

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-296033

(P2005-296033A)

(43) 公開日 平成17年10月27日(2005. 10. 27)

(51) Int. Cl.⁷

A 6 1 M 1/36

B 0 1 J 20/22

F I

A 6 1 M 1/36

5 4 5

A 6 1 M 1/36

5 4 3

B 0 1 J 20/22

C

テーマコード (参考)

4 C 0 7 7

4 G 0 6 6

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2004-111963 (P2004-111963)

(22) 出願日 平成16年4月6日(2004. 4. 6)

(71) 出願人 000003159

東レ株式会社

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

(72) 発明者 小屋松 祐一

神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株

式会社基礎研究所先端融合研究所内

(72) 発明者 吉澤 あすか

神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株

式会社基礎研究所先端融合研究所内

(72) 発明者 井田 伸夫

神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株

式会社基礎研究所先端融合研究所内

Fターム(参考) 4C077 AA05 BB03 EE01 GG15 KK13

MM03 NN04 NN20 PP02 PP12

PP13 PP15 PP29

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 体液浄化用吸着材

(57) 【要約】

【課題】 体液中のH M G B 1を高い効率で吸着除去し、かつ白血球、血小板などの生体反応に必要な血液細胞は除去しない性質を持つ吸着材。

【解決手段】 アニオン性の官能基が水不溶性担体に固定化されてなるH M G B 1の吸着体で、体液中のH M G B 1を高い効率で吸着し、かつ白血球または血小板の少なくともいずれかを実質的に吸着しないことを特徴とする体液浄化用吸着材。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アニオン性の官能基が水不溶性担体に固定化されてなる H M G B 1 の吸着体で、体液中の H M G B 1 を高い効率で吸着し、かつ白血球または血小板の少なくともいずれかを実質的に吸着しないことを特徴とする体液浄化用吸着材。

【請求項 2】

アニオン性の官能基が水不溶性担体に固定化されてなる H M G B 1 の吸着体で、体液中の H M G B 1 を高い効率で吸着し、かつ白血球および血小板のいずれも実質的に吸着しないことを特徴とする体液浄化用吸着材。

【請求項 3】

H M G B 1 を含有する体液を接触させた際に、H M G B 1 の吸着率が 5 0 % 以上であり、かつ白血球および血小板の吸着率がいずれも 2 0 % 以下であることを特徴とする、請求項 1 - 2 いずれかに記載の体液浄化用吸着材。

【請求項 4】

前記不溶性担体に固定されているアニオン性基がスルホン酸基または硫酸エステル基であることを特徴とする、請求項 1 - 3 いずれかに記載の体液浄化用吸着材。

【請求項 5】

前記水不溶性担体がビーズ状の形状を持つことを特徴とする請求項 1 - 4 いずれかに記載の体液浄化用吸着材。

【請求項 6】

前記水不溶性担体がビーズ状の形状を持ち、その平均粒径が 5 0 ~ 1 0 0 0 μ m の範囲にあることを特徴とする請求項 5 記載の体液浄化用吸着材。

【請求項 7】

請求項 1 - 6 のいずれかに記載の体液浄化用吸着材を充填してなる体液浄化用カラム。

【請求項 8】

体液中に H M G B 1 が検出される疾患に用いられる請求項 7 記載の体液浄化用カラム。

【請求項 9】

前記疾患が敗血症であることを特徴とする請求項 8 記載の体液浄化用カラム。

【請求項 10】

請求項 1 - 6 のいずれかに記載の吸着材と体液とを接触させて、体液中の H M G B 1 を該吸着材に吸着させることを含む体液中の H M G B 1 の除去方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、体液中の H M G B 1 タンパクを吸着する吸着材およびそれを用いた体液浄化カラムに関するものである。本発明は、ヒト体液中の H M G B 1 を除去することにより、敗血症などの病態を改善させる用途に好適に用いられる。

【背景技術】

【0002】

H M G B 1 タンパク（ハイモビリティーグループボックスタンパク 1，H M G - 1 と呼ばれる）は、真核細胞内に存在する非ヒストン性の D N A 結合タンパクであり、本来細胞内で D N A に結合して転写の促進や細胞の増殖などの機能に関与する細胞内タンパクの一つである。

【0003】

最近、この H M G B 1 が細胞外に分泌され、敗血症ショックの強力なメディエーターとして作用するという報告がなされた（たとえば、非特許文献 1 参照）。すなわち、マウスにリボポリサッカライド（L P S）を投与すると 8 - 2 4 時間後に血清中の H M G B 1 濃度が顕著に上昇しマウスは死に至る。精製した H M G B 1 自体を L P S と同時にマウスに投与した場合も相乗的に作用して致死活性を示すことから、H M G B 1 がエンドトキシンショックの重要なメディエーターとなることが示された。ヒトにおいても、敗血症患者血

10

20

30

40

50

中でH M G B 1濃度が顕著に上昇し、特に死亡例において高いことが示された。このため、患者血液中に存在するH M G B 1の除去あるいは活性中和により、敗血症などのH M G B 1の細胞外産生を伴う炎症性疾患を治療しうる可能性が示唆されている。また、H M G B 1は癌の転移やリウマチ等の自己免疫疾患にも関与しているとの報告もある。血液中のH M G B 1を除去する方法として、H M G B 1と結合する性質を持つ官能基を固定化した吸着材が報告されている。(W O O 1 / 0 7 4 4 2 0。) H M G B 1は、分子内にアニオン性のアミノ酸が30個程度連続して存在するカルボキシ末端領域があり、この部分でカチオン性の材料とイオン性相互作用で結合することが予想され、実際アミノ基を有する材料に効率よく吸着することが示されている。しかし、一方カチオン性の官能基は、白血球などの血液細胞との相互作用が強いことが知られており、このため全血を流した場合には、H M G B 1だけでなく、生体の防御反応に必要な白血球、血小板などの血液細胞も吸着材により吸着除去されてしまうという問題点があった。

10

【非特許文献1】ワン(W a n g H)他18名、「マウスにおけるエンドトキシン侵襲の後期メディエーターとしてのH M G - 1 (H M G - 1 a s a l a t e m e d i a t o r o f e n d o t o x i n l e t h a l i t y i n m i c e)」、(米国)、サイエンス(Science)、1999年、285巻、p248-251

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

上述のように、体液中のH M G B 1は敗血症などの疾患の病態と密接に関連することが示されており、体液中のH M G B 1を高い効率で吸着除去し、かつ白血球、血小板などの生体反応に必要な血液細胞は除去しない性質を持つ吸着材の開発が強く望まれている。

20

【課題を解決するための手段】

【0005】

かかる課題を解決するため検討を行った結果、本発明者らは、硫酸基、硫酸エステル基などのアニオン性基を固定化した吸着材が、H M G B 1を高い効率で吸着するが、血球細胞を吸着しないことを見だし、本発明に到達した。すなわち、本発明は以下のような構成を有する。

(1)アニオン性の官能基が水不溶性担体に固定化されてなるH M G B 1の吸着体で、体液中のH M G B 1を高い効率で吸着し、かつ白血球または血小板の少なくともいずれかを実質的に吸着しないことを特徴とする体液浄化用吸着材

30

(2)アニオン性の官能基が水不溶性担体に固定化されてなるH M G B 1の吸着体で、体液中のH M G B 1を高い効率で吸着し、かつ白血球および血小板のいずれも実質的に吸着しないことを特徴とする体液浄化用吸着材

(3)H M G B 1を含有する体液を接触させた際に、H M G B 1の吸着率が50%以上であり、かつ白血球および血小板の吸着率がいずれも20%以下であることを特徴とする、

(1)-(2)いずれかに記載の体液浄化用吸着材

(4)前記不溶性担体に固定されているアニオン性基が硫酸基または硫酸エステル基であることを特徴とする、(1)-(3)のいずれかに記載の体液浄化用吸着材

(5)前記水不溶性担体がビーズ状の形状を持つことを特徴とする(1)-(4)のいずれかに記載の体液浄化用吸着材

40

(6)前記ビーズ状の水不溶性担体の平均粒径が50~1000μmの範囲にあることを特徴とする(5)記載の体液浄化用吸着材

(7)(1)-(6)のいずれかに記載の体液浄化用吸着体を充填してなる体液浄化用カラム

(8)血液中にH M G B 1が検出される疾患に用いられる(7)記載の体液浄化用カラム

(9)前記疾患が敗血症であることを特徴とする(7)記載の体液浄化用カラム

(10)(1)-(6)のいずれかに記載の吸着材と体液とを接触させて、体液中のH M G B 1を該吸着材に吸着させることを含む体液中のH M G B 1の除去方法

【発明の効果】

50

【 0 0 0 6 】

本発明により、体液中の有用な血球成分を除去せずに、生体に好ましくない細胞外の H M G B 1 を除去することが可能になる。

【発明を実施するための最良の形態】

【 0 0 0 7 】

本発明の吸着材は、アニオン性の官能基が固定化された水不溶性担体からなり、血液、血漿、リンパ液、組織間液、腹水、滑膜液などの体液中に含まれる H M G B 1 を高い効率で吸着しかつ白血球または血小板の少なくともいずれかを実質的に吸着しないことを特徴とする。H M G B 1 を高い効率で吸着するとは、例えば直径 0 . 7 c m、流路長 2 . 4 c m の円筒状のカラムに 2 m l の吸着材を充填し H M G B 1 を含む全血を 1 ~ 2 m l / 分の流量で通過させた際に、カラムに流入した H M G B 1 のうちの 5 0 % 以上が吸着されることをいい、好ましくは 7 0 % 以上、さらに好ましくは 9 0 % 以上が吸着されることをいう。また白血球または血小板を実質的に吸着しないとは、同条件でカラムに流入した白血球または血小板を 2 0 % 以下しか吸着されないことをいい、好ましくは 1 5 % 以下より好ましくは 1 0 % 以下しか吸着されないことをいう。水不溶性担体に固定化されたアニオン性官能基としては、カルボキシル基、スルホン酸基、硫酸エステル基、リン酸基などの官能基が用いられる。特に、H M G B 1 の吸着性能が高いスルホン酸基または硫酸エステル基を固定化した担体が吸着材として望ましい。これらの官能基は、単独でも組み合わせても採用することができる。上述した官能基の密度は特に限定されないが、官能基が固定化された水不溶性担体の乾燥重量 1 g あたりの官能基の数（複数の官能基がある場合にはそれらの合計）が $1 \mu \text{mol} \sim 1 \text{mmol}$ 程度が好ましく、さらに好ましくは $10 \mu \text{mol} \sim 1 \text{mmol}$ 程度である。水不溶性担体に固定化されている官能基の数は、例えば元素分析を行うことにより決定できる。本発明に用いられる水不溶性担体の材料は、本発明に用いられる不溶性担体の材料は、ポリアミド、ポリイミド、ポリ（芳香族ビニル化合物）、ポリエステル、ポリメチルメタクリレート、ポリスルホン、ポリエチレン、ポリビニルアルコール、ポリテトラフルオロエチレンなどの合成高分子や、セルロース、コラーゲン、キチン、キトサン、デキストランおよびそれらの誘導体を含む天然高分子、などが好適に用いられる。さらに、金属、セラミックス、ガラスなどの無機材料を適当な高分子で被覆したり、表面を直接修飾したのも好適に用いられる。

【 0 0 0 8 】

本発明の材料の形状は、繊維状、中空糸状、ビーズ状、平膜状、粉状などを用いることができるが、特に血球と血漿を分離せずにカラムに循環する全血体外循環にも適した、繊維状、中空糸状あるいはビーズ状のものが好ましく用いられる。H M G B 1 の吸着率を上げるには、接触面積の大きい多孔性の材料が好ましい。また、ビーズとしては、カラムに充填した際の圧損が少なくかつ表面積の大きいものが良いので、粒径が $50 \sim 1000 \mu \text{m}$ のものが好ましく、 $100 \sim 700 \mu \text{m}$ のものがさらに好ましい。粒径は、例えばコールターカウンターを用いることにより測定できる。ここでいうビーズとは、形状が球状であり、真球度が 0 . 7 以上であるものをいい、好ましくは 0 . 8 以上、より好ましくは 0 . 9 以上であるものをいう。真球度とは最短径（短径）と最長径（長径）との比（短径 / 長径）で定義され、この値が 1 . 0 に近づくほど真球度が高いことを意味する。例えば、上記のようなアニオン性の官能基が水不溶性担体に固定化されてなる H M G B 1 の吸着体で、体液中の H M G B 1 を高い効率で吸着し、かつ白血球または血小板の少なくともいずれかを実質的に吸着しないことを特徴とする体液浄化用吸着材として、具体的には、粒径が $50 \sim 1000 \mu \text{m}$ の範囲にあり、硫酸エステルを導入した球状セルロースのビーズが挙げられる。

【 0 0 0 9 】

このようなビーズは、セルロース粉末をチオシアン酸カルシウム溶液に溶解し、得られた液をソルビタンモノオレートを含む O - ジクロロベンゼンに滴下・攪拌することで球状セルロースを作製した後、得られた球状セルロースと N , N' - ジメチルホルムアルデヒド 3 酸化硫酸塩複合体を混合したのち、アルカリ溶液で中和し蒸留水で洗浄することで製

10

20

30

40

50

造することができる。

【0010】

本発明の材料のカラムへの充填方法は、繊維状材料であれば、織物、編物、不織布など布状の形態にして積層充填して、あるいは孔のあいた中空の中心パイプの周りに巻き付けて液を内側から外側に透過させる方法などが用いられる。

【0011】

本発明の材料はカラムに充填することでH M G B 1除去用体液浄化用カラムとして用いることが出来る。本発明の吸着材充填したカラムを用いてH M G B 1を含む患者の体液を体外循環の方法で透過させることにより、敗血症などの疾患の治療を行うことが出来る。本吸着材を充填したカラムは細菌成分を吸着する血液浄化カラムと合わせて用いることにより、特に高い治療効果を得ることが期待できる。さらには、本吸着材はガン、自己免疫疾患などの治療にも好適に用いられ得る。

10

【実施例】

【0012】

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが本発明の範囲はこれらの実施例に限定されるものではない。

(実施例1)

インビトロでのヒト血液通過実験

セルロース粉末をチオシアン酸カルシウム溶液に加え、100に加熱して溶解した。得られた液を130に加熱したソルビタンモノオレートを含むO-ジクロロベンゼンに滴下し、攪拌することで造粒した。その後常温まで冷却し、メタノールを数回に分けて滴下することで洗浄したのち、大量の水で洗浄することで球状セルロースを得た。得られた球状セルロースとN, N'-ジメチルホルムアルデヒド3酸化硫酸塩複合体を20分×70

20

および5時間×50にて混合したのち、アルカリ溶液で中和し蒸留水で洗浄することで硫酸化エステル基を導入した球状セルロースを得た。

得られた硫酸エステル基を硫黄原子含量として2.9%の密度で含有する平均粒子径224μmのセルローズビーズ2mlを直径0.7cm、流路長2.4cmの円筒状のカラムに充填し、20mlの生理食塩水で洗浄した。このカラムに、500μg/mlの精製H M G B 1溶液を2500分の1容量および抗凝固剤として3.8%クエン酸ナトリウムを1/10容量添加した正常ヒト全血を1ml/分の流量で通過させ、通過後の血液を1mlずつチューブに回収した。回収した血液は、直ちに血球計数器(日本光電製)を用いて白血球数および血小板数の測定を行った。

30

H M G B 1濃度の定量は、血液サンプルを遠心分離して得た血漿画分をサンプルとして、E L I S A法により行った。

【0013】

【表 1】

【表 1】

HMGB 1 濃度			
通過液量 (mL)	カラム通過前の血液 (ng/mL)	カラム通過後の血液 (ng/mL)	吸着率 (%)
0	326.6	0.3	99.9
4	326.6	0.3	99.8

10

白血球数			
通過液量 (mL)	カラム通過前の血液 (個/ μ L)	カラム通過後の血液 (個/ μ L)	吸着率 (%)
0	5300	5000	5.6
4	5300	5100	3.8

20

血小板数			
通過液量 (mL)	カラム通過前の血液 (個/ μ L)	カラム通過後の血液 (個/ μ L)	吸着率 (%)
0	176000	166000	5.7
4	176000	169000	4.0

30

【0014】

循環開始直後、4 mL の血液通過後のいずれにおいても、HMGB 1 の吸着率は 99 % 以上の高い数値であり、かつ白血球または血小板の吸着率は 6 % 以下と低いレベルであった。

(実施例 2)

ラット体外循環実験

生理食塩水で 10 mg/mL に希釈した LPS を、オス、8 週齢の Wistar 系ラット（体重 300 g）に 150 μ L（投与量 5 mg/kg）静脈内投与した。LPS 投与後 6 時間経過した時点で、上記実施例 1 のカラムを用いて体外循環を行った。体外循環は循環流量 2 mL/分で行い、循環時間を 30 分とした。血液サンプルは循環中のカラムの入側と出側にて 0 分（循環開始時）、30 分（循環終了時）のタイミングで 1 mL ずつチューブに回収した。回収した血液には抗凝固剤として 3.8 % クエン酸ナトリウムを 1/10 容量添加し、直ちに血球計数器（日本光電製）を用いて白血球数および血小板数の測定を行った。HMGB 1 濃度の定量は、血液サンプルを遠心分離して得た血漿画分をサンプルとして、ELISA 法により行った。

40

【0015】

【表 2】

【表 2】

HMGB1 濃度			
通過液量 (mL)	カラム通過前の血液 (ng/mL)	カラム通過後の血液 (ng/mL)	吸着率 (%)
0	24.4	4.3	82.4
30	17.2	4.3	75.0

10

白血球数			
通過液量 (mL)	カラム通過前の血液 (個/ μ L)	カラム通過後の血液 (個/ μ L)	吸着率 (%)
0	2700	2600	3.7
30	2900	2700	6.9

20

血小板数			
通過液量 (mL)	カラム通過前の血液 (個/ μ L)	カラム通過後の血液 (個/ μ L)	吸着率 (%)
0	20.6	20.6	0
30	21.1	20.6	2.4

30

【0016】

循環開始直後、30分後（循環終了時）のいずれにおいても、HMGB1の吸着率は50%以上を保っており、かつ白血球または血小板の吸着率は20%以下に抑えられていた。

フロントページの続き

F ターム(参考) 4G066 AA47B AB05B AB15B AC02C AD01B AD04B BA20 BA36 CA54 DA11
FA03 FA11 FA26