

博士学位論文 2023 年度

メトヘモグロビンの結合特性に着目した
多機能性製剤の開発

慶應義塾大学大学院薬学研究科

鈴木悠斗

本論文で使用した主な略語一覧表

A/G ratio	アルブミン/グロブリン比	Albumin/globulin ratio
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ	Alanine aminotransferase
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	Aspartate aminotransferase
ATP	アデノシン三リン酸	Adenosine triphosphate
AUC	血中濃度-時間曲線下面積	Area under the blood concentration curve
BUN	血中尿素窒素	Blood urea nitrogen
CcO	シトクロム <i>c</i> オキシダーゼ	Cytochrome <i>c</i> oxidase
CD	円二色性	Circular Dichroism
CL	クリアランス	Clearance
CRE	クレアチニン	Creatinine
<i>ctO₂</i>	総酸素濃度	Total oxygen concentration in blood
CXCL1	ケラチノサイト由来ケモカイン	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
CXCL2	マクロファージ炎症性タンパク質	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
D-BIL	直接ビリルビン	Direct bilirubin
DLS	動的光散乱法	Dynamic light scattering
DMEM	ダルベッコ改変イーグル培地	Dulbecco's Modified Eagle Medium
F.D.	凍結乾燥	Freeze-dried
FBS	ウシ胎児血清	Fetal bovine serum
FDA	米国食品医薬品局	Food and Drug Administration
Fe	血清鉄	Serum iron
GSH/GSSG	酸化型/還元型グルタチオン比	GSH-to-GSSG ratio
GSH	還元型グルタチオン	Reduced glutathione
GSSG	酸化型グルタチオン	Oxidized glutathione
Hb	ヘモグロビン	Hemoglobin
HCO ₃ ⁻	重炭酸イオン	Bicarbonate
HE	ヘマトキシリン・エオジン	Hematoxylin-Eosin
HSA	ヒト血清アルブミン	Human serum albumin
H ₂ S-metHAC	硫化水素結合型メトヘモグロビン アルブミンクラスター	Hydrogen sulfide bound methemoglobin-albumin clusters
I-BIL	間接ビリルビン	Indirect bilirubin
IEF	等電点電気泳動	Isoelectric focusing
IFN- γ	インターフェロン- γ	Interferon-gamma
IL-1 β	インターロイキン-1 β	Interleukin 1 beta
IL-6	インターロイキン-6	Interleukin 6
IRI	虚血再灌流障害	Ischemia-reperfusion Injury
K _p	組織-血漿間分配係数	Tissue-to-plasma partition coefficient
<i>K</i>	平衡定数	Equilibrium constant
MCP-1	単球走化性タンパク 1	Monocyte chemoattractant protein-1

MDA	マロンジアルデヒド	Malondialdehyde
metHAC	メトヘモグロビンアルブミン クラスター	methemoglobin–albumin clusters
metHb+3HSA	メトヘモグロビンと 3 倍モル量の アルブミンの混合物	Methemoglobin with three–fold molar human serum albumin
metHb	メトヘモグロビン	Methemoglobin
metRBC	メト化赤血球	Methemoglobin–rich red blood cells
MMP	ミトコンドリア膜電位	Mitochondrial membrane potential
mOsm	血漿浸透圧	Osmotic pressure
MPO	ミエロペルオキシダーゼ	Myeloperoxidase
MRT	平均滞留時間	Mean residence time
Na ₂ S ₂ O ₃	チオ硫酸ナトリウム	Sodium thiosulfate
NaCN	シアン化ナトリウム	Sodium cyanide
NADH	ニコチンアミドアデニン ジヌクレオチド	Nicotinamide adenine dinucleotide
NaHS	硫化水素ナトリウム	Sodium hydrosulfide
NaNO ₂	亜硝酸ナトリウム	Sodium nitrite
Native–PAGE	非変性ポリアクリルアミド ゲル電気泳動	Native–polyacrylamide gel electrophoresis
<i>n</i>	ヒル係数	Hill coefficient
<i>p</i> 50	酸素飽和度 50%での酸素分圧	Oxygen affinity
PBS	リン酸緩衝食塩水	Phosphate-buffered saline
PDI	多分散指数	Polydispersity index
PLT	血小板	Platelet
<i>p</i> O ₂	酸素分圧	Partial pressure of oxygen
RBC	赤血球	Red blood cells
ROS	活性酸素種	Reactive oxygen species
SEC	サイズ排除クロマトグラフィ	Size exclusion chromatography
SMP	3–マレイミドプロピオン酸 <i>N</i> –スクシンイミジル	<i>N</i> –succinimidyl 3–maleimidopropionate
<i>s</i> O ₂	酸素飽和度	Oxygen saturation
T _{1/2}	消失半減期	biological half–life
TBARS	2-チオバルビツール酸反応性物質	2-thiobarbituric acid reactive substances
T–BIL	総ビリルビン	Total bilirubin
TIBC	総鉄結合能	Total iron binding capacity
TNF–α	腫瘍壊死因子	Tumor Necrosis Factor–α
TP	総タンパク	Total protein
UIBC	不飽和鉄結合能	Unsaturated iron binding capacity
V	分布容積	Distribution volume of central– compartment
WBC	白血球	White blood cells

本論文は学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

1. Methemoglobin-albumin clusters for the treatment of hydrogen sulfide intoxication
Journal of Controlled Release., 349, 304-314 (2022)
Yuto Suzuki, Kazuaki Taguchi, Wataru Okamoto, Yuki Enoki, Teruyuki Komatsu, Kazuaki Matsumoto
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.07.001>
2. Pharmaceutical integrity of lyophilized methemoglobin-albumin clusters after reconstitution
ACS Omega., 8, 25, 22589-22595 (2023)
Yuto Suzuki, Kazuaki Taguchi, Wataru Okamoto, Yuki Enoki, Teruyuki Komatsu, Kazuaki Matsumoto
<https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01054>
3. Pharmaceutical stability of methemoglobin-albumin cluster as an antidote for hydrogen sulfide poisoning after one-year storage in freeze-dried form
International Journal of Pharmaceutics., 645, 123433 (2023)
Yuto Suzuki, Kazuaki Taguchi, Wataru Okamoto, Yuki Enoki, Teruyuki Komatsu, Kazuaki Matsumoto
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123433>
4. Methemoglobin-albumin clusters for cyanide detoxification
Toxicology and Applied Pharmacology., 466, 116472 (2023)
Yuto Suzuki, Kazuaki Taguchi, Wataru Okamoto, Yuki Enoki, Teruyuki Komatsu, Kazuaki Matsumoto
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2023.116472>

目次

第1章 緒言	1
第2章 metHAC の作製及び硫化水素中毒解毒剤としての有用性評価.....	5
第1節 序	5
第2節 結果	6
2-1. metHAC の作製及び物理化学的特性評価.....	6
2-2. metHAC の硫化水素捕捉性 (結合性) 評価	8
2-3. NaHS 曝露に対する metHAC の細胞保護効果	10
2-4. 硫化水素中毒モデルマウスにおける metHAC の治療効果	13
2-5. metHAC の体内動態評価	17
2-6. metHAC の安全性評価.....	20
第3節 考察	27
第4節 小括	30
第3章 metHAC の凍結乾燥注射剤としての開発.....	31
第1節 序	31
第2節 結果	32
2-1. 凍結乾燥粉末 metHAC の再溶解後の性状評価	32
2-2. 凍結乾燥粉末 metHAC の再溶解後の硫化水素結合能評価	35
2-3. 凍結乾燥粉末化 metHAC の <i>in vivo</i> 有効性評価.....	37
2-4. 長期保存後の凍結乾燥 metHAC の性状評価	38
2-5. 長期保存後の凍結乾燥 metHAC の再溶解後の製剤安定性評価.....	43
2-6. 長期保存後の凍結乾燥 metHAC の <i>in vivo</i> 有効性評価.....	46
2-7. 長期保存後の凍結乾燥 metHAC の <i>in vivo</i> 安全性評価.....	48
第3節 考察	50
第4節 小括	52
第4章 適応拡大に向けた metHAC のシアン中毒解毒剤としての有効性評価.....	53
第1節 序	53
第2節 結果	54
2-1. metHAC のシアン捕捉性 (結合性) 評価.....	54
2-2. NaCN 曝露に対する metHAC の細胞保護効果.....	55
2-3. シアン中毒モデルマウスにおける metHAC の治療効果.....	58
第3節 考察	62
第4節 小括	63

第5章 H ₂ S-metHAC の硫化水素送達体としての応用.....	64
第1節 序	64
第2節 結果	66
2-1. H ₂ S-metHAC の作製及び物理化学的特性評価.....	66
2-2. H ₂ S-metHAC からの硫化水素放出性評価	68
2-3. H ₂ S-metHAC 最大耐用量の決定.....	69
2-4. 肝虚血再灌流障害に対する H ₂ S-metHAC の有効性評価	70
2-5. H ₂ S-metHAC の安全性評価	76
第3節 考察	82
第4節 小括	84
第6章 総括	85
実験の部	87
第2章に関する実験.....	87
第3章に関する実験.....	93
第4章に関する実験.....	96
第5章に関する実験.....	98
謝辞.....	102
参考文献	103

第1章 緒言

硫化水素は、特有の腐卵臭を有する性質から嗅覚を通してその存在を確認することができるガスであり、火山や温泉など天然に存在する。自然界に加え、硫化水素は石油精製場や化学工場などの産業利用による場面、さらにはマンホール内や排水溝でも発生しており、人々の生活に身近なガスである¹⁻³。この硫化水素は有毒ガスの一つであり、高濃度の曝露により急性中毒を引き起こし、度々死亡事故にもつながっている。硫化水素中毒の発現メカニズムとして、硫化水素がミトコンドリアのシトクロム *c* オキシダーゼ (CcO) に結合し、電子伝達が阻害され、酸素を利用したエネルギー産生 (ATP 産生) が停止する結果、速やかに中毒症状が引き起こされる⁴ (Fig. 1)。軽症の場合は頭痛、めまい、嘔吐などを引き起こし、重症では意識喪失や呼吸停止を経て最終的に死に至る。実際に、年間数人から数十人の下水処理作業員がマンホール内で吸入して死亡していることや、2008年には年間1000件以上の自殺手段としても利用されており、大きな社会問題となっている^{5,6}。しかしながら、現状硫化水素中毒に対する承認を受けた解毒剤は一切存在しておらず³、有望な新規硫化水素中毒解毒剤の創製が望まれる。

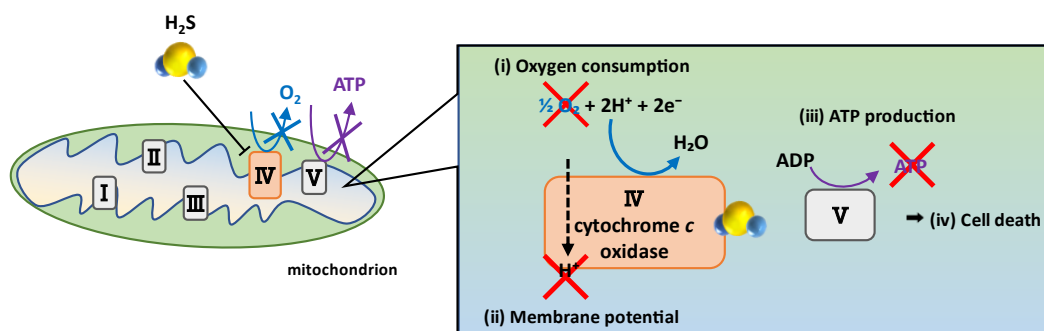


Fig. 1. Overview of the toxic mechanism of hydrogen sulfide

硫化水素は強力な毒性が注目されているが、近年の研究において微量ながら生体内で産生されていることが報告された⁷。生体内において硫化水素はシステインやメチオニンといった硫黄原子を含むアミノ酸を原料として酵素 (cystathionine γ -lyase、cystathionine β -synthase、3-mercaptopyruvate sulfurtransferase) を介して産生され、血管平滑筋の弛緩や神経調節などシグナル分子として生体恒常性の維持に寄与している^{8,9}。上述のシグナル伝達作用のみならず硫化水素は抗酸化作用や抗炎症作用など多彩な生理活性作用を有しており¹⁰、外因的な硫化水素の低濃度曝露が酸化ストレスから細胞を保護し、虚血再灌流障害や炎症性腸疾患などの創薬シーズとして有用であることが報告されている^{11,12}。こうした事実から、硫化水素製剤の開発研究が進められており、その一部は臨床試験が実施されるほど将来的な創薬への利用が大きく期待されている¹³。現在、硫化水素は既存の医療ガスの供給方法を模倣した硫化水素吸入療法や硫化水素ナトリウム (NaHS) などの低分子硫化水素供与体を利用することで生体内に供給されている。一方で、吸入療法や低分子製剤では組織選択性が無く全身に拡散することに加え、吸入療法に関しては吸入時のみ有効であることや

低分子製剤は半減期が短いことなど、持続的な硫化水素供給を達成するために頻回投与または長時間吸入を必要とすることから¹⁴⁻¹⁶、*in vivo* への応用に苦慮している。また、前述のように硫化水素は生理活性作用だけでなく強力な毒性を有しているため、高濃度や大量投与、過度な頻回投与を行うことはできない。このように、難治性疾患治療に向けた硫化水素製剤の開発が進められているが、硫化水素の医薬品への利用には大きなハードルが存在するため、未だ有望な治療システムの構築には至っておらず、新たなシステムの開拓・探索が強く望まれる。

メトヘモグロビン (metHb) はヘモグロビン (Hb) が含有する二価のヘム鉄が三価になった酸化型 Hb であり、Hb を構成する 4 つのグロビン鎖に 1 つずつ三価ヘム鉄を含有する約 64 kDa のヘムタンパクである。生体内では、還元状態 [二価 (2+)] の鉄に酸素を結合することで Hb が全身組織への酸素運搬を担っているのに対し、metHb には酸素結合能がないため、グルタチオン (GSH) やニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) といった生体内還元物質によって通常は 0.5% 以下に厳密に制御されている¹⁷。一方で興味深い特徴として、metHb は硫化水素と高い結合親和性を有する¹⁸。このことから、metHb を硫化水素の解毒に活用するため、亜硝酸ナトリウム (NaNO₂) が解毒剤として臨床で利用される場面が存在する¹⁹。これは、NaNO₂ が血中で酸化剤として Hb を metHb に変換し、CcO に結合する硫化水素を競合的に metHb に捕捉させることで解毒を試みている。元来、NaNO₂ はシアン中毒解毒剤としてアメリカ食品医薬品局 (FDA) より承認されており、硫化水素がシアン同様に CcO を阻害することで強力な毒性を示すこと、また、metHb と高い親和性を有することに倣い、NaNO₂ は硫化水素中毒の解毒にも適用外で利用されている。しかしながら、Hb のメト化に時間を要する NaNO₂ は急性毒性を示す硫化水素に対して効果が不十分である側面が存在する。また、NaNO₂ は酸素運搬に利用している内因性の Hb の一部を酸素運搬の無い metHb に変換するため、低酸素血症を惹起するといった重大な副作用も存在する²⁰。そのため、NaNO₂ を解毒に使用する際は血中の metHb 量を常にモニタリングしながら投与量を調節しなければならず、急性中毒解毒剤への利用には非常に煩雑な医療行為となる。このように、実臨床での有効性が見込めながらも使用時の潜在的なリスクが存在するため、NaNO₂ は硫化水素中毒の解毒剤として承認されていないのが現状である。

これまでに metHb の結合特性に関する研究が行われており、硫化水素やシアンは高い親和性をもって結合する一方で、その結合は pH 依存的な可逆性を示し、低 pH 環境で解離が進むことが示されている²¹。この事実に着目し、metHb が高濃度の硫化水素曝露時に硫化水素と結合して捕捉する「硫化水素中毒解毒剤」として機能するとともに、metHb に硫化水素を付加した硫化水素結合型 metHb は硫化水素の解離を利用した「硫化水素送達体」の有望なマテリアルとして利用できることに着想した。しかしながら、metHb を単体で硫化水素送達体に利用するためには 2 つの重大な問題が存在する。一つ目が腎障害の惹起である²²。Hb は速やかに 2 量体に解離し、腎臓で糸球体濾過を受ける。糸球体に蓄積したヘムは活性酸素種 (ROS) を生じ、腎障害が引き起こされる。二つ目に、動態特性である。

metHbを含めたHbは生体内に単体で存在した場合、速やかにハプトグロビンと結合して肝臓に運ばれることで血中から除去されるため、極端に半減期が短い(～2 h)。このような機構は、溶血などで赤血球(RBC)からHbが漏出した場合でも速やかに血中からクリアランスされ、腎障害が回避される生体防御機構として存在しているが、metHbの製剤利用としては負の側面となる。このことから、metHbを創薬マテリアルとして利用するには製剤加工が必要である。

これまでに、ポリエチレングリコール修飾型Hbや重合型Hb、Hb内包リポソームなど様々なHbを基盤とした人工酸素運搬体の開発が進められている^{22,23}。このうちの一つに、Hbの周囲をヒト血清アルブミンで被覆したヘモグロビン-アルブミンクラスターが近年開発された²⁴。ヘモグロビン-アルブミンクラスターは、血漿中に最も多く存在するタンパク質であるアルブミンをリンカーを介してHbに結合することでHb単体利用での問題点である血中滞留性の悪さ及び腎障害の誘発を改善している^{25,26}。また、生体由来のタンパク質を構成要素としているため、生体適合性が高く安全性に優れている点も利点の一つである。このコンセプトに着想を得て、Hbではなく、metHbをアルブミンで被覆したメトヘモグロビン-アルブミンクラスター(metHAC)を作製すれば、ヘモグロビン-アルブミンクラスター同様に血中滞留性の悪さや腎障害を回避した新たなmetHb製剤になるのではないかと考えた。具体的には、「硫化水素解毒剤」としての利用に際し、metHACはmetHbを直接投与するため、NaNO₂利用で問題となるmetHbの産生に要する時間は必要なく、迅速な解毒が可能になると推測される。また硫化水素結合型metHAC(H₂S-metHAC)の「硫化水素送達体」としての利用において、H₂S-metHACは既存の硫化水素ドナーの投与や硫化水素の直接吸入と比較して、低pH部位に対して効率的に硫化水素を送達できると考えられる(Fig. 2)。

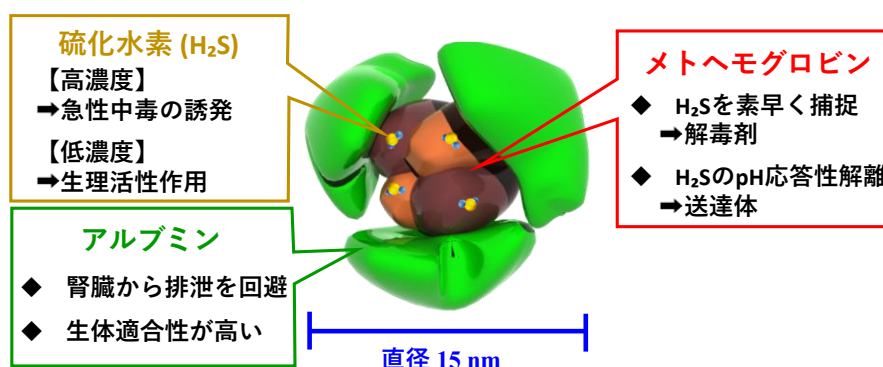


Fig. 2. Structure of metHAC and its promising functions.

このような背景の下、本研究では新規 metHb 製剤である metHAC を作製し、「硫化水素中毒解毒剤」及び「硫化水素送達体」としての有用性を評価した (Fig. 3)。まず第 2 章において、metHAC を作製し、硫化水素中毒解毒剤としての有効性を評価した。また、健常マウスを用いて体内動態や安全性評価も実施した。次に第 3 章では、将来的な臨床への応用を見据えて metHAC の製剤としての長期安定性を含む保存性を評価した。さらに第 4 章では、metHAC の解毒剤としての適応症拡大を目指し、シアン中毒に対する有用性について検討した。第 5 章では、metHAC の硫化水素送達体としての可能性を検討するべく、metHAC に硫化水素を付加した H_2S -metHAC を作製し、製剤特性及び肝虚血再灌流障害に対する有用性評価を実施した。以下に得られた知見を詳述する。

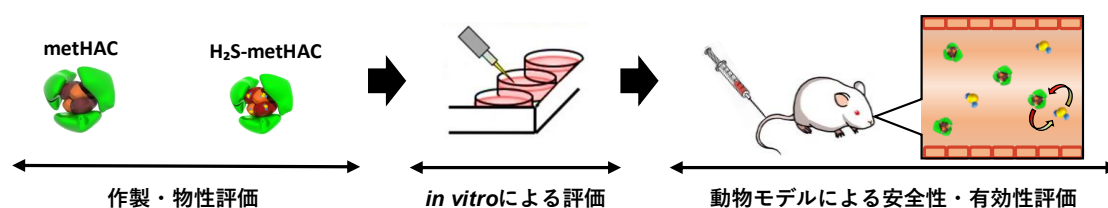


Fig. 3. Schematic diagram of the study.

第2章 metHAC の作製及び硫化水素中毒解毒剤としての有用性評価

第1節 序

硫化水素の毒性は人を短時間で死亡させるほど非常に強力であるにもかかわらず、硫化水素の発生源から離れることや防護服を着用するなどして曝露を回避する以外に有効な硫化水素中毒の予防手段は存在しないことに加え、中毒発症後の治療・解毒を目的とした承認医薬品は一切存在しない⁵。

metHb は硫化水素と高い結合親和性を有することが報告されており、硫化水素中毒解毒剤としてのポテンシャルを有する。metHb を産生する NaNO_2 は、承認された解毒薬がなく、治療選択肢が存在しない現状において、適用外ながらも院内製剤として硫化水素中毒患者の治療に使用された症例も存在する^{27,28}。しかしながら、 NaNO_2 はメト化に一定時間を要するため²⁹、急性毒性を示す硫化水素中毒の解毒に遅れが生じて有効性が低下する欠点が存在する。加えて、 NaNO_2 は RBC 中の Hb を酸素運搬能のない metHb に酸化することから、低酸素血症を惹起する懸念がある中で、ミトコンドリアの酸素利用阻害を起点とする硫化水素毒性に相加して症状がさらに深刻化する可能性があり、安全使用にも問題を抱えている。 NaNO_2 ではなく、metHb の直接的な利用も考えられるが、metHb 単体ではハプトグロビンに捕捉されることで血中から速やかに除去されてしまう不十分な血中滞留性により十分な治療効果が期待できないことに加え、腎臓で糸球体濾過を受ける過程でヘムに起因した腎障害を誘発する問題点が存在する²²。

ヘモグロビン-アルブミンクラスターは Hb に共通する血中滞留性や安全性の問題点を克服した Hb 製剤である。この特徴を活かして、Hb ではなく metHb をアルブミンで被覆した metHAC を設計・作製すれば、 NaNO_2 や metHb の問題点を改善した新たな製剤として提示することができ、承認された解毒剤が存在しない硫化水素中毒に対する治療薬の確立につながると考えた。

そこで本章では、まず metHAC を創製し、物理化学特性を含めた構造評価及び UV-Vis. スペクトル変化による硫化水素捕捉能を評価し、新規製剤としての特性を理解するとともに、硫化水素中毒解毒剤としてのポテンシャルを検討した。次に、硫化水素がミトコンドリアを阻害することで毒性発現することを考慮し、細胞実験において硫化水素曝露に対する metHAC 存在下でのミトコンドリア機能保護を介した細胞生存率への寄与を評価した。また、*in vitro* での結果が実際の生体における硫化水素中毒状態で解毒能を発揮することを確認するため、致死性硫化水素中毒状態のマウスを用いて硫化水素中毒解毒剤としての metHAC の有効性を生存率や CcO 活性保護の観点から metHb 単体や NaNO_2 と比較検討した。さらに、metHAC の硫化水素中毒解毒剤として開発に必要な metHAC の体内動態特性や安全性を血液ガスパラメータ、生化学パラメータ及び組織染色などから総合的に評価した。

第2節 結果

2-1. metHAC の作製及び物理化学的特性評価

アルブミンは 35 個のシステイン残基を有しており、それらが 17 個の分子内ジスルフィド結合を構成している。唯一遊離チオール (SH) 基を有する 34 位のシステイン残基に対し、クロスリンカーである *N*-succinimidyl 3-maleimidopropionate (SMP) を介して Hb の表面に位置するリジン残基を結合することで、ヘモグロビン-アルブミンクラスターは作製されている。このヘモグロビン-アルブミンクラスターに NaNO_2 を添加することで Hb を metHb に酸化し、metHAC を作製した (Fig. 4)。

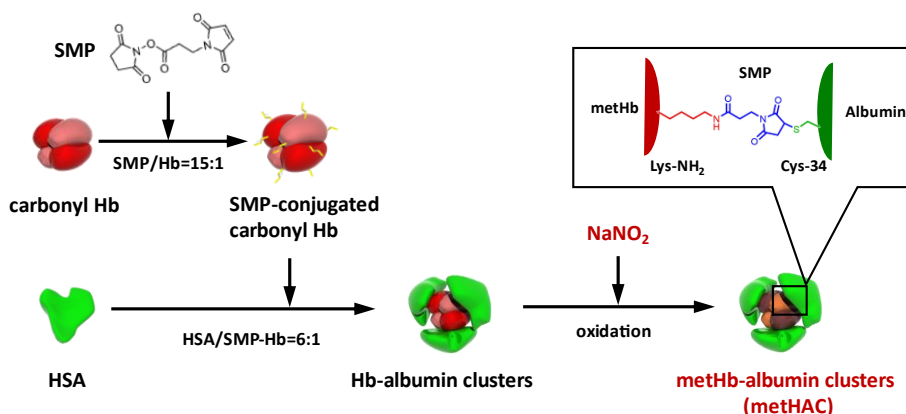


Fig. 4. Preparation process of metHAC.

metHAC はヘモグロビン-アルブミンクラスターを基盤として設計・作製された新規製剤である。そのため、構造を含めた metHAC 固有の物理化学特性を評価する必要がある。このことを確認すべく、構造学的観点から metHAC の物理化学特性を評価した。まず、動的光散乱法 (DLS) を用いて得られた粒度分布から、metHAC は粒子径 14.27 ± 0.17 nm、多分散指数 (PDI) 0.12 ± 0.02 の単分散であり、均一のナノ製剤であった (Fig. 5a, Table 1)。また、metHAC の等電点及びゼータ電位はアルブミンの表面特性と類似していた (Fig. 5b, Table 1)。

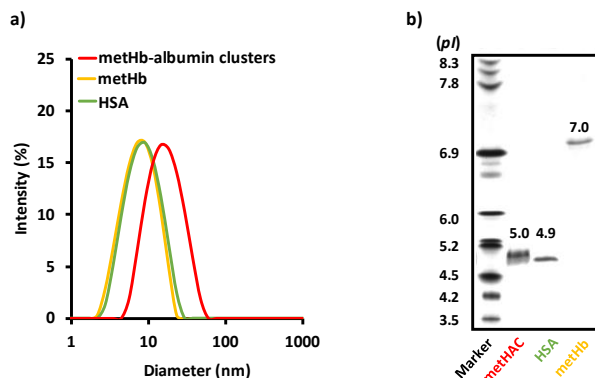


Fig. 5. a) Size distribution and b) image of isoelectric focusing (IEF) of metHAC, metHb, and HSA. HSA; human serum albumin

Table 1. Physicochemical characteristics of metHAC, metHb, and HSA.

	Diameter (nm)	PDI	ζ-potential (mV)
metHAC	14.27 ± 0.17	0.12 ± 0.02	-3.19 ± 0.25
metHb	6.43 ± 0.21	0.13 ± 0.03	-5.45 ± 0.17
HSA	7.36 ± 0.11	0.09 ± 0.03	-2.83 ± 0.05

PDI; polydispersity index, HSA; human serum albumin (n = 3, mean ± S.D.)

metHAC は中心に位置する metHb にリンカーを介してアルブミンが結合されている。作製した metHAC をサイズ排除クロマトグラフィ (SEC) により評価した結果、複数のピークを示すクロマトグラムが得られ、それらはアルブミン単体や metHb 単体のピークとは一致しなかった (Fig. 6a)。また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE) を行ったところ、SEC の結果同様に複数のバンドが確認され、metHb に結合するアルブミンの数が異なる粒子が混合状態で存在していると考えられた。またバンドの位置から、1 分子の metHb にアルブミンが 1 分子から最大で 6 分子程度結合していると推定された (Fig. 6b)。さらに、円二色性 (CD) スペクトルを測定した結果、metHAC は 1 分子の metHb に平均で 3 分子のアルブミンが結合していると考えられた (Fig. 6c)。

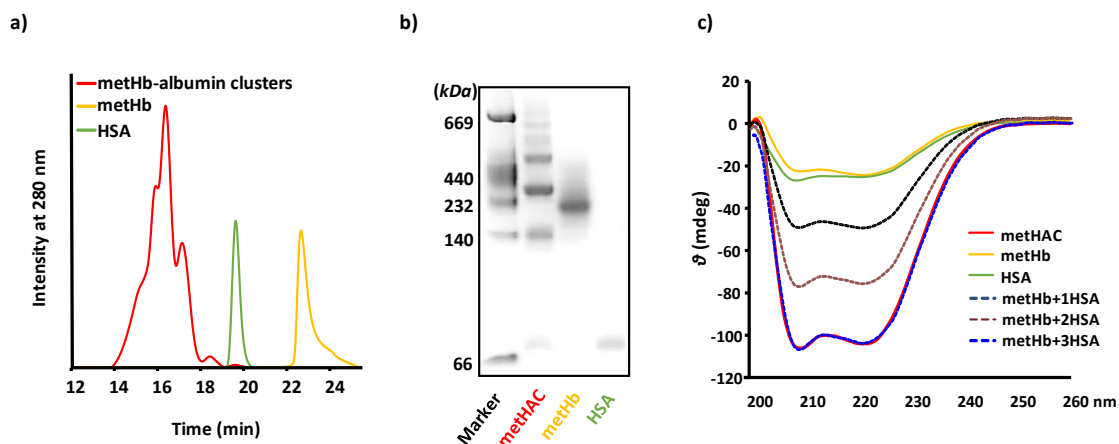


Fig. 6. a) Representative SEC profiles, b) image of Native-PAGE, and c) CD spectra of metHAC, metHb, and HSA. HSA; human serum albumin

2-2. metHAC の硫化水素捕捉性 (結合性) 評価

metHb を硫化水素中毒解毒剤として利用するコンセプトは、metHb が有する三価の鉄のヘムに硫化水素を結合させることで解毒を試みることである。metHAC の metHb はリジン残基を介してアルブミンのシステイン残基とリンカーにより結合しているため、理論上は解毒中心となるヘムの結合に影響しない。しかしながら、アルブミンによる立体障害や予期しない因子の存在による metHb と硫化水素の結合阻害も懸念される。metHb は、ヘムに硫化水素が結合すると吸収スペクトルが変化し、結合物質に応じて固有の吸収極大波長を示す性質を有する。そこで、硫化水素ドナーである NaHS を用いて metHAC と硫化水素の結合特性を UV-Vis. スペクトル変化により評価した。metHb に NaHS を添加した結果、ピーク波長が 406 nm から 426 nm にシフトした (Fig. 7a)。同様のスペクトル変化が metHAC においても確認され、metHAC は硫化水素結合能を保持していることが示された (Fig. 7b)。これらの結合特性を定量的に評価するため、スペクトル変化を利用して結合パラメータ (平衡定数 K 、ヒル係数 n) を算出した (Fig. 8)。その結果、metHAC の K 及び n は metHb 単体よりもわずかに小さい値となった (Table 2)。アルブミンが存在することによる結合への影響が考えられたため、metHb にアルブミンを結合させず、metHb 単体に 3 倍モル比のアルブミンを混合した溶液 (metHb+3HSA) においても検討を行ったが、スペクトル変化及び結合パラメータは metHb 単体の結果とほぼ一致した (Fig. 7c, 8, Table 2)。

硫化水素中毒重症状態では、代謝性アシドーシスの進行により生体内が低 pH 状態に変化することが予想される。そこで、低 pH 環境にて metHAC の硫化水素結合性を評価した。その結果、pH6.8, 6.2 の低 pH 環境では pH7.4 と比較して metHAC の結合定数が低下した。この低下は、metHb 単体及び metHb+3HSA においても同様に確認され、metHb に起因する特性であると考えられた (Table 2)。

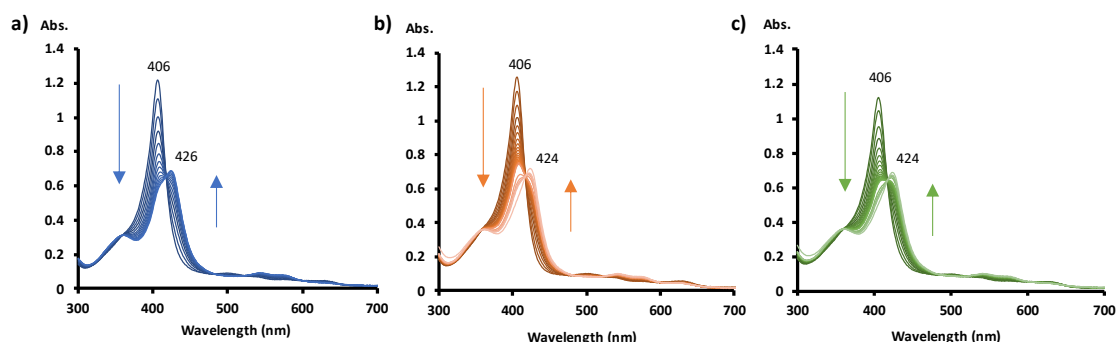


Fig. 7. UV-Vis. spectral changes on addition of NaHS solution.

Representative UV-Vis. spectra changes of a) metHb, b) metHAC, and c) metHb+3HSA (metHb with three-fold molar human serum albumin) after gradual NaHS addition. All samples were adjusted to 2 μ M as metHb in 100 mM phosphate buffer at pH7.4 and NaHS solution was gradually added at a molar ratio of 0.2 to the samples.

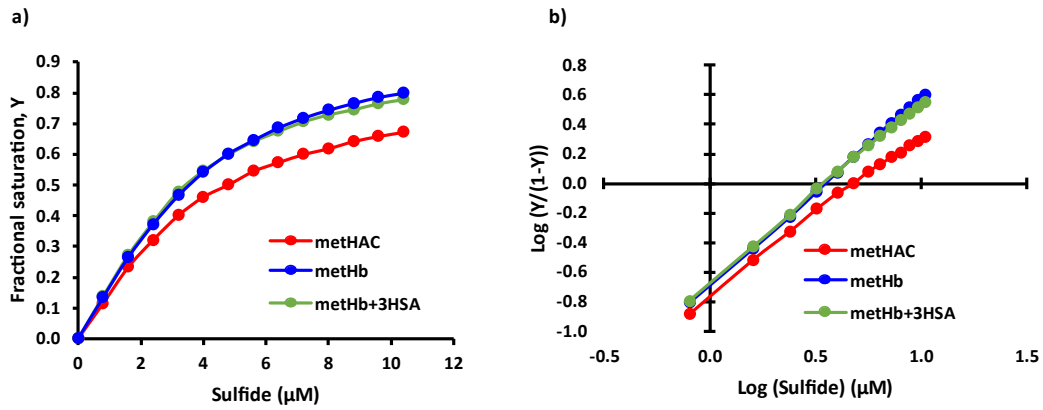


Fig. 8. a) Equilibrium curves and (b) Hill plots of metHAC, metHb, and metHb+3HSA with hydrogen sulfide at pH7.4.

Table 2. Binding characteristics of metHAC, metHb, and metHb+3HSA with hydrogen sulfide.

	$K \times 10^6 \text{ (M}^{-1}\text{)}$			n		
	metHb	metHAC	metHb + 3HSA	metHb	metHAC	metHb + 3HSA
pH 7.4	0.26 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.23 ± 0.01	1.30 ± 0.02	1.08 ± 0.01	1.25 ± 0.03
pH 6.8	0.18 ± 0.01	0.08 ± 0.004	0.20 ± 0.01	1.16 ± 0.01	0.91 ± 0.04	1.18 ± 0.004
pH 6.2	0.09 ± 0.01	0.04 ± 0.002	0.09 ± 0.01	0.99 ± 0.01	0.81 ± 0.02	1.01 ± 0.01

K ; equilibrium constant, n ; Hill coefficient, metHb+3HSA; metHb with three-fold molar human serum albumin ($n = 3$, mean $\pm$ S.D.)

2-3. NaHS 曝露に対する metHAC の細胞保護効果

◆ 細胞生存率評価による metHAC の細胞保護効果の検討

硫化水素の毒性発現は、細胞内に侵入してミトコンドリア内膜に存在する CcO に結合することが起点となる。CcO は metHb 同様に三価の鉄を含有するヘムタンパクであり、硫化水素と親和性が高い。硫化水素の結合による CcO の阻害は Complex IV での電子伝達を阻害し、酸素利用が停止される。それに伴ってプロトンの移動が制限されることでミトコンドリア膜電位が低下し、ATP 産生が阻害されることで細胞死が誘導される。そこで、まず NaHS 曝露に対する metHAC 存在下での細胞生存率を評価した。その結果、曝露する NaHS の濃度に依存した細胞死が確認されたのに対し、metHAC の存在によって細胞生存率が上昇した。また、metHAC の添加濃度の増大に応じて抑制効果は大きくなった (Fig. 9)。既存の NaNO₂ を用いた解毒では生体内の RBC 内の Hb を metHb に変換したメト化赤血球 (metRBC) を解毒剤として利用している。そこで、ポジティブコントロールとして metRBC を添加したところ、metHAC の細胞保護効果は metRBC 同等であった (Fig. 10a-c)。また、ネガティブコントロールであるヘモグロビン-アルブミンクラスター群の結果から、metHAC の細胞保護効果はアルブミンではなく metHb に由来したものであることも示された (Fig. 10a-c)。

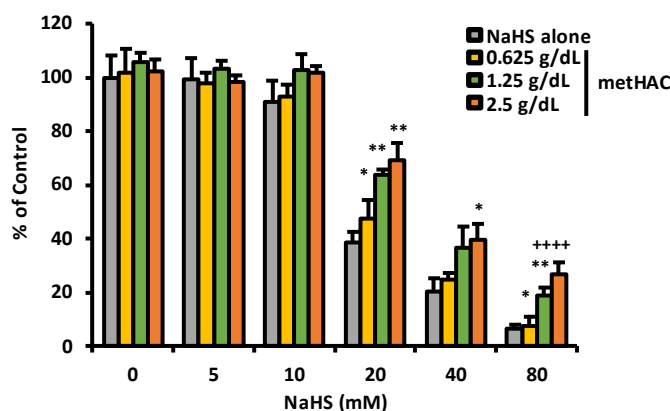


Fig. 9. The viability of NaHS-exposed H9c2 cells in the presence of metHAC in a dose-dependent manner.

NaHS solution and various concentration of metHAC solution were added to each well and incubated for 1 h (37 °C, 100% air). Cell viabilities were determined by methylene blue assay. (n = 3, mean + S.D.) **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. NaHS alone, ++*p* < 0.01 vs. 0.625 g metHb/dL.

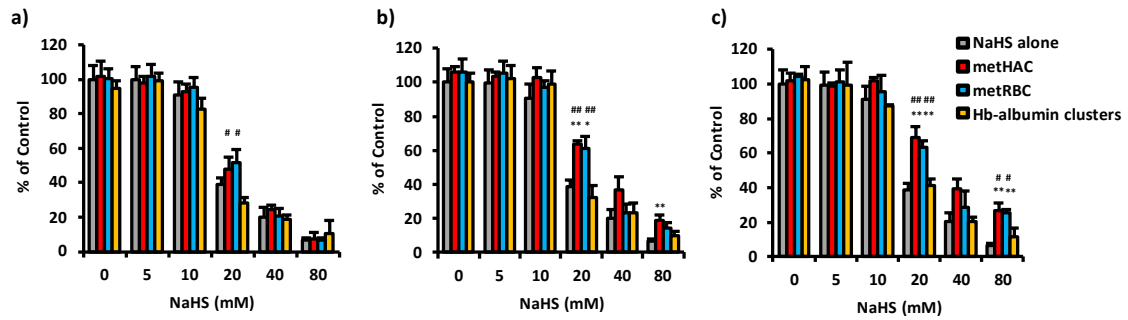


Fig. 10. The viability of NaHS-exposed H9c2 cells in the presence of methHAC, metRBC, or Hb-albumin clusters.

NaHS solution in the presence of methHAC, metRBC, or Hb-albumin clusters at **a)** 0.625 g/dL, **b)** 1.25 g/dL, **c)** 2.5 g/dL was added to each well and incubated for 1 h (37 °C, 100% air). Cell viabilities were determined by methylene blue assay. (n = 3, mean + S.D.) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. NaHS alone, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Hb-albumin clusters.

◆ 酸素消費量評価による methHAC のミトコンドリア保護効果の検討

NaHS 曝露に対する methHAC の細胞生存率上昇がミトコンドリアを保護することで細胞保護効果を発揮しているかを評価するため、NaHS 曝露した細胞の酸素消費量変化を検討した。その結果、NaHS の単独曝露及びヘモグロビン-アルブミンクラスター添加群では酸素消費が大きく抑制されているのに対し、methHAC 及び metRBC 添加群では NaHS 曝露していない Control 群と同等程度に酸素消費が行われていることが確認された (Fig. 11a, b)。

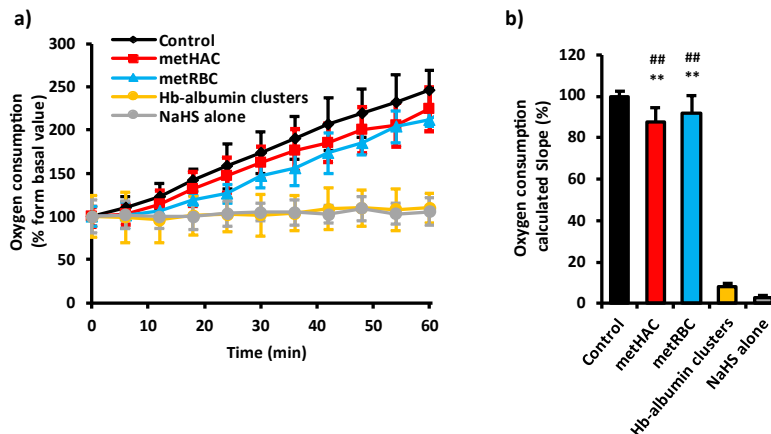


Fig. 11. a) Oxygen consumption profiles and b) calculated slope of NaHS-exposed H9c2 cells in the presence of methHAC, metRBC, or Hb-albumin clusters.

Cells were exposed to 2.5 mM NaHS in the presence of methHAC, metRBC, and Hb-albumin clusters and incubated for 1 h (37 °C, 100% air). The samples of methHAC, metRBC, and Hb-albumin clusters were set 2.5 g/dL as metHb or Hb. (n = 3, mean + S.D.) ** $p < 0.01$ vs. NaHS alone, ## $p < 0.01$ vs. Hb-albumin clusters.

◆ 膜電位評価による metHAC のミトコンドリア保護効果の検討

ミトコンドリア膜電位についても評価した結果、酸素消費量の結果と同様に NaHS の単独曝露及びヘモグロビン-アルブミンクラスター添加群では膜電位が大きく低下しているのに対し、metHAC 及び metRBC 添加群ではその低下が抑制されていた (Fig. 12)。これらの細胞実験における結果を総合すると、NaHS 曝露に対する metHAC の細胞保護効果は metHAC 中の metHb が硫化水素を捕捉し、酸素を消費しながらミトコンドリアの活性を維持させることで、ATP 産生の阻害を抑制し、細胞生存率の低下につながる細胞保護効果を発揮したと考えられた。

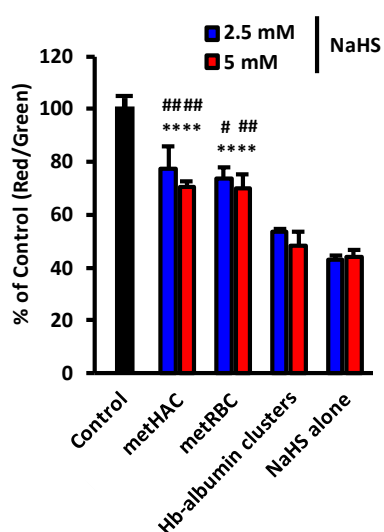


Fig. 12. Mitochondrial membrane potential of NaHS-exposed H9c2 cells in the presence of metHb-albumin clusters, metRBC, or Hb-albumin clusters.

Cells were exposed to 5 mM or 2.5 mM NaHS in the presence of metHAC, metRBC, and Hb-albumin clusters and incubated for 1 h (37 °C, 100% air). The samples of metHAC, metRBC, and Hb-albumin clusters were set 2.5 g/dL as metHb or Hb. (n = 3, mean + S.D.) ** $p < 0.01$ vs. NaHS alone, # $p < 0.05$, ### $p < 0.01$ vs. Hb-albumin clusters.

2-4. 硫化水素中毒モデルマウスにおける metHAC の治療効果

◆ NaHS 致死量の決定

9 週齢 ddY 系雌性マウスを用いて NaHS 溶液皮下投与時における致死量を評価した。その結果、30 mg/kg において 90%以上の個体が死亡した (Table 3)。この結果より、NaHS 溶液を皮下投与で 30 mg/kg 投与したマウスを致死性硫化水素中毒モデルマウスとして使用することにした。

Table 3. Determination of Lethal Dose of NaHS solution subcutaneously administered in mice.

Dose (mg/kg)	n	Alive	Dead	Mortality (%)
17	5	5	0	0
21	5	3	2	40
25	10	6	4	40
27.5	10	6	4	60
30	17	1	16	95

◆ 致死性硫化水素中毒モデルマウスに対する metHAC の最適投与量の検討

metHAC を硫化水素中毒解毒剤として利用するにあたり、まず最適投与量を検討した。致死性硫化水素中毒モデルマウスに metHAC を治療薬として投与したときの生存率を評価した。その結果、Saline 投与群では 100%が死亡したのに対し、metHAC 投与群では投与量依存的な治療効果が確認され、500 mg metHb/kg において 100%の生存率を示した (Fig. 13)。この結果から、500 mg metHb/kg を最適投与量に決定した。

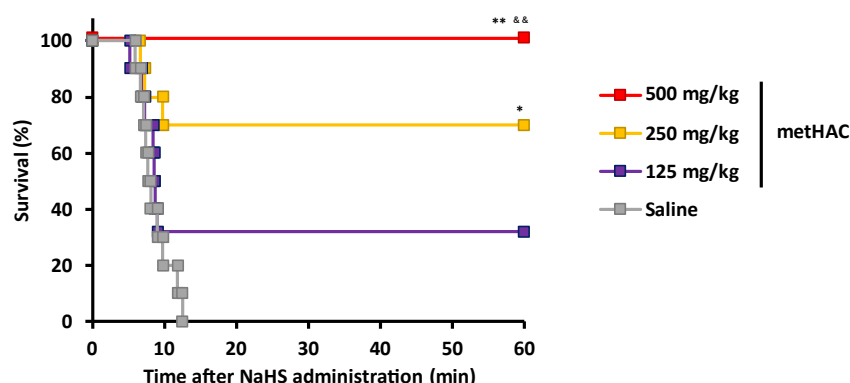


Fig. 13. Determination of optimal dose of metHAC in lethal hydrogen sulfide poisoning mice.

At 3 min after the subcutaneous exposure of NaHS solution (30 mg/kg), either saline or various dose of metHAC (125, 250 and 500 mg metHb/kg) was injected in lethal hydrogen sulfide poisoning model mice (n = 10/group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Saline, && $p < 0.01$ vs. 125 mg metHb/kg of metHAC.

◆ 生存率評価による metHAC の有効性の検討

metHAC の有効性を比較するため、対照群として metHb 単体群、NaNO₂ 群、ヘモグロビン-アルブミンクラスター群を設定し、致死硫化水素中毒状態のマウスに治療薬として投与したときの生存率を評価した。その結果、ネガティブコントロールであるヘモグロビン-アルブミンクラスター (500 mg Hb/kg) 群においては生存率が 10%となった。また、metHAC (500 mg metHb/kg) と metHb の投与量を揃えた metHb (500 mg metHb/kg) 単体群では 30%の生存にとどまり、生体内で metHb を産生する NaNO₂ 群においても 10%の生存率となった (Fig. 14)。

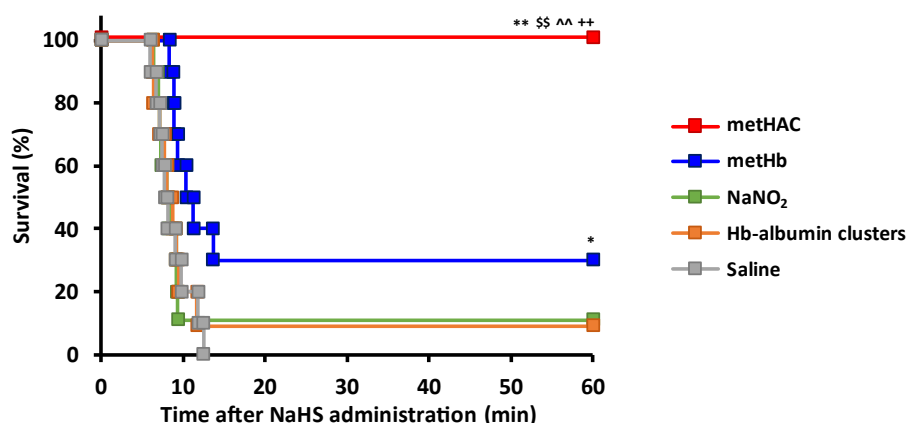


Fig. 14. Survival rate of lethal hydrogen sulfide poisoning mice after treatment with metHAC.

At 3 min after the subcutaneous exposure of NaHS solution (30 mg/kg), either saline, metHAC (500 mg metHb/kg), metHb (500 mg/kg), NaNO₂ (8.5 mg/kg), or Hb-albumin clusters (500 mg Hb/kg) was injected in lethal hydrogen sulfide poisoning model mice (n = 10/group). $^{ss}p < 0.01$ vs. Hb-albumin clusters, $^{^}p < 0.01$ vs. metHb, $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ vs. Saline, $^{++}p < 0.01$ vs. NaNO₂.

◆ CcO 活性評価による metHAC の有効性の検討

硫化水素中毒は、硫化水素が CcO に結合してその活性を阻害することで毒性が発現する。そこで、致死性硫化水素中毒モデルマウスに metHAC を治療薬として投与し、主要臓器の CcO 活性を評価した。その結果、Control 群と比較して NaHS 曝露後 (3 min) の活性は低下しており、治療効果のない Saline 群では今回評価したすべての臓器において活性がさらに低下していた (Fig. 15a–e)。一方で、metHAC 投与群では活性が維持されており、特に心臓、肺、脳において顕著であった (Fig. 15c–e)。また、それらの抑制効果は NaNO₂ 群よりも優れており、Fig. 14 に示した生存率の結果と一致した。

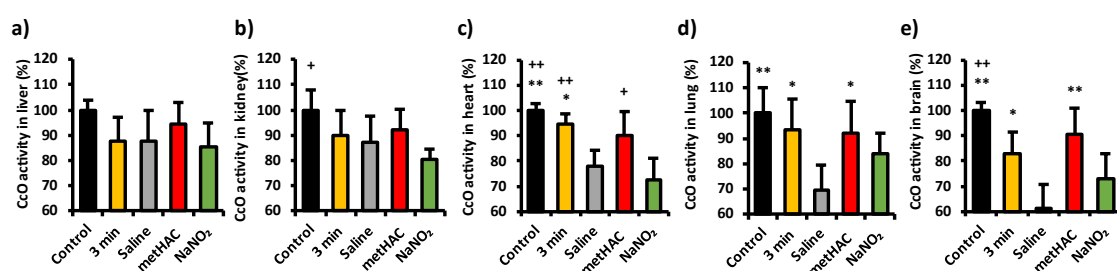


Fig. 15. CcO activity in the a) liver, b) kidney, c) heart, d) lung, and e) brain after antidotal treatment in lethal hydrogen sulfide poisoning model mice.

At 3 min after the subcutaneous exposure of NaHS solution (30 mg/kg), either saline, metHAC (500 mg methHb/kg) or NaNO₂ (8.5 mg/kg) was injected in lethal hydrogen sulfide poisoning model mice. 5 min after administration of each antidote, the mice were euthanized and specific organs (liver, kidneys, heart, lungs and brain) were collected. Two NaNO₂-treated and three saline-treated mice died before sample collection. The organs from dead mice were collected immediately after the confirmation of death. (n = 5, mean + S.D.) **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. Saline, +*p* < 0.05, ++*p* < 0.01 vs. NaNO₂.

◆ 代謝性アシドーシス評価による metHAC の有効性の検討

硫化水素中毒では、CcO が失活すると、ミトコンドリアの電子伝達が停止するため、酸素を利用した好氣的エネルギー産生が阻害される。それに伴って、嫌氣的な解糖系を介した代替経路によるエネルギー産生で不足分を賄おうとする代償機構が亢進する。嫌氣的解糖系では、副産物である乳酸 (lactate) の蓄積により血液が酸性状態に傾く。そこで、致死量的硫化水素中毒モデルマウスに metHAC を治療薬として投与し、代謝性アシドーシスの指標となる血液ガスパラメータを評価した。その結果、NaHS を投与していない Control 群と比較して metHAC の投与直前 (3 min) 時点では、pH が低下するとともに、血中 lactate 濃度が上昇した。この傾向は Saline 群でさらに亢進していたのに対し、metHAC 群では大幅に改善した (Fig. 16a, b)。また、他の代謝性アシドーシスを反映するパラメータであるアニオンギャップ (anion gap)、重炭酸イオン (HCO_3^-)、ベースエクセス (base excess) についても同様の傾向が確認され、Fig. 15 に示した CcO 活性の結果と一致した (Fig. 16c–e)。

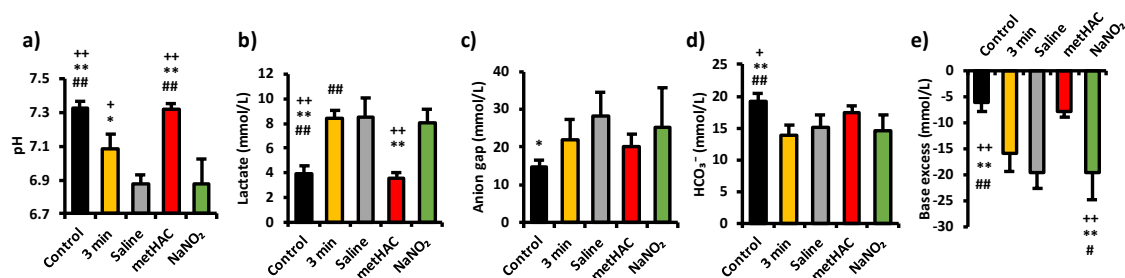


Fig. 16. Metabolic acidosis parameters in blood after antidotal treatment in lethal hydrogen sulfide poisoning model mice.

At 3 min after the subcutaneous exposure of NaHS solution (30 mg/kg), either saline, metHAC (500 mg metHb/kg) or NaNO₂ (8.5 mg/kg) was injected in lethal hydrogen sulfide poisoning model mice. 5 min after administration of each antidote, the mice were euthanized and venous blood was collected. Two NaNO₂-treated and three saline-treated mice died before sample collection. The blood from dead mice were collected immediately after the confirmation of death. Parameters of **a)** pH, **b)** lactate, **c)** anion gap, **d)** bicarbonate (HCO_3^-), and **e)** base excess were measured. (n = 5, mean ± S.D.) **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. Saline, +*p* < 0.05, ++*p* < 0.01 vs. NaNO₂.

2-5. metHAC の体内動態評価

◆ 血漿中濃度推移

ここまでの評価で、metHAC は metHb 単体の投与では達成できない優れた硫化水素中毒の解毒効果 (有効性) を発揮した。この有効性の違いを説明しうる主要な要因の一つとして動態特性の違いが関係していると考えられる。実際に、metHb 単体は血中において速やかにハプトグロビンに捕捉されて肝臓に運ばれることに加え、腎臓において糸球体濾過を受けるため、血中半減期が非常に短いことが大きな課題である。そこで、健常マウスにおけるそれぞれの体内動態評価を実施した。その結果、metHb 単体は速やかに血中から消失し、血漿中半減期 ($T_{1/2}$) 及び平均滞留時間 (MRT) はそれぞれ 2 h、1.3 h と算出された。一方で、metHAC の血中滞留性は metHb 単体と比較して非常に向上し、 $T_{1/2}$ は 15 h、MRT は 21.8 h に延長した。また、metHAC の血中滞留性はアルブミン単体と比較しても延長した (Fig. 17, Table 4)。一方で、投与 72 時間後までには大部分が血漿中から消失していた (data not shown)。

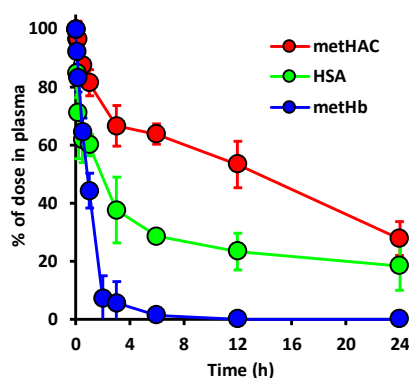


Fig. 17. Time course for the plasma level of metHAC, HSA, and metHb labeled with Cy5.

The samples were intravenously injected into healthy mice (Cy5-labeled metHAC: 500 mg metHb/kg, Cy5-labeled metHb: 500 mg metHb/kg, Cy5-labeled HSA: 1547 mg/kg). (n=3, mean $\pm$ S.D.)

Table 4. Pharmacokinetic parameters of Cy5-labeled metHAC, HSA, and metHb.

	metHAC	HSA	metHb
$T_{1/2}$ (h)	15.0	11.5	2.0
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (h·% dose/mL)	1986	1019	114
V_d (mL)	1.1	1.6	2.5
CL (mL/h)	0.05	0.10	0.87
MRT (h)	21.8	19.0	1.3

Pharmacokinetic parameters were determined using a non-compartment model by Phoenix[®] WinNonlin[®] (Version 8.2, Certara, USA) from the results of Fig. 17. $T_{1/2}$; biological half-life, AUC; area under the blood concentration curve, V_d ; distribution volume of central-compartment, CL; clearance, MRT; mean residence time. HSA; human serum albumin.

◆ 組織分布

血漿中濃度推移の結果から、metHAC と metHb 単体では血中動態が大きく異なる特性を示し、これは臓器分布の差異に依存していることが想定された。そこで、まず各組織中における metHAC の分布と血漿中濃度比を K_p 値 (組織-血漿間分配係数) で評価した。その結果、metHb 単体の K_p 値は腎臓において高い割合を示し、投与初期より血漿中から腎臓への移行性が増大していることが確認された (Table 5)。しかしながら、 K_p 値は臓器と血漿中の分布量の相対値であり、臓器分布の絶対量を評価することはできない。そこで次に、metHAC の各臓器への経時的な分布について検討した。その結果、metHb 単体は肝臓及び腎臓に高い割合で分布していたのに対し、metHAC では腎臓への高い分布は回避され、肝臓に高く分布していた (Fig. 18f)。また、この傾向はアルブミンの動態特性と類似していた (Fig. 18a-e)。一方で、この高い割合での推移は、7日後には5%以下となり14日後までにはほぼ完全に消失した (data not shown)。

Table 5. Tissue to plasma partition coefficients (K_p) in liver, spleen, kidney, heart, lung, and brain after administration of metHAC, HSA, and metHb at 1 h.

Time (h)	Organ	metHAC	HSA	metHb
1 h	liver	0.65 ± 0.10	0.71 ± 0.08	1.60 ± 0.30
	spleen	0.26 ± 0.04	0.14 ± 0.09	0.38 ± 0.22
	kidney	1.02 ± 0.22	0.67 ± 0.21	4.75 ± 0.32
	heart	0.49 ± 0.10	0.50 ± 0.24	0.66 ± 0.08
	lung	0.68 ± 0.11	0.52 ± 0.11	2.29 ± 0.33
	brain	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.01

The samples were intravenously injected into healthy mice (Cy5-labeled metHAC: 500 mg metHb/kg, Cy5-labeled metHb: 500 mg metHb/kg, Cy5-labeled HSA: 1547 mg/kg). (Each point: n=3, mean $\pm$ S.D.)

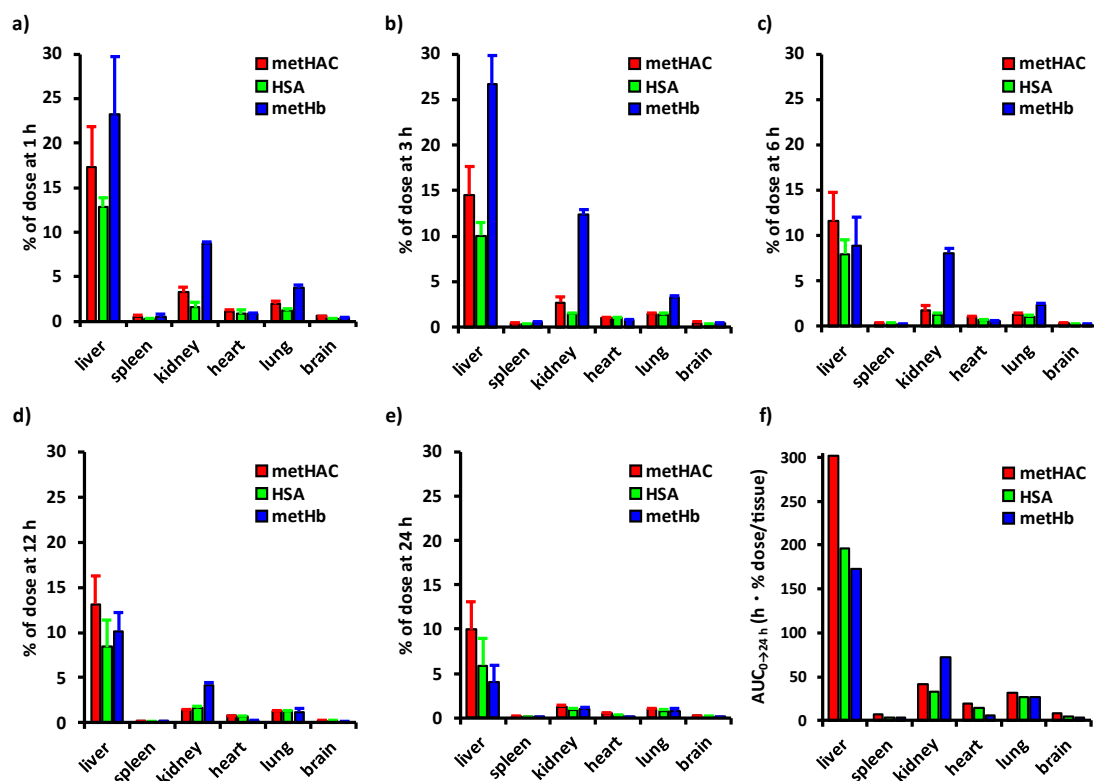


Fig. 18. Tissue distribution of Cy5-labeled methHAC, HSA, and methHb at a) 1 h, b) 3 h, c) 6 h, d) 12 h, e) 24 h, and f) AUC_{0→24 h} in each organ.

The samples were intravenously injected into healthy mice (Cy5-labeled methHb–albumin clusters: 500 mg methHb/kg, Cy5-labeled methHb: 500 mg methHb/kg, Cy5-labeled HSA: 1547 mg/kg). (n=3, mean + S.D.)

2-6. metHAC の安全性評価

◆ metHAC の生体適合性評価

ここまでの結果から metHAC の硫化水素中毒に対する十分な有効性が確認された。一方で、新たな硫化水素中毒解毒剤として使用するためには、有効性に加えて十分な安全性が担保される必要がある。そこで metHAC の安全性評価として、まず metHAC 投与による外観と体重変化を評価した。健常マウスに 500 mg metHb/kg の metHAC を投与し、14 日後まで体重変化を追跡した結果、異常行動や毛並みの変化、食欲減退に伴う体重減少は確認されず、Saline 投与群と同等に経日的に体重増加した (Fig. 19)。また、metHAC 投与後の経日的な主要臓器の重量変化についても評価したが、Saline 投与群と同等であり、異常な変化は確認されなかった (data not shown)。これら主要臓器の形態学的変化を HE 染色した組織により評価したが、metHAC 投与による形態的な異常は確認されなかった (Fig. 20)。

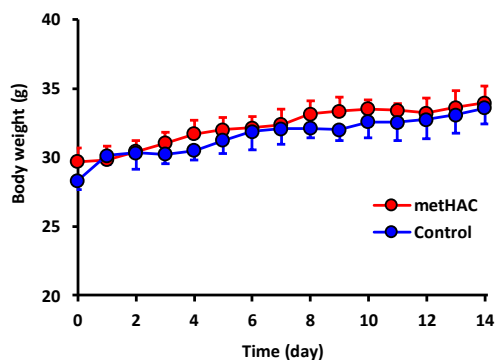


Fig. 19. Change in body weight after administration of methHAC and saline.

500 mg metHb/kg of metHAC was administered to healthy mice ($n = 20$). Four mice each were sacrificed, and biological samples were collected on day 1, 3, 7, and 14. Mice in the control group received saline and were sacrificed on day 14 ($n = 4$). Body weight of all mice was measured every day. ($n = 4-20$, mean $\pm$ S.D.)

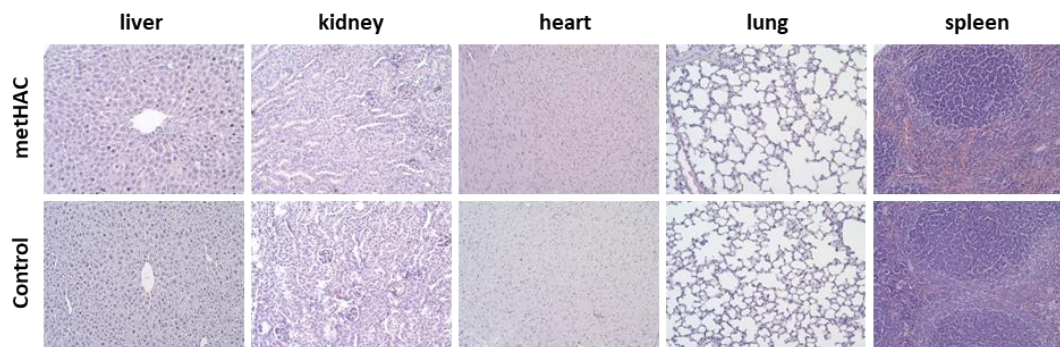


Fig. 20. Micrographs showing the organs at 1 day after methHAC administration in healthy mice.

500 mg metHb/kg of metHAC was administered to healthy mice. At 1 day after administration, organs (liver, kidneys, heart, lungs, and spleen) were collected. Saline was injected to the control group. Morphological changes were evaluated by HE stain. ($\times 200$ magnification)

◆ methHAC 投与による代謝関連臓器への影響評価

methHb 単体は肝臓及び腎臓に高く分布したのに対し、methHAC は肝臓に高い分布を示した。そこで、methHAC 投与後の肝臓及び腎臓の機能を生化学パラメータにより評価を行った。その結果、肝機能の指標となるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 及びアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) の異常な上昇は確認されなかった (Fig. 21a, b)。また、腎機能の指標である血中尿素窒素 (BUN) 及びクレアチニン (CRE) についても有意な変化は確認されなかった (Fig. 21c, d)。これらのことから、methHAC の投与は肝臓及び腎臓の機能に影響を及ぼさないと考えられた。

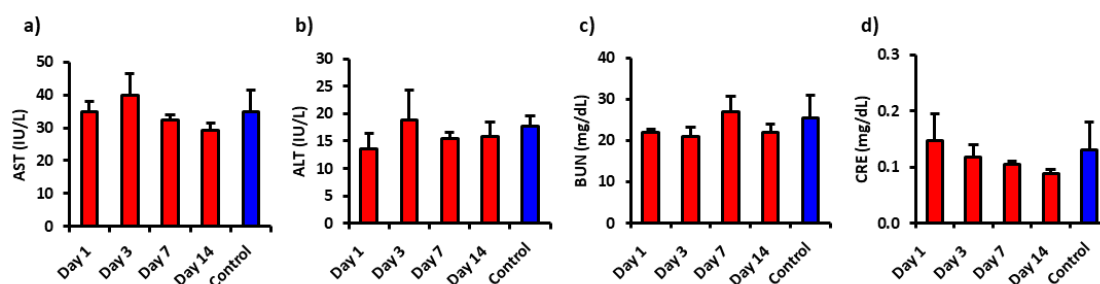


Fig. 21. Biochemical parameters in plasma reflecting liver injury and renal function.

500 mg methHb/kg of methHAC was administered to healthy mice. Blood samples were collected on day 1, 3, 7, and 14. Mice in the control group received saline and were sacrificed on day 14. Body weight of all mice was measured every day. Plasma levels of **a)** aspartate aminotransferase (AST), **b)** alanine aminotransferase (ALT), **c)** blood urea nitrogen (BUN), and **d)** creatinine (CRE) were measured. (n = 4, mean + S.D.)

◆ metHAC 投与後の構成要素の評価 (アルブミン)

アルブミンは血漿中タンパク質の 60%以上を占めており、構成要素としてアルブミンが利用されている metHAC の投与によって、血漿中のタンパク質存在比や浸透圧のバランス崩壊といった懸念がある。そこで、血漿中のタンパク質を評価した結果、metHAC 投与 1 日後において総タンパク質濃度及びアルブミン濃度が上昇した。一方で、3 日目以降はコントロールと同等水準となり、アルブミン/グロブリン比 (A/G ratio) においても変動は見られなかった (Fig. 22a-c)。また、metHAC 投与は血漿の浸透圧に影響を与えなかった (Fig. 22d)。これらの結果と体内動態の結果を考え合わせて、metHAC 投与 1 日後に確認されたパラメータの上昇は血漿中に残存する metHAC であるものの、血漿中タンパク質の存在に影響を及ぼさないと考えられた。

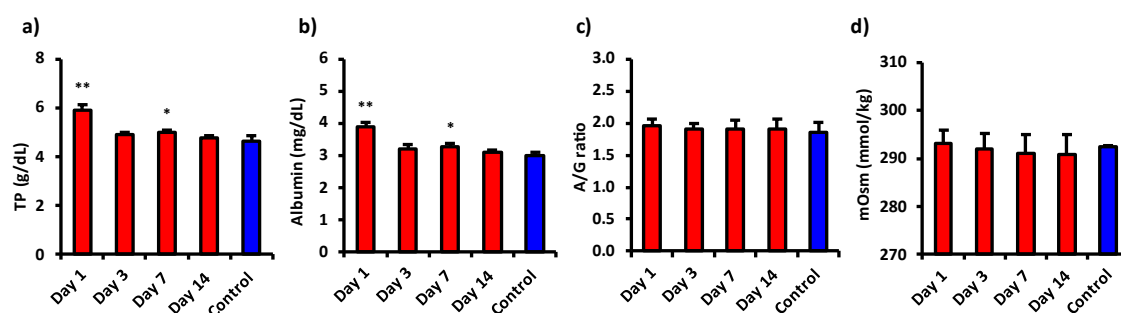


Fig. 22. Protein-related parameters in plasma after the administration of metHAC to healthy mice.

metHAC 500 mg metHb/kg was administered to healthy mice. After administration, blood was collected at the point of 1, 3, 7, and 14 days. Mice in the control group received saline and were sacrificed on day 14. Biochemical parameters of **a)** total protein (TP), **b)** albumin, **c)** albumin/globulin ratio (A/G ratio) and **d)** osmotic pressure (mOsm) in plasma were measured. (n=4, mean + S.D.) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control.

◆ methHAC 投与後の構成要素の評価 (メトヘモグロビン)

methHAC を構成する methHb が適切に代謝・排泄されない場合、ヘム含有の鉄が過剰に生体内に蓄積し、フェントン反応などによって ROS を産生することで臓器障害を惹起する可能性がある。そこで、methHb 及び鉄の代謝関連パラメータを評価した。まず、methHb の代謝物であるビリルビン関連パラメータ [直接ビリルビン (D-BIL)、間接ビリルビン (I-BIL) 及び総ビリルビン (T-BIL)] は、methHAC 投与 1 日後に methHAC の代謝に起因して一過性に上昇したが、血漿中から methHAC がほとんど消失した投与 3 日目以降において突出した変化は確認されなかった (Fig. 23a–c)。また、鉄代謝関連パラメータの血清鉄 (Fe)、不飽和鉄結合能 (UIBC) 及び総鉄結合能 (TIBC) についてもコントロールと同等の水準で推移した (Fig. 23d–f)。これらの結果から、methHAC の methHb は、適切に代謝・排泄されると考えられた。

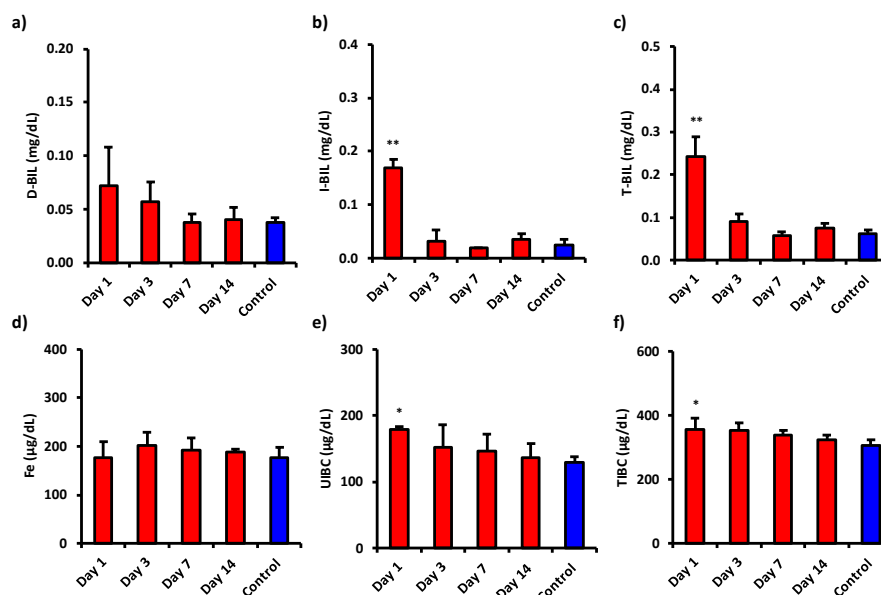


Fig. 23. Evaluation of serum parameters representing the metabolites of methHb and iron after the administration of methHAC to healthy mice.

methHAC 500 mg methHb/kg was administered to healthy mice. After administration, blood was collected at the point of 1, 3, 7, and 14 days. Mice in the control group received saline and were sacrificed on day 14. Biochemical parameters of **a)** direct bilirubin (D-BIL), **b)** indirect bilirubin (I-BIL), **c)** total bilirubin (T-BIL), **d)** serum iron (Fe), **e)** unsaturated iron binding capacity (UIBC), and **f)** total iron binding capacity (TIBC) were measured. (n=4, mean + S.D.) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control.

◆ metHAC 投与による酸化ストレスへの影響評価

metHAC 投与後の代謝産物であるヘム由来の鉄によって懸念される酸化亢進を TBARS アッセイにより主要組織における脂質過酸化を評価した。その結果、metHAC 投与後の肝臓においてマロンジアルデヒド (MDA) 上昇がみられたものの、一過性の上昇にとどまるとともに、他の主要な臓器における顕著な上昇は確認されず、酸化ストレスによる影響はないことが示唆された (Fig. 24a–g)。

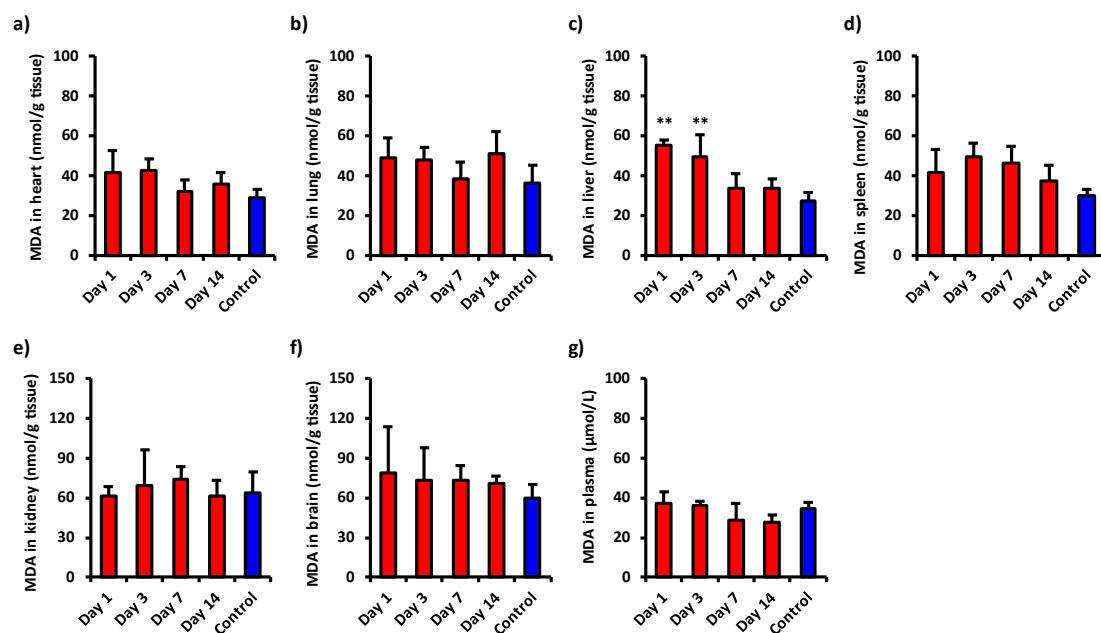


Fig. 24. The amount of MDA in each organ after administration of metHAC.

metHAC 500 mg metHb/kg was administered to healthy mice. After administration, blood and organs (heart, lung, liver, kidney, spleen, brain) were collected at the point of 1, 3, 7 and 14 days. Mice in the control group received saline and were sacrificed on day 14. Oxidative stress of lipid peroxidation was measured by TBARS assay. **a)** heart, **b)** lungs, **c)** liver, **d)** spleen, **e)** kidneys, **f)** brain, and **g)** plasma. (n=4, mean + S.D.) ** $p < 0.01$ vs. Control.

◆ metHAC 投与による炎症の評価

metHb から放出されるヘムは遊離状態で長時間存在する場合、ROS を産生することに加えて炎症性サイトカインの産生を誘導することが報告されている³⁰。そこで、metHAC 投与の炎症反応について評価した。metHAC 投与後の炎症性サイトカインである interleukin-1 β (IL-1 β)、interleukin-6 (IL-6)、interferon- γ (IFN- γ)、tumor necrosis factor- α (TNF- α) の血漿中濃度を測定した結果、今回評価した炎症性サイトカインの上昇は確認されなかった (Fig. 25a-d)。これらのことから、metHAC 投与後に炎症は誘導されないと考えられた。

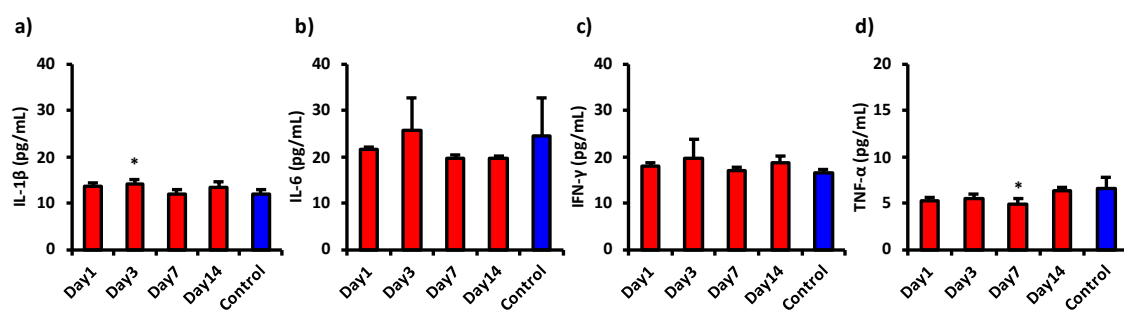


Fig. 25. Inflammatory cytokines of a) IL-1 β , b) IL-1 β , c) IFN- γ and d) TNF- α after administration of metHAC.

metHAC 500 mg metHb/kg was administered to healthy mice. After administration, blood was collected at the point of 1, 3, 7 and 14 days. Mice in the control group received saline and were sacrificed on day 14. Inflammatory cytokines in plasma were measured by ELISA. (n=4, mean + S.D.)
* $p < 0.05$ vs. Control.

◆ methHAC 投与後の血液学的検査

methHAC 投与後の生体における安全性を血液学的観点からも評価した。まず血球数について、白血球 (WBC) 及び血小板 (PLT) が一過性に減少したものの、投与 14 日後までに回復するとともに、RBC 関連パラメータの変化は確認されなかった (Fig. 26)。また、血漿中の主要な電解質であるナトリウム (Na^+) やクロライド (Cl^-)、カリウム (K^+) 濃度などについても異常な変化は確認されなかった (data not shown)。さらに、既存の硫化水素解毒で利用される NaNO_2 は RBC 中の metHb 量を増大させるため、低酸素血症を惹起する可能性が問題視されている。そこで、methHAC 投与後の酸素化 Hb 割合や酸素分圧、酸素飽和度などの酸素化の指標を評価したところ、血中の酸素量は減少しておらず、また、血液中に存在する metHb 量の増大も確認されなかった (data not shown)。これらの結果から、methHAC は NaNO_2 の投与で問題となる副作用を考慮する必要なく、硫化水素中毒が疑われる患者に対して躊躇なく利用できることが示唆された。

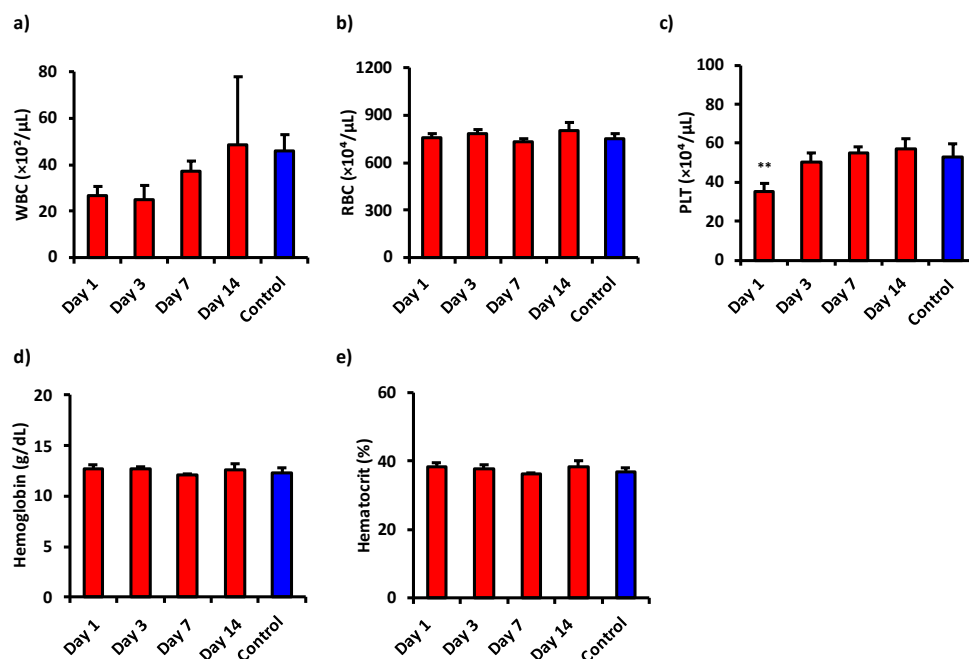


Fig. 26. Hematological parameters of a) white blood cells (WBC), b) red blood cells (RBC), c) platelet (PLT), d) hemoglobin, and e) hematocrit after administration of methHAC.

methHAC 500 mg metHb/kg was administered to healthy mice. After administration, venous blood was collected at the point of 1, 3, 7 and 14 days. Mice in the control group received saline and were sacrificed on day 14. (n=4, mean + S.D.) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control.

第3節 考察

硫化水素中毒は致死性が高いにもかかわらず、承認された解毒剤は存在せず、新薬創出への活発な研究も行われていない。硫化水素は metHb と高い結合親和性を有することが知られている。この性質を利用して、生体内の Hb を metHb に変換することでシアン中毒の解毒剤として利用されてきた NaNO_2 が硫化水素中毒患者に対しても慣例的に使用されてきた³。このことから、解毒機構の中心である metHb の硫化水素中毒解毒剤への利用は有望であるものの、metHb 単体で生体内に投与された場合に血中滞留性が低いことに加えて腎障害を惹起する懸念があり、そのまま利用できない。本章ではこれら metHb の弱点を克服することが期待できるヘモグロビン-アルブミンクラスターを基盤として metHAC を作製し、新たな硫化水素中毒解毒剤としての基礎検討を行った。

metHAC はヘモグロビン-アルブミンクラスターに酸化剤である NaNO_2 を添加することで Hb を metHb に酸化して作製した。ヘモグロビン-アルブミンクラスター同様に中心に位置する 1 分子の metHb に対して平均で 3 分子のアルブミンが結合した構造を有しており、硫化水素中毒解毒剤として最も重要な硫化水素捕捉性を保持していた。metHAC は metHb に結合するアルブミン数が異なる混合体であるが、ヘモグロビン-アルブミンクラスターの酸素結合特性において、1 分子の Hb に結合するアルブミンが 1 分子から 4 分子までそれぞれ分離したもの及び混合体は全て同等の酸素親和性を示すことが報告されており^{31,32}、metHAC においてもアルブミン結合数にかかわらず同等の硫化水素結合性を示すと考えられる。一方で、metHb 単体と比較して metHAC の硫化水素結合力の低下がみられ、アルブミンによる metHb の被覆が原因と考えられた (Table 2)。これまでに、ヘモグロビン-アルブミンクラスターにおいて Hb のリジン残基の化学修飾がサブユニットにおける四次構造の変化を抑制し、Hb 単体と比較して酸素結合の協同性が低下することが報告されている³³。metHAC においても metHb リジン残基にリンカーを修飾することによる硫化水素との結合時の構造変化に影響を及ぼした可能性がある。また、低 pH 環境では pH7.4 環境と比較して metHb 及び metHAC の硫化水素結合性の低下が確認された (Table 2)。Hb は、酸素親和性の高い R 状態と親和性の低い T 状態の 2 状態を取り、様々な生体内因子の変化に応答して状態転移する。特に、低 pH 環境に応答して Hb がプロトン化されることで T 状態に変化して酸素親和性が低下し (Bohr 効果)³⁴、組織深部などの毛細血管内まで酸素運搬を可能にしていることを考慮すると、metHb 及び metHAC においても低 pH 環境での構造変化が抑制され、硫化水素との結合が低下したと推測される。

硫化水素中毒では、ミトコンドリア内膜の CcO が含有するヘムに硫化水素が結合することで電子伝達及び酸素消費が停止し、ミトコンドリア膜電位が形成されなくなることでエネルギー産生が阻害され、最終的に細胞死に至るとされる⁴。metHAC の硫化水素中毒解毒剤としての有効性を検討するため、まず NaHS を曝露した硫化水素中毒模倣細胞を用いて評価した。その結果、metHAC 添加群は酸素消費及びミトコンドリア膜電位の低下を回避しながら細胞生存率が上昇しており、慣例的に硫化水素中毒解毒剤として使用されている

NaNO₂ を模倣した metRBC 群においても同様の結果となった (Fig. 9–12)。このことから、metHAC は NaNO₂ と同様のメカニズムにより硫化水素中毒に対して解毒効果を示すと想定され、metHAC の metHb が硫化水素を捕捉し、ミトコンドリアの保護 (酸素消費及びミトコンドリア膜電位を維持) により、エネルギー産生の阻害が回避されることで細胞保護効果につながったと推察された。実際に、致死性硫化水素中毒モデルマウスにおいても metHAC の解毒効果は確認され、中毒下での治療薬としての投与においても低下する CcO 活性を回復させており、大幅な生存率の上昇に寄与していると考えられた (Fig. 14, 15)。一方で、NaNO₂ 投与は metHAC のみならず metHb 単体と比較しても低い生存率となった。NaNO₂ の解毒特性は RBC 中 Hb を metHb に変換後に解毒作用を示し、予防投与では解毒効果が得られている報告を考慮すると³⁵、致死性中毒状態下ではメト化に時間を要して解毒が遅れたことで、CcO 活性を改善できずに十分な解毒効果が発揮されなかったと考えられる。これらの結果から、metHAC としての直接的な metHb の利用が NaNO₂ と同様の解毒メカニズムながらも NaNO₂ の解毒遅延を解消し、急性症状を示す硫化水素中毒において迅速な解毒につながったことが示唆される。硫化水素中毒による CcO 活性の阻害は代償機構である解糖系の亢進に伴う代謝性アシドーシスが進行する²。metHAC 結合特性の結果から低 pH 下で metHAC の硫化水素結合能力が低下することが確認されていたため、アシドーシス状態 (中毒状態) の生体において metHAC の解毒能力が低下することが懸念されたものの、重症アシドーシスを併発している本検討で用いた中毒モデルマウスにおいて十分な解毒作用を発揮しており、治療薬として利用できると考えられた。

metHb 単体は、生体内に投与されると血中に存在するハプトグロビンと速やかに結合して複合体を形成し、マクロファージ表面の CD163 を介してエンドサイトーシスされることで非常に血中滞留性が悪いことが報告されており^{22,36}、本検討での体内動態評価からも metHb 単体の血漿中半減期は 2 時間と短かった。しかしながら、metHAC では半減期が 15 時間にまで延長しており、アルブミンと近い血中動態 (半減期 11.5 時間) を示した (Fig. 17, Table 4)。metHAC の表面電荷の指標となるゼータ電位や等電点などの製剤特性の結果がアルブミンに類似していることを考慮すると (Fig. 5b, Table 1)、metHAC はアルブミンにより metHb を被覆したことで生体内においてアルブミン様に認識され、ハプトグロビンによる捕捉を回避したと考えられた。一方で metHAC とアルブミンを比較すると metHAC の方が血中滞留性が良好であった。これまでに、クロスリンカーを用いて作製したアルブミンの二量体や四量体は、分子サイズが増大することで血管外への漏出及び糸球体による濾過が抑制され、単量体よりも血中滞留性が向上することが報告されている^{37,38}。このことから、アルブミンの四量体のサイズに匹敵する metHAC はアルブミン以上の血中滞留性を示したと考えられる。これまでの研究では、*in vitro* において metHb が硫化水素結合能力を有しているにもかかわらず^{21,39}、硫化水素中毒ラットへの metHb 単体投与には解毒効果が得られていない⁴⁰。また、本検討での致死性硫化水素中毒モデルマウスへの metHb 単体投与においても同様の結果を示したことを考慮すると (Fig. 14)、血中滞留性の向上は、metHb の硫化水

素中毒解毒剤への応用化に向けた最重要事項であると考えられる。よって、metHAC は metHb とアルブミンの固有特性を利用することで、metHb の硫化水素結合能を保持しながらもアルブミン様の高いステルス性を備えた製剤として生体内での治療効果を最大化させたと考えられる。

血中滞留性の向上は有効性を高める一方で、過度な延長は生体蓄積性や毒性を増大させることも懸念される。本検討において、metHb 単体の肝臓及び腎臓への高い分布を確認したのに対し、metHAC は肝臓に高く分布しながらも腎臓への高い分布は回避され、アルブミン様の組織分布となった (Fig. 18, Table 5)。元来、metHb はハプトグロビンと結合後、肝臓でヘムとグロビンに分解されてそれぞれ代謝され、ハプトグロビンに捕捉されなかった metHb が腎臓において糸球体濾過を受けて排泄される⁴¹。特に、糸球体濾過を受ける際に放出されるヘムが腎臓に蓄積するため、含有する鉄イオンに起因して生じた ROS による腎障害の誘発が懸念事項となっている⁴²。metHAC の安全性評価から、腎組織形態及び血漿中腎機能マーカーの結果において metHAC 投与後の腎障害の兆候はなく、高い分布を示した肝臓においても組織形態変化及び血漿中トランスアミナーゼ値の上昇が確認されなかったことから (Fig. 20, 21)、metHAC 投与による肝臓及び腎臓への負担は大きくないと考えられた。また、ビリルビンや鉄関連のパラメータ、さらに脂質過酸化や炎症性サイトカインの異常な上昇はなかったことから (Fig. 23–25)、ヘムに起因する ROS の産生及び炎症誘発は起こっておらず、metHAC 由来の metHb は適切に代謝されていると考えられた。

以上の結果から、metHAC は metHb とアルブミンのそれぞれのタンパク質固有特性を利用することで、metHb や NaNO_2 の問題点を克服した有効性及び安全性の高い硫化水素中毒解毒剤として使用できる可能性が示唆された。

第4節 小括

第2章では metHAC の作製及び作製及び硫化水素中毒解毒剤としての有用性を評価した結果、以下の知見を得た。

- ヘモグロビン-アルブミンクラスターに NaNO_2 を添加し、Hb を metHb に酸化することで metHAC を作製した。
- metHAC は 1 分子の metHb にリンカーを介して平均 3 分子のアルブミンが結合した約 14 nm の粒子であった。
- metHAC は pH 依存的な硫化水素捕捉性を示した。
- 硫化水素曝露に対し、metHAC はミトコンドリア機能を維持することで細胞保護効果を示した。
- metHAC は致死性硫化水素中毒モデルマウスの CcO 活性の回復及びアシドーシスの回避に寄与することで生存率を上昇させた。
- metHAC の血漿中半減期は約 15 時間であり、metHb 単体 (2 時間) と比較して大幅に延長した。
- metHAC は metHb 単体で観察される腎臓への高い分布は回避され、肝臓に高く分布した。一方で、投与後 14 日以内にほぼ消失し、生体蓄積性はないと考えられた。
- metHAC は臓器障害を惹起せず、高い生体適合性 (安全性) を示した。

以上の知見から、metHAC は metHb の動態特性を改善することで優れた解毒作用を発揮し、安全性の高い硫化水素中毒解毒剤として使用できる可能性が示された。

第3章 metHAC の凍結乾燥注射剤としての開発

第1節 序

実臨床での metHAC の硫化水素中毒解毒剤としての使用を考えた時、救急医療における場面が想定される。硫化水素中毒は強力且つ速やかに進行することから、一刻も早い治療の開始が必要とされ、硫化水素中毒発症の潜在的リスクが高い化学工場や最前線の現場で医療を提供する救急車などに解毒剤を常備しておくことが非常にスピーディーな初期治療につながり、中毒患者の生存及び予後の向上に大きく貢献すると考えられる。また、硫化水素中毒は予期できるものではなく、事故などで突発的に発生することがほとんどであるとともに、年間の発症数が他の疾患と比較して多くないことを考慮すると、硫化水素中毒解毒剤は即時使用可能な状態で長期間保存できる製剤であることが望ましい。

凍結乾燥処理は安定的にタンパク質を長期間保存することができる手段として、上市されている多くのタンパク質製剤に適用されている^{43,44}。一方で、凍結乾燥処理及び再溶解処理は、タンパク質に負荷をかけるため、分解や凝集など製剤特性を変化させてしまう可能性があり^{45,46}、有効性の低下や安全性を担保した製剤の利用にも大きな影響を及ぼす懸念がある。特に metHb とアルブミンをリンカーにより結合している metHAC は、純粋なタンパク質製剤より凍結乾燥処理及び再溶解処理後もクラスター構造が安定に維持されている保証はない。これらは再溶解処理に利用する溶媒によっても左右され、迅速な治療開始に必要な硫化水素中毒解毒剤として metHAC を利用することを想定すると、生理食塩水や注射用水、ブドウ糖溶液など流通量が多く、汎用性の高い溶媒で再溶解が可能であることが望ましいと考えられる。しかしながら、製剤に適さない溶媒の使用は変性などを招くことがあり、実際にハーセプチン[®]はブドウ糖溶液と混合した場合、蛋白凝集が起こるため、注射用水または生理食塩水以外での調製を行ってはならない旨が添付文書に記載されている⁴⁷。こうしたことから、凍結乾燥処理による metHAC への影響を評価する必要があるとともに、凍結乾燥処理した metHAC の再溶解時の最適な溶媒を選定することは臨床使用に向けた基盤情報となる。

これらのことを踏まえ本章では、凍結乾燥処理後の metHAC の製剤特性評価及び致死硫化水素中毒モデルマウスを用いた解毒能の評価を実施した。このとき、凍結乾燥粉末化した metHAC の再溶解には汎用性の高い溶解液として注射用水、生理食塩水、ブドウ糖溶液をそれぞれ利用し、最適な再溶解溶媒を検討した。これらの結果に基づき、凍結乾燥処理した metHAC を1年間に渡り保存し、長期保存後の製剤安定性及び *in vivo* における有効性及び安全性を評価した。

第2節 結果

2-1. 凍結乾燥粉末 metHAC の再溶解後の性状評価

◆ 凍結乾燥粉末 metHAC の再溶解後の物理化学特性評価

まず、凍結乾燥処理を行った粉末状態の metHAC を臨床上で使用頻度が高く代表的な溶解液である注射用水、生理食塩水、5%ブドウ糖液でそれぞれ再溶解し、物理化学特性を評価した。その結果、PBS を溶媒として凍結乾燥処理し、注射用水で再溶解したサンプル (PBS F.D.) 及び精製水を溶媒として凍結乾燥処理し、生理食塩水で再溶解したサンプル (Saline F.D.) は、凍結乾燥及び再溶解処理をしていない metHAC と粒度分布及び平均粒子径を含む物理化学特性は同等であった。一方で、精製水を溶媒として凍結乾燥処理し、5%ブドウ糖液で再溶解したサンプル (Glucose F.D.) は、PDIが増大するとともにわずかに粒度分布が左側にシフトし、平均粒子径が約 4 nm 縮小した (Fig. 27, Table 6)。

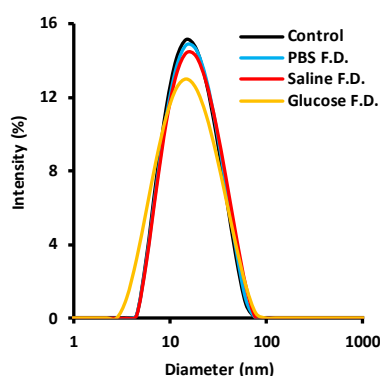


Fig. 27. Size distribution of lyophilized metHAC after reconstitution in respective solvents.

Lyophilized samples were reconstituted with sterile water for injection (PBS F.D.), 0.9% sodium chloride injection (Saline F.D.), and 5% dextrose injection (Glucose F.D.), respectively. Before lyophilization, the original solvent (PBS) for the samples of two groups (Saline F.D. and Glucose F.D.) was replaced with purified water. Samples without lyophilization and reconstitution process were used as Control.

Table 6. Physicochemical characteristics of lyophilized metHAC after reconstitution in respective solvents.

	Diameter (nm)	PDI	ζ-potential (mV)
Control	14.28 ± 0.14	0.12 ± 0.02	-3.34 ± 0.31
PBS F.D.	14.38 ± 0.23	0.12 ± 0.02	-3.35 ± 0.52
Saline F.D.	14.67 ± 0.48	0.16 ± 0.05	-3.61 ± 0.07
Glucose F.D.	10.71 ± 0.22	0.26 ± 0.02	-2.60 ± 0.33

PDI; polydispersity index (n = 3, mean ± S.D.)

◆ 凍結乾燥粉末 methHAC の再溶解後の構造評価

凍結乾燥及び再溶解処理後の methHAC の構造を評価するため、SEC を実施した。その結果、注射用水、生理食塩水、5%ブドウ糖液それぞれで再溶解した凍結乾燥粉末 methHAC は凍結乾燥及び再溶解処理をしていない methHAC と同様のクロマトグラムが得られた (Fig. 28a)。また、Native-PAGE 及び等電点電気泳動 (IEF) を行ったところ、溶媒に関わらず再溶解後の methHAC は同様のバンドパターンを示し、顕著な差異は確認されなかった (Fig. 28b, c)。このうち、SEC 及び Native-PAGE が示す複数のピーク及びバンドは 1 分子の methHb に結合するアルブミンの数が異なることに起因するため、それぞれ定量的に評価した結果、5%ブドウ糖液により再溶解した methHAC は、遊離アルブミンや methHb : アルブミン = 1 : 1 などのアルブミン結合数の少ない小型クラスター体が約 5–10%程度増大した (data not shown)。このことから、5%ブドウ糖液における粒子径の縮小は、一部のアルブミンが再溶解時に methHAC から解離していることに起因することが示唆された。

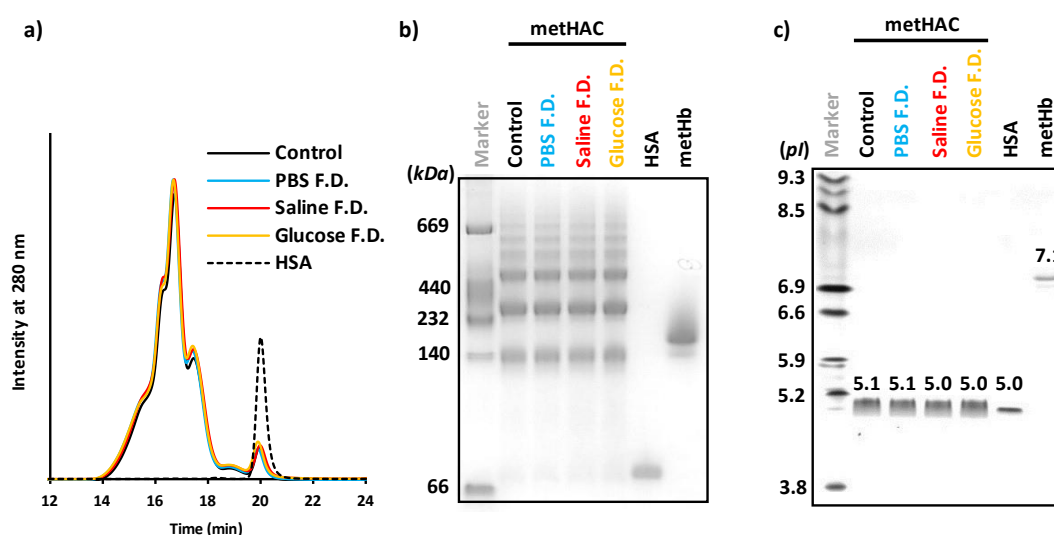


Fig. 28. a) Representative SEC profiles, b) image of Native-PAGE, and c) IEF patterns of lyophilized methHAC after reconstitution in respective solvents.

Lyophilized samples were reconstituted with sterile water for injection (PBS F.D.), 0.9% sodium chloride injection (Saline F.D.), and 5% dextrose injection (Glucose F.D.), respectively. Before lyophilization, the original solvent (PBS) for the samples of two groups (Saline F.D. and Glucose F.D.) was replaced with purified water. Samples without lyophilization and reconstitution process were used as Control.

◆ 凍結乾燥粉末 metHAC の再溶解後の構成タンパク質の構造評価

ここまでの結果より、凍結乾燥及び再溶解処理後も注射用水、生理食塩水においては metHAC としての全体構造を維持していると考えられたが、構成タンパク質の構造を正確に評価できていない。構成タンパク質の変性による構造変化は、有効性や動態特性に影響を及ぼす可能性があるため重要である。CD スペクトルで評価した結果、注射用水、生理食塩水、5%ブドウ糖液それぞれで再溶解した凍結乾燥粉末 metHAC は凍結乾燥及び再溶解処理をしていない metHAC と同様のスペクトル形状となり、構成タンパク質の二次構造は維持されていた (Fig. 29)。また、ヘムを保持する metHb の構造変化によりヘムが放出されると metHAC の硫化水素捕捉能が担保されなくなる。そこで、凍結乾燥及び再溶解処理後の溶媒中の遊離ヘム量を評価したところ、全ての再溶解した metHAC でコントロールと同等であった (Table 7)。このことから、metHAC の metHb は凍結乾燥及び再溶解処理後もヘムを安定的に保持していると考えられた。

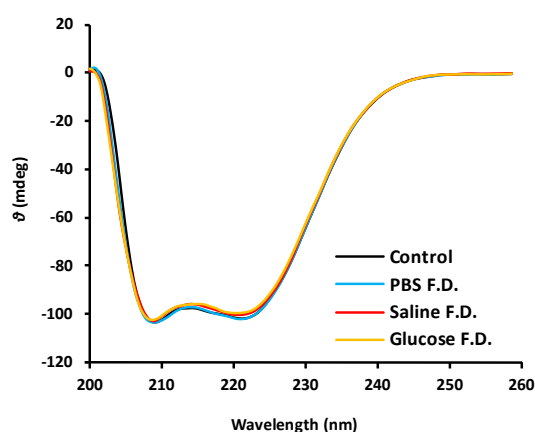


Fig. 29. CD spectra of lyophilized metHAC after reconstitution in respective solvents.

Lyophilized samples were reconstituted with sterile water for injection (PBS F.D.), 0.9% sodium chloride injection (Saline F.D.), and 5% dextrose injection (Glucose F.D.), respectively. Before lyophilization, the original solvent (PBS) for the samples of two groups (Saline F.D. and Glucose F.D.) was replaced with purified water. Samples without lyophilization and reconstitution process were used as Control. Spectra were recorded at 0.2 μ M as metHb.

Table 7. Released heme from lyophilized metHAC after reconstitution in respective solvents.

	Released heme (%)
Control	0.26 $\pm$ 0.01
PBS F.D.	0.68 $\pm$ 0.54
Saline F.D.	0.48 $\pm$ 0.08
Glucose F.D.	0.49 $\pm$ 0.13
metHb	0.70 $\pm$ 0.19
metHb + 3HSA	0.35 $\pm$ 0.08

n = 3, mean $\pm$ S.D.

2-2. 凍結乾燥粉末 metHAC の再溶解後の硫化水素結合能評価

凍結乾燥及び再溶解処理後の metHAC の硫化水素結合能を UV-Vis. スペクトル変化により評価した。その結果、凍結乾燥及び再溶解処理後も metHAC は Control 同様にスペクトルピークが NaHS の添加によって 405 nm から 424 nm に変化した (Fig. 30)。また、硫化水素結合能の指標である K 及び n についても Control と同等であり、凍結乾燥及び再溶解処理は metHAC の硫化水素結合能に影響しないと考えられた (Fig. 31, Table 8)。

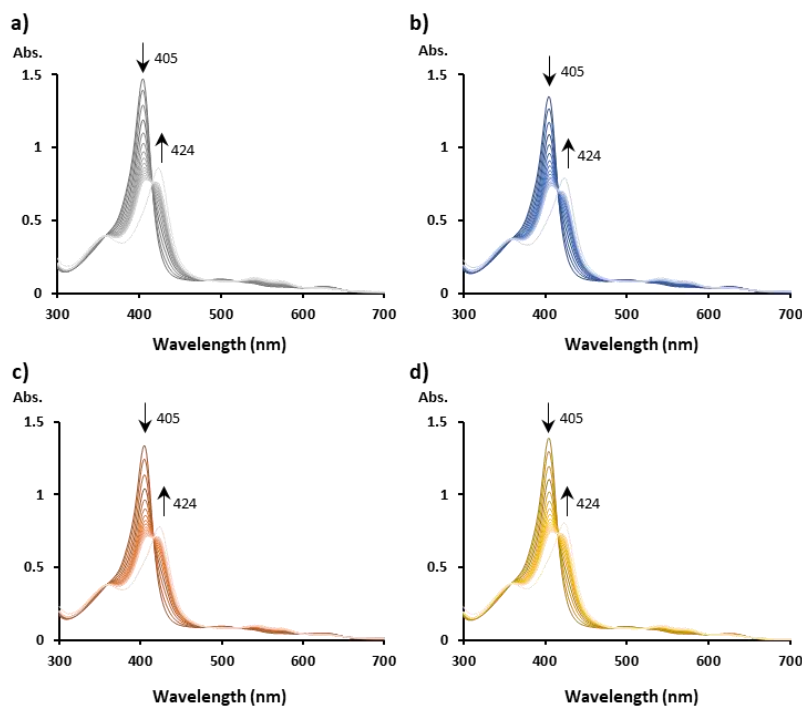


Fig. 30. UV-Vis. spectral change of reconstituted methHAC a) control, b) PBS F.D., c) Saline F.D., and d) Glucose F.D. on addition of NaHS solution.

Lyophilized samples were reconstituted with sterile water for injection (PBS F.D.), 0.9% sodium chloride injection (Saline F.D.), and 5% dextrose injection (Glucose F.D.), respectively. Before lyophilization, the original solvent (PBS) for the samples of two groups (Saline F.D. and Glucose F.D.) was replaced with purified water. Samples without lyophilization and reconstitution process were used as Control. NaHS solution (a molar ratio of $0.2 \times$ heme in metHb) was gradually added to each sample. All samples were adjusted to $2 \mu\text{M}$ as metHb.

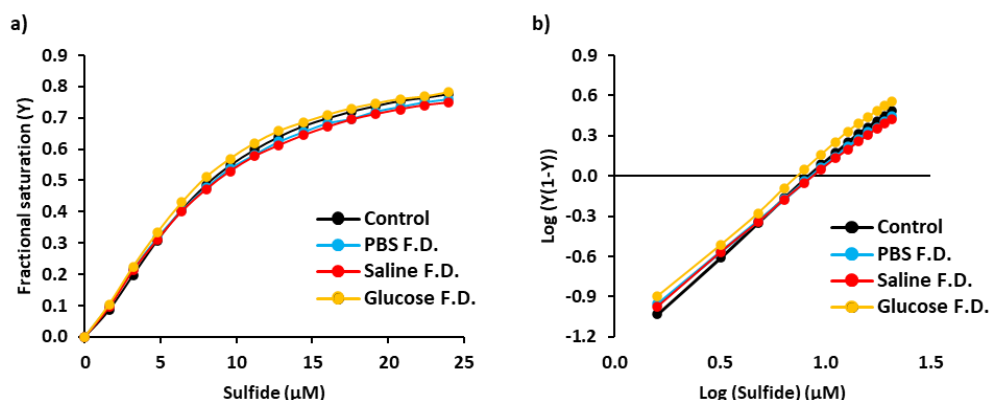


Fig. 31. a) Equilibrium curves and (b) Hill plots of reconstituted methHAC with hydrogen sulfide.

Lyophilized samples were reconstituted with sterile water for injection (PBS F.D.), 0.9% sodium chloride injection (Saline F.D.), and 5% dextrose injection (Glucose F.D.), respectively. Before lyophilization, the original solvent (PBS) for the samples of two groups (Saline F.D. and Glucose F.D.) was replaced with purified water. Samples without lyophilization and reconstitution process were used as Control. NaHS solution (a molar ratio of $0.2 \times$ heme in methHb) was gradually added to each sample. All samples were adjusted to $2 \mu\text{M}$ as methHb.

Table 8. Binding characteristics of reconstituted methHAC with hydrogen sulfide.

	$K (\times 10^6 \text{ M}^{-1})$	n
Control	0.20 ± 0.01	1.28 ± 0.05
PBS F.D.	0.22 ± 0.01	1.25 ± 0.01
Saline F.D.	0.23 ± 0.04	1.27 ± 0.03
Glucose F.D.	0.24 ± 0.01	1.29 ± 0.01

K ; equilibrium constant, n ; Hill coefficient ($n = 3$, mean $\pm$ S.D.)

2-3. 凍結乾燥粉末化 methHAC の *in vivo* 有効性評価

凍結乾燥及び再溶解処理後の methHAC の *in vitro* における硫化水素捕捉性が確認された。*in vivo* においてもこの有効性が発揮されることを確認するため、凍結乾燥及び再溶解処理した methHAC を致死性硫化水素中毒モデルマウスに投与し、生存率を評価した。その結果、PBS F.D.群及び Saline F.D.群では全例が生存し、Glucose F.D.群では1例が死亡した (Fig. 32)。これらのことから、凍結乾燥処理した methHAC は注射用水または生理食塩水での再溶解で *in vivo* においても凍結乾燥を行っていない methHAC と同程度の解毒能を保持すると考えられた。

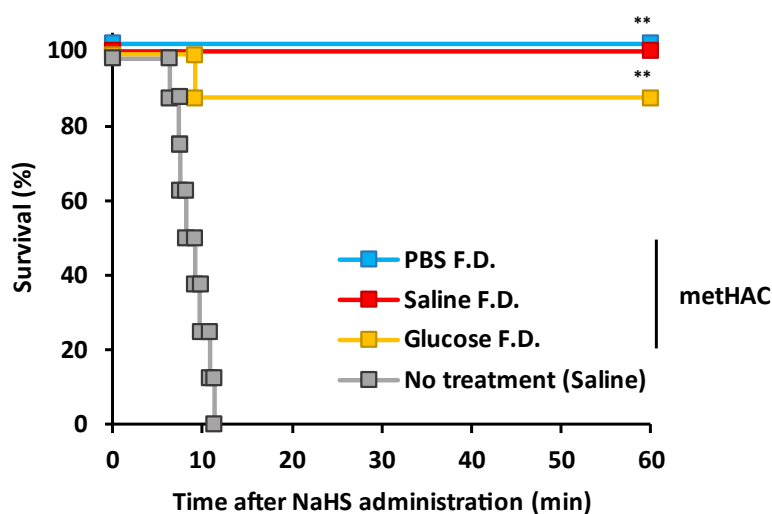


Fig. 32. Survival rate of lethal hydrogen sulfide poisoning mice after treatment with the reconstituted methHAC.

At 3 min after the subcutaneous exposure of NaHS solution (30 mg/kg), either reconstituted methHAC (500 mg methHb/kg) or saline was injected in lethal hydrogen sulfide poisoning model mice ($n = 8/\text{group}$). ** $p < 0.01$ vs. No treatment (Saline).

2-4. 長期保存後の凍結乾燥 metHAC の性状評価

◆ 長期保存後の凍結乾燥 metHAC の外観

metHAC は凍結乾燥処理が可能であり、注射用水または生理食塩水での再溶解によって構造変化を誘導せずに硫化水素解毒製剤として利用できると考えられた。そこで、凍結乾燥処理した metHAC を 1 年間保存し、硫化水素解毒製剤としての長期安定性を評価した。凍結乾燥保存した粉末化 metHAC に注射用水を添加したところ 5 分以内に沈殿や凝集などなく完全に溶解した (Fig. 33)。また、対照として 1 年間溶液状態で保存した metHAC についても沈殿や凝集、変色など外観の変化は無かった (data not shown)。

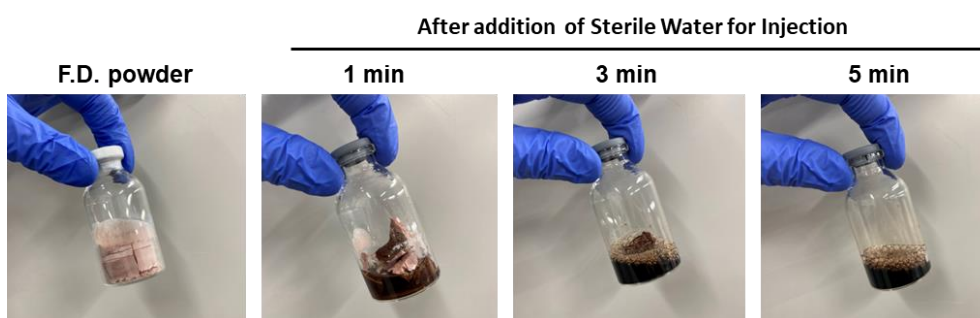


Fig. 33. Appearances of F.D. powder metHAC after 1-year storage and reconstitution.

Appearance of metHAC after 1-year storage as freeze-dried powder formulation and after reconstitution with Sterile Water for Injection at 1, 3, and 5 min.

◆ 長期保存後の凍結乾燥 metHAC の物理化学特性評価

まず、1 年間保存後の物理化学特性を評価した。その結果、凍結乾燥により粉末状態で保存した metHAC は Fresh (Control) と同等な粒度分布、粒子径、 ζ -電位を示し、物理化学特性に変化は無かった。また、溶液状態で 1 年間保存した metHAC においても変化は確認されなかった (Fig. 34, Table 9)。これらのことから、凍結乾燥処理により粉末化した metHAC は完全に溶解し、長期間保存後の再溶解時にも凝集は起きていないことが示唆された。

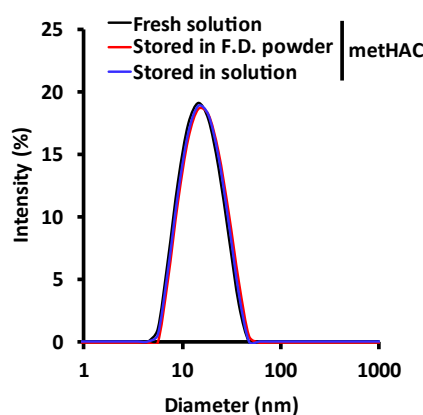


Fig. 34. Size distribution of 1-year stored metHAC in F.D. powder and solution formulation.

Samples were stored in freeze-dried (F.D.) powder and solution formulation for 1 year at 4 °C. Control samples were freshly prepared in solution.

Table 9. Physicochemical characteristics of 1-year stored metHAC in F.D. powder and solution formulation.

		Diameter (nm)	PDI	ζ -potential (mV)
metHAC	Fresh	14.1 $\pm$ 0.24	0.06 $\pm$ 0.01	-3.19 $\pm$ 0.23
	Stored in F.D. powder	15.0 $\pm$ 0.08	0.08 $\pm$ 0.003	-3.25 $\pm$ 0.24
	Stored in solution	14.6 $\pm$ 0.13	0.07 $\pm$ 0.003	-3.54 $\pm$ 0.26
metHb		6.5 $\pm$ 0.24	0.19 $\pm$ 0.02	-5.01 $\pm$ 0.46
HSA		7.3 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.01	-2.73 $\pm$ 0.37

PDI; polydispersity index, HSA; human serum albumin (n = 3, mean $\pm$ S.D.)

◆ 長期保存後の凍結乾燥 metHAC の構造評価

1 年間保存後の metHAC を SEC 及び Native-PAGE により評価した。その結果、凍結乾燥により粉末状態で保存した metHAC は SEC によるクロマトグラム及び Native-PAGE によるバンドにおいて Fresh (Control) と同様であった。一方で溶液として保存した metHAC は大部分の結果において Fresh (Control) と同等であったものの、遊離アルブミンと一致するピーク及びバンドが最大 10%程度増大した (Fig. 35)。これらの結果から、溶液状態による長期間の保存は metHAC からのアルブミンの解離を含めた分解が進行している可能性が示唆された。一方、凍結乾燥による粉末状態での保存ではこのような分解が回避され、より安定性高く保存できると考えられた。

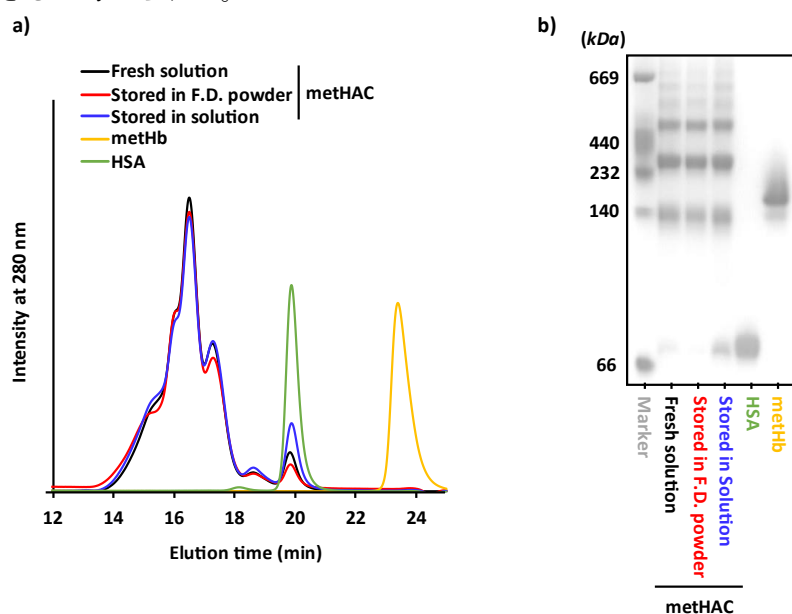


Fig. 35. a) Representative SEC profiles, b) Image of Native-PAGE of 1-year stored metHAC in F.D. powder and solution formulation.

Samples were stored in freeze-dried (F.D.) powder and solution formulation for 1 year at 4 °C. Control samples were freshly prepared in solution.

◆ 長期保存後の凍結乾燥 metHAC の構成タンパクの構造評価

構成タンパクの構造を CD スペクトルにより評価した。その結果、1 年間保存後においても凍結乾燥粉末による保存および溶液による保存と保存形態にかかわらずスペクトルの変化は確認されず、Fresh (Control) と同等であった (Fig. 36)。また、metHb から放出される遊離ヘムについても定量を行ったところ、Fresh (Control) と同等であった (Table 10)。これらのことから、metHAC は長期間保存後も構成タンパクの構造変化は起きていないと考えられた。

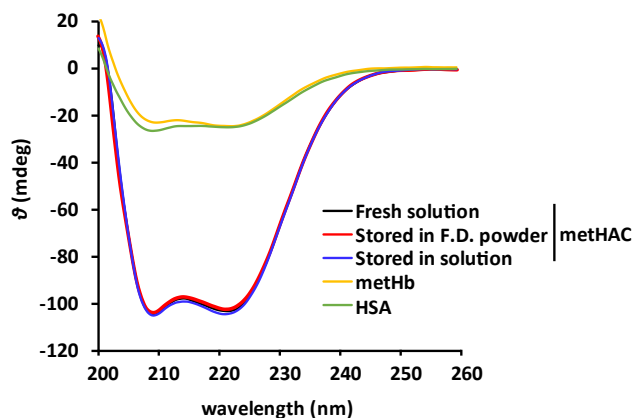


Fig. 36. CD spectra of 1-year stored metHAC in F.D. powder and solution formulation.

Samples were stored in F.D. powder and solution formulation for 1 year at 4 °C. Control samples were freshly prepared in solution. Spectra were recorded at 0.2 μM as metHb.

Table 10. Released heme from 1-year stored metHAC in F.D. powder and solution formulation.

	released heme (%)
Fresh	0.20 ± 0.07
Stored in F.D. powder	0.30 ± 0.09
Stored in solution	0.35 ± 0.17

n = 3, mean ± S.D.

◆ 長期保存後の凍結乾燥 metHAC の硫化水素結合能評価

硫化水素中毒解毒剤として利用するためには、metHb に起因した硫化水素捕捉性が重要となる。そこで、各条件で 1 年間保存した metHAC に NaHS 溶液を添加し、UV-Vis. スペクトルを測定した。その結果、凍結乾燥粉末および溶液で保存した metHAC 中の metHb へ硫化水素が結合することにより、スペクトルが右にシフトした (Fig. 37)。また、硫化水素結合能の指標である K 及び n についても Fresh (Control) と同等であり、metHAC は保存形態に関わらず 1 年間保存後も硫化水素捕捉性を維持していた (Table 11)。

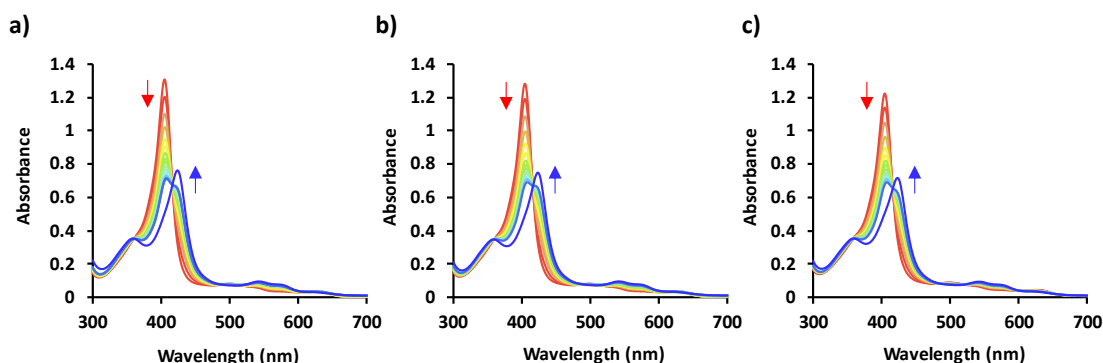


Fig. 37. UV-Vis. spectral change of 1-year stored metHAC in F.D. powder and solution formulation on addition of NaHS solution.

NaHS solution (a molar ratio of $0.2 \times$ heme in metHb) was gradually added to **a)** fresh metHAC, metHAC stored **b)** as F.D. powder, and **c)** in solution. All samples were adjusted to $2 \mu\text{M}$ as metHb.

Table 11. Binding characteristics of 1-year stored metHAC with hydrogen sulfide.

	$K (\times 10^6 \text{ M}^{-1})$	n
Fresh	0.21 ± 0.02	1.24 ± 0.09
Stored in F.D. powder	0.22 ± 0.01	1.18 ± 0.01
Stored in solution	0.21 ± 0.02	1.12 ± 0.02

K ; equilibrium constant, n ; Hill coefficient, ($n = 3$, mean $\pm$ S.D.)

2-5. 長期保存後の凍結乾燥 metHAC の再溶解後の製剤安定性評価

凍結乾燥粉末製剤として上市されている医薬品は溶解後速やかに使用し、耐用経過時間以内使用できない場合は破棄しなければならないといった厳密な使用ルールが添付文書に記載されている。これは、開封して溶解後に長時間が経過することで無菌性が担保できなくなるとともに、凝集や分解によって製剤の治療効果を担保できなくなる有効性及び安全性の観点から規定されている。将来的な metHAC の製剤化にむけて、「適用上の注意」を確立しておくことは臨床応用への先駆けとなる。そこで、1 年間凍結乾燥粉末として保存した metHAC を注射用水で溶解し、24 時間後まで 6 時間ごとに製剤特性の変化を評価した。まず、物理化学特性を評価したところ、24 時間後までに粒子径の増大や粒度分布の変化は確認されなかった (Fig. 38a, Table 12)。また、metHAC の構造を SEC、Native-PAGE 及び CD スペクトルにより評価した結果、24 時間後も同一の形状を示した (Fig. 38, 39)。さらに、ヘムの放出及び解毒剤として最も重要な硫化水素捕捉性についても 24 時間後まで減衰は確認されなかった (Fig. 40, Table 13, 14)。これらの結果から、製剤として凍結乾燥粉末保存した metHAC は再溶解後、24 時間以内までの利用は担保されと考えられた。

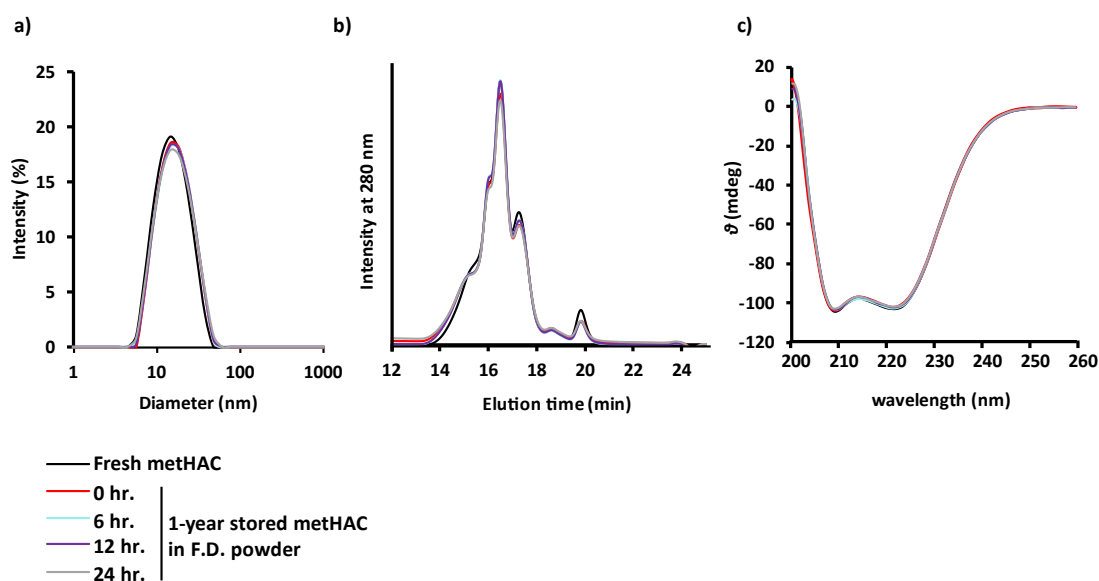


Fig. 38. a) Size distribution, b) SEC profiles, c) CD spectra of 1-year stored metHAC in F.D. powder formulation at 6 h, 12 h, and 24 h after reconstitution with sterile water for injection.

Table 12. Time-course of physicochemical characteristics of 1-year stored methHAC in F.D. powder formulation after reconstitution.

	Diameter (nm)	PDI	ζ-potential (mV)
0 h	15.0 ± 0.08	0.08 ± 0.003	−3.25 ± 0.24
6 h	14.9 ± 0.03	0.08 ± 0.005	−3.17 ± 0.17
12 h	14.8 ± 0.13	0.07 ± 0.005	−3.53 ± 0.44
24 h	14.8 ± 0.14	0.07 ± 0.01	−3.52 ± 0.15

Results of methHAC stored in F.D. powder formulation at 0 h are quoted from Table 9. PDI; polydispersity Index. (n = 3, mean ± S.D)

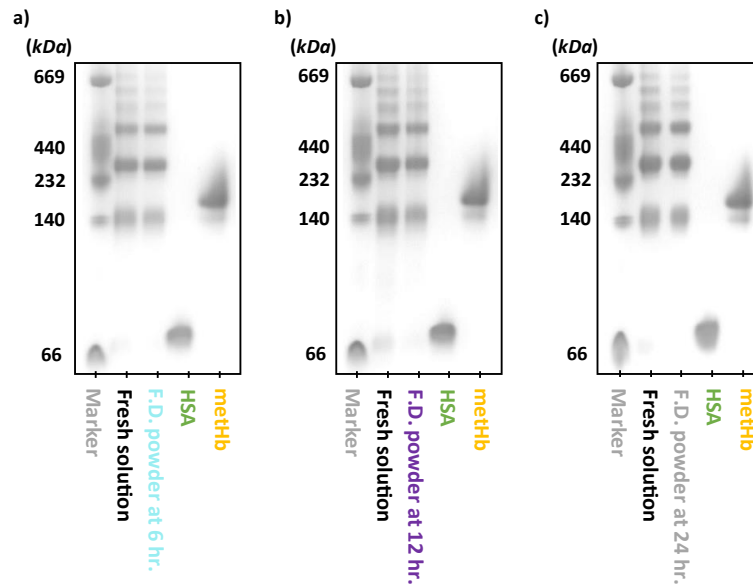


Fig. 39. Time-course Native-PAGE results of 1-year stored methHAC in F.D. powder formulation at a) 6 h, b) 12 h, and c) 24 h after reconstitution with sterile water for injection.

Table 13. Time-course of released heme from 1-year stored methHAC in F.D. powder formulation at 6 h, 12 h, and 24 h after reconstitution with sterile water for injection.

	Released Heme (%)
0 h	0.30 ± 0.09
6 h	0.27 ± 0.04
12 h	0.40 ± 0.16
24 h	0.25 ± 0.06

Results of methHAC stored in F.D. powder formulation at 0 h are quoted from Table 10. (n = 3, mean ± S.D.)

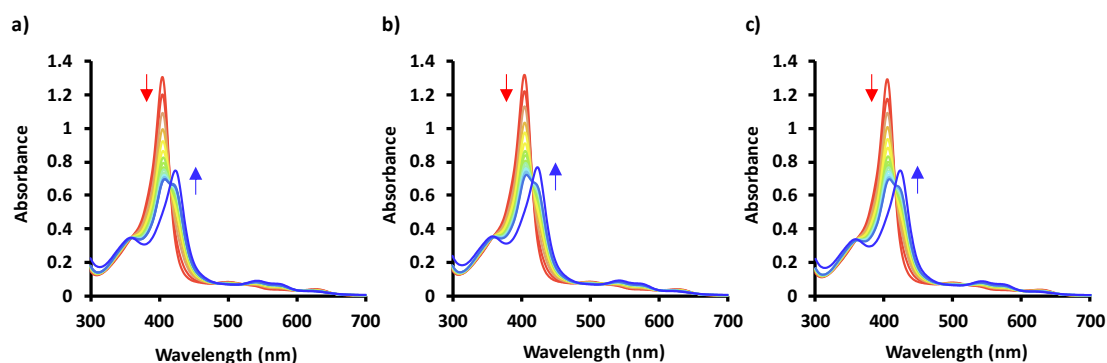


Fig. 40. UV–Vis. spectral changes of 1–year stored metHAC in F.D. powder formulation on addition of NaHS solution at a) 6 h, b) 12 h, and c) 24 h after reconstitution with sterile water for injection.

NaHS solution (a molar ratio of $0.2 \times$ heme in metHb) was gradually added to each sample adjusted to $2 \mu\text{M}$ as metHb.

Table 14. Binding characteristics of 1–year stored metHAC in F.D. powder formulation with hydrogen sulfide at 6 h, 12 h, and 24 h after reconstitution with sterile water for injection.

	$K \times 10^6 \text{ (M}^{-1}\text{)}$	n
0 h	0.22 ± 0.01	1.18 ± 0.01
6 h	0.22 ± 0.001	1.13 ± 0.04
12 h	0.19 ± 0.01	1.18 ± 0.03
24 h	0.18 ± 0.01	1.13 ± 0.05

Results of metHAC stored in F.D. formulation at 0 h. are quoted from Table 11. K ; equilibrium constant, n ; Hill coefficient ($n = 3$, mean $\pm$ S.D.)

2-6. 長期保存後の凍結乾燥 metHAC の *in vivo* 有効性評価

ここまでの検討から、metHAC は溶液状態での 1 年間保存では遊離アルブミンの増大が確認され、一部のアルブミンが metHAC から解離していると考えられた。一方で、凍結乾燥粉末状態による保存では構造変化等を誘導することなく製剤として利用できる可能性が示された。そこで、1 年間凍結乾燥粉末または溶液で保存した metHAC を致死性硫化水素中毒モデルマウスに投与し、生存率を評価することで解毒製剤としての有効性を検討した。その結果、生理食塩水の投与では全個体が死亡した条件下において凍結乾燥粉末として 1 年間保存した metHAC は 100%が生存した。一方、溶液状態で保存した metHAC は 70%の生存率にとどまった (Fig. 41)。

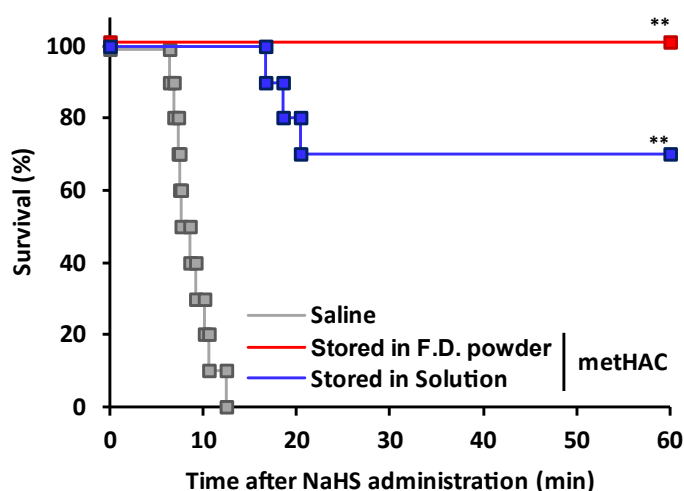


Fig. 41. Survival rate of lethal hydrogen sulfide poisoning mice after treatment with 1-year stored metHAC in F.D. powder and solution formulation.

At 3 min after the subcutaneous exposure of NaHS solution (30 mg/kg), either formulation of 1-year stored metHAC in F.D. or solution (500 mg metHb/kg) was injected in lethal hydrogen sulfide poisoning model mice. Saline was administered in the control group (n = 10/group). ** $p < 0.01$ vs. Saline.

metHAC の有効性は CcO に結合する硫化水素を競合的に metHb が捕捉することで解毒が達成され、Fresh な metHAC の投与では致死硫化水素中毒モデルマウスの CcO 活性を保護する結果が得られた (Fig. 15)。そこで、1 年間保存した metHAC を致死硫化水素中毒モデルマウスに投与し、主要臓器の CcO 活性を評価した。その結果、中毒状態の進行により低下する CcO 活性は、測定した全ての臓器において保存形態にかかわらず metHAC 投与により回復した (Fig. 42)。

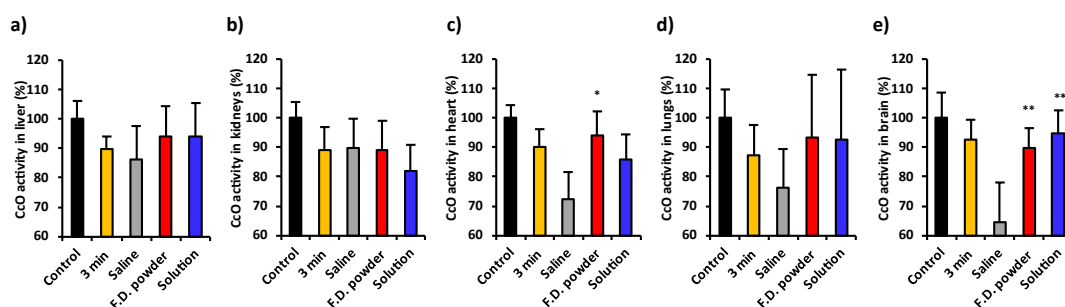


Fig. 42. CcO activity in the a) liver, b) kidneys, c) heart, d) lung, and e) brain after treatment with 1-year stored metHAC in F.D. powder and solution formulation in lethal hydrogen sulfide poisoning mice.

At 3 min after the subcutaneous exposure of NaHS solution (30 mg/kg), either saline, 1-year stored metHAC in F.D. or solution (500 mg metHb/kg) was injected in lethal hydrogen sulfide poisoning model mice. 5 min after administration, the mice were euthanized and specific organs (liver, kidneys, heart, lungs and brain) were collected. (n = 5, mean + S.D.) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. saline.

CcO の阻害によって代謝性アシドーシスが進行するため、CcO 活性を評価した同一個体の血液ガスパラメータを評価した。その結果、pH の低下や乳酸の産生、それらに付随する重炭酸イオンの減少は回避され、代謝性アシドーシスの進行は抑制された (Fig. 43)。

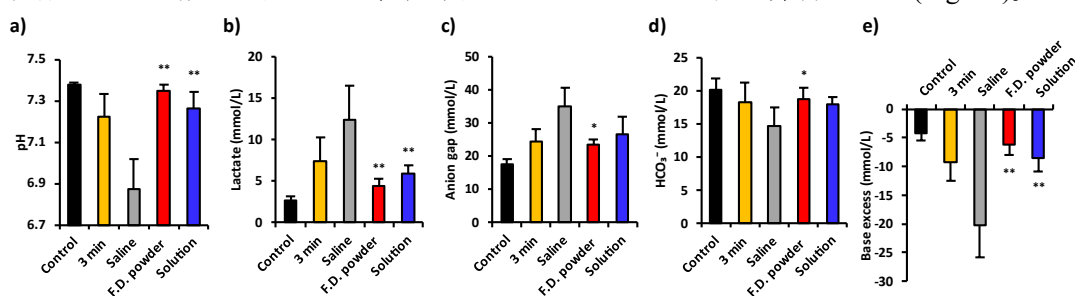


Fig. 43. Metabolic acidosis parameters in blood after treatment with 1-year stored metHAC in F.D. powder and solution formulation in lethal hydrogen sulfide poisoning mice.

At 3 min after the subcutaneous exposure of NaHS solution (30 mg/kg), either saline, formulation of 1-year stored metHAC in F.D. or solution (500 mg metHb/kg) was injected in lethal hydrogen sulfide poisoning model mice. 5 min after administration of each antidote, the mice were euthanized and venous blood was collected. Parameters of a) pH, b) lactate, c) anion gap, d) bicarbonate (HCO₃⁻), and e) base excess were measured. (n = 5, mean ± S.D.) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. saline.

2-7. 長期保存後の凍結乾燥 metHAC の *in vivo* 安全性評価

◆ 長期保存 metHAC 投与による生体への影響評価

これまでの結果から凍結乾燥 metHAC は長期間保存後においても硫化水素中毒に対して優れた解毒効果を発揮した。そこで、長期間保存後の metHAC の安全性評価についても実施した。健常マウスに 500 mg metHb/kg の 1 年間凍結乾燥粉末及び溶液状態で保存した metHAC を投与し、7 日後まで外観と体重変化を追跡した結果、異常行動や毛並みの変化、食欲減退に伴う体重減少は確認されなかった (Fig. 44)。

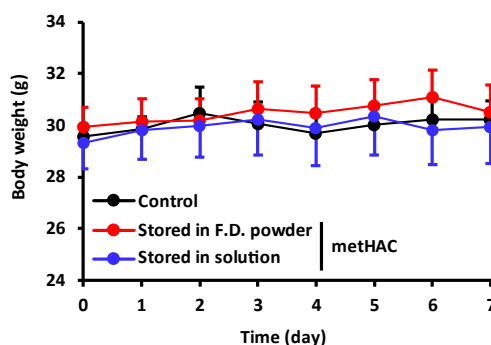


Fig. 44. Change in body weight after administration of 1-year stored metHAC in F.D. powder and solution formulation in healthy mice.

500 mg metHb/kg of metHAC was administered to healthy mice. Mice in the control group received saline. (n = 5 / group, mean $\pm$ S.D.)

◆ 長期保存 metHAC 投与による主要臓器への影響評価

また、肝臓及び腎臓の形態学的変化を HE 染色により評価したところ、保存形態にかかわらず Saline 投与群とほぼ同等であり、異常な形態変化は確認されなかった (Fig. 45)。この結果と一致するように、血漿中の肝機能パラメータである AST、ALT 及び腎機能パラメータである BUN、CRE の変化も確認されなかった (Fig. 46)。

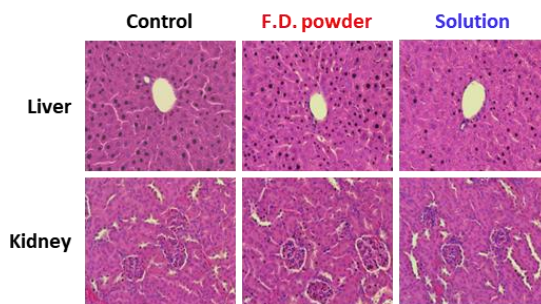


Fig. 45. Histopathologic examination of liver and kidneys after administration of 1-year stored metHAC in F.D. powder and solution formulation in healthy mice.

500 mg metHb/kg of metHAC was administered to healthy mice. Mice in the control group received saline. At 7 days after administration, liver and kidneys were collected and morphological changes were evaluated by HE stain. ($\times 200$ magnification)

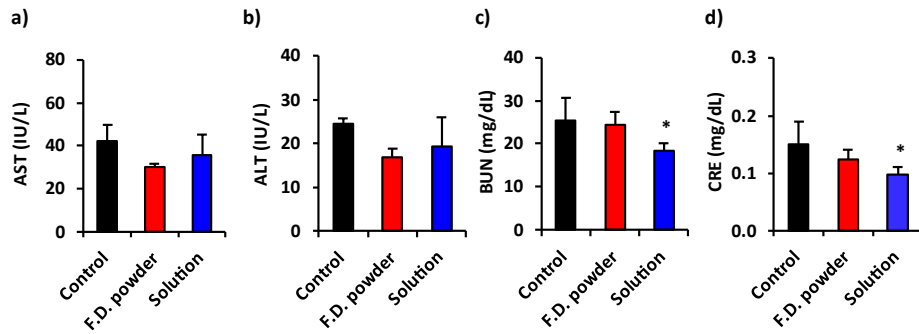


Fig. 46. Biochemical parameters in plasma reflecting liver injury and renal function after administration of 1-year stored methHAC in F.D. powder and solution formulation in healthy mice.

500 mg methHb/kg of methHAC was administered to healthy mice. Mice in the control group received saline. At 7 days after administration, blood was collected and plasma levels of **a)** aspartate aminotransferase (AST), **b)** alanine aminotransferase (ALT), **c)** blood urea nitrogen (BUN), and **d)** creatinine (CRE) were measured. (n = 5, mean + S.D.) * $p < 0.05$ vs. Control.

さらに、血液学的検査についても実施したところ、保存形態にかかわらず保存 methHAC は血球数へ影響を及ぼさなかった (Fig. 47)。

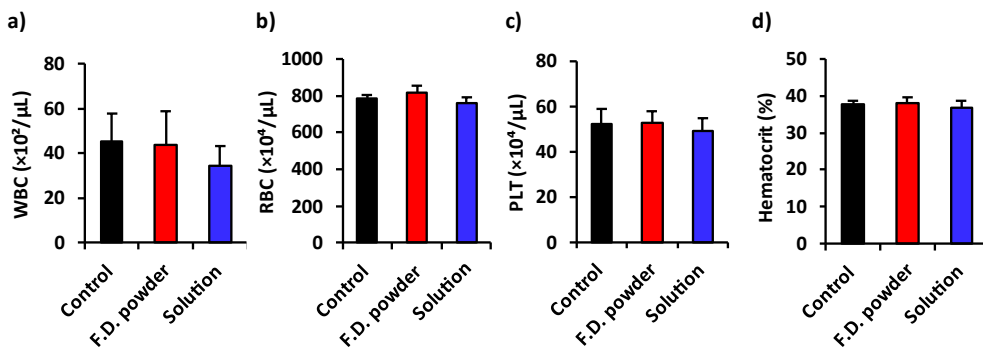


Fig. 47. Hematological analyses after administration of 1-year stored methHAC in F.D. powder and solution formulation in healthy mice.

500 mg methHb/kg of methHAC was administered to healthy mice. Mice in the control group received saline. At 7 days after administration, blood was collected and hematological parameters of **a)** white blood cells (WBC), **b)** red blood cells (RBC), **c)** platelet (PLT), and **d)** hematocrit were measured. (n = 5, mean + S.D.)

第3節 考察

硫化水素は強力且つ素早く作用する毒物であり、中毒患者は迅速に治療が行われなければ生存率が劇的に低下することが大きな特徴の一つである。解毒までの時間を短縮するためには、中毒現場やプレホスピタルでの治療が要求され、それに伴って即時使用可能な状態での解毒剤の保存管理が求められる。第2章の検討から解毒剤の候補として作製した metHAC はタンパク質で構成されている。凍結乾燥処理はタンパク質との相性が良く、固有の構造を保ちながら長期間保存でき、溶媒を添加する操作のみで速やかに使用できるため、既存のタンパク質製剤の多くは凍結乾燥粉末として保存されている。幸いなことに、このような製剤特性は硫化水素中毒解毒剤の保存方法として最適な手段であるため、本章では、まず metHAC の凍結乾燥処理前後での製剤特性、最適溶媒の決定及び有効性の変化を評価し、次に凍結乾燥粉末として1年間にわたって保存し、保存後の製剤特性に加えてマウスを用いた有効性及び安全性評価を行った。

metHAC を構成する metHb 及びアルブミンはそれぞれ凍結乾燥粉末として試薬が市場に流通しており、構成タンパク質それぞれの安定性は理解されている^{44,48}。一方で、metHAC は metHb とアルブミンをクロスリンカーで結合しており、生体内での metHAC の機能を担保するためには結合部を含めた構造全体としての安定性が重要となる。凍結乾燥製剤において最も負荷がかかるのは、凍結乾燥処理時と再溶解処理時の製剤状態が大きく変化するときであるとされ⁴⁵、再溶解に利用する溶媒との相性も metHAC の凍結乾燥製剤化を左右する主要因の一つになると考えられる。実際に本検討において、PBS を溶媒として凍結乾燥処理し、注射用水で再溶解したサンプル及び精製水を溶媒として凍結乾燥処理し、生理食塩水で再溶解したサンプルは凍結乾燥処理及び再溶解処理後も製剤特性を維持していたのに対し、精製水を溶媒として凍結乾燥処理し、5%ブドウ糖溶液で再溶解したサンプルは平均粒子径が縮小していた (Fig. 27, Table 6)。ヘモグロビン-アルブミンクラスターは Hb に結合するアルブミン数に応じて粒子径が変化し、アルブミン4分子結合体の 14.8 nm からアルブミン1分子結合体の 9.5 nm まで幅広い³¹。5%ブドウ糖液で再溶解した場合、SEC 及び Native-PAGE の結果で遊離アルブミンの増大を示唆する結果が得られていることを考え合わせると (Fig. 28)、この平均粒子径の変化は再溶解時に metHb とアルブミンのリンカーによる結合が一部で開裂したことに起因する可能性が高い。metHAC は metHb に結合させたリンカーのマレイミド基がアルブミン含有システインのチオール基に結合する様式であり (Fig. 4)、マレイミド-チオール結合は様々な刺激によってレトロマイケル反応や加水分解により不安定化することが報告されている^{49,50}。明確な原因は不明であるものの、ブドウ糖との相互作用や再溶解溶媒の pH の差異が関与した可能性があり、5%ブドウ糖溶液による凍結乾燥粉末 metHAC の再溶解は製剤特性を担保する上で望ましくないと考えられた。このことは、5%ブドウ糖溶液で再溶解した metHAC において他の溶媒で再溶解したものと比較して治療奏功率が低下した致死性硫化水素中毒モデルマウスによる有効性の検討結果からも示唆された (Fig. 32)。以上のことから、metHAC は凍結乾燥処理が可能であるものの、

再溶解溶媒に注意が必要であり、注射用水または生理食塩水が望ましく、5%ブドウ糖溶液の使用は推奨されないと考えられる。

製剤の凍結乾燥粉末化は溶媒を添加する簡便な操作のみで使用可能でありながらも、長期間保存可能であり、硫化水素中毒解毒剤として実用的な製剤形態である。実際に、凍結乾燥粉末化 metHAC は溶媒を添加して 5 分以内で完全に再溶解しており (Fig. 33)、急性毒性を示す硫化水素中毒の解毒剤として実用的である。また、再溶解後少なくとも 24 時間は製剤特性を維持していたため (Fig. 38, 39)、追加投与や大規模事故により多数の中毒患者が見込まれる場合は、備えてあらかじめ調製しておくことも可能であると考えられる。metHAC の即時使用可能な剤形は溶液であるため、溶液状態で長期保存可能であることは凍結乾燥粉末製剤以上に臨床上の強みが増す。しかしながら、1 年にわたる長期保存後においては遊離アルブミンが増大する若干の構造変化がみられるとともに、致死性硫化水素中毒モデルマウスの生存率が 70%に低下しており、解毒能が低下していた (Fig. 35, 41)。溶媒存在下で長期間保存することは metHb とアルブミンを結合するマレイミド-チオール結合部の加水分解を助長するため^{49,50}、製剤安定性が低下して遊離アルブミンが増大したと考えられる。一方で、形態によらず 1 年間保存後も凝集や沈殿、構成タンパクの構造や硫化水素結合特性の変化は確認されていないことから、アルブミンの解離によって metHAC の動態特性が変化し、解毒能に差異が生じたと考えられる。また、1 年間保存後も metHAC による臓器障害誘発の兆候は確認されていないことから (Fig. 45, 46)、生体適合性の維持による安全性の高さを備えた metHAC を利用できることが示唆された。

以上の結果から、metHAC は凍結乾燥粉末化により長期保存が可能となり、臨床使用を考慮した実用性の高い硫化水素中毒解毒剤として利用できると考えられる。

第4節 小括

第3章では凍結乾燥処理による metHAC の硫化水素中毒解毒剤の製剤としての応用を評価した結果、以下の知見を得た。

- metHAC は凍結乾燥及び再溶解処理後も製剤特性を維持していた。
- 凍結乾燥処理した metHAC は注射用水 (PBS) または生理食塩水で再溶解することが望ましく、5%ブドウ糖溶液による再溶解は推奨されないと考えられた。
- metHAC は凍結乾燥及び再溶解処理後も解毒能を維持していた。
- 凍結乾燥粉末状態で1年間保存した metHAC は速やかに再溶解可能であり、再溶解後も製剤特性を維持していた。
- 凍結乾燥粉末状態で1年間保存した metHAC は再溶解後少なくとも24時間は製剤特性を維持していた。
- 凍結乾燥粉末状態で1年間保存した metHAC は致死性硫化水素中毒モデルマウスにおいて高い解毒能を示した。
- 1年間保存した metHAC は臓器障害を惹起せず、高い生体適合性 (安全性) を示した。

以上の知見から、metHAC の凍結乾燥粉末化により長期保存が可能な硫化水素中毒解毒剤として利用できると考えられる。

第4章 適応拡大に向けた metHAC のシアン中毒解毒剤としての有効性評価

第1節 序

シアン中毒は、硫化水素中毒同様にシアンが細胞内ミトコンドリア中の CcO と結合し、細胞の酸素代謝を直接阻害することによって引き起こされる⁵¹。その発生要因は多岐にわたり、自殺目的やテロによる使用目的での被害、さらには火災によるポリウレタンやアクリロニトリルなど合成繊維の燃焼で発生したシアンガスの意図せぬ吸入でも発生している^{52,53}。少量であれば、内因的に存在するシアン解毒酵素のロダネーゼにより、低毒性のチオシアンに変換することが可能であるが、処理能力飽和後の症状の進行は早く、全身の組織が窒息状態となるため、一刻も早い治療の開始が必要とされる。シアン中毒には既存の解毒剤が存在し、亜硝酸系薬 (亜硝酸アミルや NaNO_2) とチオ硫酸ナトリウムの併用、または、ヒドロキシコバラミンが使用されている⁵⁴。亜硝酸系薬とチオ硫酸ナトリウムの併用では、まず亜硝酸が RBC 中の Hb を metHb に変換し、CcO に結合したシアンを親和性のより高い metHb に移行させ、CcO の機能を回復させる。次に、metHb とシアンの結合は可逆的であるため、metHb から解離したシアンはチオ硫酸ナトリウムを併用することでロダネーゼを活性化させ、解毒を促進する二段階の解毒機序となっている⁵⁵。一方で、亜硝酸系薬による Hb のメト化には一定時間を要するため、速やかに毒性発現するシアン中毒の解毒に遅れが出てしまうことや、RBC の酸素運搬能を阻害するため低酸素血症を惹起する可能性が高く、呼吸困難や一酸化炭素中毒を併発する火災時のシアン中毒患者には使用できない^{19,56}。また、チオ硫酸ナトリウムによるロダネーゼの活性化には時間を要するため、単剤のみでの使用では有効性は見込めない。一方で、解毒剤としてのヒドロキシコバラミンの利用は、投与直後から解毒能を発揮するとともに、RBC の酸素運搬には一切影響を及ぼさないため、上述の亜硝酸系薬の問題点を回避することができる。しかしながら、低分子製剤 ($M_w = 1,346$) であることに起因して血漿中のタンパク質と結合し、解毒能が大幅に低下するといった重大な問題点が存在する (タンパク結合率 95%以上)^{57,58}。これらのことから、既存の解毒療法が最良な選択肢であるとは言えない現状である。

このような背景から硫化水素中毒と同様の毒性発現機序及び metHb と高い結合親和性を有するシアン中毒に対しても metHAC が解毒剤としても利用可能であると考えられ、シアン中毒解毒剤としての開発においても社会的意義は大きいと考えられる。そこで本章では、metHAC のシアン中毒解毒剤としての有用性を細胞実験及び致死シアン中毒モデルマウスを用いて評価し、metHAC の中毒解毒剤としての適応拡大の可能性を検討した。

第2節 結果

2-1. metHAC のシアン捕捉性 (結合性) 評価

硫化水素中毒解毒剤としての metHAC は、metHAC 中の metHb が硫化水素を捕捉することで解毒剤として機能させるコンセプトである。シアンも硫化水素と同様に metHb が有する三価のヘム鉄と親和性高く結合することが知られており、理論上は metHAC がシアン中毒の解毒剤として利用できる可能性を秘めている。そこで、metHAC 溶液にシアン化ナトリウム (NaCN) 溶液を添加したときの UV-Vis. スペクトルの変化を評価した。その結果、metHAC は添加する NaCN 量に依存して 406 nm から 420 nm にピーク波長が推移した。この変化は、metHb と同様の挙動であった (Fig. 48a, b)。このことから、metHAC のシアン捕捉性が示された。また、結合特性を定量的に評価するため、スペクトル変化を利用して結合パラメータを算出した。その結果、metHAC の K 及び n は metHb よりも小さい値となった (Table 15)。アルブミンの存在により metHb のシアンとの結合が阻害されている可能性が考えられたため、metHb にアルブミンを結合させず、metHb に 3 倍モル比のアルブミンを混合した溶液 (metHb+3HSA) においても検討を行ったところ、metHAC や metHb と同様のスペクトル変化が確認された (Fig. 48c)。結合パラメータは metHb と比較してわずかに小さい値となったものの、metHAC より大きい結果となり、metHAC のシアン結合性の低下はアルブミンに起因しないと考えられた (Table 15)。上記の結果から、metHb と比較して metHAC はシアンの結合性が低い性質を有することが示唆されたため、利用方法を考慮したシアン中毒解毒剤として metHAC を確立する必要があると考えられた。

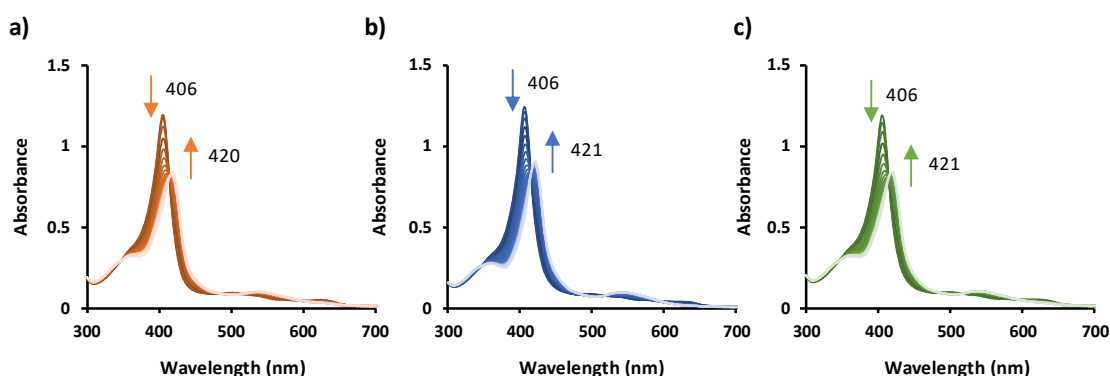


Fig. 48. UV-Vis. spectral changes on addition of NaCN solution.

Representative UV-Vis. spectra changes of **a)** metHAC, **b)** metHb, and **c)** metHb+3HSA (metHb with three-fold molar human serum albumin) after gradual NaCN addition. All samples were adjusted to 2 μ M as metHb and NaCN solution was gradually added at a molar ratio of 0.2 to the samples.

Table 15. Binding characteristics of metHAC, metHb, and metHb+3HSA with cyanide.

	$K \times 10^6 \text{ (M}^{-1}\text{)}$	n
metHAC	0.58 ± 0.04	1.48 ± 0.05
metHb	1.76 ± 0.12	1.81 ± 0.04
metHb+3HSA	1.58 ± 0.16	1.61 ± 0.07

K ; equilibrium constant, n ; Hill coefficient, metHb+3HSA; metHb with three-fold molar human serum albumin ($n = 3$, mean $\pm$ S.D.)

2-2. NaCN 曝露に対する metHAC の細胞保護効果

◆ 細胞生存率評価

シアン毒性発現は、硫化水素同様に細胞内に侵入してミトコンドリア内膜に存在する CcO に結合することが起点となる。シアン結合による CcO の阻害により電子伝達が阻害され、酸素利用が停止される。このとき、ミトコンドリアの膜電位及び付随する活性が低下し、最終的に細胞死が誘導される。そこで、まず NaCN 曝露に対する metHAC 存在下での細胞生存率を評価した。その結果、曝露する NaCN の濃度の増大により細胞生存率が低下しており、ヘモグロビン-アルブミンクラスターの添加では保護効果は確認されなかったのに対し、metHAC 及び metRBC 添加群ではその低下が濃度依存的に抑制された (Fig. 49)。

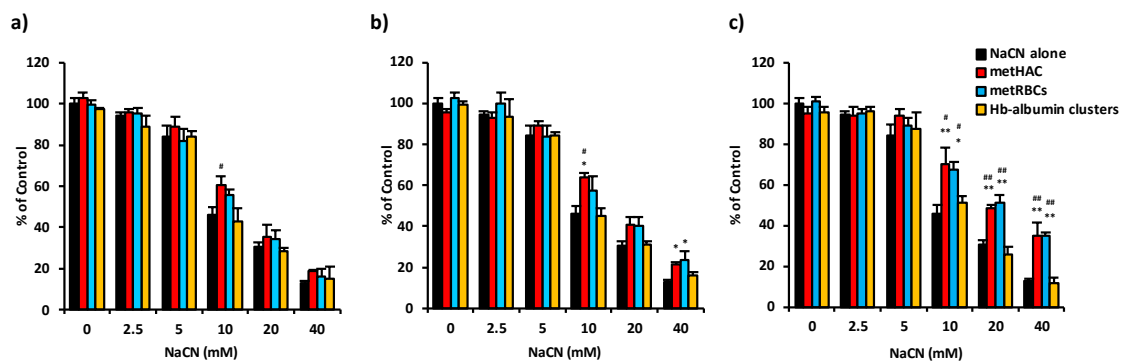


Fig. 49. The viability of NaCN-treated H9c2 cells in the presence of metHAC, metRBC, or Hb-albumin clusters.

NaCN solution in the presence of metHAC, metRBC, or Hb-albumin clusters at **a)** 0.625 g/dL, **b)** 1.25 g/dL, **c)** 2.5 g/dL was added to each well and incubated for 1 h (37 °C, 100% air). Cell viabilities were determined by methylene blue assay. All experiments were conducted in triplicates. The data are represented as mean $\pm$ S.D. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. NaCN alone, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. Hb-albumin clusters.

◆ 酸素消費量評価による metHAC の NaCN 曝露に対する細胞保護効果の検討

酸素消費量の観点から、NaCN 曝露に対する保護効果を検討した結果、NaCN 添加により酸素消費量は大幅に低下した。一方で、metHAC 及び metRBC 添加群においてはコントロール群と同等程度に維持されていた (Fig. 50)。

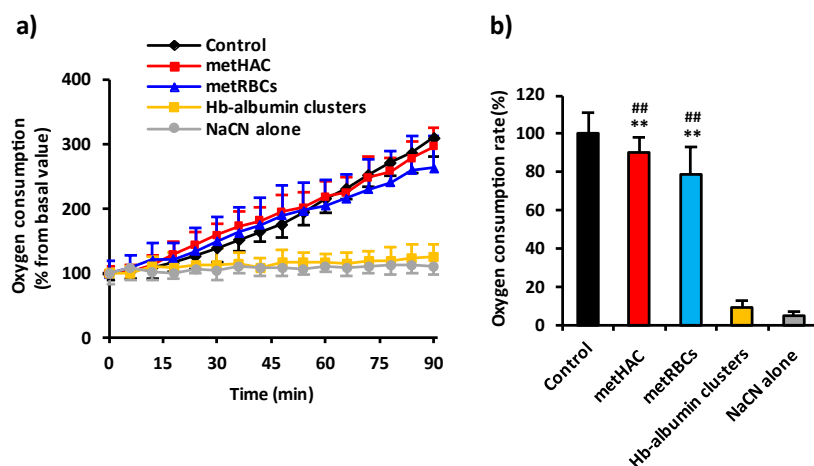


Fig. 50. a) Oxygen consumption profiles and b) calculated slope of NaCN-treated H9c2 cells in the presence of metHAC, metRBC, or Hb-albumin clusters.

Cells were exposed to 2.5 mM NaCN in the presence of metHAC, metRBC, and Hb-albumin clusters and incubated for 1 h (37 °C, 100% air). The samples of metHAC, metRBC, and Hb-albumin clusters were set 2.5 g/dL as metHb or Hb. All experiments were conducted in triplicates. The data are represented as mean $\pm$ S.D. ** p < 0.01 vs. NaCN alone, ## p < 0.01 vs. Hb-albumin clusters.

◆ ミトコンドリア評価による metHAC の NaCN 曝露に対する細胞保護効果の検討

NaCN 曝露による影響をミトコンドリア膜電位及び活性により評価した。その結果、NaCN 処理は大きく膜電位を低下させたのに対し、metHAC 及び metRBC 添加群においてこの低下が抑制された (Fig. 51)。この傾向はミトコンドリア活性の結果と一致しており (Fig. 52)、ミトコンドリア膜電位の低下が抑制されたことでミトコンドリア活性の低下が回避され、細胞生存率を上昇させて細胞保護効果を示したと考えられる。

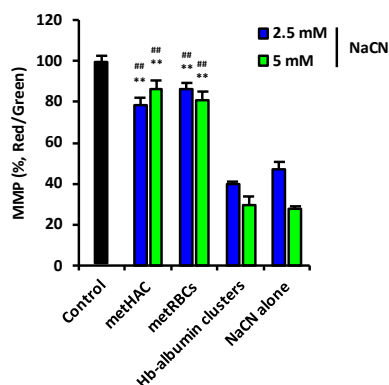


Fig. 51. Mitochondrial membrane potential (MMP) of NaCN-treated H9c2 cells in the presence of metHAC, metRBC, or Hb-albumin clusters.

Cells were exposed to 5 mM or 2.5 mM NaCN in the presence of metHAC, metRBC, and Hb-albumin clusters and incubated for 1 h (37 °C, 100% air). The samples of metHAC, metRBC, and Hb-albumin clusters were set 2.5 g/dL as metHb or Hb. All experiments were conducted in triplicates. The data are represented as mean $\pm$ S.D. ** p < 0.01 vs. NaCN alone, ## p < 0.01 vs. Hb-albumin clusters.

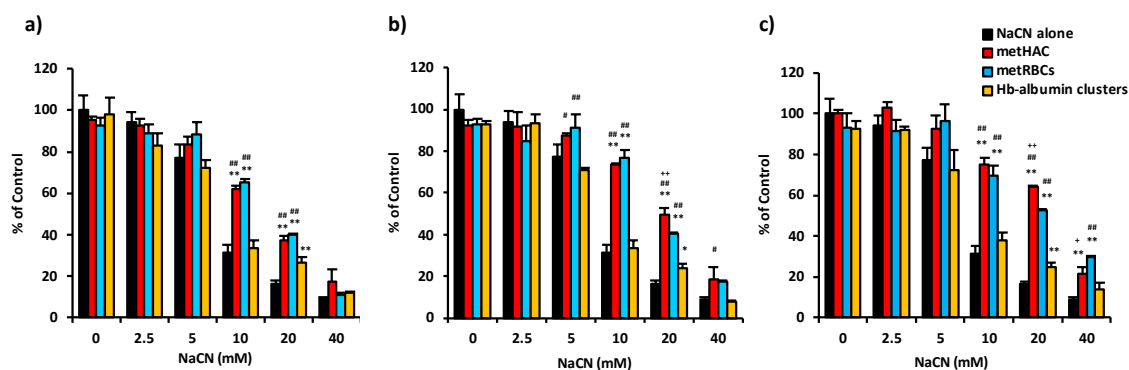


Fig. 52. Mitochondrial activity of NaCN-treated H9c2 cells in the presence of metHAC, metRBC, or Hb-albumin clusters.

NaCN solution in the presence of metHAC, metRBC, or Hb-albumin clusters at a) 0.625 g/dL, b) 1.25 g/dL, c) 2.5 g/dL was added to each well and incubated for 1 h (37 °C, 100% air). Mitochondrial activity was determined by CCK-8. All experiments were conducted in triplicates. The data are represented as mean $\pm$ S.D. * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. NaCN alone, # p < 0.05, ## p < 0.01 vs. Hb-albumin clusters, + p < 0.05, ++ p < 0.01 vs. metRBCs.

2-3. シアン中毒モデルマウスにおける metHAC の治療効果

◆ 生存率評価による metHAC の有効性の検討

metHAC を致死的な硫化水素中毒に対して解毒剤として使用する際に、中毒モデルマウスでは 500 mg metHb/kg が最適投与量であると結論付けており、有効性に加えて安全性を担保した状態で使用することができる。そこで、まず致死的なシアン中毒モデルマウスに 500 mg metHb/kg で metHAC を投与し、生存率を評価した。その結果、生理食塩水の投与で全例が死亡する条件下で、metHAC 投与群は 40%が生存した。同用量の metHb 単独投与群では 10%の生存にとどまったことから、metHAC は生存率の上昇に寄与するものの、改善の余地があると考えられた。現行の治療法では、シアン中毒に対して NaNO_2 とチオ硫酸ナトリウムの併用療法が利用されている。 NaNO_2 は酸化剤として RBC 中の Hb を metHb に変換し、metHb がシアンを捕捉することでシアン解毒に貢献する。一方で、チオ硫酸ナトリウムは生体内シアン解毒酵素のロダネーゼを活性化することで metHb から解離したシアンを低毒性のチオシアンに変換促進する異なった機序でシアン解毒を担う。metHAC とシアンの結合性評価の結果から、metHAC は metHb と比較して結合解離性が高いことを踏まると、metHAC にチオ硫酸ナトリウムを併用することで治療効果を高めることができると考えられた。そこで、致死シアン中毒モデルマウスに対して metHAC にチオ硫酸ナトリウムを併用したところ、100%の生存率となり、現行の NaNO_2 とチオ硫酸ナトリウムの併用による治療効果 (50%) と比較しても優れた結果を示した (Fig. 53)。

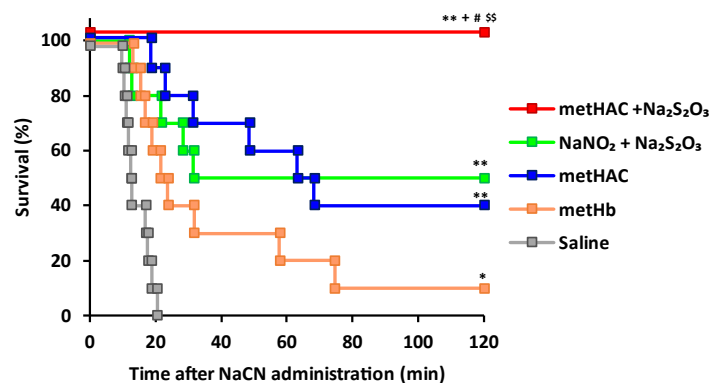


Fig. 53. Survival rate of lethal cyanide poisoning mice after treatment with metHAC.

At 5 min after the oral exposure of NaCN solution (12 mg/kg), either saline, metHAC (500 mg metHb/kg), metHAC (500 mg metHb/kg) + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (61 mg/kg), metHb (500 mg/kg), or NaNO_2 (8.5 mg/kg) + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (61 mg/kg) was injected in lethal cyanide poisoning model mice ($n = 10$ / group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. saline, + $p < 0.05$ vs. NaNO_2 + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, # $p < 0.05$ vs. metHAC, \$\$ $p < 0.01$ vs. metHb. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; sodium thiosulfate.

◆ CcO 活性評価による metHAC の有効性の検討

シアン中毒は CcO の阻害によって誘導されるため、致死シアン中毒モデルマウス解毒剤投与後の CcO 活性を評価した。その結果、NaCN 曝露下において評価したすべての臓器で活性が低下しているのに対し、metHAC の投与によりその活性は回復した。また、チオ硫酸ナトリウムの併用によりその回復はさらに促進される傾向がみられ、NaNO₂ とチオ硫酸ナトリウムの併用以上の効果を示した (Fig. 54)。

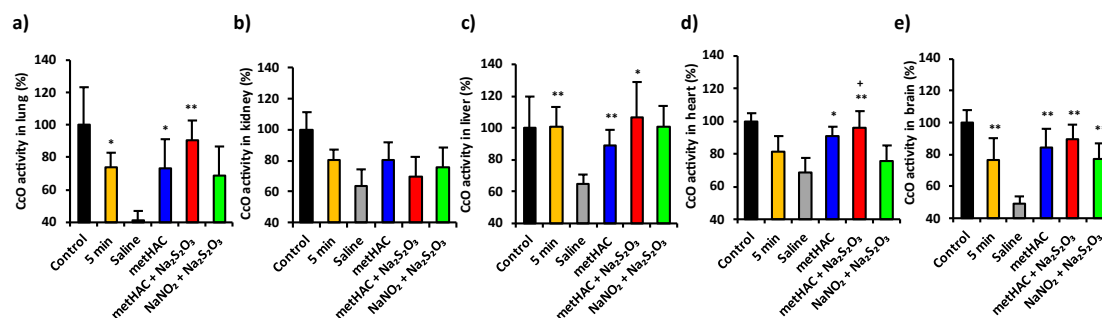


Fig. 54. CcO activity in the a) lungs, b) kidney, c) liver, d) heart, and e) brain after antidotal treatment in lethal cyanide poisoning mice.

At 5 min after the oral administration of NaCN solution (12 mg/kg), either saline, metHAC (500 mg metHb/kg), metHAC (500 mg metHb/kg) + Na₂S₂O₃ (61 mg/kg), or NaNO₂ (8.5 mg/kg) + Na₂S₂O₃ (61 mg/kg) was injected in lethal cyanide poisoning model mice. 10 min after administration of each antidote, the mice were euthanized and specific organs (lungs, kidneys, liver, heart, and brain) were collected. (n = 5 / group). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. saline, +*p* < 0.05 vs. NaNO₂ + Na₂S₂O₃.

◆ 代謝性アシドーシス評価による metHAC の有効性の検討

CoC を阻害するシアン中毒下では、代替エネルギー産生経路である嫌氣的解糖系が亢進する。副産物である乳酸の蓄積によって代謝性アシドーシス状態となるため、血液ガスパラメータにより解毒剤投与後のアシドーシス状態を評価した。その結果、致死性のシアン中毒状態では重炭酸イオンの大幅な減少や乳酸の増大など重度の代謝性アシドーシスが進行しているのに対し、metHAC 単独投与群及びチオ硫酸ナトリウム併用群では代謝性アシドーシスの発症が抑制された (Fig. 55)。

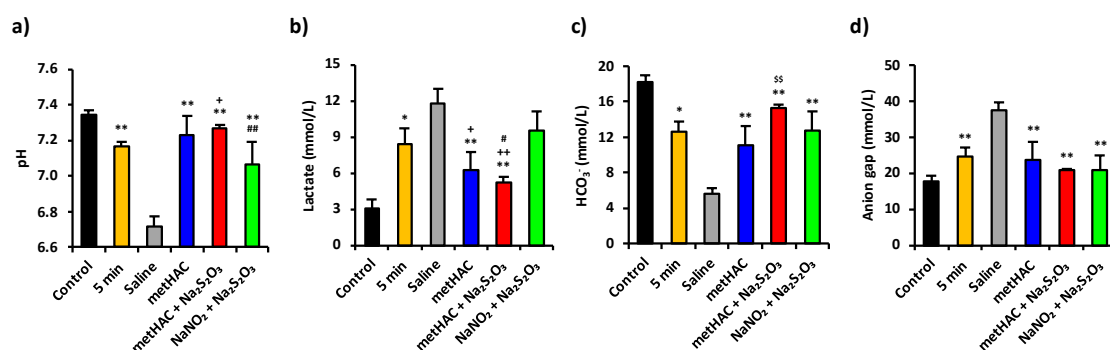


Fig. 55. Metabolic acidosis parameters in blood after antidotal treatment in lethal cyanide poisoning mice.

At 5 min after the oral administration of NaCN solution (12 mg/kg), either saline, methHAC (500 mg metHb/kg), methHAC (500 mg metHb/kg) + Na₂S₂O₃ (61 mg/kg), or NaNO₂ (8.5 mg/kg) + Na₂S₂O₃ (61 mg/kg) was injected in lethal cyanide poisoning model mice. 10 min after administration of each antidote, the mice were euthanized and venous blood was collected. (n = 5 / group). **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. saline, #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01 vs. 5 min, \$\$*p* < 0.01 vs. methHAC, +*p* < 0.05, ++*p* < 0.01 vs. NaNO₂ + Na₂S₂O₃.

◆ 致死シアン中毒モデルマウスにおける metHAC のシアン捕捉能評価

metHAC は体内に存在するシアンを metHAC の中心に位置する metHb が捕捉することで解毒を行っていると考えられる。そこで、metHAC 投与後の血中のシアン濃度及びチオシアン濃度を測定した。その結果、シアン曝露によって RBC 中のシアン濃度は増大した。一方で、metHAC 単独投与群では生理食塩水投与群と比較して RBC 中のシアン濃度が減少したのに対し、血漿中におけるシアン濃度が非常に大きくなり、RBC において血漿中に分布する metHAC が多くのシアンを捕捉していると考えられた。また、metHAC へのチオ硫酸ナトリウムの併用では血漿中シアン濃度が減少し、チオシアン濃度の増大に変化したことから、metHAC が捕捉したシアンをチオ硫酸ナトリウムが効率的にチオシアンに変換していることが示唆された。チオシアン濃度の増加は NaNO_2 にチオ硫酸ナトリウムを併用した群においても確認され、 NaNO_2 由来の RBC 中 metHb が捕捉したシアンをチオシアンに変換していると考えられた (Fig. 56)。

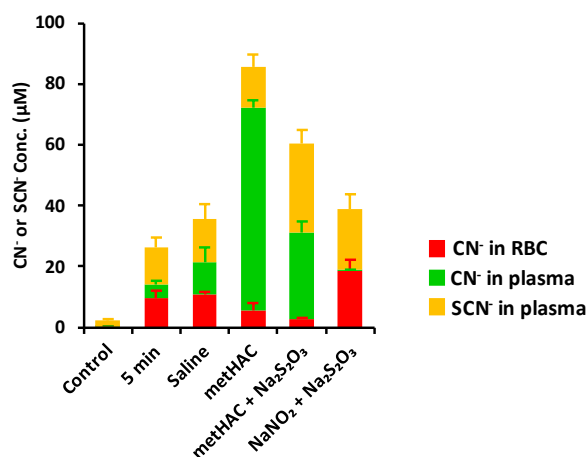


Fig. 56. Cyanide (CN^-) and thiocyanate (SCN^-) concentrations in blood after antidotal treatment in lethal cyanide poisoning mice.

At 5 min after the oral administration of NaCN solution (12 mg/kg), either saline, metHAC (500 mg metHb/kg), metHAC (500 mg metHb/kg) + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (61 mg/kg), or NaNO_2 (8.5 mg/kg) + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (61 mg/kg) was injected in lethal cyanide poisoning model mice. 10 min after administration of each antidote, the mice were euthanized and venous blood was collected. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; sodium thiosulfate (n = 5 / group, mean + S.D.)

第3節 考察

シアン中毒は硫化水素中毒と同様に CcO を阻害することで中毒を発症するとされ、強力且つ素早く作用する性質も類似している。metHb は硫化水素のみならず、シアンとも高い結合親和性を有するため^{58,59}、硫化水素中毒解毒剤として作製した metHAC がシアン中毒の解毒剤としても利用できる余地は大いに存在する。現状、シアン中毒の解毒剤として NaNO₂ とチオ硫酸ナトリウムの併用が臨床で使用されている。NaNO₂ は RBC 中の Hb を metHb に変換して metHb にシアンを捕捉させる役割を担い、この metHb から解離したシアンをチオ硫酸ナトリウムが生体内解毒酵素であるロダネーゼ活性を高め、低毒性のチオシアンに変換促進を行っている⁶⁰。このように異なる作用機序の薬剤を併用することで治療効果の最大化を狙っており、metHAC は metHb としての機能を果たすことから NaNO₂ 投与の代替として利用できる可能性がある。本章では、metHAC のシアン中毒解毒剤としての適応拡大を目指し、細胞及び致死シアン中毒モデルマウスによりその有効性を検討した。

既存の解毒療法である NaNO₂ とチオ硫酸ナトリウムの併用投与では、第一段階として NaNO₂ により形成された metHb が生体内のシアンを捕捉する部分から解毒が開始される。しかしながら、NaNO₂ は RBC 中の Hb を metHb に変換するまでは解毒が開始されないため、metHAC と比較して解毒の遅延が見込まれ、急性中毒の解毒剤としては必ずしも最適ではない。また、metHb には酸素結合能が無いため、RBC の酸素運搬を阻害する低酸素症の惹起といった問題点も存在している。一方で、チオ硫酸ナトリウムは NaNO₂ が抱える低酸素症の惹起はなく、比較的安全に利用できる点は非常に利点が多いものの、ロダネーゼの活性化には Hb のメト化以上に時間を要するため、単独での使用は有効性が見込まれない⁶¹。本検討では、metHAC が metHb の代用として機能することを想定しており、metHAC はシアンを捕捉し、シアン解毒のポテンシャルを有していることを確認した (Fig. 48)。実際に、致死シアン中毒モデルマウスにおいて metHAC の単独投与で生存率が改善しており、チオ硫酸ナトリウムの併用によりその効果が最大化されていた (Fig. 53)。これは、NaNO₂ とチオ硫酸ナトリウムの併用投与群の結果を大きく上回っており、metHAC が NaNO₂ の解毒遅延を解消し、内因性 metHb の代替として機能していることを示唆しており、metHAC 投与群における血漿中シアン濃度の高さからも裏付けられる (Fig. 56)。metHAC のシアン捕捉により、ミトコンドリア活性が保護されていることは細胞実験シアン中毒モデルマウスにおける CcO 活性の回復や代謝性アシドーシス発症の予防からも確認できており (Fig. 50–52, 54)、metHAC の NaNO₂ を凌駕する代替製剤として利用できる可能性が考えられる。

以上の結果から、硫化水素中毒解毒剤として作製した metHAC はシアン中毒の解毒剤としても適応拡大が可能であり、NaNO₂ の代替製剤としてチオ硫酸ナトリウムとの併用により解毒効果が最大化されることが考えられる。

第4節 小括

第4章では metHAC の適応拡大に向けたシアン解毒剤としての有効性を評価した結果、以下の知見を得た。

- metHAC はシアン捕捉性を示した。
- シアン曝露に対し、metHAC はミトコンドリア活性及び酸素消費を維持することで細胞保護効果を示した。
- metHAC は致死シアン中毒モデルマウスの生存率を上昇させ、チオ硫酸ナトリウムと併用することで全例が生存した。
- metHAC とチオ硫酸ナトリウムの併用利用は、致死シアン中毒モデルマウスにおいて metHAC がシアンを捕捉しながら、チオ硫酸ナトリウムがチオシアンへの変換を促進し、CcO 活性を回復させた。

以上の知見から、硫化水素中毒解毒剤として作製した metHAC は同様の毒性メカニズムを有するシアン中毒の解毒剤としても適応拡大が可能であり、チオ硫酸ナトリウムと併用することでその効果が最大化されると示唆された。

第5章 H₂S-metHAC の硫化水素送達体としての応用

第1節 序

硫化水素は、1713年に Bernardino Ramazziniによって初めてその強力な毒性が報告されて以来、長年にわたって毒ガスとして認知されてきた⁹。しかしながら、1989年に硫化水素が脳に存在することが報告されて以降⁶²、硫化水素が生体内において微量ながら内因的に産生され、血管平滑筋の弛緩や神経調節などシグナル分子として生体恒常性の維持に寄与していることが相次いで報告された^{63,64}。また、シグナル分子として機能するのみならず、硫化水素が神経細胞を酸化ストレスから保護することが見出され、細胞保護因子としての機能が示された。こうした硫化水素の機能は、外因的な投与によっても得られ、疾患治療の創薬シーズとして様々な研究が進められている⁶⁵⁻⁶⁷。特に、炎症性腸疾患⁶⁶や糖尿病^{68,69}、薬剤誘発性腎障害^{65,70}など多岐に渡る難治性疾患に対して動物レベルでの有効性が確認され、今後の応用が期待されている。なかでも、虚血再灌流障害に対しては動物レベルでの有効性に加え、冠動脈バイパス手術時の心虚血再灌流障害において臨床試験が実施されるほどまでに研究段階が進められている⁷¹。虚血再灌流障害は、一過性の阻血とその後の閉塞部位への供給再開時に生じる障害であり、臨床では心筋梗塞や脳梗塞といった再灌流療法後や臓器移植や切除などの外科的処置後にみられることが多い。その発症と進展に ROS や炎症などの複合的要因が関与しているものの⁷²⁻⁷⁴、虚血再灌流障害に対して承認された治療薬は存在せず、臨床上解決すべき重要課題となっている⁷⁵。

硫化水素の生体内への投与として、硫化水素の吸入や硫化水素供与体の利用が画策されている。硫化水素の吸入は、ガスとして肺胞から取り込ませるが、刺激性ガスである硫化水素を直接肺胞に曝露する方法は硫化水素ドナーの静脈内投与と比較して粘膜刺激作用により咽頭や気管支、肺組織に炎症反応を生じ、呼吸器系への負担が大きい懸念がある⁷⁶。そのため、高用量の硫化水素が必要な場合など、ガスを高濃度にすることは非常に困難である。また、人間の鼻は0.003 ppm以上で腐卵臭を感知するため⁷⁷、長時間にわたる吸入継続を繰り返すのは服薬アドヒアランスの不良を引き起こす可能性も高い。また、硫化水素ドナーの静脈内投与は投与量をコントロールしやすく、患者への負担も軽減されと考えられる。しかしながら、NaHS や硫化ナトリウムなどの硫化水素ドナーは、溶解直後に解離して硫化水素を放出する速放性であり、治療効果の持続性(半減期が短い)や⁷⁸、血中硫化水素濃度の急上昇により硫化水素中毒を発症する懸念が存在する⁷⁹。このように、未だ有望な硫化水素送達システムの構築には至っておらず、新たなシステムの開発・探索が強く望まれる。

第2章の結果を踏まえ、硫化水素中毒解毒剤として利用した metHAC は低 pH 環境で効率的に硫化水素を解離すると考えられ、metHAC に硫化水素を付加した H₂S-metHAC は硫化水素送達体として機能すると考えられる。また、硫化水素吸入療法及び既存の硫化水素ドナーの懸念点である呼吸器系への負担や metHAC の十分な血中滞留性、容易な投与量の調

整により中毒発症は回避されると予想される。加えて、metHAC の肝臓に高い分布を示した体内動態の結果を考慮すると、肝臓において低 pH 化が進行する疾患において metHAC の特性を活かした効率的な硫化水素送達を達成できると考えられる。

そこで本章では、metHAC の硫化水素送達体としての可能性を検討するため、まず metHAC に硫化水素 を付加した H_2S -metHAC を新たに作製し、硫化水素放出性を含めた製剤特性を評価した。次に、既に硫化水素の有効性が確認されており、病態下で低 pH が誘導される疾患として虚血再灌流障害を選択し、肝虚血再灌流障害モデルマウスに対して H_2S -metHAC の硫化水素送達体としての有効性を検討した。最後に、健常マウスを用いて H_2S -metHAC から放出される硫化水素の毒性についても検討し、metHAC の中毒解毒剤のみならず、硫化水素送達体としての有用性を評価した。

第2節 結果

2-1. H_2S -metHAC の作製及び物理化学的特性評価

metHb が硫化水素と可逆的に結合する性質を利用し、第二章で作製した metHAC に硫化水素ドナーである NaHS を添加することで硫化水素結合型 metHAC (H_2S -metHb-albumin clusters: H_2S -metHAC) を作製した (Fig. 57)。

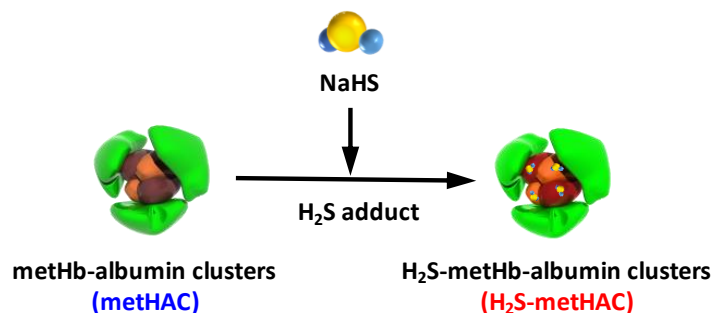


Fig. 57. Preparation process of H_2S -metHAC.

H_2S -metHAC は metHAC の metHb に硫化水素が付加した状態であり、ピーク波長が 405 nm から 423.5 nm にスペクトルが変化していることから確認した (Fig. 58a)。 H_2S -metHAC の構造学的特性を理解するため、 H_2S -metHAC の物理化学特性を評価した。その結果、 H_2S -metHAC は metHAC と同等な粒度分布を示すとともに、粒子径は約 14 nm となり、硫化水素付加工程を経ることによる metHAC の凝集や分解は起きていなかった。また、metHb 単体に硫化水素を付加した硫化水素結合型 metHb (H_2S -metHb) においても metHb と同等であった (Fig. 58b, Table 16)。

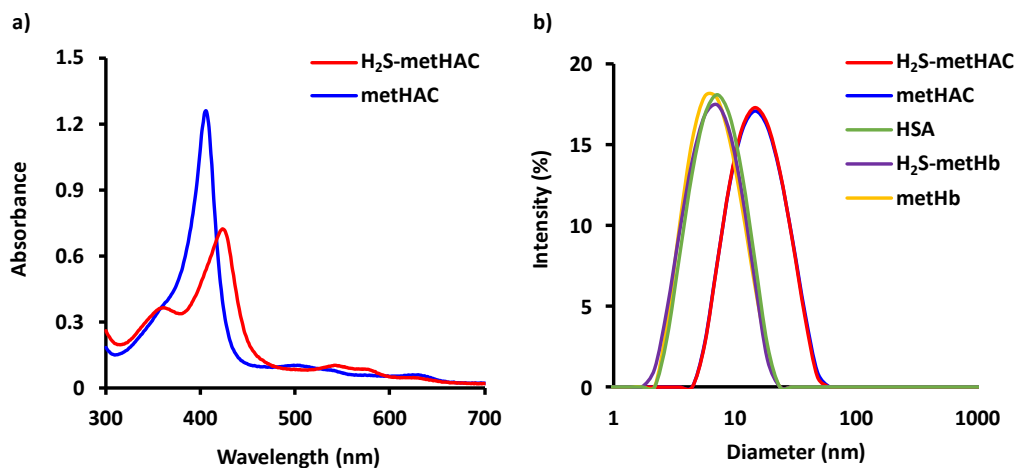


Fig. 58. a) Size distribution and b) UV-Vis. spectrum of H_2S -metHAC.

Table 16. Physicochemical characteristics of H₂S–methHAC.

	Diameter (nm)	PDI	ζ-potential (mV)
H ₂ S–methHAC	13.9 ± 0.05	0.04 ± 0.006	-3.11 ± 0.11
methHAC	14.1 ± 0.10	0.04 ± 0.005	-3.07 ± 0.09
HSA	6.8 ± 0.04	0.02 ± 0.002	-3.20 ± 0.33
metHb	5.9 ± 0.04	0.12 ± 0.005	-4.98 ± 0.44
H ₂ S–metHb	6.0 ± 0.16	0.12 ± 0.026	-4.91 ± 0.37

PDI; polydispersity index, HSA; human serum albumin (n = 3, mean ± S.D.)

H₂S–methHAC の構造を詳細に評価するため、SEC 及び Native–PAGE を実施した。その結果、H₂S–methHAC の SEC クロマトグラムは methHAC の形状とよく一致するとともに、Native–PAGE においても H₂S–methHAC は methHAC と同様のパターンを示し、全体構造は硫化水素付加後も維持されていると考えられた (Fig. 59a, b)。そこで、構成タンパク質の二次構造を反映する CD スペクトルを実施したが、H₂S–methHAC と methHAC は同様のスペクトル形状となり、また H₂S–metHb 及び metHb も一致した (Fig. 59c)。これらのことから、硫化水素付加による methHAC の構造に変化はなく、H₂S–methHAC は methHAC と同等の構造特性を有すると考えられた。

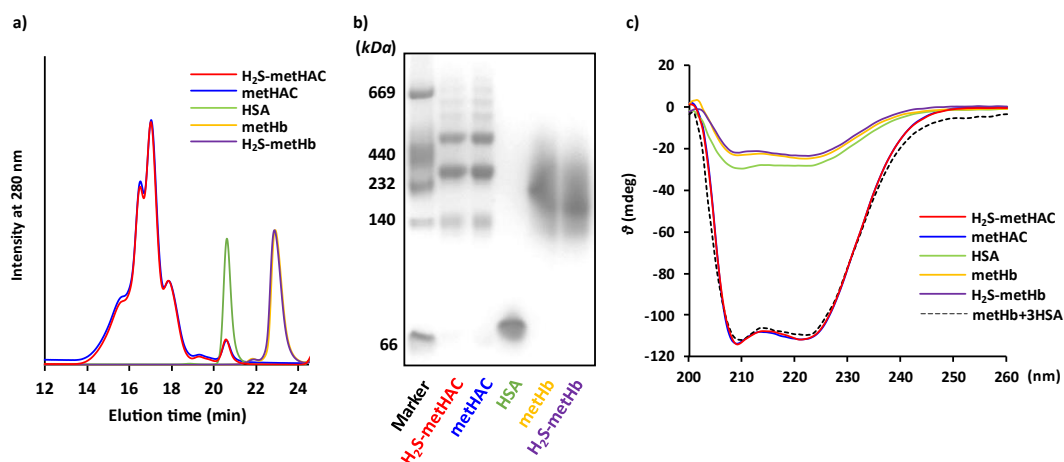


Fig. 59. a) Representative SEC profiles, b) Image of Native–PAGE and c) CD spectra of H₂S–methHAC. HSA; human serum albumin

2-2. H₂S–metHAC からの硫化水素放出性評価

H₂S–metHAC が硫化水素送達体として機能するためには、metHAC に結合させた硫化水素が解離して放出される必要がある。そこで、H₂S–metHAC のスペクトル変化を評価することで metHAC に結合させた硫化水素の放出性を検討した。その結果、H₂S–metHAC からの経時的な硫化水素の放出が確認され、pH7.4 の生理的条件下では 3.69 ± 0.24 時間で 50% が放出された (Fig. 60, Table 17)。また、その放出割合は pH の低下に応じて促進された。この結果より、標的部位において局所的な pH 低下を伴う疾患に対して H₂S–metHAC の硫化水素送達体としての利用が有効である可能性が高いと考えられた。

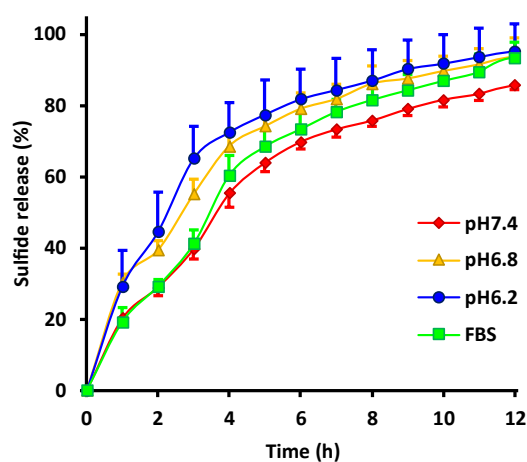


Fig. 60. Time course of sulfide release from H₂S–metHAC at various pH conditions.

H₂S–metHAC was diluted to 0.5 g metHb/dL in 100 mM phosphate buffer at pH7.4, 6.8, 6.2, or fetal bovine serum (FBS), respectively. Then, samples were incubated at 37°C and change in UV-Vis. spectra at 423.5 nm were observed. (n = 3, mean ± S.D.)

Table 17. 50% sulfide release time from H₂S–metHAC at various pH conditions.

Condition	hr.
pH7.4	3.69 ± 0.24
pH6.8	2.73 ± 0.22
pH6.2	2.18 ± 0.46
FBS	3.36 ± 0.17

n = 3, mean ± S.D.

2-3. H₂S-metHAC 最大耐用量の決定

硫化水素は抗酸化作用や抗炎症作用などの生理活性作用を示す一方で、短時間での高濃度曝露は硫化水素中毒を発症し、最悪の場合は死に至る。硫化水素中毒を回避し安全性を担保した H₂S-metHAC の利用を達成するためには、まず最大耐用量を決定する必要がある。そこで、既存の硫化水素ドナーである NaHS と比較しながら H₂S-metHAC の最大耐用量を評価した。その結果、NaHS の投与では 1.74 mg/kg において 5 例中 1 例 (20%) の死亡が確認され、2.09 mg/kg では全例が死亡した。一方で、1.74 mg/kg NaHS と同等量の硫化水素を担持する 500 mg metHb/kg の H₂S-metHAC 投与では死亡は確認されず、さらに 100 mg metHb/kg 増量した 600 mg metHb/kg (2.09 mg/kg NaHS 相当) においても 100%生存した (Table 18)。metHAC は最大 5 g metHb/dL (タンパク量として 20 g/dL) で作製しており、600 mg metHb/kg 以上の利用では投与体積の増加に伴って心血管系への負担が増大してしまうこと、また、製剤学的観点から 5 g metHb/dL 以上のさらなる濃縮は高粘性化により困難であるため、本検討では H₂S-metHAC の最大耐用量を 600 mg metHb/kg と決定した。

今回、NaHS および H₂S-metHAC 投与 24 時間後の生存個体における肝機能および腎機能を反映する生化学パラメータについても評価を行ったが、異常な上昇は確認されなかった (Fig. 61)。これらのことから、H₂S-metHAC は徐放的に硫化水素を放出することで硫化水素中毒を回避して NaHS では達成できない高用量の硫化水素送達を可能にすると考えられ、適用疾患や病態の進行に応じて高用量の硫化水素が必要とされる場合は NaHS 以上に安全に使用できることが示唆された。

Table 18. Survival rate after intravenous administration of NaHS and H₂S-metHAC.

	Dose	n	Alive	Dead	Survival (%)
Control	Saline	5	5	0	100
NaHS	0.35 mg NaHS/kg	5	5	0	100
	0.69 mg NaHS/kg	5	5	0	100
	1.05 mg NaHS/kg	5	5	0	100
	1.39 mg NaHS/kg	5	5	0	100
	1.74 mg NaHS/kg	5	4	1	80
	2.09 mg NaHS/kg	5	0	5	0
H₂S-metHAC	100 mg metHb/kg (Equivalent to 0.35 mg NaHS/kg)	5	5	0	100
	200 mg metHb/kg (Equivalent to 0.69 mg NaHS/kg)	5	5	0	100
	300 mg metHb/kg (Equivalent to 1.05 mg NaHS/kg)	5	5	0	100
	400 mg metHb/kg (Equivalent to 1.39 mg NaHS/kg)	5	5	0	100
	500 mg metHb/kg (Equivalent to 1.74 mg NaHS/kg)	5	5	0	100
	600 mg metHb/kg (Equivalent to 2.09 mg NaHS/kg)	5	5	0	100
metHAC	600 mg metHb/kg	5	5	0	100

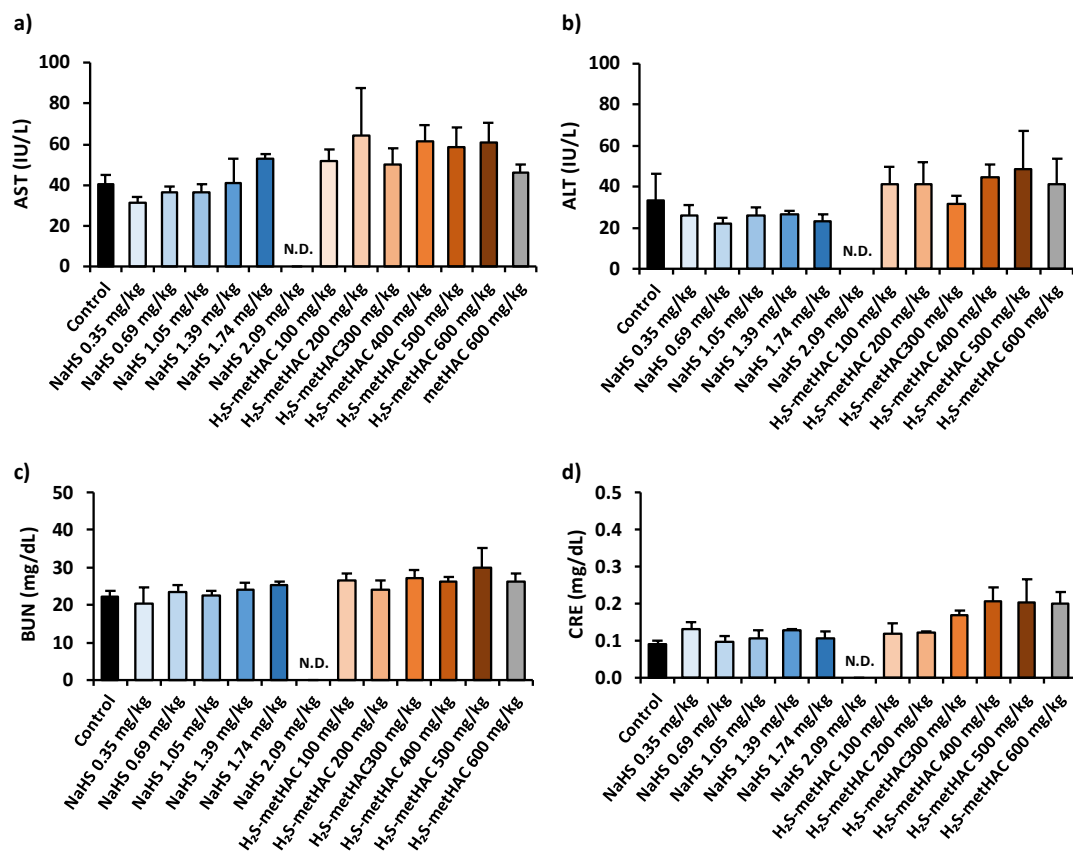


Fig. 61. Biochemical parameters reflecting liver injury and renal function at 24 hours after administration of NaHS and H₂S-methHAC.

Healthy mice received various dose of either NaHS or H₂S-methHAC. At 24 hours after administration, blood was collected and biochemical parameters reflecting liver injury [**a**] aspartate aminotransferase (AST), **b**] alanine aminotransferase (ALT)] and renal function [**c**] blood urea nitrogen (BUN), **d**] creatinine (CRE)] were measured in survived mice. Saline and methHAC (600 mg methHb/kg) were administered to control mice, respectively. N.D.; Not determined (n = 4–5, mean + S.D.)

2-4. 肝虚血再灌流障害に対する H₂S-methHAC の有効性評価

◆ 肝虚血再灌流障害モデルマウスの作製

H₂S-methHAC の肝虚血再灌流障害に対する治療薬としての利用を検討するため、以下に示す手順で肝虚血再灌流障害モデルマウスを作製した (Fig. 62)。マウスを正中切開し、門脈を非侵襲性クリップを用いて肝臓への血液流入を停止した (70%虚血)。虚血状態を 45 分間にわたり継続後、クリップを外して 6 時間再灌流した。H₂S-methHAC を含めたすべての治療薬は虚血開始の 30 分前に投与し、有効性を評価した。

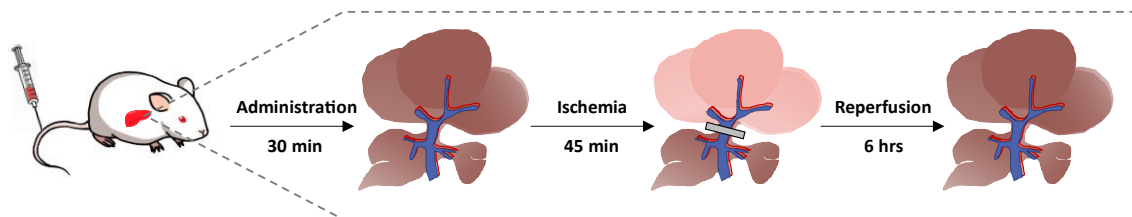


Fig. 62. Schematic illustration of the surgical procedure of hepatic ischemia-reperfusion injury (IRI).

Mice received test samples *via* the tail vein. After 30 min of administration, midline laparotomy was performed and hepatic triplet (portal vein, hepatic artery, and bile duct) was clamped with an atraumatic clip to achieve 70% hepatic ischemia. After 45 min, the microvascular clamp was removed and reperfusion was continued for 6 hours.

◆ H₂S-metHAC 最適投与量の決定

肝虚血再灌流障害に対する H₂S-metHAC の最適投与量を検討するため、前述の肝虚血再灌流障害モデルマウスに各投与量 (100, 300, 600 mg metHb/kg) に設定した H₂S-metHAC を投与し、再灌流終了後の肝障害度を評価した。その結果、Saline 投与群と比較して H₂S-metHAC の投与により血漿中トランスアミナーゼ値は低下し、300 mg metHb/kg 投与群において最も肝障害を抑制した (Fig. 63)。このことから、本検討における H₂S-metHAC の最適投与量を 300 mg metHb/kg に決定した。

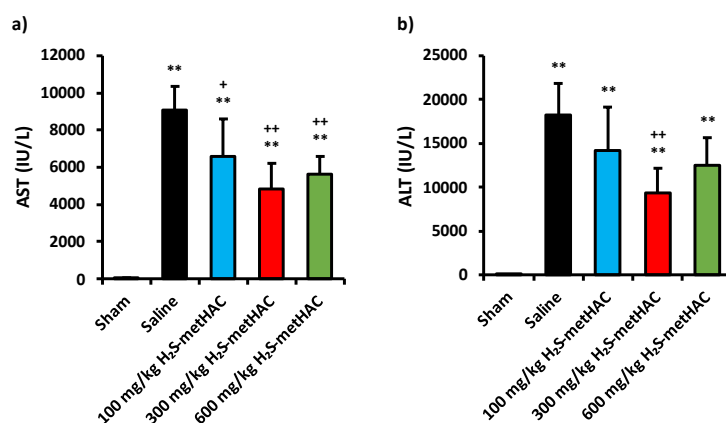


Fig. 63. Determination of optimal dose of H₂S-metHAC in a mouse model of hepatic IRI.

Mice were administered either saline or various dose of H₂S-metHAC (100, 300 and 600 mg metHb/kg). Then, mice received IRI treatment according to the protocol in Fig. 62. Mice in the sham group received only a midline laparotomy without clamping the hepatic triplet. Plasma levels of **a)** aspartate aminotransferase (AST) and **b)** alanine aminotransferase (ALT) were measured. (n = 6/group, mean + S.D.) ***p* < 0.01 vs. sham, +*p* < 0.05, ++*p* < 0.01 vs. Saline.

◆ H₂S–methHAC の有効性評価

前項で決定した最適投与量において、肝虚血再灌流障害に対する H₂S–methHAC の有効性を対照群と比較しながら検討した。Fig. 64a に示すように、肝虚血再灌流障害処理後の肝臓では黄点線で囲む部分において顕著に組織障害が惹起されており、HE 染色画像からも組織傷害が確認された。この組織障害範囲は、硫化水素利用において縮小しており、特に NaHS 群よりも等価量の硫化水素を担持する H₂S–methHAC 群においてその効果は大きかった。この傾向は、血漿中トランスアミナーゼ値からも確認され、H₂S–methHAC の投与が肝虚血再灌流障害処理によって受ける障害を予防していた (Fig. 64b, c)。

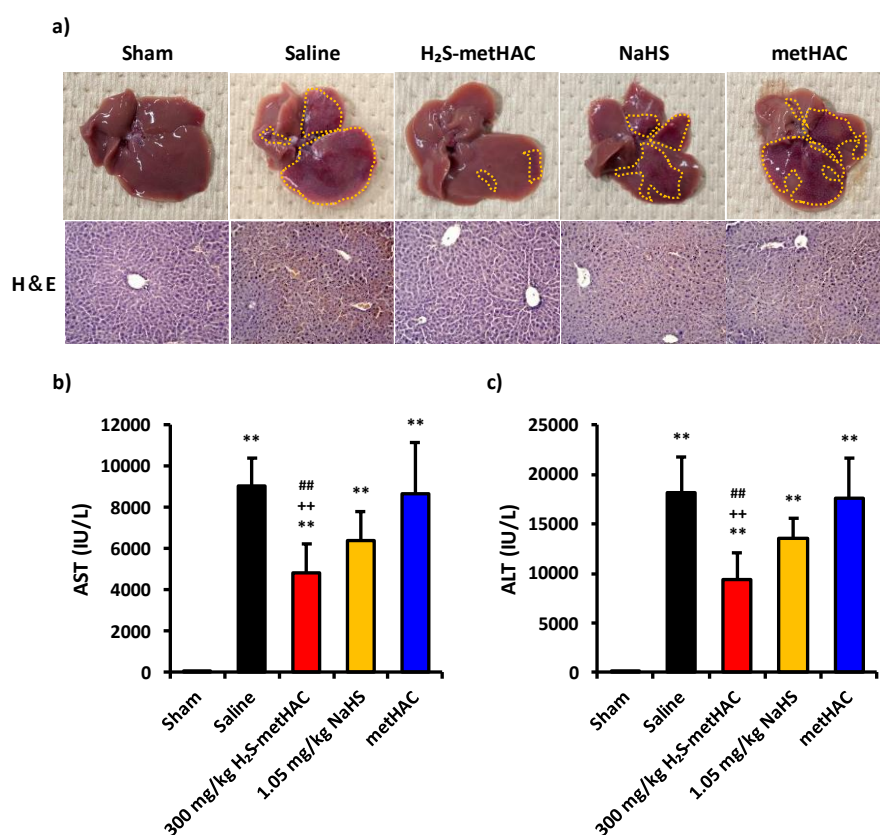


Fig. 64. Protective effects of H₂S–methHAC in a mouse model of hepatic IRI.

Histological image of liver tissues after IRI treatment. a) Top: Gross photographs of liver. The dotted lines indicate the boundary of damaged sites. Bottom: HE-stained liver tissues. Plasma levels of b) aspartate aminotransferase (AST) and c) alanine aminotransferase (ALT). (n = 6/group, mean + S.D.)

***p* < 0.01 vs. sham, ++*p* < 0.01 vs. Saline, ##*p* < 0.01 vs. methHAC.

◆ 肝虚血再灌流障害モデルマウスにおける酸化ストレス評価

肝虚血再灌流障害では、ROS の過剰産生を要因の一つとして細胞、組織への障害が進行する。硫化水素は、生体内抗酸化物質である還元型 GSH 量を増加させ、抗酸化能を高めることが報告されている⁸⁰。そこで、肝組織中 GSH 量を評価した結果、肝虚血再灌流障害モデルマウスでは GSH 量が大幅に減少しているのに対し、H₂S-metHAC 投与群ではその減少が抑制されており、NaHS 投与群よりも優れた効果であった (Fig. 65a)。また、GSH は酸化され、酸化型グルタチオン (GSSG) に変化するため、GSH 及び GSSG の比 (GSH/GSSG) を評価したところ、GSH 量と同様の傾向を示した (Fig. 65b)。また、肝虚血再灌流障害モデルマウスにおいて実際に抗酸化能を発揮していることを評価するため、肝組織中の脂質過酸化を評価した。その結果、Sham 群と比較して肝虚血再灌流処理により MDA 量が大きく増大したのに対し、H₂S-metHAC の投与は MDA 量の増大が抑制され、酸化障害を軽減していた (Fig. 65c)。これらのことから、NaHS と比較して H₂S-metHAC は効率的に肝臓への硫化水素送達を達成したことで、抗酸化能を高めて酸化傷害を抑制したと考えられた。

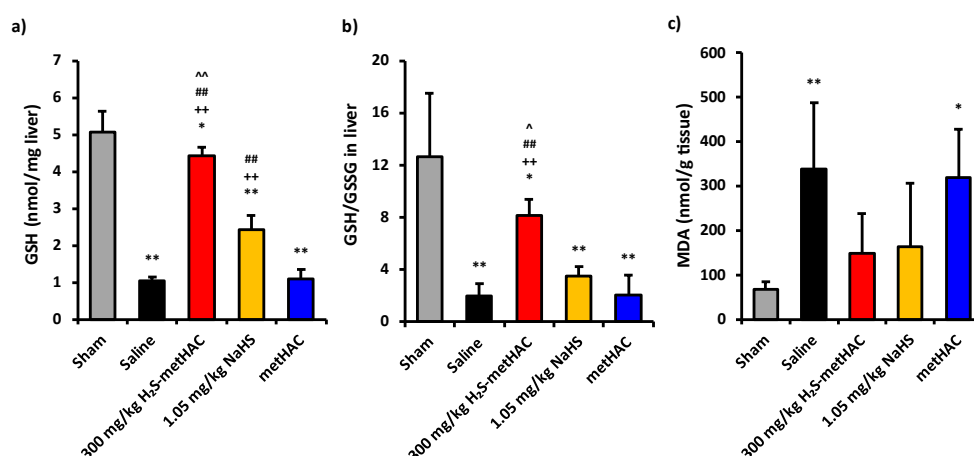


Fig. 65. Oxidative stress levels in a mouse model of hepatic IRI.

Mice received IRI treatment according to the protocol in Fig. 62. After the liver was harvested, **a)** reduced glutathione (GSH), **b)** GSH-to-oxidized glutathione (GSSG) ratio (GSH/GSSG) and **c)** malondialdehyde (MDA) levels in liver were measured. (n = 6/group, mean + S.D.) *p < 0.05, **p < 0.01 vs. sham, ++p < 0.01 vs. Saline, ^p < 0.05, ^^p < 0.01 vs. NaHS, ###p < 0.01 vs. methHAC.

◆ 肝虚血再灌流障害モデルマウスにおける炎症性サイトカイン量の評価

肝虚血再灌流では、ROS により細胞が障害され、炎症性サイトカインが放出されることで炎症反応が増大する。そこで、肝虚血再灌流処理後の血漿中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、IFN- γ を評価した結果、Sham 群では検出限界以下または微量での検出となったのに対し、Saline 群では全ての炎症性サイトカイン濃度が大幅に増大していた。一方で、H₂S-metHAC 投与群により炎症性サイトカイン濃度は有意に減少しており、NaHS 投与群よりも顕著であった (Fig. 66)。

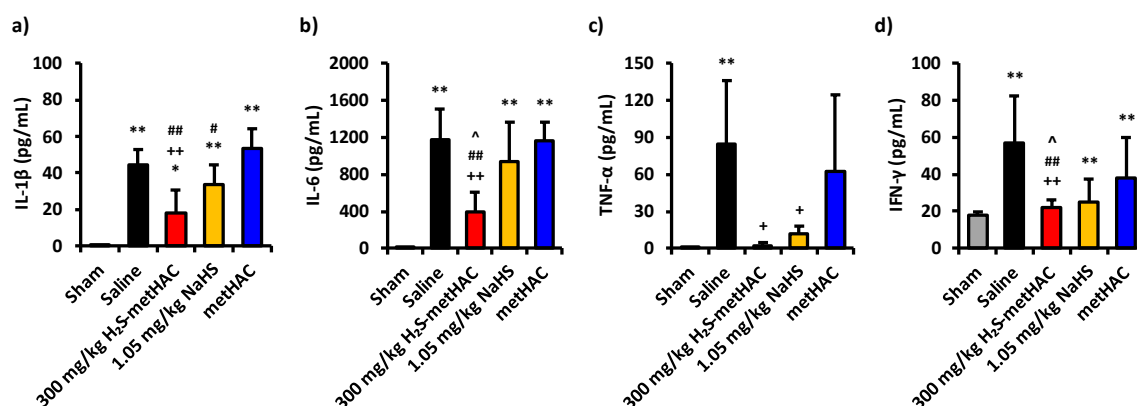


Fig. 66. Inflammatory cytokine levels in a mouse model of hepatic IRI.

Mice received IRI treatment according to the protocol in Fig. 62. Plasma levels of **a)** interleukin-1 β (IL-1 β), **b)** interleukin-6 (IL-6), **c)** tumor necrosis factor- α (TNF- α), and **d)** interferon- γ (IFN- γ) were measured. (n = 5–6/group, mean + S.D.) * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. sham, + p < 0.05, ++ p < 0.01 vs. Saline, ^ p < 0.05 vs. NaHS, # p < 0.05, ## p < 0.01 vs. metHAC.

◆ 肝虚血再灌流障害モデルマウスにおけるケモカイン量の評価

障害部位での炎症反応は、炎症性サイトカインに加え、放出されるケモカインにより好中球やマクロファージなどの免疫細胞が遊走されることで増大する。そこで、血漿中ケモカイン量を評価した結果、肝虚血再灌流障害で大幅に増大するケモカインは H₂S-metHAC 投与により抑制されており、その効果は NaHS よりも強力であった (Fig. 67)。

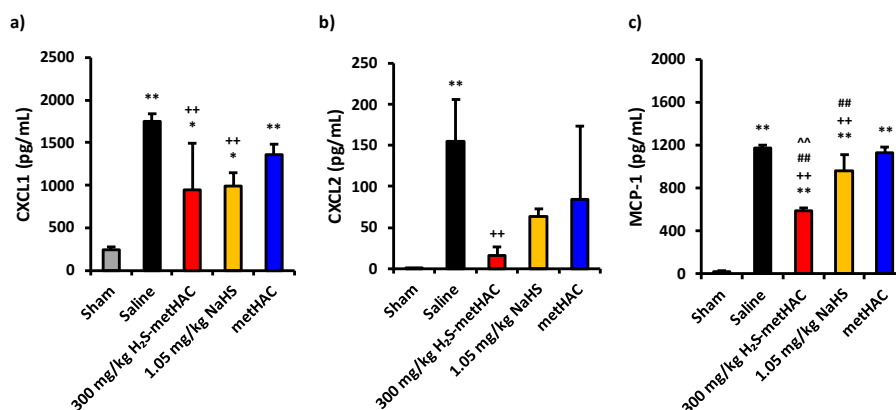


Fig. 67. Inflammatory chemokine levels in a mouse model of hepatic IRI.

Mice received IRI treatment according to the protocol in Fig. 62. Plasma levels of **a)** chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1), **b)** chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2), **c)** monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) were measured. (n = 4-6/group, mean + S.D.) **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. sham, ++*p* < 0.01 vs. Saline, ^*p* < 0.01 vs. NaHS, ###*p* < 0.01 vs. methHAC.

◆ 肝虚血再灌流障害モデルマウスにおけるミエロペルオキシダーゼの評価

次に、ケモカインにより遊走される免疫細胞のうちの一つである好中球のマーカーであるミエロペルオキシダーゼ (MPO) 量を評価した。その結果、肝 IRI 処理によって上昇した MPO は H₂S-metHAC 投与により半減し、NaHS 以上の効果を示した (Fig. 68)。

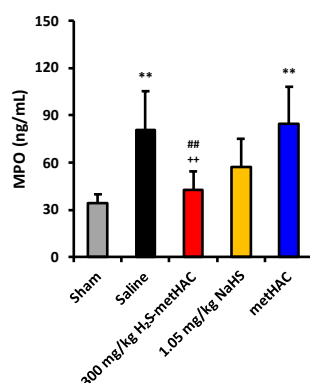


Fig. 68. MPO levels in a mouse model of hepatic IRI.

Mice received IRI treatment according to the protocol in Fig. 62. Plasma levels of **a)** myeloperoxidase (MPO) levels were measured. (n = 6/group, mean + S.D.) ***p* < 0.01 vs. sham, ++*p* < 0.01 vs. Saline, ###*p* < 0.01 vs. methHAC.

2-5. H₂S-metHAC の安全性評価

◆ H₂S-metHAC 放出硫化水素による生体への影響評価

H₂S-metHAC の利用において、H₂S-metHAC から放出される硫化水素に起因した中毒症状の誘発が、最も懸念される事項である。そこで、健常マウスに 300 mg metHb/kg H₂S-metHAC (1.05 mg NaHS/kg と等価) 投与後の CcO 活性及び血液ガスパラメータの観点から硫化水素中毒症状を評価した。その結果、すべての臓器において中毒機構の中心となる CcO 活性の低下は確認されなかった (Fig. 69)。また、硫化水素中毒下では酸素利用が阻害され、代替エネルギー産生によって代謝性アシドーシスが進行するため、血中アシドーシス関連パラメータを評価したところ、乳酸の蓄積や重炭酸の減少などのアシドーシスが疑われるパラメータ変化は確認されなかった (Fig. 70)。さらに、血液が保持する酸素量の指標となる血液ガスパラメータにおいてもコントロールと同等水準であったことから (Fig. 71)、H₂S-metHAC によって放出される硫化水素 による中毒症状は誘導されていないことが示された。

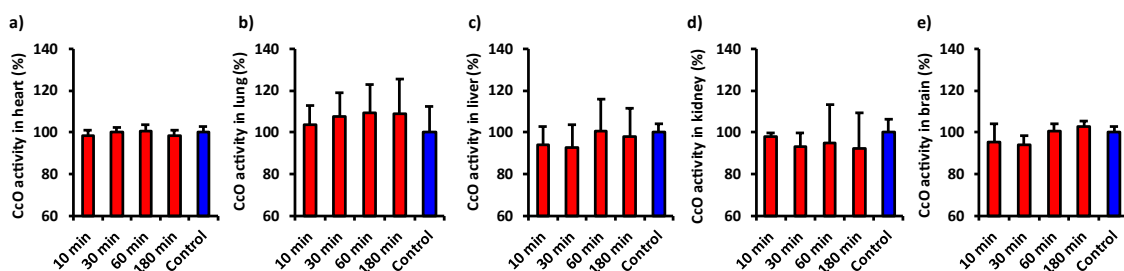


Fig. 69. CcO activity after administration of H₂S-metHAC in healthy mice.

300 mg metHb/kg H₂S-metHAC was administered to healthy mice, and organs were collected at 10-, 30-, 60-, and 180-min. CcO activity in **a)** heart, **b)** lung, **c)** liver, and **d)** kidney and **e)** brain were measured. (n = 3, mean + S.D.)

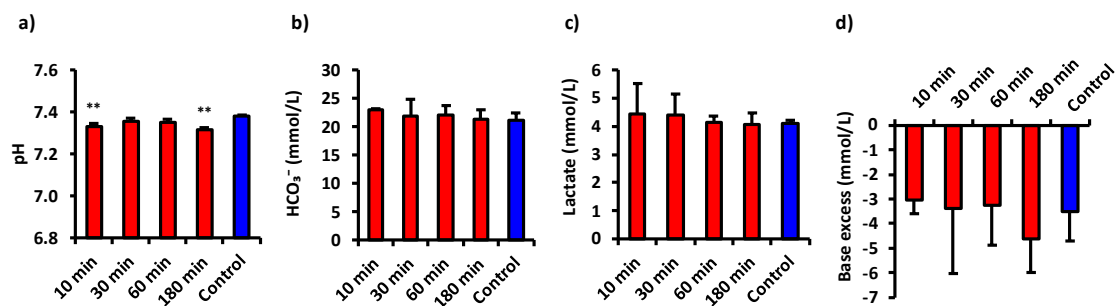


Fig. 70. Metabolic acidosis parameters in blood after administration of H₂S-metHAC in healthy mice.

300 mg metHb/kg H₂S-metHAC was administered to healthy mice, and venous blood was collected at 10-, 30-, 60-, and 180-min. Metabolic acidosis parameters of **a)** pH, **b)** bicarbonate (HCO₃⁻), **c)** lactate, and **d)** base excess were measured. (n = 3, mean + S.D.) ***p* < 0.01 vs. control.

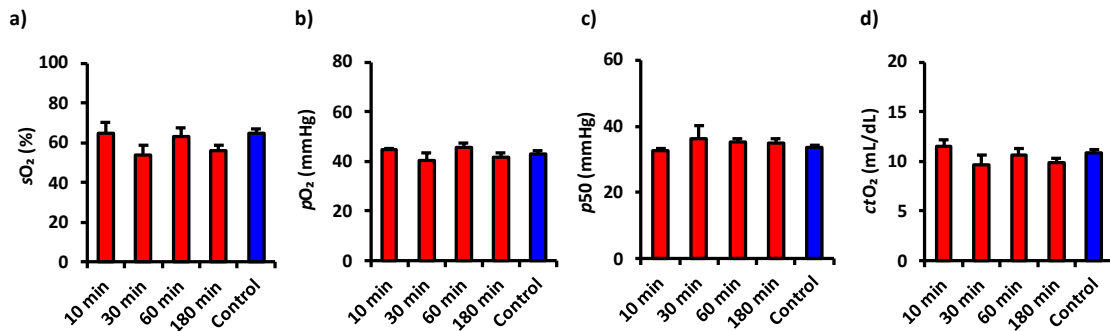


Fig. 71. Blood oxygenation parameters after administration of H₂S–metHAC in healthy mice.

300 mg metHb/kg H₂S–metHAC was administered to healthy mice, and venous blood was collected at 10-, 30-, 60-, and 180-min. Oxygen related parameters of **a)** oxygen saturation (sO_2), **b)** partial pressure of oxygen (pO_2), **c)** oxygen affinity ($p50$), and **d)** total oxygen concentration in blood (ctO_2) were measured. (n = 3, mean + S.D.)

◆ H₂S–metHAC の生体適合性評価

第二章の結果から metHAC の十分な安全性を確認している。一方で、metHAC に硫化水素を付加することで、硫化水素中毒の誘発以外にも生体が H₂S–metHAC に拒絶を示す可能性も拭いきれない。そこで、健常マウスに 300 mg metHb/kg (1.05 mg NaHS/kg と等価) の H₂S–metHAC を投与し、14 日後まで体重変化を追跡した結果、Saline 投与群と同等に経日の体重増加が確認された (Fig. 72)。また、H₂S–metHAC 投与後の主要臓器における病理組織検査を HE 染色により評価したところ、H₂S–metHAC 投与による形態変化は確認されなかった (Fig. 73)。

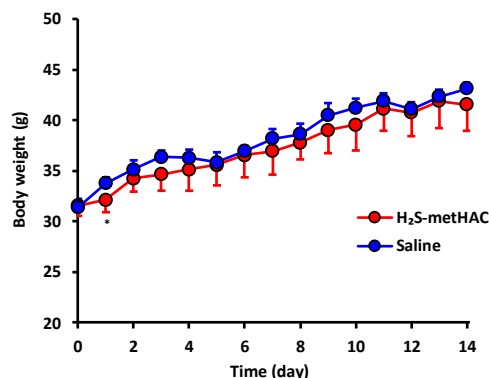


Fig. 72. Change in body weight after administration of H₂S–metHAC and saline.

300 mg metHb/kg of H₂S–metHAC was administered to healthy mice (n = 20). Four mice each were sacrificed, and biological samples were collected on day 1, 3, 7, and 14. Mice in the control group received saline and were sacrificed on day 14 (n = 4). Body weight of all mice was measured every day. (n = 4–20, mean ± S.D.) * $p < 0.05$ vs. Control.

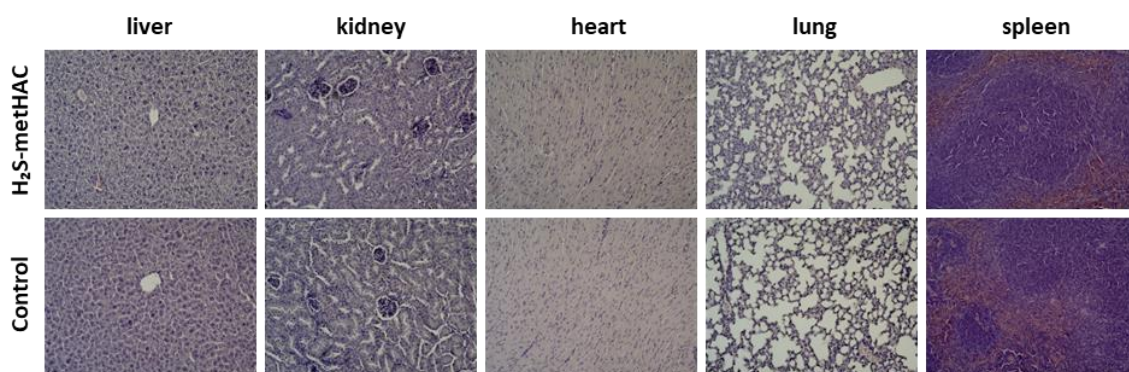


Fig. 73. Micrographs showing the organs at 1 day after H₂S–metHAC administration in healthy mice.

300 mg H₂S–metHb/kg of metHAC was administered to healthy mice. At 1 day after administration, organs (liver, kidneys, heart, lungs, and spleen) were collected. Saline was injected to the control group. Morphological changes were evaluated by H&E stain. (×200 magnification)

◆ H₂S–metHAC 投与による代謝関連臓器への影響評価

H₂S–metHAC 投与後の肝臓及び腎臓への傷害性を生化学パラメータから評価した。その結果、肝機能の指標となる AST 及び ALT の有意な変化は確認されなかった (Fig. 74a, b)。また、腎機能の指標である BUN 及び CRE についても異常な上昇は確認されなかった (Fig. 74c, d)。これらのことから、H₂S–metHAC は metHAC の投与同様に肝臓及び腎臓の機能に影響を及ぼさないと考えられた。

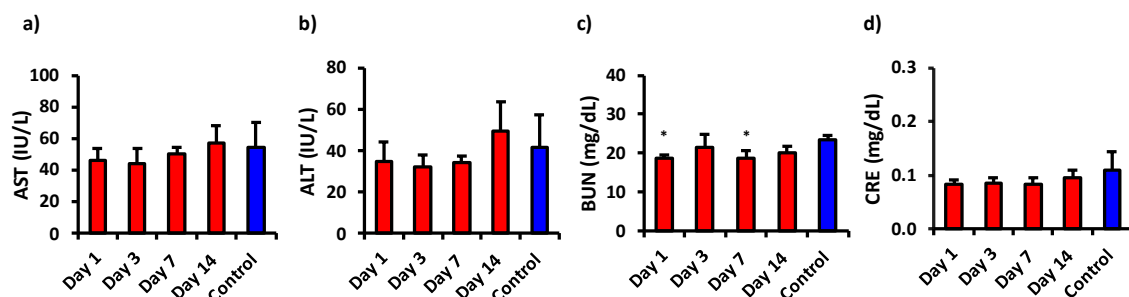


Fig. 74. Biochemical parameters in plasma reflecting liver injury and renal function.

300 mg metHb/kg of H₂S–metHAC was administered to healthy mice. Blood samples were collected on day 1, 3, 7, and 14. Mice in the control group received saline and were sacrificed on day 14. Plasma levels of **a)** aspartate aminotransferase (AST), **b)** alanine aminotransferase (ALT), **c)** blood urea nitrogen (BUN), and **d)** creatinine (CRE) were measured. (n = 4, mean + S.D.) **p* < 0.05 vs. Control.

◆ H₂S-metHAC 投与後の構成要素の評価 (アルブミン)

H₂S-metHAC 投与による血漿中におけるタンパク質存在比への影響や長期残存を評価するため、血漿中のタンパク質を評価した。その結果、H₂S-metHAC 投与後のパラメータの変動は確認されず (Fig. 75)、血漿中への長期残存は起こらないとともにタンパク質存在比にも影響を及ぼさないと推測された。

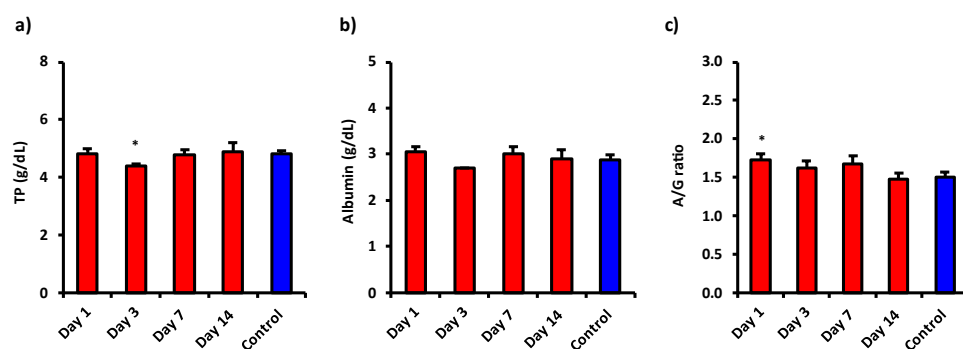


Fig. 75. Protein-related parameters in plasma after the administration of metHAC to healthy mice.

300 mg metHb/kg of H₂S-metHAC was administered to healthy mice. After administration, blood was collected at the point of 1, 3, 7, and 14 days. Saline was injected to the control group. Biochemical parameters of **a)** total protein (TP), **b)** albumin, **c)** albumin/globulin ratio (A/G ratio) in plasma were measured. (n=4, mean + S.D.) * $p < 0.05$ vs. Control.

◆ H₂S-metHAC 投与後の構成要素の評価 (メトヘモグロビン)

metHAC の代謝・排泄に起因した毒性を評価するため、metHb の代謝関連パラメータを評価した。まず、metHb から放出されるヘムの代謝物であるビリルビンについて、metHAC 投与後 1 日目以降において異常な変化は確認されなかった (Fig. 76a-c)。また、鉄代謝関連パラメータについてもコントロールと同等の水準で推移した (Fig. 76d-f)。これらの結果から、metHb 由来のヘム及び鉄の代謝系に異常はないと考えられた。

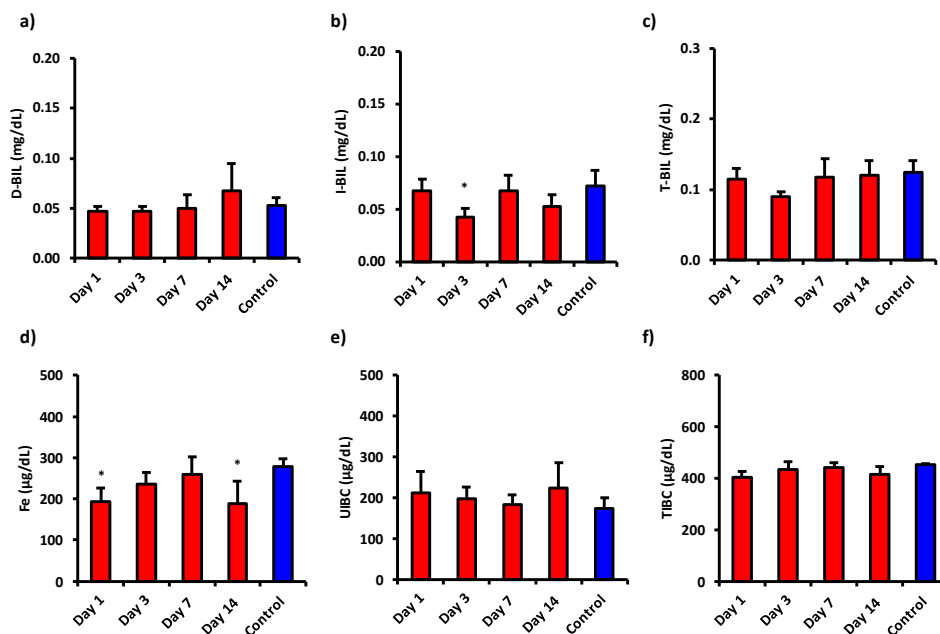


Fig. 76. Evaluation of serum parameters representing the metabolites of metHb and iron after the administration of metHAC to healthy mice.

H₂S-metHAC 300 mg metHb/kg was administered to healthy mice. After administration, blood was collected at the point of 1, 3, 7, and 14 days. Saline was injected to the control group. Biochemical parameters of a) direct bilirubin (D-BIL), b) indirect bilirubin (I-BIL), c) total bilirubin (T-BIL), d) serum iron (Fe), e) unsaturated iron binding capacity (UIBC), and f) total iron binding capacity (TIBC) in plasma were measured. (n=4, mean + S.D.) **p* < 0.05 vs. Control.

◆ H₂S-metHAC 投与後の血液学的検査

H₂S-metHAC 投与後の生体における安全性を血液学的観点からも評価した。その結果、一過性に血球数は変動したものの、投与 14 日後までに回復し (Fig. 77)、H₂S-metHAC 投与による血球成分への影響は限定的であると考えられた。

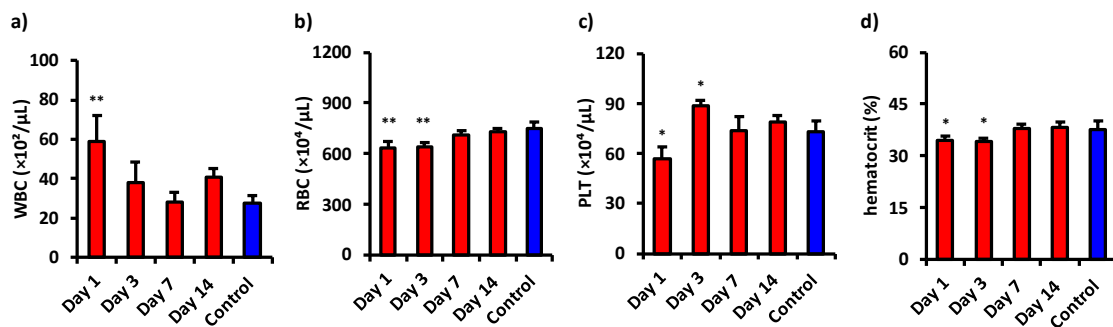


Fig. 77. Hematological parameters of a) white blood cells (WBC), b) red blood cells (RBC), c) platelet (PLT), and d) hematocrit after administration of methHAC.

H₂S-metHAC 300 mg metHb/kg was administered to healthy mice. After administration, venous blood was collected at the point of 1, 3, 7 and 14 days. Saline was injected to the control group. (n=4, mean + S.D.) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Control.

第3節 考察

硫化水素は強力な毒性から治療薬への応用には目が向けられていなかったものの、生体内に存在して生体恒常性の維持に寄与していることが報告されて以来^{63,64}、一酸化窒素や一酸化炭素に次ぐ第三の生理活性ガスとして注目されるようになった。特に高濃度での曝露は中毒を誘導するのに対し、低濃度での利用は酸化ストレスからの細胞保護効果を発揮する濃度依存性が明らかになったことにより、治療薬への応用が加速して様々な疾患に対しての有効性が続々と明らかとなった⁶⁸⁻⁷⁰。しかしながら、その強力な毒性を回避しながら有効性の確保を両立することがボトルネックとなっている。現在の硫化水素の投与方法として、硫化水素の吸入または低分子硫化水素ドナーの投与が多くの研究で採用されているものの、肺の傷害や頻回投与を要することが臨床使用上の課題となっている。metHbは硫化水素と可逆的な結合により硫化水素を放出する性質を持ち、硫化水素送達体としてのポテンシャルを有すると考えられる。本検討ではmetHACに硫化水素を付加したH₂S-metHACを新たに作製し、硫化水素送達体としての利用を検討した。metHACは低pHで硫化水素との結合が抑制されること、肝臓に高く分布すること、硫化水素が抗酸化作用及び抗炎症作用を有することから総合して、H₂S-metHACのターゲット疾患として病態下で組織低pH化を引き起こす肝虚血再灌流障害を選択し、metHACの硫化水素送達体としての有用性を評価した。

H₂S-metHACはmetHACにNaHSを混合することで硫化水素を付加して作製した。構造特性はmetHACと同等であり、硫化水素付加による製剤特性への影響はないと考えられた。第二章において、metHACは低pH化が進むにしたがって硫化水素との結合が抑制されていた(Table 2)。可逆的な結合であることを踏まえると、このことは低pH環境に進むにしたがってmetHACと結合した硫化水素の解離が進むと捉えることもでき、実際に低pH環境では硫化水素の解離が促進されていた(Fig. 60)。肝虚血再灌流障害モデルマウスの肝組織pHは最大でpH6.5程度まで低下している報告からも⁸¹、metHbの特性を活用した理想的な放出特性であることが示唆される。

既存の硫化水素ドナーは速放性であることから高曝露になりやすく、硫化水素中毒の誘発が懸念される⁷⁹。このことから、持続的な硫化水素供給には頻回投与が必要となり、臨床使用における負担が大きい。また、高用量の硫化水素が要求される場合においても増量は難しい。本検討においてH₂S-metHACはNaHSなどと比較して徐放的な挙動を示しており(Fig. 60)、頻回投与の負担は軽減できる可能性が高いことに加え、NaHS単回投与では致死量となる硫化水素を一度に生体内に供給することも可能であった(Table 18)。実際に、H₂S-metHAC投与後の中毒症状の指標となるCcO活性の低下や代謝性アシドーシスの誘導は一切確認されなかったことも(Fig. 69-71)、H₂S-metHACの硫化水素供与体としての臨床使用上の優位性を支持すると考えられる。

肝虚血再灌流障害は複合的な要因が関係するものの、ROSの過剰産生を起点として肝障害を及ぼすとされる。虚血による低酸素状態では、ATP異化の進行により生じたヒポキサ

ンチンがキサンチンオキシダーゼを介してキサンチンに変換される際にスーパーオキシドが産生される⁸²。また、低酸素環境により性質の変化したミトコンドリアへの再灌流による急激な酸素の供給により、電子の漏出に伴って ROS が産生されることも報告されている⁸²。硫化水素は肝虚血再灌流障害に対して障害抑制効果が数多く報告されており^{11,74,80,83-86}、細胞内の主要な抗酸化物質である GSH の原料となるシスチンのトランスポーター (シスチン/グルタミン酸トランスポーター) 及び GSH 合成酵素である γ -グルタミルシステイン合成酵素を活性化し、GSH 合成を促進することが報告されている⁸⁷。また、Keap1-Nrf2 経路を活性化することも分かっている⁸⁸。Keap1 が有するシステインの SH 基がスルフヒドリル化されることで、Keap1 と複合体を形成していた Nrf2 が解離し、核内への移行を促進すると考えられている⁸⁹。Nrf2 は抗酸化反応のマスターレギュレーターとして機能しており、GSH 合成酵素やヘムオキシゲナーゼ、チオレドキシシンなどの抗酸化タンパク質の発現誘導を促すことで、硫化水素が生体内の総合的な抗酸化反応を高めるとされる⁸⁰。実際に、本検討において作製した H₂S-metHAC の投与は肝虚血再灌流障害モデルマウスにおける組織傷害範囲が小さく、血漿中トランスアミナーゼ値の増大を抑制していたことから肝障害を抑制していた (Fig. 64)。また、H₂S-metHAC 投与は GSH 量の低下及び MDA 量の増大を抑制しているとともに、同等量の硫化水素を含有する NaHS の投与と比較してもその効果は大きく (Fig. 65)、metHAC の肝臓への効率的なターゲッティング且つ低 pH 環境において硫化水素の放出が促進され、抗酸化作用を発揮したと考えられた。さらに、肝臓に存在する Kupffer 細胞は虚血による低酸素での ROS に応答して NF- κ B を活性化し、ROS や炎症性サイトカイン、ケモカインを放出して傷害部位での炎症反応の増大に関与するとされる⁹⁰⁻⁹²。炎症性サイトカイン及びケモカインは好中球やマクロファージなどの免疫細胞の遊走をさらに促進する。特に好中球は NADPH オキシダーゼにより ROS を過剰に産生するため、炎症部位での傷害をさらに促進すると考えられている⁹³。今回、代表的な炎症性サイトカインである IL-1 β や IL-6、TNF- α 、IFN- γ の産生が抑制する結果を得たことに加え (Fig. 66)、ケモカイン産生の抑制 (Fig. 67) 及び MPO 活性についても抑制されており (Fig. 68)、H₂S-metHAC から効率的に肝臓に放出された硫化水素が抗酸化作用を示し、組織酸化傷害を軽減したことで、さらなる炎症反応の亢進を抑制したと考えられた。

以上の結果から、H₂S-metHAC は肝虚血再灌流障害に対して放出される硫化水素が抗酸化作用及び抗炎症作用を発揮することで有効性を示した。既存の硫化水素利用の問題点を改善し、臨床使用を考慮した新たな硫化水素ドナーとして H₂S-metHAC の応用が期待される。

第4節 小括

第5章では H_2S -metHAC の硫化水素送達体としての有用性を評価した結果、以下の知見を得た。

- metHAC に NaHS を添加し、metHb に硫化水素を付加することで H_2S -metHAC を作製した。
- H_2S -metHAC は約 14 nm の粒子であり、metHAC と同等の製剤特性を有していた。
- H_2S -metHAC は硫化水素を放出し、低 pH 環境にて放出が促進された。
- H_2S -metHAC は徐放的に硫化水素を放出し、硫化水素中毒の発症を回避しながらも必要に応じて多量の硫化水素を生体内に投与可能であった。
- H_2S -metHAC は、抗酸化作用及び抗炎症作用によって肝虚血再灌流障害を抑制した。
- H_2S -metHAC は肝虚血再灌流処置後も肝臓における GSH 量を維持しており、肝臓への効率的な硫化水素送達を達成していると考えられた。
- H_2S -metHAC は硫化水素の高曝露により惹起される中毒症状誘発の兆候は確認されなかった。
- H_2S -metHAC は臓器障害を惹起せず、metHAC と同様に高い生体適合性 (安全性) を示した。

以上の知見から、 H_2S -metHAC は肝虚血再灌流障害に対する有効性を示し、硫化水素送達体としての可能性を示した。抗酸化作用及び抗炎症作用を発揮する硫化水素は、虚血再灌流障害のみならず、ROS や炎症を原因とする難治性疾患に対する有効性も報告されており、既存薬の存在しない幅広い疾患への新たな硫化水素ドナーとして H_2S -metHAC の応用が期待される。

第6章 総括

硫化水素は、火山ガスや温泉など天然に存在するとともに、マンホール内や排水溝でも発生しており、人々の生活に密接して存在する身近なガスである。この硫化水素は有毒ガスの一つとして認知され、高濃度の曝露によって細胞内窒息を引き起こし急性中毒を誘発した死亡事故も度々発生している。しかしながら、承認を受けた硫化水素中毒解毒剤は世界中を見渡しても存在しない。一方、近年の研究において、硫化水素が生体内で恒常的に産生され、低濃度で臓器保護など多彩な生理活性作用 (抗酸化作用・抗炎症作用など) を示すことが明らかとなっている。このことから、硫化水素を難治性疾患治療などの医療への応用を目指した研究が進められているが、未だ有望な送達システムの構築には至っておらず、新たなシステムの開発・探索が強く望まれている。

metHbは硫化水素と迅速に結合する一方で、その結合は可逆的であり、特に低pH環境では一部が解離する。この事実に着目し、metHbが高濃度の硫化水素曝露時に硫化水素と結合し捕捉する「硫化水素中毒解毒剤」として機能するとともに、metHbにあらかじめ硫化水素を付加した硫化水素結合型 metHb は「低 pH 応答型硫化水素送達体」としても期待できる有望なマテリアルになると考えた。しかしながら、metHb 単体は不十分な血中滞留性 (有効性) に加え、腎障害などの重篤な副作用 (安全性) を誘発する観点から製剤加工が必要である。そこで、metHb の問題点を改善した新たな製剤としてヘモグロビンをアルブミンで被覆したヘモグロビン-アルブミンクラスターを基盤とした metHAC を着想した。本研究では「硫化水素中毒解毒剤」及び「低pH応答型硫化水素送達体」として双方向な利用を可能とする metHAC の創製を行い、それぞれの物性評価に加えて細胞及び動物を用いて有用性評価を実施した。

以下に得られた知見を総括する。

1. metHAC の作製及び硫化水素中毒解毒剤としての有用性評価 (第2章)

metHAC はヘモグロビン-アルブミンクラスターに NaNO_2 を添加することで作製した。1 分子の metHb にリンカーを介して平均 3 分子のアルブミンが結合した約 14 nm の製剤であり、metHb の特徴である硫化水素捕捉性を示した。この硫化水素捕捉性により、metHAC は致死性硫化水素中毒モデルマウスの CcO 活性を回復しミトコンドリアを保護することで生存率を上昇させた。また、metHAC はアルブミンで被覆することで metHb の問題点である低い血中滞留性を改善し、血漿中半減期を 7.5 倍に延長した。さらに、高い生体適合性を有し、有効性及び安全性の高い硫化水素中毒解毒剤として使用できると考えられた。

2. 凍結乾燥処理による metHAC の硫化水素中毒解毒剤の製剤としての応用 (第3章)

凍結乾燥 metHAC は注射用水 (PBS) または生理食塩水で再溶解処理後においても製剤特性及び解毒能を維持していた。一方で、5%ブドウ糖溶液は再溶解の溶媒として推奨されなかった。metHAC を凍結乾燥粉末として 1 年間保存した場合においても、再溶解後 24 時間

までは製剤特性を維持していた。また、致死硫化水素中毒モデルマウスの CcO 活性の回復を伴い生存率を上昇させていたことから、保存後においても解毒能は低下しないと考えられた。さらに臓器障害を惹起せず、高い生体適合性 (安全性) を維持していた。これらの結果から、metHAC は凍結乾燥粉末化により利便性の高い長期保存可能な硫化水素中毒解毒剤として利用できると考えられた。

3. 適応拡大に向けた metHAC のシアン解毒剤としての有効性評価 (第 4 章)

metHAC は硫化水素と同様にシアン捕捉性を示した。また、シアン曝露細胞に対して metHAC はミトコンドリア活性及び酸素消費を維持することで保護効果を示した。既存のシアン中毒解毒療法 (NaNO_2 とチオ硫酸ナトリウムが併用) を模して、metHAC とチオ硫酸ナトリウムの併用投与による解毒作用を評価した結果、致死シアン中毒モデルマウスの CcO 活性を回復させ、生存率を上昇させた。このことから、硫化水素中毒解毒剤として作製した metHAC はシアン中毒の解毒剤としても適応拡大が可能であることが示唆された。

4. 硫化水素結合型 metHAC の硫化水素送達体としての応用 (第 5 章)

H_2S -metHAC は metHAC に NaHS を添加し、metHAC の中心に位置する metHb に硫化水素を付加することで作製した。 H_2S -metHAC は metHAC と同等の製剤特性を有しており、また、低 pH 環境に応答して徐放的に硫化水素を放出した。そこで、病態下で局所的な組織低 pH 化が誘導され、硫化水素の有効性が確認されている疾患として肝虚血再灌流障害を選択し、 H_2S -metHAC の硫化水素ドナーとしての有効性を検討した。その結果、硫化水素の有する抗酸化作用及び抗炎症作用によって肝虚血再灌流障害モデルマウスの肝障害の発症と進展を抑制していた。また、その効果は既存の硫化水素ドナーより優れており、効率的な硫化水素の送達によるものと考えられた。一方で、中毒症状誘発が懸念されたが、それらの兆候は確認されず、metHAC と同様に高い生体適合性 (安全性) を有していた。よって、 H_2S -metHAC は新たな硫化水素ドナーとして応用が期待される。

以上の結果から、本研究で作製した metHAC は硫化水素中毒及びシアン中毒の解毒剤として利用でき、凍結乾燥粉末化することで急性の病態に対応して臨床上的課題を克服した実用性の高い解毒剤として使用できると考えられた。また、metHAC に硫化水素を付加した H_2S -metHAC は metHb 固有の特性を活かした新たな硫化水素ドナーとして活用でき、承認薬の存在しない肝虚血再灌流障害の治療薬として利用できることも考えられた。これらのことから、metHAC は汎用性が高く、幅広く応用可能な製剤として利用できることが示唆された。今後、metHAC は急性中毒解毒剤のみならず虚血再灌流障害を含めた硫化水素の有効性が示されている疾患治療薬として臨床に実装されることが期待される。

実験の部

実験試料

アルブミンは献血アルブミン (ベネシス; 一般社団法人 日本血液製剤機構) を使用した。Hb は東京芝浦臓器株式会社より購入した新鮮なウシ血液から精製したものを使用した。ヘモグロビン-アルブミンクラスターは既報により作製され、PBS (pH 7.4) に溶解したものを中央大学理工学部小松晃之教授から供与された³¹。その他、試薬や溶媒類は市販特級品を使用し、溶媒としての水は超純水 (RFU424TA; アドバンテック東洋株式会社) を使用した。

統計解析

実験データは、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。有意差検定には2群間では Student's t-test を用いた。3群間以上のデータについては、分散分析 (ANOVA) を用いて Tukey-Kramer 法または Dunnett 法により多重比較検定を行い、それぞれ危険値 0.05 以下のときに統計学的有意であると評価した。

第2章に関する実験

metHAC の作製

metHAC はヘモグロビン-アルブミンクラスターに対し、過剰量の NaNO_2 を混合し、攪拌しながら 18 時間冷蔵で反応させた。紫外可視分光光度計 (UV-1900i; 株式会社 島津製作所) により、UV-Vis. スペクトル変化から metHb 含量が 95% 以上のものを試料として使用した。未反応の NaNO_2 をゲル濾過クロマトグラフィ (Sephadex G-25 Superfine; GE Healthcare, UK) により除去し、限外濾過 (Amicon Ultra-15; 10 kDa MWCO, Merck Millipore, St. Louis, MO, USA) により 5 g metHb/dL に濃縮した。

物理化学特性の評価

metHAC、アルブミン、metHb の物理化学特性は PBS (pH 7.4) でタンパク量として 10 μM に希釈し、孔径 0.2 μm のシリンジフィルター (DISMIC®; アドバンテック東洋株式会社) を通したのち、DLS にて粒度分布、粒子径及び PDI を測定した (Mobius; Wyatt Technology Corp., Santa Barbara, CA, USA)。 ζ -電位の測定には ELSZ2KOP (大塚電子株式会社) を使用した。

IEF

IEF は pH 3–10 IEF Protein Gels (Invitrogen™ Novex™; Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) を使用して 5 μL のサンプル (metHAC は 2 μM , アルブミン及び metHb は 3.5 μM) を泳動した。泳動後、Native-PAGE と同様の操作を行った。

SEC の測定

SEC はサンプルを PBS でタンパク量として 10 μ M に希釈し、以下の条件にて測定した。

カラム：YMC-Pack Diol-300 (8.0 mm $\times$ 300 mm, 5 μ m, 株式会社ワイエムシィ)

注入量：10 μ L

移動相：50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)

流速：0.5 mL/min

測定波長：280 nm (株式会社 島津製作所)

ポンプ：LC-20AD (株式会社 島津製作所)

検出器：SPD-20A (株式会社 島津製作所)

カラムオーブン：25°C、CTO-20A (株式会社 島津製作所)

CD スペクトルの測定

CD スペクトルはサンプルを PBS でタンパク量として 0.2 μ M に希釈し、以下の条件にて測定した。また、得られたスペクトルはスムージング補正処理を実施した。

使用機器：J-1100 (日本分光株式会社)

CD スケール：200 mdeg/1.0 dOD

レスポンス (D.I.T.)：8sec

データ取込間隔：0.5 nm

走査速度：10 nm/min

積算回数：1

Native-PAGE

Native-PAGE は 6% のポリアクリルアミドゲル (SuperSepTM Ace; 富士フイルム和光純薬株式会社) を使用して 10 μ L のサンプル (methHAC 及びアルブミンは 5 μ M, methHb は 8 μ M) を泳動した。ゲルは Coomassie Blue R-250 (CBB Stain One Super; ナカライテスク株式会社) を使用して染色し、Amersham Imager 600 (Cytiva, Marlborough, MA, USA) にて撮影した。

UV-Vis. スペクトルの測定

UV-Vis. スペクトルは、光路長 10 mm の石英セルに 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で methHb 量として 2 μ M に希釈したサンプル 3500 μ L を充填し、pH 12 に調製した精製水で溶解した 2.8 mM の NaHS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 溶液を 2 μ L ずつ混合後の変化を SH-9500Lab (コロナ電気株式会社) を用いて測定した。methHb+3HSA は、methHb に対しモル比で 3 倍量のアルブミンを混合して評価した。

結合定数の算出

平衡定数 (K) は以下の式 (1) として表される。

$$K = \frac{[L-R]}{[R][L]} \dots (1)$$

式中の R は metHb または metHAC、L は硫化水素、L-metHb は硫化水素結合 metHb または硫化水素結合 metHAC を指す。式 (1) は、スペクトル変化を利用した式 (2) に変換可能であり、以下に基づき算出した。

$$\frac{A - A_0}{A_0 - A} = [L] - \frac{A - A_0}{A_\infty - A_0} [M]_0 \dots (2)$$

A_0 は NaHS を添加する直前の 425 nm における吸光度 (100% metHb または 100% metHAC)、 A は NaHS 各添加後の 425 nm における吸光度、 A_∞ は過剰量の NaHS 添加後の 425 nm における吸光度 (100% L-metHb または 100% L-metHAC) を表す。

結合飽和度は以下の式 (3) に基づいて算出した²¹。

$$Y = \frac{[L-R]}{[R] + [L-R]} = \frac{B - B_\infty}{B_0 - B_\infty} \dots (3)$$

B_0 は NaHS を添加する直前の 405 nm における吸光度 (100% metHb または 100% metHAC)、 B は NaHS 各添加後の 405 nm における吸光度、 B_∞ は過剰量の NaHS 添加後の 405 nm における吸光度 (100% L-metHb または 100% L-metHAC) を表す。ヒル係数 (n) は、結合飽和度の式を Y としたときの $\text{Log} (Y/(1-Y))$ を縦軸、NaHS 添加量の対数を横軸に取ったときの傾きとして算出した。

metRBC の作製

ddY マウス (三協ラボサービス社) よりヘパリン処理した注射筒にて血液を回収し、遠心分離 (3,000 rpm, 20 min) により血漿及び白血球膜を取り除いた。得られた RBC は等量の生理食塩水に再懸濁させ、100 μL の 1M NaNO_2 溶液を 5 mL の RBC 懸濁液に添加後、10 分間緩やかに攪拌し metRBC を作製した⁹⁴。その後、生理食塩水で洗浄および遠心処理を繰り返して洗浄 metRBC を作製し、DMEM に溶解し使用した。なお、metRBC の作製は、慶應義塾大学動物実験委員会により承認を受けて実施した (承認番号: A2021-025)。

細胞培養

ラット心臓横紋筋由来である H9c2 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) より購入し、非働化した 10%FBS 及び抗生物質 (ペニシリン 100 unit/mL, ストレプトマイシン 100 $\mu\text{g/mL}$) 含有 DMEM (以下、DMEM (+)) を用いて細胞用ディッシュに播種し、37°C, 5% CO_2 濃度下で静置培養した。セミコンフルエントに達した細胞はトリプシン及び遠心 (1,000 rpm, 5 min) 処理後、DMEM (+) で再懸濁し、継代した。

細胞生存率評価

H9c2 細胞は 96-well culture plate に各ウェル 100 μL で 2×10^4 cells/well になるように播種し、一晚培養して接着させた。培地を除去後、各濃度に調製した各解毒剤を 50 μL ずつ各 well に添加した。直後に DMEM (-) に溶解し各濃度に調製した NaHS 溶液 (0, 10, 20, 40, 80, 160 mM) を 50 μL 添加し (最終 NaCN 濃度 0, 5, 10, 20, 40, 80 mM)、37°C、100% 湿潤空気下で 1 時間培養した。培養後、NaHS 及び解毒剤の混合液を除去し、DMEM (-) でウェル内を洗浄した。接着細胞数はメチレンブルーアッセイにより評価した⁹⁵。具体的には、1%メチレンブルー含有 0.01M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) を加え、30 分間常温でインキュベートした。上清を除去し、0.01M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) で 4 回洗浄後、0.1M 塩酸-エタノール抽出液 (0.1 M 塩酸 : エタノール = 1 : 1) を 100 μL /well 加え、10 分間振とうし、Infinite® M200 (TECAN) で 660 nm の吸光度を測定した。

酸素消費量の測定

H9c2 細胞は 96-well culture plate に 5×10^4 cells/well になるように播種し、一晚培養して接着させた。培地を除去後、DMEM (-) に溶解し 5 mM に調製した NaHS 溶液を 75 μL ずつ各ウェルに添加した。直後に各解毒剤 (5 g metHb/dL) を 75 μL 添加して各ウェルが 150 μL になるように設定した。酸素消費量は Extracellular Oxygen Consumption Assay (ab197243; Abcam, Cambridge, UK) を使用して測定した。具体的には、Extracellular Oxygen Consumption Reagent を 10 μL /well で添加後、すみやかに High sensitivity mineral oil を添加して、37°C、delay time 30 μs 、integration time 100 μs 、60 分間の条件でマイクロプレートリーダーを用いて Excitation / Emission = 380 nm / 650 nm による時間分解蛍光測定を行った。

ミトコンドリア膜電位評価

H9c2 細胞は 96-well culture plate に 2×10^4 cells/well になるように播種し、一晚培養して接着させた。培地を除去後、各解毒剤 (5 g metHb/dL) を 50 μL 添加し、直後に DMEM (-) で溶解した 5 mM または 10 mM に調製した NaHS 溶液を 50 μL ずつ各ウェルに添加した。37°C、100% 湿潤空気下で 1 時間培養後、NaHS 及び解毒剤の混合液を除去し、DMEM (-) でウェル内を洗浄したのち、JC-1 MitoMP Detection Kit (株式会社 同人化学研究所) を使用してミトコンドリア膜電位を測定した。具体的には、2 $\mu\text{mol/L}$ に調製した JC-1 Dye を 100 μL /well で添加し、37°C、5% CO_2 で 30 分間インキュベートした。上清を除去し、DMEM (-) でウェル内を 2 回洗浄した。Imaging Buffer を 100 μL /well 添加し、マイクロプレートリーダーでそれぞれ Red (Excitation / Emission = 535 nm / 590 nm) 及び Green (Excitation / Emission = 485 nm / 530 nm) を蛍光測定し、強度比 (Red / Green) を算出した。

実験動物

8 週齢の ddY 系雌性マウスを三協ラボサービス株式会社より購入し、12 時間の明暗サイクル環境下で 1 週間予備飼育した。動物実験は慶應義塾大学動物実験委員会により承認を受けて実施した (承認番号: A2021-025)。

致死硫化水素中毒モデルマウスによる生存率評価

マウスに生理食塩水に溶解した 30 mg/kg NaHS 溶液 (10 mL/kg) を無麻酔下で皮下投与し、3 分後にイソフルラン吸入麻酔下において metHAC (125, 250, 500 mg metHb/kg)、NaNO₂ (8.5 mg/kg)、metHb (500 mg metHb/kg)、ヘモグロビン-アルブミンクラスター (500 mg Hb/kg)、または生理食塩水を尾静脈より投与し、その後の生存率を評価した。

致死硫化水素中毒モデルマウスのサンプル回収

マウスに 30 mg/kg NaHS 溶液を無麻酔下で皮下投与し、3 分後にイソフルラン吸入麻酔下において metHAC (500 mg metHb/kg)、NaNO₂ (8.5 mg/kg) または生理食塩水を尾静脈より投与した。投与 5 分後、下大静脈より血液を採取し、血液ガスパラメータを血液ガス分析装置 (RAPID point® 500; シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティックス社) により速やかに測定した。また、各臓器 (心臓、肺、肝臓、腎臓、脳) についても採取し、CcO 活性の評価に使用した。サンプル回収の直前に死亡した個体 (NaNO₂ 投与群; n = 2, 生理食塩水投与群; n = 3) については、速やかにサンプル採取を行い、各評価に用いた。

CcO 活性の評価

Spinazzi らの報告を参考に実施した⁹⁶。マウスより臓器 (心臓、肺、肝臓、腎臓、脳) を摘出後、生理食塩水で血液を洗浄して氷冷したスクロースホモジナイズバッファー (20 mM Tris, 40 mM KCl, 2 mM EGTA, 250 mM Sucrose, 0.05 % n-dodecyl- β -D maltoside, pH 7.4) を各臓器重量に対して加え (心: 60 倍, 肺: 20 倍, 肝: 40 倍, 腎: 40 倍, 脳: 20 倍)、ホモジナイズ (POLYTRON® System PT 2500E; KINEMATICA AG) した。ホモジネートを遠心分離 (600 g, 10 min, 4°C) した。また、12.5 mg の酸化シトクロム c を 20 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.0) 1 mL に溶解し、使用直前に亜ジチオン酸ナトリウムを加えて還元シトクロム c 溶液を得た。その後、石英キュベットに 435 μ L の精製水、100 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.0) を 500 μ L、1 mM 還元シトクロム c 溶液を 60 μ L 添加し、5 μ L の上清サンプルを加えて速やかに混和後、550 nm における 2 分間の吸光度の減少により CcO 活性を評価した。

Cy5 標識サンプルの作製

Cy5 標識 metHAC (Cy5-metHAC) は、metHAC に Cy5-NHS を混合することで作製した。2 mg の Cy5-NHS を 100%エタノール 200 μ L に溶解し、精製水 800 μ L を加えて全量 1 mL とした。そこに、5 mL metHAC (5 g/dL) を混合し、4°Cで一晩攪拌した。反応処理後、未反応の Cy5-NHS を PD-10 脱塩カラム (Cytiva, Marlborough, MA, USA) により除去し、限外濾過 (Amicon Ultra-15, 10 kDa MWCO) により 5 g metHb/dL に濃縮した。同様の方法で Cy5 標識 metHb (Cy5-metHb)、Cy5 標識アルブミン (Cy5-HSA) も作製した。

体内動態評価

マウスに非絶食、イソフルラン麻酔下において、各 Cy5 標識サンプル (Cy5-metHAC: 500 mg metHb/kg, Cy5-metHb: 500 mg/kg, Cy5-HSA: 1547 mg/kg) をそれぞれ尾静脈より投与した。投与後 5 min, 10 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 1 day, 2 days, 3 days, 7 days, 14 days に下大静脈よりヘパリン処理した注射筒で血液を採取し、遠心分離 (3,000 rpm, 15 min) 後、血漿を得た。また、血液回収後に各組織 (心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、脳) も回収した。組織重量に対し 10 倍量 PBS を添加してホモジナイズし、組織サンプルを得た。血漿及び組織サンプル 200 μ L に対し、3 倍量の 10%ガスチーム® (日医工株式会社) を混合し、37°Cで 24 時間攪拌 (200 rpm) した。反応後、血漿に対し 7 倍量の 100%エタノールを添加後、よく攪拌した。さらに、7 倍量のクロロホルムを添加して再度攪拌したのち、遠心分離 (4,000 rpm, 5 min, 4°C) して 2 層に分離した。下層を 1.2 mL を採取し、遠心エバポレーター (CVE-3110 型、NVP-1000 型; 東京理科機器株式会社) を用いて蒸発乾固した。乾固して得られた結晶は 500 μ L エタノールに溶解し、マイクロプレートリーダー (Cytation™5, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) にて蛍光強度 (Excitation / Emission = 642 nm / 662 nm) を測定した。

体内動態解析による薬物動態パラメータ及び K_p 値の算出

体内動態解析は Phoenix® WinNonlin® (Version 8.2, CERTARA, Princeton, NJ, USA) を使用して薬物動態パラメータを算出した。また、各臓器の K_p 値は、 $K_p = C_t / C_p$ (C_t : 組織中 Cy5 濃度、 C_p : 血漿中 Cy5 濃度) により算出した。

metHAC の安全性評価におけるサンプル回収

健常マウスに metHAC 500 mg metHb/kg を投与し、経日的に体重を測定した。投与後 1、3、7、14 日でそれぞれマウスより採血し、全血における血球数及び血液ガスパラメータを測定後、遠心処理 (3,000 rpm, 15min) により、血漿サンプルを得た。また、各組織 (心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓) も摘出し、生理食塩水で残存血液を洗浄したサンプルを得た。コントロールマウスには、生理食塩水を投与し、14 日後にサンプル回収を行った。なお、回収したサンプルは測定まで -80°Cで保存した。

血漿中生化学パラメータの測定

血漿中生化学パラメータは、オリエンタル酵母工業株式会社 長浜工場 長浜ライフサイエンスラボラトリーに委託し、日立 7180 型自動分析装置を用いて測定した。

血球数の測定

血球数は全自動血球計数器セルタック α (MEK-6558; 日本光電工業株式会社) を用いて測定した。

病理組織学的検査及び HE 染色

各臓器のサンプル回収後、10%中性緩衝ホルマリン液に浸し、パラフィンに包埋した。その後、厚さ 4 μm の切片となるようにスライスし、パラフィン包埋切片を作製した。切片の脱パラフィンを行った後、流水水洗し、Mayer's Hematoxylin 液 (1.5 倍法, 武藤化学株式会社) で 90 秒間染色した。温水で水洗したのち、1%エオシン液 (武藤化学株式会社) で染色した。水洗後、脱水、透徹、封入したのち、顕微鏡 (BZ-X700; 株式会社キーエンス) にて 200 倍率で組織像を観察した。

血漿中サイトカインの測定

血漿中サイトカインの測定は、Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) を使用した。取扱説明書に従って IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 、TNF- α を測定した。

酸化ストレスの測定

TBARS Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) を使用して MDA 量を測定することで血漿中脂質過酸化を評価した。臓器中の MDA 量は、組織重量に対して 10 倍量の RIPA buffer を添加してホモジナイズし、遠心処理 (1,600 g、10 min、4°C) によって得た上清を上記の血漿サンプルと同様の方法で測定した。

第 3 章に関する実験

物理化学特性の評価

各溶媒で再溶解したサンプルは、各溶媒でタンパク量として 10 μM に希釈し、それ以降は第 2 章の「物理化学特性の評価」の方法に準じて実施した。

SEC の測定

第 2 章の「SEC の測定」の方法に準じて実施した。

CD スペクトルの測定

各溶媒で再溶解したサンプルは、各溶媒でタンパク量として 0.2 μ M に希釈し、それ以降は第 2 章の「CD スペクトルの測定の方法」に準じて実施した。

Native-PAGE

第 2 章の「Native-PAGE」の方法に準じて実施した。

IEF

第 2 章の「IEF」の方法に準じて実施した。

遊離ヘムの定量

サンプルは各溶媒で 0.2 g metHb/dL に希釈し、限界濾過 (Nanosep[®] 10 K Centrifugal Device; Pall Corp., Port Washington, NY, USA) により濾過液を得た。濾過液中の遊離ヘムは Heme Assay kit (Sigma, Burlington, MA, USA) を用いて定量した。

UV-Vis. スペクトルの測定

第 2 章の「UV-Vis. スペクトルの測定」に準じて実施し、紫外可視分光光度計 (UV-1900i; 株式会社 島津製作所) を用いて測定した。

結合定数の算出

第 2 章の「結合定数の算出」に準じて実施した。

metHAC の凍結乾燥処理

PBS に溶解した metHAC (5 g metHb/dL) は、(i) コントロール、(ii) PBS F.D.、(iii) Saline F.D.、(iv) Glucose F.D. の 4 群を設置するため 3 ロットずつ、12 個のガラスバイアルに分けた。(i) 及び (ii) のサンプルは、metHAC が PBS に溶解したまま使用した。(iii) 及び (iv) のサンプルは、限外濾過 (Amicon Ultra-15, 10 kDa MWCO) により溶媒を PBS から超純水に置換した。その後、(ii)～(iv) のすべてのサンプルは超純水で 2 g metHb/dL に希釈し、液体窒素で凍結後、FDU-1200 (東京理科機器株式会社) を使用して -45°C の減圧環境下で一晩凍結乾燥処理した。サンプルは、4°C に設定した乾燥機内にて遮光下で 1 週間保存した。(i) のコントロールサンプルは、2 g metHb/dL への希釈及び凍結乾燥処理をせずに凍結乾燥処理したサンプル同様に保存した。

凍結乾燥処理 metHAC の最適な再溶解液の選択

凍結乾燥処理した(ii) PBS F.D.は注射用水 (大塚蒸留水; 大塚製薬工場)、(iii) Saline F.D.は生理食塩水 (大塚生食注; 大塚製薬工場)、(iv) Glucose F.D.は 5%ブドウ糖液 (大塚糖液 5%; 大塚製薬工場) でそれぞれ 5 g metHb/dL になるように再溶解した。

metHAC の長期保存

PBS に溶解した metHAC (5 g metHb/dL) は、6 個のガラスバイアルに分け、それぞれ 3 個ずつ「凍結乾燥状態での保存用サンプル」と「溶液状態での保存用サンプル」とした。

「凍結乾燥状態での保存用サンプル」は PBS を溶媒として、超純水で 2 g metHb/dL に希釈し、「metHAC の凍結乾燥処理」の方法に従って凍結乾燥処理した。「溶液状態での保存用サンプル」は溶媒置換及び希釈処理は行わず、PBS を溶媒として 5 g metHb/dL のまま保存した。全てのサンプルは 4°C に設定した乾燥機内にて遮光下で 1 年間保存した。保存後、「凍結乾燥状態での保存用サンプル」は注射用水 (大塚蒸留水) で 5 g metHb/dL になるように再溶解した。

凍結乾燥処理 metHAC の再溶解後の安定性評価

溶解後 0, 6, 12, 24 時間における物理化学特性、SEC、CD スペクトル、Native-PAGE、遊離ヘム量、UV-Vis. スペクトルの結果から評価した。溶解後の metHAC は各タイムポイントでの測定の直前まで 4°C の遮光下で保存した。

実験動物

第 2 章の記載に準じて実験動物を取り扱い、慶應義塾大学動物実験委員会により承認を受けて実施した (承認番号: A2021-025)。

致死硫化水素中毒モデルマウスによる生存率評価

第 2 章の「致死硫化水素中毒モデルマウスによる生存率評価」に準じて実施した。溶媒や保存形態にかかわらず、metHAC は全て 500 mg metHb/kg で投与した。ネガティブコントロールには生理食塩水を投与した。

CcO 活性の評価

第 2 章の「CcO 活性の評価」に準じて実施した。

長期保存 metHAC の安全性評価におけるサンプル回収

第 2 章の「安全性評価におけるサンプル回収」に準じて実施した。健常マウスに生理食塩水または形態によらず 1 年間保存した metHAC 500 mg metHb/kg を投与し、7 日後にサンプルを回収した。

血漿中生化学パラメータの測定

血漿中生化学パラメータは、富士ドライケム 7000i (富士フイルム株式会社) を使用して測定した。

病理組織学的検査及び HE 染色

第 2 章の「病理組織学的検査及び HE 染色」に準じて実施した。

血球数の測定

第 2 章の「血球数の測定」に準じて実施した。

第 4 章に関する実験

UV-Vis. スペクトルの測定

第 2 章の「UV-Vis. スペクトルの測定」に準じて実施した。pH 12 に調製した精製水で溶解した 1.4 mM の NaCN (ナカライテスク株式会社) 溶液を 2 μ L ずつサンプルに添加し、混合後のスペクトル変化を SH-9500Lab (コロナ電気株式会社) を用いて測定した。

結合定数の算出

第 2 章の「結合定数の算出」に準じて実施した。硫化水素濃度を適用する部分をシアン濃度に変更し、421 nm における吸光度変化を利用することでシアンにおける結合定数を算出した。

metRBC の作製

第 2 章の「metRBC の作製」に準じて実施した。なお、metRBC の作製は、慶應義塾大学動物実験委員会により承認を受けて実施した (承認番号: A2021-026)。

細胞培養

第 2 章の「細胞培養」に準じて実施した。

細胞生存率評価

各解毒剤 (1.25, 2.5, 5 g metHb/dL) 及び NaCN 溶液 (0, 5, 10, 20, 40, 80 mM) をそれぞれ 50 μ L ずつ各ウェルに添加し、第 2 章の「細胞生存率評価」の方法に準じて実施した。

酸素消費量の測定

各解毒剤 (5 g metHb/dL) 及び NaCN 溶液 (5 mM) をそれぞれ 75 μ L ずつ各ウェルに添加し、第 2 章の「酸素消費量の測定」の方法に準じて実施した。

細胞ミトコンドリア代謝活性評価

H9c2 細胞は 96-well culture plate に 2×10^4 cells/well になるように播種し、一晚培養して接着させた。培地を除去後、各濃度に調製した各解毒剤を 50 μ L ずつ各 well に添加した。直後に DMDM (-) に溶解し各濃度に調製した NaCN 溶液 (0, 5, 10, 20, 40, 80 mM) を 50 μ L 添加し、37°C、100% 湿潤空気下で 1 時間培養した。培養後、NaCN 及び解毒剤の混合液を除去し、DMDM (-) でウェル内を 3 回洗浄した。各ウェルに 100 μ L の DMEM (-) を添加後、CCK-8 (株式会社 同仁化学研究所) を 10 μ L/well 添加し、2 時間培養してマイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。

ミトコンドリア膜電位評価

各解毒剤 (5 g metHb/dL) 及び NaCN 溶液 (5, 10 mM) をそれぞれ 50 μ L ずつ各ウェルに添加し、第 2 章の「ミトコンドリア膜電位評価」の方法に準じて実施した。

実験動物

第 2 章の方法に準じて実験動物を取り扱い、慶應義塾大学動物実験委員会により承認を受けて実施した (承認番号: A2021-026)。

致死シアン中毒モデルマウスによる生存率評価

マウスに生理食塩水に溶解した 12 mg/kg NaCN 溶液 (10 mL/kg) を無麻酔下で 経口投与し、5 分後に意識喪失したマウスに無麻酔下において metHAC (500 mg metHb/kg)、metHAC (500 mg metHb/kg) + チオ硫酸ナトリウム (61 mg/kg)、NaNO₂ (8.5 mg/kg) + チオ硫酸ナトリウム (61 mg/kg)、metHb (500 mg metHb/kg)、または生理食塩水を尾静脈より投与し、その後の生存率を評価した。

致死シアン中毒モデルマウスのサンプル回収

マウスに生理食塩水に溶解した 12 mg/kg NaCN 溶液 (10 mL/kg) を無麻酔下で 経口投与し、5 分後に意識喪失したマウスに無麻酔下において metHAC (500 mg metHb/kg)、metHAC (500 mg metHb/kg) + チオ硫酸ナトリウム (61 mg/kg)、NaNO₂ (8.5 mg/kg) + チオ硫酸ナトリウム (61 mg/kg)、または生理食塩水を尾静脈より投与した。投与 10 分後、下大静脈より血液を採取し、速やかに血液ガスパラメータを測定した。残存血液はシアンイオン濃度、チオシアンイオン濃度の測定に利用した。また、各臓器 (心臓、肺、肝臓、腎臓、脳) についても採取し、CcO 活性の評価に使用した。

CcO 活性の評価

第 2 章の「CcO 活性の評価」に準じて実施した。

シアン濃度の測定

RBC 中シアン濃度は、Brenner らの報告を参考に微量拡散分析法により測定した⁹⁷。20 mL サンプル管瓶の中央内部にふた部を切断した 2 mL マイクロチューブを置き、チューブ内部に 0.1 N NaOH を 1 mL 添加した。また、サンプル管瓶内部 (チューブ外部) には 10% トリクロロ酢酸 1 mL と 200 mM L-アスコルビン酸 1 mL をそれぞれ加えた⁹⁸。マウスより血液を回収後、血漿と血球成分に分離したサンプルをそれぞれトリクロロ酢酸と L-アスコルビン酸の混合液に加えて速やかに密閉し、37°C 水浴中において 160 rpm で 3 時間攪拌した。シアンの溶解した NaOH 300 μ L を分取し、氷冷下で 60 μ L クロラミン・リン酸液 (0.25% クロラミン T 液 : 1M リン酸ナトリウムの 1:3 混合液) を加えて 2 分間放置した。その後、900 μ L ピリジン・ピラゾロン液 (0.27 g シアノリンブルーをピリジン 20 mL に溶解後、精製水 100 mL と混合) を加え、40 分間室温で静置後に 620 nm における吸光度を測定した。

血漿中チオシアンイオン濃度の測定

血漿中チオシアンイオン濃度は、チオシアンイオンをシアンに酸化することで測定した⁹⁹。10% トリクロロ酢酸 1 mL と 0.01 M 過マンガン酸カリウム 1 mL で充填されたサンプル管瓶内部 (チューブ外部) に血漿サンプルを加え、前述の「シアン濃度の測定」に準じて実施した。

第 5 章に関する実験

H₂S-metHAC の作製

第 2 章「metHAC の作製」に準じて作製した metHAC に過剰量の PBS に溶解した NaHS 溶液を混合することで硫化水素を付加して作製した。metHAC 含有 metHb が 95% 以上 H₂S-metHb に変換されていることを紫外可視分光光度計 (UV-1900i) による UV-Vis. スペクトル変化から確認した。metHAC と反応しなかった余剰 NaHS は、限外濾過 (Amicon Ultra-15; 50 kDa MWCO) により除去した。

物理化学特性の評価

第 2 章の「物理化学特性の評価」の方法に準じて実施した。

SEC の測定

第 2 章の「SEC の測定」の方法に準じて実施した。

CD スペクトルの測定

第 2 章の「CD スペクトルの測定」の方法に準じて実施した。

Native-PAGE

第2章の「Native-PAGE」の方法に準じて実施した。

硫化水素放出試験

H₂S-metHAC の硫化水素放出試験は、UV-Vis.スペクトル (UV-1900i) を用いて評価した。H₂S-metHAC (5 g metHb/dL) を9倍量の 100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4, 6.8, 6.2) または FBS (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) に混合し、37°Cでインキュベートした。規定時間インキュベート後、光路長 10 mm の石英セルに各 pH に調整した 100 mM リン酸緩衝液で metHb 量として 2 μM に希釈し (FBS は pH 7.4 の 100 mM リン酸緩衝液で希釈)、423.5 nm における吸光度変化を測定した。

実験動物

6 週齢の ICR 系雄性マウスを三協ラボサービス株式会社より購入し、12 時間の明暗サイクル環境下で 1 週間予備飼育した。動物実験は慶應義塾大学動物実験委員会により承認を受けて実施した (承認番号: A2022-347)。

H₂S-metHAC 最大耐用量の決定

健常マウスに NaHS 溶液 (0.35, 0.69, 1.05, 1.39, 1.74, 2.09 mg NaHS/kg) 及び各濃度の NaHS と同等量の硫化水素を含有する H₂S-metHAC (100, 200, 300, 400, 500, 600 mg metHb/kg) を尾静脈より投与し、生存率を評価した。コントロールのマウスには、生理食塩水及び metHAC (600 mg metHb/kg) をそれぞれ投与した。24 時間後において生存したマウスの血液を回収し、血漿中生化パラメータを富士ドライケム 7000i にて測定した。

肝虚血再灌流障害モデルマウスの作製

肝虚血再灌流障害モデルマウスは、Abe らの報告を参考に作製した¹⁰⁰。一晩絶食したマウスをイソフルラン麻酔下にて、腹部を正中切開し、非侵襲的クリップ (C-17-35-1 35 mm 溝無; 株式会社 夏目製作所) で門脈をクランプした。この時、虚血部位 (正中葉、左外側葉) が鮮やかな赤色から赤褐色に変化し、阻血されていることを確認した。また、虚血処理中は開腹部を湿らせたコットンで覆い、ヒーターマット (KN-475-3-40; 株式会社 夏目製作所) 上にて仰臥位にした。45 分間の虚血後、クランプの解除及び開腹部位の縫合を行い、生理食塩水 (300 μL) を腹腔内投与した。血液の再灌流は 6 時間継続させた。

肝虚血再灌流障害モデルマウスに対する H₂S–metHAC の有効性評価

マウスにイソフルラン麻酔下にて H₂S–metHAC (100, 300, 600 mg metHb/kg)、NaHS (1.05 mg/kg)、metHAC (300 mg metHb/kg) または生理食塩水を尾静脈より投与し、30 分後に「肝虚血再灌流障害モデルマウスの作製」に従って肝虚血処置を開始した。再灌流終了 6 時間後、血液及び肝臓を回収した。Sham マウスは、門脈のクランプを除き、すべて肝 IRI モデルマウスと同様の処置を受けた。

血漿中生化学パラメータの測定

第 3 章の「血漿中生化学パラメータの測定」に準じて実施した。

病理組織学的検査及び HE 染色

第 2 章の「病理組織学的検査及び HE 染色」に準じて実施した。

肝臓中 GSH 及び GSH/GSSG の測定

GSSG/GSH Quantification Kit (株式会社 同仁化学研究所) を使用して測定した。

血漿中サイトカインの測定

第 2 章の「血漿中サイトカインの測定」に準じて実施した。

肝臓中 MDA 量の測定

組織重量に対して 10 倍量の RIPA buffer を添加してホモジナイズし、遠心処理 (1,600 g、10 min、4°C) によって得た上清を TBARS Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) により測定した。

血漿中ケモカインの測定

Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Inc.) を使用して CXCL1、CXCL2、MCP-1 を測定した。

血漿中 MPO の測定

Mouse Myeloperoxidase ELISA Kit (ab275109; Abcam, Cambridge, UK) を使用して測定した。

H₂S–metHAC から放出される硫化水素の毒性評価

健常マウスに H₂S–metHAC 300 mg metHb/kg を投与し、10、30、60、180 分後にマウス下大静脈より採血し、第 2 章の方法に準じて血液ガスパラメータを測定した。また、各組織 (心臓、肺、肝臓、腎臓、脳) も回収し、第 2 章の方法に従って CcO 活性を評価した。

H₂S-metHAC の安全性評価におけるサンプル回収

健常マウスに H₂S-metHAC 300 mg metHb/kg を投与し、経日的に体重を測定した。投与後 1、3、7、14 日にマウスより採血し、全血における血球数を測定後、遠心処理 (3,000 rpm, 15min) により、血漿サンプルを得た。また、各組織 (心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓) も回収した。コントロールのマウスには、生理食塩水を投与し、14 日後に同様にサンプル回収を行った。

安全性評価における血漿中生化学パラメータの測定

血漿中生化学パラメータは、オリエンタル酵母工業株式会社 長浜工場 長浜ライフサイエンスラボラトリーに委託し、日立 7180 型自動分析装置を用いて測定した。

血球数の測定

第 2 章の「血球数の測定」に準じて実施した。

謝辞

本研究を行うに際し、終始ご懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました慶應義塾大学薬学部薬効解析学講座 松元 一明 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に際し、終始御指導と御助力を賜りました慶應義塾大学薬学部 薬効解析学講座 田口 和明 准教授ならびに榎木 裕紀 専任講師に深謝致します。

本論文の審査にあたり、有益な御助言と御指導を賜りました慶應義塾大学薬学部創薬分析化学講座 花岡 健二郎 教授ならびに同代謝生理化学講座 前川 大志 専任講師に厚く御礼申し上げます。

本研究の実施に際し、ヘモグロビン-アルブミンクラスターを御提供いただき、終始御便宜と御鞭撻を賜りました中央大学理工学部 小松 晃之 教授に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行に際し、有益な助言を賜りました中央大学理工学部 岡本 航 博士ならびに山田 大雅 博士に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、多大なる御協力をいただきました慶應義塾大学 薬学部 薬効解析学講座の諸氏に心から感謝いたします。

最後に、これまで私を支えてくれた家族、友人に心から感謝いたします。

令和 6 年 3 月
鈴木 悠斗

参考文献

- (1) Dorman, D. C.; Moulin, F. J. M.; McManus, B. E.; Mahle, K. C.; James, R. A.; Struve, M. F. Cytochrome Oxidase Inhibition Induced by Acute Hydrogen Sulfide Inhalation: Correlation with Tissue Sulfide Concentrations in the Rat Brain, Liver, Lung, and Nasal Epithelium. *Toxicol. Sci.* **2002**, 65 (1), 18–25. <https://doi.org/10.1093/toxsci/65.1.18>.
- (2) Hendry-Hofer, T. B.; Ng, P. C.; McGrath, A. M.; Mukai, D.; Brenner, M.; Mahon, S.; Maddry, J. K.; Boss, G. R.; Bebart, V. S. Intramuscular Aminotetrazole Cobinamide as a Treatment for Inhaled Hydrogen Sulfide Poisoning in a Large Swine Model. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2020**, 1479 (1), 159–167. <https://doi.org/10.1111/nyas.14339>.
- (3) Ng, P. C.; Hendry-Hofer, T. B.; Witeof, A. E.; Brenner, M.; Mahon, S. B.; Boss, G. R.; Haouzi, P.; Bebart, V. S. Hydrogen Sulfide Toxicity: Mechanism of Action, Clinical Presentation, and Countermeasure Development. *J. Med. Toxicol.* **2019**, 15 (4), 287–294. <https://doi.org/10.1007/s13181-019-00710-5>.
- (4) Jiang, J.; Chan, A.; Ali, S.; Saha, A.; Haushalter, K. J.; Lam, W. L. M. R.; Glasheen, M.; Parker, J.; Brenner, M.; Mahon, S. B.; Patel, H. H.; Ambasudhan, R.; Lipton, S. A.; Pilz, R. B.; Boss, G. R. Hydrogen Sulfide-Mechanisms of Toxicity and Development of an Antidote. *Sci. Rep.* **2016**, 6 (1), 20831. <https://doi.org/10.1038/srep20831>.
- (5) Malone Rubright, S. L.; Pearce, L. L.; Peterson, J. Environmental Toxicology of Hydrogen Sulfide. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **2017**, 71, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.09.011>.
- (6) Bott, E.; Dodd, M. Suicide by Hydrogen Sulfide Inhalation. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* **2013**, 34 (1), 23–25. <https://doi.org/10.1097/PAF.0b013e31827ab5ad>.
- (7) Kimura, H. Signalling by Hydrogen Sulfide and Polysulfides via Protein S-Sulfuration. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, 177 (4), 720–733. <https://doi.org/10.1111/bph.14579>.
- (8) Shibuya, N.; Koike, S.; Tanaka, M.; Ishigami-Yuasa, M.; Kimura, Y.; Ogasawara, Y.; Fukui, K.; Nagahara, N.; Kimura, H. A Novel Pathway for the Production of Hydrogen Sulfide from D-Cysteine in Mammalian Cells. *Nat. Commun.* **2013**, 4, 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms2371>.
- (9) Kimura, H. Hydrogen Sulfide (H₂ S) and Polysulfide (H₂ S_n) Signaling: The First 25 Years. *Biomolecules* **2021**, 11 (6), 896. <https://doi.org/10.3390/biom11060896>.
- (10) Ding, H.; Chang, J.; He, F.; Gai, S.; Yang, P. Hydrogen Sulfide: An Emerging Precision Strategy for Gas Therapy. *Adv. Healthc. Mater.* **2022**, 11 (4), 1–32. <https://doi.org/10.1002/adhm.202101984>.
- (11) Wu, D.; Wang, J.; Li, H.; Xue, M.; Ji, A.; Li, Y. Role of Hydrogen Sulfide in Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, 2015 (1), 1–16. <https://doi.org/10.1155/2015/186908>.
- (12) Qin, M.; Long, F.; Wu, W.; Yang, D.; Huang, M.; Xiao, C.; Chen, X.; Liu, X.; Zhu, Y. Z. Hydrogen Sulfide Protects against DSS-Induced Colitis by Inhibiting NLRP3 Inflammasome. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, 137 (April), 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.025>.

- (13) Wallace, J. L.; Wang, R. Hydrogen Sulfide-Based Therapeutics: Exploiting a Unique but Ubiquitous Gasotransmitter. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14* (5), 329–345. <https://doi.org/10.1038/nrd4433>.
- (14) Lee, Z. W.; Teo, X. Y.; Tay, E. Y. W.; Tan, C. H.; Hagen, T.; Moore, P. K.; Deng, L. W. Utilizing Hydrogen Sulfide as a Novel Anti-Cancer Agent by Targeting Cancer Glycolysis and PH Imbalance. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171* (18), 4322–4336. <https://doi.org/10.1111/bph.12773>.
- (15) Lee, Z. W.; Zhou, J.; Chen, C. S.; Zhao, Y.; Tan, C. H.; Li, L.; Moore, P. K.; Deng, L. W. The Slow-Releasing Hydrogen Sulfide Donor, GYY4137, Exhibits Novel Anti-Cancer Effects in Vitro and in Vivo. *PLoS One* **2011**, *6* (6), 5–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021077>.
- (16) Yang, C. T.; Chen, L.; Xu, S.; Day, J. J.; Li, X.; Xian, M. Recent Development of Hydrogen Sulfide Releasing/Stimulating Reagents and Their Potential Applications in Cancer and Glycometabolic Disorders. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8* (SEP). <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00664>.
- (17) Yamada, M.; Sakai, H. Hidden Antioxidative Functions of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Coexisting with Hemoglobin. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12* (7), 1820–1829. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00174>.
- (18) Jensen, B.; Fago, A. A Novel Possible Role for Met Hemoglobin as Carrier of Hydrogen Sulfide in the Blood. *Antioxidants Redox Signal.* **2020**, *32* (4), 258–265. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7877>.
- (19) Borron, S. W.; Bebart, V. S. Asphyxiants. *Emerg. Med. Clin. North Am.* **2015**, *33* (1), 89–115. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2014.09.014>.
- (20) Kiss, L.; Bocsik, A.; Walter, F. R.; Ross, J.; Brown, D.; Mendenhall, B. A.; Crews, S. R.; Lowry, J.; Coronado, V.; Thompson, D. E.; Sipos, P.; Szabó-Révész, P.; Deli, M. A.; Petrikovics, I. In Vitro and in Vivo Blood-Brain Barrier Penetration Studies with the Novel Cyanide Antidote Candidate Dimethyl Trisulfide in Mice. *Toxicol. Sci.* **2017**, *160* (2), 398–407. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx190>.
- (21) Jensen, B.; Fago, A. Reactions of Ferric Hemoglobin and Myoglobin with Hydrogen Sulfide under Physiological Conditions. *J. Inorg. Biochem.* **2018**, *182* (September 2017), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.02.007>.
- (22) Taguchi, K.; Maruyama, T.; Otagiri, M. Pharmacokinetic Properties of Hemoglobin Vesicles as a Substitute for Red Blood Cells. *Drug Metab. Rev.* **2011**, *43* (3), 362–373. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.558094>.
- (23) Xiong, Y.; Liu, Z. Z.; Georgieva, R.; Smuda, K.; Steffen, A.; Sendeski, M.; Voigt, A.; Patzak, A.; Bäuml, H. Nonvasoconstrictive Hemoglobin Particles as Oxygen Carriers. *ACS Nano* **2013**, *7* (9), 7454–7461. <https://doi.org/10.1021/nn402073n>.
- (24) Tomita, D.; Kimura, T.; Hosaka, H.; Daijima, Y.; Haruki, R.; Ludwig, K.; Böttcher, C.; Komatsu, T. Covalent Core-Shell Architecture of Hemoglobin and Human Serum Albumin as an Artificial

- O₂ Carrier. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (6), 1816–1825. <https://doi.org/10.1021/bm400204y>.
- (25) Haruki, R.; Kimura, T.; Iwasaki, H.; Yamada, K.; Kamiyama, I.; Kohno, M.; Taguchi, K.; Nagao, S.; Maruyama, T.; Otagiri, M.; Komatsu, T. Safety Evaluation of Hemoglobin-Albumin Cluster “HemoAct” as a Red Blood Cell Substitute. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 12778. <https://doi.org/10.1038/srep12778>.
 - (26) Hosaka, H.; Haruki, R.; Yamada, K.; Ttcher, C. B.; Komatsu, T. Hemoglobin-Albumin Cluster Incorporating a PT Nanoparticle: Artificial O₂ Carrier with Antioxidant Activities. *PLoS One* **2014**, *9* (10), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110541>.
 - (27) Kamijo, Y.; Takai, M.; Fujita, Y.; Hirose, Y.; Iwasaki, Y.; Ishihara, S. A Multicenter Retrospective Survey on a Suicide Trend Using Hydrogen Sulfide in Japan. *Clin. Toxicol.* **2013**, *51* (5), 425–428. <https://doi.org/10.3109/15563650.2013.799676>.
 - (28) Hoidal, C. R.; Hall, A. H.; Robinson, M. D.; Kulig, K.; Rumack, B. H. Hydrogen Sulfide Poisoning from Toxic Inhalations of Roofing Asphalt Fumes. *Ann. Emerg. Med.* **1986**, *15* (7), 826–830. [https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(86\)80383-3](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(86)80383-3).
 - (29) Klimmek, R.; Krettek, C.; Werner, H. W. Ferrihaemoglobin Formation by Amyl Nitrite and Sodium Nitrite in Different Species in Vivo and in Vitro. *Arch. Toxicol.* **1988**, *62* (2–3), 152–160. <https://doi.org/10.1007/BF00570133>.
 - (30) Umbreit, J. Methemoglobin—It’s Not Just Blue: A Concise Review. *Am. J. Hematol.* **2007**, *82* (2), 134–144. <https://doi.org/10.1002/ajh.20738>.
 - (31) Funaki, R.; Kashima, T.; Okamoto, W.; Sakata, S.; Morita, Y.; Sakata, M.; Komatsu, T. Hemoglobin-Albumin Clusters Prepared Using N-Succinimidyl 3-Maleimidopropionate as an Appropriate Cross-Linker. *ACS Omega* **2019**, *4* (2), 3228–3233. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03474>.
 - (32) Kimura, T.; Shinohara, R.; Böttcher, C.; Komatsu, T. Core-Shell Clusters of Human Haemoglobin A and Human Serum Albumin: Artificial O₂-Carriers Having Various O₂-Affinities. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3* (30), 6157–6164. <https://doi.org/10.1039/c5tb00540j>.
 - (33) Morita, Y.; Yamada, T.; Kureishi, M.; Kihira, K.; Komatsu, T. Quaternary Structure Analysis of a Hemoglobin Core in Hemoglobin-Albumin Cluster. *J. Phys. Chem. B* **2018**, *122* (50), 12031–12039. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b10077>.
 - (34) Morita, Y.; Saito, A.; Yamaguchi, J.; Komatsu, T. Haemoglobin(BK120C)-Albumin Trimer as an Artificial O₂carrier with Sufficient Haemoglobin Allosterity. *RSC Chem. Biol.* **2020**, *1* (3), 128–136. <https://doi.org/10.1039/d0cb00056f>.
 - (35) Truong, D. H.; Mihajlovic, A.; Gunness, P.; Hindmarsh, W.; O’Brien, P. J. Prevention of Hydrogen Sulfide (H₂S)-Induced Mouse Lethality and Cytotoxicity by Hydroxocobalamin (Vitamin B12a). *Toxicology* **2007**, *242* (1–3), 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.09.009>.
 - (36) Taguchi, K.; Urata, Y.; Anraku, M.; Maruyama, T.; Watanabe, H.; Sakai, H.; Horinouchi, H.;

- Kobayashi, K.; Tsuchida, E.; Kai, T.; Otagiri, M. Pharmacokinetic Study of Enclosed Hemoglobin and Outer Lipid Component after the Administration of Hemoglobin Vesicles as an Artificial Oxygen Carrier. *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37* (7), 1456–1463. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.027094>.
- (37) Komatsu, T.; Oguro, Y.; Nakagawa, A.; Tsuchida, E. Albumin Clusters: Structurally Defined Protein Tetramer and Oxygen Carrier Including Thirty-Two Iron(II) Porphyrins. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (6), 3397–3403. <https://doi.org/10.1021/bm050454u>.
- (38) Taguchi, K.; Urata, Y.; Anraku, M.; Watanabe, H.; Kawai, K.; Komatsu, T.; Tsuchida, E.; Maruyama, T.; Otagiri, M. Superior Plasma Retention of a Cross-Linked Human Serum Albumin Dimer in Nephrotic Rats as a New Type of Plasma Expander. *Drug Metab. Dispos.* **2010**, *38* (12), 2124–2129. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.031989>.
- (39) Boubeta, F. M.; Bieza, S. A.; Bringas, M.; Palermo, J. C.; Boechi, L.; Estrin, D. A.; Bari, S. E. Hemeproteins as Targets for Sulfide Species. *Antioxidants Redox Signal.* **2020**, *32* (4), 247–257. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7878>.
- (40) Chenuel, B.; Sonobe, T.; Haouzi, P. Effects of Infusion of Human Methemoglobin Solution Following Hydrogen Sulfide Poisoning. *Clin. Toxicol.* **2015**, *53* (2), 93–101. <https://doi.org/10.3109/15563650.2014.996570>.
- (41) Tsuchida, E.; Sou, K.; Nakagawa, A.; Sakai, H.; Komatsu, T.; Kobayashi, K. Artificial Oxygen Carriers, Hemoglobin Vesicles and Albumin-Hemes, Based on Bioconjugate Chemistry. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (8), 1419–1440. <https://doi.org/10.1021/bc800431d>.
- (42) Rother, R. P.; Bell, L.; Hillmen, P.; Gladwin, M. T. The Clinical Sequelae of Intravascular Hemolysis and Extracellular Plasma Hemoglobin: A Novel Mechanism of Human Disease. *Jama* **2005**, *293* (13), 1653–1662. <https://doi.org/10.1001/jama.293.13.1653>.
- (43) Strickley, R. G.; Lambert, W. J. A Review of Formulations of Commercially Available Antibodies. *J. Pharm. Sci.* **2021**, *110* (7), 2590–2608.e56. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.03.017>.
- (44) Anhorn, M. G.; Mahler, H. C.; Langer, K. Freeze Drying of Human Serum Albumin (HSA) Nanoparticles with Different Excipients. *Int. J. Pharm.* **2008**, *363* (1–2), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.004>.
- (45) Wang, W. Lyophilization and Development of Solid Protein Pharmaceuticals. *Int. J. Pharm.* **2000**, *203* (1–2), 1–60. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00423-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00423-3).
- (46) Pikal-Cleland, K. A.; Carpenter, J. F. Lyophilization-Induced Protein Denaturation in Phosphate Buffer Systems: Monomeric and Tetrameric β -Galactosidase. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90* (9), 1255–1268. <https://doi.org/10.1002/jps.1078>.
- (47) FDA. HERCEPTIN® (Trastuzumab) Final labelling evidence https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/103792s5256lbl.pdf.
- (48) Volkov, V. V.; McMaster, J.; Aizenberg, J.; Perry, C. C. Mapping Blood Biochemistry by Raman

- Spectroscopy at the Cellular Level. *Chem. Sci.* **2022**, *13* (1), 133–140. <https://doi.org/10.1039/d1sc05764b>.
- (49) Huang, W.; Wu, X.; Gao, X.; Yu, Y.; Lei, H.; Zhu, Z.; Shi, Y.; Chen, Y.; Qin, M.; Wang, W.; Cao, Y. Maleimide–Thiol Adducts Stabilized through Stretching. *Nat. Chem.* **2019**, *11* (4), 310–319. <https://doi.org/10.1038/s41557-018-0209-2>.
- (50) Ravasco, J. M. J. M.; Faustino, H.; Trindade, A.; Gois, P. M. P. Bioconjugation with Maleimides: A Useful Tool for Chemical Biology. *Chem. - A Eur. J.* **2019**, *25* (1), 43–59. <https://doi.org/10.1002/chem.201803174>.
- (51) Hendry-Hofer, T. B.; Ng, P. C.; Witeof, A. E.; Mahon, S. B.; Brenner, M.; Boss, G. R.; Bebarta, V. S. A Review on Ingested Cyanide: Risks, Clinical Presentation, Diagnostics, and Treatment Challenges. *J. Med. Toxicol.* **2019**, *15* (2), 128–133. <https://doi.org/10.1007/s13181-018-0688-y>.
- (52) Brenner, M.; Mahon, S. B.; Lee, J.; Kim, J.; Mukai, D.; Goodman, S.; Kreuter, K. A.; Ahdout, R.; Mohammad, O.; Sharma, V. S.; Blackledge, W.; Boss, G. R. Comparison of Cobinamide to Hydroxocobalamin in Reversing Cyanide Physiologic Effects in Rabbits Using Diffuse Optical Spectroscopy Monitoring. *J. Biomed. Opt.* **2010**, *15* (1), 017001. <https://doi.org/10.1117/1.3290816>.
- (53) Nath, A. K.; Roberts, L. D.; Liu, Y.; Mahon, S. B.; Kim, S.; Ryu, J. H.; Werdich, A.; Januzzi, J. L.; Boss, G. R.; Rockwood, G. A.; MacRae, C. A.; Brenner, M.; Gerszten, R. E.; Peterson, R. T. Chemical and Metabolomic Screens Identify Novel Biomarkers and Antidotes for Cyanide Exposure. *FASEB J.* **2013**, *27* (5), 1928–1938. <https://doi.org/10.1096/fj.12-225037>.
- (54) Chan, A.; Jiang, J.; Fridman, A.; Guo, L. T.; Shelton, G. D.; Liu, M. T.; Green, C.; Haushalter, K. J.; Patel, H. H.; Lee, J.; Yoon, D.; Burney, T.; Mukai, D.; Mahon, S. B.; Brenner, M.; Pilz, R. B.; Boss, G. R. Nitrocobinamide, a New Cyanide Antidote That Can Be Administered by Intramuscular Injection. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (4), 1750–1759. <https://doi.org/10.1021/jm501565k>.
- (55) Bebarta, V. S.; Brittain, M.; Chan, A.; Garrett, N.; Yoon, D.; Burney, T.; Mukai, D.; Babin, M.; Pilz, R. B.; Mahon, S. B.; Brenner, M.; Boss, G. R. Sodium Nitrite and Sodium Thiosulfate Are Effective Against Acute Cyanide Poisoning When Administered by Intramuscular Injection. *Ann. Emerg. Med.* **2017**, *69* (6), 718–725.e4. <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2016.09.034>.
- (56) Morningstar, J.; Lee, J.; Hendry-Hofer, T.; Witeof, A.; Lyle, T.; Knipp, G.; MacRae, C. A.; Boss, G. R.; Peterson, R. T.; Davisson, V. J.; Gerszten, R. E.; Bebarta, V. S.; Mahon, S.; Brenner, M.; Nath, A. K. Intramuscular Administration of Hexachloroplatinate Reverses Cyanide-Induced Metabolic Derangements and Counteracts Severe Cyanide Poisoning. *FASEB BioAdvances* **2019**, *1* (2), 81–92. <https://doi.org/10.1096/fba.1024>.
- (57) Yamagiwa, T.; Kawaguchi, A. T.; Saito, T.; Inoue, S.; Morita, S.; Watanabe, K.; Kitagishi, H.; Koji, K.; Inokuchi, S. Supramolecular Ferric Porphyrins and a Cyclodextrin Dimer as Antidotes for Cyanide Poisoning. *Hum. Exp. Toxicol.* **2014**, *33* (4), 360–368. <https://doi.org/10.1177/0960327113499041>.

- (58) Watanabe, K.; Kitagishi, H.; Kano, K. Supramolecular Iron Porphyrin/Cyclodextrin Dimer Complex That Mimics the Functions of Hemoglobin and Methemoglobin. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, 52 (27), 6894–6897. <https://doi.org/10.1002/anie.201302470>.
- (59) Watanabe, K.; Kitagishi, H.; Kano, K. Supramolecular Ferric Porphyrins as Cyanide Receptors in Aqueous Solution. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, 2 (12), 943–947. <https://doi.org/10.1021/ml200231x>.
- (60) Pearce, L. L.; Manzano, E. L.; Martinez-Bosch, S.; Peterson, J. Antagonism of Nitric Oxide toward the Inhibition of Cytochrome c Oxidase by Carbon Monoxide and Cyanide. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, 21 (11), 2073–2081. <https://doi.org/10.1021/tx800140y>.
- (61) Way, J. L. Cyanide Intoxication and Its Mechanism of Antagonism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1984**, 24 (1), 451–481. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.24.040184.002315>.
- (62) Warenycia, M. W.; Goodwin, L. R.; Benishin, C. G.; Reiffenstein, R. J.; Francom, D. M.; Taylor, J. D.; Dieken, F. P. Acute Hydrogen Sulfide Poisoning. Demonstration of Selective Uptake of Sulfide by the Brainstem by Measurement of Brain Sulfide Levels. *Biochem. Pharmacol.* **1989**, 38 (6), 973–981. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90288-8](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90288-8).
- (63) Abe, K.; Kimura, H. The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Neuromodulator. *J. Neurosci.* **1996**, 16 (3), 1066–1071. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-03-01066.1996>.
- (64) Guo, W.; Cheng, Z. Y.; Zhu, Y. Z. Hydrogen Sulfide and Translational Medicine. *Acta Pharmacol. Sin.* **2013**, 34 (10), 1284–1291. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.127>.
- (65) Cao, X.; Xiong, S.; Zhou, Y.; Wu, Z.; Ding, L.; Zhu, Y.; Wood, M. E.; Whiteman, M.; Moore, P. K.; Bian, J. S. Renal Protective Effect of Hydrogen Sulfide in Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Antioxidants Redox Signal.* **2018**, 29 (5), 455–470. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7157>.
- (66) Tokuda, K.; Kida, K.; Marutani, E.; Crimi, E.; Bougaki, M.; Khatri, A.; Kimura, H.; Ichinose, F. Inhaled Hydrogen Sulfide Prevents Endotoxin-Induced Systemic Inflammation and Improves Survival by Altering Sulfide Metabolism in Mice. *Antioxidants Redox Signal.* **2012**, 17 (1), 11–21. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4363>.
- (67) Qabazard, B.; Masocha, W.; Khajah, M.; Phillips, O. A. H₂S Donor GYY4137 Ameliorates Paclitaxel-Induced Neuropathic Pain in Mice. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, 127 (February), 110210. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110210>.
- (68) Suzuki, K.; Olah, G.; Modis, K.; Coletta, C.; Kulp, G.; Gerö, D.; Szoleczky, P.; Chang, T.; Zhou, Z.; Wu, L.; Wang, R.; Papapetropoulos, A.; Szabo, C. Hydrogen Sulfide Replacement Therapy Protects the Vascular Endothelium in Hyperglycemia by Preserving Mitochondrial Function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, 108 (33), 13829–13834. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105121108>.
- (69) Gong, W.; Zhang, S.; Chen, Y.; Shen, J.; Zheng, Y.; Liu, X.; Zhu, M.; Meng, G. Protective Role of Hydrogen Sulfide against Diabetic Cardiomyopathy via Alleviating Necroptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **2022**, 181 (November 2021), 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.01.028>.

- (70) Karimi, A.; Absalan, F.; Khorsandi, L.; Valizadeh, A.; Mansouri, E. Sodium Hydrogen Sulfide (NaHS) Ameliorates Alterations Caused by Cisplatin in Filtration Slit Diaphragm and Podocyte Cytoskeletal in Rat Kidneys. *J. Nephropathol.* **2017**, *6* (3), 150–156. <https://doi.org/10.15171/jnp.2017.26>.
- (71) Predmore, B. L.; Lefer, D. J. Development of Hydrogen Sulfide-Based Therapeutics for Cardiovascular Disease. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **2010**, *3* (5), 487–498. <https://doi.org/10.1007/s12265-010-9201-y>.
- (72) Eltzschig, H. K.; Eckle, T. Ischemia and Reperfusion—from Mechanism to Translation. *Nat. Med.* **2011**, *17* (11), 1391–1401. <https://doi.org/10.1038/nm.2507>.
- (73) Hines, I. N.; Hoffman, J. M.; Scheerens, H.; Day, B. J.; Harada, H.; Pavlick, K. P.; Bharwani, S.; Wolf, R.; Gao, B.; Flores, S.; McCord, J. M.; Grisham, M. B. Regulation of Postischemic Liver Injury Following Different Durations of Ischemia. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **2003**, *284* (3 47-3), 536–545. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00400.2002>.
- (74) Kang, K.; Zhao, M.; Jiang, H.; Tan, G.; Pan, S.; Sun, X. Role of Hydrogen Sulfide in Hepatic Ischemia-Reperfusion-Induced Injury in Rats. *Liver Transplant.* **2009**, *15* (10), 1306–1314. <https://doi.org/10.1002/lt.21810>.
- (75) Guan, L.-Y. Mechanisms of Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury and Protective Effects of Nitric Oxide. *World J. Gastrointest. Surg.* **2014**, *6* (7), 122. <https://doi.org/10.4240/wjgs.v6.i7.122>.
- (76) Szabó, C. Hydrogen Sulphide and Its Therapeutic Potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6* (11), 917–935. <https://doi.org/10.1038/nrd2425>.
- (77) Edwards, S.; Alharthi, R.; Ghaly, A. E. Removal of Hydrogen Sulphide from Water. *Am. J. Environ. Sci.* **2011**, *7* (4), 295–305. <https://doi.org/10.3844/ajessp.2011.295.305>.
- (78) Vitvitsky, V.; Kabil, O.; Banerjee, R. High Turnover Rates for Hydrogen Sulfide Allow for Rapid Regulation of Its Tissue Concentrations. *Antioxidants Redox Signal.* **2012**, *17* (1), 22–31. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4310>.
- (79) Cui, W.; Chen, J.; Yu, F.; Liu, W.; He, M. GYY4137 Protected the Integrity of the Blood-Brain Barrier via Activation of the Nrf2/ARE Pathway in Mice with Sepsis. *FASEB J.* **2021**, *35* (7), 1–15. <https://doi.org/10.1096/fj.202100074R>.
- (80) Jha, S.; Calvert, J. W.; Duranski, M. R.; Ramachandran, A.; Lefer, D. J. Hydrogen Sulfide Attenuates Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury: Role of Antioxidant and Antiapoptotic Signaling. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **2008**, *295* (2), 801–806. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00377.2008>.
- (81) Gan, X.; Zhang, R.; Gu, J.; Ju, Z.; Wu, X.; Wang, Q.; Peng, H.; Qiu, J.; Zhou, J.; Cheng, F.; Lu, L. Acidic Microenvironment Regulates the Severity of Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury by Modulating the Generation and Function of Tregs via the PI3K-MTOR Pathway. *Front. Immunol.* **2020**, *10* (January), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02945>.

- (82) Granger, D. N.; Kvietys, P. R. Reperfusion Injury and Reactive Oxygen Species: The Evolution of a Concept. *Redox Biol.* **2015**, *6*, 524–551. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.020>.
- (83) Cheng, P.; Wang, F.; Chen, K.; Shen, M.; Dai, W.; Xu, L.; Zhang, Y.; Wang, C.; Li, J.; Yang, J.; Zhu, R.; Zhang, H.; Zheng, Y.; Lu, J.; Zhou, Y.; Guo, C. Hydrogen Sulfide Ameliorates Ischemia/Reperfusion-Induced Hepatitis by Inhibiting Apoptosis and Autophagy Pathways. *Mediators Inflamm.* **2014**, *2014*, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2014/935251>.
- (84) Kim, J. Y.; Lee, D. Y.; Kang, S.; Miao, W.; Kim, H.; Lee, Y.; Jon, S. Bilirubin Nanoparticle Preconditioning Protects against Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *Biomaterials* **2017**, *133*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.04.011>.
- (85) Wang, D.; Ma, Y.; Li, Z.; Kang, K.; Sun, X.; Pan, S.; Wang, J.; Pan, H.; Liu, L.; Liang, D.; Jiang, H. The Role of AKT1 and Autophagy in the Protective Effect of Hydrogen Sulphide against Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. *Autophagy* **2012**, *8* (6), 954–962. <https://doi.org/10.4161/auto.19927>.
- (86) Zhang, Q.; Fu, H.; Zhang, H.; Xu, F.; Zou, Z.; Liu, M.; Wang, Q.; Miao, M.; Shi, X. Hydrogen Sulfide Preconditioning Protects Rat Liver against Ischemia/Reperfusion Injury by Activating Akt-GSK-3 β Signaling and Inhibiting Mitochondrial Permeability Transition. *PLoS One* **2013**, *8* (9), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074422>.
- (87) Kimura, H. Hydrogen Sulfide: From Brain to Gut. *Antioxidants Redox Signal.* **2010**, *12* (9), 1111–1123. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2919>.
- (88) Shimada, S.; Fukai, M.; Wakayama, K.; Ishikawa, T.; Kobayashi, N.; Kimura, T.; Yamashita, K.; Kamiyama, T.; Shimamura, T.; Taketomi, A.; Todo, S. Hydrogen Sulfide Augments Survival Signals in Warm Ischemia and Reperfusion of the Mouse Liver. *Surg. Today* **2015**, *45* (7), 892–903. <https://doi.org/10.1007/s00595-014-1064-4>.
- (89) Yang, G.; Zhao, K.; Ju, Y.; Mani, S.; Cao, Q.; Puukila, S.; Khaper, N.; Wu, L.; Wang, R. Hydrogen Sulfide Protects Against Cellular Senescence via S -Sulfhydration of Keap1 and Activation of Nrf2. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18* (15), 1906–1919. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4645>.
- (90) Hirao, H.; Nakamura, K.; Kupiec-Weglinski, J. W. Liver Ischaemia–Reperfusion Injury: A New Understanding of the Role of Innate Immunity. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2022**, *19* (4), 239–256. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00549-8>.
- (91) Serracino-Inglott, F.; Habib, N. A.; Mathie, R. T. Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *Am. J. Surg.* **2001**, *181* (2), 160–166. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(00\)00573-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(00)00573-0).
- (92) Zhai, Y.; Petrowsky, H.; Hong, J. C.; Busuttil, R. W.; Kupiec-Weglinski, J. W. Ischaemia-Reperfusion Injury in Liver Transplantation-from Bench to Bedside. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2013**, *10* (2), 79–89. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.225>.
- (93) Mu, J.; Li, C.; Shi, Y.; Liu, G.; Zou, J.; Zhang, D. Y.; Jiang, C.; Wang, X.; He, L.; Huang, P.; Yin, Y.; Chen, X. Protective Effect of Platinum Nano-Antioxidant and Nitric Oxide against Hepatic

- Ischemia-Reperfusion Injury. *Nat. Commun.* **2022**, *13* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29772-w>.
- (94) Cabrales, P.; Intaglietta, M.; Tsai, A. G. Transfusion Restores Blood Viscosity and Reinstates Microvascular Conditions from Hemorrhagic Shock Independent of Oxygen Carrying Capacity. *Resuscitation* **2007**, *75* (1), 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2007.03.010>.
 - (95) Oliver, M. H.; Harrison, N. K.; Bishop, J. E.; Cole, P. J.; Laurent, G. J. A Rapid and Convenient Assay for Counting Cells Cultured in Microwell Plates: Application for Assessment of Growth Factors. *J. Cell Sci.* **1989**, *92* (3), 513–518. <https://doi.org/10.1242/jcs.92.3.513>.
 - (96) Spinazzi, M.; Casarin, A.; Pertegato, V.; Salviati, L.; Angelini, C. Assessment of Mitochondrial Respiratory Chain Enzymatic Activities on Tissues and Cultured Cells. *Nat. Protoc.* **2012**, *7* (6), 1235–1246. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.058>.
 - (97) Brenner, M.; Azer, S. M.; Jin Oh, K.; Han, C. H.; Lee, J.; Mahon, S. B.; Du, X.; Mukai, D.; Burney, T.; Saidian, M.; Chan, A.; Straker, D. I.; Bebart, V. S.; Boss, G. R. Oral Glycine and Sodium Thiosulfate for Lethal Cyanide Ingestion. *Ferment. Technol.* **2017**, *07* (03), 355. <https://doi.org/10.4172/2167-7972.1000355>.
 - (98) Seto, Y. Oxidative Conversion of Thiocyanate to Cyanide by Oxyhemoglobin during Acid Denaturation. *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *321* (1), 245–254. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1392>.
 - (99) Chan, A.; Balasubramanian, M.; Blackledge, W.; Mohammad, O. M.; Alvarez, L.; Boss, G. R.; Bigby, T. D. Cobinamide Is Superior to Other Treatments in a Mouse Model of Cyanide Poisoning. *Clin. Toxicol.* **2010**, *48* (7), 709–717. <https://doi.org/10.3109/15563650.2010.505197>.
 - (100) Abe, Y.; Hines, I. N.; Zibari, G.; Pavlick, K.; Gray, L.; Kitagawa, Y.; Grisham, M. B. Mouse Model of Liver Ischemia and Reperfusion Injury: Method for Studying Reactive Oxygen and Nitrogen Metabolites in Vivo. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *46* (1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.029>.