

199800445A

平成10年度 厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

研究成果報告書

酸素運搬機能を有する人工赤血球の創製と その評価に関する研究
(H10-血液-007)

平成11年4月10日

主任研究者 土田 英俊 （早稲田大学 理工学部 教授）

目 次

1. 研究組織、研究費、研究成果の刊行に関する一覧表	1
2. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書	
主任研究者 土田英俊	6
3. 厚生科学研究費補助金分担研究報告書	
主任研究者 土田英俊	8
分担研究者 関口定美	1 8
小林紘一	2 5
末松 誠	3 0
4. (付) 研究報文	

研究課題名（課題番号）：酸素運搬機能を有する人工赤血球の創製とその評価に関する研究
(H10-血液-007)

研究事業期間：平成10年4月1日から平成11年3月31日まで（3）年計画の（2）年目

国庫補助金精算所要額：金80,000,000円也

研究組織

①研究者名	②分担する研究項目	③最終卒業学校・卒業年次・学位及び専攻科目	④所属施設及び現在の専門（研究実施場所）	⑤所属施設における職名	⑥研究費配分額（千円）
土田英俊	総括 / 人工赤血球およびその製剤化	早大大・昭35・工博・応用化学	早大理工 / 医工学、人工臓器、人工血液	教授	53,000
関口定美	精製ヘモグロビンの品質管理	北大・昭33・医博・外科学	北海道赤十字血液センター / 臨床輸血学	所 長	15,000
小林紘一	in vivo 評価法と効能確認	慶大医・昭42・医博・外科学	慶大医 / 呼吸器外科	教授	10,000
末松 誠	肝微小循環系観測による評価	慶大医・昭63・医博・生理学	慶大医 / 生理学・医化学	助教授	2,000

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執筆者氏名
BLOOD SUBSTITUTES. Present and Future Perspectives	1998年12月	Elsevier Science	Eishun Tsuchida
"Perspectives of blood substitute" in BLOOD SUBSTITUTES, Chapter 1, pp 1-14	1998年12月	Elsevier Science	Eishun Tsuchida
"Evaluation of the oxygen transporting capability of hemoglobin vesicles" in BLOOD SUBSTITUTES, Chapter 14, pp 171-184	1998年12月	Elsevier Science	Shinji Takeka Hiromi Sakai Koichi Kobayashi Eishun Tsuchida
"Microvasacular Responses to Hemodilution with Hb-vesicles: Importance of resistance arteries and mechanisms of vasoconstriction in BLOOD SUBSTITUTES, Chapter 15, pp 185-200	1998年12月	Elsevier Science	Hiromi Sakai Amy G. Tsai Eishun Tsuchida Marcos Intaglietta
"The heme oxygenase system in liver microcirculation: A key mechanism for hemoglobin degradation" in BLOOD SUBSTITUTES, Chapter 19, pp 241-250	1998年12月	Elsevier Science	Makoto Suematsu Yoshiyuki Wakabayashi Nobuhito Goto Shinji Takeoka Eishun Tsuchida Yuzuru Ishimura

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執 筆 者 氏 名
"Oxygen-Transport Albumin: A new hemoprotein incorporating lipidheme as a red cell substitute" in BLOOD SUBSTITUTES, Chapter 24, pp 315-326	1998年12月	Elsevier Science	Teruyuki Komatsu Eishun Tsuchida Koichi Kobayashi
"Impact on the appearance of blood substitutes replacing blood in transfusion medicine" in BLOOD SUBSTITUTES, Chapter 29, pp 383-390	1998年12月	Elsevier Science	Sadayoshi Sekiguchi
"F. 人工血液", バイオマテリアルと生体 - 副作用と安全性, pp 230-236	1998年12月	中山書店	土田英俊
人工血液, 6 (3), 76-87 (1998) "微小循環動態の観測と赤血球代替物の評価"	1998年8月	日本血液代替物学会	酒井宏水 Marcos Intaglietta 土田英俊
組織培養工学, 24 (13), 488-492 (1998) "酸素輸液の現状"	1998年9月	ニュー・サイエンス社	武岡真司, 土田英俊
LiSA 別冊 '98, 5, 2-8 (1998) "人工血液"	1998年9月	メディカル・サイエンス・インターナショナル	土田英俊
Drug Delivery System (DDS), 13 (5), 333-340 (1998) "分子集合を利用した人工血液"	1998年9月	日本DDS学会	土田英俊
医学のあゆみ, 188 (6), 677-686 (1999) "酸素輸液の開発動向"	1999年2月	医歯薬出版	土田英俊, 酒井宏水
組織培養工学, 24 (13), 500-503 (1998) "人工酸素運搬体 - その臨床応用を目指して -"	1998年9月	ニュー・サイエンス社	小林紘一, 田島敦史
血管, 21 (1), 19-25 (1998) "ヘムオキシゲナーゼ/一酸化窒素系による臓器機能制御機構"	1998年4月	日本心脈管作動物質学会	末松 誠, 若林良之 牧野信也, 高宮里奈 合田亘人, 石村 巽
細胞工学, 17 (2), 224-229 (1998) "ヘムオキシゲナーゼ/CO系による臓器機能制御"	1998年4月	秀潤社	末松 誠, 合田亘人 鈴木恒陽, 若林良之 石村 巽
組織培養工学, 24 (1), 19-23 (1998) "一酸化窒素による微小血管機能の制御: 肝臓におけるin vivo/in vitroのdiscrepancy"	1998年4月	ニュー・サイエンス社	末松 誠, 鈴木恒陽 牧野信也, 若林良之 柏木 哲, 合田亘人 石村 巽

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執 筆 者 氏 名
医学のあゆみ, 184 (10), 821-825 (1998) "人工酸素運搬体と微小循環機能"	1998年5月	医歯薬出版	末松 誠, 武岡真司 土田英俊, 石村 巽
病理と臨床, 16 (9), 1089-1094 (1998) "kupffer細胞と肝微小循環：ヘム代謝 と血流調節の接点"	1998年9月	文光堂	末松 誠, 京兼隆典 若林良之, 石村 巽
<i>J. Biomed. Materials Res.</i> , 40 , 66-78 (1998) "Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with a red cell substitute consisting of polyethyleneglycole-modified vesicles encapsulating hemoglobin"	1998年4月	John Wiley & Sons, Inc.	Hiromi Sakai Amy G. Tasai Heinz Kerger Shinji Takeoka Eishun Tsuchida Marcos Intaglietta
<i>J. Chem. Soc. Faraday Trans.</i> , 94 , 2151- 2158 (1998) "Physical properties and packing states of molecular assemblies of synthetic glycolipid in aqueous dispersions"	1998年10月	The Royal Society of Chemistry	Shinji Takeoka Keitaro Sou Christoph Boettcher Jürgen H. Fhürhop Eishun Tsuchida
<i>Artif. Cells Blood Substitute Immobilization Biotechnol.</i> , 26 , 497-506 (1998) "Effects of the pH-controlled hemoglobin vesicles by CO ₂ gas"	1998年11月	Marcel Dekker, Inc.	SungInc Park Takehiro Kose Masaomi Hamasaki Shinji Takeoka Hiroyuki Nishide Eishun Tsuchida
<i>Artif. Cells Blood Substitute Immobilization Biotechnol.</i> , 26 , 507-518 (1998) "Oxygen releasing from cellular Hb"	1998年11月	Marcel Dekker, Inc.	Noriyuki Kawai Haruki Ohkawa Hiromitsu Maejima Shinji Takeoka Hiroyuki Nishide Eishun Tsuchida
<i>Artif. Cells Blood Substitute Immobilization Biotechnol.</i> , 26 , 519-528 (1998) "Human serum albumin bound synthetic heme as an oxygen carrier: determination of equilibrium constants of heme binding to host albumin"	1998年11月	Marcel Dekker, Inc.	Teruyuki Komatsu Kazuyoshi Hamamatsu Shinji Takeoka Hiroyuki Nishide Eishun Tsuchida
人工血液, 6 , 110-114 (1998) "リコンビ ナントアルブミン - ヘム複合体の物性 と酸素結合能"	1998年12月	日本血液代替物学会	小松晃之, 浜松和芳 松川泰子, 呉 健 土田英俊

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執 筆 者 氏 名
<i>Am. J. Physiol.</i> , 276 (Heart Circ. Physiol. 45), H553-562 (1999) "Microvascular responses to hemodilution with Hb-vesicles as red cell substitutes: Influences of O ₂ affinity"	1999年2月	American Physiological Society	Hiromi Sakai Amy G. Tsai Ronald J. Rohlfes Hiroyuki Hara Shinji Takeoka Eishun Tsuchida
<i>Am. J. Physiol.</i> , 276 (Heart Circ. Physiol. 45), H563-571 (1999) "Changes in resistance vessels during hemorrhagic shock and resuscitation in conscious hamster model"	1999年2月	American Physiological Society	Hiromi Sakai Hiroyuki Hara Amy G. Tsai Eishun Tsuchida Paul C. Johnson Marcos Intaglietta
<i>Bioconjugate Chem.</i> , 10 , 82-86 (1999) "Physicochemical properties and O ₂ -coordination structure of human serum albumin incorporating tetrakis(o-pivalamido)phenylporphyrinatoiron(II) Derivatives"	1999年2月	American Chemical Society	Teruyuki Komatsu Kazuyoshi Hamamatsu Jian Wu Eishun Tsuchida
<i>Artif. Cells Blood Substitute Immobilization Biotechnol.</i> , 26 , 487-495 (1998) "Effect of liposome-encapsulated hemoglobin on phorbol ester-induced superoxide production and expression of costimulatory molecules by monocytes <i>in vitro</i> "	1998年11月	Marcel Dekker, Inc.	Mitsuhiro Fujihara Kenji Ikebuchi Miki Yamaguchi Hideki Abe Koichi Niwa Sadayoshi Sekiguchi
<i>Artif. Cells Blood Substitute Immobilization Biotechnol.</i> , 26 , 559-570 (1998) "Inflammatory cytokine production in whole blood modified by liposome-encapsulated hemoglobin"	1998年11月	Marcel Dekker, Inc.	Koichi Niwa Kenji Ikebuchi Mitsuhiro Fujihara Hideki Abe Shinobu Wakamoto Takatoshi Ito Miki Yamaguchi Sadayoshi Sekiguchi
<i>J. Clin. Invest.</i> , 101 , 604-612 (1998) "Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver: Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation"	1998年2月	The American Society for Clinical Investigation, Inc.	Nobuhito Goda Kensuke Suzuki Makoto Naito Shinji Takeoka Eishun Tsuchida Yuzuru Ishimura Takuya Tamatani Makoto Suematsu

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執 筆 者 氏 名
<i>Hepatology</i> , 27 , 108-115 (1998) "Nitric oxide suppression reversibly attenuates mitochondrial dysfunction and cholestasis in endotoxemic rat liver"	1998年4月	American Association for the Study of Liver Diseases	Masaya Shiomi Yoshiyuki Wakabayashi Tsuyoshi Sano Yuichi Shinoda Yuji Ninura Yuzuru Ishimura Makoto Suematsu
<i>Hepatology</i> , 28 , 286-290 (1998) "Carbon monoxide as a modulator of bile canaliculi contractility in cultured rat hepatocytes"	1998年5月	American Association for the Study of Liver Diseases	Yuichi Shinoda Makoto Suematsu Yoshiyuki Wakabayashi Tsuneharu Suzuki Nobuhito Goda Shuji Saito Tokio Yamaguchi Yuzuru Ishimura

総括研究報告書

酸素運搬機能を有する人工赤血球の創製とその評価に関する研究

主任研究者 土田 英俊 早稲田大学 理工学部 教授

研究要旨 本研究は、十分な酸素輸送量と、血液と同等の溶液レオロジーを持ち、しかも無害で所定の安定度を満足する人工赤血球の創製を目指すものであり、細胞型ヘモグロビン小胞体と全合成系アルブミン-ヘムを対象としている。平成10年度では、原料ヘモグロビンのウイルスフリーの確認、ヘモグロビン小胞体製造の連続工程の検討、新しいメトヘモグロビン還元法の開発、ヘモグロビン小胞体と血球成分との相互作用や免疫系への影響が殆ど認められないことを実証した。また、分離灌流肝を用いた検討では、内毒素血症におけるヘモグロビン分解の亢進が細胞型では抑制されることを証明した。完全合成系アルブミン-ヘムについては、安全性を含めた動物試験成績を集積するとともに、リコンビナントアルブミンを用いた系での分子構造の特定と物性の詳細解析を行った。

分担研究者

関口 定美 北海道赤十字血液センター 所長

小林 紘一 慶応義塾大学 医学部 教授

末松 誠 慶応義塾大学 医学部 助教授

A. 研究目的

副作用の心配がない安全で有効な人工赤血球の創製を確立するために、ヒトヘモグロビン小胞体と全合成系を対象に、*in vitro*, *in vivo* 両面からの厳密な評価結果を性能改良に直接反映させながら、安全で充分量の酸素輸送ができる人工赤血球を製造する。

平成10年度では、細胞型ヘモグロビン小胞体製造の連続工程の確立、新しいメトヘモグロビンの還元法の検討、血液成分との相互作用や免疫系に対する影響の検討、内毒素血症における肝微小循環の観測、全合成系レコンビナントアルブミン-ヘム複合体の物性解析と体内酸素運搬能の確認を具体項目として研究を行った。

B. 研究方法

細胞型ヘモグロビン小胞体を連続的に生産できる体制を整えるために、(1)原料ヘモグロビン溶液のウイルス不活化法・除去法の検討として、ウイルス除去膜によるパルボウイルスの除去と、メチレンブルーを用いたウイルス光不活化法を検討した。また液状加熱処理法のウイルス不活化効果についてHIVを用いたバリデーションを行った。(2) 脱一酸化炭素

($\text{HbCO} \rightarrow \text{HbO}_2$)の工程における光源として赤外線放射の少ないナトリウムランプを用いる方法、および(3) 脱酸素($\text{HbO}_2 \rightarrow \text{deoxyHb}$)を迅速に行うために人工肺を用いる方法も検討した。更に、小胞体表面にポリオキシエチレン脂質を後導入する方法について、これを物理化学的な手法あるいは臨界分子量を利用する方法により定量解析し、最適な導入条件と脂質組成を選定した。

鉄二価のヘモグロ빈は自動酸化して鉄三価のメトヘモグロビン(*metHb*)となり酸素結合能を失うが、この解決のために、光還元法により酸素結合能を還元させる方法を検討した。

生体適合性を検討するため、各種アゴニストによる血小板凝集への影響を検討した。また、好中球の走化能及び抗原提示細胞の抗原提示能をMLRの系を用い、免疫系への影響検討した。更に、SODの小胞体封入効果を $\text{TNF-}\alpha$ 産生量から定量した。ヘモグロビン小胞体投与後の細網内皮系(RES)貪食能を把握するため、カーボンクリアランス試験を実施した。

内毒素血症の分離灌流肝を用い非細胞型および細胞型ヘモグロビン小胞体の肝血管抵抗に対する影響を観察した。

リコンビナントヒト血清アルブミン(rHSA)にテトラフェニルポルフィリン鉄(II)誘導体(*FeP*)を複合させた rHSA-*FeP*複合体(完全合成系ヘム蛋白質)を調製し、その溶液物性、血液適合性、酸素結合能を測定した。更にHSA-*FeP*の動物投与試験(血液希釈後の出

血ショックに対する蘇生)から、酸素運搬能を評価した。

C. 研究結果および考察

細胞型ヘモグロビン小胞体の製造工程において、ウイルス除去膜BMM-15でヘモグロビン溶液を濾過することにより、 $6-7 \log_{10}$ のパルボウイルス除去が可能であった。またvesicular stomatitis virusは、 $5 \mu\text{M}$ メチレンブルー存在下 5.7 J/cm^2 可視光照射により、 $5.7 \log_{10}$ 不活化された。加熱処理前 $6.9 \log_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ だったHIV感染価は、ヘモグロビンの一酸化炭素処理を行い、 60°C 、12時間の加熱処理で $2.3 \log_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ に低下、 $4.6 \log_{10}$ の不活化が可能であった。

ナトリウムランプを光源とした一酸化炭素化ヘモグロビンの光解離により、発熱を抑えて濃厚溶液を効率よく処理できた。また、脱酸素化工程には人工肺を用いることで大量処理が可能となった。ヘモグロビン精製から小胞体調製まで一連の操作の連続化、量産化の方法論を確立した。

ヘモグロビン小胞体の表面修飾法の検討では、修飾剤のアシル鎖長と表面への導入安定度の相関、ポリオキシエチレン(POE)鎖長と分散安定度の相関を明らかにし、修飾剤としてとしてPOE(Mw.5000)-DSPEを0.2mol%導入することが適していることが定量的に示された。

メトヘモグロビンが一酸化炭素雰囲気下、光照射によって還元される現象を新たに見出した。また、この反応は多価アルコールの添加で促進された。これはメト化したヘモグロビン小胞体を添加剤を使用せずに繰り返し酸素運搬能を還元させる方法となる。

細胞型ヘモグロビン小胞体は、血小板との相互作用を検討したところ、トロンビン、コラーゲン及びリストセチン刺激による血小板凝集能に影響を及ぼさなかった。好中球の走化能及び抗原提示細胞の抗原提示能にも影響を及ぼさなかった。刺激細胞を細胞型ヘモグロビン小胞体存在下にて0-20時間インキュベートさせた範囲内では、抗原提示能への影響も見られなかった。空リポソームにより誘導されるTNF- α 産生は、リポソーム内にSODを封入することにより抑制することができたことから、炎症反応の抑制には、活性酸素を消去する機能が酸素輸液に必要であることを示唆している。

カーボンクリアランス試験では、 10 ml/kg 投与した場合に、食食能の一過性低下が認められるが、3

日後には回復、食食能は亢進し、2週間で正常値へ復する傾向が認められ、不可逆な影響を与えるものではないと考えられた。

内毒素血症分離灌流肝を用いた試験では、Hb, metHb投与群で正常の2倍程度反応の血管抵抗の増強を認めた。これは内毒素によりNO合成酵素とheme oxygenase-1が誘導され、血管抵抗調節のNO、CO依存性が現れたためと考察された。また、Hb, metHbを投与すると数分以内に胆汁中にbilirubinが数倍増加したのに対し、HbV群ではbilirubin増加量はHb群の約30%程度に留まった。内毒素血症の肝臓ではヘム分解のダイナミクスが正常と大きく異なり、血管抵抗の維持にNO、COの双方が必要であるため、このような病的状態下で使用可能な酸素運搬体の設計に関する新たな知見が得られたことになる。

rHSA-FeP複合体製剤が、生理的条件下で酸素を可逆的に結合解離できる完全合成系ヘム蛋白質となることを実証した。FePはrHSA当たり最大8分子まで導入でき、粘度、膠質浸透圧、等電点、及びrHSAの二次構造はFePの結合数によらず一定であった。ヒト血液と混合した場合でも凝集の惹起はなく、血液適合性が高かった。70%血液希釈後に40%脱血ショック状態とし、HSA-FePを蘇生液として投与したところ、血圧、血液ガスパラメータ、組織酸素分圧、血流などの有意な回復が認められ、十分な酸素運搬能が実証できた。

D. 結論

細胞型ヘモグロビン小胞体の高効率連続量産工程について見通しを立てることができた。また、生体適合性を血液成分との相互作用や免疫系への影響の解析から、顕著な影響が無いことが確認された。肝微小循環動態において、細胞型ヘモグロビンが非細胞型よりも安全性が高いことが解った。全合成系では、アルブミン-ヘム複合体の物性の詳細が明確になり、また体内での十分な酸素運搬能が実証できた。これらの結果を受け、平成11年度では製造工程と品質管理、保存安定度について最終確認を行い、発明技術の特許出願と産業側の具体的参加をはかると共に、安全確認の重点的实施、実用化を目指した臨床試験への足掛かりを構築していく計画である。

1. リコンビナントアルブミン-ヘム製剤の溶液物性と酸素結合能
2. 細胞型ヘモグロビン小胞体の連続製造装置設計とその試作評価
3. 細胞型ヘモグロビン小胞体表面のポリオキシエチレン修飾法の検討
4. メトヘモグロビンの新しい還元系の構築

土田 英俊 早稲田大学理工学部 教授

研究要旨 リコンビナントヒト血清アルブミン(rHSA)にテトラフェニルポルフィリン鉄(II)誘導体(FeP)を包接させて得たrHSA-FeP複合体製剤が、生理的条件下で酸素を可逆的に結合解離できる完全合成系酸素輸液となることを実証した。FePはアルブミン1分子当たり最大8分子まで導入でき、粘度、膠質浸透圧、等電点、及びrHSAの二次構造は変化しなかった。ヒト血液と混合した場合でも赤血球凝集を惹起しなかった。

細胞型ヘモグロビン小胞体の製造工程において、脱一酸化炭素の工程にナトリウムランプを用いることで発熱の影響を抑え、濃厚溶液を効率よく処理できた。また、脱酸素化工程には人工肺を用いることで大量処理が可能となった。ヘモグロビン精製から小胞体調製までの一連の操作が連続化でき、スケールアップのための基礎を確立した。

細胞型ヘモグロビン小胞体のポリオキシエチレン表面修飾の詳細を検討した。修飾剤のアシル鎖長と表面への導入安定度、POE鎖長と分散安定度の相関を明らかにし、修飾剤と小胞体の分子間相互作用の解明および最適な修飾分子の構造を特定した。

メトヘモグロビンが一酸化炭素雰囲気下、光照射によって還元される現象を解析、メトヘモグロビン小胞体に酸素運搬能を還元させる新しい方法論の可能性を見出した。

1. リコンビナントアルブミン-ヘム製剤の溶液物性と酸素結合能

A. 研究目的

リコンビナントヒト血清アルブミン(HSA、Mw: 66.5 kD)にテトラフェニルポルフィリン鉄(II)誘導体(FeP)を包接させたリコンビナントアルブミン-ヘム複合体(HSA-FeP製剤)を調製し、その完全合成系酸素輸液の溶液物性、酸素結合能を定量的に明らかにすると共に、赤血球代替物としての機能評価を研究目的とした。

B. 実験方法

1) rHSA-FeP溶液の調製

FePは既法に従い合成¹⁾、rHSA(25 g/dL (3.75 mM))は吉富製薬社製を使用した。FePのエタノール溶液([FeP]: 0.15 mM)に一酸化炭素(CO)下でアスコルビン酸(AsA)水溶液を添加(AsA/FeP: 1 mol/mol)し、中心鉄がFe(II)に還元されたFeP(CO)体を得た。これをrHSAのリン酸生理緩衝溶液([rHSA]: 18.8 mM, [リン酸]: 10 mM, pH 7.3)に滴下混合し、すぐにエタノールを減圧除去した。限外濾過、透析により、エタノール、酸化型デヒドロアスコルビン酸を除去し、赤色透明のrHSA-FeP(CO)溶液([rHSA]: 5 g/dL (5 wt%))を得た。FeP結合比の異なる試料(FeP/HSA: 1, 4, 8 (mol/mol))を調製し、測定に供した。

2) 物理化学測定

等電点電気泳動はPhastsystem (Pharmacia), CDス

ペクトルは円二色性分光計J-720W (JASCO)を用いて測定した。rHSA-FeP(5g/dL)のコロイド浸透圧、及び粘度は、各々コロイド浸透圧計 4420 COLLOID OSMOMETER (WESCOR)、キャピラリー粘度計 DCS300 (Anton Paar)を用いて決定した。ヒト全血液はEDTAを含む採血管で採取し、同量のrHSA-FeP溶液と混合した後、すぐに粘度測定に供した。

3) 酸素親和度、及び酸素結合解離速度定数の測定

rHSA-FeP溶液([FeP]: 15 mM)に異なる酸素分圧の酸素/窒素混合ガスを吹き込み、その時の可視吸収スペクトル変化から、酸素親和性($P_{1/2}$)を決定した。酸素結合反応の熱力学パラメータ(ΔH , ΔS)は van't Hoffプロットから算出し、酸素の結合解離速度定数(k_{on} , k_{off})はレーザーフラッシュフォトリシス分光装置 TSP-601 (UNISOKU)を用いて決定した。酸素錯体半減期($\tau_{1/2}$)はoxy体(552 nm)の吸光度の経時変化から算出した。

C. 結果および考察

赤色のrHSA-FeP([rHSA]: 5 g/dL)は調製6ヵ月後(4°C保存)でも沈殿や凝集を認めず、きわめて安定な溶液であった。可視吸収スペクトルにおける427 nmの吸光度とFeP分子のモル吸光係数から、rHSAには最大8分子までのFePが導入できることを明かにした。これは従来のHSA-FeP系の場合と同様であり、FePの逐次平衡定数は K_1 : 10^6 (M^{-1})~ K_8 : 10^4 (M^{-1})程度と考えられる。

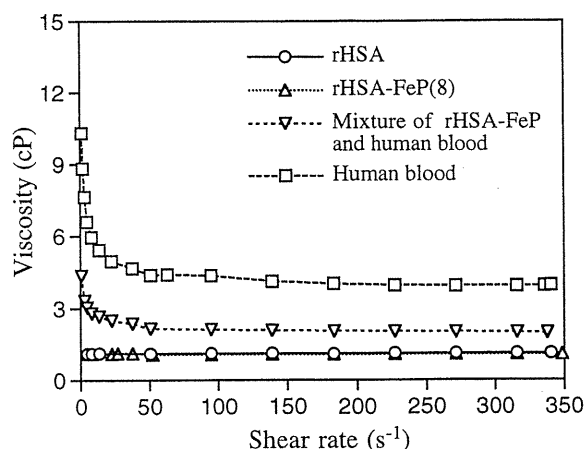


図1. HSA-FePの粘度特性(37°C)

rHSA-FePのCDスペクトルパターン、及びその強度はrHSA単独の場合と同様で、 $[\theta]_{208}$ の値から算出した α -helix含量も約60%であった。また、結合したFePによる誘起CDが400nm付近に観測されなかったことから、rHSAとFeP分子の結合は弱く、FePの取り込みは疎水性相互作用のみによるものと推定される。

また、rHSA-FePの等電点(pI), コロイド浸透圧は、FePの結合比(1~8)に関わらず各々4.8、18 mmHg ([rHSA]: 5 g/dL)であり、rHSAの値と同等であった。すなわちFePの結合に伴う表面電荷の変化

表1 HSA-FePの酸素結合パラメータ(25°C).

	$P_{1/2}$ ¹⁾ (Torr)	$10^7 k_{on}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$10^2 k_{off}$ (s^{-1})	ΔH ($kJmol^{-1}$)	ΔS ($JKmol^{-1}$)
rHSA-FeP(4)	13(37)	1.9	4.3	-61	-114
rHSA-FeP(8)	13(33)	2.5	5.6	-61	-115
HSA-FeP(8)	13(32)	2.6	5.5	-59	-107
Red blood cell	9(27)	0.0011	0.0016	—	—
Hb(T-state) α	40	0.29	1.8	-57—-65	-116—-133

1) at 37°C in parenthesis.

はなく、これはアルブミン自身の本来有する特性(膠質浸透圧調製や血漿増量作用)が損われないことを意味する。rHSA-FeP溶液の粘度曲線はニュートン性であり、測定速度範囲(0~350 s⁻¹)内に一定の低粘度(1.1 cP)を示した。ヒト全血液と混合しても凝集や沈殿の惹起は見られなかった。さらに混合溶液を光学顕微鏡で観察したが、赤血球の形状に全く変化はなかった。

rHSA-FePのdeoxy体溶液に酸素を通気すると、可視吸収スペクトル(λ_{max} :443, 542, 567 nm)は速やかにoxy体のスペクトル(λ_{max} :426, 552 nm)へ移行し、その酸素結合解離は可逆的であった。続いて一酸化炭素を通気すると安定なcarbonyl体(λ_{max} :427, 539 nm)を形成した。酸素錯体の半減期($\tau_{1/2}$)は、8 hr (25°C), 2hr (37°C)であり、従来のHSA-FeP系と同等であった。

rHSA-FePの酸素結合解離曲線から酸素親和性を算出した($P_{1/2}$: 33~37 Torr)。ヘモグロビンのような酸素結合の協同効果は見られない(Hill係数は1.0)が、肺(P_{O_2} : 110 Torr)–末梢血(P_{O_2} : 40 Torr)間における酸素運搬効率は22%で、赤血球の値(23%)に匹敵する酸素輸送能力を有する。また、rHSA-FePの酸素結合における熱力学パラメータ(ΔH , ΔS)は、各々-61 kJ/mol, -114 J/K・molで、ヘモグロビンの値と同等であった(表1)。

レーザーフラッシュフォトリシス法から決定したrHSA-FePの酸素結合解離速度定数(k_{on} , k_{off})は血液よりも10³倍、Hbよりも数倍大きく。酸素を迅速に吸脱着できることが明かとなった(表1)。これらの結果から、rHSA-FePはヘモグロビンと同じ機構で酸素分子を結合しており、完全合成型酸素輸液としての必要条件を兼ね備えていると考えられる。

D. 結論

FePはrHSAに最大8分子まで包接され、得られたrHSA-FeP複合体の溶液物性はrHSA自身と変わらない。これはFePのrHSAへの結合が疎水性相互作用によるためと考えられる。rHSA-FeP溶液は赤血球凝集を惹起せず、生理的条件下で可逆的に酸素を結合解離できる。酸素結合パラメータ、酸素輸送効率は赤血球と比較して遜色なく、rHSA-FePが酸素輸液としての機能を具有することを実証できた。

参考文献

1) Komatsu T, Kumamoto S, Ando K, Nishide H, Tsuchida E. Synthesis and O₂-binding properties of tetraphenylporphyrinatoiron(II) derivatives bearing proximal imidazole covalently bound at the b-pyrrolic position. J Chem Soc Perkin Trans 2 1995;1995:747-753

2. 細胞型ヘモグロビンの連続製造装置設計とその試作評価

A. 研究目的

細胞型ヘモグロビン小胞体(HbV)について、無菌操作で動物実験に供与できる量(実験室規模)を連続的に生産できる体制を整えるために、各工程の再検討を行うことを目的とした。特に、脱一酸化炭素(HbCO→HbO₂)の工程における光源として赤外線放射の少ないナトリウムランプを用いる方法、および脱酸素(HbO₂→deoxyHb)を迅速に行うために人工肺を用いる方法を検討した。

B. 研究方法

1) 脱一酸化炭素の工程

ヘモグロビン小胞体分散液[Hb] = 0.5 g/dL, 初期CO化率98.4%)100mLを円筒型硝子容器(高さ: 12.5cm, 直径: 18cm)に入れて、ロータリーエバポレータに装填して56rpmにて回転させた。光源としては高圧ナトリウムランプ(360W, 理工科学産業)およびハロゲンランプ(500W, 岩崎電器)を硝子容器から1cmの距離に固定、酸素を1.0 L/minの速度で流入させた。反応開始後0.5, 1, 2, 3 minに試料を少量採取し、可視吸収スペクトルからHbVのCO化率を得て、配位子交換率

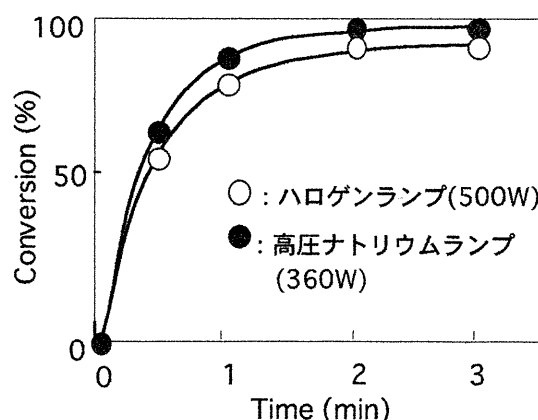


図2 HbV 配位子交換率の光照射時間変化

表2 HbVの配位子交換効率の比較

光源	照射時間 (min)	[Hb] (g/dL)	溶液量 (mL)	配位子初期交換速度 (g/min)
ハロゲンランプ (500W)	4	0.5	200	0.24
	4	1	150	0.35
高圧ナトリウムランプ (360W)	3	1	200	0.64
	3	2	100	0.65
	3	4	50	0.65
	3	4	100	1.19

を算出した。また、HbV分散液のHb濃度を1, 2, 4 g/dLと変化させた場合についても比較検討した。

2) 脱酸素の工程

酸素化したヘモグロビン溶液(10 g/dL, ピリドキサル 5'リン酸を等モル添加) 300 mLをローラーポンプによりホローファイバー型人工肺(Capiox II 08, テルモ)に1.0 L/minに循環させ、同時に窒素を1.2 L/minで通気した。Hb溶液の酸素分圧をクラーク式針型酸素電極 (PO₂-100, Intermedical 社)によってモニターした。

C. 結果および考察

1) 脱一酸化炭素の工程

従来使用のハロゲンランプ(500W)は赤外線放射が大きいため発熱と低エネルギー効率が問題であった。そこで中心波長600nmの温白色光の高圧ナトリウムランプ(360W)を用いて配位子交換効率を検討した(図2)。高圧ナトリウムランプの方が消費電力

が小さいにも拘わらず、ハロゲンランプを用いた場合よりも配位子交換率がやや高く、光を照射して僅か3分で配位子交換率が97%にまで達した。また、ハロゲンランプ表面の温度が150℃にまで上昇していたが、高圧ナトリウムランプ表面は30℃でほぼ一定であった。

次にHb濃度と配位子交換効速度の相関を検討した(表2)。高圧ナトリウムランプを用いた場合、Hb溶液中のHb総量が一定の場合に、Hb濃度を上げて溶液量を減らしても配位子交換速度はほぼ等しく、Hb総量を二倍にすると配位子交換速度も二倍に増大し、ハロゲンランプを用いた場合に比較して効率が3-4倍高いことが明らかとなった。これは高圧ナトリウムランプの波長領域がヘモグロビンのQ帯(500-600nm)とほぼ重なっており、光解離が効率的に進行した為と考えられる。またハロゲンランプの場合、高濃度で配位子交換を行うと熱により水分が蒸発して固化するため希釈する必要があったが、高圧ナトリウムランプでは高濃度での配位子交換が可能となり、処理量の増大が可能となった。

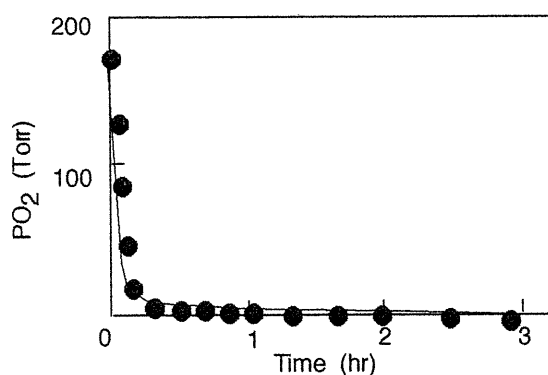
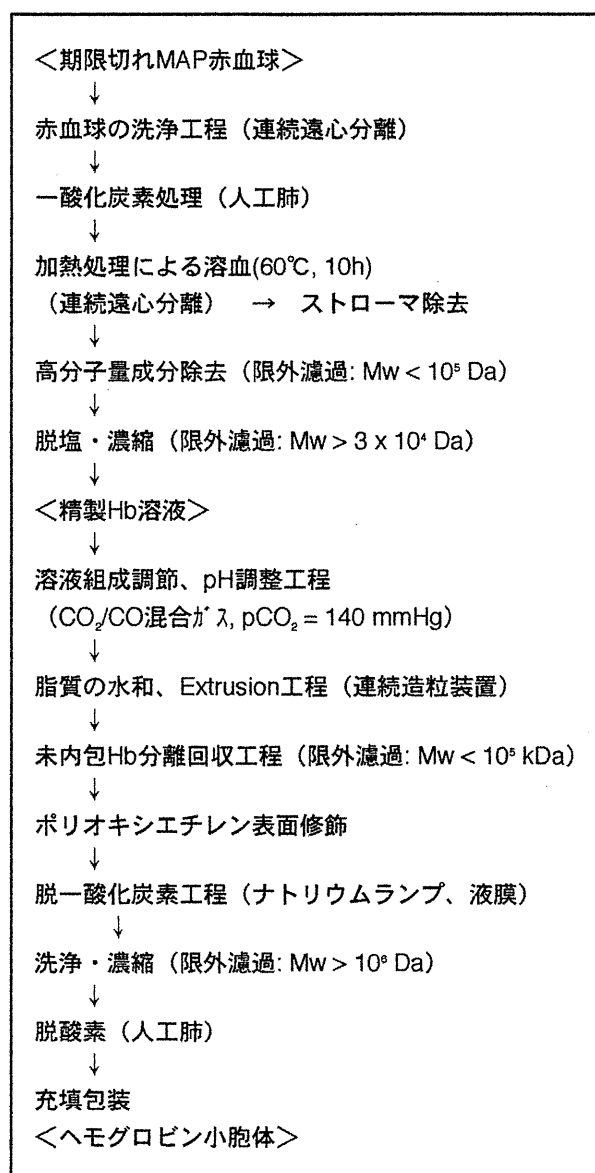


図3 人工肺を用いたヘモグロビン溶液の脱酸素化

2) 脱酸素の工程

ヘム鉄二価状態のヘモグロビンの自動酸化速度は、溶液の酸素分圧に依存し、特に酸素飽和度が50%になるような酸素分圧での酸化速度が最も速く、酸素が全くない状態では酸化しない。従って、ヘモグロビン小胞体の長期棚置き保存には、溶液内の酸素を除去してヘモグロビンの酸化劣化を抑制して酸素結合能を維持させることが必要となる。

そこで、脱酸素の工程を気液界面の物質移動を促



スキーム1. ヘモグロビン小胞体の連続製造プロセス

進させるために人工肺の利用を検討した。ヘモグロビン溶液の酸素分圧は操作開始後、急激に低下し、30分で10 Torr以下に、また2時間で2 Torr以下にまで低下した。窒素を直接通気する場合と違って、人工肺では溶液の泡立ちが無いことも利点となり、今後更に流速や膜面積などの条件を検討することで効率化が計れるものと考えられる。

3)ヘモグロビン小胞体調製の連続工程の設計

これまでに確立したヘモグロビン小胞体の連続調製工程をスキーム1に示した。ヘモグロビンの精製工程において、連続遠心分離機やタンジェンシャル

フロー式の限外濾過膜装置を用いる。また、ヘモグロビン小胞体の粒径制御にはカセット式フィルターを利用し送液ポンプで連続化を可能とした造粒装置(MPW-II)を用いる。脱一酸化炭素の工程は大型蒸発装置と光源としてナトリウムランプを用いる。最終的な脱酸素反応には、人工肺のような膜システムを利用する。

D. 結論

ヘモグロビン小胞体の脱一酸化炭素の工程にはナトリウムランプを用いることで発熱の影響を抑え、希釈することなく効率よく行えた。また、脱酸素には人工肺を用いることで大量処理が可能となった。ヘモグロビン精製から小胞体調製まで一連の操作をスケールアップして連続化できる見通しができた。今後は産業側の協力も得て、量産規模のプラント設計を実施する予定である。

3. 細胞型ヘモグロビン小胞体表面のポリオキシエチレン修飾法の検討

A. 研究目的

細胞型ヘモグロビン（ヘモグロビン小胞体）の血中滞留時間の延長および分散安定度の向上を目的として、小胞体の表面にポリオキシエチレン脂質（POE脂質）を後導入する方法について、これを物理化学的な手法あるいは臨界分子量を利用する独自開発の方法により定量解析し、最適な導入条件と脂質組成を選定する。

B. 研究方法

1) 試料

POE脂質：POE5000-DPPE, POE5000-DSPE, POE200-DSPE（日油），リン脂質：Presome PPG-1（DPPC/Cholesterol/DPPG = 5/5/1 by mol：日本精化），DSPC/Cholesterol/DSPG = 5/5/1 by mol：日本精化，POE（日油）：Mw = 650, 1040, 1530, 2080, 2500, 3110, 3300, 5000, 5800, 9600, 11340, 22070

2) POE脂質の臨界ミセル濃度

所定濃度のPOE脂質分散液 2 mL に6 μ Lのジフェニルヘキサトリエン（DPH）のTHF溶液を添加し、

表3 小胞体へのPOE脂質の後導入パラメータ

POE-lipid	membrane	k_{on} ($s^{-1}M^{-1}$)	ΔH (kcal/mol)	incorporation ratio1) (%)	K ($10^4 M^{-1}$)
POE-DPPE	DPPC	67.4	17	72	1.8
	DSPC	68.0	21	83	2.7
POE-DSPE	DPPC	5.5	13	74	2.0
	DSPC	5.5	25	93	7.1

1) [mixed lipid]=0.57wt%

37℃で3時間静置後蛍光測定 ($\lambda_{ex} = 357 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 430 \text{ nm}$) を行った。また、0.83 mMのPOE脂質分散液にDPHを導入し、これを135倍希釈して経時的に蛍光を測定することによりPOE脂質の解離挙動を解析した。

3) POE脂質の小胞体導入

所定濃度の小胞体分散液 1.35 mLにPOE脂質分散液 (0.83 mM, 10 μ L) を滴下し、等温滴定型微小熱量分析により導入速度 k_{on} と ΔH を37℃にて測定。

4) POE脂質小胞体導入率の測定

POE脂質導入小胞体分散液を超遠心分離 (10⁵ g, 30 min, 37℃) にて沈澱させ、その凍結乾燥粉末を重クロロホルムに溶解、¹H-NMRのPOE鎖メチレンとDPPCコリンメチルの積分比から導入率を算出。

5) POE添加による小胞体凝集の臨界分子量測定

0.08 wt%のPOE脂質導入小胞体に分子量の異なるPOEを3 wt%になるように滴下し、濁度 (600 nmの吸光度) が急激に増大するPOEの分子量を臨界分子量とした。

C. 研究結果および考察

1) POE脂質の臨界ミセル濃度および解離挙動

POE-DPPEとPOE-DSPE の臨界ミセル濃度は各々70 μ M、9 μ Mであり、通常のリン脂質の臨界ミセル濃度 10⁻¹⁰Mと比較して極めて大きい。後導入時の水相POE脂質濃度は最大でも6 μ Mであるので、POE脂質は殆どモノマーに解離しているものと思われる。ミセルからモノマーへの解離速度は、POE-DSPEで

5.0×10³ s⁻¹であり、ミセルの半減期は 140秒、POE-DPPEでは1秒以内と推定されるので、小胞体へのPOE脂質導入は解離したPOE脂質によって行われる。

2) POE脂質の小胞体への導入速度

POE脂質の導入速度定数および導入のエンタルピー変化 ΔH を表3に示す。前年度は擬一次過程で解析したが、詳細な検討により導入速度式はPOE脂質と小胞体濃度の2次式として成立することが明らかとなった。導入速度は小胞体を構成する脂質のアシル鎖長には依存しないが、POE脂質のアシル鎖長に依存し、POE-DSPEはPOE-DPPEよりも12倍導入し難い。他方、 ΔH はむしろ小胞体構成脂質のアシル鎖長の影響を大きく受け、鎖長の長い系の方がPOE脂質は安定導入される。

3) POE脂質導入の平衡状態と解離挙動

POE脂質の小胞体導入および平衡状態を図4、数値は表3にまとめた。POE-DPPEの系の方がPOE-DSPE系よりも圧倒的に速く導入されており、2) の結果を支持している。また、導入率から求めた平衡定数は DPPC/POE-DPPE < DPPC/POE-DSPE < DSPC/POE-DPPE < DSPC/POE-DSPEの順に大きくなっており、アシル鎖長が長い系の方が大きい。

解離挙動を図5に示すが、POE-DPPE系の方がPOE-DSPE系よりも解離し易く、DSPE/POE-DSPCの系が最も解離し難い。POE-DPPE系は導入し易いが、希釈されると直ぐ抜けることを考慮するとヘモグロビン小胞体の修飾剤としては不適當と思われる。DSPC/POE-DSPEでは後導入に時間が掛かりすぎ、

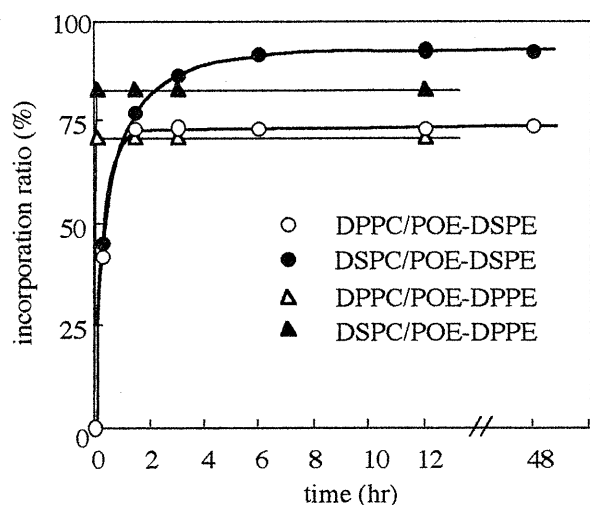


図4 リン脂質小胞体へのPOE脂質導入過程と平衡状態. 37°C, POE5000-DSPE or DPPE.

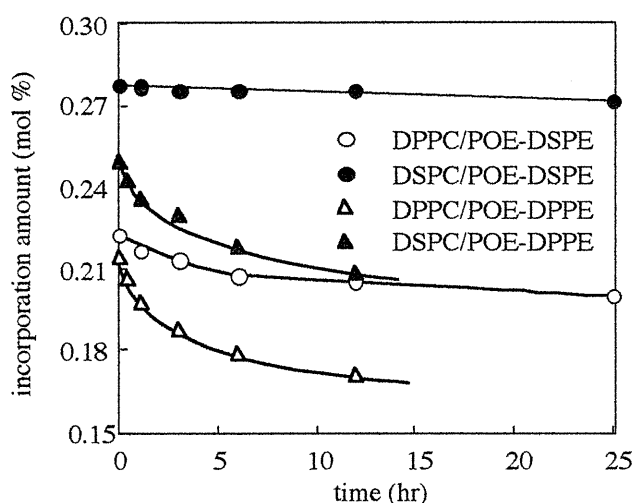


図5 希釈による小胞体からの導入POE脂質の解離挙動. 37°C, POE5000-DSPE or DPPE.

DSPC系では小胞体造粒も困難であるので、表面修飾に最適な組合せとして、DPPC/POE-DSPE系が特定された。平衡時の導入率は、小胞体の濃度を増大させれば高くなる（[Lipid] = 1.5 wt%、導入率89%）ので改善できる。

4) 臨界分子量によるPOE修飾小胞体の解析

POE修飾小胞体とPOE臨界分子量（ M_c ）の関係（図6）では、POE導入量の増大と共に M_c が増大している。これはPOE修飾により小胞体の凝集が起こり難くなっていることを示している。 M_c からもPOE-DPPEよりもPOE-DSPEの方が導入されに難い

こと、POE-DSPEの方がPOE-DPPEよりも小胞体から抜け難いことが確認できた。図7はPOE5000-DSPEとPOE2000-DSPEの導入量と M_c の関係であるが、POE5000-DSPEの方が低導入量(0.2mol%)で高い凝集抑制効果を示すことが明らかとなった。従って、POEは平均分子量5000が適しているものと判断された。

D. 結論

ヘモグロビン小胞体(DPPC系)の表面修飾剤としてPOE5000-DSPEが適していることが定量的に示された。POE脂質の後導入において、導入速度、導入率を小胞体濃度の増大により向上できることが明らか

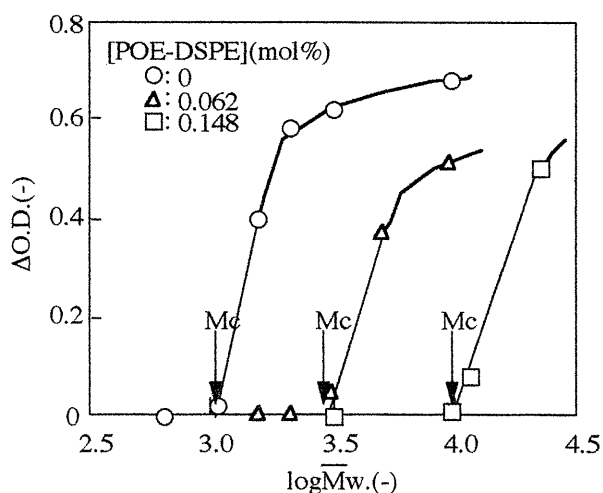


図6 POE添加によるPOE脂質導入小胞体の凝集挙動と臨界分子量. 37°C, DPPC/Cholesterol/DPPG

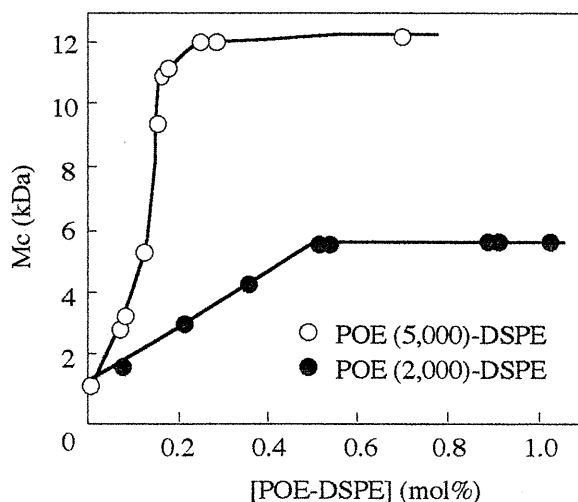


図7 POE脂質導入小胞体の導入率と臨界分子量の関係. 37°C, DPPC/Cholesterol/DPPG

になり、今後の導入技術改良の指針となる知見が得られた。小胞体の凝集抑制効果はPOE5000-DSPEを0.2mol%導入することで十分に発揮される。

4. メトヘモグロビンの新しい還元系の構築

A. 研究目的

鉄二価のヘモグロ빈は自動酸化して鉄三価のメトヘモグロ빈(metHb)となり酸素結合能を失う。このmetHbを還元するために、これまでにチオール類などの還元剤を添加する方法を検討してきた。ここでは、各種ヘム蛋白質が光還元される機構を利用して、メト化した細胞型ヘモグロ빈小胞体の酸素結合能を還元させる方法の確立を目的としている。今回は先ずヘモグロ빈溶液で検討した。

B. 研究方法

HbCOにフェリシアン化カリウムを作用させた後、イオン交換樹脂(Mixed bed resin, Biorad)により過剰分や還元されたフェロシアン化カリウムを除去し、メト化率99.8%のメトヘモグロ빈(metHb)を得た。

metHb溶液(10 μ M, 150mMのNaClを含む10mMリン酸緩衝液, pH 7.4)を石英セルに入れ、高圧水銀灯(250 W)とcut-offフィルタ(UV-360)を組み合わせ、照射波長を365nmを中心とする光を照射し、紫外可視吸光スペクトルから還元反応を追跡した。溶存気体の影響(CO, Ar, O₂)、多価アルコール添加効果(グリセロールおよびマンニトール 100mM)を検討した。

C. 結果および考察

アルゴンおよび酸素雰囲気では還元は進行しないが、CO雰囲気では1時間で60%還元が進行した。CO雰囲気では、ヘムが還元された後にCOが直ちに結合することで、逆電子移動が抑制されていると考えられる。CO雰囲気下、多価アルコールの添加効果(グリセロール、マンニトール)を検討したところ、両系とも約30分で還元率は100%に達した。配位ヒスチジンがヘム鉄三価イオンに電子を供与する説が報告されているが、電子移動のメカニズムは未だ

明らかでは無い。多価アルコール添加系では、これがラジカル捕捉剤となって結果的にヘモグロ빈還元が促進されたと考えられる。

今後は、還元機構の解明とアルコール類およびその他の添加効果の検討(分子サイズ、酸化還元電位との関係)、一酸化炭素が無い条件での光還元の実現、光還元後のヘモグロ빈の機能と構造の評価、更にヘモグロ빈小胞体への応用を検討する。

D. 結論

メトヘモグロ빈が一酸化炭素雰囲気下、光照射によって還元される現象を見出した。また、この反応は多価アルコールの添加で促進された。光還元法はメトヘモグロ빈小胞体の酸素運搬能を還元させることに利用できる可能性がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

Komatsu T, Hamamatsu K, Takeoka S, Nishide H, and Tsuchida E. Human serum albumin bound synthetic heme as an oxygen carrier: determination of equilibrium constants of heme binding to host albumin. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 1998;26: 519-528.

Komatsu T, Hamamatsu K, Wu J, and Tsuchida E. Physicochemical properties and O₂-coordination structure of human serum albumin incorporating tetrakis(o-pivalamido)phenylporphyrinatoiron (II) derivatives. *Bioconjugate Chem* 1999;10:82-86.

小松晃之, 浜松和芳, 松川泰子, 呉健, 土田英俊. リコンビナントアルブミン-ヘム複合体の物性と酸素結合能. *人工血液* 1998;6:110-114.

朴晟翼, 濱崎将臣, 古林智一, 武岡真司, 西出宏之, 土田英俊. 炭酸ガスによりpHを制御したヘモグロ빈小胞体のヘモグロ빈酸化挙動. *人工血液* 1998;6:42-45.

Sakai H, Tsai AG, Hara H, Tsuchida E, Johnson PC, and Intaglietta M. Non-invasive observation of resistance arteries and capacitance vessels during severe hemodilution and resuscitation from hemorrhagic shock in conscious hamster model. *Am J Physiol* 1999;276 (Heart Circ Physiol 45):H563-H571.

Sakai H, Tsai AG, Rohlfes RJ, Hara H, Takeoka S, Tsuchida E, and Intaglietta M. Microvascular responses to hemodilution with Hb-vesicles as red cell substitutes:

Influences of O₂ affinity. *Am J Physiol* 1999;276 (Heart Circ. Physiol. 45). H553-H562.

Sakai H, Tsai AG, Kerger H, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Subcutaneous microvascular responses to hemodil consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J Biomed Materials Res* 1998;40:66-78.

Park SI, Kose T, Hamasaki M, Takeoka S, Nishide H, and Tsuchida E. Effects of the pH-controlled hemoglobin vesicles by CO₂ gas. *Artif Cells Blood Substitues Immobilization Biotechnol* 1998;26:497-506.

Kawai N, Ohkawa H, Maejima H, Takeoka S, Nishide H, and Tsuchida E. Oxygen releasing from cellular Hb" *Artif Cells Blood Substitues Immobilization Biotechnol* 1998;26:507-518.

Takeoka S, Sou K, Boettcher C, Fhurhop JH, and Tsuchida E. Physical properties and packing states of molecular assemblies on synthetic glycolipid in aqueous dispersions. *J Chem Soc Faraday Trans* 1998;94:2151-2158.

2. 著書、総説

Tsuchida E. Perspectives of blood substitutes, in "Blood Substitutes. Present and Future Perspectives", Ed. E. Tsuchida, Elsevier Science (1998), New York, Chapter 1, pp. 1-14.

Komatsu T, Tsuchida E, and Kobayashi K. Oxygen-transport albumin: A New Hemoprotein Incorporating Lipidhemes as a Red Cell Substitute, in "Blood Substitutes. Present and Future Perspectives", Ed. E. Tsuchida, Elsevier Science (1998), New York, Chapter 24, pp. 315-326.

Takeoka S, Sakai H, Kobayashi K, and Tsuchida E. Evaluation of the oxygen transporting capabilities of hemoglobin vesicles, in "Blood Substitutes. Present and Future Perspectives", Ed. E. Tsuchida, Elsevier Science (1998), New York, Chapter 14, pp. 171-184.

Sakai H, Tsai AG, Tsuchida E, Intaglietta M. Microvascular responses to hemodilution with Hb-vesicles: importance of resistance arteries and mechanisms of vasoconstriction, in "Blood Substitutes. Present and Future Perspectives", Ed. E. Tsuchida, Elsevier Science (1998), New York, Chapter 15, pp. 185-199.

酒井宏水, Marcos Intaglietta, 土田英俊. 微小循環動態の観測と赤血球代替物の評価. *人工血液* 1998;6:76-87.

土田英俊, 酒井宏水. 酸素輸液の開発動向. *医学のあゆみ* 1999;188:677-686.

土田英俊. *人工血液. LiSA 別冊* 1998;5:2-8.

土田英俊. 分子集合を利用した人工赤血球. *Drug Delivery System* 1998;13:333-340.

土田英俊. *人工血液. 「バイオマテリアルと生体-副作用と安全性-」* 中山書店, 1998, pp.230-236.

武岡真司, 土田英俊. 酸素輸液の現状. *組織培養工学* 1998;24:488-492.

3. 学会発表

土田英俊/ 酸素輸液の展開状況 / 第5回日本血液代替物学会年次大会、札幌、1998.9.4-5.

土田英俊 / 新しい酸素輸液の研究展開の現状 / 厚生科学研究 高度先端医療研究事業：人工血液開発研究分野、公開シンポジウム、東京、1999.2.10.

武岡真司、土田英俊 / 人工赤血球開発の現状 -長期保存と棚置きの可能性- / 第25回日本低温医学会総会、旭川、1999.7.24,25.

武岡真司、土田英俊 / 酸素輸液展開の現状 / 日本人工臓器学会セミナー、人工臓器、1998. 7.18,19.

小松晃之、浜松和芳、土田英俊 / アルブミン-ヘムの構造と酸素配位反応 / 第47回高分子学会年次大会、京都、1998.5.

小松晃之、浜松和芳、土田英俊 / アルブミン-ヘム複合体の酸素結合能 / 第5回日本血液代替物学会年次大会、札幌、1998.9.

浜松和芳、小松晃之、土田英俊 / 遺伝子組換えアルブミン-ヘム複合体の構造と酸素結合反応 / 第高分子討論会、名古屋国際会議場、1998.9.

松川泰子、小松晃之、土田英俊 / リコンビナントアルブミン-ヘム複合体の酸素配位反応 / 第76日本化学会春季年会、神奈川大学横浜キャンパス、1999.3.30.

小松晃之、浜松和芳、岡田智行、土田英俊 / 二量化アルブミン-ヘム複合体の構造と酸素配位 / 第76日本化学会春季年会、神奈川大学横浜キャンパス、1999.3.30.

古林祐佳、小松晃之、土田英俊 / 近位塩基を有するテトラフェニルポルフィリン鉄の酸素配位 / 第76日本化学会春季年会、神奈川大学横浜キャンパス、1999.3.30.

J. Wu, T. Komatsu, E. Tsuchida / Human Serum

Albumin Incorporating Synthetic Hemes: Structure, Solution Properties and O₂-Binding Kinetics/4th International Porphyrin Heme Symposium (Yonago), 2-3 Oct. 1998.

J. Wu, T. Komatsu, E. Tsuchida/Dioxygen Carrying Property of Serum Albumin Incorporating Tetraphenylporphyrinatoiron(II) Derivative/217th ACS National Meeting, Anaheim, Anaheim, USA, 21-25 Mar. 1998.

T. Komatsu, E. Tsuchida/Human Serum Albumin-Heme Hybrid as Dioxygen Infusion/217th ACS National Meeting, Anaheim, Anaheim, USA, 21-25 Mar. 1998.

T. Komatsu, S. Takeoka, H. Sakai, E. Tsuchida/Lipidheme Vesicles and Hemoglobin Vesicles as Dioxygen Infusion/217th ACS National Meeting, Anaheim, Anaheim, USA, 21-25 Mar. 1998.

H. Sakai, H. Hara, H. Kerger, A.G. Tsai, S.I. Park, S. Takeoka, H. Nishide, E. Tsuchida, and M. Intaglietta. / Subcutaneous microvascular responses to severe hemodilution with hemoglobin-vesicles as red cell substitutes / The 20th European Conference on Microcirculation, Paris, August 30 - September 2, 1998.

H. Sakai, H. Hara, A.G. Tsai, E. Tsuchida, and M. Intaglietta / Non-invasive observation of resistance arteries (d, 150 μ m) during hemodilution and hemorrhagic shock - resuscitation in conscious hamster model. / The 20th European Conference on Microcirculation, Paris, August 30 - September 2, 1998.

酒井宏水、原弘之、武岡真司、土田英俊、Marcos Intaglietta / 微小循環動態の観測による赤血球代替物評価 / 第5回日本血液代替物学会年次大会、札幌、1998.9.4-5.

武岡真司、大川春樹、湯浅美菜子、酒井宏水、土田英俊 / ヘモグロビン利用の血液代替物の特徴と酸素の輸送動力学 / 第5回日本血液代替物学会年次大会、札幌、1998.9.4-5.

宗慶太郎、油谷賢一、酒井宏水、武岡真司、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体表面へのポリオキシエチレン修飾効果 / 第5回日本血液代替物学会年次大会、札幌、1998.9.4-5.

酒井宏水、油谷賢一、宗慶太郎、武岡真司、土田英俊、Marcos Intaglietta / POE修飾小胞体と微小循環動態 / 第47回 高分子討論会、名古屋国際会議場 1998.9.30-10.2

武岡真司、湯浅美菜子、濱崎将臣、酒井宏水、土田英俊、末松誠、石村巽 / 細胞型、非細胞型酸素輸液

と微小循環挙動 / 第47回 高分子討論会、名古屋国際会議場 1998.9.30 - 10.2.

原弘之、酒井宏水、武岡真司、土田英俊、Marcos Intaglietta / 酸素輸液のMicrocirculation 挙動 / 第47回 高分子討論会、名古屋国際会議場 1998.9.30-10.2

酒井宏水、原弘之、湯浅美菜子、武岡真司、土田英俊、Marcos Intaglietta / 抵抗血管の血流動態(無麻酔非侵襲観測): 出血ショックと酸素輸液投与による血圧亢進 / 第24回 日本微小循環学会総会、日本海運クラブ、1999.2.26,27.

小沼浩人、湯浅美菜子、酒井宏水、武岡真司、Takashi Yonetani、土田英俊 / 分子量の異なるヘモグロビン型酸素輸液の合成と物性精密評価 / 日本化学会春季年会、神奈川大学横浜キャンパス、1999. 3. 29.

原弘之、酒井宏水、武岡真司、Marcos Intaglietta、土田英俊 / ヘモグロビンを用いる酸素輸液の体内微小循環動態評価 / 日本化学会春季年会、神奈川大学横浜キャンパス、1999. 3. 29.

富山賢一、浜崎正臣、宗慶太郎、酒井宏水、武岡真司、Marcos Intaglietta、土田英俊 / ヘモグロビン内包リン脂質小胞体の常温長期保存の可能性 / 日本化学会春季年会、神奈川大学横浜キャンパス、1999. 3. 29.

1. 原料となる感染のない精製ヘモグロビンの製法およびその効果的プロセスの確立
2. セル表面修飾法の確立と血小板、血漿蛋白質との相互作用制御の確立
3. 免疫系への影響の検討

分担研究者	関口定美	北海道赤十字血液センター	所長
研究協力者	池淵研二	北海道赤十字血液センター	副所長
	阿部英樹	北海道赤十字血液センター	研究部
	藤原満博	北海道赤十字血液センター	研究部

研究要旨 人工酸素運搬体の原料となるヒト赤血球由来ヘモグロビン溶液（SFH）の安全性を確保するため、ウイルス除去膜BMMによるパルボウイルスの除去法、メチレンブルーを用いた光不活化法によるVSVの不活化、加熱処理法によるHIV不活化について検討した。平均孔径15 nmのBMM-15でSFHを濾過することにより、 $6.7 \log_{10}$ のパルボウイルス除去が可能であった。SFH中vesicular stomatitis virusは、 $5 \mu\text{M}$ メチレンブルー存在下 5.7 J/cm^2 可視光照射により、 $5.7 \log_{10}$ 不活化された。また、加熱処理前 $6.9 \log_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ だったHIV感染価は、CO存在下 60°C 、12時間の処理で $2.3 \log_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ に低下し、 $4.6 \log_{10}$ の不活化が可能であった。

リポソーム型ヘモグロビンの一つであるNRCを用い、その生体適合性について、血小板との相互作用を検討した。NRCは対照として用いたヘモグロビンAo、 α - α 架橋型ヘモグロビンと同様、トロンビン、コラーゲン及びリストセチン刺激による血小板凝集能には、影響を及ぼさなかった。

免疫系への影響として、好中球の走化能及び抗原提示細胞の抗原提示能をMLRの系を用い、検討を行った。NRCは好中球の走化性を著しく減少させた。一方、ポリオキシエチレン(POE)修飾リポソーム型ヘモグロビンPOE-HbV及びHbV（当研究班早稲田大学製）は走化能に影響を及ぼさなかった。刺激細胞としてPBMCを0.5%NRC存在下にて0-20時間インキュベートさせた範囲内では、抗原提示能に影響は見られなかった。

一連の炎症性反応を抑制するため、リポソーム包埋SODの効果を検討した。空リポソームにより誘導されるTNF- α 産生は、リポソーム内にSODを封入することにより抑制することができた。

1. 原料となる感染性のない精製ヘモグロビンの製法およびその効果的プロセスの確立

A. 研究目的

ヘモグロビン溶液（SFH）の安全性をより高めるためには複数のウイルス不活化法・除去法の導入は必須である。昨年度に引き続き、ウイルス除去膜によるパルボウイルスの除去に加え、メチレンブルー（MB）を用いたウイルス光不活化法を検討した。また、これまで早稲田大学で採用されてきた液状加熱法のウイルス不活化効果について、早稲田大学と共同でHIVを用いバリデーションを行った。

B. 研究方法

ウイルス除去法

赤血球は献血で得た期限切れヒト赤血球製剤を用いた。赤血球を生理的食塩水で洗浄後4倍容の H_2O で溶血し、膜成分を $18,000 \times g$ 、30分遠心後、 $0.22 \mu\text{m}$ フィルターで濾過しSFHを調製した。ヘモグロビン濃度約4%のSFH 50 mLにパルボウイルスB19陽性血漿0.5 mLを添加し、ウイルス除去膜プラノバ35（BMM-35；平均孔径35 nm，濾過面積 0.01 m^2 ，旭化成），プラノバ15（BMM-15；平均孔径15 nm，濾過面積 0.01 m^2 ）にて順次濾過した。ウイルスDNAはnested-double PCR法にて検出し、計算によりウイ