

表1. BMM-15によるSFHからのパルボウイルス除去

	ウイルス量 ( $10^8$ PCR titer)	Hb回収率 (%)	Hbメト化率 (%)
濾過前	6.00 - 8.67	—	6.32 - 8.96
濾過後	-0.33 - 2.00	66.3 - 76.4	6.67 - 10.00

range, n = 6.

ルス量を求めた。ヘモグロビン濃度はシアンメトヘモグロビン法により測定した。

#### MB光不活化法

SFHにvesicular stomatitis virus (VSV)，終濃度5  $\mu$ M MBを添加し，24ウェルプレートに分注し，赤色光を照射した。VSV感染性はVero細胞を用いた細胞変性効果により求めた。

#### 加熱処理法

SFHにHIVを添加し，溶液のCOガス置換を行った。処理前検体を採取後，再度COガス置換し，密閉後60°C，12時間，溶液を攪拌しながら加熱処理を行った。処理前後の検体のHIV感染価をM8166細胞を用いた細胞変性効果により測定した。

### C. 研究結果

濾過前 $10^{6.87}/10 \mu\text{L}$  PCR titerのウイルス粒子数はBMM-15濾過により $10^{0.32}/10 \mu\text{L}$ へと減少し，6-7  $\log_{10}$ の除去が可能であった（表1）。このときのヘモグロビン回収率は66-76%であった。濾過によりヘモグロビンのメト化率は，変化しなかった。

VSVは5.7 J/cm<sup>2</sup>照射により6.5  $\log_{10}$ 不活化され，この時ヘモグロビンのメト化率は1.2%から3.2%に上昇した（表2）。一方，SFHに含まれるSOD活性は86%に低下した。

加熱処理前6.9  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mLだったHIV感染価は，CO存在下60°C，12時間の処理で2.3  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mLに低下し，4.6  $\log_{10}$ の不活化が可能であった。

### D. 考察

パルボウイルスB19は大きさが直径約20 nmであるためBMM-15では効率よく除去することができ，6-7  $\log_{10}$ の除去率が得られた。パルボウイルスはMB光処理や加熱処理では不活化されないため，BMM膜による除去が有効な方法であると考えられる。しかしヘモグロビン回収率がやや低いため，濾過面積の

表2. MBによるSFH中VSVの光不活化

照射量 (J/cm <sup>2</sup> )	VSV不活化率 ( $\log_{10}$ )	Hbメト化率 (%)	SOD活性 (U/mL)
0	—	1.2 $\pm$ 0.4	3.70 $\pm$ 0.04
2.85	4.6 $\pm$ 0.4	ND	ND
5.7	6.5 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.3	3.18 $\pm$ 0.18
11.4	ND	4.9 $\pm$ 1.0	3.11 $\pm$ 0.03

mean  $\pm$  SD, n = 3. ND; not determined.

大きなBMMを用いる，SFHのヘモグロビン濃度を低くする，希釈工程を濾過に組み込むなど，工夫が必要と思われた。

MB光不活化法では，30分間の処理で6  $\log_{10}$ 以上の不活化率が得られ，非常に効果が高いことが分かった。メト化の亢進も低く，SODと同様他の酵素系に及ぼす影響も低いと推測される。

SFHに添加したHIVは，CO存在下60°C，12時間の処理で，4.6  $\log_{10}$ の不活化が可能であった。処理後にも感染性が検出されたが，処理前感染価6.9  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/mLは実験的に作り出されたものであり，現実的にはこのような高力価のHIV陽性SFHは存在しないことから，不活化率4.6  $\log_{10}$ は十分であると考えられる。ただ，予想に反し検出限界以下にまでHIV感染価が低下しなかった理由として，タンパク質濃度が高いこと，酸素を除去したことなどが推測される。

## 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

### A. 研究目的

ポリエチレングリコール修飾リポソーム型ヘモグロビン（NRC）の生体適合性について血小板を用い，凝集能を指標に検討した。

### B. 研究方法

400mL全血由来濃厚血小板（PC）を，Hepes Tyrode's buffer (+PGE1) で2回洗浄後，Hepes Tyrode's buffer (+Mg, Ca)に浮遊させた。血小板を，HbAo， $\alpha$ - $\alpha$ 架橋型Hb，NRC（各1 mM）と37°C，3

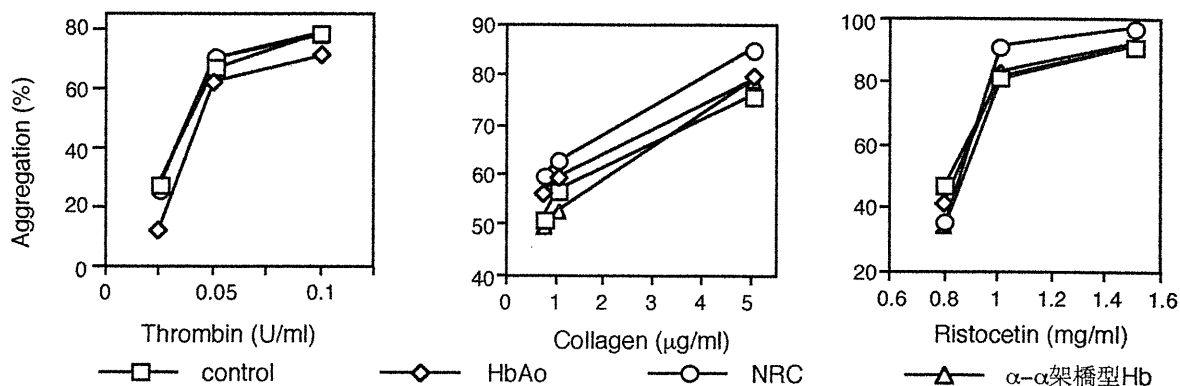


図1. 血小板凝集能に対するHbAo、NRC、 $\alpha$ - $\alpha$ 架橋型Hbの影響.

分間インキュベートした後、トロンピンを添加し、血小板の凝集能を測定した。コラーゲン、リソセチン凝集の場合は血小板をAB型血漿に浮遊させた。

### C. 研究結果

各種アゴニストによる血小板凝集に対し、NRCによる影響はみられなかった (図1)。

### D. 考察

NRCはフリーヘモグロビン、 $\alpha$ - $\alpha$ 架橋型ヘモグロビンと同様、血小板の凝集能に対し影響を及ぼさないことが判った。

## 3. 免疫系への影響の検討

### 3-1. 抗原提示細胞への影響

#### A. 研究目的

NRCが、免疫反応の重要な位置を占める抗原提示細胞の抗原提示能に及ぼす影響について検討した。

#### B. 研究方法

末梢血単核球 (PBMC) の抗原提示能の測定は one-way MLRを用いた。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後、 $\gamma$ 線照射した。その後リンパ球を添加し5日間培養後、 $^3$ H-チミジンを添加し、リンパ球の $^3$ H-チミジン取り込み量を測定した。

#### C. 研究結果

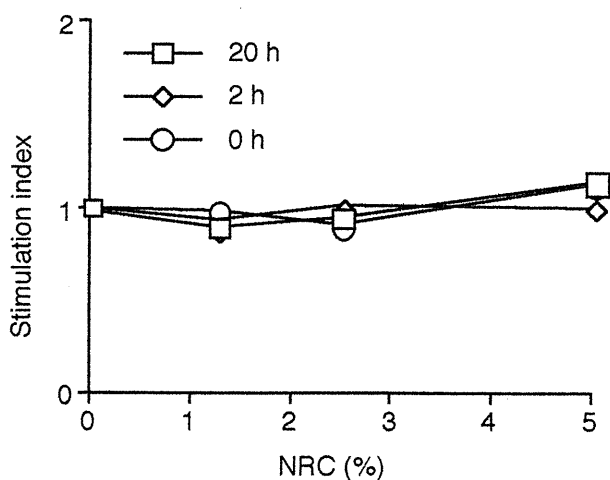


図2. Allogeneic MLRに対するNRCの影響.

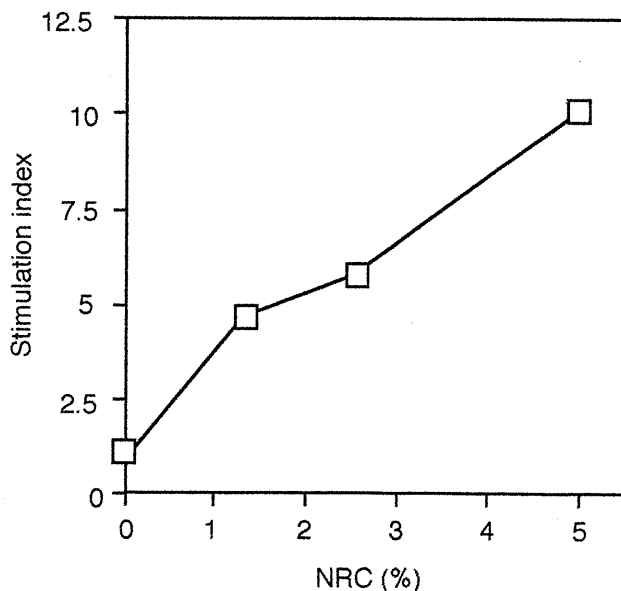


図3. Autologous MLRに対するNRCの影響.

表3. NRCのmitogen効果の有無

	Con A (5 µg/mL)	Con A (5 µg/mL) + NRC (%)			
		0	1.25	2.5	5
Uptake of [ <sup>3</sup> H]thymidine (cpm)	30,372 ± 3,705	171 ± 76	361 ± 45	300 ± 24	344 ± 93

Allogeneic MLRに対するNRCの影響を見たところ、リンパ球の増殖は抗原提示細胞との共培養時間（0-20時間）及びNRC濃度（0-5%）の影響を受けなかった（図2）。次にautologous MLRに対する影響を見たところ、増殖の程度を示す<sup>3</sup>H-チミジンの取り込み量はallogeneic MLRの約1/4と低いものの、NRC濃度依存的にリンパ球の増殖が促進された（図3）。そこでNRC自体がmitogen作用を有するか否か検討した。その結果、強力なmitogen作用を有するコンカナバリンAに比べほとんどバックグラウンドレベルであったことから、NRC自体にはmitogen作用は無いことが判った（表3）。

#### D. 考察

NRCは、autologous MLRにおいて増殖作用を示した。NRC自体はmitogen作用を持たないことから、その機序は不明であるが興味を持たれる現象である。

### 3-2. 好中球の走化能に対する酸素運搬体の影響

#### A. 研究目的

人工酸素運搬体として開発されたリポソーム型ヘモグロビンが、免疫反応に重要な役割を果たす好中球の走化性に及ぼす影響を検討した。

#### B. 研究方法

人工酸素運搬体としてNRC及びliposome（テルモ）、HbV及びPOE-HbV（早稲田大学）を用い、一定ヘモグロビン濃度下にて、比較を行った（liposomeに関しては、NRCに対応する脂質濃度で用いた）。

好中球は健康人のヘパリン採血由来の血液より6%デキストランにより分離し、試験に用いた。人工酸素運搬体（0-1% v/v）と好中球（10<sup>6</sup>/ml）を37℃、5% CO<sub>2</sub>、30minの条件でインキュベーションし、好中球に対する影響を走化性により測定した。

走化性測定にはケモタキシスチャンバー（3 µm-Filter）を用いた。下室には走化性因子（fMLP:1 µ

M）を添加もしくは添加しない培地を使用し、上室にはあらかじめインキュベーションした好中球を10<sup>6</sup>個添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、30min間反応させた。Filter下室側に走化した好中球を固定後ギムザ染色し、顕微鏡下にてその数を計数して評価を行った。

#### C. 研究結果

コントロールでは走化性因子によりスポンテニアスに比較して約1.5倍の細胞が走化するのに対して、HbV及びPOE-HbV（早稲田大学）においては影響は見られなかった。一方、NRC及びliposomes（テルモ）においては濃度依存的に走化性減少傾向が観測された（図4）。

#### D. 考察

早稲田大学のリポソームのPOE修飾による効果の違いは見られず、HbV、POE-HbVとも走化性に対しても影響はないと思われる。

しかし、テルモ社のNRC、liposomesでは、走化性抑制が観測された。これは、今回の検討条件では、ヘモグロビン濃度を固定して比較試験を行ったことから、リポソームの濃度（脂質量など）の違いによる影響が考えられ、更に濃いリポソーム濃度においてもHbV、POE-HbVとも走化性に対する影響は見られていない(N=1)。また、実験系に残存するリポソームと走化性因子の相互作用（吸着など）も考えられるが、インキュベーションの後、リポソーム洗浄した好中球においても同様の結果が観測されたこと及びチャンバー下室に走化性因子とリポソームが存在していても走化性に及ぼす影響は見られないことから、リポソーム-好中球のインキュベーション中に影響するファクターが起因していると思われる。

これにより、好中球走化性に対して人工酸素運搬体の構成するリポソームの違いによる効果の違い示唆され、内包しているヘモグロビンなど他因子の影響を検討しなければいけない。

### 3-3. SODリポソームの炎症性サイトカインの産生に対する効果

#### A. 研究目的

人工酸素運搬体の一つであるNRCを全血と共培養すると、その後のLPS刺激に対する炎症性サイトカインの産生を増強すること、好中球や単球からのスーパーオキシド産生を惹起することを前回示した。

NRCは赤血球と同等のSOD活性を有しているが、更に多くのSODをNRCに付与することにより、このようなスーパーオキシドや炎症性サイトカインの産生を抑制できる可能性が考えられる。そこで、今回、SOD内包リポソームを作成し、そのSODが炎症性サイトカインの産生に与える影響を検討した。

#### B. 研究方法

Bovine SODと脂質（水添ホスファチジルコリ

ン：コレステロール：ミリスチン酸：トコフェロール=7：7：2：0.28, SOD濃度6.2 KU/ml, ホスファチジルコリン濃度276 mg/dl)よりSOD内包リポソームを調整した。

同様に、同じ脂質組成より成るSODを含まない、空リポソーム（ホスファチジルコリン濃度2.5 g/dl)も調整した。

ヘパリン加全血1 mlに空リポソーム（5% (v/v), ホスファチジルコリン終濃度125 mg/dl)あるいは空リポソーム（5% (v/v), ホスファチジルコリン終濃度125 mg/dl)とSODリポソーム（0.2, 0.5, 2.5, 5% (v/v), SOD終濃度12.4, 31, 77.5, 310 KU/ml, ホスファチジルコリン終濃度0.6, 1.5, 6.9, 13.8 mg/dl)を添加し、37℃, 5% CO<sub>2</sub>下で24穴培養プレートを用いて培養した。24時間後、終濃度1 μg/mlになるようにLPSを添加し更に8時間培養した。検体を遠心分離し、上清中のTNF-α濃度をELISA法で測定した。

#### C. 研究結果

Saline添加に比べて空リポソームを5%添加した場合、上清中のTNF-α産生量は約2倍に増加した。空

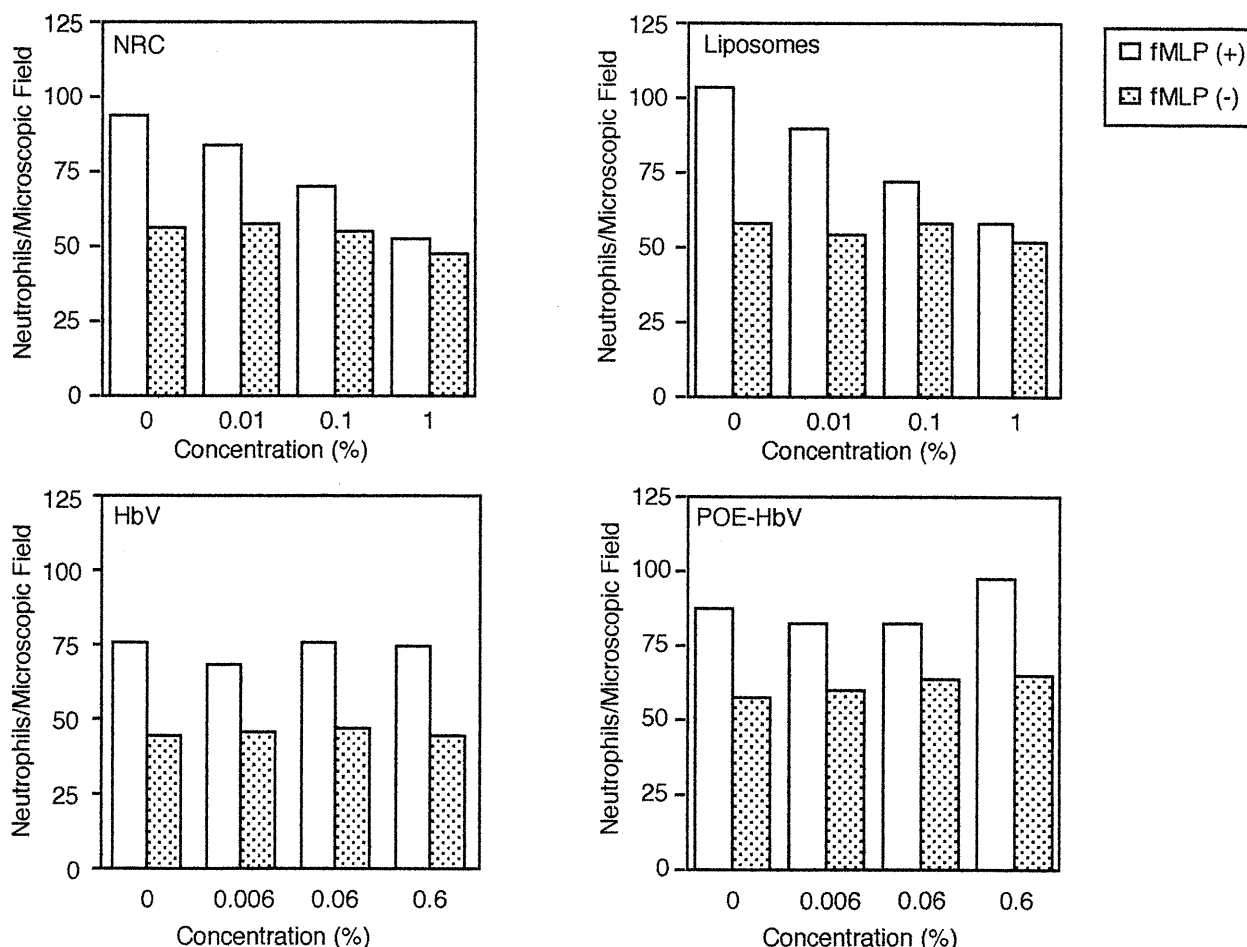


図4. リポソーム型ヘモグロビンが好中球の走化能に及ぼす影響。

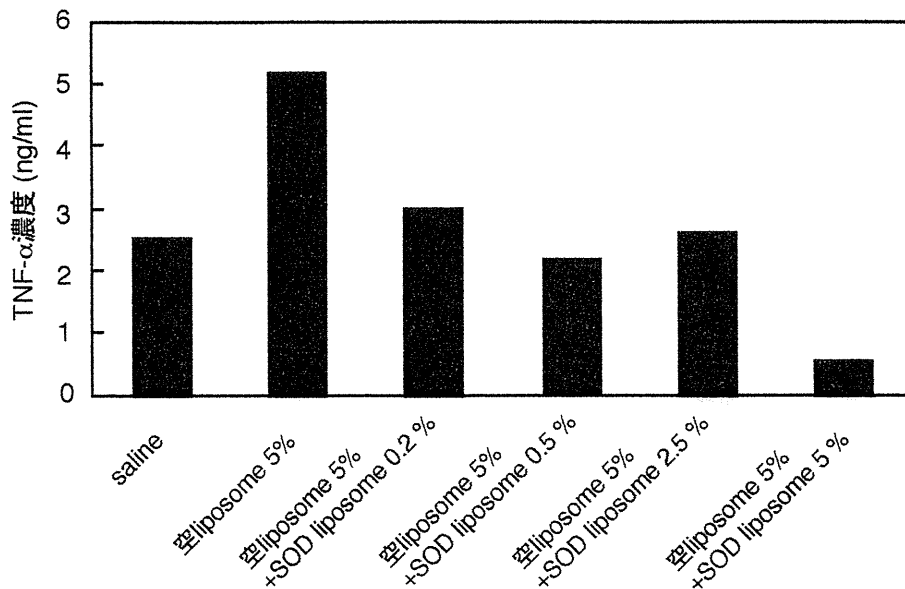


図5. TNF- $\alpha$ 産生におけるSODリポソームの濃度依存的影響。

リポソーム5%に加えSODリポソーム0.2%~2.5%添加するとコントロール (saline添加) レベルまで産生が低下した。さらに、SODリポソーム5%を添加するとTNF- $\alpha$ 産生はコントロール以下まで著明に低下した (図4)。

次に、系全体の脂質濃度を合わせる為に、空リポソーム5%と同時にホスファチジルコリン量が同量の空リポソームとSODリポソームをそれぞれ添加し

た両群について比較したところ、図5に示すようにSODリポソームによりTNF- $\alpha$ の産生が抑制された。

#### D. 考察

スーパーオキシドを含めた活性酸素種が細胞内シグナル伝達系、特にNF- $\kappa$ Bの活性を調節している事が知られている。このNF- $\kappa$ Bの活性化は単球においてはTNF- $\alpha$ の産生に重要である事から、リポソームに内包されたSODはスーパーオキシドをトラップすることにより、TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインの産生を抑制できることが示唆された。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表、著書、総説

Fujihara M, Ikebuchi K, Yamaguchi M, Abe H, Niwa K, and Sekiguchi S. Effects of liposome-encapsulated hemoglobin on phorbol ester-induced superoxide production and expression of costimulatory molecules by monocytes in vitro. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 1998;26:487-495.

Niwa K, Ikebuchi K, Fujihara M, Abe H, Wakamoto S, Ito T, Yamaguchi M, and Sekiguchi S. Inflammatory cytokine production in whole blood modified by liposome-encapsulated hemoglobin. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 1998;26:559-570.

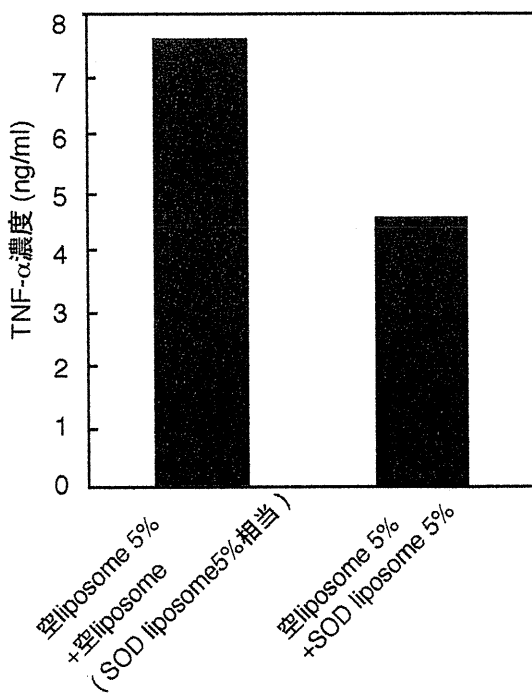


図6. SODリポソームがTNF- $\alpha$ 産生に及ぼす影響。

池淵研二、丹羽光一、藤原満博、阿部英樹、若本志乃舞、伊藤貴俊、山口美樹、関口定美、リポソ

ーム内包型ヘモグロビンによる全血由来炎症性サイトカイン産生の修飾. 人工血液1998;6(1):13-16.

Sekiguchi S. The impact of blood substitutes on the blood program, in "Blood Substitutes. Present and Future Perspectives", Ed. E. Tsuchida, Elsevier Science (1998), New York, Chapter 29, pp. 383-390.

## 2. 学会発表

藤原満博他 / 単球の活性酸素産生能及びコストイミュラトリー分子発現に対するリボソーム型ヘモグロビンの影響 / 第46回日本輸血学会総会 / 日本輸血学会雑誌, 44(2): 234, 1998.

阿部英樹他 / リボソーム型人工酸素運搬体による好中球からのスーパーオキシド産生 / 第46回日本輸血学会総会 / 日本輸血学会雑誌, 44(2): 235, 1998.

池淵研二他 / 全血培養におけるリボソーム型ヘモグロビンによる炎症性サイトカイン産生の検討 / 第46回日本輸血学会総会 / 日本輸血学会雑誌, 44(2): 235, 1998.

関口定美 / 輸血療法により血液事業は変わるか / 第5回日本血液代替物学会年次大会, 札幌, 1998.9.4-5. / 人工血液 1998;6(3):57.

阿部英樹, 池淵研二, 関口定美 / ヘモグロビン溶液のウイルス不活化 / 第5回日本血液代替物学会年次大会, 札幌, 1998. 9.4-5. / 人工血液 1998;6(3):60.

藤原満博, 東寛, 若本志乃舞, 伊藤貴俊, 池淵研二, 武岡真司, 土田英俊, 関口定美 / In vitroにおける人工酸素運搬体 (NRC) の抗原提示能, 好中球走化能, 血小板凝集能への影響 / 第5回日本血液代替物学会年次大会, 札幌, 1998. 9.4-5. / 人工血液 1998;6(3):73.

関口定美 (代: 池淵研二) / 酸素輸液の重要性と医療への応用 / 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.

## 1. アルブミン-ヘム製剤の酸素輸送能評価 2. ヘモグロビン小胞体の細網内皮系に対する影響

分担研究者 小林 紘一 慶應義塾大学医学部外科 教授

**研究要旨** ヒト血清アルブミン(HSA)に4分子のテトラフェニルポルフィリン鉄(II)誘導体(FeP)を包接させたアルブミン-ヘム(rHSA-FeP)製剤について、血液希釈後の出血ショックモデルに対する蘇生液とした投与試験を行い、血液ガスパラメータ、血流動態、組織酸素分圧の測定から、その十分な酸素輸送能を実証した。また、体内酸素錯体半減期は、血流中、および血漿中(in vitro)においてそれぞれ4.1 hr、3.3 hrとなり、生理食塩水中の1.0hrに比較して延長された。

ポリオキシエチレン修飾ヘモグロビン小胞体投与後のRES貪食能を把握することを目的とし、カーボンクリアランス試験により貪食能の推移を検討した。10 ml/kg投与した場合には、貪食能の一過性低下が認められるが、3日後には回復、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無いと考えられた。

### 1. アルブミン-ヘム製剤の酸素輸送能評価

#### A. 研究目的

ヒト血清アルブミン(HSA)に4分子のテトラフェニルポルフィリン鉄(II)誘導体(FeP)を包接させて調製したアルブミン-ヘム(rHSA-FeP)製剤は、生理的条件下(pH 7.4, 37°C)で酸素を可逆的に結合解離できる合成ヘム蛋白質である。本製剤の溶液物性、血液適合性に問題はなく、人工酸素輸液(血液代替物)としての機能を具有することが明らかにされている。本研究では、HSA-FeP製剤の生体内酸素輸送能、酸素錯体半減期を定量的に評価することを目的として、出血ショックラットを用いた脱血交換投与試験を行った。

#### B. 研究方法

##### 1) in vivo 酸素輸送能評価

5wt%HSA-FeP (FeP/HSA: 4) 製剤は既法に従い調製した<sup>1)</sup>。Wistar rat(雄、体重334±19g)をPentobarbital sodium(Nembutal)の腹腔内注射(1mL/kg)により全身麻酔し、背位に固定。右頸静脈からカテーテル(PE-50, 内径0.58mm, 外径0.96mm)を入れ右心房付近まで

挿入した(V-line)。続いて、顎二腹筋を縦方向に切開、同カテーテルを頸動脈に挿入後A-lineを作製した。血圧測定装置(Polygraph system, 日本光電)を動脈側カテーテルに接続、平均体血圧(MAP)を連続的に測定し、ここから採血及び脱血を行った。また、静脈側カテーテルより静脈血採血と試料の注入を行った。

開腹後、骨格筋(顎二腹筋)及び左腎皮質に針型Clark式酸素電極(POE-10N, Intermedical)を挿入、それ

Table 1 Basal values of HSA and HSA-FeP.

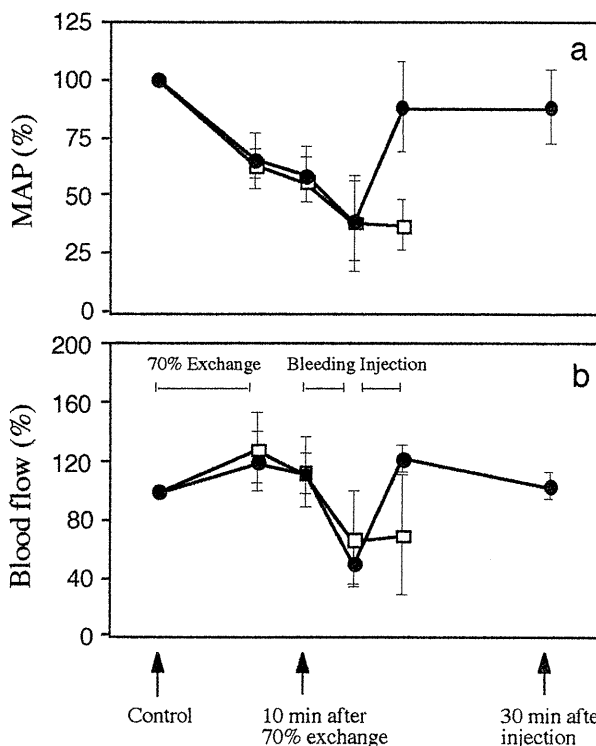
	HSA	HSA-FeP
Hct (%)	50.5±4.7	46.2±5.5
MAP (mmHg)	93±12	106±11
Blood flow (mL/min)	4.9±1.4	5.0±2.1
pH	7.322±0.025	7.343±0.027
BE (mmol/L)	-0.9±2.0	0.9±2.2
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	87.6±15	87.5±3.1
PvO <sub>2</sub> (mmHg)	42.6±7.8	45.8±2.4
PtO <sub>2</sub> (R) (mmHg)	19.8±5.1	18.7±5.8
PtO <sub>2</sub> (M) (mmHg)	22.5±5.2	21.0±5.7

それぞれの組織酸素分圧( $PtO_2$ )を測定した。腹部大動脈にドップラー血流量計(Pulsed Doppler Flow, dimension system, Crystal Biotech社) カフプローブ(2mm径)を装着、大動脈血流量、心拍数を計測し心拍出量の指標とした。

生体中の赤血球の影響を最小限にするため、予め推定循環血液量の70%を5% albumin-cutter (Bayer社)で交換した。さらに40%の脱血を行ない、過度の出血ショックモデルを作成。次に40%の脱血を行い、ショック状態とする。その後脱血量と同量の試料を投与し、HSA-FeP投与群(n=6)、5wt%-HSA投与群(n=6)について、血液ガス分析、血圧、腎皮質・骨格筋酸素分圧の測定を行った。測定値及び計算値はmean±SDで表示し、ANOVAでp値が0.001未満の場合を有意差があると判定した。

## 2) 血中酸素錯体半減期

Wistar rat (♂, 320 g)の頸静脈より推定循環血液量(56mL/kg)の40%を脱血し、同量のHSA-FeP oxy体を投与した。投与0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 hr後(計8回)



**Fig. 1** Changes of (a) MAP and (b) blood flow of abdominal aorta during 70% exchange transfusion with HSA and resuscitation from 40% bloodbleeding with HSA-FeP (●, n=6) or HSA (□, n=6).

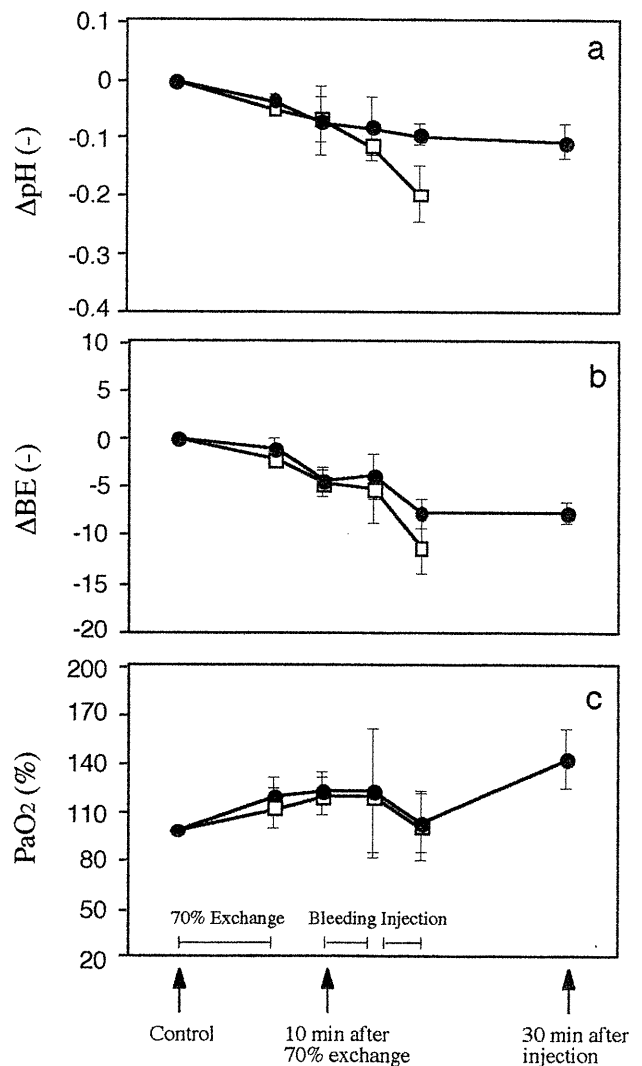
に、A-lineより0.3 mlずつ採血。遠心分離した上澄みに存在するHSA-FeP溶液のFePの吸光度(550 nm)からFePの酸素化率を決定、その経時変化をプロットした。

また、HSA-metFeP ([FeP]=0.5 mM)について、アスコルビン酸5倍モル、または0.1mMを添加した系、血漿中、全血液中における還元反応を、CO体( $\lambda_{max}$ : 539 nm)の吸光度変化から追跡した(37°C)。

## C. 研究結果及び考察

### 1) in vivo 酸素輸送能評価

脱血交換前の初期基準値 (Table 1) について検定を行った結果、95%の範囲で有意差は認められなかつ

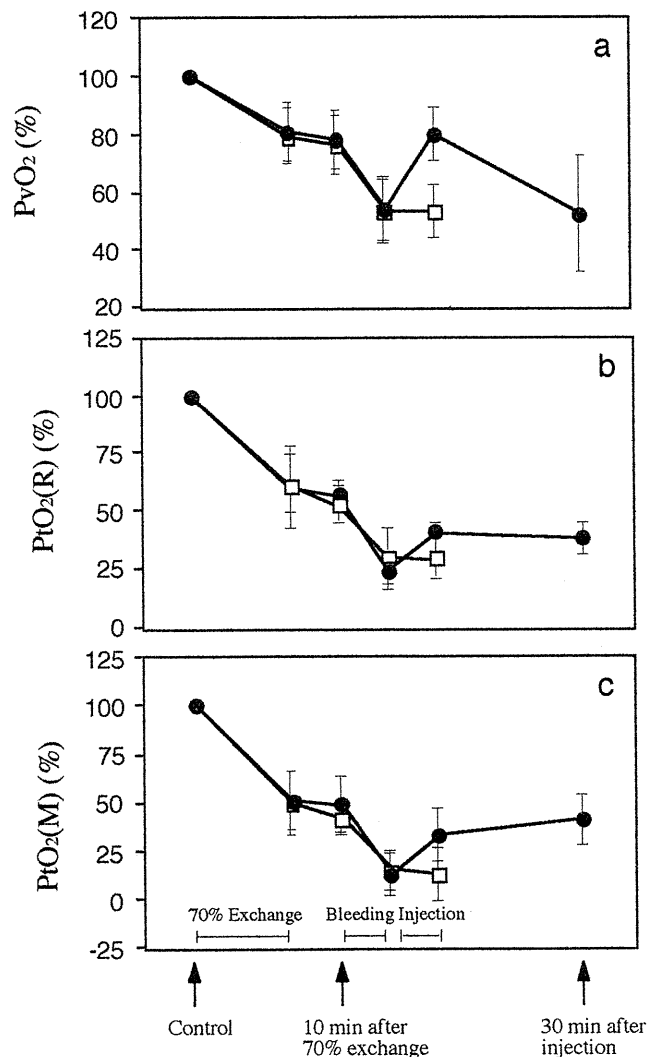


**Fig. 2** Change of (a) pH, (b) BE and (c) PaO<sub>2</sub> during 70% exchange transfusion with HSA and resuscitation from 40% blood bleeding with HSA-FeP (●, n=6) or HSA (□, n=6).



た。40%脱血に伴いHct値は、11%まで減少する。HSA-FeP投与群、HSA投与群について各パラメータの推移を相対値で表示した。

MAPはHSA投与群でほとんど回復しないのに対し、HSA-FeP投与群では基準値の90%まで回復した (Fig. 1)。また、Blood flowはHSA投与では20%の上昇に留まるが、HSA-FeP投与群では脱血前値まで戻った。pHは、HSA投与群で大きな低下を認めるのに対し、HSA-FeP投与群は脱血前に近い値を保った (Fig. 2)。腎皮質酸素分圧( $PtO_2(R)$ )、骨格筋酸素分圧( $PtO_2(M)$ )は、HSA-FeP投与に伴い投与前の約50%まで上昇した (Fig. 3)。これらの結果からHSA-FePの *in vivo* 酸素輸送が実証できた。血流量と心拍数の回復が100%であるにもかかわらず、 $PtO_2(R)$ の回復率は



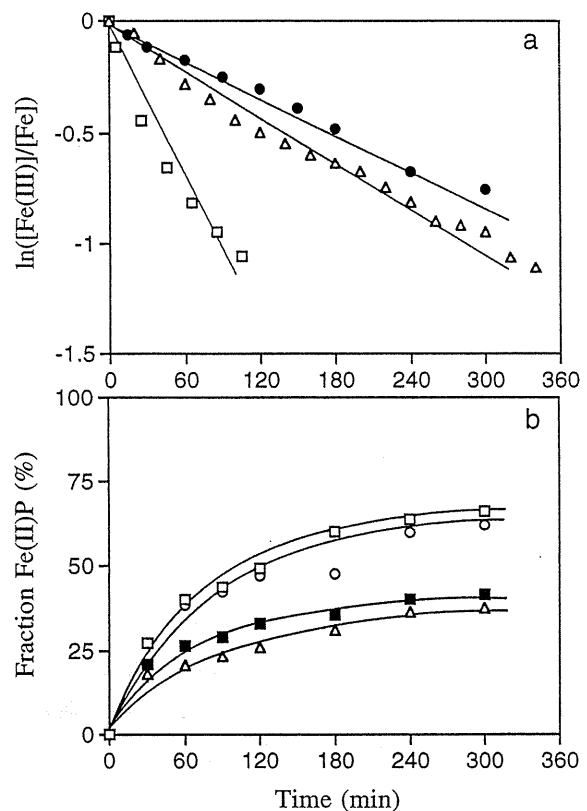
**Fig. 3** Change of (a)  $PvO_2$ , (b)  $PtO_2(R)$  and (c)  $PtO_2(M)$  during 70% exchange transfusion with HSA and resuscitation from 40% blood bleeding with HSA-FeP (●, n=6) or HSA (□, n=6).

50%に留まった。これは高酸素輸送能のHSA-FeP(8)の投与により改善できると考えている。

また、HSA投与群では30分以内に全例が死亡したのに対し、HSA-FeP投与群では全例が生存し、HSA-FeP投与による救命効果が明らかとなった。また、試験終了後については12時間の生存も確認できた。

## 2) 血中酸素錯体半減期

血流中、および血漿中 (*in vitro*) におけるHSA-FePの $\tau_{1/2}(O_2)$ は、それぞれ4.1 hr、3.3 hrで、生理食塩水中の1.0hrに比較して長い (Fig. 4a)。これは、血漿中に存在するAsA (0.1 mM) がHSA-metFePを還元するため、見かけ上半減期が伸びたものと考えられる。そこで、HSA-metFePの還元反応について検討した (Fig. 4b)。HSA-metFePに5倍モル当量のAsAを加えた場合、5 hrで66%まで還元が進行した。100%



**Fig. 4** (a) Autooxidation of  $O_2$ -coordinated species of FeP incorporated into HSA at 37 °C; □: in saline solution (pH 7.4,  $Poz$ : 150 mmHg), △: in plasma ( $Poz$ : 150mmHg), ●: *in vivo*. (b) Reduction of HSA-Fe(III)P (0.5mM) by several systems under anaerobic condition at 37 °C; ○: in whole blood (Hct: 27%), △: in plasma, □: with AsA (2.5 mM), ■: with AsA (0.1 mM).

反応が進まないのは、一度メト化するとイミダゾール基が中心鉄に再配位できないFePが存在するためと考えられる。一方、血漿中では38%の還元に残った。血中AsA濃度から推測して、AsAによる還元が示唆される。これに対し、全血液を添加した場合は、63%まで還元が進行した。酸化型AsA (デヒドロAsA (DHA)) が赤血球により再還元されるため、反応が完全に進むものと考えられる。また、この系が二次反応( $k: 10.9 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ )であることも、AsAによる還元を裏付けている。

#### D. 結論

HSA-FeP製剤の生体内酸素輸送を定量し、本物質が完全合成型の酸素輸液として機能することを実証できた。現在、FeP結合数8のHSA-FeP製剤、リコンビナントアルブミンを用いたrHSA-FeP製剤の酸素輸送効果、代謝経路の解明について検討している。

#### 参考文献

1) T. Komatsu, K. Hamamatsu, J. Wu, E. Tsuchida, "Physicochemical Properties and  $\text{O}_2$ -Coordination Structure of Human Serum Albumin Incorporating Tetrakis(o-pivalamido)phenylporphyratoiron(II) Derivatives", *Bioconjugate Chem.*, **10**, 82-86 (1999)

### 2. ヘモグロビン小胞体の細網内皮系に対する影響

#### A. 研究目的

ヘモグロビン小胞体は最終的に細網内皮系(RES)にて捕捉代謝される。この際RESがHb小胞体で飽和されてしまうと、生体防御としての異物貪食機能に影響があると指摘されている。そこで、Hb小胞体投与後のRES貪食能を把握することを目的とし、カーボンクリアランス試験を実施する。

#### B. 研究方法

ポリオキシエチレン修飾したHb小胞体分散液は、既報<sup>1)</sup>に従い合成した。生理食塩水に分散させてHb濃度は10g/dLとした。Wistar系ラット(雄、体重約200g)を用い、エーテル麻酔下、尾静脈よりHb小胞

体(10 ml/kg, 15匹)、および生理食塩水(40 ml/kg, 15匹)を投与した。各群を4グループに分け、投与後、1, 3, 7, 14日後にネンプタール麻酔下挿管し(PE-50)、Carbon particle (Fount India Ink, Pelikan製 16 mg/mL in 生理食塩水)を10 mL/kg投与し、4, 10, 20分後に採血して50  $\mu\text{L}$ を測定液(0.1% 炭酸ナトリウム溶液) 5mLに加え、675 nmの吸光度を測定した。Phagocyte Index (K値)は、計算式 ( $K = 1/(t_2 - t_1) \times \log(C_1/C_2)$ ;  $C_1, C_2$ は、carbon溶液投与後  $t_1, t_2$ 分後の血中carbon濃度)より算出した。測定後、過剰量ネンプタール投与により犠牲死させて臓器を摘出し、脾臓重量を測定、各臓器をホルマリン固定し、病理検査を行った。

#### C. 研究結果および考察

Phagocyte Index (K)は、HbV投与1日後30%程度低下するが、3日後には約2倍に亢進した(Fig. 1)。その後2週間後にはコントロール群と同等に戻った。

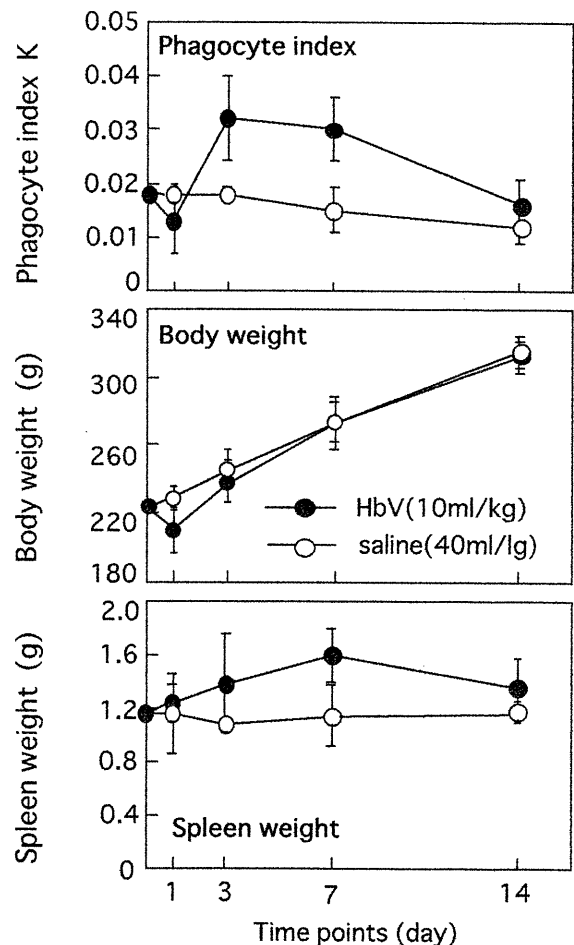


Fig. 4 Influence of HbV injection (10 mL/kg) on phagocyte index, body weight, and spleen weight.

また体重は、投与翌日に減少するが、その後は順調に増え続けた。脾臓重量は、1週間後に約30%増大するが、2週間後には低下傾向にあった。

投与1日目に食食能が低下した。これは、生体防御の初期反応を抑制する可能性があり注目する必要がある。しかしこの食食能の低下は一過性であった。3日以降の食食能亢進は投与に伴う網内系の機能亢進によると思われる。投与されたヘモグロビン小胞体が順次代謝されるために重要な過程を形成しているものと考えられた。また、2週間後には食食能は正常値に復し脾臓重量も正常化したので一過性の亢進状態であったと考えられた。今後、摘出臓器の病理検査、および投与量を増大させた場合についても詳細を検討する予定である。

#### D. 結論

ポリオキシエチレン修飾ヘモグロビン小胞体分散液(Hb濃度10g/dL)を10ml/kg投与した場合は、食食能の一過性低下が認められるが、3日後には回復、亢進し、2週間で正常値へ復する傾向が認められ、細網内皮系において代謝が行われていることが明らかとなった。また、ポリオキシエチレン修飾ヘモグロビン小胞体の投与が、細網内皮系に不可逆な影響を与えるものではないと判断された。

#### 参考文献

1) H. Sakai, S.I. Park, T. Kose, S. Takeoka, Y. Izumi, A. Yoshizu, H. Nishide, K. Kobayashi, and E. Tsuchida. "Surface modification of Hemoglobin vesicles with poly(ethyleneglycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 80% exchange transfusion in anesthetized rats." *Bioconjugate Chem.* **8**, 23-30 (1997).

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表、著書、総説

小林紘一, 田島敦志. 人工酸素運搬体 -その臨床応用を目指して-. 組織培養工学 1998;24:500-503.

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.

Kobayashi K, Tajima A, Yoshizu A, Watanabe M, Komatsu T, Hamamatsu K, Mastukawa Y, Tsuchida E. Exchange Transfusion of Albumin-heme as a Synthetic O<sub>2</sub>-Infusion to Hemorrhagic Shocked Rat. (1999) submitted.

#### 2. 学会発表

小林紘一/Oxygen carrying therapeutics か Replacementか/第5回日本血液代替物学会年次大会、札幌、1998年9月

小林紘一 / 人工酸素運搬体の適応症例 / 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.

吉津晃、田島敦志、泉陽太郎、渡辺真純、堀之内宏久、小林紘一、朴晟翼、濱崎将臣、酒井宏水、武岡真司、西出宏之、土田英俊/出血性ショックモデルにおける人工酸素運搬体-ヘモグロビン小胞体(HbV)-の小腸に対する酸素運搬能の検討/第5回日本血液代替物学会年次大会、札幌、1998年9月

田島敦志、岩丸有史、渡辺真純、堀之内宏久、小林紘一、浜松和芳、小松晃之、土田英俊/脱血ショックモデルを用いた全合成系人工酸素運搬体、アルブミンヘム(HSA-FeP)の生体内における酸素運搬能の検討/第5回日本血液代替物学会年次大会、札幌、1998年9月

## 微小循環動力学から見たヘモグロビン型酸素運搬体による循環機能修飾と分解動態

分担研究者 末松 誠 慶應義塾大学医学部医化学

**研究要旨** 肝臓はヘモグロビン分子を修飾した人工酸素運搬体の主要な代謝臓器である。生体内の主要なヘム分解系であるheme oxygenaseは肝臓に豊富に存在する酵素であるが、人工酸素運搬体の臨床における適応症の一つと考えられるショックのような病態では本酵素がストレス応答の結果誘導され、正常では起こりえないような分解動態と臓器機能修飾を起こす可能性がある。細胞型ヘモグロビン封入体はこのような問題を解決するひとつの方法であることをラット分離灌流肝モデルで証明した。

### A. 研究目的

ヘモグロビン(Hb)はハプトグロビンにより肝臓などに運搬されheme oxygenaseにより分解されて胆汁色素であるbiliverdinと一酸化炭素(CO)として代謝される。我々は最近肝臓で内因性に生成される一酸化炭素(CO)が類洞血管抵抗を生理的レベルに低く保つために必要不可欠であることを報告した(1, 2)。しかしながら肝臓、脾臓を含む門脈循環は言うに及ばず、他臓器におけるCOの生成系であるヘムオキシゲナーゼ(HO)の分布検索は未知のままであった。我々はラットのHO isozymeであるHO-1, HO-2を特異的に認識する単クローン抗体を作成し肝臓でのHb分解動態とCO生成に伴う肝臓の血管機能の修飾について解析した。

### B. 研究方法

ラット肝細胞からRT-PCR法によりHO-1, HO-2のcDNAを作成し、EF-1aをプロモーターとするplasmid vector pEFneoにこれを導入しマウス由来T細胞株WR19Lにtransfectionすることによりstable transformant cellを樹立した。このマイクロソーム分画をマウスに免疫、B細胞を分離しmyeloma細胞とのhybridomaを作成し、HAT選択により抗体産生クローンを選別した。抗体生成クローンをヌードマウスに腹腔内注射し、腹水からラットHO-1に対する抗体GTS-1,HO-2に対する抗体、GTS-2を精製した。また同様の方法で抗ヒトHO-1単クローン抗体の作成も試

みた。

### C. 研究結果

#### 1) 抗ラットHO-1(GTS-1), HO-2(GTS-2)単クローン抗体のcharacterization

得られた抗体によりWR19L-rHO1,WR19L-rHO2を免疫蛍光染色してFACS解析を行ったところそれぞれ特異的な染色所見が確認された。またWR19L-rHO1, WR19L-rHO2のlysateを泳動し、GTS-1,-2を用いて行ったWestern解析により両抗体が交叉反応なく特異的にアイソザイムを認識すること、WR19Lのlysateには反応性を認めないことが確認された。いっぽうHO活性が正常組織で豊富に見られる脾と精巢のlysateでWestern解析を行ったところ前者はHO-1、後者はHO-2が豊富であることが確認された。

#### 2) 肝臓における免疫組織化学的検討

肝臓におけるGTS-1を用いた染色では非実質領域に不定形の細胞が散在し、実質領域の染色性はわずかであった。これに対してGTS-2の染色像では実質細胞に陽性所見が認められた。染色性に小葉間でheterogeneityは認められなかった。GTS-1陽性細胞をさらに詳しく同定する目的で組織マクロファージ(Kupffer cell)のマーカーであるKiM2Rあるいは伊東細胞のマーカーであるdesminに対する単クローン抗体により二重染色を試みたところGTS-1陽性細胞はKupffer cellであることが判明し、伊東細胞には染

色性は認めなかった。またE.coliのendo-toxin O111B4を4 mg/kg腹腔内投与し6時間後に肝臓を同様の免疫染色で解析したところ、HO-2の発現には変化がなかったがHO-1の発現が肝実質細胞で著明に上昇することが示された。したがって内毒素ショックのような病態では投与したHbの代謝動態が正常とは大きく異なることが予想された。

### 3) 肝血管抵抗調節における類洞外CO生成系の重要性

肝血管抵抗調節における類洞外CO生成系の重要性を検討するためにNOやCOを捕捉しその生理活性を消去できるoxyhemoglobin (HbO<sub>2</sub>), NOは消去できるがCOを捕捉できないmethemoglobin (metHb)、またoxyhemoglobinをliposomeでencapsulationした径250nmのvesicle (HbV) のそれぞれを濃度1.5g/dlで灌流肝のperfusion circuitに投与して血管抵抗をモニターした。HbO<sub>2</sub>投与時には直後より50%程度の上昇を示し、HbO<sub>2</sub>の除去により上昇はbaselineまで完全に回復した。一方metHbでは数%程度の上昇しか認められず、HbVの投与では有意な抵抗の上昇は認められなかった。HbO<sub>2</sub>による血管抵抗の上昇はおもに類洞血管の狭小化によるものと考えられた。以上の結果は正常肝ではCOが血管抵抗を正常に低く保つために必要であることを示すわれわれの過去の報告によく一致した。また胆汁中のbilirubin分泌量は観察時間内ではどの群でもわずかな上昇を認めるのみであった。一方内毒素投与群ではHb, metHb投与群で正常の2倍程度反応の増強を認めた。これは毒素によりNO合成酵素の誘導がかり、血管抵抗調節のNO依存性が現われたためと考えられた。

またHb, metHbを投与すると数分以内に胆汁中にbilirubinが数倍に増加した。とくにmetHbでは15分後におけるbilirubin増加量はHbの3-4倍に達した。一方HbV群ではbilirubin増加量はHb群の約30%程度にとどまった。

### D. 考案および結論

肝臓は他の臓器と異なりわずか数cmH<sub>2</sub>Oの低い圧勾配で血流が維持されており、低い血管抵抗が維持されることが血行の恒常性を維持するために不可欠であると考えられるが、そのメカニズムとして生理

的レベルのCOが持続的に生成されることが肝臓の低い血管抵抗を維持するために必要であることが示された。我々はすでにHOの拮抗阻害剤であるzinc protoporphyrin IXが肝類洞血管抵抗を上昇させ、COのsupplementによりこれが抑制されることを報告したが(2)ここで示したHbO<sub>2</sub>による抵抗の上昇とmetHbによる抵抗の上昇の欠如は正常肝ではNOではなくCOが血管拡張因子として必要であることを改めて示したと言える。またリポソームで封入したHbO<sub>2</sub>に昇圧効果が欠如することから、類洞血管内皮のfenestrationを通過し、血管外に漏出したHb分子がCOを捕捉することが昇圧反応を起こすものと考えられた(4)。すなわち、組織染色の結果から血管外空間に位置する肝実質細胞のHO<sub>2</sub>がCO生成源として重要であることが示唆された。内毒素モデルのように血管抵抗の維持にNO, COの双方が必要であると同時にヘム分解のダイナミクスが大きく異なる場合の酸素運搬体設計原理をさらに深く検討する必要がある。またNOはHbのメト化を加速させheme oxygenaseによる分解速度を上昇させる可能性があるため、今後Hb誘導体自体の抗メト化活性付与の戦略を次年度以降の研究課題として考慮する予定である。

### 謝辞

抗体作成に御協力いただいたJT医薬探索研の玉谷卓也博士、Hb derivativesを御供与いただいた早稲田大学理工学部土田英俊教授に深謝致します。

### 参考文献

- 1) Suematsu M, Goda N, Sano T, et al., Carbon monoxide: An endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest* 1995;96:2431-2437.
- 2) Suematsu M, Wakabayashi Y, and Ishimura Y, Gaseous monoxides: A novel regulator of microvascular function in the liver. *Cardiovasc Res* 1996;32:679-686.
- 3) Sano T, Shiomi M, Wakabayashi Y, et al., Endogenous carbon monoxide suppression stimulates bile acid-dependent biliary transport in perfused rat liver. *Am J Physiol (Gastrointest. Liver Physiol)* 1997;272:G1268-G1275.
- 4) Goda N, Suzuki K, Naito M, et al., Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver: Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation.

J Clin Invest 1998;101(3):604-612.

無細胞型ヘモグロビンによる肝微小循環収縮反応の  
増強効果: COおよびNOの役割 / 第5回日本血液代替  
物学会年次大会、札幌、1998.9.4-5.

## E. 研究発表

### 1. 論文発表、著書、総説

Sasayama S, Wakabayashi Y, Sano T, Shinoda Y, Nimura Y, Ishimura Y, and Suematsu M. Nitric oxide suppression reversibly attenuates mitochondrial dysfunction and cholestasis in endotoxemic rat liver. *Hepatology* 1998;27:108-115.

Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T, and Suematsu M. Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver: topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 1998;101:604-612.

Shinoda Y, Suematsu M, Wakabayashi Y, Suzuki T, Goda N, Saito S, Yamaguchi T, and Ishimura Y. Carbon monoxide as a regulator of bile canalicular contractility in cultured rat hepatocytes. *Hepatology* 1998;28:286-295.

末松誠、若林良之、牧野信也、高宮里奈、合田  
巨人、石村巽. ヘムオキシゲナーゼ/一酸化炭素系  
による臓器機能制御機構. *血管* 1998;21:19-25.

末松誠、合田巨人、鈴木恒陽、若林良之、石村巽.  
ヘムオキシゲナーゼ-CO系による臓器機能制御.  
*細胞工学* 1998;17:224-229.

末松誠、鈴木恒陽、牧野信也、若林良之、柏木哲、  
合田巨人、石村巽. 一酸化炭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-.  
*細胞培養工学* 1998;24:19-23.

末松誠、武岡真司、土田英俊、石村巽. 人工酸素運  
搬体と微小循環機能 -ガス状血管拡張物質とヘモ  
グロビンの相互作用-. *医学のあゆみ*  
1998;184:821-825.

末松誠、京兼隆典、若林良之、石村巽. Kupffer  
細胞と肝微小循環 -ヘム代謝と血流調節の接点-.  
*病理と臨床* 1998;16:1089-1094

Suematsu M, Wakabayashi Y, Goda N, Takeoka S, Tsuchida E, and Ishimura Y. The heme oxygenase system in liver microcirculation: a key mechanism for hemoglobin degradation, in "Blood Substitutes. Present and Future Perspectives", Ed. E. Tsuchida, Elsevier Science (1998), New York, Chapter 19, pp. 241-249.

### 2. 学会発表

末松誠、牧野信也、石村巽 / 誘導型heme oxygenase  
による微小循環機能の調節機構 / 第24回 日本微小循  
環学会総会、日本海運クラブ、1999.2.26, 27.

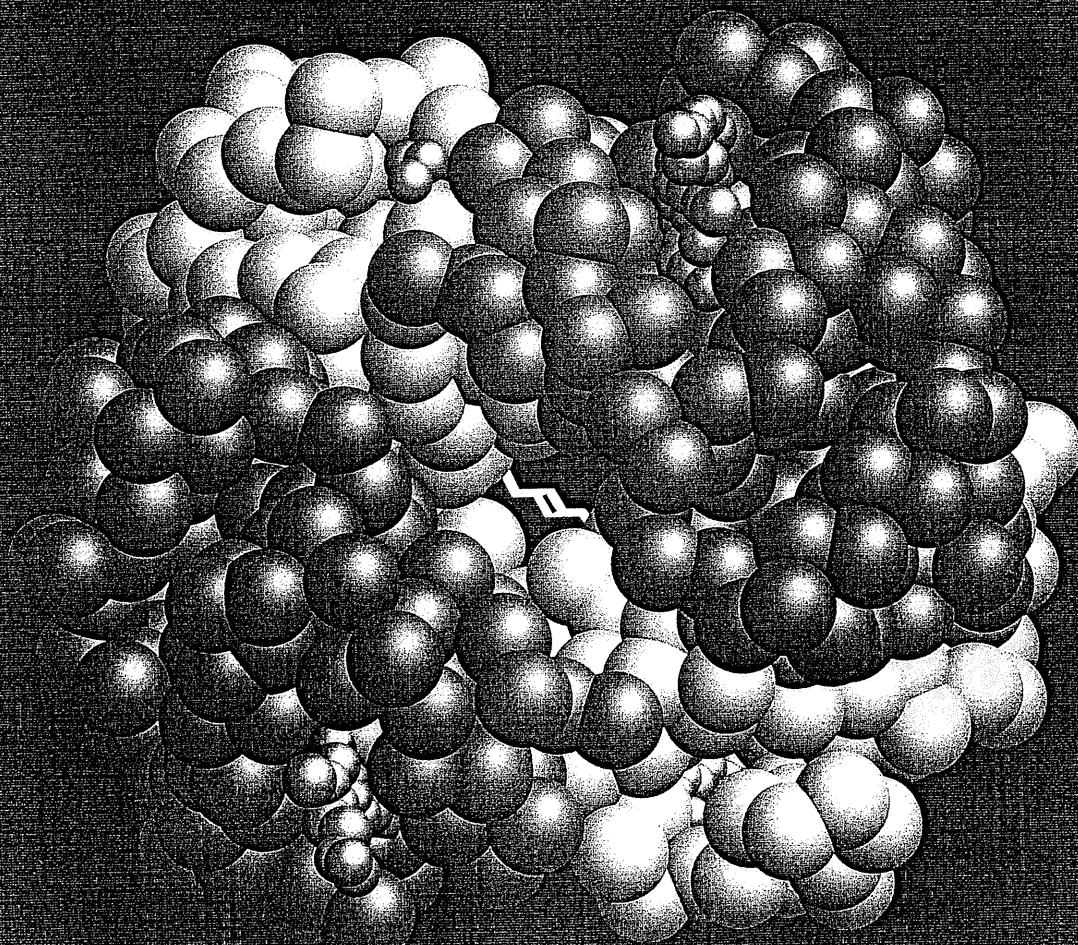
末松誠、武岡真司、京兼隆典、石村巽、土田英俊 /

(付) 研究報文

# BLOOD SUBSTITUTES

*Present and Future Perspectives*

EISHUN TSUCHIDA, Editor



**ELSEVIER**



# **Blood Substitutes Present and Future Perspectives**

edited by

**Eishun Tsuchida**  
Department of Polymer Chemistry  
Waseda University  
Tokyo, Japan



1998

ELSEVIER

Amsterdam – Lausanne – New York – Oxford – Shannon – Singapore – Tokyo

## PREFACE

This book contains the selected papers presented at the seventh International Symposium on Blood Substitutes (7th ISBS) held at Ibuka Memorial Hall, the International Conference Center of Waseda University in Tokyo on 7–10 September 1997. In keeping with the scientific design of the 7th ISBS Symposium, chapters have been carefully selected and organized to showcase the advancements in recent research. Furthermore, the newest developments after 7th ISBS are also included. The first highlight is “The Current Status of Blood Substitutes” including up-to-date clinical results of leading companies which are manufacturing hemoglobin-based or perfluorocarbon-based blood substitutes. The following chapter is the report of a roundtable discussion, “The Target and Assessment of Clinical Tests.” I believe that readers will enjoy this chapter which expresses real targets of the products and issues of clinical trials, which also reflects the high activity in this area. I wish to thank Prof. M. Takaori who edited this report as a chairperson. Before the submission of the chapter, he asked all speakers to check their statements and discussions and revise them more comprehensively for readers. Indeed, the good use of hemoglobin-based materials as hemoglobin formulation is remarkable, but the development of oxygen infusion should be more important.

The following chapters are advanced techniques to evaluate the oxygen carrying efficacy *in vitro* and *in vivo* including microcirculation measurements. “Development in Encapsulated Hemoglobin,” will focus on encapsulated hemoglobins as one of the prime candidates for use in the next generation of hemoglobin-based oxygen carriers. The book covers issues of hemoglobin toxicity and side effects such as vasoconstriction in more detail using carefully designed *in vivo* and *ex vivo* techniques. “Platelet Substitutes” introduce a new subject area to the session lineup at ISBS Symposia, and they are also included in this book. Of course, this book is also a collection of various new types of red cell substitutes such as recombinant hemoglobins, recombinant albumin–lipidheme complex, modified red blood cells, and perfluorochemicals using material science and molecular engineering. I hope this lineup will go a long way to make this book a successful interdisciplinary landmark toward the beginning of the coming century.

The editor wishes to thank all participants for their contributions and offers gratitude to the members of the Organizing Committee, to the Scientific Program Committee, and especially to Drs. H. Nishide and S. Takeoka, the Conference Secretariat. Finally, it is a pleasure to express indebtedness for the staff of Elsevier for their support for publishing this book and their forbearance and unfailing courtesy.

The Editor  
Eishun Tsuchida  
Tokyo, May 1998

## Table of Contents

Chapter 1 Perspectives of Blood Substitutes E. Tsuchida	1
Chapter 2 The Role of Blood Substitutes in Emerging Healthcare Systems R.M. Winslow	15
Chapter 3 Red Cell Substitutes: Evolution of Approaches for Demonstrating Efficacy J.C. Fratantoni	33
Chapter 4 The Clinical Utility of Human Polymerized Hemoglobins as a Blood Substitute Following Acute Trauma and Urgent Surgery S.A. Gould, E.E. Moore, F.A. Moore, J.B. Haenel, J.M. Burch, H. Sehgal, L. Sehgal, R. DeWoskin, G.S. Moss	41
Chapter 5 Recent Progress in the Development of Recombinant Human Hemoglobin (rHb1.1) as an Oxygen Therapeutic J.W. Freytag, R.F. Caspari, R.J. Gorczynski	55
Chapter 6 Overview of the Effects of Diaspirin Crosslinked Hemoglobin (DCLHb) on Oxygenation, Perfusion of the Microcirculation, and Clinical Studies K.E. Burhop, T.H. Schmitz	75
Chapter 7 Update on Perfluorocarbon-Based Oxygen Delivery Systems J.G. Riess, P.E. Keipert	91
Chapter 8 Red Cell Substitutes: Past Problems, Current Dilemmas A.G. Greenburg	103
Chapter 9 Round Table Discussion: "The Target and Assessment of Clinical Tests" M. Takaori	111