

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 —

Carbon monoxide as a regulator of microvascular function

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*

はじめに

近年著者らは生体内で生成されるガス状物質の一つである一酸化炭素 (CO) が正常の肝臓で血管拡張物質として作用することを見出した^{1,2)}。肝臓の毛細血管に相当する類洞はわずかに数cmH₂Oの圧格差で血流が維持されており、その血管抵抗は未知のメカニズムで恒常的に低く保たれていると考えられてきたが、内因性に生成されたCOがそのメカニズムを担っていると思われる。またCOは肝実質細胞の重要な機能の一つである胆汁分泌の調節にも関与することが示唆された³⁾。肝臓はその構成細胞の一つ一つを初代培養して、in vivoで得られた知見をin vitroで検証することが比較的容易である点が特色である。しかし実際には、in vitroでの培養系を用いた実験結果から導ける結論と、異なる細胞同士が社会を形成する臓器や個体レベルで生じる結果との間には大きな隔たりがあることも事実である。本稿では、COによる肝臓機能の制御を明らかにする過程で生じたこのような discrepancyを浮き彫りにしつつ、このガス状物質の生理作用に関する研究の現況と問題点について概説する。

1. 内因性COの生成系

生体内ではCOはそのほとんどがヘム分解の律速酵素であるheme oxygenaseにより生成されるが、酵素の体内分布、COの分子標的についてはまだ十分な知見が得られていないのが現状である。本酵素はヘムのポルフィリン環への酵素添加反応により、 α -メテン炭素での開裂が起こり、同モルの一酸化炭素と鉄-ビリベルジン錯体が生成され、これがNADPHチトクロームP-450リダクターゼにより還元され、鉄とビリベルジンを生成する (図1)⁴⁾。ビリベルジンはビリベルジンリダクターゼによりビリルビンとなり、抱合されて胆汁中に排泄される。HOにはストレス応答で誘導されるHO-1⁵⁾と、構成型のHO-2⁶⁾が知られている。HO-1の遺伝子発現調節領域には、HRE (hypoxia responsible element), AP-1, NF- κ Bなどのドメインがあり、種々生体侵襲に反応して蛋白の発現が起こる。これに対してHO-2は発現誘導を起す因

子が報告されていない (表1)。HO活性の高い臓器としては脳、脾、肝が挙げられ、脳や肝ではHO-2活性が有意であるのに対し、赤血球破壊の場である脾ではHO-1が優位である⁶⁾。しかしながらこれらの臓器のどの細胞に二つのHOアイソザイムが発現しているかに関する知見は乏しく、各臓器におけるCOの生成動態も十分には検討されていなかった。著者らは最近ラットのHO-1、HO-2の高発現細胞を樹立し、これらの細胞のミクロソーム分画をマウスに免疫し、交叉反応を示さない抗ラットHO-1、HO-2モノクローナル抗体 (GTS-1, GTS-2) を作製した。これらの抗体を用いた免疫組織化学により、ラットの正常な肝臓ではHO-1が組織マクロファージであるKupffer cellに、HO-2が肝実質細胞に発現していることが示された⁷⁾。また内毒素で刺激を受けた肝では、Kupffer cellのみならず肝実質細胞にも発現が増強することが示された⁷⁾。

一方、肝臓を構成する細胞の初代培養系でもKupffer cellと肝実質細胞にそれぞれHO-1、HO-2の発現が再現できる。興味深いことに培養した類洞内皮細胞や伊東細胞では、誘導型酵素であるHO-1が高発現することが明らかになった (データ未発表)。これらの細胞の分離にはcollagenase digestionと低流量灌流を組み合わせることが必要であり、分離操作の過程でHO-1の誘導が惹起された可能性がある。したがって、これらの細胞を用いたHO-CO系の実験から得られた知見の解釈についてはとりわけ注意が必要となる。

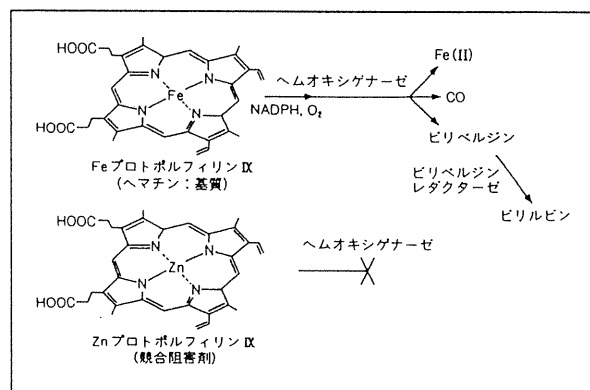


図1 heme oxygenaseによるヘムの酸化的分解とCOの生成
zinc protoporphyrin IX(ZnPP)はheme oxygenaseの拮抗阻害剤であるが、種々のヘム酵素に対する直接の阻害効果も知られている。

*Makoto Suematsu, Tsuneharu Suzuki, Shinya Makino, Yoshiyuki Wakabayashi, Satoshi Kashiwagi, Nobuhito Goda, Yuzuru Ishimura: 慶應義塾大学医学部医化学教室 Department of Biochemistry School of Medicine, Keio University

表1 heme oxygenase isozymes (HO-1,HO-2) の比較

PROPERTIES	Heme oxygenase-1	Heme oxygenase-2
Molecular weight	32KDa	36KDa
Km for protoheme IX	0.24 μ M	0.40 μ M
Inducers	Heme, endotoxin, oxidants, (heat shock)	not known

From Maines, MD. FASEB J. 1988

2. COによるguanylate cyclaseの活性化/In vivoとin vitroの違い

COは同じ低分子モノオキシドであるNO同様、可溶性guanylate cyclaseを活性化することが種々の細胞で示されてきた^{2,8,9)}。しかしながら、精製酵素標品を用いた検討では本酵素の感受性には大きな差があり、COによるin vitroで精製されたguanylate cyclaseの活性化はNOの約1/50程度と報告されている¹⁰⁾。したがって、生体局所でCOがNOに代わって本酵素を活性化するには50倍以上の濃度が必要と考えられる。一方、NOはラジカル分子のため、ヘモグロビンによる除去もCOに比べ速やかであり、COのヘモグロビンへの結合力はNOの約1/3000とされている。しかしながら、生体内での消去系となる赤血球のヘモグロビンとの相互反応は大きく異なっている。すなわちNOと結合した赤血球内の二価鉄のヘモグロビンは分解して硝酸イオンとメトヘモグロビンに変換し、メトヘモグロビンは還元されて元の二価鉄のヘモグロビンにリサイクルされるのに対し、COは一度二価鉄のヘモグロビンに結合すると、安定な複合体 (ferrous-CO complex) をつくり、肺のガス交換に際して酵素と可逆的に置き換わり、呼気中にそのままの形で排泄される点の特徴である。したがって、健康人の血中には通常1-2%程度のヘモグロビン-CO複合体が検出できる。一方、NOは非ヘム鉄やSH基との反応性も高いことが知られているが、COにはこれらの属性は見られない。さらに水溶液中での半減期が桁はずれにCOの方が長いことを考えあわせると、肝、脾のようなCO生成能が高いと思われる臓器でのcGMPを介した情報伝達をどちらのメディエーターが司るかを量論的に議論する必要性が現れた。肝では分離灌流系を用いて静脈環流液中のNOやCOを実際に測定することが可能であり、近年、両者の量論的比較に基づいた機能調節の議論が急速に進みつつある。

一方、NOとCOのguanylate cyclase活性可能の違いはin vitroにおける酵素の精製標品による検討であるが故に生じたものである可能性も最近示唆されている。Koeslingらはウシ肺から精製した酵素標品を用い、YC-1と呼ばれる抗血小板薬が酵素のCOによるcyclic GMP生成能を100倍程度活性化することを報告した¹¹⁾。YC-1は生体内物質ではないが、もし細胞内にYC-1-like cofactorが存在すると仮定すると、細胞に添加したCOがcGMPを上昇させ、cofactorがはずれた精製酵素がCOに対して感受性が低い理由が説明できる。このような事例はguanylate cyclaseの例を見るまでもなく、過去に精製ヘモグロビンの酵素親和性と赤血球

内のヘモグロビン酵素親和性とのdiscrepancyから、蛋白の精製過程で失われた赤血球内の2,3-bisphosphoglyceric acid(2,3-BPG)がヘモグロビンのアロステリックエフェクターとして見出されたのはその典型である。

3. 肝におけるCOの生成とその生理学的意義

ラットの分離灌流肝を用いた我々の検討では、正常灌流肝では肝静脈からのサンプル中約0.2~0.6 μ M程度のCOが遊離してくることがミオグロビンを用いた分光分析で明らかとなった^{2,3)}。これは流量にして0.5~0.7n mol/min/g liverに相当する。分離灌流肝ではヘモグロビンのような酸素運搬体なしで肝臓のviabilityを維持するため流量が正常の門脈血流の3倍程度あるため、上記の約3倍程度の濃度(1 μ M内外)のCOが類洞周辺に恒常的に維持されていると考えられる。肝におけるCO生成系は全体の約2/3が肝実質細胞に局在すると言われている。著者らは半透膜で仕切られた二層式のバイオリアクターを用い、その一方に肝細胞を高密度培養し、他方から培養液をサンプリングすることにより分離細胞のCO生成能を検討している⁷⁾。初代培養分離肝細胞を用いた検討では、分離直後の肝細胞で約30nmol/hour/10⁸ cells程度のCO生成が検出でき、時間依存性に生成量は低下した。これは湿重量1gに約10⁸個の肝細胞が存在すると仮定すると、ほぼ0.5nmol/min/g liverに相当することから、正常肝では肝細胞からのCOの生成が大部分を占めることになる¹²⁾。またHOはヘムを分解しどうモルのビリベルジンとCOを生成し、ビリベルジンは同モルのビリルビンに変換されるため、COとビリルビンの生成量の量的関係はほぼ一致する。すなわち肝微小循環系は、肝実質細胞から遊離されたCOに常にさらされていると考えられる。もちろんこれらは分離灌流系を用いた測定に基づく概算であり、生体内では類洞血流から供給される遊離ヘムや老廃赤血球由来のヘモグロビンをKupffer cellが代謝する可能性も考慮すると、CO生成はさらに増加すると思われる。

COの濃度の概算が可能になると、COによるguanylate cyclaseの活性化が成立するためにはNOの濃度がCOに比してかなり低いことが要件となる。NOは最終代謝産物であるNO₂⁻、NO₃⁻をGreiss法によって測定したり、スピントラップ剤で補足してESRで検出可能である。正常肝灌流モデルではGreiss法での検出感度以上のNO_xは検出できないが、DeckerらのグループのESRによる計測によれば、スピントラップ剤で直接補足できるNOの生成は30pmol/min/g liver程度であった¹³⁾。NOは酸素の存在下で速やかにNO₂に変換されるが、Miskoらは肝灌流モデルでのsteady-stateのNO₂生成をdiaminonaphthaleneを用いた蛍光法¹⁴⁾により評価している。これによると、肝静脈灌流液中のNO₂はただだか0.1nmol/min/g liver程度である。したがって、局所における遊離NOの実効濃度はさらに低く、COのそれと比べても著しく低いと思われる。また、生成したNOは肝臓においておそらくKupffer cell

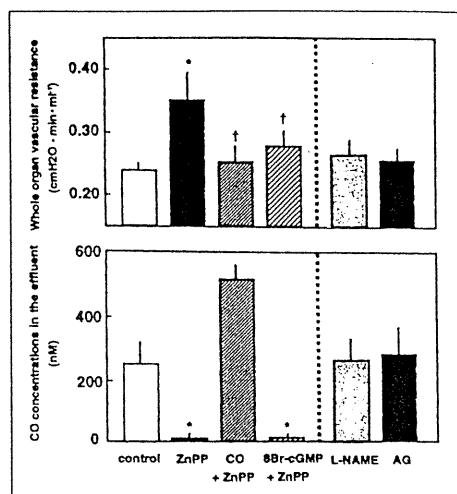


図2 ラット分離灌流肝におけるCOの生成と血管抵抗に対する各種薬剤の効果 (文献2より引用)

ZnPP: zinc protoporphyrin IX. L-NAME, AG (aminoguanidine) はNO synthaseの阻害剤。

などで生成されるO₂によって消去されることがSpitzerらのグループによって明らかにされた¹⁵⁾。したがって、類洞周辺においてcGMPの上昇に關するNOの濃度は予想以上に低い可能性がある。このように試験管内ではNOはCOに比べ、guanylate cyclaseの活性化能が高いが、生体内の肝微小環境においてはCO濃度がNO濃度より極めて高いと考えられるために、肝臓においてはCOが循環制御調節因子としてより重要である可能性が示唆された。

4. 肝局所でのCO生成部位と肝類洞収縮反応の調節メカニズム

肝臓で定常状態で生成されているCOは、heme oxygenaseの拮抗阻害剤であるzinc protoporphyrin-IX(ZnPP) (図4) を投与すると検出できなくなる。この状態での灌流肝は約30%の血管抵抗の増加を示すようになる。ここに1 μM程度のCOあるいは膜透過性のcGMPアナログである8Br-cGMPを投与すると、灌流圧の上昇は抑制されたことから、内因性に生成されるCOが、steady stateにおける肝血管抵抗の調節因子であることが示された^{2,3)}。この抵抗要素は門脈血管でなく類洞血管であることを、生体顕微鏡下の肝微小循環観察法で調べることができる^{3,7)} (図3)。この際、類洞は不連続性の収縮を示すが、収縮部位が血管内皮細胞である伊東細胞に一致した。類洞には平滑筋細胞が存在せず、周皮細胞が収縮要素として作用するわけだが、驚くべきことにL-NAMEやaminoguanidineのようなNO synthase阻害剤を1 mM投与しても昇圧反応が起こらない。以上のことから、NOはsteady-stateでの肝血管抵抗の調節因子とは考えにくいと思われた (図2)。また、この類洞収縮反応はα1 stimulantであるphenylephrine 500nMでは起こらない。このとき血管抵抗は30%程度上昇するため、

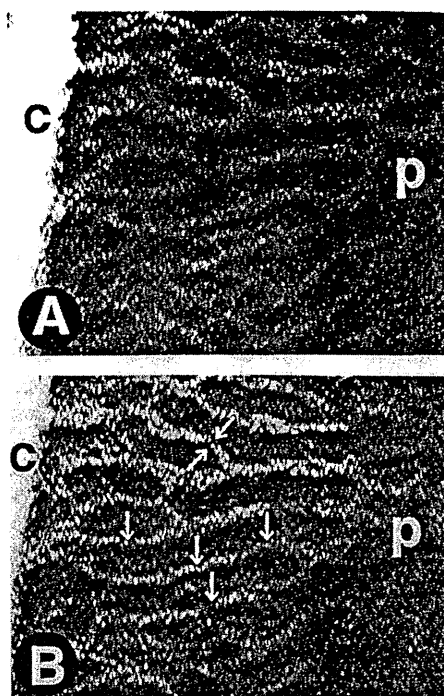


図3 ラット分離灌流肝表面の類洞血管像

実時間型ラインスキャン共焦点レーザー顕微鏡でFITC標識dextranを門脈内注入しながら撮影。Pは傍門脈域、Cは中心細静脈を示す。Aはコントロール像で、COトラップ剤で類洞内皮小孔を通過し血管外に拡散するoxyhemoglobinを投与すると、類洞に不連続性狭小化反応が現れ (矢印)、全肝血管抵抗の上昇が起こる。

主な収縮部位は門脈のレベルに起こると考えられる²⁾。

しかしながら、遊離の金属プロトポルフィリンには多彩な薬理作用があることが知られており、ZnPPにもsoluble guanylate cyclaseの直接抑制作用¹⁶⁾、inducible NO synthaseの抑制作用¹⁷⁾、voltage-dependent calcium channelの活性化作用¹⁸⁾ などがあることが報告されている。著者らはheme oxygenaseを抑制せずに、肝臓内局所のCOをトラップするものがZnPPのみであったような血管収縮作用を発揮するであろうと考え、NO、COをとともに補足するoxyhemoglobinと、NOは補足できるがCOとの結合は起こらないmethemoglobin投与による血管反応の変化を検討した⁷⁾。正常の灌流肝ではoxyhemoglobinでは血管抵抗の上昇と類洞の狭小化が起こるが、methemoglobinではこれらの変化は起こらなかった。興味深いことに、oxyhemoglobinを類洞内皮細胞のfenestrationを通過しない250nm程度のリポソームに封入し投与すると、血管抵抗の増加が起こらなくなった。これらの所見から我々は肝実質細胞(HO-2)で生じたCOの一部が、血液中のhemoglobinに補足されることなく類洞壁外周をとりまく伊東細胞に作用し、同細胞のcGMPを上昇させることが類洞血管抵抗を低く保つために必要不可欠であると考えた。したがって、分離培養した伊東細胞でも外因性に投与されたCOにより、応分のcGMP生成の上昇が起こるはずであると考え、初代培養系にお

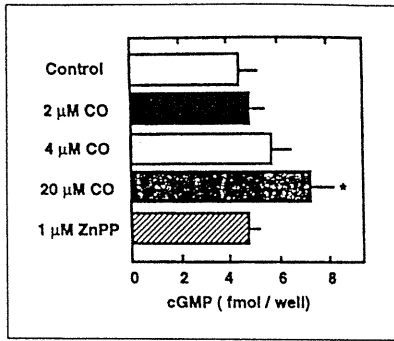


図4 ラット伊東細胞の初代培養系における外因性CO添加によるcGMPの上昇 (文献2より一部引用)

けるCOによるcGMP上昇の容量依存性を検討したところ、最低でも10 μM程度のCOが有意なcGMPの上昇に必要であることが明らかになった(図4)²⁾。この濃度は先に示した、分離灌流肝の静脈灌流液中での濃度の約30倍(灌流量をin vivoでの3倍と見積もっても10倍)の開きがある。主要なCO生成系である肝実質細胞と伊東細胞は、ともに類洞外空間に存在し互いに接しているため、このdiscrepancyは問題にならない可能性もあるが、COがguanylate cyclase以外の標的分子に作用して伊東細胞の膜電位を変化させている可能性も否定できない。従来伊東細胞の膜電位の調節メカニズムについては電気生理学的解析が行われていなかったが、著者らはwhole cell patch clampによりこれを解析し、外向き、内向き整流性K⁺チャネルの存在(図5)と細胞間のgap junctional communicationの存在を証明した(図6)¹⁹⁾。これらのうち、外向きK⁺チャネルは他の細胞で膜状の未知のヘム蛋白と共役して酸素センシングを行う機構として注目されている。COによりこのチャネルの開口確率が上昇し、膜の過分泌が起こって細胞の弛緩に関与するかどうかを明らかにするためにはさらなる検討が必要である。伊東細胞の初代培養系は類洞のトームスの調節メカニズムを知る上で極めて有用であるが、この細胞も培養のためのplatingによりphenotypeが日毎に変化し、培養4-6日以降、α-smooth muscle actinの発現やvoltage-dependent Ca²⁺ channelの発現が起り、myofibroblastへの形質転換が起り始める。COやNOのようなガス状メディエーターとヘム蛋白との相互作用を培養系で検証する際には、in vitroとin vivoの酸素環境の違いと、それに伴うガス状物質のヘム蛋白への結合性の違いを留意する必要があることは言うまでもない。

おわりに

肝臓におけるCOによる類洞血管弛緩機序は、COの生成源、作用部位、NOとの量論的比較が明らかになりつつある。しかしながら、soluble guanylate cyclaseのみがCOの標的分子であるか否かは依然不明である。COは生体内で二価の鉄をもつヘム蛋白、酵素と結合ができるため、今後COによるNO synthaseや

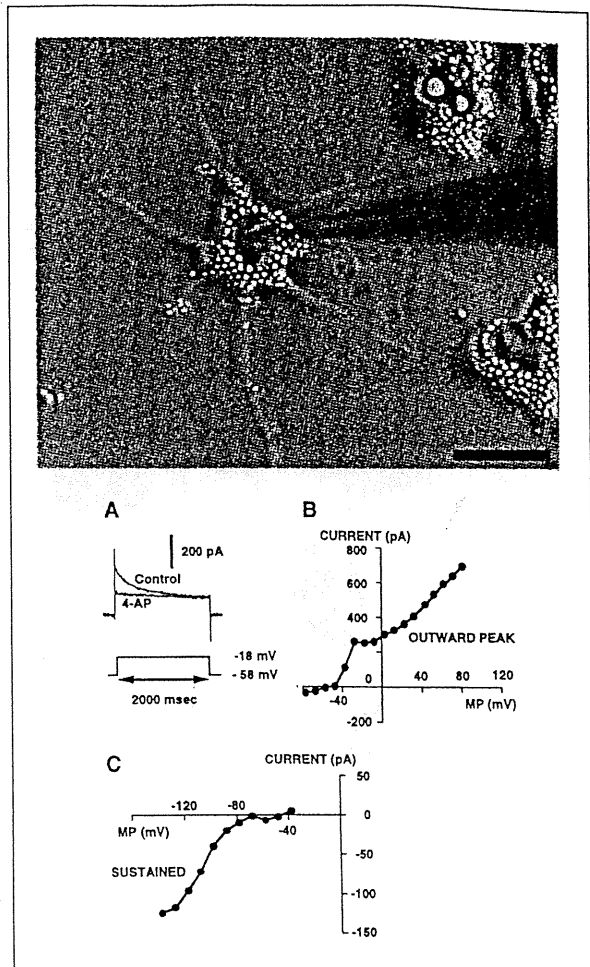


図5 ラット伊東細胞の初代培養系におけるwhole-cell patch clampによる内向き、外向きカリウム電流の特性

上図は伊東細胞にmicropipetteを刺入したところ。外向き電流(B)は4-methylpyridine(4-MP)により抑制され(A)、内向き電流(C)は細胞外カリウム濃度を上げるにより増強する細胞外カリウム濃度を上げるにより増強する。(文献19より引用)

cytochrome P-450-dependent eicosatrienoic acid epoxygenaseの活性調節などが面白い研究対象としてクローズアップされよう。特に後者は細胞内カルシウムの動員を活性化するepoxyeicosatrienoic acidの生成酵素であり、肝、腎などに存在することが報告されている。一方で、COの生理活性は局所でのNO生成量によって厳しく規制される。脳や精巣などheme oxygenase活性の高い他の臓器におけるCOの生理活性作用が確立されるためには、in vivo, in vitroにおける徹底したNO、COの量論的比較が必要であることは言うまでもない。

近年のHOのノックアウトマウスも開発され²⁰⁾、HOの各臓器での生理作用を解析するためのツールとして注目されるが、HOはヘム酵素であるNO合成酵素のturn overをも左右するため、そのphenotypeの変化がCOの低下によるものか、NOの上昇によるものかを見

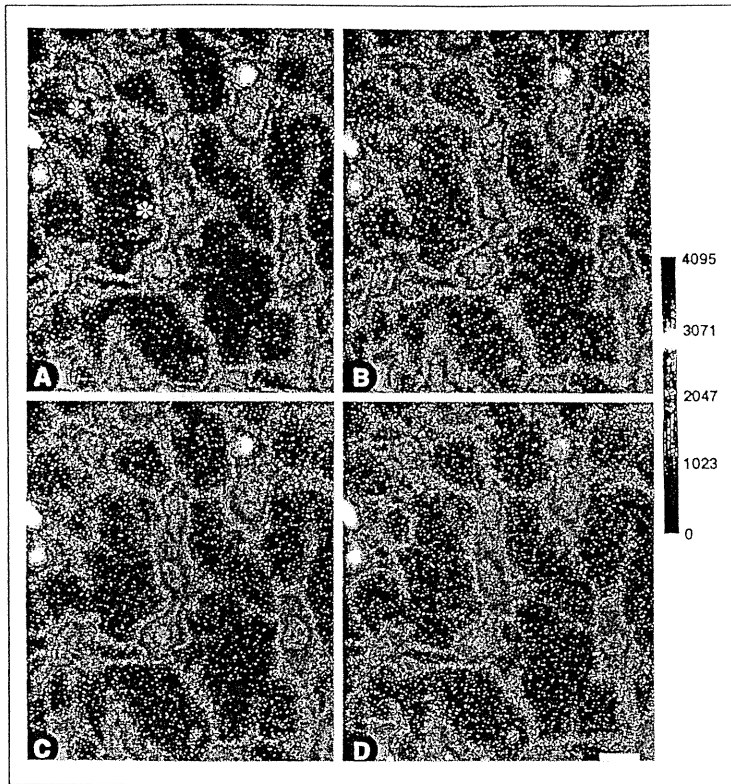


図6 ラット初代培養伊東細胞における gap junctional communicationのFLAP法 (fluorescence laser-associated photobleaching) による存在証明

A:control。carboxyfluoresceinを細胞内に負荷された細胞。B:Laser application直後。asterisksの細胞の蛍光がphotobleachingにより激弱。C, Dは各々2, 6分後の像で蛍光の回復がみられる。Bar=20 μm

極めることが必要になろう。近年、内毒素血症においてHO-1が動脈壁で誘導されること、ZnPP投与でshockに伴う血圧低下が抑制できることから誘導型HOの生成するCOが血管弛緩作用を発揮したとする論文が出された²⁰⁾。しかしながら、この報告では同じ部位でinducible NO synthaseが発現しているかどうかを検証すると同時に (ZnPPがNO synthaseを抑制して圧を上げた可能性がある)、ZnPPによる昇圧効果が局所で生成される量に見合ったCOの添加により抑制可能であることを示す必要があり、これらの証明なくしてCOの関与は十分に証明し得ないと考えられる。また肝類洞細胞培養系での経験から、HO-1のようなストレス蛋白の機能解析を培養系で行う場合、in vivoにおいて当該細胞が同様な蛋白発現をしているか否かを十分に検索して、実験成績の評価を行う必要があることは論を待たない。

文献

- 1) Suematsu, M., Kashiwagi, S., Sano, T., *et al.* : Biochem. Biophys. Res. Commun., 205(2) : 1333-1337, 1994.
- 2) Suematsu, M., Goda, N., Sano, T., *et al.* : J. Clin. Invest., 96 : 2431-2437, 1995.
- 3) Sano, T., Shiomi, M., Wakabayashi, Y., *et al.* : Am. J. Physiol., (Heart Circ.Physiol.) 272 : G1268-G1275, 1997.
- 4) Suematsu, M., Wakabayashi, Y., Shimura, Y. : Cardiovasc. Res., (invited review) 32 : 679-686, 1996.
- 5) Shibahara, S., R. Müller, H. Taguchi, *et al.* : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82 : 7865-7869, 1985.
- 6) Maines, M. D. : FASEB J., 2 : 2557-2568, 1988.
- 7) Goda, N., Suzuki, K., Naito, M., *et al.* : J. Clin. Invest. in

press

- 8) Brune, B., Ullrich, V. : Mol. Pharmacol., 32 : 497-504, 1987.
- 9) Rich, A. G., Farrugia, G., Rae, J. L. : Am. J. Physiol., 267 : C435-C442, 1994.
- 10) Kharitonov, V., Sharma, V. S., Pilz, R. B., *et al.* : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92 : 2568-2571, 1995.
- 11) Friebe, A., Schultz G, Koesling, D. : EMBO J., 15 : 6863-6868, 1996.
- 12) Yamaguchi, T., Y. Wakabayashi, M. Tanaka, *et al.* : Am. J. Physiol., (Gastrointest. and Liver Physiol.) 270 : G1028-G1032, 1996.
- 13) Obolenskaya, M. Y., Vanin, A. F., Mordvintcev, P. I., *et al.* : Biochem. Biophys. Res. Commun., 202 : 571-576, 1994.
- 14) Misko, T. P., Schilling, R. J., Salvemini, D., *et al.* : Analyt. Biochem., 110 : 258-266.
- 15) bautista, A. P., Spitzer, J. J. : Am. J. Physiol., (Gastrointest. Liver Physiol.) 266 : G783-788, 1994.
- 16) Ignarro, L. J., Barrot, B., Wood, K. S. : J. Biol. Chem., 259 : 6201-6207, 1984.
- 17) Wolff, D. J., Naddelman, R. A., Lubeskie, A., *et al.* : Arch. Biochem. Biophys., 333 : 27-34, 1996.
- 18) Linden, D. J., Narasimhan, K., Gurfel, D. : J. Neurophys., 70 : 2673-2677, 1993.
- 19) Kashiwagi, S., Suematsu, M., Wakabayashi, Y., *et al.* : Am. J. Physiol., (Gastrointest. Liver Physiol.) 272(35) : G742-G750, 1997.
- 20) Poss, K., Tonegawa, S. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94 : 10925-10930, 1997.
- 21) Yet, S. -F., Pellacani, A., Patterson, C., *et al.* : J. Biol. Chem., 272 : 4296-4301, 1997.

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 —

末松 誠 武岡真司 土田英俊 石村 巽

●人工酸素運搬体として修飾ヘモグロビン分子が注目されている。これらを生体内投与したさいのNOやCOとの相互作用や、その結果生じる血管機能異常を肝微小循環を例に概説する。

*

キーワード：一酸化炭素，ヘムオキシゲナーゼ，人工赤血球，一酸化窒素，類洞壁細胞

Moncada らにより、血管内皮由来の平滑筋弛緩因子がL-arginine から生成されるガス状メディエーターである一酸化窒素(NO)であることが発見されて以来¹⁾、NOは全身諸臓器の抵抗血管を能動的に弛緩させ血流を保持させるために不可欠な因子であると考えられてきた。一方、著者らは生体内で生成されるもうひとつのガス状物質である一酸化炭素(CO)が正常の肝で血管拡張物質として作用することを見出した^{2,3)}。肝の毛細血管に相当する類洞はわずか数cmH₂Oの圧格差で血流が維持されており、その血管抵抗は未知のメカニズムで恒常的に低く保たれていると考えられてきたが、内因性に生成されたCOがそのメカニズムを担っていると思われる。

これら2つのガス状物質と分子状酸素がもつ共通の性質としてヘム蛋白、酵素との強い相互作用がある。血流中を流れる赤血球はなんらかの“しかけ”で、血管弛緩性ガス状物質の生理作用を損なうことなく酸素を末梢組織に輸送していると考えられる。しかし、赤血球のもつ“しかけ”についてはまだ完全には解明されておらず、このことは理想的な人工酸素運搬体(人工血液)を開発す

る過程でのひとつのハードルとなっている。

本稿では、微小循環学からみた人工赤血球開発の進歩と問題点を概説する。

■内因性COの生成系—heme oxygenase

生体内におけるCO生成のほとんどはヘムの分解酵素であるheme oxygenase(HO)による。本酵素はヘムのポルフィリン環への酸素添加反応によりα-メテン炭素での開裂が起こり、同モルの一酸化炭素と鉄-ビリベルジン錯体が生成し、これがNADPHチトクロームP-450リダクターゼにより還元され、鉄とビリベルジン生成する(図1)⁴⁾。ビリベルジンはビリベルジンリダクターゼによりビリルビンとなり、抱合されて胆汁中に排泄される。HOにはストレス応答で誘導されるHO-1⁵⁾と構成型のHO-2⁶⁾が知られている。HO-1の遺伝子発現調節領域にはHRE(hypoxia responsible element)、AP-1、NF-κBなどのドメインがあり、種々生体侵襲に反応して蛋白の発現が起こる。これに対してHO-2は発現誘導を起こす因子が報告されていない(表1)。HO活性の高い臓器としては脳、脾、肝があげられ、脳や肝ではHO-2活性が優位であるのに対し、赤血球破壊の場である脾ではHO-1が優位である⁶⁾。しかし、これらの臓器のどの細胞に2つのHOアイソザイムが発現しているかに関する知見は乏しく、各臓器におけるCOの生成動態も十分には検討されていない。

著者らは最近、ラットのHO-1、HO-2の高発現細胞を樹立し、これらの細胞のミクロソーム分画をマウスに免疫し交差反応を示さない抗ラットHO-1、HO-2モノクローナル抗体(GTS-1、GTS-2)を作成した。これらの抗体を用いた免疫組織化学により、ラットの正常な肝ではHO-1が組織マクロファージであるKupffer細胞に、HO-2が肝実質細胞に発現していることが示された(図2)⁷⁾。また、内毒素で刺激を受けた肝ではKupffer細胞

Artificial blood substitutes in microcirculation—effects on NO- and CO-mediated vasorelaxing mechanisms
Makoto SUEMATSU¹, Shinji TAKEOKA², Eishun TSUCHIYA² and Yuzuru ISHIMURA¹: 慶應義塾大学医学部医化学教室¹, 早稲田大学理工学部高分子化学教室²

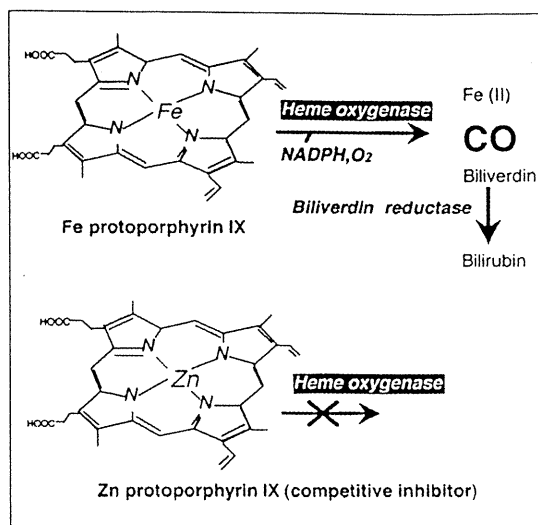


図1 heme oxygenaseによるヘムの酸化的分解とCOの生成

zinc protoporphyrin IX (ZnPP) はheme oxygenaseの拮抗阻害薬であるが、種々のヘム酵素に対する直接の阻害効果も知られている。

のみならず肝実質細胞にも発現が増強することが示された。HO-1の肝における誘導は、内毒素のみならず虚血-再灌流障害、ショックのような病態でも誘導される。このことは体内に投与されたヘムの分解速度が正常個体とショックに曝露された個体で大きく異なることを示唆している。肝臓外にもHO-1はいろいろな臓器に分布している。肺では肺泡マクロファージに、脾では赤血球を分解する領域とされる赤脾髄のマクロファージ、あるいは白脾髄との境界に輪状に分布するED3陽性のマクロフィリックマクロファージに分布する。

マクロファージになぜHO-1が強陽性に発現するのか、また発現したHO活性がマクロファージの機能調節にいかなる関与をするのかは現在のところ不明である。しかし最近、HOの生成物であるビリベルジン、ビリルビンが単球の血管内皮細胞層での遊走を調節する作用があることが明らかにされたことは注目に値する。いずれにしても肝、脾といった細網内皮系におけるHOの発現動態は、ヘム蛋白分解のおもなコンパートメントを形成するため、ヘムを用いた人工酸素運搬体の代謝を考えるうえできわめて重要である。

■ヘモグロビンによるガス状メディエーターの捕捉

ヘムを用いた人工酸素運搬体は酸素を運搬するだけでなく、生体で生理作用を担っているNO、COの活性を損なわないことが要求される。NOはラジカル分子のため、ヘモグロビンによる除去もCOに比べ速やかであり、COのヘモグロビンへの結合力はNOの約1/3,000とされている。また、生体内での消去系となる赤血球のヘモグロビンとの相互反応はNOとCOの間で大きく異なっている。すなわち、NOと結合した赤血球内の二価鉄のヘモグロビンは分解して硝酸イオンとメトヘモグロビンに変換し、メトヘモグロビンは赤血球内のメトヘモグロビンレダクターゼで還元されて元の二価鉄のヘモグロビンにリサイクルされるのに対し、COは一度二価鉄のヘモグロビンに結合すると安定な複合体(ferrous-CO complex)をつくり、肺のガス交換にさいして酸素と可逆的に置き換わり呼気中にそのままの形で排泄される点が特徴である。したがって、健常人の血中には通常1~2%程度のヘモグロビン-CO複合体が検出できる。

一方、NOは非ヘム鉄やSH基との反応性も高いことが知られているが、COにはこれらの属性はみられない。さらに、水溶液中での半減期がけたはずれにCOのほうが長いことを考え合わせると、肝、脾のようなCO生成能が高いと思われる臓器でのcGMPを介した情報伝達をどちらのメディエーターがつかさどるかを量論的に議論する必要性が現れた。肝では分離灌流系を用いて静脈灌流液中のNOやCOを実際に測定することが可能であり、近年、両者の量論的比較に基づいた機能調節の議論が急速に進みつつある。

■肝におけるCOの生成とその生理学的意義

分離灌流肝(ラット)を用いた著者らの検討では、正常灌流肝では肝静脈からのサンプル中約0.1~0.4 μM程度のCOが遊離してくることがミオグロビンをを用いた分光分析で明らかとなった^{2,3)}。これは流量にして約0.6 nmol/min/g liverに相当する。肝におけるCO生成系は全体の約2/3が肝実質細胞に局在するといわれている。初代培養分離肝細胞を用いた検討では約30 nmol/hr/10⁸ cells程度のCO生成が検出できた。これは、湿重量1 g

表 1 heme oxygenase isozymes (HO-1, HO-2) の比較⁶⁾

properties	heme oxygenase-1	heme oxygenase-2
molecular weight	32 KDa	36 KDa
Km for protoheme IX	0.24 μ M	0.40 μ M
inducers	heme, endotoxin, oxidants, (heat shock)	not known

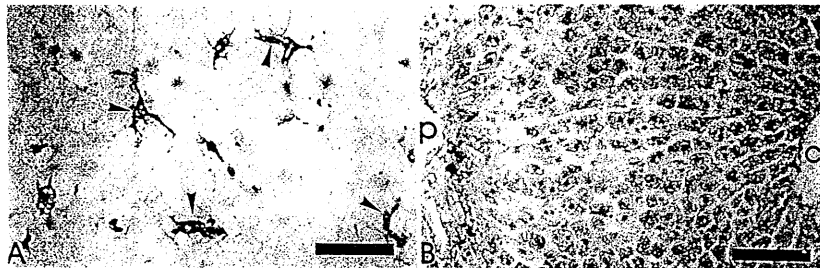


図 2 抗ラット HO-1, HO-2 モノクローナル抗体 GTS-1 (A), GTS-2 (B) による肝の免疫染色像
Bar は, A では 50 μ m, B では 100 μ m を示す. P は終末門脈枝, C は中心細静脈を示す.

に約 10^8 個の肝細胞が存在すると仮定するとほぼ 0.5 nmol/min/g liver に相当することから, 正常肝では肝細胞からの CO の生成が大部分を占めることになる^{3,7)}.

また, HO はヘムを分解し同モルのビリベルジンと CO を生成し, ビリベルジンは同モルのビリルビンに変換されるため, CO とビリルビンの生成量の量的関係はほぼ一致する. すなわち, 肝微小循環系は肝実質細胞から遊離された CO につねに曝露されていると考えられる. もちろんこれらは分離灌流系を用いた測定に基づく概算であり, 生体内では類洞血流から供給される遊離ヘムや老廃赤血球由来のヘモグロビンを Kupffer 細胞が代謝する可能性があり, CO 生成はさらに増加すると思われる.

NO は最終代謝産物である NO_2 , NO_3 を Greiss 法によって測定したりスピントラップ剤で捕捉して ESR で検出可能である. 正常肝灌流モデルでは Greiss 法での検出感度以上の NO_x は検出できないが, Decker らのグループの ESR による計測によればスピントラップ剤で直接捕捉できる NO の生成は 30 pmol/min/g liver 程度で, これが部分肝切除後に数倍に増加することを示した⁹⁾. 一方, 肝

は, 部分切除後, あるいは内毒素投与後には数十倍の NO を産生する. したがって, NO の局所における実効濃度は, Brassらによれば⁹⁾, lipopolysaccharide (4 mg/kg) をラットに投与すると数時間後には 1.3 nmol/min/g liver 程度の NO が検出可能となる. NO は酸素の存在下で速やかに NO_2 に変換されるが, Miskoらは肝灌流モデルでの steady-state の NO_2 生成を diaminonaphthalene を用いた蛍光法¹⁰⁾ により評価している. これによると, 肝静脈灌流液中の NO_2 はたかだか 0.1 nmol/min/g liver 程度である. したがって, 局所における NO の実効濃度は CO のそれと比べて著しく低いと思われる.

また, 生成した NO は肝においておそらく Kupffer 細胞などで生成される O_2 によって消去されることが Spitzer らのグループによって明らかにされた¹¹⁾. したがって, 類洞周辺において NO の濃度は予想以上に低く保たれている可能性がある. 試験管内では NO は CO に比べ, guanylate cyclase の活性化能が高いが, 生体内の肝微小環境においては CO 濃度が NO 濃度よりきわめて高いと考えられるために, 正常肝においては CO が循環制御調節因子としてより重要である可能性が示唆された.

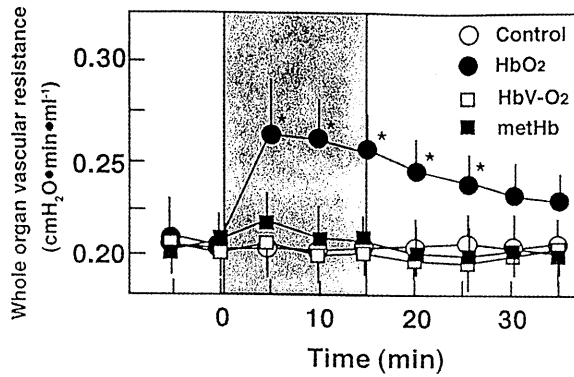


図3 ラット分離灌流肝におけるCOの生成と血管抵抗に対する各種薬剤の効果⁷⁾

■肝局所でのCO生成部位と肝類洞収縮反応の調節メカニズム

肝で定常状態で生成されているCOは、heme oxygenaseの拮抗阻害薬であるzinc protoporphyrin-IX (ZnPP) (図1)を投与すると検出できなくなる^{3,12)}。この状態での灌流肝は約30%の血管抵抗の増加を示すようになる。ここに1 μ M程度のCOあるいは8Br-cGMPを投与すると灌流圧の上昇は抑制されたことから、内因性に生成されるCOが、steady stateにおける肝血管抵抗の調節因子であることが示された^{3,4)}。この抵抗要素は門脈血管でなく類洞血管であることを生体顕微鏡下の肝微小循環観察法で調べることができる^{3,7)}。このさい、類洞は不連続性の収縮を示すが、収縮部位が血管周皮細胞である伊東細胞¹³⁾に一致した。類洞には平滑筋細胞が存在せず、周皮細胞が収縮要素として作用するわけだが、驚くべくことにL-NAMEやaminoguanidineのようなNO synthase阻害薬を1 mM投与しても昇圧反応が起こらない。以上のことから、NOはsteady-stateでの肝血管抵抗の調節因子とは考えにくいと思われた(図3)。またこの類洞収縮反応は α 1 stimulantであるphenylephrine 500 nMでは起こらない³⁾。このとき血管抵抗は30%程度上昇するため、おもな収縮部位は門脈のレベルに起こると考えられる。

しかし、遊離の金属プロトポルフィリンには多彩な薬理作用があることが知られており、ZnPPにもsoluble guanylate cyclaseの直接抑制作用¹⁴⁾、inducible NO synthaseの抑制作用¹⁵⁾、voltage-dependent calcium channelの活性化作用¹⁶⁾などが

あることが知られている。著者らはheme oxygenaseを抑制せずに、肝臓内局所のCOをトラップするものがZnPPでみられたような血管収縮作用を發揮するであろうと考え、NO、COをとともに捕捉するoxyhemoglobinと、NOは捕捉できるがCOとの結合が起こらないmethemoglobin投与による血管反応の変化を検討した⁷⁾。正常の灌流肝ではoxyhemoglobinでは血管抵抗の上昇と類洞の狭小化が起こるが、methemoglobinではこれらの変化は起こらなかった。興味深いことに、oxyhemoglobinを類洞内皮細胞のfenestrationを通過しない250 nm程度のリポソームに封入し投与すると血管抵抗の増加が起こらなくなった⁷⁾。これらの所見から、著者らは肝実質細胞(HO-2)で生じたCOの一部が血液中のヘモグロビンに捕捉されることなく類洞壁外周を取り巻く伊東細胞に作用し同細胞のcGMPを上昇させることが類洞血管抵抗を低く保つために必要不可欠であると結論した。

■肝におけるヘム分解の区画制御と類洞機能

Schmidらは1970年代に肝におけるヘムの分解機序を詳細に検討し、分離培養した実質細胞(肝細胞)と非実質細胞分画に遊離ヘモグロビンと赤血球を添加すると、非実質細胞では赤血球添加時に、実質細胞では遊離ヘモグロビン投与時にビリルビン生成が亢進することが明らかにされた¹⁷⁾。その後、四半世紀を経て著者らによりheme oxygenase-1,-2がそれぞれKupffer細胞と肝細胞が特異的に分布することが明らかにされたことにより、2つのアイソザイムが細胞特異的なヘムの分解系を形成することが示唆された。老廃赤血球やリポソーム封入型のヘモグロビンは体内に投与すると、Kupffer細胞をはじめとする組織マクロファージに取り込まれるが、遊離ヘモグロビン分子や最近開発されている人工酸素運搬体である分子間架橋型ヘモグロビン、さらにこれらが細胞外で自己酸化を受けてできるメトヘモグロビンは肝の類洞内皮細胞に存在する径100~150 nm程度の篩板状小孔(fenestration)を容易に通り返けるため肝細胞のHO-2で分解されるものと考えられる⁷⁾。

したがって、Shockらの生体侵襲を受けてHO-1が誘導された個体では体内に投与されたヘム分子の分解は正常とは様相を異にすることが想像に

難くない。最近、著者らは内毒素血症の肝を *ex vivo* で灌流し、修飾ヘモグロビンを投与したさいの血管抵抗の変化を検討している。内毒素投与により肝では肝実質細胞全域に HO-1 の誘導がかかると同時に NO synthase の共誘導がかかる。このような状況ではヘモグロビン分子を投与すると正常肝でみられる 2 倍程度の抵抗の上昇が現れる。一方、NO は捕捉するが、CO を捕捉できないメトヘモグロビンを投与すると、正常ではみられないような血管抵抗の上昇が観察できる。これらの所見は内毒素血症では正常時の CO に代わって NO が抵抗を低く保つ因子として作用していることを意味している。2つのガス状物質の soluble guanylate cyclase 活性化作用の違いを考慮すると、この結果は当然と考えられる。

興味深いことに、ヘモグロビンとメトヘモグロビンでは血管抵抗の上昇作用は異なり、メトヘモグロビンはヘモグロビンの 50% 程度の作用しか現さない。著者らは当初、両者の NO 捕捉作用の違いがその理由であると考えたが、ヘマトクリットの 10% 程度の濃度で投与すると、静脈灌流液の NO₂ が双方で完全に低下するにもかかわらず血管抵抗の差は存在することから、別のメカニズムによる現象と考察している。メトヘモグロビンはヘモグロビンに比べ補欠分子であり、HO の基質となる protoheme IX の遊離を起こしやすく、事実、投与後数分の単位で胆汁中にビリルビンとして分泌されてくることが明らかにされた(未発表データ)。

すなわち、肝に投与されたメトヘモグロビンは Disse 腔に分布し NO を捕捉して血管を収縮させるばかりではなく、基質として肝細胞に取り込まれて CO を生成することにより、消去された NO 依存性の血管拡張作用を代償している可能性が示唆される。このことは内毒素肝では aminoguanidine のような誘導型 NO synthase の阻害下で 1mM 程度のごくわずかな CO を流すだけで、血管抵抗が 30% 程度低下することからも支持される。細胞外空間に投与されたヘモグロビン分子は速やかにメト化され、HO により胆汁色素として排泄される。ヘモグロビンのメト化は人工酸素運搬体の寿命を延長させるための技術的ハードルとなっているが、無細胞型の修飾ヘモグロビンを投与する場合、分

子架橋して代謝を遅らせると、CO 生成による血管拡張代償機能が働かず、ガス状物質の捕捉作用だけが持続することになる可能性がある。このような意味で小胞化して血管内にとどまるようにしたヘモグロビン分子には、血管外に存在する NO や CO を介した血管拡張メカニズムを損なうことなく、Kupffer 細胞のような血管内の常在マクロファージに存在する生理的分解機構で代謝される点で大きな利点があると考えられる。

■おわりに

NO や CO を介した肝の血管抵抗の調節機構と heme oxygenase の臓器内分布の研究成果を通じて、ヘムを用いた人工酸素運搬体のあらたな設計原理が明らかにされつつある。アメリカでは分子内架橋型ヘモグロビンが臨床試験段階にあるが、生体内でのヘム代謝のコンパートメントと微小循環機能を考慮に入れた酸素運搬体の設計はこれからの課題といえる。

文献

- 1) Palmer, R. M. J. et al. : *Nature*, **327** : 524-526, 1987.
- 2) Suematsu, M. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205** (2) : 1333-1337, 1994.
- 3) Suematsu, M. et al. : *J. Clin. Invest.*, **96** : 2431-2437, 1995.
- 4) Suematsu, M. et al. : *Cardiovasc. Res.* (invited review), **32** : 679-686, 1996.
- 5) Shibahara, S. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82** : 7865-7869, 1985.
- 6) Maines, M. D. : *FASEB J.*, **2** : 2557-2568, 1988.
- 7) Goda, N. et al. : Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver : Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J. Clin. Invest.*, **101** (3), 604-612, 1998.
- 8) Obolenskaya, M. Y. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **202** : 571-576, 1994.
- 9) Ma, T. T. et al. : *Gastroenterology*, **108** (2) : 463-469, 1995.
- 10) Misko, T. P. et al. : *Eur. J. Biochem.*, **233** : 119-125, 1993.
- 11) Bautista, A. P. and Spitzer, J. J. : *Am. J. Physiol.* (Gastrointest. Liver Physiol.), **266** : G783-G788, 1994.
- 12) Yamaguchi, T. et al. : *Am. J. Physiol.* (Gastrointest. Liver Physiol.), **270** : G1028-G1032, 1996.
- 13) Kashiwagi, S. M. et al. : *Am. J. Physiol.* (Gastrointest. Liver Physiol.), **272** (35) : G742-G750, 1997.
- 14) Ignarro, L. J. et al. : *J. Biol. Chem.*, **259** : 6201-6207, 1984.
- 15) Wolff, D. J. et al. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **333** : 27-34, 1996.
- 16) Linden, D. J. et al. : *J. Neurophys.*, **70** : 2673-2677, 1993.
- 17) Bissel, D. M. et al. : *Blood*, **40** : 812-822, 1972.

Kupffer 細胞と肝微小循環 —ヘム代謝と血流調節の接点—

末松 誠* 京兼隆典* 若林良之*
石村 巽*

はじめに

Kupffer cell (KC) は肝微小循環の毛細血管にあたる類洞の内腔に局在する常在性マクロファージである。KC は腸管から門脈循環に流入する細菌の捕捉、抗原提示等を行い網内系の主座を形成する細胞である一方、類洞の血流調節にも関係することが古くから提唱されている。さらに KC は脾臓のマクロファージとともに体内の老廃赤血球の処理系として重要な役割を果たしており、赤血球内の遊離ヘモグロビンが全身血中に流入し毒性を発揮しないためのフェイルセーフ機構として働くとともに、ヘモグロビン由来のヘム鉄回収の primary site として役割を果たすものと考えられている。本稿では著者らによって最近明らかにされた肝臓におけるヘム鉄代謝のメカニズムと KC の役割、および類洞血流調節メカニズムとの密接な関係について触れる一方、近年血液代替物として実用化が期待されている人工酸素運搬体について、網内系微小循環生理の観点からみた設計原理についても言及する。

I. マクロファージにおけるヘム鉄分解反応系：heme oxygenase-1

体内におけるヘム鉄の分解は heme oxygenase (HO) により行われる。本酵素の反応は protoheme IX

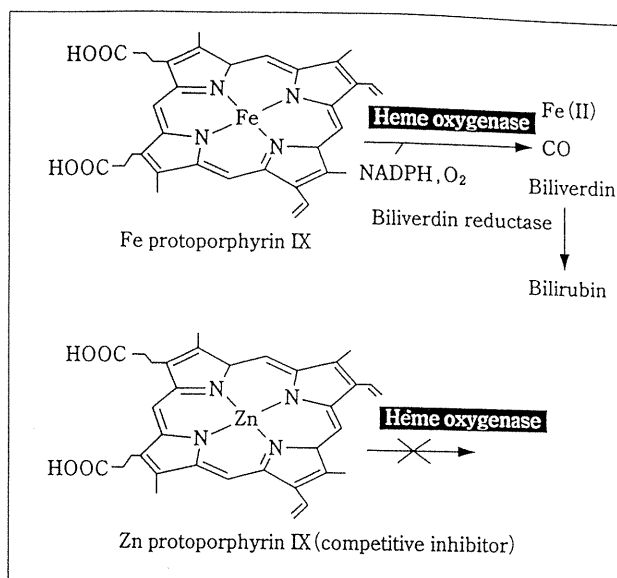


図1 heme oxygenase (HO) によるヘムの酸化的分解と CO の生成。zinc protoporphyrin IX は HO の拮抗阻害剤であるが種々のヘム酵素に対する直接の阻害効果も知られている。

のポルフィリン環への酸素添加反応により、 α -メテン炭素での開裂を起こし、同モルの一酸化炭素と三価鉄-ビリベルジン錯体を生成し、最後に NADPH/チトクロム P-450 レダクターゼにより鉄が二価に還元され、鉄とビリベルジンを生成する (図 1)¹⁾。ビリベルジンはビリベルジンリダクターゼによりビリルビンとなり、抱合されて胆汁中に排泄される。鉄は ferritin に結合し貯蔵鉄として細胞内に蓄えられる。HO にはストレス応答で誘導される HO-1²⁾ と、構成型の HO-2³⁾ が知られている。HO-1 の遺伝子発現調節領域には HRE (hypoxia responsible element), AP-1 等のドメインがあり種々の生体侵襲に反応して蛋白の発現が起こる。これに対して HO-2 は発現誘導を起こす因子が報告されていない (表 1)。また基質である protoheme IX に対する Km 値は HO-2 よりも HO-1 がやや低く、誘導型酵素の方が heme の分解活性が高いと考えられる。

体内において最も HO 活性の高い臓器は脳、精巣、肝、脾の四つである。しかしながら HO isozymes の臓器内分布については脳、精巣等での報告が散見されるのみで、肝、脾等網内系での分布についてはまだ十分な知見が得られていない。著者らは最近ラットの HO-1, HO-2 の高発現細胞を樹立し、これらの細胞のミクロソーム分画をマウスに免疫し交叉反応を示さない抗ラット HO-1, HO-2 モノクローナル抗体 (GTS-1,

*慶應義塾大学医学部医化学教室

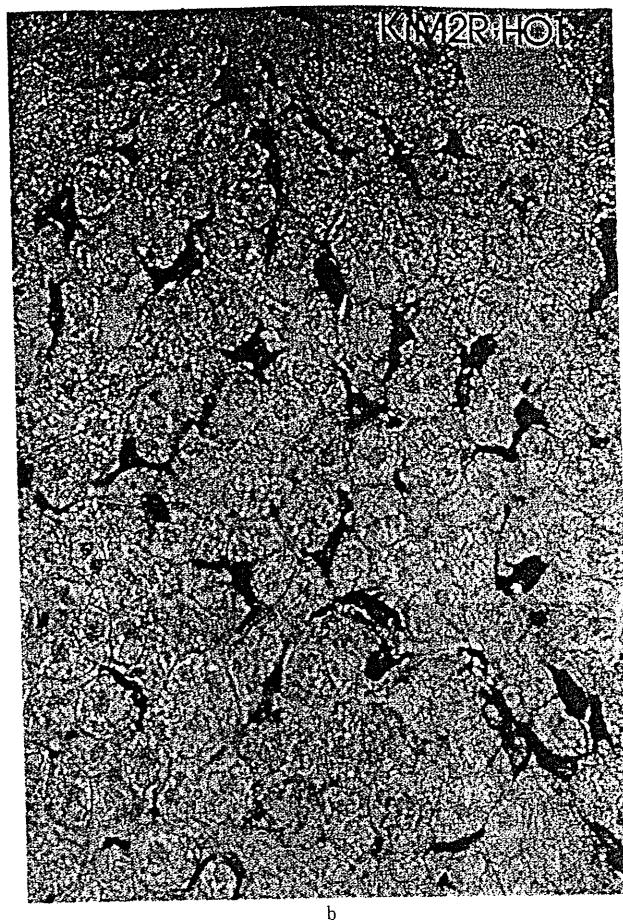
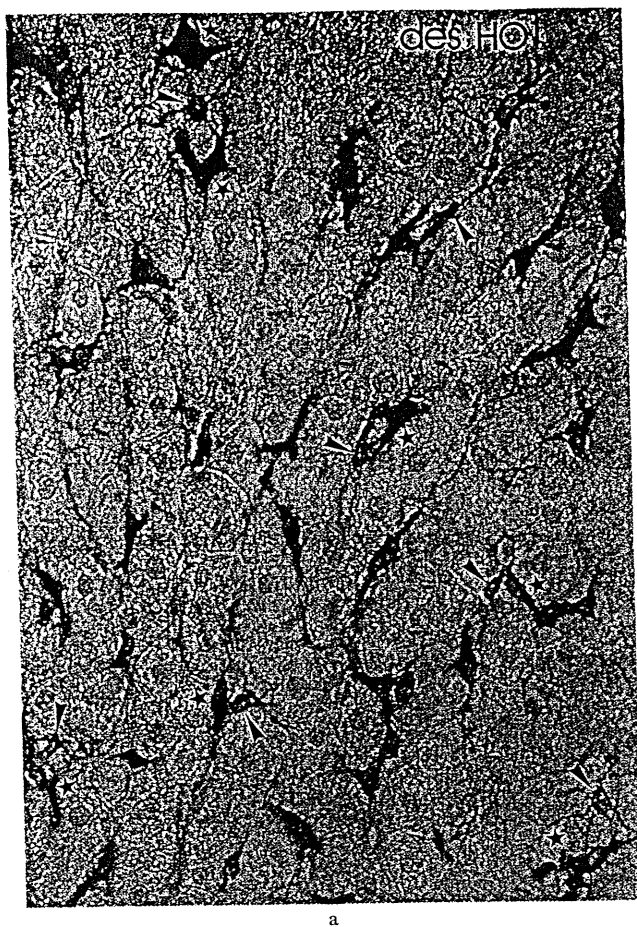


図2 抗ラット HO-1 モノクローナル抗体 GTS-1 による肝臓の免疫二重染色像 a では GTS-1 による染色を茶色(★印), 抗デスミン抗体による伊東細胞の染色を紫色(矢頭)で示した. b では抗 KiM2R 抗体による KC の二重染色を行った. a では両者は局在が解離しており, b では両者が重なっていることから, HO-1 は主に KC に局在することが明らかとなった. (文献 4 より許可を得て引用).

表1 Heme oxygenase isozymes (HO-1, HO-2)の比較(文献 1 より改変)

	HO-1	HO-2
分子量	32kDa	36kDa
熱に対する感受性 (60°C, 10分処理での活性の喪失)	30%	80%
活性に必要なもの	O ₂ , NADPH, NADPH/チトクロム P-450 レダクターゼ	
protoheme IXの Km 誘導物質	0.24 μM ヘム, Hb, 低酸素(hypoxia), オキシダント, エンドトキシン, 熱ショック	0.40 μM ?

GTS-2)を作製した. これらの抗体を用いた免疫組織化学により, ラットの正常な肝臓では HO-1 が KC に, HO-2 が肝実質細胞に発現していることが示された⁴⁾(図2). また内毒素で刺激を受けた肝では, KC のみならず肝実質細胞にも発現が増強することが示された⁴⁾. GTS-1 により行った他の臓器における HO-1 の発現パターンをみると脾臓に分布するマクロファージ, 肺胞マクロファージ, 脳の microglia, 網膜の網膜色素細胞等, 活発な貪食能をもつ細胞に強い発現が認められた(未発表データ). 従来脾臓に HO の活性が高いことが, 老廃赤血球が破壊され, HO-1 の誘導物質である protoheme IX に恒常的に曝露されるためと考えられてきた¹⁾. しかしながら著者らの免疫組織学的所見によれば脾臓における HO の発現は HO-1 がほとんどであるものの, 老廃赤血球の代謝部位である赤脾

髓のマクロファージのみならず、相対的に食能が低い白脾髄と赤脾髄の境界域にあるマクロファージにも強い発現が認められた。赤脾髄は脾微小循環の下流にあたるため、境界域のマクロファージでの HO-1 の発現は protoheme IX に対する恒常的曝露では説明がつかない。最近、histiocytic lymphoma cell を phorbol myristate acetate (PMA) で分化誘導させると食能等のマクロファージの形質を発現するがその過程で HO-1 の誘導が起こること、HO-1 の promotor 領域に PMA が作用して転写活性が上昇する element が存在することが示された。体内のマクロファージに HO-1 の恒常的な発現が認められる所見との関連が注目される⁹⁾。

II. 細菌における HO の役割

鉄の再利用動態は生体にとってのみならず、生体内に棲む細菌や寄生虫の生存にも大きな影響を与える。哺乳動物の鉄の大部分は ferritin やヘモグロビン、ミオグロビンの形で細胞内空間に存在し、血液中でも鉄結合蛋白である transferrin の形で存在するため、体内で細菌や寄生虫が遊離鉄を利用できる機会には限度がある。したがってこれらの生物は毒素を用いて宿主細胞を壊したり、赤血球内に寄生してヘモグロビンを重合体として貯蔵したり、必要に応じて分解、利用する仕組みを進化させている。このような仕組みのうち細菌がヘム鉄を再利用するための独自の HO 系をもつことが最近明らかになった⁹⁾。この HO はジフテリア菌においてクローニングされた 28kDa の蛋白であり、哺乳類の HO-1 同様 protoheme IX をビリベルジン IX α に特異的に分解し、同時に protoheme IX により誘導がかかる。またこの HO の promotor にはジフテリア毒素の共通のものがあり、ヘムの分解反応と毒素生成による宿主細胞破壊によるヘム鉄利用の促進がリンクして起こる巧妙な代謝系を形成している。ジフテリア菌以外にもこの HO 系が存在することも示されているが、今後マラリアやトリパノソーマ等赤血球に寄生しヘム鉄を栄養源として利用できる原虫類での HO 活性の存在とその役割が注目される。また感染防御系としての網内系の役割を考慮すると、マクロファージの HO-1 は食に際してヘム鉄利用の競合により細菌の生育に抑制的役割を果たす可能性も考えられよう。

III. 肝における CO の生成と類洞血流維持のメカニズム

ヘム分解に際して生じるガス状物質である CO は NO 同様 soluble guanylate cyclase (sGC) を活性化させ cGMP を上昇させる作用があることが知られていた。このため HO の発現の強い臓器では CO を介した情報伝達の可能性が提唱されている。しかしながら *in vitro* での CO の sGC の活性化能は NO の数十分の一であると報告されており⁷⁾、その意味で NO、CO の量論的比較に基づいた CO による機能調節の研究はきわめて少ない。分離灌流肝(ラット)を用いたわれわれの検討では、正常灌流肝では肝静脈からのサンプル中約 0.1~0.4 μ M 程度の CO が遊離してくることが、ミオグロビンを用いた分光分析で明らかとなった^{8,9)}。これは流量にして約 0.6 nmol/min/g liver に相当する。肝における CO 生成系は全体の約 2/3 が肝実質細胞に局在するといわれている。初代培養分離肝細胞を用いた検討では、約 30 nmol/hour/ 10^8 cells 程度の CO 生成が検出できた¹⁰⁾。これは湿重量 1 g に約 10^8 個の肝細胞が存在すると仮定するとほぼ 0.5 nmol/min/g liver に相当することから、正常肝では肝細胞からの CO の生成が大部分を占めることになる⁹⁾。また HO はヘムを分解し同モルのビリベルジンと CO を生成し、ビリベルジンは同モルのビリルビンに変換されるため、CO とビリルビンの生成量の量的関係はほぼ一致する¹¹⁾。すなわち肝微小循環系は、肝実質細胞から遊離された CO に常に曝露されていると考えられる。もちろんこれらは分離灌流系を用いた測定に基づく概算であり、生体内では類洞血流から供給される遊離ヘムや老廃赤血球由来のヘモグロビンを KC が代謝する可能性があり、CO 生成はさらに増加すると思われる。

肝臓で steady state で生成されている CO は、HO の拮抗阻害剤である zinc protoporphyrin-IX (ZnPP) (図 3)⁹⁾ を投与すると検出できなくなる。この状態での灌流肝は 30~50% の血管抵抗の増加を示すようになる。ここに 1 μ M 程度の CO あるいは 8 Br-cGMP を投与すると灌流圧の上昇は抑制されたことから、内因性に生成される CO が、steady state における肝血管抵抗の調節因子であることが示された^{8,9)}。この抵抗要素は門脈血管でなく類洞血管であることを、生体顕微鏡下の肝微小循環観察法で調べることができる⁹⁾。この際、類洞は不連続性の収縮を示すが、収縮部位が血管周皮細胞である伊東細胞に一致した。類洞には平滑筋細胞が存在せず、これまで周皮細胞であるこの細

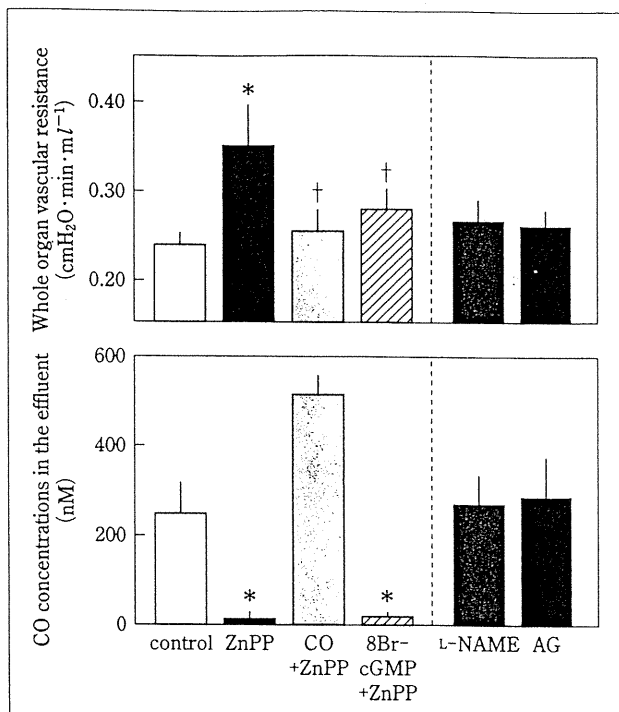


図3 ラット分離灌流肝におけるCOの生成と血管抵抗に対する各種薬剤の効果 ZnPP: zinc protoporphyrin IX, L-NAME, AG (aminoguanidine)はNO synthaseの阻害剤(文献9より許可を得て引用). *: $p < 0.05$ (controlに比して有意差), †: $p < 0.05$ (ZnPP群に比して有意差).

胞が収縮弛緩の調節要素として作用するものと考えられてきた。伊東細胞にはsGC活性がありCOのtargetの一つとして作用すると考えられる⁹⁾。この細胞には通常平滑筋細胞に豊富に認められる voltage-dependent Ca channelの発現がなく、内向き、外向き整流性K channelがあり、伊東細胞同士にも gap junctional communicationがあるため、膜の脱分極に対応して自らの膜電位をKの平衡電位付近に低く保ち抗興奮性を維持するのが本来の役割と考えられる。COにはK channelの開口確率を上げ膜を過分極させる作用も報告されているが、伊東細胞のパッチクランプでは電流量がきわめて小さいため、これを証明するに至っていない^{12,13)}。驚くべきことにL-NAMEやaminoguanidineのようなNO synthase阻害剤を1 mM投与しても昇圧反応が起こらない。以上のことから、NOはsteady stateでの肝血管抵抗の調節因子とは考えにくいと思われた(図3)。

肝臓におけるNOの生成は最終代謝産物であるNO₂⁻, NO₃⁻をGreiss法によって測定したり、スピントラップ剤で捕捉してESRで検出可能である。正常肝灌流モデルではGreiss法での検出感度以上のNOx

は検出できないが、ObolemskayaらのグループのESRによる計測によればスピントラップ剤で直接捕捉できるNOの生成は30 pmol/min/g liver程度であるという¹⁴⁾。一方Miskoらは肝灌流モデルでのsteady stateのNO₂生成をdiaminonaphthaleneを用いた蛍光法¹⁵⁾により評価している。これによると肝静脈灌流液中のNO₂は、たかだか0.1 nmol/min/g liver程度である。したがって局所におけるNOの実効濃度はCOのそれと比べて著しく低いと思われる。また、生成したNOは肝臓においてKC等で生成されるO₂⁻によって消去されることがSpitzerらのグループによって明らかにされた¹⁶⁾。生体内の肝微小環境においてはCO濃度がNO濃度よりきわめて高いと考えられること、COの主要な生成部位が血管外に位置する肝実質細胞にあることで、血液中のヘモグロビンに捕捉される前に類洞弛緩メカニズムを担う伊東細胞に作用できること等が、この臓器においてCOがactiveな血管拡張因子と作用しうる要因であると考えられる¹⁷⁾。

IV. 肝臓におけるヘム分解の区画制御と人工酸素運搬体の設計原理

肝臓におけるCOを介した類洞拡張作用があること、COを消去すると類洞が収縮し生理的な血流が維持できなくなることが明らかにされたことをきっかけとして、最近注目されている人工酸素運搬体(人工赤血球)の設計原理にも再検討が迫られつつある。現在開発が進められている人工酸素運搬体は期限切れの輸血サンプル中の赤血球から抽出したヘモグロビンを分子内、分子間で架橋し腎での限外濾過を防いだ無細胞型と、高濃度のヘモグロビンをリポソームで封入した細胞型に大別される。

肝臓は老廃赤血球の分解臓器の一つとして重要であるにもかかわらず、赤血球やヘモグロビンの肝内分解プロセスに関する研究は数少ない。Schmidらは¹⁸⁾1970年代に肝臓におけるヘムの分解機序を詳細に検討し、分離培養した実質細胞(肝細胞)と非実質細胞分画(KC)に遊離ヘモグロビンと赤血球を添加すると、非実質細胞では赤血球添加時に、実質細胞では遊離ヘモグロビン投与時にビリルビン生成が亢進することを明らかにした。その後四半世紀を経て著者らによりHO-1, -2がそれぞれKCと肝細胞が特異的に分布することが明らかにされたことにより、二つのisozymesが細胞特異的なヘムの分解系を形成することが示唆された⁹⁾。老廃赤血球やリポソーム封入型のヘモグロビン

は体内に投与すると KC をはじめとする組織マクロファージに取り込まれるが、遊離ヘモグロビン分子や、前述の無細胞型人工酸素運搬体である分子間架橋型ヘモグロビン、さらにこれらが細胞外で自己酸化を受けてできるメトヘモグロビン (metHb) は肝臓の類洞内皮細胞に存在する径 100~150 nm 程度の篩板状小孔 fenestration を容易に通るため肝細胞の HO-2 で分解されてしまうものと考えられる。すなわち肝臓に到達した無細胞型酸素運搬体は容易に血管外空間 (Disse 腔) に到達することにより、生理的な類洞弛緩に必要な CO を捕捉して血管抵抗を上昇させる危険性がある。事実正常ラット分離灌流肝にオキシヘモグロビン (HbO₂) を投与すると血管抵抗は 50% 程度増加するが、これをリポソームに封入した径約 250 nm の粒子を投与した際には抵抗の増加は起こらなかった。また CO を結合することのできない metHb の投与では血管抵抗の上昇が認められなかった⁴⁾。metHb には NO の捕捉作用があることを考慮すると、同時にこれらの所見は正常肝では内因性の CO が血管抵抗を低く保つために必要であることを確認する成績となった (図 4)。

通常体内に投与された赤血球が老廃化すると、これを処理するのは肝臓の場合類洞血管内に局在する KC である。一方、分子状酸素運搬体が投与された時その代謝の主な場を提供するのは肝実質細胞となる。前述したように類洞血管外の CO は血流の維持に不可欠であるため、その生理作用をキャンセルしないためには人工酸素運搬体に用いられるヘモグロビン分子が KC で徐々に分解を受け、胆汁色素として肝外に分泌されるような設計をする必要があると思われる。腎排泄防止を考慮して作製された α - α crosslinked Hb は分解されにくい CO 捕捉剤として Disse 腔にとどまり、著明な肝血管抵抗上昇反応を起こすことを著者らは見出している (未発表データ)。

さらに shock 等の生体侵襲を受けて HO-1 が誘導された個体では体内に投与されたヘム分子の分解は正常とは様相を異にすることが想像にかたくない。内毒素曝露時には肝臓では肝実質細胞全域に HO-1 の誘導がかかると同時に NO synthase の共誘導がかかる。このような状況ではヘモグロビン分子を投与すると正常肝でみられる 2 倍程度の抵抗の上昇があらわれる。一方 NO は捕捉するが CO を捕捉できない metHb を投与すると正常ではみられないような血管抵抗の上昇が観察できる。これらの所見は内毒素血症では正常時の CO に代わって NO が抵抗を低く保つ因子として

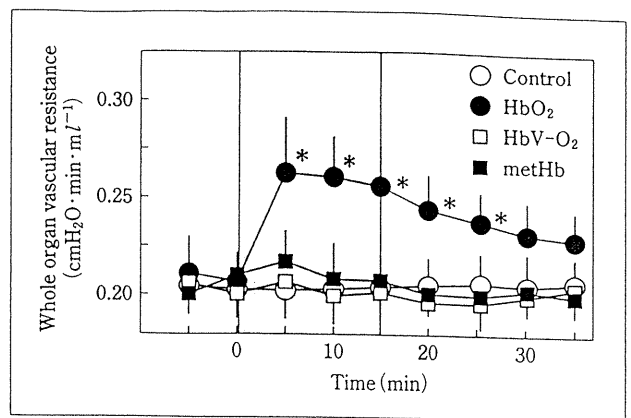


図4 ラット分離灌流肝における HbO₂, metHb, liposome-encapsulated HbO₂ (HbV-O₂) 投与時の血管抵抗上昇反応の相違 CO, NO をともに捕捉できる HbO₂ では抵抗の上昇が起こり, NO が捕捉できるものの CO を捕捉できない metHb では昇圧反応が認められないことから, CO が肝の低い血管抵抗を維持するために不可欠であることが示された. fenestration を通過できない径 250 nm の HbV-O₂ では抵抗の上昇が起こらないことから, 類洞外空間の CO が捕捉されることにより抵抗が上昇することがわかる (文献 4 より許可を得て引用). *: p < 0.05 で control に比して有意な上昇.

作用していることを意味している。興味深いことに同濃度の HbO₂ と metHb では血管抵抗の上昇作用は異なり、後者は前者の 50% 程度の作用しかあらわさない。著者らは当初両者の NO 捕捉作用の違いがその理由であると考えたが、ヘマトクリットの 10% 程度の濃度で投与すると、静脈灌流液の NO₂⁻ が双方で完全に低下するにもかかわらず、血管抵抗の差は存在することから、別のメカニズムによる現象と考察した。metHb は Hb に比べ蛋白分子からの protoheme IX の遊離を起こしやすく、事実投与後数分の単位で胆汁中にビリルビンとして分泌されてくることが明らかにされた (未発表データ)。すなわち肝臓に投与された metHb は Disse 腔に分布し NO を捕捉して血管を収縮させるばかりではなく、基質として肝細胞に取り込まれて CO を生成することにより消去された NO 依存性の血管拡張作用を代償している可能性が示唆される。このことは内毒素肝では aminoguanidine のような誘導型 NO synthase の阻害下で 1 mM 程度のごくわずかな CO を流すだけで血管抵抗が 30% 程度低下することからも支持される。細胞外空間に投与されたヘモグロビン分子はすみやかにメト化され HO により胆汁色素として排泄される。ヘモグロビンのメト化は人工酸素運搬体の寿命を延長させるための技術的ハードルとなっているが、無細胞型の酸素運搬体を投与する場合、分子架橋して代謝を遅らせると CO 生成に

よる血管拡張代償機転が働かず，ガス状物質の捕捉作用だけが持続することになる可能性がある。無論，リポソーム型酸素運搬体にも代謝に伴うマクロファージからのサイトカインの放出の問題等現状でクリアすべき問題点は指摘されている。しかしながら小胞化して血管内にとどまるようにしたヘモグロビン分子には，血管外に存在するNOやCOを介した血管拡張メカニズムを損なうことなくKCのような血管内の常在マクロファージに存在する生理的分解機転で代謝される点で大きな利点があると考えられる。

文 献

- 1) Maines, M. D. : Heme oxygenase; function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 1998, **2**: 2557-2568
- 2) Shibahara, S., Müller, R., Taguchi, H. and Yoshida, T. : Cloning and expression of cDNA of rat heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, **82**: 7865-7869
- 3) Maines, M. D., Trakshel, G. M., Kutty, R. K. : Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. *J Biol Chem* 1986, **261**: 411-419
- 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**: 604-612
- 5) Muraosa, Y., Shibahara, S. : Identification of a cis-regulatory element and putative trans-acting factors responsible for 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-mediated induction of heme oxygenase expression in myelomonocytic cell lines. *Mol Cell Biol* 1993, **13**: 7881-7891
- 6) Wilks, A., Schmitt, M. P. : Expression and characterization of a heme oxygenase (Hmu O) from *Corynebacterium diphtheriae*. Iron acquisition requires oxidative cleavage of the heme macrocycle. *J Biol Chem* 1998, **273**: 837-841
- 7) Kharitonov, V., Sharma, V. S., Pilz, R. B. et al. : Basis of guanylate cyclase activation by carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**: 2568-2571
- 8) Suematsu, M., Kashiwagi, S., Sano, T. et al. : Carbon monoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, **205**: 1333-1337
- 9) Suematsu, M., Goda, N., Sano, T. et al. : Carbon monoxide; An endogenous modulator of sinusoidal tone in perfused rat liver. *J Clin Invest* 1995, **96**: 2431-2437
- 10) Shinoda, Y., Suematsu, M., Wakabayashi, Y. et al. : Carbon monoxide as a regulator of bile canalicular contractility in cultured rat hepatocytes. *Hepatology* 1998, **28**: 286-295
- 11) 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* 1997, **272**: G1268-G1275
- 12) Kashiwagi, S., Suematsu, M., Wakabayashi, Y. et al. : Electrophysiological characterization of cultured hepatic stellate cells in rats. *Am J Physiol* 1997, **272**: G742-G750
- 13) Rich, A. G., Farrugia, G., Rae, J. L. : Carbon monoxide stimulates a potassium-selective current in rabbit corneal epithelial cells. *Am J Physiol* 1994, **267**: C435-C442
- 14) Obolenskaya, M. Y., Vanin, A. F., Mordvintcev, P. I. et al. : EPR evidence of nitric oxide production by the regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, **202**: 571-576
- 15) Misko, T. P., Schilling, R. J., Salvemini, D. et al. : A fluorimetric assay for the measurements of nitrite in biological samples. *Anal Biochem* 1993, **110**: 258-266
- 16) Bautista, A. P., Spitzer, J. J. : Inhibition of nitric oxide formation in vivo enhances superoxide release by the perfused liver. *Am J Physiol* 1994, **266**: G783-G788
- 17) Suematsu, M., Wakabayashi, Y., Ishimura, Y. : Gaseous monoxides; A novel regulator of microvascular function in the liver. *Cardiovasc Res* 1996, **32**: 679-686
- 18) Bissell, M. D., Schmid, R. : Hemoglobin and erythrocyte catabolism in rat liver; The separate roles of parenchymal and sinusoidal cells. *Blood* 1972, **40**: 812-822

Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with a red cell substitute consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin

Hiroshi Sakai,^{1,2} Amy G. Tsai,¹ Heinz Kerger,¹ Sung-Ick Park,² Shinji Takeoka,² Hiroyuki Nishide,² Eishun Tsuchida,² Marcos Intaglietta¹

¹Department of Bioengineering, University of California, San Diego, La Jolla, California 92093-0412, USA

²Department of Polymer Chemistry, Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University, Tokyo 169, Japan

Received 30 January 1997; accepted 2 June 1997

Abstract: Phospholipid vesicles encapsulating purified hemoglobin [Hb vesicles (HbV); diameter 259 ± 82 nm; oxygen affinity 31 mm Hg; [Hb] 5 and 10 g/dL] were developed to provide oxygen-carrying capacity to plasma expanders. Their function as a blood replacement was tested in the subcutaneous microvasculature of awake hamsters during severe hemodilution in which 80% of the red blood cell mass was substituted with suspensions of the vesicles in 5% human serum albumin (HSA) solution. Vesicles were tested with membranes that were unmodified (HbV/HSA) or conjugated with polyethyleneglycol (PEG) on the vesicular surface (PEG-HbV/HSA). The viscosity of 10 g/dL HbV/HSA was 8 cP at 358 s^{-1} owing to the intervesicular aggregation, while that of 10 g/dL PEG-HbV/HSA was 3.5 cP, since PEG chains inhibit aggregation. Both materials yielded normal mean arterial pressure, heart rate, and blood gas parameters at all levels of exchange, which could not be achieved with

HSA alone. Subcutaneous microvascular studies showed that PEG-HbV/HSA significantly improved microhemodynamic conditions (flow rate, functional capillary density, vessel diameter, and oxygen tension) relative to unmodified HbV/HSA. Even though the enhancement of PEG modification did not achieve the functional characteristics of the blood-perfused microcirculation, PEG reduced vesicular aggregation and viscosity, improving microvascular perfusion relative to the unmodified type. These results highlight the significance of microvascular analysis in the design of red cell substitutes and the necessity of surface modification of HbV to prevent aggregation. © 1998 John Wiley & Sons, Inc. *J Biomed Mater Res*, 40, 66–78, 1998.

Key words: red cell substitute; microcirculation; hemoglobin; liposome; polyethyleneglycol

INTRODUCTION

Acute normovolemic hemodilution with plasma expanders is a clinically used practice to reduce the need for blood transfusion. In general, it is possible to survive very low hematocrits such as 70% loss of red blood cell (RBC) mass; however, at these reduced levels of oxygen-carrying capacity, physiologic compensatory adjustments are eventually insufficient to fully maintain metabolism. An oxygen-carrying fluid is re-

quired when severe hemodilution occurs at surgical settings such as extracorporeal cardiopulmonary bypass, or RBC mass losses exceeding 30%. The problems of the present blood transfusion system such as blood-borne infections, difficulties in storage, and complicated specification accelerate the development of oxygen-carrying fluids, especially hemoglobin (Hb)-based oxygen carriers. Phospholipid vesicles containing concentrated hemoglobin [Hb vesicles (HbV)] have the potential to become industrially produced red cell substitutes,^{1–4} and most closely reproduce the characteristics of natural blood including the red cell membrane function of physically preventing direct contact of Hb with the cellular components of circulation. The desirability of this barrier function is evident in considering the side-effects found in the use of acellular Hb solutions such as chemically modified Hb and recombinant Hb, which are now in clinical

Correspondence to: H. Sakai

Contract grant sponsor: USPHS/NHLBI; Contract grant number: HL48018

Contract grant sponsor: Ministry of Education, Science, Sports, and Culture, Japan; Contract grant number: 07508005

© 1998 John Wiley & Sons, Inc. CCC 0021-9304/98/010066-13

trials.⁵ The principal systemic side-effect consistently reported in the administration of acellular Hb solutions is a pressor response.^{6,7} The origin of this reaction has been attributed to the nitric oxide (NO) scavenging effect of Hb, owing to the intrinsic high affinity of NO to Hb, a process presumed to lead to vasoconstriction.⁸ The hypothesis has also been advanced that owing to the high oxygen availability from dissolved Hb, the microcirculation responds according to classic autoregulatory theory and limits oxygen delivery by restricting flow, thus increasing peripheral vascular resistance and blood pressure.⁹ Moreover, NO-scavenging induces platelet activation,¹⁰ and acellular Hb enhances biological activity of endotoxin by complex formation.¹¹ Intraperitoneal bleeding has been associated with the use of Hb solutions, leading to severe colic. A common factor in these adverse reactions is the direct contact of the Hb molecule with the vascular tissue, a problem that is, in principle, solved by encapsulating Hb with phospholipid vesicles.⁴ This approach potentially shields the microcirculation from the biological activity or toxicity of Hb and Hb-related products such as metHb and released heme. Furthermore, the technology allows the co-encapsulation of chemical reagents or enzymes in vesicles and/or their embedding in a lipid bilayer.

Studies of phospholipid vesicles for application to drug delivery systems have shown that they present a particular set of problems including saturation of the reticuloendothelial system (RES), complement activation, and hemodynamic modifications. Polyethyleneglycol (PEG)-conjugated lipid has been incorporated into the bilayer membrane to sterically stabilize the vesicles, evade RES, and prolong the circulation time.^{12,13} PEG modification of HbV was first reported in 1989 by Terumo Co. (Tokyo, Japan), who showed that PEG-HbV induced less aggregation in the presence of water-soluble polymers and lower viscosity.^{14,15} PEG modification also has been shown to reduce immunological responses and to prolong circulation time.¹⁶ PEG-HbV has been investigated in terms of systemic responses and oxygen-carrying capacity in resuscitation from hemorrhagic shock, hemodilution, extracorporeal cardiopulmonary bypass, etc., with excellent results.^{15,17,18} PEG-modified HbV, like all proposed blood substitutes, perform their principal functions in the microcirculation. The present study was designed to determine the subcutaneous microhemodynamic behavior of PEG-HbV suspended in the clinically used 5% human serum albumin (HSA) solution in comparison with unmodified HbV and HSA using the experimental design of conscious hamsters fitted with dorsal skinfold chambers.^{9,19-28}

MATERIALS AND METHODS

Preparation of polyethyleneglycol-modified hemoglobin vesicles (PEG-HbV)

Hemoglobin vesicles were prepared as previously reported in the literature.^{29,30} The encapsulated carbonylhemoglobin (ca. 38 g/dL) contained pyridoxal 5'-phosphate (18 mM; Merck Co., Whitehorse Station, NJ) as an allosteric effector and DL-homocysteine (5 mM; Aldrich Co., Milwaukee, WI) as a metHb reductant. The lipid bilayer included Presome PPG-I (a mixture of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine, cholesterol, and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol; Nippon Fine Chem. Co., Tokyo, Japan) and α -tocopherol (Merck Co.) at a molar composition of 5/5/1/0.1. Sizing was obtained by extrusion and unencapsulated Hb was removed by ultracentrifugation (50,000 g, 40 min). The surface modification of HbV with PEG was performed by mixing the HbV suspension with a saline solution of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-(polyethyleneglycol) (PEG-DPPE; Avanti Co.) at 37°C under a CO atmosphere and stirring for 30 min. The hydrophobic fatty acid chains of PEG-DPPE were automatically anchored to the outer surface of the bilayer membrane of HbV. The incorporation ratio was more than 90% with no change in diameter or noticeable Hb leakage,¹⁵ allowing precise comparison between surface-modified and unmodified HbV. Carbonylhemoglobin was converted to oxyhemoglobin by illumination with visible light under an O₂ atmosphere.³¹ PEG-HbV was ultracentrifuged and re-dispersed in 5 g/dL human serum albumin (HSA) solution (Albumin 5%-cutter; Bayer Co., Germany). The suspension was then filtered through sterilizable filters (Dismic; Toyo Roshi Co., Tokyo, Japan; pore size: 0.45 μ m), and the Hb concentration was regulated to 5 or 10 g/dL using the HSA solution to obtain 5 and 10 PEG-HbV/HSA. The unmodified HbV suspended in the HSA solution (5 and 10 HbV/HSA) was prepared in the same manner. The characteristics of 10 PEG-HbV/HSA and 10 HbV/HSA are listed in Table I. The particle diameter was regulated to ca. 250 nm; oxygen affinity of Hb was regulated to 31–33 mm Hg by coencapsulation of pyridoxal 5-phosphate, which was slightly lower than that of human and hamster (ca. 28 mm Hg). The viscosities of 10 HbV/HSA and 10 PEG-HbV/HSA were measured with an oscillatory capillary rheometer (Anton Parr, Austria).

Animal model and preparation

Experiments were carried out in 53 male Syrian golden hamsters of 72 \pm 11 g body weight (Simonsen Lab., Gilroy, CA). All the animals were housed in cages and provided with food and water *ad libitum* in a temperature controlled room on a 12:12 h day/night cycle. The dorsal skinfold consisting of two layers of skin and muscle was fitted with two titanium frames with a 15-mm circular opening and surgically installed under intraperitoneal sodium pentobarbital anesthesia (ca. 100 mg/kg body weight; Abbott Lab., North Chicago, IL).²⁸ Layers of skin muscle were separated from

TABLE I
Physicochemical Characteristics of PEG-Modified and Unmodified Hemoglobin Vesicles Suspended in 5% Human Serum Albumin (HSA) in Comparison with Human Blood

	10 PEG-HbV/ HSA	10 HbV/ HSA	Human Blood
Diameter (nm)	259 ± 82	254 ± 82	ca. 8000
P ₅₀ (mm Hg)	31	33	28
Hb (g/dL)	10	10	12–17
Lipid (g/dL)	5.7	5.7	1.8–2.5*
Hb/Lipid (g/g)	1.9	1.9	ca. 6.7†
metHb (%)	2.5	2.5	<0.5
Viscosity (cP at 230 s ⁻¹)	3.7	8.0	3–4
Osmolarity (mOsm)	300	300	ca. 300
Oncotic pressure (mm Hg)	20	20	ca. 25
pH at 37°C	7.4	7.4	7.2–7.4

*Total cell membrane components.

†Weight ratio of Hb to total cell membrane components.

the subcutaneous tissue and removed until a thin monolayer of muscle and one layer of intact skin remained. A cover glass (diameter 12 mm) was held by one frame on the exposed tissue allowing intravital observation of the microvasculature and tissues, as shown in Figure 1.

Polyethylene catheters (PE-50; Becton Dickinson, Parsippany, NJ) were implanted in the jugular vein and the carotid artery. They were passed subcutaneously from the ventral to the dorsal side of the neck and exteriorized through the skin at the base of the chamber. The patency of the catheters was ensured by filling with heparinized saline (40 IU/mL).

Microcirculatory observations of the awake and unanesthetized hamsters were performed 2 days after chamber implantation, thus mitigating postsurgical trauma. During the measurement, the animals were placed in a porous plastic tube (inner diameter 3.8 cm; length 17 cm) from which the window chamber protruded to minimize animal movement without impeding respiration.

A preparation was considered suitable for experimentation if microscopic examination of the window chamber met the following criteria: no sign of bleeding and/or edema, systemic mean arterial pressure >80 mm Hg, heart rate above 320 beats/min.

All animal studies were approved by the Animal Subject Committee of the University of California, San Diego, and NIH guidelines for the care and use of laboratory animals (NIH Publ. No. 85-23, Rev. 1985) were observed.

Experimental procedure

Isovolemic hemodilution with the experimental fluids was performed by simultaneous withdrawal of blood from the arterial catheter and infusion of the test substitutes into the venous catheter at a rate of 0.3 mL/min. Systemic blood volume was estimated as 7% of the total body weight (BW) (g). Blood was exchanged continuously, therefore, to estimate the necessary amount of HbV; the exchange was as-

sumed to consist of repeating n cycles of 0.01 mL withdrawal and sample injection. The level of exchange, LE (%), was therefore given by the expression (1):

$$LE (\%) = 100 \cdot \{1 - [(0.07 BW - 0.01)/0.07 BW]^n\}, \quad (1)$$

and a sample size at a given LE was expressed as $0.01 \cdot n$ (mL).

Measurements were performed at 0%, 30%, 60%, and 80% for the microhemodynamic and blood gas analyses. Thirty-six hamsters were exchange transfused in five groups with 10 g/dL Hb: (1) 10 PEG-HbV/HSA ($n = 8$), (2) 10 HbV/HSA ($n = 7$); 5 g/dL Hb: (3) 5 PEG-HbV/HSA ($n = 6$), and (4) 5 HbV/HSA ($n = 7$), and (5) HSA ($n = 8$). Mean arterial pressure (MAP) and heart rate were monitored continuously prior to and after each 10% substitution. The *in situ* microcirculation of the skinfold chamber was observed using a microscope monitor system. After blood substitution, a bolus intravenous (i.v.) injection of palladium porphyrin bound to bovine albumin solution (7.6 wt %, 0.1 mL) was injected to measure the oxygen tensions (PO₂) in vessels and interstitium.

Seventeen hamsters were used for the same oxygen tension measurement as the control group.

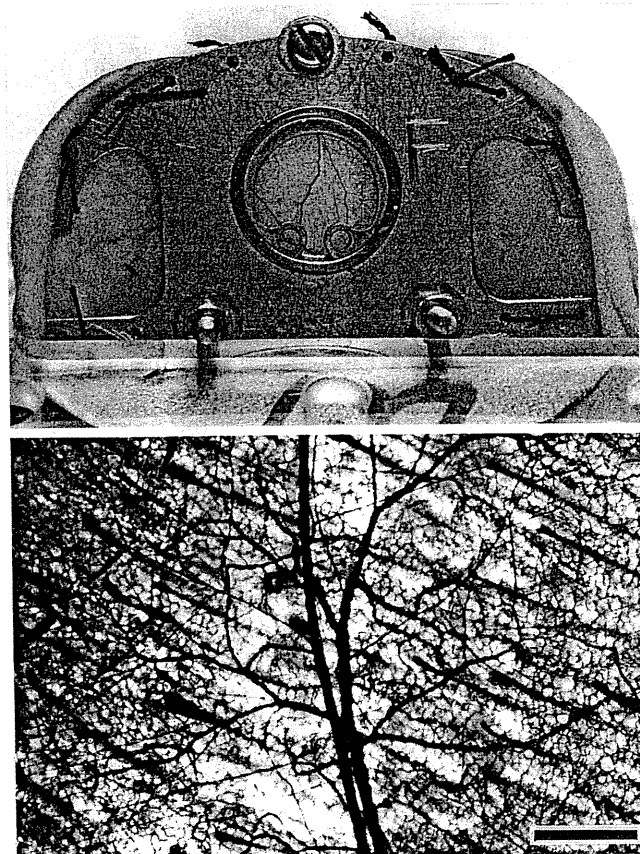


Figure 1. (Top) Dorsal skinfold chamber in a Syrian golden hamster used to visualize microvessels in the subcutaneous tissue. The diameter of the fixed glass window is 12 mm. (Bottom) Micrograph of subcutaneous microvasculature. A feeding arteriole (A1) and a large venule (V1) flow in parallel in the middle. The bar indicates 0.5 mm.

Systemic condition measurement

Blood samples were collected in heparinized microtubes (<100 μL ; Curtin Matheson Scientific, Norcross, GA) for the hematocrit and blood gas analyses. A pH/blood gas analyzer (Ciba Corning 238; Ciba Corning Diagnostic, Pleasanton, CA) was used for analysis of arterial blood oxygen tension (P_{aO_2}), arterial blood carbon dioxide tension (P_{aCO_2}), pH, and base excess. An analog recording system (Beckman R611; Beckman Instruments, Schiller Park, IL) was used for continuous monitoring of MAP and heart rate.

Microhemodynamic analysis

Microvessels in the subcutaneous tissue and skeletal skin muscle were observed with an inverted microscope (IMT-2; Olympus, Tokyo, Japan) using a $\times 40$ water-immersion objective (Olympus, Wplan) and transillumination technique. Microscopic images were recorded by a camera (Cohu 4815-2000, San Diego, CA) and transferred to a TV-VCR (Sony Trinitron PVM-1271Q monitor, Tokyo, Japan; and Panasonic AG-7355 video recorder, Tokyo, Japan).

Microvessels were classified according to their position within the microvascular network according to the previously reported scheme.²³ Arteriolar microvessels were grouped into large feeding arterioles (A1; diameter $52 \pm 13 \mu\text{m}$), small arcading arterioles (A2, $26 \pm 7 \mu\text{m}$), transverse arterioles (A3, $10 \pm 3 \mu\text{m}$), and terminal arterioles (A4, $8 \pm 3 \mu\text{m}$). Venules were classified as small collecting venules (Vc, $30 \pm 8 \mu\text{m}$) and large venules (Vl, $95 \pm 23 \mu\text{m}$). The microvessels for measurements were chosen for their optical clarity and not the nature of the flow. Capillaries and tissue segments selected for measurements were supplied and drained by the arterioles and venules of a functional microvascular unit. These microvessels and capillaries were sketched in advance to plan the sequence of measurements. Selection of vessels in terms of visibility may bias the measurements in the direction of high flow value; however, since the same vessels were measured throughout the study, the trends observed should be representative of the microcirculation as a whole.

Microvascular diameter and RBC velocity were analyzed on-line in arterioles and venules.^{32,33} Vessel diameter was measured with an image-shearing system (Digital Video Image Shearing Monitor 908; I.P.M., San Diego, CA); RBC velocity was analyzed by photodiodes and the cross-correlation technique (Velocity Tracker Mod-102 B; I.P.M.). Blood flow rates (Q) were calculated using the equation (2):

$$Q = (\text{RBC velocity}/R_v) \cdot \pi \cdot (\text{diameter}/2)^2 \quad (2)$$

R_v represents the ratio of velocity in the middle of vessels to whole-blood velocity based on the data in the glass tubes. This was reported in a study by Lipowsky and Zweifach,³⁴ where $R_v = 1.6$ for vessels with diameter of 17–60 μm and $R_v = 1.3$ for narrower vessels below 10 μm . Therefore, $R_v = 1.6$ was used for A1, A2, Vc, and Vl, and $R_v = 1.3$ for A3 and A4. R_v may change to some extent ($\pm 10\%$) if diameter and velocity change significantly. The difference in R_v is dependent on flow and behavior of blood in the low-shear-rate region

of the centerline. In our experiments, all results with vesicles led to a decrease in blood flow velocity with little change in diameters. The calculated trend in blood flow should be representative of the actual events taking place and not too sensitive of the potential 10% variation of R_v . The diameters and blood flow rates of A3 and A4 for the HSA group at 80% exchange could not be measured because of the ambiguity of the vessels caused by edema and decreased hematocrit usually present during severe hemodilution with plasma expanders.³⁵

Functional capillary density was analyzed on-line by counting the number of capillaries stemming from one A3 arteriole, usually 20–50 capillaries with RBC flow, and expressed as a percentage of the basal value.

Micrographs of the microvasculature were taken (Tmax 400 or 3200 film; Kodak; 1/500 or 1/1000-s shutter speed) with illumination from a high-pressure mercury lamp (Olympus; BH2-RFL-T2) with a cutoff filter (wavelength 420 nm). This form of illumination caused RBC, HbV, and PEG-HbV to become darker, which contrasted well with the background tissue since the Soret band of Hb molecule adsorbs this range of light.

Determination of microvascular and interstitial oxygen tensions

Subcutaneous microvascular and interstitial PO_2 was determined with the O_2 -dependent quenching of phosphorescence emitted by bovine serum albumin-bound metalloporphyrin complexes after pulsed light excitation.^{24,26,36} The method allows noninvasive assessment of intravascular PO_2 and determination of interstitial oxygenation, since intravascularly injected porphyrin complexes bound to albumin extravasate into the interstitium over time. The relationship between phosphorescence lifetime τ and oxygen tension is given by the Stern–Volmer equation (3):

$$\tau_0/\tau = 1 + kq \cdot \tau_0 \cdot \text{PO}_2 \quad (3)$$

where τ_0 and τ are the phosphorescence lifetimes in the absence of molecular oxygen and at a given PO_2 , respectively, and kq is the quenching constant, both factors being pH- and temperature-dependent.

Paradium-meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphyrin (Porphyrin Products, Logan, UT) bound to bovine serum albumin (Sigma) and diluted saline to a final concentration of 7.6 wt % was used as a phosphorescent dye ($\tau_0 = 600 \mu\text{s}$, $kq = 325 \text{ torr}^{-1} \text{ s}^{-1}$, at pH 7.4 and 37°C) and intravenously injected (0.1 mL).

Phosphorescence was excited by light pulse (30 Hz) generated by a 45-W xenon strobe arc (EG&G Electro Optics, Salem, MA), while PO_2 -measuring sites were microscopically vignetted by an adjustable slit. For microvascular PO_2 measurements, the slit was longitudinally fitted within the vessel, while for the analysis of interstitial PO_2 it was placed into intercapillary spaces strictly avoiding interference with blood vessels. Filters of 420 and 630 nm were used for porphyrin excitation and phosphorescence emission, respectively. Phosphorescence signals were captured by a photomultiplier (EMI 9855B; Knott Elektronik, Munich, Germany).