

199800446A

厚生科学研究費

高度先進医療研究事業

酸素運搬機能を有する人工赤血球の
開発に関する研究

平成 10 年度 総括研究報告書

平成 11 年 3 月

主任研究者 北 畠 顕

北海道大学医学部教授

総括研究報告書

酸素運搬機能を有する人工赤血球の開発に関する研究

主任研究者 北畠 顕 北海道大学医学部教授

研究要旨 臨床応用可能な、副作用の少ない新たなヘモグロビン (Hb) 修飾体系人工赤血球として、血中滞留時間を延長し、さらに Hb の一酸化窒素 (NO) 消去による副作用を軽減する目的で、分子量の大きなポリエチレングリコール (PEG) 修飾を加えた PEG-Hb を創製した。PEG-Hb の P50 は近赤外分光法を用いた脳組織内ミトコンドリア酸素濃度測定により 28mmHg とした。各種病態ラットを用いた、Hb 修飾体の循環動態や血小板作用への影響から、Hb のベータ鎖システイン残基へ一酸化窒素 (NO) を付加した S-ニトロソ Hb (SNO-Hb) がより望ましいことが確認された。従って、今後の臨床応用を考えた場合、その候補となりうる物質は SNO-PEG-Hb であろうと考えられ、特許申請を行った。また、新たなパーフルオロカーボン (PFC) 創製を目指し、その基材として、最新の乳化器を用いて PFC エマルジョンを作成した。このエマルジョンは、粒子の安定性、均一性もすぐれており、また粘性の調整も可能であった (特許申請準備中)。

分担研究者

佐久間一郎 北海道大学医学部 助手
藤井 聡 北海道大学医学部 助手
仲井 邦彦 東北大学大学院医学系
研究科 講師

A. 研究目的

1. 各種 Hb 修飾体の循環動態に対する影響

人工血液としてセルフリー Hb 修飾体を臨床応用利用する場合、一酸化窒素 (NO) の Hb による不活化に基づく血管収縮、腸管異常収縮、血小板活性化などの副作用が問題となる。本研究班では、Hb 修飾体に NO 放出能を付与した SNO-Hb 修飾体の検討を行っている。本年度は、各種病態モ

デルラットにおける SNO-Hb、臨床応用を考えて本研究班で新たに創製した PEG-Hb および SNO-PEG-Hb の循環動態への影響、NO 放出能を検索した。

2. 各種 Hb 修飾体の血小板に対する影響
本研究では血小板 β 3 インテグリンと細胞接着分子である P-セレクチンに注目し、各種 Hb 修飾体が血小板活性化をもたらすかを検討した。

3. 近赤外分光法を用いた検討

本研究班では、昨年度近赤外分光法を用い脳組織内ミトコンドリア酸素濃度測定を行う方法を確立した。本年度は本法を利用し、今後の人工赤血球分子設計の資料とすべく、P50 を変化させた場合の NRC および PEG-Hb の酸素運搬能の変化を検索した。

4. PEG-Hb および SNO-PEG-Hb の作成

本研究では、副作用の少ない酸素運搬体の開発を行なうことを意図し、Hb 修飾体に NO 放出能を付与し、Hb による NO 除去を代償することを考案した。具体的には、酸素運搬能および血中滞留時間を確保するためにそれぞれ piridoxalation および pegylation を行ない、さらに Hb の SH を S-nitrosylation し、SNO-PEG-Hb の作成を計画した。本年度は、その詳細な分子モデルを決定するとともに、リットル単位での中規模製造工程を確立、製剤供給を目指した。また、製剤の特許性を確保するために民間企業との共同で新規 PEG 修飾体を考案し、特許申請を行なうことを企図した。

5. 新規パーフルオロカーボン用エマルジョンの作成

人工血液とパーフルオロカーボン (PFC) エマルジョンが研究されてきた。PFC エマルジョンは、経皮的冠動脈拡張術での酸素補給液として製造許可を受けたものの、現在は製造中止されている。しかし米国を中心とし、さらに改良された PFC エマルジョンが、赤血球輸血代替のみならず、癌放射線治療、画像診断、臓器保存などでも治験が行われている。本研究班では新規高圧ジェット流反転型乳化機を用い、PFC エマルジョンの製剤改良を試みた。

B. 研究方法

1. 各種 Hb 修飾体の循環動態に対する影響

ハローセン麻酔下の各種病態モデルラット (Wistar ラット、Brown Norway ラット、糖尿病発症 OLETF ラット) で、大腿動脈カニューレシオンにより血圧・心拍数をモニターした。大腿静脈より Hb および各種 Hb 修飾体を静注した。Wistar ラットではマイクロダイアリスを用い、脳内の NO 濃度を HPLC を用いた $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 濃度計測により把握した。

2. 各種 Hb 修飾体の血小板に対する影響

上記動物の動脈血採血により、多血小板血漿 (PRP) を調整した。対照には同量の生理食塩水を用いた。血小板凝集計はレーザー散乱粒子計測法を用いた。凝集素には ADP とコラーゲンを用いた。

健常ヒト PRP をヘモグロビンとインキュベートした。活性化された血小板表面に発現された P-セレクトリンを、FITC 蛍光標識した抗 P-セレクトリン抗体とフローサイトメトリーを用いて直接的に活性化血小板を測定した。PAC-1 についてもフローサイトメトリーを用いて直接的に活性化血小板を測定した。

3. 近赤外分光法を用いた検討

雄性 Wistar ラットで、大腿静脈からウシ血清アルブミン (BSA) を 2%含有する NRC を注入しつつ、同時に大腿動脈から 1 ml/分 で脱血し、85%の血液を NRC に置換した。また、動静脈血中酸素濃度および自発脳波 (EEG) の測定を行った。NRC は IHP 添加量を調節した 2 種類 (P50=14、60 Torr、Hill 係数=2.1) を用いた。コントロール実験として BSA を含むリン酸 buffer で体内 Hb を同量にしたモデルを作製した。近赤外分光測定により Hb 酸素化度およびチトクローム酸化度を求めた。

創製された PEG-Hb に PLP を添加して、P50 を変化させた PEG-Hb-PLP を作製し、80%の血液を置換したモデルにおいて、近赤外分光測定を行った。

4. PEG-Hb および SNO-PEG-Hb の作成

従来法により精製 Hb の製造を行ない、酸素親和性の調節は pyridoxal 5'-phosphate による修飾を行なった。分子量 8450、20450 の各修飾剤を用い、異なる分子量の PEG-Hb 修飾体を作成した。

NO ドナーとしてニトロソグルタチオンを使用し、Hb 濃度 0.050 mM、0.1 M リン酸緩衝液 (0.5 mM EDTA)、pH 8.6、4°C にて 10 時間反応させ、生成物を適当な分画分子量の限外ろ過膜にて分離、濃縮した。最終製剤は生理食塩水に透析し

Hb10%とした。

蛋白質結合 SNO の解析は、HPLC ゲルろ過カラムを用いて分離後、ポストカラムにて HgCl_2 により SNO を遊離させ、生成した nitrite を Griese 試薬により発色させ定量した。SNO-PEG-Hb の SNO 部分の血中半減期解析は、200 mg/kg の Hb 溶液として大腿静脈に投与後、適当な時間を置いて採血し、直接 HPLC にて高分子画分から得られる SNO を定量した。

5. 新規パーフルオロカーボン用エマルジョンの作成

PFC としてフロリナート FC43(主成分：パーフルオロトリブチルアミン)、乳化剤として精製卵黄レシチンを用いた。種々の条件で、レシチン分散液と PFC を、デュアルフィード法(圧力 20000psi)で乳化した。この粗乳化液をさらに種々の条件で反転法にて本乳化した。粒子径を動的光散乱法で測定し、その他の物理化学的性質も測定した。

C. 研究結果

1. 各種 Hb 修飾体の循環動態に対する影響

どのラットモデルにおいても、無修飾 Hb と比較し、SNO-Hb では血圧上昇は軽度であった。PEG-Hb では血圧は徐々に軽度に上昇したが、SNO-PEG-Hb では血圧上昇はほとんど認められなかった。SNO-Hb により、脳内 NO 代謝物濃度が上昇し、NO が放出されていることが確認された。

2. 各種 Hb 修飾体の血小板に対する影響

Wistar 群に比較して Brown-Norway 群では Hb 投与群で凝集能が上昇した。SNO-Hb 投与群では凝集能上昇は Hb 投与群に比べ軽度であった。OLETF 群では対象群に比べ Hb 投与群で凝集能が上昇した。

対照群に比べ Hb 投与群で血小板 CD62P 発現が亢進した。SNO-Hb 投与群では CD62P 上昇は Hb 投与群に比べ軽度な傾向であった。

3. 近赤外分光法を用いた検討

静脈血の酸素分圧に対する脳内チトクローム酸化率の変化から、ヒト赤血球 ($P50=27$ Torr) と NRC ($P50=60$ Torr) においては同一の傾向を示した。NRC ($P50=14$ Torr) だけは酸素分圧の低い領域までチトクロームが酸化型を保った。

PEG-Hb ($P50=18.5$ Torr) および PLP を用い酸素親和性の異なる 2 種類の PEG-Hb-PLP ($PLP/Hb=1.25$, $P50=30.5$ Torr) と ($PLP/Hb=2.5$, $P50=40.5$ Torr) を得た。Hill 係数=1.6 で共通であった。80% の血液を 3 種の PEG-Hb に置換したラットにおいて、それぞれの酸素運搬能は $P50$ に依存せず、酸素親和性の減少 ($P50$ の増加) は特に改善をもたらさなかった。

4. PEG-Hb および SNO-PEG-Hb の作成

上記高度交換輸血モデルにおいて、脳組織酸素化を指標として各種 $P50$ の影響を比較評価したものの大きな差異は認められなかったことより、供給する SNO-PEG-Hb の $P50$ 値としては 28 Torr 前後を採用することとした。

3つの異なる分子量 (2956、8450、および 20450) の PEG 修飾剤を用い PEG-Hb を作成したが、HPLC 上での生成物の見掛け上の分子量は、それぞれ 55kda、870 kda、1380kda となり、さらに SNO 化した場合の SNO 結合率は、20%、27%、18%となり、用いた PEG 鎖に無関係であった。

Hb に pyridoxalation および PEG 修飾を行なった後、SNO 化を実施したが、NO ドナーの添加量に依存して SNO 化率は 20-70%を示した。リットル単位での製造工程にて、Hb 変性の指標であるメト化率の基準を 10%と設定した場合、失敗なく作成できる SNO%はおおよそ 50-60%であり、SNO-PEG-Hb 製剤としては、SNO% を 30%または 50-60%の 2つとして品質の固定を試みた。なお、PEG 修飾法を核として、最終生成物である SNO-PEG-Hb

の特許申請を行った。

ラット血中での SNO-PEG-Hb (PEG 分子量 2956 の場合) の半減期を解析した。SNO-PEG-Hb の Hb 自体の半減期は約 15 時間であったが、高分子領域に結合する SNO を塩化水銀にて遊離させ半減期を求めた場合、SNO の血中半減期は 1.1 時間と算出された。なお、SNO-PEG-Hb 未投与動物においても高分子画分に結合する SNO が認められたが、極めて少量であった。

5. 新規パーフルオロカーボン用エマルジョンの作成

デュアルフィード法と反転法の組み合わせにより、PFC90%(W/V) のエマルジョンが調製できた。粒子径は、レシチン濃度・PFC 濃度・圧力・パス回数を調節することで、約 600 nm から 100 nm で制御可能だった (1.2%レシチン-60%PFC-40000psi-5 パスで約 180 nm)。本乳化後の PFC エマルジョンの粒子径は、4°C、室温、37°Cの保存条件で変化しなかった。PFC 高濃度においても、レシチン濃度を低くすることで低粘度のエマルジョンが調製された。

D. 考察

1. 各種 Hb 修飾体の循環動態に対する影響

SNO-Hb は NO を放出することができ、その結果 Hb の NO 消去作用に由来する副作用を軽減することが可能と考えられる。また、昨年度の研究により、Hb 修飾体を臨床応用するには、血中滞留時間延長、ステルス化・毒性の軽減などの条件が必要であり、そのためには分子量を巨大化した分子設計が必要であることが確認されたため、本年度は新たな PEG-Hb を創製した。本年度の実験結果は、この PEG-Hb についても SNO 化が望ましいことを示唆するものと考えられた。

2. 各種 Hb 修飾体の血小板に対する影響 Hb 投与により血小板機能が変化するこ

とが示唆された。Hb の影響を十分に把握するために高感度のレーザー散乱粒子計測法とフローサイトメトリーを用いた評価系が有効であった。本研究で見出された血小板の活性化程度は、犬冠動脈内皮障害と冠動脈狭窄モデルにおける血小板 P-セレクチン発現程度 (約 15%) に匹敵する。血栓周囲ではトロンビンが活性化されており、また糖尿病では酸化ストレスが増大し、活性酸素が豊富に存在する。トロンビンおよび活性酸素は血小板 P-セレクチン発現を誘導する。したがって、血栓形成素因、糖尿病、ないしは有意な冠動脈狭窄が存在する場合には Hb がもたらす血小板活性化は、急性冠症候群を誘導する可能性が考えられる。酸素運搬体の適応は健常人のみならず種々の病態生理下で使用されることを念頭に置いて各種病態モデル動物での検討が重要であった。血小板 P-セレクチン発現を抑制することは Hb のもたらす副作用を軽減する可能性がある。3. 近赤外分光法を用いた検討

P50 の低い (酸素親和性が高い) Hb で置換されたラットが、低酸素下で高いヒトクローム酸化率を保った例が観察されたが、これは従来からある常識 (高地トレーニングの結果血液の P50 が上がる) と反するものである。しかし低酸素分圧下での酸素持ちこみ量において、P50 が低い方が有利であるからとも考えられ、これは低酸素下で生きる一部の哺乳動物の赤血球 (ヒト胎児、ラマ等) で知られている。運動中のように激しく酸素を欲する場合は、NRC (P50=60 Torr) が素早く酸素を離すので有利であり、呼吸酸素濃度が著しく低い場合 (<10%) では、酸素供給量の多い NRC (P50=14 Torr) が有利に働く可能性があり、病状に応じてタイプの異なった NRC を投与すべきかもしれない。

4. PEG-Hb および SNO-PEG-Hb の作成

酸素運搬能、血中滞留時間、SNO 放出性を有する新規な Hb 修飾体を SNO-

PEG-Hbとして作成し、リットル単位の中規模製造法を確立し、品質管理を施して供給した。Hbは顕著な昇圧反応を惹起し、一方SNO-Hbの作用は明らかに弱い。PEG-HbとSNO-Hbを比較した場合でも、SNO化したHb修飾体の昇圧反応は弱い。従って、SNO-HbよりSNOが放出され血管平滑筋に作用しているものと推測される。SNO-PEG-Hbより遊離するSNOの化学的構造に関しては今だ未解決であり、血中に存在するSNO量を直接解析することは不可能であるが、SNO-Hb投与後に血管-脳関門で隔てられた海馬領域のNO代謝物量は顕著に上昇したことから、SNO-Hbから何らかのNO代謝物が放出されたと考えられる。そこでSNO-PEG-Hb自体の血中半減期を解析した所、SNOの半減期は1.1時間であった。Hb分子の半減期よりは短いものの、HbよりのSNO解離は徐放性であり、SNO-PEG-Hbは血漿中でも比較的安定であることが示された。

Hb変性の基準としてメト化10%以内を条件とすると、Hb修飾体のSNO化は60-70%まで可能であったが、PEG-Hbは未修飾Hbに比べ血管収縮活性など小さいものと予想され、内因性NOの除去効率も低いと考えられる。従って、代償的に投与すべきSNO量も少なくすることが妥当かもしれない。また、内因性のNOに比較し外来性として投与するSNO量は血管内環境で見た場合、かなり大量と思われる。実際にHb未投与動物の血漿からは極めて微量のSNOしか検出されない。SNO-PEG-HbからのSNO放出は徐放性であり投与後瞬時に大量の遊離SNOが生じる訳ではないが、SNO-PEG-Hbの適応病態とも関連付けながら、SNO%の適正なレベルの検討を行なう必要がある。

人工酸素運搬体は薬剤の1つであり、開発研究において特許申請を行なうことが必要である。今回、日本油脂株式会社との共同研究により新たなPEG鎖を開発し新

規SNO-PEG-Hbとして、北海道大学総長を筆頭申請人として特許申請を行なうことができた。今後、国際研究を視野に入れ、現在米国および欧州に国際特許の申請準備中である。

5. 新規パーフルオロカーボン用エマルジョンの作成

高圧ジェット流デュアルフィード型・回転型乳化機を用いることにより、高濃度のPFCエマルジョン調製が可能となった。このエマルジョンは、粒子の安定性、粒子の均一性もすぐれており、また粘性の調整も可能であり、今後新たな日本製のパーフルオロカーボンの創製が期待される(作成方法につき特許申請準備中)。

E. 結論

1. SNO-HbはNOを放出することができるHb製剤であり、血圧上昇・血小板凝集亢進などNO消去による副作用を軽減可能と考えられた。本研究班で創製したPEG-Hbは、特にそれをSNOすることにより、臨床的有用性が期待される物質であることが明らかとなった。

2. Hb投与により血小板機能に変化する可能性が示唆され、Hbの影響を十分に把握するために高感度のレーザー散乱粒子計測法とフローサイトメトリーを用いた評価系が有効であることが明らかとなった。酸素運搬体の適応は健常人のみならず種々の病態生理下で使用されることが予想される。このことを念頭に置いた各種病態モデル小動物での検討が重要であると考えられた。

3. NRCもPEG-HbもP50の高低にかかわらず、脳における酸素供給能が良好であり、臨床応用上有用であることが確認された。酸素運搬体中のHb酸素化度(酸素供給量)が同じならば、組織のチトクロームの酸化度も同程度であり、P50は酸素供給の点からはそうcriticalでないことが示された。また、病態に応じたP50の調整が望ましい場合もあることが示唆された。

4. 新規な PEG 修飾体を用い SNO-PEG-Hb を作成し、特許申請を行なうとともに、関連する各種の Hb 修飾体を製造し共同研究施設に供給した。SNO-PEG-Hb の SNO 部分の血中半減期を解析し、1.1 時間 (Hb 自体は 15 時間) であった。従って、SNO-PEG-Hb の SNO は NO 自体とは異なり比較的安定であり、SNO からの NO 放出は徐放性であることが確かめられた。

5. PFC エマルジョン製剤は、赤血球輸血代替のみならず、組織灌流液、腫瘍の診断と治療への応用、造影剤としての応用など多様な分野で応用可能である。今回用いた PFC は、入手の容易さと経済性から PFC エマルジョンの初期の研究で用いられたパーフルオロトリブチリルアミンを使用した。将来的にはパーフルオロデカリン、あるいは直鎖型の PFC を用いて検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakai K, Sakuma I, Ohta T, Ando J, Kitabatake A, Nakazato Y, Takahashi TA. Permeability characteristics of hemoglobin derivatives across cultured endothelial cell monolayers. *J Lab Clin Med* 132: 313-319, 1998

2. Nakai K, Usuba A, Ohta T, Kuwahara M, Nakazato Y, Motoki R, Takahashi TA. Coronary vascular bed perfusion with a polyethylene glycol-modified hemoglobin-encapsulated liposome, Neo Red Cell, in rats. *Artif Organs* 22: 320-325, 1998

3. Nakai K, Sakuma I, Kitabatake A. Vascular Activities of hemoglobin-based oxygen carriers. In: Tsuchida E. ed. *Present and Future Perspectives of Blood Substitutes*. Elsevier Science SA, Lausanne: pp251-264, 1998

4. Marutuka K, Woodcock-Mitchell J, Sakamoto T, Sobel B, Fujii S: Pathogenetic implications of

hyaluronan-induced modification of vascular smooth muscle cell fibrinolysis in diabetes. *Coronary Artery Disease* 9: 177-184, 1998

5. Okada H, Woodcock-Mitchell J, Sakamoto T, Marutuka K, Sobel B, Fujii S: Interleukin 1 Regulates Type-1 Plasminogen Activator Inhibitor and Type-1 Collagen Expression in Rat Cardiac Microvascular Endothelial Cells. *Circulation* 97: 2175-2182, 1998

6. Nordt TK, Sawa H, Fujii S, Bode C, Sobel BE: Augmentation of Arterial Endothelial Cell Expression of the Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1) Gene by Proinsulin and Insulin in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1535-1543, 1998

7. Nakai K, Sakuma I, Satoh H, Kitabatake A. Vascular activities of hemoglobin-based oxygen carriers: relationship between vasoconstrictive activity and endothelial permeability. In: Kitabatake A, Sakuma I, ed. *Recent Advances in Nitric Oxide Research*. Springer-Verlag Tokyo. pp33-45, 1999

8. Okada H, Fujii S, Sobel BE, Gao M, Koyama T, Hattori Y, Zaman T, Sakuma I, Kitabatake I. Insulin and proinsulin regulate type-1 plasminogen activator inhibitor and type-1 collagen expression in rat cardiac microvascular endothelial cells. *Pathogenesis* 1: 179-188, 1999

9. Okada H, Shatos MA, Doherty JM, Sobel BE, Fujii S: Induction of urokinase type plasminogen activator from human cerebral microvascular endothelial cells by tumor necrosis factor α . *Coronary Artery Disease*, in press, 1999

10. Sakamoto T, Woodcock-Mitchell J, Marutuka K, Sobel B, Fujii S: Tumor Necrosis Factor Regulates Type-1 Plasminogen Activator Inhibitor Expression in Mouse Adipose Cells. *Am J Physiol*, in press, 1999

11. Jun Sakanoue, Mamoru Tamura,

Kunihiko Nakai, Ichiro Sakuma, and Akira Kitabatake: Redox states of cerebral tissues of rats substituted by the liposome-encapsulated hemoglobin. Oxygen Transport to Tissue XXI ed. Eke A, Delpy DT, Plenum Press, 1999 in press

12. 仲井邦彦、佐久間一郎、北畠 顕：ヘモグロビン系酸素運搬体による血管反応。人工血液 6(2): 25-36, 1998

13. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、坂野上 淳、藤井 聡、吉岡充弘、佐藤 洋、北畠 顕：人工赤血球研究の現況—循環系への影響の少ない新たなヘモグロビン系人工酸素運搬体の開発。循環制御 19(3): 379-386, 1998

14. 佐久間一郎、仲井邦彦、藤井 聡、吉岡充弘、富樫廣子、佐藤 洋、北畠 顕：人工血液とNO。心血管病態とNO。島田和幸、池田康夫、大熊 稔、日高弘義、丸山征郎編集。金芳堂、京都。pp181-193, 1998

15. 藤井ひとみ、藤井 聡、仲井邦彦、佐久間一郎、北畠 顕、劔物 修：赤血球代替物性能評価の方法の開発と臨床試験。人工血液 7(1): 7-15, 1999

16. 佐久間一郎、北畠 顕：血管内皮由来弛緩因子—研究のあゆみ。医学のあゆみ 188(13): 1099-1103, 1999

17. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、坂野上 淳、藤井 聡、吉岡充弘、佐藤 洋、北畠 顕：人工血液の設計とガス状メディアエーター。集中治療, 1999 in press

18. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、藤井 聡、吉岡充弘、佐藤 洋、北畠 顕：NO-hemoglobin の人工酸素運搬体としての応用。血管と内皮。9 増刊：71-82, 1999

2. 学会発表

1. I. Sakuma, K. Nakai, H. Togashi, J. Sakanoue, A. Aita, S. Fujii, M. Yoshioka, H. Sato, A. Kitabatake: Effects of cell free S-nitrosohemoglobin in vivo on blood pressure, platelet aggregation and

Plasma $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$: comparison with those of cell free hemoglobin. The 3rd International Conference "Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide". Los Angeles, U.S.A, 1998.7.

2. K. Nakai, I. Sakuma, H. Togashi, S. Fujii, M. Yoshioka, H. Sato, A. Kitabatake: Vasoconstriction as a result of EDRF scavenging by hemoglobin derivatives: Comparison between acellular and cellular hemoglobin in Langendorff perfusion of the rat heart. The 3rd International Conference "Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide". Los Angeles, U.S.A, 1998.7.

3. K. Nakai, I. Sakuma, H. Fujii, A. Kitabatake, H. Sato: Polyethylene-glycol modified bovine hemoglobin as a candidate for plasma expander having oxygen transporting capacity: Its vascular activity and endothelial permeability. The 3rd International Conference "Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide". Los Angeles, U.S.A, 1998.7.

4. Jun Sakanoue, Mamoru Tamura, Kunihiko Nakai, Ichiro Sakuma, Akira Kitabatake: Redox states of cerebral tissues of rats substituted by the liposome-encapsulated hemoglobin. The 26th Annual Meeting of the International Society on Oxygen Transport to Tissue. Budapest, Hungary, 1998.8.

5. I. Sakuma, K. Nakai, H. Togashi, S. Fujii, M. Yoshioka, H. Sato, A. Kitabatake: Effects of S-nitrosohemoglobin on blood pressure, platelet aggregation and plasma $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$. The 18th World Congress of the international Union of Angiology. Kyoto, Japan, 1998.9.

6. Jun Sakanoue, Osamu Hazeki, Yoko Hoshi, Yasuyuki Kakihana, Mamoru Tamura, Ichiro Sakuma, Kunihiko

Nakai, Satoshi Fujii: Polyethylene glycol modified liposome encapsulated human hemoglobin improves cerebral oxygenation and redox behavior of cytochrome oxidase in the rat brain measured by near-infrared spectroscopy in vitro. The 71st Scientific Sessions of the American Heart Association. Dallas, U.S.A., 1998.11.

7. Ishimori N, Watano K, Goto D, Kaneko T, Makiguchi M, Nakagawa T, Mitchell J, Woodcock-Mitchell J, Sobel BE, Fujii S: Hyperinsulinemia and subsequent impaired fibrinolysis determine the severity of coronary artery disease in obese subjects. The 71st Scientific Sessions of the American Heart Association. Dallas, U.S.A., 1998.11.

8. Zaman AKM, Goto D, Watano K, Isshimori N, Kaneko T, Mitchell J, Woodcock-Mitchell J, Fujii S: Diminished fibrinolysis and increased coagulation precede cardiac microvascular remodeling in obese mice. The 71st Scientific Sessions of the American Heart Association. Dallas, U.S.A., 1998.11.

9. Ichiro Sakuma, Kunihiro Nakai, Hiroko Togashi, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Sato, Akira Kitabatake: Possibility of S-nitrosohemoglobin as a new cardioprotective agent. The International Society of Heart Research, the 15th Annual Meeting of Japanese Section. Tokyo, Japan, 1998.11.

10. K. Nakai, I. Sakuma, H. Togashi, S. Fujii, A. Aita, J. Sakanoue, M. Yoshioka, H. Satoh, A. Kitabatake: Vascular Activity of unmodified hemoglobin and S-nitroso-hemoglobin in rats. IBC's 6th Annual Conference on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics. Washington, DC, U.S.A., 1998.11.

11. 仲井邦彦、佐久間一郎、富樫広子、藤

井 聡、吉岡充弘、北島 顕 : SNO-hemoglobin の人工酸素運搬体としての応用. 第7回生体NOフォーラム、東京、1998.5.

12. 佐久間一郎、藤井 聡、富樫弘子、吉岡充弘、仲井邦彦、佐藤 洋、北島 顕 : ヘモグロビン誘導体の内皮由来弛緩因子スカベンジャー作用による血管収縮: セルフリーヘモグロビンと細胞性ヘモグロビンのランゲンドルフ灌流心での比較. 第3回 VASCULAR MEDICINE 学会、神戸、1998.7.

13. 坂野上 淳、田村 守、仲井邦彦、佐久間一郎、北島 顕 : 近赤外分光法を用いたラット脳におけるヘモグロビンリポソーム包接体の酸素運搬機能の測定. 日本血液代替物学会第5回年次大会、札幌、1998.9.

14. 仲井邦彦、佐久間一郎、富樫広子、坂野上 淳、田村 守、吉岡充弘、佐藤 洋、北島 顕 : S-Nitrosohemoglobin の作製. 日本血液代替物学会第5回年次大会、札幌、1998.9.

15. 佐久間一郎、富樫広子、仲井邦彦、藤井 聡、坂野上 淳、田村 守、佐藤 洋、吉岡充宏、北島 顕 : S-Nitrosohemoglobin が循環系機能に与える影響. 日本血液代替物学会第5回年次大会、札幌、1998.9.

16. 藤井 聡、佐久間一郎、仲井邦彦、富樫広子、吉岡充弘、佐藤 洋、北島 顕 : ヘモグロビン系酸素運搬体による血小板作用. 日本血液代替物学会第5回年次大会、札幌、1998.9.

17. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫広子、藤井 聡、吉岡充宏、佐藤 洋、北島 顕 : NO 供与能を有する hemoglobin 誘導体 S-nitrosohemoglobin の生体内における性質. 第1回日本血管細胞生物学会、東京、1998.9.

18. 福島昭二、野崎秀人、杠 真紀、岸本修一、竹内由和、仲井邦彦、佐久間一郎 : 高圧ジェット流デュアルフィード型・反転

型乳化機による O/W 型パーフルオロカーボンエマルジョン（人工血液）の調整．第 46 回日本薬学会近畿支部総会大会、西宮、1998.10.

19. 佐久間一郎、藤井 聡、北畠 顕：S-nitrosohemoglobin の生体内における NO 供与体としての性質．第 2 回日本心血管内分泌代謝学会総会、京都、1998.11.

20. 佐久間一郎、藤井 聡、北畠 顕、富樫広子、吉岡充宏、仲井邦彦、佐藤 洋：NO 供給能を有する hemoglobin 誘導体 S-nitrosohemoglobin の生体内における性質．第 4 回北海道活性酸素・フリーラジカル研究会、札幌、1998.11.

21. 北畠 顕：人工酸素運搬体研究の最近の動向．第 3 回関西大学先端科学技術シンポジウム、大阪、1999.1.

22. 仲井邦彦、佐久間一郎、富樫廣子、坂野上 淳、田村 守、吉岡充弘、佐藤 洋、北畠 顕：S-nitrosohemoglobin を応用した酸素運搬体の分子設計とその生理作用、第 11 回代用臓器研究会、札幌、1999.2.

23. 北畠 顕：酸素輸液の臨床応用．厚生省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.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

北畠 顕、佐久間一郎、仲井邦彦、安河内徹（出願人：北海道大学総長、日本油脂株式会社）一酸化窒素代謝物-ポリオキシアルキレン-ヘモグロビン結合体．1999 年 2 月特許出願中．

分担研究報告書

酸素運搬機能を有する人工赤血球の開発に関する研究

分担研究者 佐久間一郎 北海道大学医学部助手

研究要旨 臨床応用可能な人工赤血球の候補として、ヘモグロビン（Hb）のSH基をS-ニトロ化したSNO-Hbの生物学的性状を検索し、SNO-Hbは無修飾Hbと比べ血小板凝集作用や血管収縮作用が著しく弱いことを確認した。また、polyethyleneglycol（PEG）修飾を行いさらに生物学的性質を実用的なものにしたPEG-Hbを制作し、そのSNO修飾体（SNO-PEG-Hb）を創製し、特許を申請するに至った。また、脳組織内ミトコンドリア酸素濃度測定法を用い、ヒトヘモグロビンリポソーム包接体（NRC）やPEG-HbにおいてP50を変化させた場合の酸素運搬機能を詳細に検討し、NRCもPEG-HbもP50の高低にかかわらず、脳における酸素供給能が良好であり、臨床応用上有用であることを確認した。さらに、パーフルオロカーボンの基材として、最新の乳化器を用い、新規製剤を創製した（特許申請準備中）。

A. 研究目的

1. 各種Hb修飾体の循環動態に対する影響

人工血液としてセルフリーHb修飾体を臨床応用利用する場合、一酸化窒素（NO）のHbによる不活化に基づく血管収縮、腸管異常収縮、血小板活性化などの副作用が問題となる。本研究班では、Hb修飾体にNO放出能を付与したSNO-Hb修飾体の検討を行っている。本年度は、各種病態モデルラットにおけるSNO-Hb、臨床応用を考えて本研究班で新たに創製したPEG-HbおよびSNO-PEG-Hbの循環動態への影響、NO放出能を検索した。

2. 近赤外分光法を用いた検討

本研究班では、昨年度近赤外分光法を用い脳組織内ミトコンドリア酸素濃度測定を行う方法を確立した。本年度は本法を利用し、今後の人工赤血球分子設計の資料とすべく、P50を変化させた場合のNRCお

よびPEG-Hbの酸素運搬能の変化を検索した。

3. 新規パーフルオロカーボン用エマルジョンの作成

人工血液とパーフルオロカーボン（PFC）エマルジョンが研究されてきた。PFCエマルジョンは、経皮的冠動脈拡張術での酸素補給液として製造許可を受けたものの、現在は製造中止されている。しかし米国を中心とし、さらに改良されたPFCエマルジョンが、赤血球輸血代替のみならず、癌放射線治療、画像診断、臓器保存などでも治験が行われている。本研究班では新規高圧ジェット流反転型乳化機を用い、PFCエマルジョンの製剤改良を試みた。

B. 研究方法

1. 各種Hb修飾体の循環動態に対する影響

ハローセン麻酔下の各種病態モデルラ

ット (Wistar ラット、Brown Norway ラット、糖尿病発症 OLETF ラット) で、大腿動脈カニューレーションにより血圧・心拍数をモニターした。大腿静脈より Hb および各種 Hb 修飾体を静注した。Wistar ラットではマイクロダイアリスを用い、脳内 (海馬領域) の NO 濃度を HPLC を用いた NO_2/NO_3 濃度計測により把握した。動脈血採血により、血小板機能評価を行った (分担研究者藤井報告書参照)。

2. 近赤外分光法を用いた検討

I. NRC 血液置換ラットの酸素運搬能評価

雄性 Wistar ラットで Nembutal 麻酔下、大腿静脈からウシ血清アルブミン (BSA) を 2% 含有する NRC を注入しつつ、同時に大腿動脈から 1 ml/分 で脱血し、最終的に 85% の血液を NRC に置換した。生理学的パラメータとして動静脈血中酸素濃度および自発脳波 (EEG) の測定を行った。NRC はアロステリック因子である IHP 添加量を調節した 2 種類 ($P_{50}=14, 60$ Torr, Hill 係数=2.1) を用いた。コントロール実験として BSA を含むリン酸 buffer で体内 Hb を同量にしたモデルを作製した。

分光測定には光源として回転円盤と 4 種のフィルターを組み合わせた UNISOKU USP430B を用い 700, 730, 750, 805 nm の 4 波長の吸光度を同時に計測し、演算により Hb 酸素化度およびチトクローム酸化度を求めた。また気管における人工呼吸管理下で呼吸酸素濃度を減少させ、その影響が上記の測定におよぼす影響を調べた。

II. 新たな PEG-Hb の創製と酸素運搬能の評価

日本油脂製の PEG でウシ PEG-Hb を創製し (分担研究者仲井報告書参照)、アロステリック因子として PLP を添加し、 P_{50} を変化させた PEG-Hb-PLP を作製した。

と同様に最終的に 80% の血液を置換したモデルにおいて、近赤外分光測定を行った。

3. 新規パーフルオロカーボン用エマルジ

ヨンの作成

PFC としてフロリナート FC43 (主成分: パーフルオロトリブチルアミン)、乳化剤として精製卵黄レシチンを用いた。種々の条件で、レシチン分散液と PFC を、デュアルフィード法 (圧力 20000 psi) で乳化した。この粗乳化液をさらに種々の条件で反転法にて本乳化した。粒子径を動的光散乱法で測定し、その他の物理化学的性質も測定した。

C. 研究結果

1. 各種 Hb 修飾体の循環動態に対する影響

どのラットモデルにおいても、無修飾 Hb と比較し、SNO-Hb では血圧上昇は軽度であった。PEG-Hb では血圧は徐々に軽度には上昇したが、SNO-PEG-Hb では血圧上昇はほとんど認められなかった。SNO-Hb により、脳内 NO 代謝物濃度が上昇し、NO が放出されていることが確認された。

2. 近赤外分光法を用いた検討

I. NRC 血液置換ラットの酸素運搬能評価

動脈血の酸素分圧に対する脳内 Hb 酸素化率とチトクローム酸化率の変化は、Hb、チトクロームとも酸素運搬体に依らず同じ傾向を示した。静脈血の酸素分圧に対する脳内 Hb 酸素化率は、それぞれの酸素運搬体の解離曲線を反映する傾向を示した。静脈血の酸素分圧に対する脳内チトクローム酸化率の変化から、ヒト赤血球 ($P_{50}=27$ Torr) と NRC ($P_{50}=60$ Torr) においては同一の傾向を示した。NRC ($P_{50}=14$ Torr) だけは酸素分圧の低い領域までチトクロームが酸化型を保った。また、2 種類の NRC により全身の 85% を置換されたラットは、ともに全身血圧および EEG 振幅を維持した。

II. 新たな PEG-Hb の創製と酸素運搬能の評価

PEG-Hb ($P_{50}=18.5$ Torr) および PLP を用い酸素親和性の異なる 2 種類の PEG-Hb-PLP ($\text{PLP}/\text{Hb}=1.25, P_{50}=30.5$

Torr)と(PLP/Hb=2.5, P50=40.5 Torr)を得た。Hill 係数=1.6 で共通であった。80%の血液を3種のPEG-Hbに置換したラットにおいて、それぞれの酸素運搬能はP50に依存せず、酸素親和性の減少(P50の増加)は特に改善をもたらさなかった。また、3種類のPEG-Hbにより全身の80%を置換されたラットはともに全身血圧およびEEG振幅を維持したが、血液置換初期においては若干血圧の上昇を伴った。

3. 新規パーフルオロカーボン用エマルジョンの作成

デュアルフィード法と反転法の組み合わせにより、PFC90%(W/V)のエマルジョンが調製できた。粒子径は、レシチン濃度・PFC濃度・圧力・パス回数を調節することで、約600nmから100nmで制御可能だった(1.2%レシチン-60%PFC-40000psi-5パスで約180nm)。本乳化後のPFCエマルジョンの粒子径は、4°C、室温、37°Cの保存条件で変化しなかった。PFC高濃度においても、レシチン濃度を低くすることで低粘度のエマルジョンが調製された。

D. 考察

1. 各種Hb修飾体の循環動態に対する影響

SNO-HbはNOを放出することができ、その結果HbのNO消去作用に由来する副作用を軽減することが可能と考えられる。また、昨年度の研究により、Hb修飾体を臨床応用するには、血中滞留時間延長、ステルス化・毒性の軽減などの条件が必要であり、そのためには分子量を巨大化した分子設計が必要であることが確認されたため、本年度は新たなPEG-Hbを創製した。本年度の実験結果は、このPEG-HbについてもSNO化が望ましいことを示唆するものと考えられる。

2. 近赤外分光法を用いた検討

I、IIの結果は、酸素運搬体中のHb酸素

化度(酸素供給量)が同じならば、組織のチトクロームの酸化度も同じということを示している。P50の低い(酸素親和性が高い)Hbで置換されたラットが、低酸素下で高いチトクローム酸化率を保った例が観察されたが、これは従来からある常識(高地トレーニングの結果血液のP50が上がる)と反するものである。しかし低酸素分圧下での酸素持ちこみ量において、P50が低い方が有利であるからとも考えられ、これは低酸素下で生きる一部の哺乳動物の赤血球(ヒト胎児、ラマ等)で知られている。運動中のように激しく酸素を欲する場合は、NRC(P50=60 Torr)が素早く酸素を離すので有利であり、呼吸酸素濃度が著しく低い場合(<10%)では、酸素供給量の多いNRC(P50=14 Torr)が有利に働く可能性があり、病状に応じてタイプの異なったNRCを投与すべきかもしれない。また、PEG-Hb置換されたラットにおける血液置換初期の若干の血圧上昇は、PEG-HbのNO消去作用によるものと思われる。

3. 新規パーフルオロカーボン用エマルジョンの作成

PFCエマルジョン製剤は、赤血球輸血代替のみならず、組織灌流液、腫瘍の診断と治療への応用、造影剤としての応用など多様な分野で応用可能である。今回用いたPFCは、入手の容易さと経済性からPFCエマルジョンの初期の研究で用いられたパーフルオロトリブチリルアミンを使用した。将来的にはパーフルオロデカリン、あるいは直鎖型のPFCを用いて検討する予定である。

E. 結論

1. 各種Hb修飾体の循環動態に対する影響

SNO-HbはNOを放出することができ、Hb製剤であり、血圧上昇・血小板凝集亢進などNO消去による副作用を軽減可能と考えられた。本研究班で創製し

た PEG-Hb は、特にそれを SNO することにより、臨床的有用性が期待される物質であることが明らかとなった。

2. 近赤外分光法を用いた検討

NRC も PEG-Hb も P50 の高低にかかわらず、脳における酸素供給能が良好であり、臨床応用上有用であることが確認された。酸素運搬体中の Hb 酸素化度（酸素供給量）が同じならば、組織のチトクロームの酸化度も同程度であり、P50 は酸素供給の点からはそう critical でないことが示された。また、病態に応じた P50 の調整が望ましい場合もあることが示唆された。

3. 新規パーフルオロカーボン用エマルジョンの作成

高圧ジェット流デュアルフィード型・反転型乳化機を用いることにより、高濃度の PFC エマルジョン調製が可能となった。このエマルジョンは、粒子の安定性、粒子の均一性もすぐれており、また粘性の調整も可能であり、今後新たな日本製のパーフルオロカーボンの創製が期待される（作成方法につき特許申請準備中）。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakai K, Sakuma I, Ohta T, Ando J, Kitabatake A, Nakazato Y, Takahashi TA. Permeability characteristics of hemoglobin derivatives across cultured endothelial cell monolayers. *J Lab Clin Med* 132: 313-319, 1998

2. Nakai K, Sakuma I, Kitabatake A. Vascular Activities of hemoglobin-based oxygen carriers. In: Tsuchida E. ed. *Present and Future Perspectives of Blood Substitutes*. Elsevier Science SA, Lausanne. pp251-264, 1998

3. Nakai K, Sakuma I, Satoh H, Kitabatake A. Vascular activities of hemoglobin-based oxygen carriers: relationship between vasoconstrictive activity and endothelial permeability. In: Kitabatake A, Sakuma I, ed. *Recent*

Advances in Nitric Oxide Research. Springer-Verlag Tokyo. pp33-45, 1999

4. Okada H, Fujii S, Sobel BE, Gao M, Koyama T, Hattori Y, Zaman T, Sakuma I, Kitabatake I. Insulin and proinsulin regulate type-1 plasminogen activator inhibitor and type-1 collagen expression in rat cardiac microvascular endothelial cells. *Pathogenesis* 1: 179-188, 1999

5. Jun Sakanoue, Mamoru Tamura, Kunihiro Nakai, Ichiro Sakuma, and Akira Kitabatake: Redox states of cerebral tissues of rats substituted by the liposome-encapsulated hemoglobin. *Oxygen Transport to Tissue XXI* ed. Eke A, Delpy DT, Plenum Press, 1999 in press

6. 仲井邦彦、佐久間一郎、北畠 顕：ヘモグロビン系酸素運搬体による血管反応。人工血液 6(2): 25-36, 1998

7. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、坂野上淳、藤井 聡、吉岡充弘、佐藤 洋、北畠 顕：人工赤血球研究の現況—循環系への影響の少ない新たなヘモグロビン系人工酸素運搬体の開発。循環制御 19(3): 379-386, 1998

8. 佐久間一郎、仲井邦彦、藤井 聡、吉岡充弘、富樫廣子、佐藤 洋、北畠 顕：人工血液と NO。心血管病態と NO。島田和幸、池田康夫、大熊 稔、日高弘義、丸山征郎編集。金芳堂、京都。pp181-193, 1998

9. 藤井ひとみ、藤井 聡、仲井邦彦、佐久間一郎、北畠 顕、劔物 修：赤血球代替物性能評価の方法の開発と臨床試験。人工血液 7(1): 7-15, 1999

10. 佐久間一郎、北畠 顕：血管内皮由来弛緩因子—研究のあゆみ。医学のあゆみ 188(13): 1099-1103, 1999

11. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、坂野上 淳、藤井 聡、吉岡充弘、佐藤 洋、北畠 顕：人工血液の設計とガス状メディエーター。集中治療, 1999 in press

12. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、藤

井 聡、吉岡充弘、佐藤 洋、北畠 顕：
NO-hemoglobin の人工酸素運搬体とし
ての応用．血管と内皮．9 増刊：71-82，
1999

2. 学会発表

1. I. Sakuma, K. Nakai, H. Togashi, J. Sakanoue, A. Aita, S. Fujii, M. Yoshioka, H. Sato, A. Kitabatake: Effects of cell free S-nitrosohemoglobin in vivo on blood pressure, platelet aggregation and Plasma $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$: comparison with those of cell free hemoglobin. The 3rd International Conference "Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide". Los Angeles, U.S.A, 1998.7.
2. K. Nakai, I. Sakuma, H. Togashi, S. Fujii, M. Yoshioka, H. Satoh, A. Kitabatake: Vasoconstriction as a result of EDRF scavenging by hemoglobin derivatives: Comparison between acellular and cellular hemoglobin in Langendorff perfusion of the rat heart. The 3rd International Conference "Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide". Los Angeles, U.S.A, 1998.7.
3. K. Nakai, I. Sakuma, H. Fujii, A. Kitabatake, H. Satoh: Polyethylene-glycol modified bovine hemoglobin as a candidate for plasma expander having oxygen transporting capacity: Its vascular activity and endothelial permeability. The 3rd International Conference "Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide". Los Angeles, U.S.A, 1998.7.
4. Jun Sakanoue, Mamoru Tamura, Kunihiko Nakai, Ichiro Sakuma, Akira Kitabatake: Redox states of cerebral tissues of rats substituted by the liposome-encapsulated hemoglobin. The 26th Annual Meeting of the International Society on Oxygen Transport to Tissue. Budapest, Hungary, 1998.8.
5. I. Sakuma, K. Nakai, H. Togashi, S. Fujii, M. Yoshioka, H. Sato, A. Kitabatake: Effects of S-nitrosohemoglobin on blood pressure, platelet aggregation and plasma $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$. The 18th World Congress of the international Union of Angiology. Kyoto, Japan, 1998.9.
6. Jun Sakanoue, Osamu Hazeki, Yoko Hoshi, Yasuyuki Kakihana, Mamoru Tamura, Ichiro Sakuma, Kunihiko Nakai, Satoshi Fujii: Polyethylene glycol modified liposome encapsulated human hemoglobin improves cerebral oxygenation and redox behavior of cytochrome oxidase in the rat brain measured by near-infrared spectroscopy in vitro. The 71st Scientific Sessions of the American Heart Association. Dallas, U.S.A., 1998.11.
7. Ichiro Sakuma, Kunihiko Nakai, Hiroko Togashi, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Sato, Akira Kitabatake: Possibility of S-nitroso-hemoglobin as a new cardioprotective agent. The International Society of Heart Research, the 15th Annual Meeting of Japanese Section. Tokyo, Japan, 1998.11.
8. K. Nakai, I. Sakuma, H. Togashi, S. Fujii, A. Aita, J. Sakanoue, M. Yoshioka, H. Satoh, A. Kitabatake: Vascular Activity of unmodified hemoglobin and S-nitroso-hemoglobin in rats. IBC's 6th Annual Conference on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics. Washington, DC, U.S.A., 1998.11.
9. 仲井邦彦、佐久間一郎、富樫弘子、藤井 聡、吉岡充弘、北畠 顕：SNO-hemoglobin の人工酸素運搬体としての応用．第7回生体NOフォーラム、東京、1998.5.
10. 佐久間一郎、藤井 聡、富樫弘子、吉岡充弘、仲井邦彦、佐藤 洋、北畠 顕：ヘモグロビン誘導体の内皮由来弛緩因子スカベンジャー作用による血管収縮：セル

フリーヘモグロビンと細胞性ヘモグロビンのランゲンドルフ灌流心での比較. 第3回 VASCULAR MEDICINE 学会、神戸、1998.7.

11. 坂野上 淳、田村 守、仲井邦彦、佐久間一郎、北畠 顕：近赤外分光法を用いたラット脳におけるヘモグロビンリポソーム包接体の酸素運搬機能の測定. 日本血液代替物学会第5回年次大会、札幌、1998.9.

12. 仲井邦彦、佐久間一郎、富樫広子、坂野上 淳、田村 守、吉岡充弘、佐藤 洋、北畠 顕：S-Nitrosohemoglobin の作製. 日本血液代替物学会第5回年次大会、札幌、1998.9.

13. 佐久間一郎、富樫広子、仲井邦彦、藤井 聡、坂野上 淳、田村 守、佐藤 洋、吉岡充宏、北畠 顕：S-Nitrosohemoglobin が循環系機能に与える影響. 日本血液代替物学会第5回年次大会、札幌、1998.9.

14. 藤井 聡、佐久間一郎、仲井邦彦、富樫広子、吉岡充弘、佐藤 洋、北畠 顕：ヘモグロビン系酸素運搬体による血小板作用. 日本血液代替物学会第5回年次大会、札幌、1998.9.

15. 田村 守、吉岡充弘、佐藤 洋、北畠 顕：S-nitrosohemoglobin を応用した酸素運搬体の分子設計とその生理作用. 第11回代用臓器研究会、札幌、1999.2.

16. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫広子、藤井 聡、吉岡充宏、佐藤 洋、北畠 顕：NO 供与能を有する hemoglobin 誘導体 S-nitrosohemoglobin の生体内における性質. 第1回日本血管細胞生物学会、東京、1998.9.

17. 福島昭二、野崎秀人、杠 真紀、岸本修一、竹内由和、仲井邦彦、佐久間一郎：高圧ジェット流デュアルフィード型・反転型乳化機による O/W 型パーフルオロカーボンエマルジョン（人工血液）の調整. 第46回日本薬学会近畿支部総会大会、西宮、1998.10.

18. 佐久間一郎、藤井 聡、北畠 顕：S-nitrosohemoglobin の生体内における NO 供与体としての性質. 第2回日本心血管内分泌代謝学会総会、京都、1998.11.

19. 佐久間一郎、藤井 聡、北畠 顕、富樫広子、吉岡充宏、仲井邦彦、佐藤 洋：NO 供給能を有する hemoglobin 誘導体 S-nitrosohemoglobin の生体内における性質. 第4回北海道活性酸素・フリーラジカル研究会、札幌、1998.11.

20. 仲井邦彦、佐久間一郎、富樫広子、坂野上 淳、田村 守、吉岡充弘、佐藤 洋、北畠 顕：S-nitrosohemoglobin を応用した酸素運搬体の分子設計とその生理作用. 第11回代用臓器研究会、札幌、1999.2.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

北畠 顕、佐久間一郎、仲井邦彦、安河内徹（出願人：北海道大学総長、日本油脂株式会社）一酸化窒素代謝物-ポリオキシアルキレン-ヘモグロビン結合体. 1999年2月特許出願中.

分担研究報告書

酸素運搬機能を有する人工赤血球の開発に関する研究

分担研究者 藤井 聡 北海道大学医学部助手

研究要旨 ヘモグロビンの血小板への影響を十分に把握するために高感度のレーザー散乱粒子計測法とフローサイトメトリーを用いた評価系が有効であった。ヘモグロビン修飾体を人工赤血球として用いた場合、血小板機能が変化する可能性が示唆された。したがって、血栓形成素因、糖尿病、ないしは有意な動脈狭窄が存在する場合にはヘモグロビンをもたらす血小板活性化は、急性血栓症を誘導する可能性が考えられる。酸素運搬体の適応は健常人のみならず種々の病態生理下で使用されることを念頭に置いて各種病態モデル動物での検討が重要であると考えられる。また、米国バーモント大学医学部付属病院にて、外傷性・出血性 ショックモデルを用いて修飾ヘモグロビン製剤の臨床応用への前段階としての大動物実験を見学した。修飾ヘモグロビン製剤では血圧の保持が容易になり、また尿流出量は保持されることから、出血性ショックの救急蘇生時における使用は期待できるかもしれない。しかし、救急蘇生の成否を決める脳機能保持作用については、修飾ヘモグロビン製剤の使用は他の蘇生方法に比較して明らかな優位性があるとはいえないようであった。

A. 研究目的

1. 酸素運搬機能を有する人工赤血球の血小板活性化作用の評価

血小板粘着、凝集による血栓形成は不安定狭心症や急性心筋梗塞などの急性冠症候群や脳梗塞の発生機序に深く関与する。血栓形成の初期過程に接着分子を介した血管内皮、血小板、白血球等の細胞間相互作用が重要な役割を果たしている。例えば、血小板 β 3インテグリンであるIIb/IIIaは活性化血小板において構造が変化し、フィブリノーゲン結合部位が発現し、結果的に血小板同士が結合する。血小板 β 3インテグリンであるIIb/IIIaのモノクローナル抗体である7E3は急性冠症候群の血小板血栓の予防に極めて有効である。これは血栓形成過程に細胞接着機構が極めて重要で

あることを示唆する。細胞接着分子の一つであるP-セレクトインは血小板の α 顆粒や血管内皮細胞のWeibel-Palade小体の顆粒膜に存在する膜糖蛋白でその構造は細胞外膜のN末端よりレクチン様ドメイン、EGF様ドメイン、補体結合ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインからなる。血小板や血管内皮細胞がトロンピンや活性酸素の刺激により活性化されると速やかにP-セレクトインは細胞表面に発現し、白血球膜上の糖鎖であるSialyl Lewis x (Slex)糖鎖をリガンドとして認め接着能を発揮する。一酸化窒素(NO)は血小板のguanylate cyclaseを活性化させ細胞質内cGMP濃度を上昇させ血小板凝集、粘着を抑制する。そのためヘモグロビンはNOを不活化する結果血小板凝集を増強する可

能性がある。そこで本研究では血小板 β 3インテグリンと細胞接着分子であるP-セレクチンに注目し、ヘモグロビンが血小板活性化をもたらすかを検討した。

2. 大動物を用いた赤血球代替物性能評価の方法の開発

ヒューマンサイエンス振興財団のご支援により『赤血球代替物性能評価の方法の開発と臨床試験』というテーマについて、米国バーモント大学医学部付属病院内科ソーベル教授、麻酔科シャピロ教授、外科シャックフォード教授の指導下に、外傷性・出血性ショックモデルを用いて修飾ヘモグロビン製剤の臨床応用への前段階としての動物実験を見学した。

B. 研究方法

1. 酸素運搬能を有する人工赤血球の血小板活性化作用の評価

I. 血小板凝集能

ヘモグロビンとしてヒトまたはウシ赤血球よりstroma free Hbを調整し透析後実験に使用した。Wister系雄生ラット、Brown-Norwayラット、病態モデルとして肥満、高血圧、高脂血症、糖尿病などを特徴とするOLETFラット、その対照となるLETOラットを用いた。大腿静脈よりヘモグロビン(5%、125 mg/kg)を投与し、経時的に採血し、多血小板血漿(PRP)を調整した。対照には同量の生理食塩水を用いた。従来の透光度を用いた血小板凝集計は1000個以上の血小板が凝集塊を形成して初めて凝集として認識され感度の点で劣っていた。そこで血小板数十個からなる小凝集塊の形成をも捕らえることが可能なレーザー散乱粒子計測法(血小板凝集塊にレーザーを当ててその散乱光を検出する)を用いた。凝集素にはADPとコラーゲンを用いた。

II. フローサイトメトリー

健常ヒトPRPをヘモグロビンとインキュベートした。活性化された血小板表面に発現されたP-セレクチンを、FITC蛍光標

識した抗P-セレクチン抗体とフローサイトメトリーを用いて直接的に活性化血小板を測定した。PAC-1はGPIIb/IIIaに対するモノクローナル抗体で静止状態のGPIIb/IIIaにはほとんど結合せず、活性化されたGPIIb/IIIaにのみ結合する。すなわち構造変化を受けたGPIIb/IIIa上のフィブリノーゲン結合部位を認識する。PAC-1もフローサイトメトリーを用いて直接的に活性化血小板を測定した。

2. 大動物を用いた赤血球代替物性能評価の方法の開発

バーモント大学では外傷性出血性ショックモデルを用いて修飾ヘモグロビン製剤の救急蘇生時における有用性について解明中である。その実験のプロトコールについては人工血液にまとめた(1999; 7(1): 7-15)。修飾ヘモグロビン製剤DCLHb(Diaspirin cross-linked hemoglobinダイアスピリン・クロスリンク・ヘモグロビン)はHBV、HCV、HIV陰性で期限切れ輸血用ヒト濃厚赤血球製剤を加熱処理後に、その赤血球からヒトヘモグロビンを取り出しさらに化学的に修飾したものである。DCLHbの第3相臨床試験の準備として、ブタを用いた外傷性・出血性ショックモデル実験を行っている。出血量調節出血性ショック実験モデル(動脈カニューレからの脱血+液体窒素による脳冷凍損傷)と出血量非調節出血性ショック実験モデル(人為的脾臓破裂による腹腔内出血)の二つを作り、それぞれの救急蘇生における修飾ヘモグロビン製剤(DCLHb)の有用性を検証している。これらの実験モデルの設定は、車社会といわれるアメリカでは交通事故が多く、中でも多量出血を伴う頭部外傷は死亡率が特に高く、幸い救命し得ても蘇生に手間取った場合などは重篤な後遺症が起きることを背景にしている。また、交通事故による腹部外傷では脾臓破裂が高率に起こり、かつ急速な多量出血を伴うため予後不良な出血性ショックを起こし易く、速やかな救

急蘇生を要する事も問題になっているためである。

各実験モデルには、比較対照群として無処置群、スタンダード蘇生群（電解質輸液＋輸血）、膠質浸透圧製剤投与群、昇圧薬投与群の4群をおき、修飾ヘモグロビン製剤（DCLHb）投与による蘇生群との間において、全身の循環動態および末梢臓器変化、中でも脳の血流と代謝状態の差の有無を解明している。

実験動物にブタを用いる。動物の実験室搬入、麻酔、測定用機器の設置、人為的外傷作成、蘇生、緊急開腹手術、および術後回復期の一定時間毎の測定を行う。一回の実験には24時間を要する。この実験プロトコールは、自動車事故などによって致命的な頭部外傷あるいは腹部外傷を負った患者が事故発生後、救急病院に搬入されて救急蘇生、診断および緊急開腹手術を受けるといった外傷患者の実際的な救急救命医療の場合を想定して作られたものである。各実験群に8頭ずつのブタを用いる計画（2モデル×5群×8頭＝80頭）で見学時点までに48頭の実験を終了した。

C. 研究結果

1. 酸素運搬能を有する人工赤血球の血小板活性化作用の評価

I. 血小板凝集能

Wistar 群に比較して Brown-Norway 群ではヘモグロビン投与群で凝集能が上昇した。SNO ヘモグロビン投与群では凝集能上昇はヘモグロビン投与群に比べ軽度であった。OLETF 群では LETO 群に比べヘモグロビン投与群で凝集能が上昇した。

II. フローサイトメトリー血小板凝集能

対照群に比べヘモグロビン投与群で血小板 CD62P 発現が亢進した。SNO ヘモグロビン投与群では CD62P 上昇はヘモグロビン投与群に比べ軽度な傾向であった。

2. 大動物を用いた赤血球代替物性能評価の方法の開発

修飾ヘモグロビン製剤（DCLHb）は血圧上昇作用を有するため血圧の保持が容易になり、また腎臓への血流量減少があるにも関わらず尿流出量は保持される可能性が示された。脳機能保持作用については、修飾ヘモグロビン製剤（DCLHb）の使用は他の蘇生方法に比較して明らかな優位性があるとは確認されなかった。

D. 考察

1. 酸素運搬能を有する人工赤血球の血小板活性化作用の評価

ヘモグロビン投与により血小板機能が変化することが示唆された。ヘモグロビンの影響を十分に把握するために高感度のレーザー散乱粒子計測法とフローサイトメトリーを用いた評価系が有効であった。本研究で見出された血小板の活性化程度は、犬冠動脈内皮障害と冠動脈狭窄モデルにおける血小板 P-セレクチン発現程度（約15%）に匹敵する（Circulation 1997; 96: 1554-1559）。血栓周囲ではトロンビンが活性化されており、また糖尿病では酸化ストレスが増大し、活性酸素が豊富に存在する。トロンビンおよび活性酸素は血小板 P-セレクチン発現を誘導する。したがって、血栓形成素因、糖尿病、ないしは有意な冠動脈狭窄が存在する場合にはヘモグロビンをもたらす血小板活性化は、急性冠症候群を誘導する可能性が考えられる。酸素運搬体の適応は健常人のみならず種々の病態生理下で使用されることを念頭に置いて各種病態モデル動物での検討が重要であった。血小板 P-セレクチン発現を抑制することはヘモグロビンのもたらす副作用を軽減する可能性がある。また、P-セレクチン分子の活性化を抑制する細胞接着抑制戦略は急性冠症候群や脳梗塞の新しい治療法として有用であることも示唆された。

2. 大動物を用いた赤血球代替物性能評価の方法の開発

修飾ヘモグロビン製剤（DCLHb）は救

急蘇生時に使用すると、内因性血管拡張作用物質である一酸化窒素 Nitric Oxide (NO) を強く吸着するため末梢血管収縮を惹起する結果血圧の保持が容易になったと考えられる。また腎臓への血流量減少があるにも関わらず尿流出量は保持されたが、この結果についての作用機序は不明であるものの、出血性ショックの救急蘇生時における使用はかなり期待できるかもしれない。しかし、救急蘇生の成否を決める脳機能保持作用については、DCLHbの使用は他の蘇生方法に比較して明らかな優位性があるとは確認されなかった。脳組織は独自の血流量自動調節能を有しており、相当の危機的状況に陥るまでは脳の酸素消費量を補うに必要な酸素供給を得るべくその血流量を微妙に調節するといわれている。そのために実験群間に大きな違いが出にくいのであろうと考えられた。

E. 結論

1. 酸素運搬能を有する人工赤血球の血小板活性化作用の評価

ヘモグロビン投与により血小板機能に変化する可能性が示唆され、ヘモグロビンの影響を十分に把握するために高感度のレーザー散乱粒子計測法とフローサイトメトリーを用いた評価系が有効であることが明らかとなった。酸素運搬体の適応は健常人のみならず種々の病態生理下で使用されることが予想される。このことを念頭に置いた各種病態モデル小動物での検討が重要であった。

2. 大動物を用いた赤血球代替物性能評価の方法の開発

米国バーモント大学医学部付属病院にて、外傷性・出血性ショックモデルを用いて修飾ヘモグロビン製剤の臨床応用への前段階としての大動物実験を見学した。途中結果では修飾ヘモグロビン製剤は血圧の保持が容易になり、また尿流出量は保持されることから、出血性ショックの救急蘇生時における使用は期待できるかもしれ

ない。しかし、救急蘇生の成否を決める脳機能保持作用については、修飾ヘモグロビン製剤の使用は他の蘇生方法に比較して明らかな優位性があるとはいえないと思われる。この点に関し、現在北畠班で開発中のSNOヘモグロビン製剤の利用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Marutuka K, Woodcock-Mitchell J, Sakamoto T, Sobel B, Fujii S: Pathogenetic implications of hyaluronan-induced modification of vascular smooth muscle cell fibrinolysis in diabetes. *Coronary Artery Disease* 9: 177-184, 1998
2. Okada H, Woodcock-Mitchell J, Sakamoto T, Marutuka K, Sobel B, Fujii S: Interleukin 1 Regulates Type-1 Plasminogen Activator Inhibitor and Type-1 Collagen Expression in Rat Cardiac Microvascular Endothelial Cells. *Circulation* 97: 2175-2182, 1998
3. Nordt TK, Sawa H, Fujii S, Bode C, Sobel BE: Augmentation of Arterial Endothelial Cell Expression of the Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1) Gene by Proinsulin and Insulin in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1535-1543, 1998
4. Okada H, Fujii S, Sobel BE, Gao M, Koyama T, Hattori Y, Zaman T, Sakuma I, Kitabatake I. Insulin and proinsulin regulate type-1 plasminogen activator inhibitor and type-1 collagen expression in rat cardiac microvascular endothelial cells. *Pathogenesis* 1: 179-188, 1999
5. Okada H, Shatos MA, Doherty JM, Sobel BE, Fujii S: Induction of urokinase type plasminogen activator from human cerebral microvascular endothelial cells by tumor necrosis factor α . *Coronary Artery Disease*, in press, 1999
6. Sakamoto T, Woodcock-Mitchell J, Marutuka K, Sobel B, Fujii S: Tumor