

(別添1)

平成11年度 総括・分担研究報告書

総括研究報告書

酸素運搬機能を有する人工赤血球の創製とその評価に関する研究

主任研究者 土田 英俊 早稲田大学 理工学部 教授

研究要旨 本研究は、ヒト血液に遜色ない充分量の酸素を体内へ輸送できる能力を有し、無害で安定度の高い人工赤血球の創製を目的とする。対象は精製ヒトヘモグロビン(Hb)をリン脂質(二分子層)膜で被覆した構造のHb小胞体と、全合成系としてのリポドヘム小胞体とアルブミン-ヘム複合体である。

平成11年度(第3年次)は、Hb小胞体に関して、Hb精製、小胞体製造工程と品質管理、保存安定度について詳細検討を行い、連続型製造装置の基本設計を完了した。また、体内動態を連続計測できる装置を工夫し、非細胞型Hb(修飾Hb)を遥かに凌ぐ物性評価と投与後の優れた微小循環動態を明らかにした。体内代謝過程を見るため、細網内皮系捕捉による免疫系への影響を評価、組織に不可逆的影響を与えることなく、最大1週間以内に投与全量が代謝されることを確認。ヒト血球成分との相互作用の観測でも、顕著な変化を認めない。また、体内循環に際し生成するメトHbが光照射によって還元され酸素配位能を復活(非酵素的還元)させる方法や、Hb小胞体表面の修飾剤(PEG脂質)を改良し、小胞体の分散安定度を大幅向上させることを可能とした。アルブミン-ヘムについては、 O_2 、COなどの結合解離過程を解析し、分子内に包接されている8個のヘムの包接位置によって、結合解離速度に相違のあることが明らかにされた。膠質浸透圧の調節と分子量の増大を目的とし、アルブミン二量体-ヘム複合体を合成すると、ヒト血液の1.3倍量の酸素輸送ができる。

「臨床応用可能な人工赤血球の創製」に向け、充分な有効性と安全度を示すことができ、本研究の第2期厚生科学研究(高度先端医療研究事業)においては、更に実用目的のための規格(GMP仕様)試料の生産を計るべく、装置の設計と設置に尽力するとともに、具体的に試料が生産ができる2年後を目途に、製造プロセス細部に亘る運転点検と改良、更には、研究室規模のモデル生産を継続して、生理学的現象と効果、毒性の再確認、並びに代謝系についての先行評価を進めたい。GMP方式で生産されるまでの基礎知見の蓄積と補強を計りたい。

分担研究者

池田 久實 北海道赤十字血液センター 所長

小林 紘一 慶応義塾大学 医学部 教授

末松 誠 慶応義塾大学 医学部 助教授

A. 研究目的

Hb小胞体 と 全合成系のリコンビナントアルブミン-ヘム複合体を対象に、製造方法、物性測定、*in vitro*、*in vivo* 評価を行い、必要に応じた改良を行いながら、充分量の酸素を安全に体内組織に輸送できる人工赤血球を創製する。

平成11年度では、細胞型Hb小胞体製造装置の基本

設計/長期室温保存安定度の確認/非細胞型と比較した利点の確認/メトHbの新しい非酵素的還元法/新規PEG脂質による小胞体表面修飾の検討/血液成分との相互作用、サイトカイン放出挙動の解析/細網内皮系への捕捉と代謝過程の検討/内毒素血症における肝微小循環の観測/アルブミン-ヘム複合体のヘム固定位置と、 O_2 、COの結合定数の比較/膠質浸透圧と酸素輸送量を確保するための二量化アルブミンヘム複合体の合成/などを具体項目とした。

B. 研究方法

Hb小胞体の製造において、気-液接触面積を増大(hollow fiber法の採用)させて、赤血球分散液の一酸

化炭素処理と、最終製品となる酸素輸液の長期保存法として脱酸素化法(deoxy型の利用)を採用、効率の向上を検討した。赤血球からのHb精製には限外濾過膜を用いた連続化工程の最適化を行い、赤血球単位量当りの精製Hb回収に要する膜面積と所要時間を確定、基本設計のデータとした。

Hb小胞体の血中滞留時間と分散安定度の向上のため、採用しているPEG脂質を用いる表面修飾では、PEG鎖長の増大が修飾後の脱離を招来するので、脂質部を大きくしてこれを避ける工夫をした。小胞体への導入安定度、凝集抑制効果を評価した。また新規PEG脂質として、リシンを連結した樹枝状分子の分岐末端に4本のアシル鎖を導入した分子を合成。これが小胞体表面に導入される過程と脱離過程を観測、PEG修飾による凝集抑制効果は、PEG添加による小胞体凝集の臨界分子量測定から評価した。／ Hb小胞体の保存安定度は、PEG修飾Hb小胞体分散液を窒素雰囲気下保存し(4, 23, 40℃)、諸物性値(吸光度、濁度、粒径、酸素親和度、メト化率)から検討。脂質分解の有無は高速液体クロマトグラフ-質量分析により検討。／ Hbのメト体(metHb)の光還元では、溶存気体の効果、各種アニオンやラジカル捕捉剤の添加効果、pHの影響について検討し、還元を促進させる条件を検討した。

細胞型Hb小胞体の利点を整理するために、4種類の修飾Hbを合成し、溶液物性をHb小胞体と比較した。無麻酔非侵襲の条件で試料を少量投与し、血圧及び抵抗血管の血管径を同時測定した。／ Hb小胞体の生体適合性評価法として、血小板の凝集度、および免疫系への影響として好中球の走化能及び貪食能を検討した。またヒト末梢血単核細胞の刺激により放出される各種サイトカインをELISA法により測定した。／ 出血ショックからのHb小胞体投与による蘇生試験を二回繰返した後に、動脈血中および腸間膜静脈血中TNF α 濃度を測定した。／ Hb小胞体を投与後2週間までカーボンクリアランス試験と組織病理学的検討を行った。／ ラット内毒素暴露灌流肝にとりこまれたHbやmetHbの分解は胆汁中のbilirubin-IXalphaのELISA測定により追跡した。またヘムオキシゲナーゼ-1や誘導型NO合成酵素の発現はそれぞれの単クローン抗体を用いたWestern blotting

法により行った。

ヒト血清アルブミン(rHSA)にリポドヘムポルフィリン鉄(II)誘導体(FeP)を計8分子包接させたアルブミン-ヘム複合体(rHSA-FeP(8))のO₂、CO結合解離定数と活性化パラメーターをレーザー照射後の過渡吸収スペクトルから測定した。アルブミンのSH残基(Cys34)をビスマレイミドヘキサンの架橋して二量化アルブミン-ヘム複合体を合成し、その酸素配位特性と膠質浸透圧を測定した。

ラット胸壁に窓枠を植込み固定、レーザー共焦点顕微鏡/生体血流高速観測装置を用い肺微小循環評価系を検討した。吉田肉腫担癌モデルを用い、腫瘍組織内酸素分圧を燐光消滅法により測定した。

C. 研究結果および考察

Hbの精製単離におけるCO化の工程と、Hb小胞体の脱酸素化工程は、気体交換膜の利用により簡略化が達成できた。また、限外濾過膜の組合せにより連続式Hb精製工程を確立できた。これらの成果として、300L規模のHb小胞体の無菌的連続製造設備の基本設計をまとめた。／ SFH中VSVは1 μ Mジメチルメチレンブルー添加系で、照射量1.7J/cm²にて6.4log₁₀の不活化率が得られ。メトHb含量および酸素親和度も殆ど変化がなかった。加熱処理(60℃, 1時間)では、空気、窒素及びCOの雰囲気によらず、VSVは5.8log₁₀以上の不活化率であった。／ Hb小胞体を1年間室温(20~25℃)で保存しても脂質の分解は無く、漏出Hbも検出限界以下であった。metHb含量は1%以下を保持でき、酸素親和度の低下も僅小値に留まり、酸素運搬機能にも影響は無かった。／ Hb小胞体の表面修飾剤としてPEG脂質のアシル鎖数を2本から4本に増大させると、高分子量PEG鎖の安定固定ができ、小胞体の分散安定度は大幅に向上した。／ metHbはT状態で且つ高スピン状態のとき光還元されやすいことが明らかになった。また、微量のmannitol(ラジカル捕捉剤)、あるいは特定アミノ酸の少量の添加により光還元が促進された。特にトリプトファン添加系では、Ar雰囲気でも効率高く還元が進行し、空気に曝すと速やかに酸素化Hbが得られ、酸素配位能復元が確認された。

血小板凝集能に対しHb小胞体の存在は影響無かつ

た。多血小板血漿においてもアゴニスト非存在下、およびコラーゲン刺激による血小板の RANTES 放出反応に対する影響はみられなかった。好中球の走化能にも影響を及ぼさなかった。／ 粒子径の異なる修飾Hbを4種類合成、Hb小胞体と物性比較したところ、生理条件(溶液粘度: 3 - 4cP, コロイド浸透圧: 20 - 25mmHg)に調節できるのはHb小胞体のみであり、これはPEG修飾が小胞体の凝集を回避することに拠る。また赤血球の凝集を生起する修飾Hbがあったが、Hb小胞体では影響が無く、Hb小胞体が血液に最も近い物性値に調節された。Hb小胞体を投与した際に背部皮下微小循環系における抵抗血管の血管収縮、血圧亢進はともに認められないのに対し、粒子径の小さな修飾Hbほど投与直後から抵抗血管の収縮が大きく、これに対応した血圧亢進が認められた。／ ヒト末梢単核細胞をHb小胞体存在下培養した上清からELISA法によりIL-1 α , 1 β , 6, 8, 10および TNF α を検出したが、SFHとの比較ではTNF α を除いてどれも有意に低い値であった。IL-2, 4およびIFN- γ は検出されなかった。／ 出血ショックからHb小胞体投与による蘇生試験において、動脈血中および腸間膜静脈血中TNF α 濃度は、アルブミン投与の場合に比較して有意に低い値となり、Hb小胞体の酸素運搬能によるものと思われた。／ Hb小胞体分散液を投与後に食食能の一過性の低下が認められるが、3日後には亢進し、2週間で正常値った。組織病理学的観察から、主として脾臓、肝臓にて捕捉と代謝が行われ、1週間以内に代謝がほぼ完了し、腫張は解除され、細網内皮系に不可逆な影響は残らなかった。／ 正常肝臓ではHbは洞様血管からDisse腔に漏出してCOを捕捉し血管収縮、胆汁鬱滞を引き起こし、肝実質細胞にて徐々に分解されビリルビンを排泄した。他方、内毒素作用肝ではヘムオキシダーゼが誘導され、NOも発生した。HbはNOもCOも捕捉するため、著しい血管収縮と胆汁うっ滞を引き起こしたが、Hb小胞体は洞様血管を漏出せず血管の内側にあるクッパー細胞に食食されるので、上述のような挙動は起こさなかった。

アルブミン-ヘム複合体について、ヘムの包接位置によるO₂, CO結合速度の相違を明らかとした。／ ヘムを16個包接させた二量化アルブミン-ヘム複合体を合成し、その酸素親和度は単量体と同等で、膠質浸透圧は単量体の半分であった。従ってヒト血液の1.3倍量の酸素を運搬できることが明らかになっ

た。

人工赤血球の肺微小循環への影響を明らかにするため、ラットを用いた直接的に生体下で肺微小循環を可視化する評価系を確立した。またラット担癌モデルを作成し、燐光減衰消滅時間から腫瘍内酸素分圧を測定する評価系を確立できた。

D. 結論

1) Hb小胞体の製造における諸工程の条件設定を行い、300リットル規模の連続製造装置の基本設計をまとめた。また、2) Hb小胞体の保存安定度が明らかになり、3) 投与後の血流動態が維持され、修飾Hb系で問題とされている血圧亢進がHb小胞体では認められないこと、4) 血球成分との相互作用や細網内皮系での捕捉・代謝、内毒素血症における肝臓の血流動態についても明らかになり、安全性に関する知見が集積できた。「臨床応用可能な人工赤血球の創製」に向けて、十分な有効性と安全性を示すことができた。更に 5) メトHbの光還元方法、6) 多アシル鎖型PEG脂質や二量化アルブミンヘム複合体の合成など、新技術も創出できた。

1. 細胞型ヘモグロビン小胞体の無菌的連続製造工程の確立
2. 細胞型、非細胞型ヘモグロビン酸素輸液の合成、物性比較と、
微小循環動態観測による投与後の血圧亢進と抵抗血管収縮の相関解析
3. ヘモグロビン小胞体の常温長期保存の可能性
4. メトヘモグロビンの新しい還元系の構築
5. ヘモグロビン小胞体の表面修飾剤としての新規PEG 脂質の合成と機能
6. リコンビナントアルブミン-ヘムの O_2 , CO結合動力学的解析
7. 二量化アルブミン-ヘム複合体の合成と酸素配位

主任研究者 土田 英俊 早稲田大学 理工学部 教授

研究協力者 武岡 真司 早稲田大学 理工学部 助教授

酒井 宏水 早稲田大学 理工総研 講師

小松 晃之 早稲田大学 理工総研 講師

研究要旨 Hb小胞体の製造工程において、気体交換膜の利用により赤血球の一酸化炭素化工程とHb小胞体の脱酸素化工程を簡略化できた。また限外濾過膜の組合せから連続式Hb精製工程を確立し、無菌的連続製造設備（300L規模）の基本設計を完了した。

Hb小胞体の細胞型構造の特徴を明確にするために、粒子径の異なる非細胞型の修飾Hbを4種類合成し、その物性を比較した。Hb小胞体を用いた酸素輸液が血液に最も近い物性値に調節可能であり、修飾Hbの投与で観測された抵抗血管の収縮と血圧亢進は認められなかった。

Hb小胞体はPEG鎖による表面修飾と無酸素の条件で、少なくとも室温で1年間の棚置き保存が可能であることが明らかとなった。

メトヘモグロビンの光還元はラジカル捕捉剤やアミノ酸存在下で大幅に促進されることから、酸素運搬機能の回復の新しい方法を見出した。Hb小胞体の表面修飾剤として新しいPEG脂質を合成、アシル鎖数の増大により高分子量のPEG鎖が小胞体表面に安定固定され、小胞体の分散安定度が大幅に向上した。

リコンビナントヒト血清アルブミン(rHSA)にテトラフェニルポルフィリン鉄 (II)誘導体(FeP)を8分子包接させたアルブミン-ヘム複合体(rHSA-FeP(8))について、 O_2 , CO結合過程を解析し、包接部位の異なるヘムの結合速度の相違を明らかにした。二量化アルブミンヘム複合体(rHSA-FeP)₂は、その酸素親和度は単量体と同等であり、膠質浸透圧を適当値に維持させた状態で2倍量のヘムを包接、結果としてヒト血液の1.3倍量の酸素を運搬できた。

1. 細胞型ヘモグロビン小胞体の無菌的連続製造工程の確立

A. 研究目的

高濃度の精製ヒトヘモグロビン(Hb)をリン脂質二分子膜小胞体に内包したHb小胞体は、充分量の酸素運搬できる酸素輸液になる。Hb小胞体の合成工程は、ヒト赤血球からのHb精製とウィルスの不活化お

よび除去、濃度40g/dL超までの濃縮、小胞体の粒径制御、洗浄、配位子(一酸化炭素、酸素)の結合と置換、および除去の工程が含まれる。これら一連の工程を無菌的雰囲気下、特に気体交換膜や限外濾過膜を用いて行い、酸素輸液を効率よく調製する方法論の確立が本研究の目的である。

B. 方法

1) 中空糸型ガス交換器を用いる赤血球の一酸化炭素処理

人工肺を用いて洗浄赤血球と一酸化炭素との気-液界面積を増大させて、赤血球内Hbの一酸化炭素化を促進させる方法を検討した。赤血球は北海道赤十字血液センターから譲渡された期限切れMAP赤血球製剤を用いた。人工肺(テルモ社製, キャピオックスH08; 膜面積0.8m²)のガスポートにCOを吹送(30, 60, 100 mL/min)。血液流入ポートに生理食塩水で希釈した洗浄赤血球(7.5, 15 g/dL, 400 mL)を循環させた(50, 100, 400, 800 mL/min)。試料を少量採取し、経時的にCO化率を測定した。

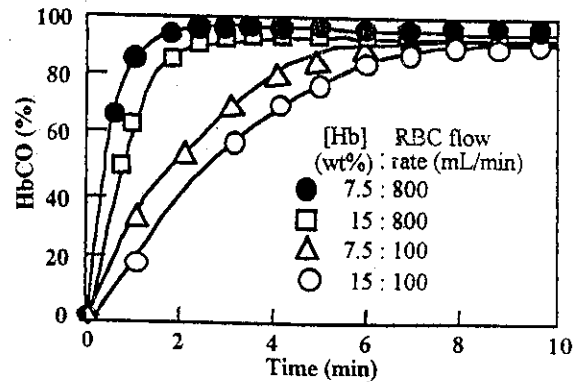


Fig. 1 Time course of RBC carbonylation using an artificial lung unit (CO: 100 mL/min)

2) 限外濾過膜を用いる製造工程

赤血球からのHb精製は限外濾過膜を用いて行った。Table 1 に示す小スケールの実験条件において、各Hb精製工程の平均透過流速(L/m²/hr, LMH)を算出した。また、算出LMHを用いて赤血球 300LからのHb精製に要する膜面積と所要時間を推定した。

3) 中空糸型ガス交換器を用いるHb小胞体の脱酸素化工程

Hb小胞体は最終的に窒素置換され脱酸素状態として保存される。ここではHb小胞体の代わりにHb溶液を用いて脱酸素化をガス交換器を利用して行い、その有効性を検討した。Hb溶液(10 g/dL, PLP/Hb = 3/1モル比)を酸素飽和状態(Po₂ = 150 Torr)とした後、上記1)記載の人工肺の溶液ポートに循環させ(1.2 L/min, 625 mL/min)、ガスポートには窒素を吹送(1L/min)し、酸素電極により酸素分圧の測定を行っ

た。

C. 結果および考察

1) 人工肺による赤血球のCO化

洗浄赤血球分散液の人工肺循環速度が赤血球CO化に及ぼす影響を検討したところ、Hb濃度15g/dLの洗浄赤血球(400mL)の循環速度の増大と共にCO化反応は速くなり、100mL/minの時CO化率が90%に到達するのに約7分を必要としたが、用いた人工肺の最大流速である800mL/minにした場合は、2分で完了した(Fig. 1)。また人工肺によるCO化処理ではHb溶液の泡立ちが殆ど認められず、操作が煩雑にならないのでHbの変性による収率低下を防ぐことができた。

ガスポートへのCO吹送速度を30, 60, 100 mL/minと増大させた場合、初期反応速度が5.7x10⁻⁶, 9.4x10⁻⁶, 1.2x10⁻⁶ mol/sと上昇した。しかし、いずれの条件で

Table 1 Experimental conditions for each Hb purification process with ultrafiltration membrane.

Hb purification process	Ultrafiltration membrane	Membrane area (m ²)	Ultrafiltration cut-off Mw (kD)	[Hb] (g/dL)	Volume (L)	Circulation rate (L/min)
Washing of twice-diluted RBC	Pellicon B-1000V	0.1	1,000	11	0.3	0.4
Stroma removal	Pellicon B-1000V	0.1	1,000	5.7	0.2	0.4
Virus removal	viresolve 70	0.001	70	1.5	0.03	0.015
Dialysis and concentration	Pellicon B-8A	0.1	8	2.2	10	0.6

Table 2 Capacity of management of each Hb purification process and estimated conditions for purification of 300L of RBC.

Hb purification process	Average permeation rate (LMH)	Hb permeability (P) or impermeability (I) (%)	Estimated conditions for purification of 300L of RBC		
			Volume (L)	Membrane area (m ²)	Required time (hr)
Washing of twice-diluted RBC	35	99.1 (P)	3,600	34	3
Stroma removal	30	86.7 (P)	2,850	19	5
Dialysis	50	99.9 (I)	150	15.2	5
Virus removal	48	98.6 (P)		0.2	
Concentration	50	99.9 (I)		15.2	

も7分後にはCO化率90%以上となった。CO吹送流速に対しては依存性が少なく、洗浄赤血球溶液の流入速度の影響が大きいことが判明したため、CO化に用いるCO消費量は少なく設定することも可能である。

洗浄赤血球濃度の影響を検討するために、CO吹送速度を100mL/min、赤血球循環速度を100, 800 mL/minで固定しHb濃度を変化(15, 7.5 g/dL)させて行ったところ、濃度が低い方がCO化が速やかに進行した(Fig.1)。しかしHb総量が半分であるのに所要時間は半分よりも長いので、効率は低下した。人工肺の目詰まりはHb濃度の高い場合も認められなかった。従って濃厚な状態で行うことが効果的と考えられる。今回の結果から、Hb濃度15g/dLの赤血球1LのCO化に必要な膜面積はCO流速100mL/minで約2m²と与えられた。最大流量6.5L/min、膜面積5.0m²の人工肺を利用して、300LのHbのCO化処理を行う場合、5時間で完了する計算になった。

2) 限外濾過膜を用いたHb精製工程

Table 2 に限外濾過膜を用いた各Hb精製工程の処理能を示す。2倍希釈赤血球の洗浄は平均透過流速が35 LMHとなり、4倍希釈した場合の45 LMHよりも低下したが、所要時間は3時間であり、4倍希釈した場合の4.7時間より短く、より効率的であると判断された。

またストロマ除去の平均透過流速は30 LMHであ

り、膜の目詰まりも起こらず、従来の遠心分離法の代替が可能と判断した。Viresolve膜を用いた限外濾過工程は平均透過流速が48 LMHと大きく、98%以上の高いHb透過率が得られた。Hb溶液濃縮工程では、平均透過流速は50 LMHと大きく、99.9%という高いHb阻止率が得られた。以上から赤血球の大量処理工程において処理条件の推定が可能になった。

3) 中空糸型ガス交換器を用いるHb小胞体の脱酸素化工程

酸素飽和させたHb溶液を0.6 L/minで循環させた場合、160分で酸素分圧が1 Torr以下に達した(Fig. 2)。また1.2 L/minでは80分で完了した。次に窒素流速を0.1から1.0 L/minに増加させると、循環流速1.2 L/minで、50分で完了した。

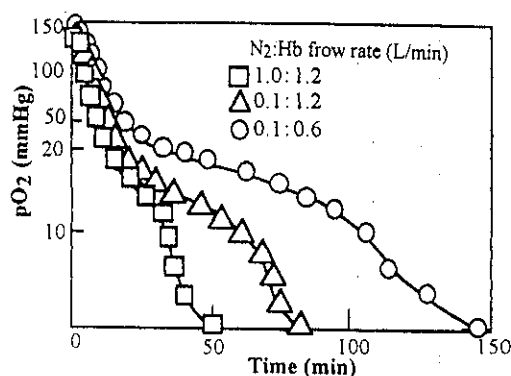


Fig. 2 Time course of deoxygenation of Hb solution using an artificial lung unit.

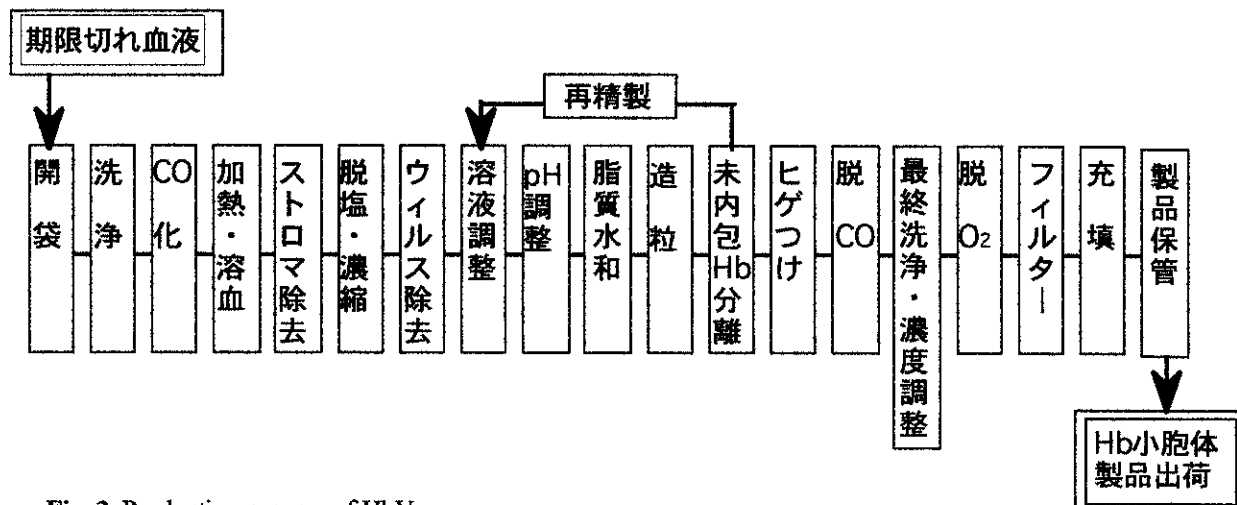


Fig. 3 Production process of HbV.

人工肺における物質収支式から、1.0 LのHbVの脱酸素化に必要な膜面積は窒素流速1.0 L/minで約40 m² (0.8m² x 50回の透過回数) と与えられるので、最大流量6.5L、膜面積5.0m²の人工肺を利用して100LのHbVの脱酸素化には、膜面積5.0m²の人工肺を6個用いて6時間で処理可能と計算された。

D. 結論

Hb小胞体製造工程において、各種分離膜を用いた小スケールの実験結果から300リットル規模の連続製造装置の基本設計ができた(Fig.3)。今後は本設計に従った実験の実施により再確認と詳細なデータを集積し、詳細設計に取りかかる予定である。

2. 細胞型、非細胞型ヘモグロビン由来酸素輸液の合成と、微小循環動態観測による機能評価

A. 研究目的

非細胞型のHb由来酸素輸液は現在臨床試験段階まで進んでいるものの、血圧亢進などの副作用が報告されている。他方、Hb小胞体は赤血球と類似の細胞構造をとるため、Hb自体に起因する副作用の抑制が期待される。そこで、各種修飾Hb (Fig.4)を合成して物性を同条件で解析し、細胞型のHb小胞体と比較検討した。また、酸素輸液の評価法として、循環系で最も本質的な役割を担う微小循環の動態を無麻酔・非侵襲で顕微鏡観測することは、酸素輸液の評価に

極めて重要である。ここでは、酸素輸液の物性や構造の相違が微小循環動態に及ぼす影響を比較検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) 修飾Hbの合成と物性測定

修飾Hbとして、Hbの α 鎖間をDBBF架橋した分子内架橋Hb(XLHb)、PLP-Hbに複数のPEGを結合させたPEG-PLP-Hb、XLHbをglutaraldehyde架橋した重合Hb(Poly-XLHb)、Hydroxyethyl starch(HES)に担持させたHES-XLHbを合成した。PEG-HbVは既報に従って合成した。これらの溶液粘度、膠質浸透圧(COP)、酸素結合解離曲線(P_{50} , Hill係数)、粒径、分子量を測

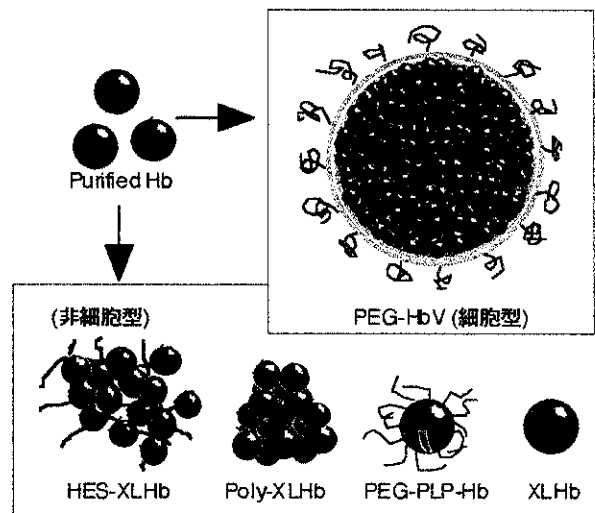


Fig. 4 Schematic representation of a series of Hb-based oxygen carriers.

定した。さらに、ヒト血液と混合後の赤血球凝集の有無や形態を観察した。

2) 微小循環動態の観察

Hamster dorsal skin-fold window法を用い、無麻酔非侵襲の条件で上記5種類の酸素輸液に関して、少量(全血液量の10%相当量)を投与し、血圧、及び抵抗血管の動態(血管径、血流量)を測定した。

C. 研究結果および考察

1) 物性の比較

計5種類の酸素輸液(XLHb、PEG-PLP-Hb、Poly-Hb、HES-Hb、PEG-HbV)の粒径は、それぞれ 7 ± 2 、 22 ± 2 、 47 ± 17 、 68 ± 24 、および 224 ± 76 nmであった。いずれも赤血球が通過できない細孔($0.4 \mu\text{m}$ φ)を通過した。XLHb、PEG-HbVに比較してPoly-Hb、PEG-PLP-Hbは P_{50} 、Hill係数が共に減少したが、これは化学修飾によるHbサブユニット間の相互作用の低下から説明される。Hb小胞体では、アロステリック因子の添加量制御で酸素親和度を自在に調節できるが、修飾Hbではその分子構造に拠って酸素親和度が固定され、調節はできない。

XLHbのCOPは重合後、約1/5に減少した(Poly-XLHb)。一方、PEG-PLP-Hbは高い値を示した。これはPEG修飾による実質濃度の増加と、PEGの水和

により溶液活量の低下のためと考えられる。細胞型のPEG-HbVでは0 Torrであるが、アルブミンに分散させることで血液と同等(20 Torr)に調節できた。粘度はPEG-PLP-Hbで高い値を示すが、PEG-HbVは、アルブミンに分散させた時に血液と同等の値をに調節できる。赤血球の凝集は、XLHb、PEG-HbVでは全く認められなかったが、PEG-PLP-Hbでは無定形な赤血球の凝集体(sludge)が観察された。一方、Poly-XLHbでは比較的弱い相互作用による連鎖(rouleaux)が形成された。以上の結果から、溶液物性を血液と同等に調節できる点で、Hb小胞体が酸素輸液として優れていると言える。

2) 抵抗血管の動態と血圧亢進

生体内において、血管内皮由来弛緩因子である一酸化窒素(NO)が平滑筋に作用する経路の遮断により血管収縮が起こり、血圧亢進に繋がることはよく知られている。ハムスター皮下微小循環動態を非侵襲、無麻酔条件で観測した結果、血圧亢進は抵抗血管($150 \mu\text{m}$ φ)の収縮と最も強く連動していることから、抵抗血管が血圧とその下流の微小循環動態を支配する極めて重要な部位であることを初めて明らかにした。そこで本モデルを用いて、血圧、及び抵抗血管の動態(血管径、血流量)を測定し比較検討した。

Table 3. Physicochemical properties of Hb-based oxygen carriers and human red blood cell (RBC)

Parameters	XLHb	PEG-PLP-Hb	Poly-XLHb	HES-XLHb	PEG-HbV	Blood (RBC)
Diameter (nm)	7 ± 2	22 ± 2	47 ± 17	68 ± 24	224 ± 76	ca. 8000
Mn (kDa) ^{a)}	72	186 (123) ^{c)}	510	431		
Mw (kDa) ^{b)}	66	189	2154	2782		
P_{50} (Torr)	32	14	20	22	18 (32) ^{d)}	28
Hill number (-)	2.0	1.3	2.2	2.2	2.1	2.7 - 3.0
OTE (%) ^{e)}	32	17	22	27	20	28
[metHb] (%)	2.2	4.5	8.0	4.5	2.5	<0.5
Free Hb (%) ^{f)}	100	4.4	2.7	3.3	not detected	
[Hb] (g/dL)	5	10	5	5	10	12 - 17
COP (Torr) ^{g)}	15.8	36.4	70.2	2.5	9.5	32
Viscosity (cP) ⁱ⁾	1.0	1.3	6.1	1.5	2.2	7.8
					2.6 (3) ^{h)}	(4) ^{h)}
					0 (20) ^{h)}	0 (20) ^{h)}
						20 - 25
						3 - 4

a) Number-average molecular weight calculated with colloid osmotic pressure. b) Weight-average molecular weight measured with light scattering analysis. c) The weight of PEG was obtained by gravimetry of dried samples. d) PLP/Hb = 3 by mol. e) Oxygen transporting efficiency: difference in oxygen saturation between 40 and 100 Torr pO₂. f) Monomeric Hb was detected by size-exclusion chromatography (TOSO TSKgel G3000SWXL) for acellular Hb. For HbV the monomeric Hb was not detected in the supernatant after ultracentrifugation (50,000g, 40 min). g) colloid osmotic pressure. h) PEG-HbV was suspended in 5% human serum albumin (HSA). i) at 332 s⁻¹

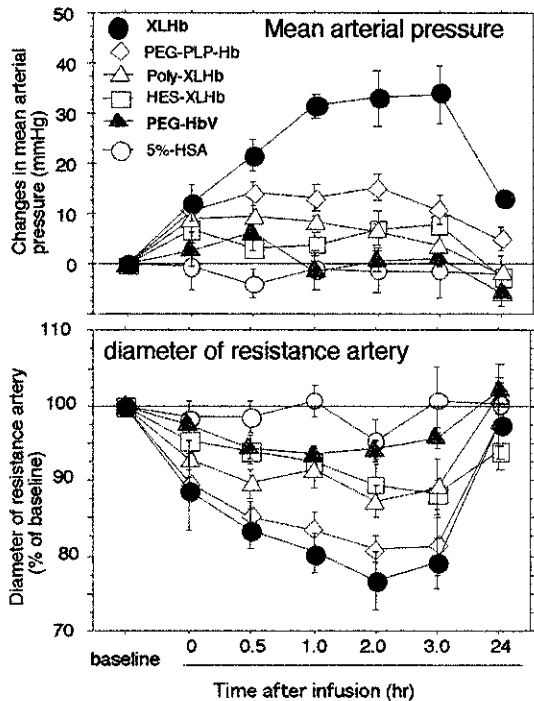


Fig. 5 Changes in mean arterial pressure and diameter of resistance artery after infusion of different Hb products. The time point 0 hr indicates less than 30 seconds after completion of infusion.

XLHbの投与直後から血圧が亢進し、3時間後でも約30mmHg上昇の高い値を推移した(Fig.5)。同時に約20%の抵抗血管の収縮と、50%以上の血流量の低下が認められた。酸素輸液の粒子径増大に伴いこの変化幅は減少し、PEG-PLP-Hb、Poly-Hbでの血圧亢進は約10-15mmHgに留まった。非細胞型の中で最大粒径のHES-Hb投与の場合が最も変化が小さく、更に細胞型のPEG-HbV、及び対照のアルブミン投与においては、殆ど変化は見られなかった。

抵抗血管の収縮及び血圧上昇は、血管内皮弛緩因子であるNOを結合捕捉する反応に起因している。血管壁内皮層には数十nmの細孔があり、小粒径のHb分子(7 ± 2 nm)は内皮層を透過して平滑筋近傍にまで到達してNOを捕捉し、その結果、血管収縮、及び血圧上昇に繋がったと考えられる。大粒径(224 ± 76nm)のPEG-HbVでは、平滑筋近傍にまで到達出来ないため血圧の上昇は認められなかった。また、ストップフロー法により測定したPEG-HbVのNO結合速度定数は $4.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり、非細胞型のHbの値 $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ に比較して一桁遅いことから、NO捕捉反応がHbの細胞化によって抑制されることも寄与していると考えられる。

D. 結論

溶液物性を血液と同等に調節できるという点で、非細胞型Hbと比較して細胞型のHb小胞体が酸素輸液として優れていると言える。また、血管内皮弛緩因子NOに関連する血圧亢進は分子のサイズに依存し、粒径の大きなHb小胞体でこの種の副作用が無いことが明らかとされた。従って血管活性が無いという点でも、Hb小胞体が酸素輸液として適当であると判断できる。

3. ヘモグロビン小胞体の常温長期保存の可能性

A. 目的

酸素輸液の保存形態としては、溶液状態で長期間常温棚保存でき、開封後すぐに使用できることが理想である。そこで、ポリエチレングリコール(PEG)鎖により表面修飾をしたHb小胞体(PEG-HbV)分散液を4, 23, 40°Cにて窒素雰囲気下で保存し、諸物性値の経時変化からHbV分散液の保存安定度を検討した。また脂質の分解の有無を高速液体クロマトグラフ-質量分析(LC-MS)により検討した。

B. 方法

無菌的雰囲気下で調製したPEG-HbV分散液([Hb]: 10 g/dL, [PEG-DSPE]: 0.30 mol%, [ピリドキサル 5'-リン酸(PLP)]:[Hb]=3/1, [ホモシステイン(Hcy)]:5 mM, pH7.4 in PBS)に窒素を通過して酸素を除去した。4, 23, 40°Cで保存し、1) 紫外可視吸収スペクトル(300 ~ 900 nm, 生理食塩水100倍希釈)、2) 濁度(900 nm吸光度, 生理食塩水10倍希釈)、3) 粒径分布、4) 酸素結合解離曲線(P_{50} , OTE, Hill係数)、5) メト化率の推移(P_{O_2} : 23 Torr, 37°C)について保存12ヶ月後まで測定を行った。脂質の分析は、試料を凍結乾燥後クロロホルムに溶解させて脂質成分を抽出し、0.5 mL/minの流速でメタノールを溶離液として40°CにおいてLC-MS(LCMS-QP8000 α島津)を測定した。ガス流速は2.5 L/minとし、走査速度は2.0 sec/scanとした。

C. 結果および考察

いずれの温度でもPEG-HbVの分散安定度(粒径、濁度)は保持されたが(Fig.6)、40°C 1年間保存後では

沈澱形成、脂質の分解、pHの低下、そして内包Hb総量の4%が漏出していることが認められた。他方、4℃、23℃保存では1年後も分散度が保持され、Hbの漏出も検出限界以下であった。保存前に3%あったmetHbは、徐々に減少し1カ月後には1%以下になった(Fig.7)。これは内包した還元剤であるhomocysteineが残存酸素を消費し、更にmetHbを還元した為である。酸素親和度(P_{50})は、保存前 38 Torrであったが、40℃保存した場合は6カ月後に 33 Torrにまで低下、1年後には 43 Torrにまで更に低下した。

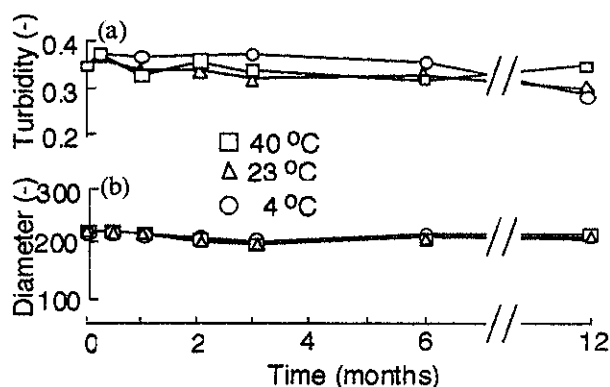


Fig. 6 Changes in dispersion state of PEG-HbV during preservation at 4, 23, and 40 °C for one year. (a) Turbidity of 10 times diluted samples at 900 nm. (b) Mean diameter changes measured with a Coulter particle analyzer.

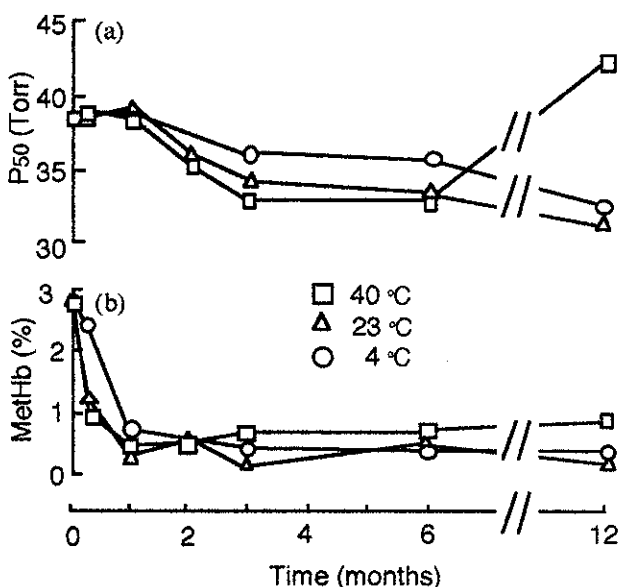


Fig. 6 Changes in the parameter of oxygen binding properties of PEG-HbV during preservation at 4, 23, and 40 °C for one year. (a) oxygen affinity, P_{50} , and (b) metHb content.

他方、4℃、23℃で保存した場合はそれぞれ36 Torr、32 Torrにまで徐々に低下するに留まった。この程度の減少では酸素運搬機能に問題は無い。

LC-MS分析では(Fig.8)、保存前のPEG-HbVではDPPG, DPPC, cholesterolの溶出時間がそれぞれ9, 15, 17.5 minであった。23℃/1年及び40℃/6ヶ月保存後のHbVでも同様のピークが得られ、脂質の分解は確認されなかった。しかし、40℃/1年保存後のPEG-HbVでは15.8 minに新たなピークが出現し、18 minにおける肩も増大した。LC-MSのピークから前者はDPPG及びDPPCのリン酸エステル結合が切れて生じたジパルミトイルグリセロールに対応し、後者はヒドロキシル基及びメチル基由来のcholesterol誘導体に対応しているものと判断された。

D. 結論

ポリエチレングリコールで表面修飾を施し、また脱酸素化を行うことより、Hb小胞体は少なくとも室

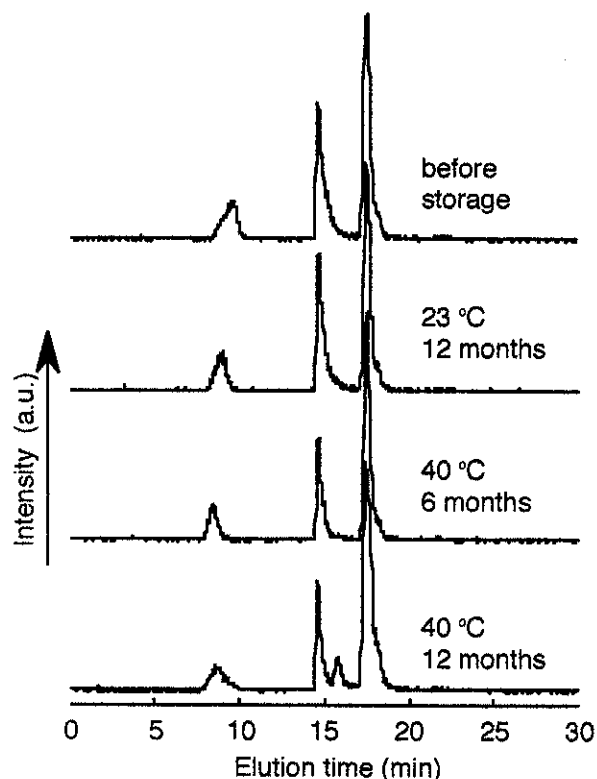


Fig. 8 The LC-MS elution profiles of the lipid components of the PEG-HbV before and after the preservation. The peaks at around 9 min, 15 min, and 17.5 min correspond to DPPG, DPPC, and cholesterol, respectively.

温で1年間の棚置き保存が可能であることが明らかとなった。安定度試験は現在も継続中である。

4. メトヘモグロビンの新しい還元系の構築

A. 目的

Hbは鉄二価(Fe^{2+})のときに酸素を可逆的に結合するが、オキシ体(HbO_2)は自動酸化により次第に鉄三価(Fe^{3+})のメト体(metHb)になり酸素配位能を失う。我々は還元剤として一連のthiol類を検討し、自動酸化速度を遅延させる効果をHb小胞体において見出している。

ヘム蛋白質は、ある条件で照射によりヘムが還元される現象が知られており、その機構について様々な提案がされている。そこで本報では、Hbの光還元機構を解析し、還元を促進させる条件を検討した。

B. 方法

カルボニルヘモグロビン(HbCO)に小過剰のフェリシアン化カリウムを作用させた後、両性イオン交換樹脂により過剰分やフェロシアン化カリウムを除去し、メト化率99.8%の metHb を得た。

純水またはリン酸緩衝液(10 mM, pH 5~9)を石英セルに入れて密封し通気(Ar , N_2 , O_2 , CO)した後、 metHb 溶液(10 μL)を注入し濃度を10 μM とした。高圧水銀灯(250 W)とcut-offフィルター(U-360)を組み合

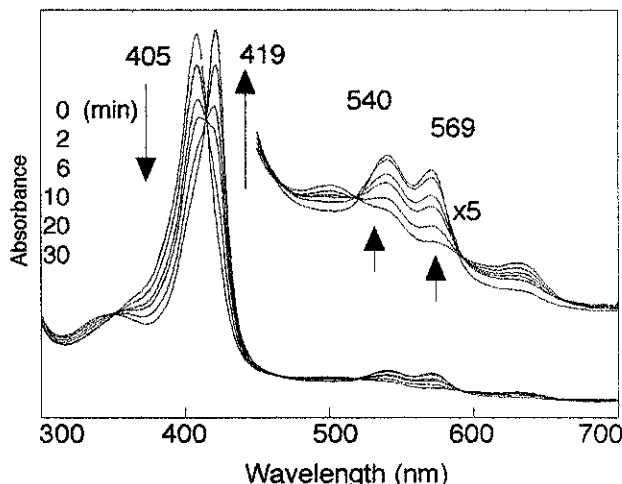


Fig. 9 Photoreduction of metHb in PBS (pH 7.4) by irradiation at 365 nm light in CO atmosphere. [metHb] = 2.5 μM , [mannitol] = 100 mM.

わせ、最大照射波長365nm(N帯付近)の光照射(1280 mJ/cm^2)にて光還元を実施した。Soret帯のスペクトル変化(λ_{max} : 405 nm \rightarrow 419 nm) からメト化率の推移を測定した。mannitolなどラジカル捕捉剤、各種アニオンの添加効果、pHの影響についても検討した。還元した HbCO に関して、等電点電気泳動、Native-PAGE電気泳動を測定した。

C. 結果および考察

metHb の光還元は、 Ar , N_2 , O_2 のいずれの雰囲気でも殆ど進行せず、またSoret帯の吸収が低下したことから、分解反応の生起が認められた。一方で、 CO 雰囲気では HbCO に特徴的なスペクトル(λ_{max} : 419, 540, & 569 nm)となり、50分間で95%還元された (Fig. 9,10)。これは還元されたヘムに即座に CO が結合することで逆電子反応が抑制された為と考えられる。

metHb の光還元はpHの低下と共に速くなった。これはpHの低下により metHb がRelax(R)状態からTense(T)状態になり、酸化還元電位が高くなる特性と関連している。また、IHPを添加した場合には、無添加系に比較して還元速度が二倍以上速くなった。これはIHPの添加が metHb をT状態に変換した為である。アニオン添加(100 mM)の影響を検討したところ、 metHb に極めて強く配位する CN^- , N_3^- の添加では光照射につれ退色(Soret帯吸収の低下)が認められ、分解が考えられた。ハロゲンイオンでは還元速度は $\text{F}^- < \text{Cl}^- \approx \text{Br}^- < \text{I}^-$ となり配位の強さに対応していた。 metHb のT状態およびアニオンが配位していな

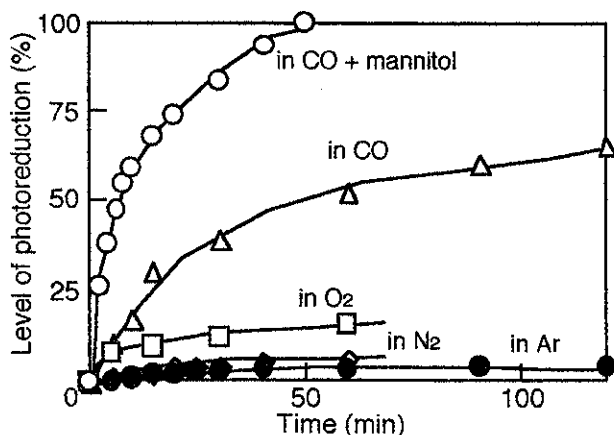


Fig. 10 Effect of dissolved gases (CO , Ar , N_2 , and O_2) on photoreduction of metHb by irradiation of 365 nm light in PBS (pH 7.4). [metHb] = 2.5 μM . Mannitol (100 mM) was added to facilitate the photoreduction (in CO).

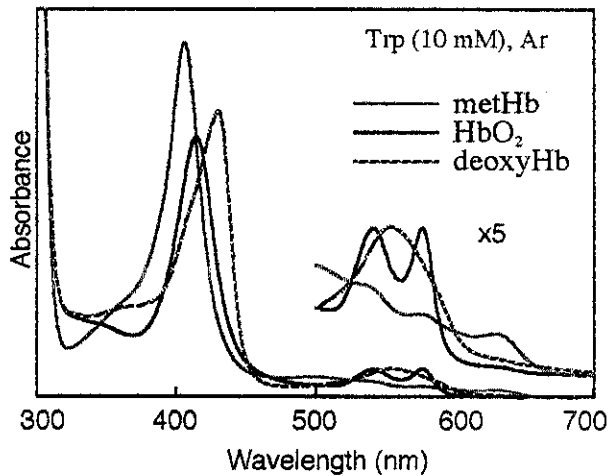


Fig. 11 UV/vis spectra of metHb, photo-reduced Hb in the presence of Trp in Ar atmosphere, and after bubbling with oxygen. The peak λ_{max} = 415 nm indicates HbO₂ formation, thus the oxygen binding property was restored.

い状態(aquametHb)は高スピン状態であり、このとき還元されやすい。

純水中でも光還元が進行し、またmannitolなどのラジカル捕捉剤、Trp, Tyrなどのアミノ酸添加で光還元が促進されたことから、ラジカルの生起、グロビン鎖の電子供与、またHb分子内でアミノ酸残基を経由した電子移動の寄与が考えられる。特にTrp添加系では、Ar雰囲気でも還元が効率高く進行した。Ar雰囲気でも還元したdeoxyHbに酸素を吹きつけると速やかにHbO₂に変化し、酸素配位能の復元が確認された(Fig. 11)。

D. 結論

近紫外領域の光照射によってmetHbの還元を著しく促進する条件を明らかにした。今後はより長波長の照射によって還元して酸素配位を復元できる系を構築し、Hb小胞体に応用させる。

5. ヘモグロビン小胞体の表面修飾剤としての新規PEG脂質の合成と機能

A. 研究目的

ヘモグロビン小胞体の血中滞留時間、および分散安定度の向上を目的として、より高分子量のPEG鎖

でHb小胞体表面を修飾するために、より大きな疎水部を有するPEG脂質を設計・合成した。小胞体への導入安定度、表面修飾した場合の凝集抑制効果を評価し、Hb小胞体の表面修飾剤としての利用を検討した。

B. 研究方法

1) 分子設計

PEG脂質の分子設計はHb小胞体への適応を考慮して、a) 生体適合性、生分解性、b) 化学的に安定、c) アシル鎖数の任意制御が可能、d) アシル鎖が均一に配向、e) 合成が容易、とした。これらを満たすものとして、アミノ酸から構成されるデンドロンの分岐末端にアシル鎖を化学的安定度の比較的高いアミド結合にて導入した疎水部を設計した(Fig.12)。アシル鎖の配向は分子力学計算により決定した。

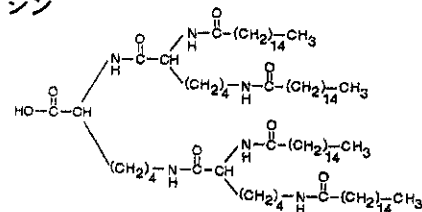
2) 合成

PEG鎖分子量、アシル鎖数の異なる一連のPEG脂質 (PEG_m-nCk; m: PEG鎖分子量×10², n: アシル鎖数, k: アシル炭素数) を合成し(Fig.13)、TLC、IR、¹H-, ¹³C-NMR、質量分析により同定した。

3) 小胞体への導入・脱離量の測定

リン脂質小胞体分散液にPEG脂質溶液を混合し、小胞体表面をPEG鎖で修飾した。等温滴定型微小熱量計 (MCS ITC; MicroCal Inc.) によりPEG脂質の導入過程を観測。また、PEG脂質導入量および希釈 (6

(a) リシン



(b) グルタミン酸

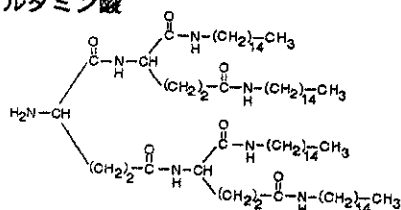


Fig. 12 Structure of hydrophobic part of PEG-lipids

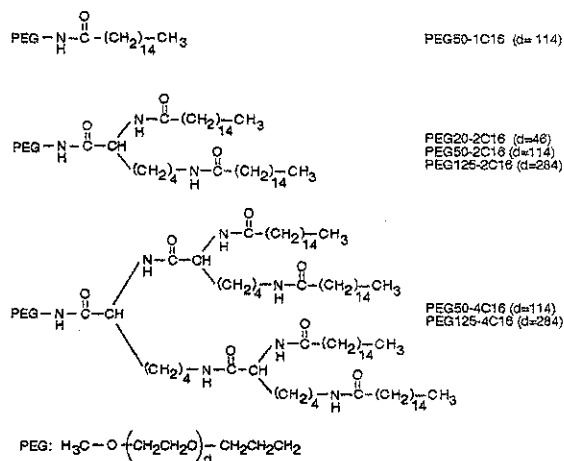


Fig. 13 Structure of PEG-lipids.

倍)による脱離量はPEG脂質導入小胞体分散液を超遠心分離(105g, 30 min, 37°C)にて沈殿させ、その凍結乾燥粉末を重クロロホルムに溶解、¹H-NMRによるPEG鎖メチレン基(3.64ppm)およびDPPCのコリンメチルプロトン(3.41ppm)の積分比より算出した。

4) 水溶性高分子(PEG)添加による小胞体凝集の臨界分子量測定

小胞体分散液(0.08wt%, 2mL)に分子量の異なるPEG水溶液(15wt%, 500μL)を添加して、溶液濁度(600nm)が急増するPEGの分子量を臨界分子量(Mc)として求めた。

C. 研究結果および考察

1) 分子設計

複数のアシル鎖を有する疎水部の分子設計において、アシル鎖の配向性は重要因子である。リシンとグルタミン酸をデンドロン骨格に用いた場合のアシル鎖の配向を分子力学計算に基づきシミュレーションした。リシンの場合、アシル鎖は同一方向に配向した構造が最安定となり、分子集合体を形成した場合、アシル鎖の高い充填状態が期待される(Fig.14a)。他方、グルタミン酸を用いた場合の最安定化構造では、アシル鎖は配向しない(Fig.14b)。これはリシンとグルタミン酸のメチレン基数と分子内水素結合の相違に基づいており、メチレン部の自由度の高いリシンでは分子内水素結合によりアシル鎖を同一方向に配向できる。従って、デンドロン骨格

にリシンを選択して、合成を行った。

(a) リシン (b) グルタミン酸

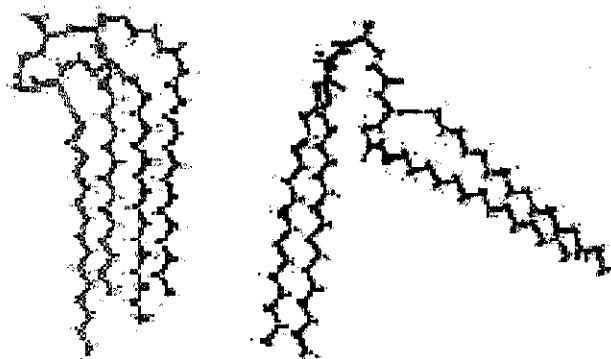


Fig. 14 Molecular dynamic calculation of hydrophobic part of PEG-lipids.

2) 合成

アシル鎖数、PEG鎖分子量の異なる一連のPEG脂質を、アミノ酸からなるデンドロン構造をスパーサーに利用して合成する簡便法を確立した。ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)法を用いてアミド結合させ、精製はエーテルからの再沈殿とカラムクロマトグラフィーにより行った。収率は何れの場合も70~80%であり、簡便に構造明確なPEG脂質を合成する方法を確立した。

3) PEG脂質の導入・脱離挙動

小胞体分散液にPEG脂質を滴下すると、発熱が観測された。これは、小胞体二分子膜に導入されたPEG脂質疎水部の熱運動度低下によるものである。導入速度はアシル鎖数の増大により低下した。PEG脂質はリン脂質小胞体に平衡状態で導入されており、希釈により脱離する。合成したPEG脂質について小胞体からの脱離を検討した。PEG鎖分子量5,000の系ではPEG50-2C16の脱離は観測されず、2本鎖で安定に担持できる(Fig.15)。しかし、PEG鎖分子量12,500のPEG125-2C16では脱離し、PEG125-4C16の脱離は観測されなかった。また、リン脂質型と比較すると、PEG-DPPEではPEG鎖分子量5,000にて脱離が観測されるが、対応するリシン骨格のdiacyl型では観測されないことから、本疎水部はリン脂質型よ

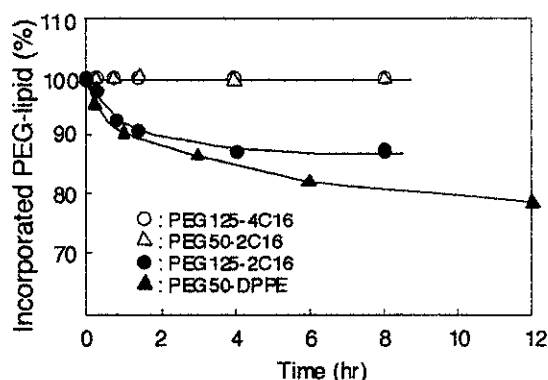


Fig. 15 Detachment of PEG-lipid by dilution.

りも安定に二分子膜に固定されるものと考えられる。従って、小胞体の表面修飾剤としてPEG鎖の分子量を増大させるには、対応させて疎水性を増大させる必要があることが明らかになった。炭素数16のアシル鎖は2本で分子量5,000まで、4本で分子量12,500までを安定に担持できた。

4) 臨界分子量(Mc)によるPEG修飾効果の解析

PEG修飾していない小胞体のMcは1040であるのに対し、PEG鎖分子量5,000 (P50-2C16、P50-DSPE)、および分子量12,500 (P125-2C16、P125-4C16)を表面に導入したリン脂質小胞体のMcは各々10,000および49,500であった(Fig.16)。Mcは疎水部に依らずPEG鎖分子量により決定され、分子量の増大により凝集抑制効果は向上した。従って、凝集抑制効果の向上にはPEG鎖分子量の増大が必要であり、これを安定に固定するためにアシル鎖数の増大が必要である。

D. 結論

簡便な方法によりPEG脂質を収率高く合成することができた。アシル鎖数の増大により高分子量のPEG鎖を小胞体表面に安定に固定できることが明らかになり、これにより小胞体の凝集抑制効果は著しく増大した。大きな疎水部により鎖長の長いPEG鎖を小胞体表面に安定固定させる分子設計が、小胞体の表面修飾剤として効果的である。

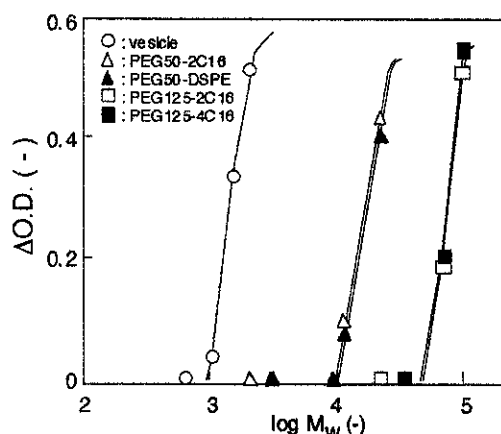


Fig. 16 Critical molecular weight of externally-added PEG to induce aggregation of PEG-modified vesicles.

6. リコンビナントアルブミン-ヘムのO₂、CO結合動力学的解析

A. 研究目的

リコンビナントヒト血清アルブミン(rHSA)にテトラフェニルポルフィリン鉄(II)誘導体(FeP)を計8分子包接させたアルブミン-ヘム複合体(rHSA-FeP)は、生理条件下(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。この複合体では、活性中心(FeP)へのO₂、CO結合反応が、ヘモグロビンと同様にヘム近傍の分子環境に影響を受けることが予想され、実際にそのO₂、CO結合過程が多相系から構成されることを見出した。そこで、FeP包接数の異なるrHSA-FePのO₂、CO結合解離パラメータを複数成分に分けて詳細に検討した。

B. 方法

FePを2、4、8分子包接させたrHSA-FeP(2)、(4)、(8)は既報法に従って調製した。O₂およびCO結合速度定数($k_{on}^{O_2}$, k_{on}^{CO})は、レーザーフラッシュ(Nd:YAG, 532 nm)照射後の再結合に伴う445 nmにおける吸光度変化をtriple-exponential curveで fittingし、得られた3成分の速度定数から算出した。また k_{on}^{CO} のArrheniusプロットから活性化パラメーター(ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger)を決定した。混合比の異なる異なるO₂ / N₂ガスをrHSA-FeP溶液([FeP]: 15 μ M)に通気し、その時の可視吸収スペクトル変化から、変形Hill式を用いて2成

Table 4 CO-, O₂- association rate constants of rHSA-FeP at 25°C.

rHSA-FeP	10 ⁶ k _{on} ^{CO} (M ⁻¹ s ⁻¹) (%)		10 ⁶ k _{on} ^{O₂} (M ⁻¹ s ⁻¹) (%)		10 ² k _{off} ^{O₂} (s ⁻¹)	
	fast	slow	fast	slow	fast	slow
(2)	4.5 (69)	0.65 (31)	34 (67)	9.4(33)	7.4	2.0
(4)	4.7 (65)	0.66 (35)	32 (63)	10 (37)	7.2	2.2
(8)	4.9 (73)	0.67 (27)	34 (73)	9.5(27)	7.5	2.0

分の酸素親和性P_{1/2fast}、P_{1/2slow}を算出した。更にそのvan't Hoffプロットから酸素結合の熱力学パラメータ(ΔH、ΔS)を計算した。O₂解離速度定数(k_{off}^{O₂})はk_{on}^{O₂}/Kから算出した。

C. 結果および考察

1) O₂、CO結合解離の動力学

FePの包接数によらず、CO再結合反応は3成分から構成されることを明らかにした。第一成分(約 2 x 10⁸ M⁻¹s⁻¹)は軸塩基の脱離に伴う反応(13 ~ 16%)で、残りの二成分が5配位FeP錯体へのCO結合と考えられる。FePの結合比を変えた場合も遅い成分のk_{on}^{CO}と速い成分のk_{on}^{CO}は一定値を示したが、その割合は異なっていた(Table 4)。各組成における速い成分と遅い成分の比から、8分子のうち、第2、5サイトに包接されているFePへのCO結合が、他のサイトの値に比べて約7倍遅いことが推測された。

O₂再結合反応の場合も、CO結合と同様に速い反応(3 x 10⁷ M⁻¹s⁻¹)と遅い反応(9 x 10⁶ M⁻¹s⁻¹)が観測された。それらの割合はCO結合の場合と同じ傾向であり、第2、5サイトに包接されているFePへのO₂結合が、やはり他のサイトに比べて約4倍遅いと考えられる。CO再結合反応における各成分のArrheniusプロットはいずれもよい直線性を示した。ヘム蛋白質のO₂、CO結合と同様に、rHSA-FeP(8)のCO結合過程

を二重障壁型の反応特性として考察した。遅い成分のΔG‡はトルエン中の値(44 kJmol⁻¹)より高く、これがエンタルピー項の増大に起因することから、CO結合の遅いサイトではFeP上部にアミノ酸残基の立体障害が存在すると考えられる。

2) O₂、CO親和性と熱力学パラメータ

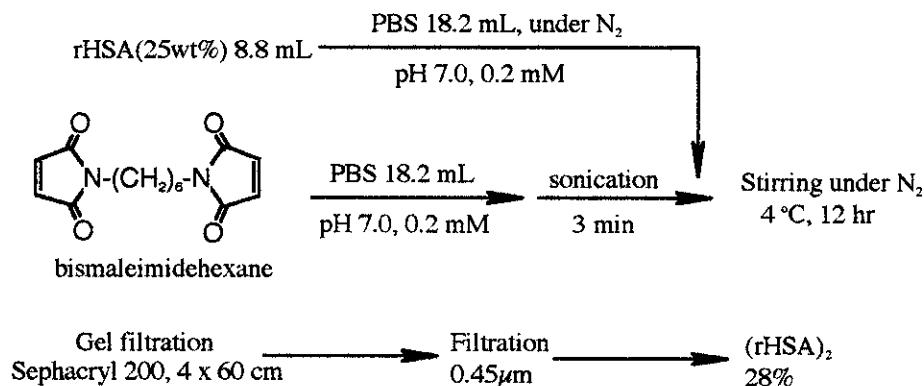
rHSA-FeP(4)と(8)のP_{1/2}^{O₂}を2成分に分けて決定した(Table 5)。いずれの場合も、酸素親和性には違いはなく、その熱力学パラメータ(ΔH、ΔS)も、ほぼ同等の値を示した。また、rHSA-FeP(4)と(8)のP_{1/2}^{CO}は0.1 Torrであった。

D. 結論

rHSA-FePのCO結合反応は三成分から構成された。第一成分は軸塩基の脱離に伴う反応で、残りの二成分が5配位FeP錯体へのCO結合過程であった。O₂についても同様に速い成分と遅い成分が観測された。FeP包接数の異なるrHSA-FeP(2,4,8)について、速い成分、遅い成分の割合を算出、これらの比から、第2、5サイトをO₂、CO結合の遅いslow sitesと決定した。また、O₂、CO親和性、及び熱力学パラメータは、FeP分子の包接数によらず一定であった。

Table 5 O₂-binding affinity and thermodynamic parameters of rHSA-FeP at 25°C.

rHSA-FeP	fast			slow		
	P _{1/2fast} (Torr)	ΔH _{fast} (kJ/mol)	ΔS _{fast} (J/Kmol)	P _{1/2slow} (Torr)	ΔH _{slow} (kJ/mol)	ΔS _{slow} (J/Kmol)
(4)	14	-60	-114	13	-61	-116
(8)	14	-60	-112	13	-57	-102



Scheme 1 Preparation of (rHSA)₂.

7. 二量アルブミン-ヘム複合体の合成と酸素配位

A. 研究目的

リコンビナントアルブミン-ヘム複合体(rHSA-FeP)は、生理条件下(水中、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が、生体内HSA濃度(5 wt%)に調整したrHSA-FePのヘム濃度は最大6 mMで、この値はヒト血液の65%に留まる。勿論、rHSA濃度の増大させることにより、ヘム濃度は上昇するが、コロイド浸透圧の増大を伴う。そこで、より高い酸素結合量を有するrHSA-FeP水溶液の実現を目的として二量アルブミン-ヘム複合体[(rHSA-FeP)₂]を合成し、その構造と酸素配位特性を明らかにした。

B. 方法

rHSA二量体はスキーム1に従い合成した。rHSAに含まれる計35個のCysのうち、唯一SH残基を有するCys34をビスマレイミドヘキサンで架橋し、二量体を合成した(収率28%)。ゲルろ過により二量体のみを単離精製し、Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization(MALDI)法を用いた質量分析(MALDI-TOFMS)と電気泳動(Native-page)から、二量体の生成を確認した。この(rHSA)₂にFeP分子を包接させ、得られた(rHSA-FeP)₂の酸素配位能について検討した。

C. 結果および考察

Native-PAGEで反応の進行を確認後、ゲル濾過により分子量140 kD付近の成分を単離、TOFMSにおける132,494の分子イオンピークと6.6 kDの2価イオンピークの存在から、rHSA二量体の生成を確認した(Fig. 16)。二量rHSAの最安定構造を分子シミュレーション(分子動力学計算)により推定したところ、

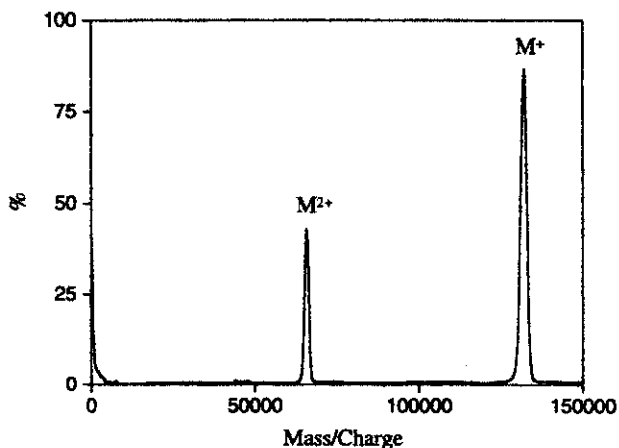


Fig. 17 MALDI-TOF MS of rHSA dimer.

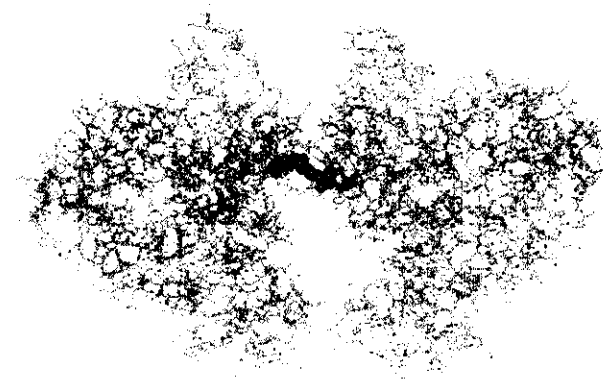


Fig. 18 Simulated structure of rHSA dimer.

Table 6 O₂- and CO-binding parameters and half-lifetime of (rHSA-FeP)₂ and rHSA-FeP at 25 °C.

sample	P _{1/2} * (Torr)	10 ⁷ k _{on} ^{O₂} (M ⁻¹ s ⁻¹)	10 ⁷ k _{off} ^{O₂} (s ⁻¹)	10 ⁷ k _{on} ^{CO} (M ⁻¹ s ⁻¹)	ΔH (kJmol ⁻¹)	ΔS (JK ⁻¹ mol ⁻¹)	τ _{1/2} /hr
(rHSA-FeP) ₂ (16)	12(30)	2.4	3.2	4.6	-61	-116	7(2)
rHSA-FeP(8)	13(33)	2.5	5.0	5.9	-61	-115	7(2)

* at 37 °C in parenthesis

Table 7 Comparison of red cells and rHSA-FeP.

sample	Total protein (wt%)	[heme] (mM)	O ₂ -solubility (mLL ⁻¹)
Human blood	21	9	234
rHSA-FeP (8)	5	6	163
(rHSA-FeP) ₂ (16)	10	12	328

Cys34の架橋後もrHSAユニットの分子構造は歪むことなく、16×10 nm の楕円球を形成していることがわかった(Fig. 17)。

得られた(rHSA)₂に1分子当り16個のFePを結合させ、(rHSA-FeP)₂(16)を調製、遊離のFePが存在しないことから、ヘモグロビン4倍量に相当するヘムが(rHSA)₂ 1分子に包接されたものと考えられる。FePの結合数によらず、等電点は一定値(pI: 4.8)を示し、表面電荷に変化は見られなかった。

(rHSA-FeP)₂(16)水溶液に酸素を通気すると、その可視吸収スペクトルは速やかに酸素錯体型へ移行し、更に酸素分圧に応答して可逆的に変化した。酸素結合解離曲線から決定した酸素親和性(P_{1/2}^{O₂})は30Torrで、従来のrHSA-FePとほぼ同じ値を示した。また、酸素結合速度定数(k_{on}^{O₂}): 2.4×10⁷ M⁻¹s⁻¹、解離速度定数(k_{off}^{O₂}): 3.2×10² s⁻¹、τ_{1/2}^{O₂}も rHSA-FePと同等であった(Table 6)。

(rHSA)₂のコロイド浸透圧は、同重量濃度のrHSAが示す値に比べ50%に低下した。この結果は生体内HSA濃度(5 wt%: 0.75 mM)に調整した(rHSA-FeP)₂溶液が、ヒト血液の1.3倍量相当のヘム濃度(12 mM)を持つ酸素輸液となることを示す(Table 7)。

D. 結論

rHSAのCys34をビスマレイミドヘキササンで架橋し

た(rHSA)₂を合成し、MALDI-TOFMSにより二量体の分子量(Mw: 133 kD)を確認した。rHSA二量体1分子当り16分子のFePを包接させた(rHSA-FeP)₂(16)を調製した。得られた二量化rHSA-FePの等電点は4.8とrHSAの値と同等であり、架橋による表面電荷への影響はない。

二量化rHSA-FePは生理条件下で酸素を可逆的に結合解離できる。その酸素親和性は30 Torr (37°C)で、酸素配位能はrHSA-FePと同等であった。二量化rHSA-FeP (5g/dL)はヒト血液の1.3倍量の酸素を運搬できる酸素輸液となる。

E. 研究発表 (1999.4 - 2000.3)

1. 論文発表

1) 酒井宏水, 富山賢一, 宗慶太郎, 武岡真司, 土田英俊. "ポリオキシエチレン修飾と脱酸素化による酸素輸液(ヘモグロビン小胞体)の長期保存". 人工血液 7, 105-110 (1999)

2) H. Sakai, M. Yuasa, H. Onuma, S. Takeoka, E. Tsuchida. "Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: objective comparison between cellular and acellular types." *Bioconjugate Chem.* 11, 56-64 (2000).

- 3) K. Sou, T. Endo, S. Takeoka, E. Tsuchida, "Poly(ethylene glycol)-modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of poly(ethylene glycol)-lipid into the vesicles", *Bioconjugate Chem.* 11, (2000) in press.
- 4) H. Sakai, K. Tomiyama, K. Sou, S. Takeoka, E. Tsuchida "Polyethyleneglycol-conjugation and deoxygenation enable long term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state", *Bioconjugate Chem.* 11, (2000) in press.
- 5) H. Sakai, H. Hara, M. Yuasa, A.G. Tsai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Intaglietta. "Molecular Dimensions of Hb-based O₂ Carriers Determine Constriction of Resistance Arteries and Hypertension in Conscious Hamster Model." *Am. J. Physiol.* 277 (Heart Circ. Physiol.). (2000) in press.
- 6) J. Wu, T. Komatsu, K. Hamamatsu, E. Tsuchida. "Human Serum Albumin Incorporating Synthetic Hemes: O₂-Coordination Structure and Properties", *Porphyrin* 3, 427-432 (1999).
- 7) E. Tsuchida, T. Komatsu, K. Hamamatsu, Y. Mastukawa, J. Wu. "Human Serum Albumin Incorporating Tetrakis(o-pivalamido)phenylporphinato-iron(II) Derivative as a Totally Synthetic O₂-Carrying Hemoprotein". *Bioconjugate Chem.* 10, 797-802 (1999).
- 8) T. Komatsu, Y. Furubayashi, H. Nishide, E. Tsuchida "5,10,15,20-Tetrakis($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -o-pivalamidophenyl)-porphinatoiron(II) Bearing a Covalently Linked Axial Imidazole via m-Aminobenzoic Acid: Synthesis and Influence of Imidazole Basicity on O₂-Binding Affinity", *Inorg. Chim. Acta.* 295, 234-238 (1999)
- 9) T. Komatsu, K. Hamamatsu, E. Tsuchida, "Cross-Linked Human Serum Albumin Dimers Incorporating Sixteen (Tetraphenylporphinato)iron(II) Derivatives: Synthesis, Characterization, and O₂-Binding Property, *Macromolecules* 32, 8388-8391 (1999)
- 10) E. Tsuchida, T. Komatsu, K. Hamamatsu, Y. Matsukawa, A. Tajima, A. Yoshizu, Y. Izumi, K. Kobayashi, "Exchange Transfusion of Albumin-Heme as an Artificial O₂-Infusion into Anesthetized Rats: Physiological Responses, O₂-Delivery and Reduction of the Oxidized Hemin Sites by Red Blood Cells", *Bioconjugate Chem.* 11, 46-50 (2000)
- 1) H. Sakai, H. Hara, M. Yuasa, S. Takeoka, M. Intaglietta, E. Tsuchida. "Non-invasive observation of resistance arteries in conscious hamsters fitted with dorsal skinfold windows" in "Microcirculation Annual 1999" (Ed. by M. Tsuchiya, M. Asano, Y. Fukuuchi), pp.91-92, Nihon-Igakukan, Tokyo, 1999.
- 2) 土田英俊、酒井宏水 「人工血液: 酸素を運搬する人工赤血球開発の現状」 "21世紀を切り開く先端医療" (東京女子医科大学医用工学研究施設 編) p. 132, Newtonムック(1999).

3. 学会発表

- 1) 酒井宏水、武岡真司、土田英俊 / 微小循環動態の観測による酸素輸液の機能評価 / 第28回医用高分子シンポジウム / 1999.6.29, 30 / 上智大学
- 2) H. Sakai, H. Onuma, K. Tomiyama, S. Takeoka, E. Tsuchida/ Hemoglobin-based oxygen carriers (1): Synthesis and physicochemical characterization of crosslinked, polymerized, polymer-conjugated and encapsulated / The 5th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies / 1999.8.31-9.5. / Waseda Univ.
- 3) H. Sakai, S. Takeoka, M. Intaglietta, E. Tsuchida/ Hemoglobin-based oxygen carriers (2): Macromolecular dimensions determine blood flow in relation to nitric oxide (NO) binding / The 5th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies / 1999.8.31-9.5. / Waseda Univ.
- 4) H. Sakai, H. Onuma, S. Takeoka, E. Tsuchida. / Photoreduction of methemoglobin and application to hemoglobin vesicles as O₂ carrier. / IUPAC 8th International Symposium on Macromolecule-Metal Complexes / 1999.9.5-8 / Waseda Univ.
- 5) T. Komatsu, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Exchange Transfusion with Albumin-Heme as an Artificial O₂-Infusion into Hemorrhagic Shock rats: Physiological Responses, O₂-Delivery and Reduction of the Oxidized Hemin Sites by Red Blood Cells / The 5th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies / Tokyo, 31 Aug. 5 Sept. 1999 / Waseda Univ.
- 6) T. Yanagimoto, T. Komatsu, E. Tsuchida / Self-Assembled Fibers Made of Lipidporphyrinato-zinc(II) and -iron(III) Complexes with an Intramolecular Coordinated Axial Imidazole / IUPAC 8th International Symposium on Macromolecule-Metal Complexes / Tokyo, 5-8 Sept. 1999. / Waseda Univ.

2. 論 説

- 7) J. Wu, T. Komatsu, E. Tsuchida / Human Serum Albumin Incorporating Tetraphenylporphyrinatoiron(II) Derivative as a Synthetic O₂-Carrying Molecule / IUPAC 8th International Symposium on Macromolecule-Metal Complexes / Tokyo, 5-8 Sept. 1999. / Waseda Univ.
- 8) Y. Matsukawa, T. Komatsu, E. Tsuchida / Kinetics of O₂- and CO-Binding to Human Serum Albumin-Heme Hybrid / IUPAC 8th International Symposium on Macromolecule-Metal Complexes / Tokyo, 5-8 Sept. 1999. / Waseda Univ.
- 9) T. Komatsu, K. Hamamatsu, E. Tsuchida / Crosslinked Human Serum Albumin Dimer Incorporating Sixteen Tetraphenylporphyrinatoiron(II) Derivatives: Synthesis, Characterization, and O₂-Binding Property / IUPAC 8th International Symposium on Macromolecule-Metal Complexes / Tokyo, 5-8 Sept. 1999 / Waseda Univ.
- 10) Y. Wu, T. Komatsu, E. Tsuchida / Preparation of Anode Materials for Lithium Ion Batteries under Mild Conditions / IUPAC 8th International Symposium on Macromolecule-Metal Complexes / Tokyo, 5-8 Sept. 1999 / Waseda Univ.
- 11) 土田英俊 / 会長シンポジウム「人工赤血球(酸素輸液)」 / 第6回日本血液代替物学会 / 1999.9.10, 11 / 京王プラザホテル
- 12) 酒井宏水、富山賢一、武岡真司、堀之内宏久、小林紘一、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体の細網内皮系への影響 / 第6回日本血液代替物学会 / 1999.9.10, 11 / 京王プラザホテル
- 13) 酒井宏水、小沼浩人、武岡真司、Marcos Intaglietta、土田英俊 / シンポジウム: -臨床医療に向けて-、セル型、非セル型酸素輸液の物性比較、および血圧亢進と抵抗血管収縮の相関の検討 / 第6回日本血液代替物学会 / 1999.9.10, 11 / 京王プラザホテル
- 14) 宗慶太郎、富山賢一、酒井宏水、武岡真司、土田英俊 / 人工赤血球: ヘモグロビン小胞体の常温長期保存 / 第6回日本血液代替物学会 / 1999.9.10, 11 / 京王プラザホテル
- 15) 武岡真司、Takashi Yonetani, 土田英俊 / 活性酸素から考慮したヘモグロビン利用酸素輸液のセル構造の重要性 / 第6回日本血液代替物学会 / 1999.9.10, 11 / 京王プラザホテル
- 16) 武岡真司、小沼浩人、酒井宏水、土田英俊 / ヘモグロビンを用いる酸素輸液の合成と物性比較 / 日本医工学治療学会第13回学術大会 / 1999.9.17,18 / 早稲田大学国際会議場
- 17) 酒井宏水、土田英俊 / ヘモグロビンを用いる酸素輸液の微小循環系に及ぼす影響 / 日本医工学治療学会第13回学術大会 / 1999.9.17, 18 / 早稲田大学国際会議場
- 18) 酒井宏水、小沼浩人、武岡真司、土田英俊 / ヘモグロビンの光還元機構 / 第48回高分子討論会 / 1999.10.6-8 / 新潟大学五十嵐キャンパス
- 19) 宗慶太郎、大川春樹、武岡真司、土田英俊 / ポリオキシエチレン結合デンドロン型脂質の合成と物性 / 第48回高分子討論会 / 1999.10.6-8 / 新潟大学五十嵐キャンパス
- 20) 武岡真司、遠藤太郎、宗慶太郎、土田英俊 / ポリオキシエチレン結合デンドロン型脂質の分子集合 / 第48回高分子討論会 / 1999.10.6-8 / 新潟大学五十嵐キャンパス
- 21) 武岡真司 / 分子集合を利用した細胞型人工赤血球の創製とその評価 / 第10回バイオマテリアル若手研究会 / 1999.11.5,6 / 八王子大学セミナーハウス
- 22) 武岡真司 / 人工血液の製剤化技術とその物性評価 / 第46回界面科学部会秋期セミナー / 1999.11.18 / 箱根アカデミーハウス
- 23) 武岡真司、小沼浩人、富山賢一、酒井宏水、土田英俊 / 細胞型・非細胞型ヘモグロビンの合成と酸素輸液としての精密評価 / JST 単一分子・原子レベルの反応制御 第3回シンポジウム -領域の全体像- / 1999.11.29,30 / 科学技術館サイエンスホール
- 24) 酒井宏水、小沼浩人、武岡真司、土田英俊 / 光照射によるヘモグロビンの電子過程 / JST 単一分子・原子レベルの反応制御 第3回シンポジウム -領域の全体像- / 1999.11.29,30 / 科学技術館サイエンスホール
- 25) 武岡真司、酒井宏水、土田英俊 / 酸素輸液の開発 / 日本医工学治療学会第14回学術大会 / 2000.2.25,26 / 東京、ホテルセンテリーハイアット
- 26) 土田英俊 / 人工血液の現状と未来 / 第13回日本自己血輸血学会総会 / 2000.2.25,26 / 東京、TFTホール