

- 27) 小沼浩人、梅山満愛、酒井宏水、武岡真司、土田英俊 / メトヘモグロビンの光電子還元 / 日本化学会第78春季年会 / 2000.3.28-31 / 日本大学船橋キャンパス
- 28) 森 かつら、大川春樹、宗 慶太郎、武岡真司、土田英俊 / 多アシル鎖型ポリオキシエチレン脂質の合成と分子集合 / 日本化学会第78春季年会 / 2000.3.28-31 / 日本大学船橋キャンパス
- 29) 宗 慶太郎、森 かつら、酒井宏水、武岡真司、土田英俊 / 多アシル鎖型POE脂質によるリン脂質小胞体の表面修飾とその安定度 / 日本化学会第78春季年会 / 2000.3.28-31 / 日本大学船橋キャンパス
- 30) 小松晃之、浜松和芳、土田英俊 / 二量化アルブミン-ヘムの構造と酸素 / 第48回高分子学会年次大会 / 1999.5.27-29 / 国立京都国際会館
- 31) 小松晃之(招待講演) / ポルフィリン組織体とその酸素輸液への応用 / 第23回高分子錯体若手懇談会 / 1999.7.28-30 / 湯河原厚生年金会館
- 32) 小松晃之、土田英俊 / 二量化アルブミン-ヘムの特徴と酸素結合能 / 第6回日本血液代替物学会 / 1999.9.10, 11 / 京王プラザホテル
- 33) 岡田智行、小松晃之、土田英俊 / アミノ酸結合テトラフェニルポルフィリン鉄錯体の合成と酸素配位 / 第49回錯体化学討論会 / 1999.9.26-28 / 北海道大学
- 34) 松川泰子、小松晃之、土田英俊 / アルブミン-ヘムの構造とO₂、CO結合反応の動力学的解析 / 第49回錯体化学討論会 / 1999.9.26-28 / 北海道大学
- 35) 小松晃之、松川泰子、土田英俊 / アルブミン-ヘムに見られる特異なO₂、CO結合反応 / 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
- 36) 松川泰子、小松晃之、土田英俊 / アルブミン-ヘムのNO配位とその結合パラメータ / 日本化学会第78春季年会 / 2000.3.28-31 / 日本大学船橋キャンパス
- 37) 中川晶人、小松晃之、土田英俊 / 光照射を利用したアルブミン-ヘムの還元反応 / 日本化学会第78春季年会 / 2000.3.28-31 / 日本大学船橋キャンパス
- 38) 宮武 薫、小松晃之、土田英俊 / ヒスチジンを軸塩基として導入したテトラフェニルポルフィリン鉄誘導体の合成と酸素配位 / 日本化学会第78春季年会 / 2000.3.28-31 / 日本大学船橋キャンパス
- 39) 早川祥一、小早川牧子、柳本徹也、小松晃之、土田英俊 / イミダゾリル基を共有結合したオクトパスポルフィリン鉄の合成 / 日本化学会第78春季年会 / 2000.3.28-31 / 日本大学船橋キャンパス
- 40) 柳本徹也、小松晃之、土田英俊 / 自己組織化したオクトパスポルフィリン集合体の構造と酸素配位 / 日本化学会第78春季年会 / 2000.3.28-31 / 日本大学船橋キャンパス

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

- 1) 樹枝状分岐構造を持つ両親媒性化合物 (特願平11-245731)
- 2) 安定保存可能な酸素輸液製剤 (特願平11-253119)
- 3) 多段式液処理装置 (特願平2000-)
- 4) ポルフィリン金属錯体-アルブミン包接化合物及び酸素運搬体 (特願平08-301873)
- 5) Porphyrin metal complex-albumin inclusion compound and oxygen carrier composition comprising of the same field of the invention (US App. No. 081639.798)

分担研究報告書

酸素運搬能を有する人工赤血球の創製とその評価に関する研究

1. 感染のない精製ヘモグロビンの製法およびその効果的プロセスの確立
2. ヘモグロビン小胞体の血小板との相互作用
3. 免疫系への影響の検討

分担研究者	池田 久實	北海道赤十字血液センター	所長
研究協力者	池淵 研二	北海道赤十字血液センター	副所長
	藤原 満博	北海道赤十字血液センター	研究部
	阿部 英樹		同上
	平山 順一		同上
	若本 志乃舞		同上
	伊藤 貴俊		同上

研究要旨 酸素輸液の原料となるヒト赤血球由来ヘモグロビン溶液（SFH）の安全性を確保するため、メチレンブルー及びジメチルメチレンブルーを用いた光処理によるvesicular stomatitis virus（VSV）の不活化、加熱処理法によるVSV不活化について検討した。SFH中VSVは、1 μ Mメチレンブルー存在下11.4 J/cm²可視光照射により、5.6 log₁₀不活化された。このときメトヘモグロビン含量、P₅₀の有意な低下がみられた。一方、1 μ Mジメチルメチレンブルーでは、照射量1.7 J/cm²にて6.4 log₁₀の不活化率が得られ、メトヘモグロビン含量およびP₅₀とも殆ど変化がなかった。加熱処理(60℃, 1時間)では、空気、N₂及びCOのいずれの雰囲気下でもVSVは5.8 log₁₀以上不活化された。しかし空気及びN₂雰囲気下では顕著なメトヘモグロビンの生成が起った。一方、CO雰囲気下ではメトヘモグロビン含量に大きな変化は認められなかった。

細胞型であるHb小胞体について、血小板との相互作用を検討したところ、コラーゲン、トロンピン、またはリストセチン刺激による血小板凝集能に影響は見られなかった。多血小板血漿を用いた場合でも、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認められなかった。

Hb小胞体の免疫系への影響として、好中球の走化能及び貪食能の検討を行ったが影響は認められなかった。また、好中球に貪食され細胞内に取り込まれている確証は得られなかったが、細胞表面への付着が示唆された。

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

A. 研究目的

ヒト赤血球由来の精製ヘモグロビン溶液（SFH）の安全性をより高めるためには、複数のウイルス不活化法・除去法の導入は必須である。前年度に引き続き、メチレンブルー（MB）及びその誘導体であるジメチルメチレンブルー（DMMB）を用いたウイルス光不活化法を検討した。また、早稲田大学で採用されている液状加熱

によるウイルス（VSV）不活化効果について、空気、窒素及び一酸化炭素雰囲気下にて検討した。

B. 研究方法

1) MB及びDMMB光不活化法

SFHにVSV、終濃度1あるいは5 μ MのMBあるいはDMMBを添加し、24ウェルプレートに1 mLずつ分注し（液厚1 mm）、赤色光（660 nm）を照射した。VSV感染性はVero細胞を用いたプラークアッセイにより求めた。メトヘモグロビン含量（%Met-Hb）は、シアンメトヘモグロビン法によ

表1. MB及びDMMB光処理によるSFH中VSVの不活化。

Dye (μ M)	Irradiation (J/sq cm)	VSV inactivation (\log_{10})	Met-Hb (%)	P_{50} (mmHg)	SOD (U/ml)
MB					
1	0	0	1.27 \pm 0.17	10.67 \pm 0.31	3.30 \pm 0.25
1	1.71	1.84 \pm 0.14	2.27 \pm 0.31	N.T.	3.25 \pm 0.09
1	2.85	2.65 \pm 0.33	3.06 \pm 0.34	N.T.	3.25 \pm 0.14
1	5.70	5.04 \pm 0.37	4.53 \pm 0.82	N.T.	3.25 \pm 0.17
1	11.40	5.61 \pm 0.97	4.49 \pm 0.56	9.30 \pm 0.47	3.15 \pm 0.15
5	11.40	N.T.	13.24 \pm 0.71	N.T.	3.06 \pm 0.23
DMMB					
1	0	0	1.30 \pm 0.19	10.50 \pm 0.35	3.32 \pm 0.17
1	0.57	2.23 \pm 0.07	1.30 \pm 0.21	N.T.	3.41 \pm 0.50
1	1.14	4.97 \pm 1.04	1.11 \pm 0.01	N.T.	3.20 \pm 0.06
1	1.71	6.43 \pm 0.69	1.40 \pm 0.16	9.83 \pm 0.47	3.37 \pm 0.13
1	11.40	N.T.	1.74 \pm 0.15	N.T.	3.22 \pm 0.09
5	11.40	N.T.	4.62 \pm 0.23	N.T.	3.09 \pm 0.20

Values of VSV inactivation, Met-Hb, P_{50} and SOD are the mean \pm S.D. of separate experiments (n=3). N.T., not tested

り、酸素親和性 (P_{50}) はHemox-Analyzerにより、SOD活性は吸光度法により測定した。

2) 加熱処理法

洗浄赤血球を等量の純水添加で溶血し、VSVを添加した。処理前検体を採取後、 N_2 あるいはCOガス置換し(30分間)、密閉後60℃で1時間溶液を攪拌しながら加熱処理を行った。空気下でも、同様に加熱処理した。処理前後の検体のVSV感染価は、Vero細胞を用いたプラークアッセイにより求めた。 $\%$ Met-Hbは、シアンメトヘモグロビン法により測定した。

C. 研究結果

MB 1 μ M、11.4 J/cm²光照射により、VSVは

表2. 加熱処理によるヘモグロビン溶液中VSVの不活化

Atmosphere	VSV inactivation (\log_{10})	$\%$ met-Hb (%)	
		pre	post
Air	>6.23	6.6	57.4
N_2	5.95	6.1	40.5
CO	>5.78	2.1	2.5

5.6 \log_{10} 不活化された(表1)。この時 $\%$ Met-Hbは1.3%から4.5%へと増大し、 P_{50} は10.7mmHgから9.3 mmHgに減少した。一方、DMMB 1 μ M存在下では、1.7 J/cm²光照射により、VSVは6.4 \log_{10} 不活化されたが、 $\%$ Met-Hb及び P_{50} ともほとんど変化がなかった。また、MBおよびDMMB 1 μ Mでは、SOD活性はほとんど低下しなかった。

加熱処理においては、空気、 N_2 及びCO雰囲気下いずれの場合も、VSVは5.8 \log_{10} 以上不活化された(表2)。しかし、空気及び N_2 雰囲気下では $\%$ Met-Hbが大幅に増大した。一方、CO雰囲気下では $\%$ Met-Hbに大きな変化はみられなかった。

D. 考察

前年度までの知見では、MBを用いた光不活化法は、30分間の処理で6 \log_{10} 以上の不活化率が得られ、メト化の亢進も低く、効果が高いことを明らかにした。しかし今回、新規のMB誘導体であるDMMBを用いたところ、MBよりもより低濃度でより高いウイルス不活化効果が得られた。しかもヘモグロビンの酸化や酸素親和度への影響がほとんどないことがわかった。したがって、DMMB光処理法はMBよりも適したウイルス不活化法であると判断された。

SFHに添加したVSVは、60℃、1時間の処理で、

5.8 log₁₀以上の不活化が可能であった。ウイルス不活化能としては十分効果が高い処理であるといえる。しかし、加熱処理によるメトヘモグロビンの生成を抑えるためには、CO置換する必要がある。

2. ヘモグロビン小胞体の血小板との相互作用

A. 研究目的

Hb小胞体は酸素輸液として開発され、出血性ショックの動物モデルにおいて有効性が示されているものの、生体適合性の観点からHbVの血球細胞や内皮細胞への影響を考慮する必要がある。今回我々は血小板凝集能に対する低濃度PEG修飾したヘモグロビン小胞体(PEG-HbV)の影響、及び血小板放出反応に対する高濃度PEG-HbVの影響を検討した。

B. 研究方法

1) 試料

HbV、PEG-HbVは早稲田大学より供与を受けた。

2) 血小板凝集能の測定

400 mL濃厚血小板(PC)をHepes Tyrode's bufferで洗浄後、同buffer (+ Mg, Ca) に浮遊させた。コラーゲン、リストセチン凝集能を測定する場合は血小板をA B型血漿に浮遊させた。血小板(5 x 10⁸/mL)をPEG-HbV ([Hb] = 5.8 mg/dL)と37°C、3分間インキュベートした後、トロンビン、

コラーゲンまたはリストセチンを添加し、PA-200 (メバニクス) を用いて血小板凝集能を測定した。

3) 血小板放出能の測定

40 mL全血(クエン酸三ナトリウム加)から多血小板血漿(PRP)を採取した。血小板浮遊液(PRP: 1.6 x 10⁸/mL、洗浄血小板: 2.0 x 10⁸/mL)とPEG-HbV ([Hb] = 0.29, 1, 2 g/dL)を37°C、10分間ブレインキュベートした後、コラーゲン(1, 2 mg/mL: PRP, 5 mg/mL: 洗浄血小板)を添加して5分間のインキュベートを行った。反応上清を採取し、放出されたRANTESまたはTXB₂の濃度をELISA kitを用いて測定した。

C. 研究結果

コラーゲン、トロンビン、またはリストセチン刺激による血小板凝集能において、PEG-HbVの影響は認められなかった(図1)。

洗浄血小板を用いた場合、アゴニスト非存在下においてPEG-HbVと血小板とのインキュベーションによるRANTES、TXB₂の放出反応に影響はなかった。コラーゲン刺激による血小板のRANTES放出反応において、PEG-HbV ([Hb]= 2 g/dL)系では増強作用がみられた(図2)。しかし、PRPを用いた場合、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(図2)。

D. 考察

血小板凝集能に対する低濃度PEG-HbVの影響がみられなかったこと、高濃度のPEG-HbVにおいて

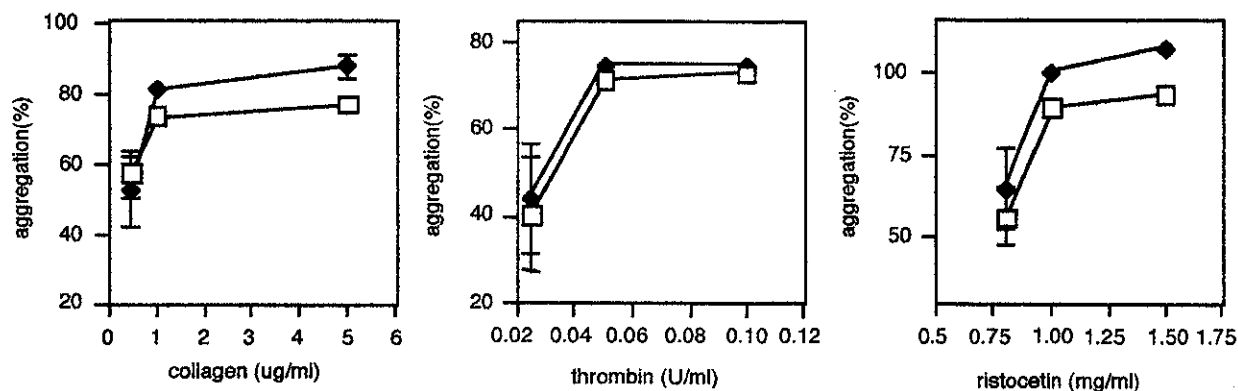
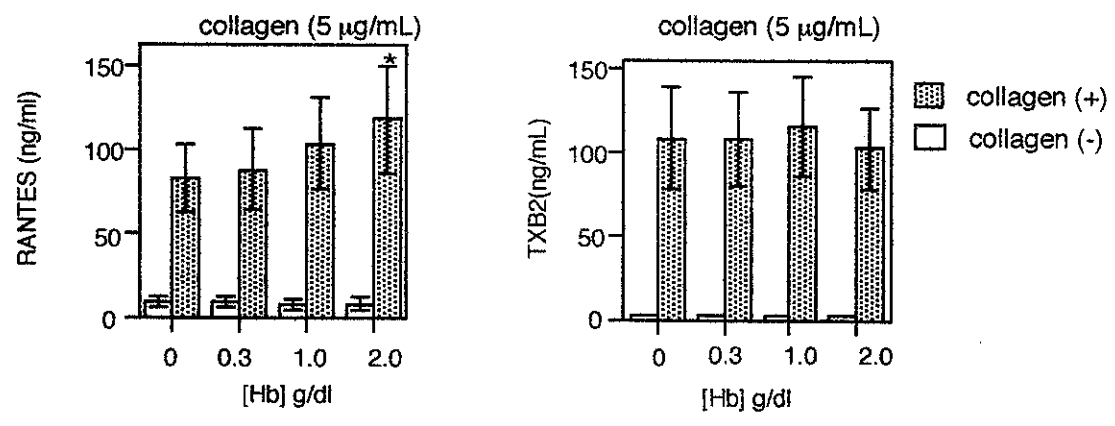


図1. PEG-HbVの血小板凝集能に対する影響。□ control ◆ PEG-HbV

A. washed platelets



B. PRP

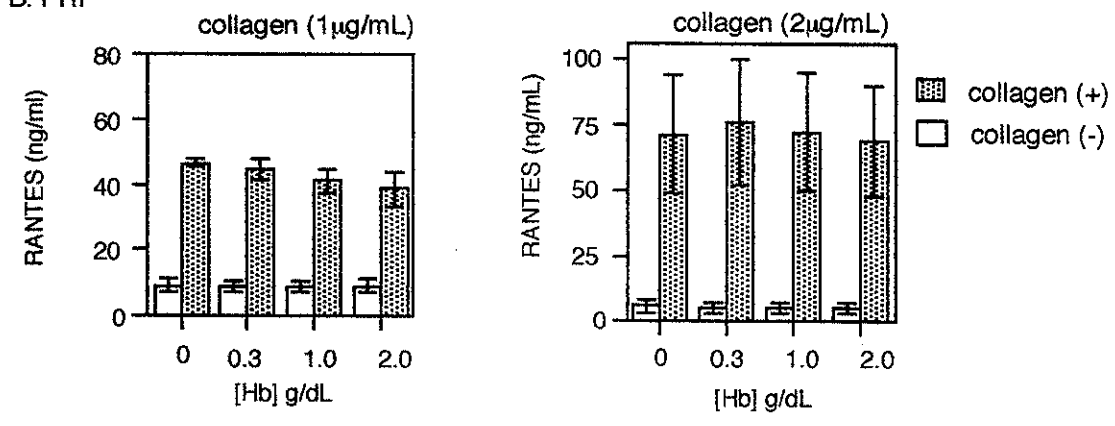


図2. PEG-HbVの血小放出能に対する影響。

*p < 0.05 (collagen v.s. collagen + Hb 2g/dl)

も、洗浄血小板よりin vivoを反映するPRPでは血小板の放出反応に対する影響はみられなかったことから、血小板における生体適合性に関してはPEG-HbVの安全性が示唆された。

3. 免疫系への影響の検討(好中球の機能に対する影響)

A. 研究目的

生体防御機構に重要な役割を果たす好中球の走化能に対するHb小胞体の影響を検討する。好中球に対する強い走化性因子FMLPを用い、24-wellケモタキシスチャンパー法を使用してin vitroでのモデル系での検討を行なった。

B. 研究方法

試料

HbV、PEG-HbVは早稲田大学より供与を受けた。

2) 好中球の走化能測定

好中球は健常人のヘパリン採血由来の血液より6%デキストランにより分離し、試験に用いた。得られた好中球の純度は95%以上であった。好中球(1.0×10⁶/mL in RPMI-1640)を、サンプル(HbVなど)と37℃、5%CO₂下、30分間、プレインキュベートした。試料の濃度はHb濃度が一定となるように調節した。24-wellケモタキシスチャンパー下室に走化性因子FMLPを含むRPMI-1640を加え、上室に細胞懸濁液(3.0×10⁶/mL)を添加し、37℃、5%CO₂下、30分間インキュベートした。チャンパー上室をwellから取り出し、PBSにより3回洗浄した後、下室側に面したフィルター上の細胞をMay-Gruenwald's solution modifiedを用いて固定後、

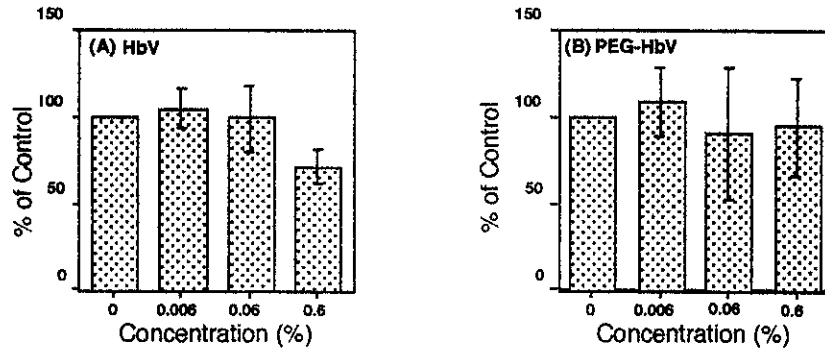


図3. 細胞型Hbの好中球走化能に対する影響
(A) HbV, (B) PEG-HbV

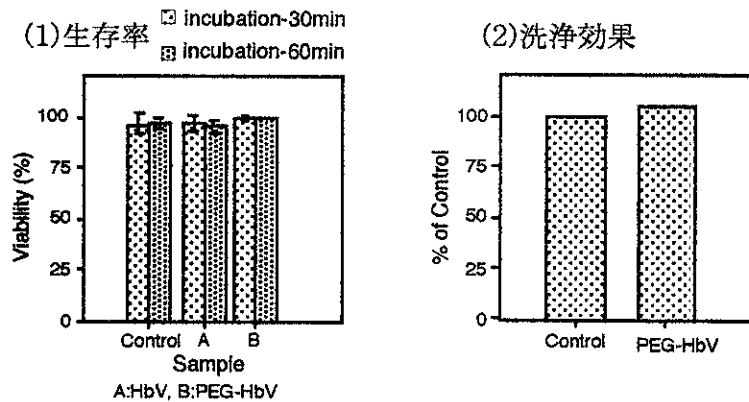


図4. 細胞型Hbの好中球走化能に対する影響 (実験系に及ぼす影響)。

PBS(pH6.4)により洗浄、3%-Giemsa's solutionにより細胞染色を行った。顕微鏡により走化細胞数を計数し、その数より走化能を評価した。

3) 蛍光顕微鏡を用いた好中球のHb小胞体貪食の検討

細胞型Hbを室温、23,000 rpm、30分間の条件で遠沈した後、PKH-67で染色した。未反応のPKH67を除去した後、PBSに再懸濁してサンプルとした。

好中球とPKH-67標識PEG-HbVとを37℃、30分間インキュベーションした後、1%グルタルアルデヒドにて固定し、共焦点レーザー顕微鏡によりFITC蛍光観察を行なった。

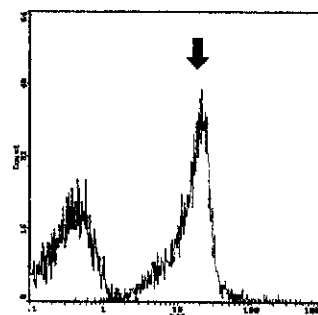
4) フローサイトメトリーを用いた好中球の貪食の検討

好中球とPKH-67標識PEG-HbVとを、37℃、30分間反応させた。貪食による細胞の蛍光強度の変化をフローサイトメーターにより測定した。陽性コ

ントロールとしてポリスチレン粒子 (PC5蛍光、直径約0.2 μm) を用いた。

5) CD11b発現

好中球とPEG-HbVを37℃にて30分間インキュベーションした後、PE標識抗CD11b抗体を加え、37



PC5
[Polystyrene particle ↓]
[Neutrophils Control —]

図5. フローサイトメトリーを用いた好中球の貪食能測定。

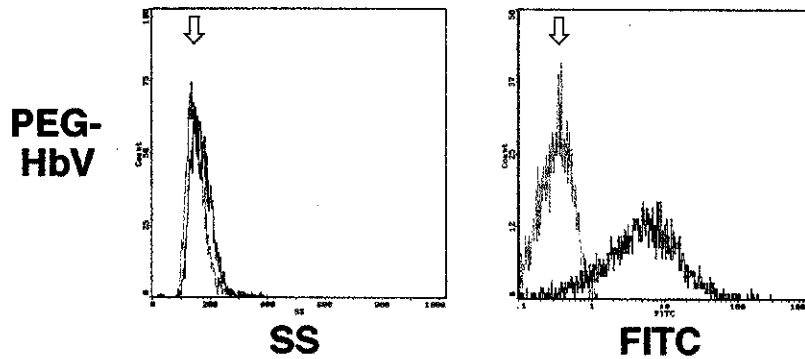


図6. フローサイトメトリーを用いた好中球の貧食能測定
Neutrophils Control, ⇨

℃にて5分間反応させた。FMLP（最終濃度：1 μM）を添加し、37℃にて10分間のインキュベーションを行った後、氷冷により反応を停止させ、フローサイトメーターによりCD11bの発現を測定した。Isotype controlとして、PE標識Mouse IgG1を使用した。

C. 研究結果

1) Hb小胞体の好中球の走化能に対する影響

HbV及びPEG-HbVが好中球の走化能に及ぼす明確な影響は見られなかったが(図3)、最高濃度では走化能抑制効果は、HbVがPEG-HbVより強くなった。

ケモタキシスチャンバー法の結果は、細胞の生存率による影響、またはFMLPと試料との相互作用等による見かけの抑制効果の可能性が考えられる。これらの可能性を確認するため、(1)生存率、(2)ケモタキシスチャンバーへの添加効果、(3)残存する試料を好中球から洗浄除去した場合の効果を検討した。

図4に示した結果から、好中球走化性の抑制作用は、(1)実験反応条件時間の間、PEG-HbVとHbVのいずれも好中球の生存率に影響しなかったことから、細胞毒性によるものではないと考えられた。また、(2)PEG-HbV処理した好中球を洗浄した場合においてもFMLPによる走化能抑制は見られなかったので、相互作用は無いと考えられた。

2) 好中球のHb小胞体貪食

共焦点レーザー顕微鏡では、細胞の自家蛍光が

観察されるのみで、細胞内にPEG-HbVを貪食した像は観察されなかった（データ示さず）。

陽性コントロールPC5ポリスチレン粒子では、無血清条件下において、90°側方散乱光（SS）および細胞蛍光（PC5）の分布の右方向へのシフトがみられ、粒子を貪食して細胞内構造が複雑化していた（図5）。PEG-HbVにおいては90°側方散乱光（SS）の分布シフトは見られなかったが、細胞蛍光の分布の右方向へのシフトが観察された（図6）。PEG-HbVは好中球に貪食され取り込まれてはいないが、表面付着している可能性が考えられた。

D. 考察

HbVおよびPEG-HbVが好中球の走化能に及ぼす影響を検討したが、影響は認められなかった。

PEG-HbVが貪食されている可能性を検討するために蛍光ラベルした試料を作成し、好中球とインキュベーションした。同径のポリスチレンビーズは好中球より貪食されたのに対し、走化性抑制効果の見られなかったPEG-HbVは、吸着の可能性はあるものの貪食の証拠は得られなかった。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Hirayama J, Wagner SJ, Gomez C, Macdonald VW, Abe H, Ikeda H, Ikebuchi K, Sekiguchi S. Virus photoinactivation in stroma-free hemoglobin (SFH) with methylene blue (MB) or 1,9-dimethylmethylene blue (DMMB). *Photochem Photobiol.*, 71, 90-93 (2000).

2) Abe H, et al. Removal of parvovirus B19 from hemoglobin solution by nanofiltration. *Artif Cells Blood*

Substit Immobil Biotechnol, in press.

3) 平山順一、阿部英樹、池淵研二、池田久實. ヘモグロビン溶液のウイルス除去/不活化. *人工血液* 7, 95-98 (1999).

2. 著書、総説

藤原満博、若本志乃舞、池淵研二、池田久實. 非溶血性輸血副作用と血液製剤の保存による生理活性物質の産生. *人工血液* 7, 87-93 (1999).

平山順一、阿部英樹、山田淑子. 人工血液開発の最近の動向. *人工血液* 7, 54-56 (1999).

3. 学会発表

平山順一 他 / メチレンブルーおよびジメチルメチレンブルーによるヘモグロビン溶液中のウイルス光不活化 / 第47回日本輸血学会総会 / 1999.5.12-14 / 仙台国際センター

阿部英樹 他 / 人工酸素運搬体ヘモグロビン溶液からの中空糸膜によるヒトパルボウイルスの除去 / 第47回日本輸血学会総会 / 1999.5.12-14 / 仙台国際センター

伊藤貴俊 他 / リボソーム型ヘモグロビンのヒト好中球走化能に対する影響 / 第47回日本輸血学会総会 / 1999.5.12-14 / 仙台国際センター

若本志乃舞 他 / In vitroにおけるリボソーム型ヘモグロビンの血小板凝集能に対する影響 / 第47回日本輸血学会総会 / 1999.5.12-14 / 仙台国際センター

阿部英樹 他 / 人工酸素運搬体ヘモグロビン溶液からの中空糸膜によるヒトパルボウイルスの除去 / 第6回日本血液代替物学会 / 1999.9.10, 11 / 京王プラザホテル

平山順一 他 / メチレンブルーおよびジメチルメチレンブルーを用いたヘモグロビン溶液に対するウイルス光不活化 / 第6回日本血液代替物学会 / 1999.9.10, 11 / 京王プラザホテル

平山順一 他 / 光増感物質メチレンブルーおよびジメチルメチレンブルーを用いたヘモグロビン溶液のウイルス光不活化 / 第6回日本光生物学協会講演会 / 1999.11.12,13 / 播磨科学公園都市兵庫県立先端科学技術支援センター

池淵研二 (関口定美) / 人工血液 / 第25回日本医学会総会 / 1999.4.4

1. ヘモグロビン小胞体存在下におけるヒト末梢血単核細胞のサイトカイン産生の挙動
2. ヘモグロビン小胞体による出血ショック蘇生とサイトカイン産生の挙動
3. ヘモグロビン小胞体の細網内皮系に対する影響の解析と病理学的検討
4. 酸素輸液投与後の肺微小循環の顕微鏡観測法の確立
5. 酸素輸液を用いた化学療法: 放射線療法の抗腫瘍効果増強

分担研究者	小林 紘一	慶應義塾大学医学部外科	教授
研究協力者	堀之内 宏久	慶應義塾大学医学部外科	講師
	渡辺 真純	慶應義塾大学医学部外科	講師
	泉 陽太郎	慶應義塾大学医学部外科	
	江口 圭介		同上
	吉津 晃		同上
	田島 敦志		同上
	岩丸 有史		同上

研究要旨 細胞型のHb小胞体がヒト末梢血単核細胞を刺激して各種サイトカインを放出させることをin vitroで確認した。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 , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10およびTNF α を検出したが、IL-2, IL-4およびIFN- γ は検出されなかった。これらの結果は、HbVを実際にヒトに投与した際におこりうるサイトカインの産生が生体に与える影響を究明していく上で価値があるものと考えられた。

出血ショックからのHb小胞体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、アルブミンによる蘇生の場合に比較して有意に低い値となり、ショックからの蘇生液としてHb小胞体の酸素運搬能が実証できた。

Hb小胞体分散液を投与すると、食能の一過性の低下が認められたが、3日後には回復、亢進し、2週間で正常値に戻る傾向が認められた。組織病理学的観察から、主に脾臓、肝臓にて捕捉・代謝が行われ、1週間以内に代謝がほぼ完了した。また、HbVの投与が細網内皮系に不可逆な影響を与えるものではないと判断された。

人工赤血球の肺微小循環への影響について明らかにするために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。

人工赤血球を投与して腫瘍組織内の酸素供給、血流状態を向上させれば、抗癌剤療法と放射線療法の抗腫瘍効果増強が期待できる。そこで担癌モデルを作成し、組織内酸素分圧を燐光の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した。

1. ヘモグロビン小胞体存在下におけるヒト末梢血単核細胞の各種サイトカイン産生の挙動

A. 目的

修飾ヘモグロビン系酸素輸液は現在欧米で既に数

多くの臨床試験が行われている段階にあるが、生体投与により血管反応等を惹起することが明らかになり、安全性は未解決のままである。高濃度の精製ヘモグロビンをリン脂質二重膜小胞体中に内包させたヘモグロビン小胞体は、非細胞型ヘモグロビン

(SFHb)と比較して血管収縮活性が低いなどの特性を持つことが報告されているが、臨床試験の段階には至っていない。本研究はHb小胞体を投与した際に起こる生体反応のひとつであるサイトカイン産生の挙

動を、ヒト末梢血単核細胞とヒト臍帯動脈血管内皮細胞を用いた培養系で検討し、酸素輸液の生体投与時の反応を理解するための一助とする。

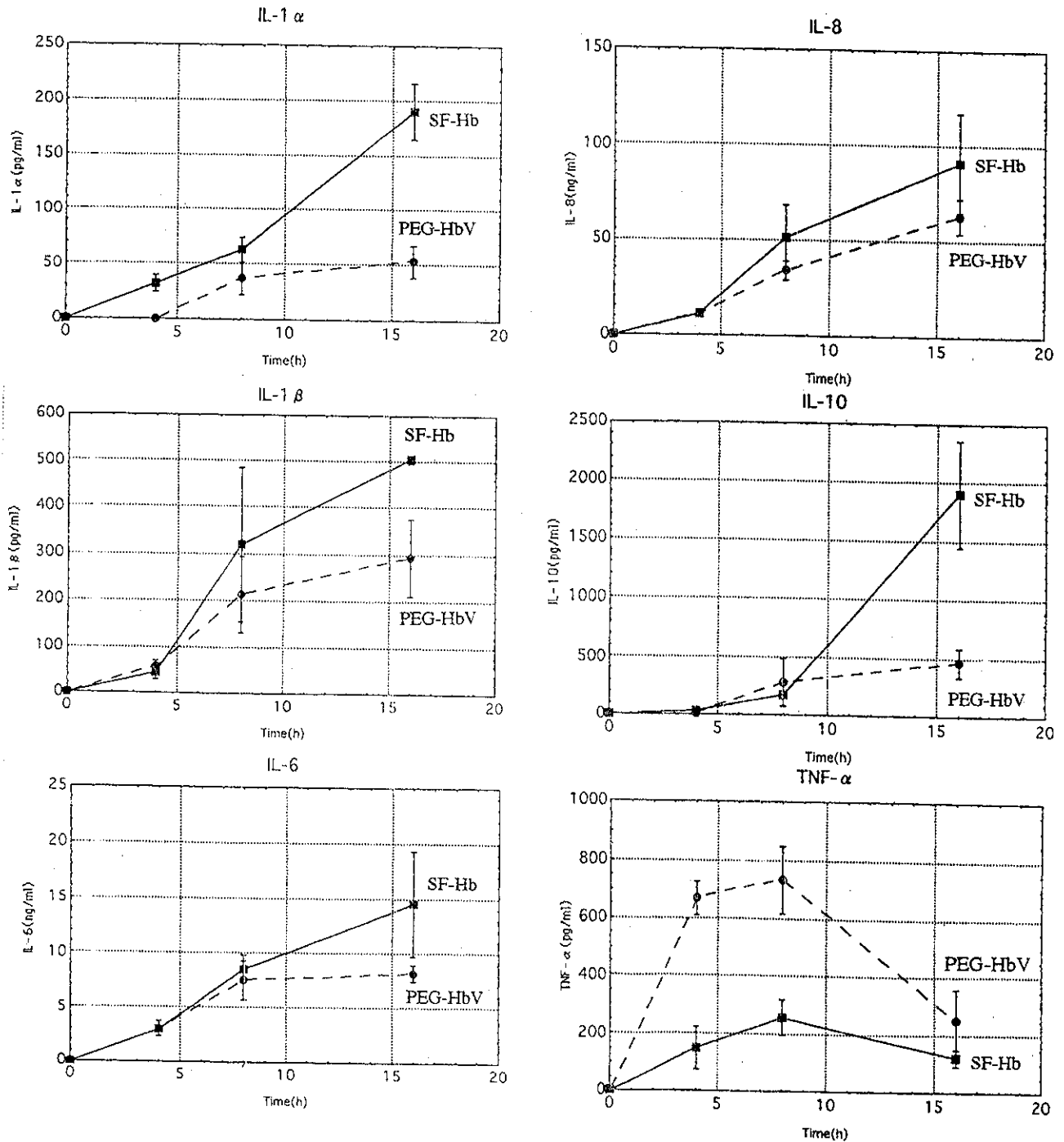


Fig. 1 Effect of co-incubation with stroma free Hb (SFH) and PEG-HbV on cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells.

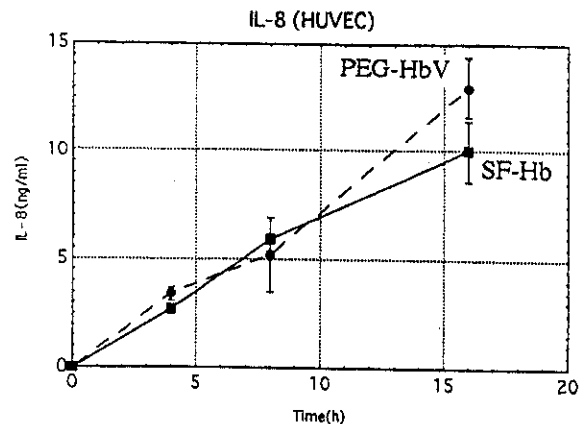
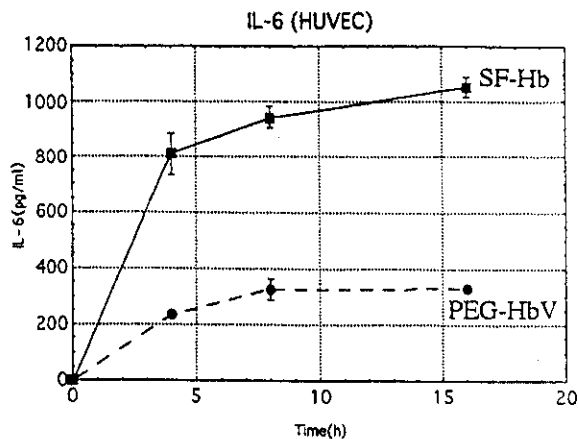


Fig. 2 Effect of co-incubation with stroma free Hb (SF-Hb) and HbV on cytokine production of human umbilical vein endothelial cells.

B. 方法

ヒト末梢血単核細胞を含む各ウェルにリン酸緩衝生理食塩水, SFHおよびPEG-HbV溶液100 μ Lを添加して, 0時間, 4時間, 8時間, 16時間37 $^{\circ}$ C, 5%CO $_2$ 下で培養した後, 15000rpmで20分遠心を行い, 上清を回収し, 測定まで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)法により, 凍結保存した培養上清中のInterleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, Tumor Necrosis Factor(TNF)- α およびInterferon(IFN)- γ の測定を行った。ELISA法はBIOTRAK ELISA system (Amersham, England)をプロトコールに従って使用し, 450nmの波長で可視吸光度計 (Molecular Divices, USA)を用いて測定した。測定可能範囲はIL-1 α ; 0 - 400 pg/ml, IL-1 β ; 0 - 400 pg/ml, IL-2; 0 - 1500

pg/ml, IL-4; 0 - 400 pg/ml, IL-5; 0 - 1000 pg/ml, IL-6; 0 - 400pg/ml, IL-8; 0-1000pg/ml, IL-10; 0-600pg/mL, TNF- α ; 0-1000pg/ml, IFN- γ ; 0-1000pg/mL であり, 測定範囲を超過する高濃度の検体は, 適当に希釈して測定した。統計的な検討はWelch's t-testを用いて行い, P<0.01をもって有意差ありと判断した。

各種サイトカインの遺伝子発現は, ヒト末梢血単核細胞を各種サンプルとともに4時間培養して, 2 \times 10 6 個の細胞からTRisol Reagent (GibcoBRL, USA)を用いてtotalRNAの抽出を行った。抽出したtotal RNAよりreverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)法を行いヒト各種サイトカインのmRNAの発現の有無を確認した。RT-PCRはAmplimer Set (CLONTECH, USA)とRT-PCR用試薬 (Perkin Elmer, USA)を使用してプロトコールに従って行い, 2%アガロースゲルで電気泳動した。

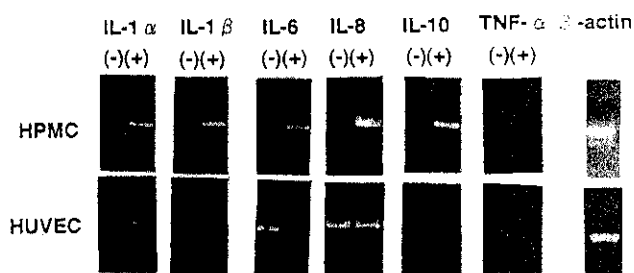


Fig. 3 Effect of coincubation with PEG-HbV on cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells (HPMC) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). (-): incubation for 4 hrs without PEG-HbV, (+) coincubation with HbV for 4 hrs.

C. 結果および考察

PEGで表面修飾したHb小胞体(PEG-HbV)が, ヒト末梢血単核細胞を刺激してinterleukin(IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 およびtumor necrosis factor(TNF)- α を放出させることをin vitroで確認した(Fig.1)。ただし, 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。PEG-HbVによるTNF- α の増大は8時間後に極大を示し, 16時間後には両者に差はなくなった。ヒト末梢血単核細胞をPEG-HbV存在下で4時間から16時間培養した上清からenzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA)法により IL-1 α , IL-1 β ,

IL-6, IL-8, IL-10およびTNF- α を検出したが、IL-2, IL-4 および IFN- γ は検出されなかった。またPEG-HbV存在下でヒト臍帯静脈内皮細胞の培養上清からIL-6とIL-8を検出した(Fig.2)。ただし、IL-6はSFHよりも大幅に低値を維持していたが、IL-8は同様に時間と共に増加した。

放出が認められたサイトカインについて、PEG-HbV存在下に4時間培養後の各サイトカインのmRNAの発現をRT-PCR法で確認した。PEG-HbVを加えずに4時間培養した場合は、サイトカインのmRNAの発現は認められなかったが、PEG-HbV存在下で4時間培養した場合は、サイトカインのmRNA発現を確認した(Fig.3 上段)。TNF α のバンドシグナルが微弱であった。これは実際にサンプル中のコピー数が少なかったためか、或いはPCRの技術上の問題かは明確には判断できなかった。HUVECではPEG-HbVを加えずに4時間培養した場合、IL-6とIL-8のmRNAの発現を認めた。HbV存在下で4時間培養した場合はIL-1 α 、IL-6およびIL-8のmRNAの発現を認めた。PEG-HbVの有無に関わらずIL-1 β 、IL-10およびTNF α の mRNAの発現は認められなかった(Fig.3下段)。

これらの結果は、Hb小胞体を実際のヒトに投与した際におこりうるサイトカインの産生が生体に与える影響について究明していく上で価値があるものと考えられた。

2. ヘモグロビン小胞体による出血ショック蘇生とサイトカイン産生の挙動

A. 研究目的

出血などにより急激に循環血液量が低下すると、消化管血流量、特に粘膜血流量は著明に低下する。そして組織低酸素血症から粘膜損傷を来し、粘膜のバリア機能が破綻すると、消化管由来の細菌が全身循環に移行して、敗血症、さらに多臓器不全に陥る病態が知られている。また敗血症においては血中のエンドトキシンとTNF α の濃度が共に上昇することが指摘されている。また血中のサイトカインの濃度が生体に対する侵襲の大きさを表す指標として有効とする報告もある。循環血液量を補うだけでなく酸

素運搬能を有していれば組織損傷の回復に有利であると期待される。そこで循環血液量の40%を脱血してショック状態のラットを作成し、これに試料を投与する操作を2回繰返した状態のラットにおいて、動脈血、腸間膜静脈血中のTNF α を測定する。

B. 研究方法

麻酔にはpentobarbital sodiumの腹腔内注入(50 mg/kg)で行った。麻酔後仰臥位に固定し、呼吸は自発呼吸とした。右鎖骨上部を切開し右頸動脈と頸静脈にそれぞれカテーテル(PE-20)を挿入した。右頸動脈カテーテルから1mL/minの速度で推定循環血液量(56mL/kg)の40%を脱血後、右頸静脈カテーテルより同速度で各試料を同量注入した。この操作を二回繰返した。脱血投与終了後30分経過観察し開腹、腸間膜静脈にカテーテルを挿入し静脈血を採取、右頸動脈カテーテルより動脈血を採取し遠心分離(3000回転、10分)して血清を分離し、Genzyme-TechneラットTNF α 測定キットにて定量を行った。試料としては5%アルブミンに分散させたHb小胞体(PEG-HbV群, n=6)および対照として5%アルブミン(ALB群, n=6)、5%アルブミンに分散させたラット洗浄赤血球(RBC群, n=6)を用いた。

C. 結果および考察

動脈血および腸間膜静脈血のTNF α 値を表1に示す。5%アルブミン群と他の2群間には動脈血、腸間膜静脈血いずれも有意差を認めた(p<0.05)。ただし各群において動脈血、腸間膜静脈血の間には有意差は無く、TNF α は腸間膜由来のものではなく全身の

Table 1 Concentration of TNF α in arterial blood and intestinal venous blood after two cycles of resuscitation from hemorrhagic shock.

group	blood	TNF α (pg/mL)
ALB	arterial	4643.6 \pm 4781.1*
	intestinal	4314.3 \pm 4234.7*
RBC	arterial	< 25
	intestinal	< 25
PEG-HbV	arterial	226.0 \pm 198.0
	intestinal	211.0 \pm 188.8

* p < 0.05 compared with other groups

末梢循環不全や、低酸素血症によるものと思われた。PEG-HbV群でALB群より有意に低く測定されたということは出血性ショックより回復する過程でvolumeとしての効果だけでなく酸素を運搬し敗血症への移行を阻止している可能性があり、洗浄赤血球と同等の酸素運搬能を持つことが示唆された。

D. 結論

Hb小胞体を用いる出血ショックからの蘇生試験において血中TNF α の値がアルブミンを用いた場合と比較して有意に低い値となり、ショックからの蘇生液としてHb小胞体の酸素運搬能による効果を指示すると思われる結果が得られた。

3. ヘモグロビン小胞体の細網内皮系に対する影響

A. 研究目的

Hb小胞体は最終的に細網内皮系(RES)にて捕捉代謝される。この際RESがHb小胞体で飽和されると、生体防御としての異物貪食機能に影響があると指摘されている。Hb小胞体をラットに10mL/kg投与したときの細網内皮系の貪食能への影響については前年度に報告した。今回は投与量を20mL/kgに増大させたときの影響について、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。

B. 研究方法

動物実験は慶應義塾大学 医学部 動物実験委員会の承認を得て、倫理基準に従って実施した。PEG-HbV分散液は、既報に従い合成した。生理食塩水に分散させてHb濃度は10g/dLとした。Wistar系ラット(雄、体重約200g)を用い、エーテル麻酔下、尾静脈よりHbV(10, 20 mL/kg, 15匹)、および生理食塩水(40 mL/kg, 15匹)を投与した。各群を4グループに分け、投与後、1, 3, 7, 14日後にネブタール麻酔下挿管し(PE-50)、Carbon particle (Fount India Ink, Pelikan製 16 mg/mL in 生理食塩水)を10 mL/kg投与し、4, 10, 20分後に採血して50 μ Lを測定液(0.1% 炭酸ナトリウム溶液) 5mLに加え、675 nmの吸光度を測定した。Phagocyte Index (K値)は、計算式 ($K = 1/(t_2 - t_1) \times \log(C_1/C_2)$; C_1, C_2 は、carbon溶液投与後 t_1, t_2 分後の血

中carbon濃度)より算出した。測定後、過剰量ネブタール投与により犠牲死させて臓器を摘出し、脾臓重量を測定した。

各臓器をホルマリン固定し、病理検査を行った。Hb小胞体中に含まれるヒトヘモグロビンの検出には、モノクローナル抗ヒトヘモグロビン抗体(DAKO A/S, Denmark)を用い、二次染色にはstreptoavidin結合アルカリホスファターゼを用いた。

C. 研究結果および考察

貪食能は、PEG-HbV投与1日後に30~50%低下するが飽和はしなかった。また3日後には逆に亢進した。10mL/kg投与群ではその後低下するが、20mL/kg投与群では7日後にピークを示した後コントロール群と同等の値に戻り、不可逆の反応では無かった。脾臓重量は増大するが、10mL/kg投与群のみ2週間後には低下傾向を示した。しかし20mL/kgでは増大したままであった。増加重量は約600 mgであり、これは投与量660mg (3300 mg/kg x 0.2kg) にほぼ対応しているものと思われた。

PEG-HbVを20mL/kg投与した場合の病理検査(H/E染色)では(Fig. 4)、脾臓の場合は白脾髄(青い部分)の周りの赤脾髄の桃色の部分、PEG-HbVを富有し腫脹した多数のマクロファージが認められた。PEG-HbVは次第に減少して1週間後には殆ど消失、白脾髄周辺(辺縁帯)にはカーボンが多く見られた。この部位には貪食細胞(リンパ球)が多く存在しているので、ここでPEG-HbVが貪食されたこと、また貪食能が増大してカーボンが多量に捕捉されたことが考えられる。2週間後にはPEG-HbVの像は無く組織は正常であった。赤血球が多く認められるので、臓器重量の増大はPEG-HbVの蓄積ではなく、赤血球と貪食能にあずかる細胞量が増大した為と思われた。抗ヒトヘモグロビン抗体を用いたヘモグロビンの染色においても(Fig. 5)、赤く染まったヘモグロビンの存在するマクロファージの量が投与3日後には著しく減少し、1週間後には殆ど見られなくなり、PEG-HbVの代謝が1週間以内に行われていることが実証された。

肝臓の場合(H/E染色)、1日後にはPEG-HbVを富有したKupffer細胞が認められた。3日後には同じ部位にカーボンが多く存在し、貪食能が高まっていることに対応していると考えられた。7日後にはPEG-

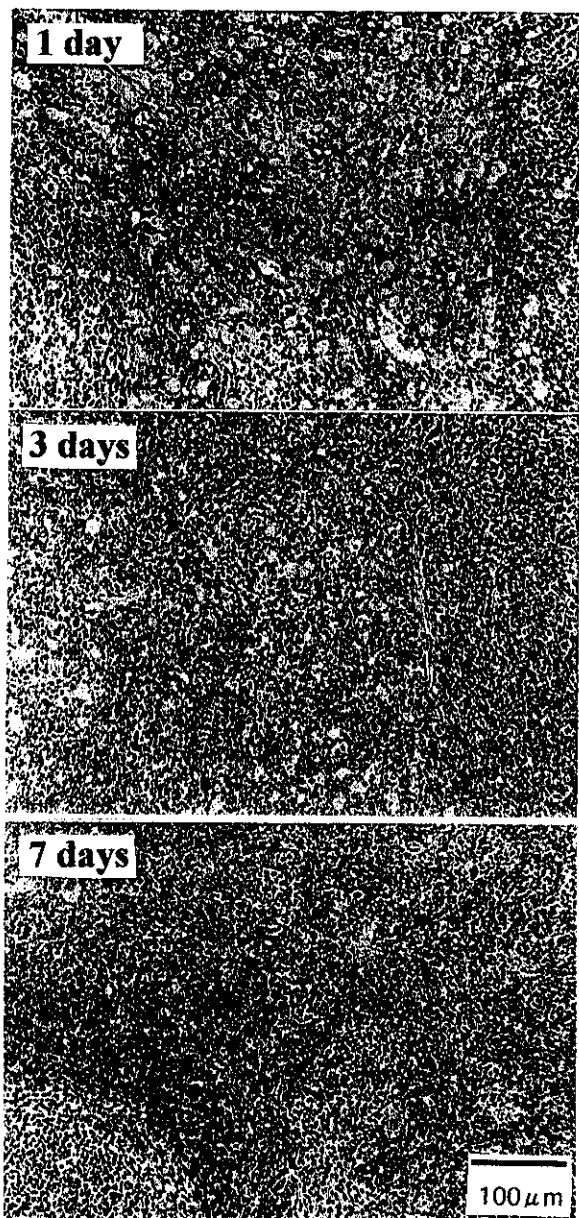


Fig. 4 Hematoxylin/eosin staining of spleen after infusion of PEG-HbV.

HbVを富有したKupffer細胞は認められず、またカーボンが最も多く存在していた。これは食食能のピークに対応していると考えられた。

D. 結論

PEG-HbV分散液を投与すると、食食能の一過性の低下が認められたが、3日後には回復、亢進し、2週間で正常値に戻る傾向が認められた。組織病理学的観察から、細網内皮系(脾臓、肝臓)において捕捉・代謝が行われ、1週間以内に代謝がほぼ完了す

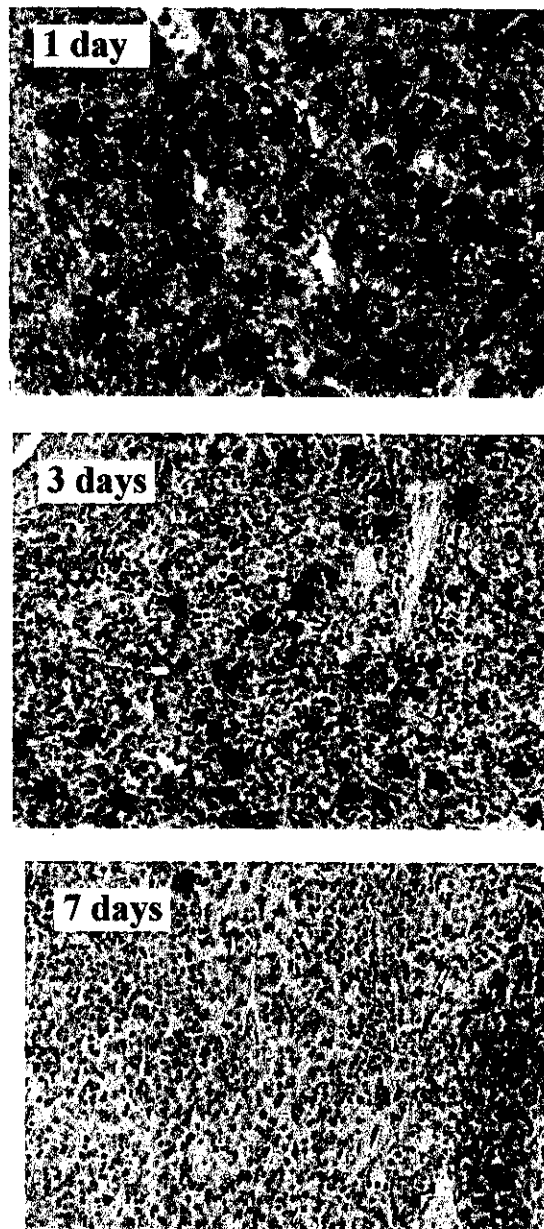


Fig. 5 Anti-human Hb antibody staining of spleen after infusion of PEG-HbV.

ることを確認した。また、PEG-HbVの投与が細網内皮系に不可逆な影響を与えるものではないと判断された。

4. 酸素輸液投与後の肺微小循環の顕微鏡観測法の確立

A. 研究目的

酸素輸液を投与した際に肺微小循環でおこる変化

を観測、解析し、その変化の原因を明らかとすることを目的とし、肺微小循環の評価系を確立する。

B. 研究方法

方法はS-Dラットに全身麻酔、人工換気下に右開胸して胸壁に石英ガラス製のウィンドウチャンバーを植え込み固定した。肺微小循環の観察は、レーザー共焦点顕微鏡を主体とした生体血流高速観測装置を用い、6-200ミクロン程度の血管内の血流循環動態を解析できるように設置した。

肺微小循環の可視化には、FITCアルブミンを用い、血漿部分を標識し血管径を測定した。

動物を2群（無処置群、生食投与群）に分ける。各々の群に試料投与前、投与後の血管径を経時的に測定し、in vivoでの肺微小循環変化の評価が可能であることを検討した。

C. 研究結果および考察

ウィンドウチャンバーを設置後、尾静脈よりFITCアルブミンを0.1ml(80mg/ml)注入し、レーザー共焦点顕微鏡下に血管を観察した。管径の測定がsegmentalに評価可能であった。Fig. 5のように60ミクロンの肺動脈と肺胞が明瞭に確認できた。

次に生理食塩水2mLを急速静注し血管径の変化を観測した。15分おきに3回注入し、経時的に血管径を測定したところ有意な変化は認められなかった。課題としてはウィンドウ設置技術の向上や麻酔の深度等ラットを生存させる技術、モニターの方法等があげられる。

D. 結論

生体内、特に肺微小循環は従来、心拍や呼吸運動のため解析は困難であったが、動物の選定、光路設計、レーザー共焦点顕微鏡の利用により評価が十分に行えることが明らかとなった。今後、酸素輸液投与による肺微小循環動態の変化を明らかにする。

5. 酸素輸液を用いた化学療法：放射線療法の抗腫瘍効果増強について

- 移植腫瘍の選択と測定系の確立 -

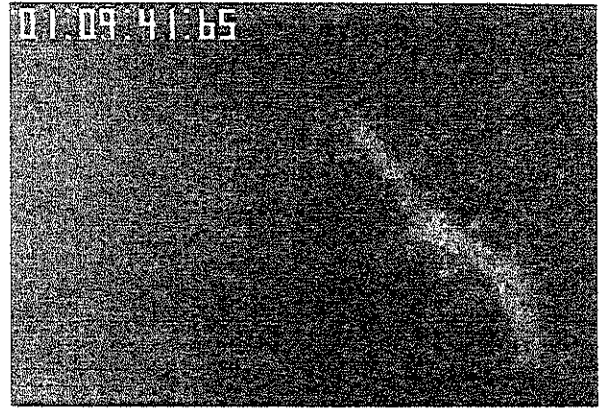


Fig. 5 Micrograph of lung of rat with FITC-albumin

A. 研究目的

悪性腫瘍の抗癌剤および放射線療法に対する耐性の原因として、腫瘍組織内の低酸素領域が重要な問題点と考えられている。この腫瘍組織内の低酸素領域を改善させるために最新の酸素輸液を投与し、腫瘍組織内の低酸素状態、低血流状態を改善させ、抗癌剤療法と放射線療法の抗腫瘍効果の増強を検討する。ここでは腫瘍組織酸素分圧の測定系の確立を目的とした。

B. 研究方法

移植腫瘍としてSato Lung Cancer(以下SLC)と吉田肉腫(LY-80)を用いて検討した。microsphere法を用いて腫瘍血流量を測定したところ、SLCよりもLY-80のほうが腫瘍血流が安定していることが確かめられた。このため担癌モデルをLY-80とし、移植モデルを確立した。LY-80組織内酸素分圧(PTO_2)の測定方法としてはOxyspot(パラジウムコプロポルフィリンをラット頸静脈から静注し、励起後の燐光の減衰消滅時間から腫瘍内酸素分圧を測定する装置)を採用し、酸素輸液を投与することによる腫瘍内酸素分圧の変化を測定した。

酸素輸液としてPEG-HbVを移植ラットの尾静脈から投与した。コントロールとしてラクテック及び5%アルブミンを設定した。投与前と投与後の腫瘍内酸素分圧を経時的にOxyspotで測定した。ハロセン吸入麻酔下自発呼吸、保温下及び血圧モニター下にて測定した。

C. 結果

腫瘍内酸素分圧を計測できることが明らかとなっ

た。また初期のデータではラクテック投与では腫瘍酸素分圧に変化は見られなかったが、PEG-HbV投与群及び5%アルブミン投与群では腫瘍酸素分圧の上昇が見られた個体もあったが、個体数がまだ少なかった。

D. 結論

腫瘍組織内の低酸素領域を改善させるために酸素輸液を投与し、腫瘍組織内の酸素供給、血流状態を向上させれば、抗癌剤療法と放射線療法の抗腫瘍効果増強が期待できる。今回、担癌モデルを作成し、組織内酸素分圧を燐光の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することができた。

今後は統計解析を進めると共に、腫瘍の部位依存性や、投与前後の腫瘍組織血流量についても同時にcolored microsphere法により測定し、組織酸素分圧との相関を検討する予定である。

E. 研究発表

1. 論文

1) 江口圭介、三橋将人、小林紘一、酒井宏水、武岡真司、土田英俊。"ヘモグロビン小胞体存在下におけるヒト末梢血単核細胞の各種サイトカイン産生の挙動"。人工血液7, 27-32 (1999)

2) E. Tsuchida, T. Komatsu, K. Hamamatsu, Y. Matsukawa, A. Tajima, A. Yoshizu, and K. Kobayashi. "Exchange transfusion with albumin-heme as an artificial O₂-infusion into anesthetized rats: physiological responses, O₂-delivery, and reduction of the oxidized heme sites by red blood cells". *Bioconjugate Chem.* 11, 46-50 (2000).

2. 論説

1) 堀之内宏久、田島敦志、小林紘一。"液体換気"。中外医学社。266-270, (1999)

2) 小林紘一。"集中治療領域での人工血液の現状と将来"。集中治療12, 65-74 (2000)

3. 学会発表

1) 堀之内宏久、小林紘一、渡辺真純、柿崎徹、泉陽太郎、吉津晃、田島敦志、大塚崇 / 生体内における酸素輸送からみた血液代替物の評価 -臨床応用に向けて- / 第6回日本血液代替物学会年次大会 / 1999. 9. 10,11 / 京王プラザホテル

2) 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年次大会 / 1999. 9. 10, 11 / 京王プラザホテル

3) 江口圭介、三橋将人、小林紘一、酒井宏水、武岡真司、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体存在下におけるヒト末梢単核細胞の各種サイトカイン産生の挙動 / 第6回日本血液代替物学会年次大会 / 1999. 9. 10,11 / 京王プラザホテル

4) 岩丸有史、安彦智博、儀賀理暁、桑原克之、河野光智、田島敦志、澤藤誠、渡辺真純、川村雅文、堀之内宏久、酒井宏水、土田英俊、小林紘一 / カラードマイクロスフェアを用いた移植肺癌モデルにおける腫瘍内微小環境の観測 / 第52回日本胸部外科学会総会 / 1999.10 / 仙台

5) 小林紘一 / 液体換気 / 日本医工学治療学会第14回学術大会 / 2000.2.25,26 / 東京 ホテルセンチュリーハイアット

6) 渡辺真純、大塚崇、山内徳子、安彦智博、岩丸有史、田島敦志、吉津晃、泉陽太郎、堀之内宏久、小林紘一、土田英俊 / 臨床応用に向けた人工酸素運搬体の生体内における評価 / 日本医工学治療学会第14回学術大会 / 2000.2.25,26 / 東京 ホテルセンチュリーハイアット

7) 小林紘一 / 赤血球の働きと人工赤血球を用いる利点 / 厚生科学研究(人工血液開発研究推進事業)研究成果発表会 / 2000.2.23 / 東京 全社協・灘尾ホール

8) 小林紘一 / ポルフィリンヘムを利用した人工酸素運搬体の開発 / 第27回ポルフィリン研究会 / 1999.11. / 東京

微小循環動力学から見たヘモグロビン型酸素輸液による
循環機能修飾とストレス個体における分解動態

分担研究者 末松 誠 慶應義塾大学医学部医化学

研究要旨 肝臓はヘモグロビン分子を修飾した酸素輸液の主要な代謝臓器である。生体内の主要なヘム分解系であるheme oxygenaseは肝臓に豊富に存在する酵素であるが、酸素輸液の臨床における適応症の一つと考えられるショックのような病態では本酵素がストレス応答の結果誘導され、肝細胞でのヘム分解速度が著明に加速し生成するCOが消去されるために胆汁分泌機能の低下が招来した。メトヘモグロビンや細胞型のヘモグロビン小胞体にはこのような作用は見られなかった。

A. 研究目的

ヘモグロビン(Hb)はハプトグロビンにより肝臓などに運搬されheme oxygenase (HO)により分解されて胆汁色素であるbiliverdinと一酸化炭素(CO)として代謝される。肝臓で内因性に生成されるCOが類洞血管抵抗を生理的レベルに低く保つために必要不可欠であることが最近報告されている(1, 2)。Hbを利用した酸素輸液はこのようなCOの効果をキャンセルする可能性がある。またショックなどの病態においては誘導型HOの発現増加によりHb由来のヘムの分解速度が大きく変化しCO消去による臓器機能修飾やbilirubinの過剰生成などの問題が起こる可能性がある。しかしながらストレス応答を示した臓器におけるヘム分解活性の変動と臓器機能修飾を実際に証明した報告はない。本研究ではこの点を明らかにするためにラット内毒素暴露灌流肝を用いてHb小胞体と遊離Hbの分解速度の変動を明らかにし、血管抵抗や胆汁分泌機能への影響を詳細に検討した。

B. 研究方法

既報の方法によりラット分離灌流肝を作成し血管抵抗と胆汁分泌をモニターした。ラットはmale Wistar strainを用い内毒素O111B4 (E coli) を4 mg/kgで腹腔内投与した群と小胞体投与群で比較検討した。門脈から終濃度1.5 g/dLでHb, metHbおよびPEG-HbVを投与し15分間灌流したのちこれらを灌流回路

から除去してさらに灌流を続行した。肝臓にとりこまれたHbやmetHbの分解は胆汁中のbilirubin-IXalphaをELISAで測定することにより施行した。また内毒素処置におけるHO-1やinducible NO synthase (iNOS)の発現はそれぞれの単クローン抗体を用いたWestern blotting analysisにより行った。

C. 研究結果

内毒素処理によりHO-1とiNOSが著明に誘導され、免疫組織学的検討によりその大半は肝細胞に発現していることが確認された。図1に内毒素(LPS)投与6時間後の肝臓におけるNO, COの生成量の変化を示す。正常肝に比べて約4倍にNOの代謝産物であるnitriteやCOが増加することが確認された。ここに1.5 g/dLのHb, metHbおよびPEG-HbVを投与した際のbilirubin-IXalphaの胆汁排泄量の変動を図2に示した。Hbの投与では正常では利胆が観察されたが、LPS肝では胆汁分泌の著明な低下が起こった。一方、metHbやPEG-HbVと投与では両群ともに大きな変化は見られなかった。

内毒素投与群ではHb, metHb投与群で正常の2倍程度反応の増強を認めた。これは毒素によりNO合成酵素の誘導がかかり、血管抵抗調節のNO依存性が現われたためと考えられた。またHb, metHbを投与すると数分以内に胆汁中にbilirubinが数倍に増加した。とくにmetHbでは15分後におけるbilirubin増加

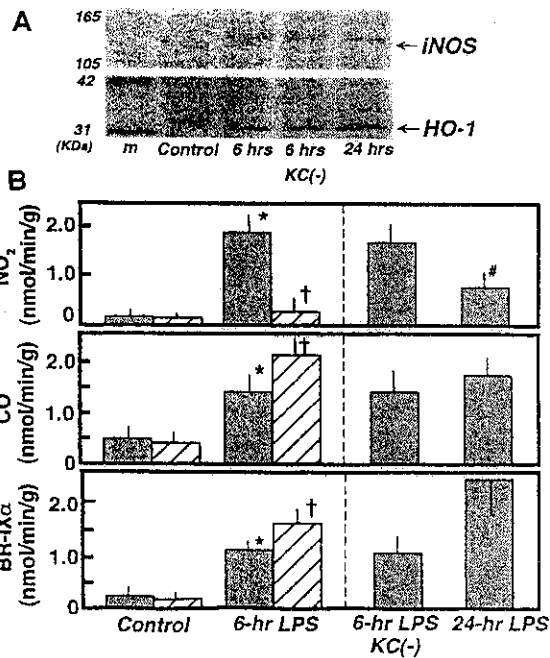


図1 内毒素暴露肝におけるNO₂⁻, CO, bilirubin (BR)-IXalphaの生成。KC(-):Kupffer cell減少処理。

量はHbの3-4倍に達した。この増加はHbの投与停止後も続き急激に上昇した。一方、PEG-HbV群ではbilirubin増加量はHb群の30%程度にとどまった。投与30分後のbilirubinの生成量を考慮すると、hemeの分解速度は正常肝臓の数十倍に亢進していることが明らかになった(図2)。

D. 考案と結論

内毒素ショックではNOとCOの生成が亢進し、血管収縮に対する防御機構として作用していると考えられる。無細胞型のHbを肝臓に投与すると正常での収縮反応の著明な増強がおり、結果として肝臓灌流の減少により胆汁分泌が低下する。従って、このような類洞を持つ臓器のfunctional integrityを維持するためには小胞体封入が有効な手段であることが示唆された。ショック肝では血管のpatencyの維持にNO, COの双方が必要であると同時にヘム分解のダイナミクスが大きく異なる。metHbではhemeの分解に伴って生じるCOが消去されず、Hbではこれがただちに消去されることがHbによる胆汁分泌低下のメカニズムと考えられるが、詳細な検討が今後必要で

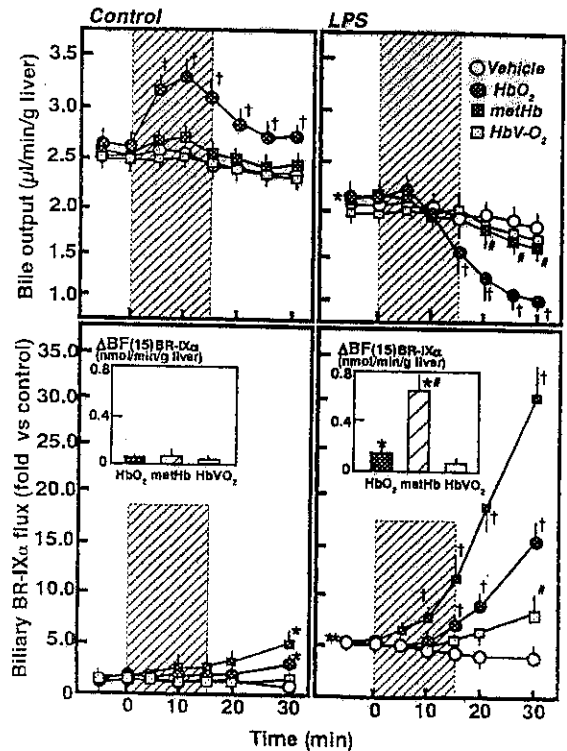


図2 正常および内毒素肝臓におけるHb, metHb, PEG-HbV投与時の胆汁流量とbilirubin (BR)-IXalphaの変動。

ある。高ビリルビン血症の増悪を回避しつつ生理的なヘム分解のコンパートメントであるマクロファージでの分解を促すような粒子の設計が今後必要になることが示唆された。

参考文献

- 1) Suematsu M, Goda N, Sano T, et al: Carbon monoxide: An endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest* 96, 2431-2437 (1995)
- 2) Sano T, Shiomi M, Wakabayashi Y, et al: Endogenous carbon monoxide suppression stimulates bile acid-dependent biliary transport in perfused rat liver. *Am J Physiol (Gastrointest. & Liver Physiol.)* 272, G1268-G1275 (1997)
- 3) 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* 101(3), 604-612 (1998)
- 4) Suematsu, M., Ishimura, Y. The heme oxygenase-CO system as a regulator of hepatobiliary function. *Hepatology* 31, 3-6 (2000)

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Y. Wakabayashi, R. Takamiya, A. Mizuki, T. Kyokane, N. Goda, T. Yamaguchi, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Suematsu, Y. Ishimura. "Carbon monoxide overproduced by heme oxygenase-1 causes a reduction of vascular resistance in perfused rat liver". *Am. J. Physiol.* 277 (Gastrointestinal Liver Physiol.) G1088-1096 (1999).

2. 論説

1) Suematsu, M., Ishimura, Y. The heme oxygenase-CO system as a regulator of hepatobiliary function. *Hepatology* 31, 3-6 (2000)

3. 学会発表

1) 水城啓、末松誠、武岡真司、石村巽、土田英俊 / ストレス誘導型heme oxygenase 発現臓器におけるヘモグロビン修飾型酸素運搬体の血管機能修飾作用の解析 / 第6回日本血液代替物学会 / 1999.9.10, 11 / 京王プラザホテル.

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願

「酸化的劣化を防止した薬学的製剤を調製する方法、酸化的劣化を防止した食品を調製する方法」
(特願2000-039982号)

19990427

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

4. 平成9～11年度 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日 (impact factor)	刊 行 書 店 名	執 筆 者 氏 名
<i>J. Clin. Invest.</i> 101 , 604-612 (1998) "Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver: topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation"	1998年2月 (9.315)	The American Society for Clinical Investigation, Inc.	Nobuhito Goda Kensuke Suzuki Makoto Naito Shinji Takeoka Eishun Tsuchida Yuzuru Ishimura Takuya Tamatani Makoto Suematsu
人工血液, 6 , 13-16 (1998) "リポソーム内包型ヘモグロビンによる全血由来炎症性サイトカイン産生の修飾"	1998年3月	日本血液代替物学会	池淵研二, 丹羽光一 藤原満博, 阿部英樹 若本志乃舞 伊藤貴俊, 山口美樹 関口定美
<i>J. Biomed. Materials Res.</i> , 40 , 66-78 (1998) "Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with a red cell substitute consisting of polyethyleneglycole-modified vesicles encapsulating hemoglobin"	1998年4月 (1.755)	John Wiley & Sons, Inc.	Hiromi Sakai Amy G. Tasai Heinz Kerger Shinji Takeoka Eishun Tsuchida Marcos Intaglietta