

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 11 年度 総括研究報告書

平成 12 年 3 月

主任研究者 北 畠 顕

北海道大学医学部教授

厚生科学研究費補助金（高度先進医療研究事業）

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 北島 顕 北海道大学医学部教授

研究要旨 本研究班ではヘモグロビン (Hb) 修飾体を人工酸素供運搬体として用いるためには、まず NO 供与能付与した SNO-Hb とすべきであることを、さらに臨床応用へ進むためには、血中滞留時間延長や免疫系へのトラップ抑制が重要であることから、SNO-Hb をポリエチレングリコール (PEG) で修飾した SNO-PEG-Hb (国内特許取得、国際特許出願中) を使用すべきであることを提唱してきた。本年度は SNO-PEG-Hb を安定して実験に供給し、この仮説をラットを用いた *in vivo* における血圧、血小板活性化への影響、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る脳の酸素化、*in vitro* の血小板活性化や粘着能への影響作用などを指標として確認した。また、臨床への第一歩として大動物を使用した実験系での評価を試み、イヌ虚血心モデルを用いて SNO-PEG-Hb の虚血改善作用が著明であることを確認した。以上より、SNO-PEG-Hb は臨床的に有用な人工酸素運搬体であることが示唆された。一方、Hb に内在する問題点を回避するために、非 Hb 系人工酸素運搬体としてパーフルオロカーボン乳剤の創製を企図し、最新の乳化器を利用して PEG 化およびアンカーリング剤を加えた新規エマルジョンを設計し (特許出願中)、パーフルオロカーボンとしてパーフルオロデカリンを溶解した製剤を作製した。本製剤をプロトタイプとして今後さらに改良を加えることにより、臨床応用可能な製剤が創製されることが考えられた。

分担研究者

佐久間一郎 北海道大学医学部附属病院
講師

藤井 聡 北海道大学医学部附属病院
講師

仲井 邦彦 東北大学大学院
医学系研究科助教授

人工赤血球としてセルフリーHb 修飾体を臨床応用利用する場合、NO の Hb による不活化に基づく血管収縮、腸管異常収縮、血小板活性化などが問題となる。人工赤血球への臨床応用に当たり、救急にセルフリーHb 修飾体を投与する必要がある場合、もし患者が血小板の活性化をきたす病態を有していれば、この Hb 修飾体の血小板への作用が血栓症や心筋梗塞、さらに慢性的には動脈硬化促進などの副作用を惹起する可能性がある。一方、われわれは以前の検討で、NO 放出能を付与した s-ニトロソ Hb (SNO-Hb) は血管内に投与されると NO を遊離し、血圧上昇および血小板凝

I. Hb 修飾体が自然発症糖尿病ラットの循環動態および血小板凝集能に及ぼす影響

A. 研究目的

集亢進を回避可能であることを確認している。糖尿病など、血小板活性化の存在が予想される病態においても、SNO-Hbはこの問題を回避できる可能性がある。本研究では、自然発症糖尿病モデルを用い、HbおよびSNO-Hbの循環動態および血小板活性化に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

ハローセン（1~1.5%）麻酔下の対照（LETO: Long Evans Tokushima）および糖尿病自然発症ラット（OLETF: Ohtsuka Long Evans Tokushima Fatty）（各20週令：インスリン非依存性糖尿病発症・確立期、40週令：インスリン非依存性糖尿病極期、60週令：インスリン依存性糖尿病移行期）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。大腿静脈より生理食塩水、未修飾HbおよびSNO-Hb（5%、125 mg/kg）を静注し、10分後に動脈血を採血した。多血小板血漿（PRP）を調整し、乏血小板血漿（PPP）により血小板数を20万/ μ lに調整した後、血小板凝集測定に供した。従来の透光度を用いた血小板凝集計ではHbによる赤色のため凝集度測定が不安定であり、かつ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ため、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を用いた。凝集素としてはADPとコラーゲンを用いた。

Hbはヒト期限切れ赤血球を用い、孔径35nmのウイルス除去膜BMM（旭化成）により膜断片とウイルス除去を行なった。SNO-Hb作製には、NO供与体として亜硝酸およびグルタチオンより自家製造したs-ニトロソグルタチオンまたはDojindo製s-ニトロソグルタチオンを使用した。Hb濃度50 μ Mとし、0.1 Mリン酸緩衝液（0.5 mM EDTA）中にてNO供与体と室温で混合した。HbとNO供与体のモル比は1:5-10とした。最終的に限界ろ過によ

り未反応s-ニトロソグルタチオンを除去して濃縮し、生理食塩水で透析した後、凍結保存した。

C. 研究結果

両群ラットにおいて、いずれの病期においても、Hbの静注は血圧を上昇させたが、SNO-Hbでは血圧上昇は軽度であった。OLETF群ではLETO群に比べ凝集惹起物質による血小板凝集が軽度であったが、両群ともいずれの病期においても対照の生理食塩水と比較してHb投与により凝集亢進が認められ、SNO-Hbではこの凝集亢進が回避された。

D. 考察

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血圧上昇、血小板凝集亢進などの副作用を軽減することが可能である。糖尿病など血小板活性化状態にあるとされる病態では、SNO-Hbのこのような作用は人工赤血球としての臨床応用を企図する場合、非常に重要と思われる。本検討において、インスリン非依存性糖尿病、さらにインスリン依存性糖尿病の状態となるOLETF群では、対照のLETO群に比べ凝集惹起物質による血小板凝集がむしろ軽度であった。これはOLETF群では20週令ですでに血小板活性化が起こり、血小板がむしろ疲弊状態にあったためと考えられる。このような状態にもかかわらず、無修飾Hbでは血小板凝集亢進が生じ、SNO-Hbではそれが回避された。この結果は、SNO-HbのようにNO供給能を有するなど、血小板活性化を抑制できる性質を持つことが、Hb修飾体の臨床応用において重要であることを示唆するものと考えられる。また、Hb修飾体の臨床応用には、血中滞留時間延長など、Hb分子を巨大化した分子設計も重要であることが確認されていることから、たとえばHbにPEGを付加するなどの修飾を加え、さらにこのPEG-HbをSNO化するこ

とが望ましいこと考えられた。

E. 結論

糖尿病など血小板活性化傾向を伴う病態がある場合には、Hb 系酸素運搬体投与による血小板凝集亢進の惹起に注意が必要と考えられ、その回避法として Hb の SNO 化が有効であることが示唆された。

II. NO 供与能を有するヘモグロビン誘導体 s-ニトロソポリエチレングリコール修飾ヘモグロビンおよび各種ヘモグロビン修飾体の生体内におよぼす影響

A. 研究目的

生体内において、ヘモグロビン(Hb)は一酸化窒素(NO)の消去物質として作用し、血管内皮細胞由来の NO である EDRF や腸管由来の NO を消去する。その結果、ヘモグロビン修飾体を人工酸素運搬体として生体に投与すると、血管トーンスを亢進による血圧上昇、血小板の活性化、さらに腸管収縮などの副作用が惹起されることが考えられている。しかるに最近、Duke 大学の Stamler によれば、赤血球中に存在する Hb の約 1/1000 は、そのヘムβ鎖の SH 基に NO が結合した s-ニトロソヘモグロビン(SNO-Hb)となっており、SNO-Hb はヘムに酸素が存在する状態では NO と強固に結合しているが、酸素が放たれた状態では NO 供与体として作用するという。われわれはこの SNO-Hb を人工酸素供与体の素材として利用することを企図して研究を進め、Hb の s-ニトロソ化により血圧上昇や血小板活性化が回避されることを確認して来た。しかるにヘモグロビン修飾体を臨床応用に耐えうるものとするには、投与後の腎臓や血管壁からの漏出を回避し、血中滞留時間をさらに延長させるべくさらなる分子修飾の必要がある。本研究では、Hb 分子にポリエチレングリコール(PEG)修飾を行った PEG-Hb を作製し、さらにそれを s-ニトロソ化した SNO-PEG-

Hb を創作し、未修飾 Hb および SNO-Hb の四者で静注後の生体内反応(血圧、血小板凝集能)を比較検討した。また、in vitro にて血小板 5-HT 動態および血小板 NO 動態への影響を、未修飾 Hb と SNO-PEG-Hb とで比較した。

B. 研究方法

期限切れ赤血球製剤より高純度 stroma-free Hb を作製し(孔径 35nm のウイルス除去膜 BMM (旭化成)により膜断片とウイルス除去)、NO 供与体として亜硝酸およびグルタチオンより自家製造したニトロソグルタチオンまたは Dojindo 製ニトロソグルタチオンを使用、Hb 濃度を 50 μM として、0.1 M リン酸緩衝液(0.5 mM EDTA)中にて好気条件下で室温で混合し(Hb と NO 供与体のモル比は 1 : 5-10)、最終的に限界ろ過を行い SNO-Hb を得た。

Hb への PEG 修飾は、酸素親和性調節のため嫌気条件下にて pyridoxal 5'-phosphate を付加した後、日本油脂製サンブライト DEAC-30HS (平均分子量 2956 のアミノ基結合型修飾剤)を用い、50 mM リン酸緩衝液(pH 8.0)にて、Hb 濃度 0.25 mM、Hb (テトラマー)と PEG 修飾剤のモル比 1 : 20 で氷温下 2 時間反応させた。この PEG-Hb への NO 付加は NO 供与体として s-ニトロソグルタチオンを用い、室温で 10 時間反応させた。

10~15 週令雄性 Wistar ラットにおいて、ハローセン(1~1.5%)麻酔下到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。大腿静脈より生理食塩水、未修飾 Hb、SNO-Hb、PEG-Hb、SNO-PEG-Hb (5%、125 mg/kg)を静注し、血圧の変化を測定した。

10~15 週令雄性 Brown Norway ラットにおいて、ハローセン麻酔下到大腿静脈より生理食塩水、未修飾 Hb、SNO-Hb、PEG-Hb、SNO-PEG-Hb (5%、125 mg/kg)を静注し、10 分後に動脈血を採血

した。多血小板血漿 (PRP) を調整し、乏血小板血漿 (PPP) により血小板数を 20 万/ μ l に調整した後、血小板凝集能をレーザー散乱型凝集計を用いて血小板凝集測定に供した。血小板惹起物質としては ADP (5 μ M) とコラーゲン (10 μ g/ml) を用いた。

また、血小板濃染顆粒からの 5-HT 放出を *in vitro* にて測定するため、無処置 Wistar ラット血液から調整した pooled PRP に 0.1~1.0% の未修飾 Hb および SNO-PEG-Hb を加え、37°C にて 10 分間 incubate した後、凝集素として ADP あるいはコラーゲンを添加し、さらに 37°C で 10 分間 incubate した。血小板と PPP に遠心分離後、それぞれの分画の 5-HT を電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) にて測定した。PPP 中の NO 酸化代謝産物 (NOx) は Griess 法にて測定した。

C. 研究結果

溶液静注により、対照生理的食塩水では血圧の変化はなく (n=10、投与前平均血圧: 81.8 \pm 2.1 mmHg、投与後変化率: -0.6 \pm 2.6 %)、未修飾 Hb では血圧が上昇し (n=9、81.1 \pm 2.9 mmHg、15.8 \pm 1.5 %; p<0.05 vs 対照)、SNO-Hb では血圧上昇は有意とはならず、また Hb と比較して有意に軽度であった (n=10、79.1 \pm 2.0 mmHg、4.7 \pm 2.3 %; p<0.05 vs Hb)。PEG-Hb では有意ではあるもののわずかな血圧上昇が認められたが、Hb と比較して有意に軽度であった (n=6、82.3 \pm 3.3 mmHg、8.5 \pm 2.3 %; p<0.05 vs 対照、p<0.05 vs Hb)。さらに、SNO-PEG-Hb では SNO-Hb と同様に血圧上昇は有意とはならず、血圧上昇は Hb と比較して有意に軽度であった (n=5、8.5 \pm 0.7 mmHg、5.2 \pm 0.3 %; p<0.05 vs Hb)。

ADP 凝集は未修飾 Hb で対照と比較して亢進したが、SNO-Hb で亢進の抑制傾向が認められ、SNO-PEG-Hb では対照と比

較しても有意に抑制された。コラーゲン凝集でも同様な傾向が認められたが、有意差は得られなかった。また、いずれの溶液によっても、静注後の血小板数に変化は認められなかった。

未修飾 Hb および SNO-PEG-Hb により、PPP 中 5-HIAA の増加と血小板中 5-HT の減少が濃度依存性に観察された。SNO-PEG-Hb による変化は、未修飾 Hb による変化と比較して軽度であった (図 5A)。また、未修飾 Hb により、PPP 中 NOx 濃度は減少傾向を示した。一方、SNO-PEG-Hb では濃度依存性に PPP 中 NOx 濃度が増加し、対照および未修飾 Hb との間に有意差が認められた。

D. 考察

本検討により、未修飾 Hb では以前のわれわれの実験結果と同様に血圧上昇と血小板活性化が確認された。血圧と血小板への影響は PEG-Hb でやや抑制され、SNO-Hb および SNO-PEG-Hb で明らかに抑制されていた。特に SNO-PEG-Hb の抑制効果は顕著であったが、*in vitro* における NOx 濃度増加で確認されるように、この効果は SNO-PEG-Hb の NO 供与能によるものと考えられる。SNO-PEG-Hb の血小板への作用に関しては、血小板 5-HT 濃度への影響と PPP 中 NOx 濃度増加により、NO の血小板への効果に起因することが示唆された。ただし、血小板への作用は一部 PEG によってもたらされたとも考えられる (参照)。

われわれの別途実験 (参照) により、SNO-PEG-Hb の PEG 化された Hb 自体の血中半減期は約 15 時間であり、SNO 体の半減期はおよそ 4 時間であると計測されている。従って、SNO-PEG-Hb は比較的長い半減期を有する NO の緩徐な放出キャリアーであるといえる。また、後述の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、SNO-PEG-Hb は十分に脳へ酸素を供給できることが示

されている。以上より、SNO-PEG-Hb は臨床に使用された場合、より副作用の少なく、しかも酸素を供給可能な製剤となることが期待される。

E. 結論

SNO-PEG-Hb は生体内で比較的長い半減期を有しており、NO と酸素を組織に供給可能であり、副作用も少ない人工酸素運搬体として、臨床応用可能な有用な物質であることが示唆された。

III. 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る人工酸素運搬体の組織酸素供与能計測

A. 研究目的

われわれは平成9年度に、各種人工酸素運搬体の生体組織における酸素運搬機能の検索を可能とするため、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法を確立した。平成10年度までにヒトHbリポソーム包接体により血液置換されたラット脳の酸素化状態の測定と、ウシPEG-Hb およびPLP化により酸素親和性を変化させたPEG-Hbにより血液置換されたラットの酸素化状態の測定を行い、各Hb修飾体の酸素運搬機能を検索するとともに、酸素親和性と酸素供与能との関係についての知見が得られた。平成11年度は、無修飾Hbと、前記の検討によりNO供与能を有し、人工酸素運搬体として有用であると予想されるSNO-HbもしくはSNO-PEG-Hbを投与したラット脳内の血液量、血中酸素分圧および全身血圧を測定し、それらの酸素運搬体およびNO供与体としての機能を比較検討した。また、新規に創製をめざしているパーフルオロカーボン乳剤に関し、酸素運搬体としての作用の検討を行い、生体適合性の優れた製剤の検索を開始した。

B. 研究方法

1. 無修飾Hb およびSNO-Hb 投与の効果

雄性Wistarラット(230-260g)をNembutal麻酔下において固定した後、大腿静脈から5%ヘモグロビンを含む無修飾HbおよびSNO-Hbを125mg/kg投与した。また、大腿動脈カニューレーションにより血圧をモニターした。近赤外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4波長近赤外分光測定器(USP430B, ユニソク社製)を用い700, 730, 750, 805nmの4波長の吸光度を同時に計測し、酸素化ヘモグロビン(oxy-Hb)、脱酸素化ヘモグロビン(deoxy-Hb)、全ヘモグロビン(total-Hb)、およびチトクロームオキシダーゼ(Cyt.oxi.)の酸化率を演算により同時に連続的に算出した。入射光はガラスファイバを通して頭皮を切開した頭頂部に照射され脳内を透過した光は口内の受光部により計測された。

2. SNO-Hb およびSNO-PEG-Hb の脱血ショック下における酸素運搬能の評価

雄性Wistarラットを用い、21%O₂人工呼吸下であらかじめ3%ウシ血清アルブミン(BSA)により全身の血液の65%を置換したのち約30%を15分かけて脱血し、ショック状態を起こした。10分後、脱血量と等量のHb(5%w/w)を含むSNO-HbもしくはSNO-PEG-Hbを15分間で投与し継続的に観察を行った。対照群として、一部のラットにSNO-HbやSNO-PEG-Hbの代わりに3%BSAを投与した。近赤外分光測定は上記と同様に行った。また測定中は生理学的パラメータとしてPaO₂, PvO₂および血圧をモニターした。

3. 新規パーフルオロカーボン乳剤の生体適合性評価

雄性Wistarラットを用い、70%脱血した状態で上記と同様に近赤外分光測定および生理学的パラメータ測定を行い、新規パーフルオロカーボンを人工呼吸下(100%O₂)もしくは酸素マスク導入下に

静注した。現在のパーフルオロカーボンが内包する問題点の回避を目的として、卵黄レシチンに PEG 修飾および添加物処理を行ってエマルジョンの安定化およびステルス化を企図した製剤を作製した。溶解パーフルオロデカリンは 30%とし、粒子サイズは 300nm となった。

C. 研究結果

1. 無修飾 Hb および SNO-Hb 投与の効果

無修飾 Hb を投与したラットでは 15-25% の有意な全身血圧の上昇が観察された、しかし脳内の血流量や酸素化状態に変化は観察されなかった。SNO-Hb を投与したラットでは血圧の上昇は観察されず、脳内の血流量や酸素化状態に変化は観察されなかった。しかし、無修飾 Hb、SNO-Hb とともに血尿が観測された。

2. SNO-Hb および SNO-PEG-Hb の脱血ショック下における酸素運搬能の評価

脱血ショックにより、oxy-Hb と total-Hb の減少、Cyt. oxi. の一部還元、および血圧低下が観察された。また組織の酸素供給量の不足を補うため PvO₂ の低下も起こった。SNO-Hb および SNO-PEG-Hb の投与により Hb と、Cyt. oxi. は速やかに脱血前のレベルまで回復した。また、PEG-Hb 投与では血圧が 10 分ほどで急速に脱血前のレベルまで回復したが、SNO-PEG-Hb 投与では 30 分ほどかけて緩徐に回復した。また BSA を投与した対照群のラットは投与後 1 時間以内にすべて死亡した。

3. 新規パーフルオロカーボン乳剤の生体適合性評価

本脱血ショックモデルでは、脱血により上記 2 同様に oxy-Hb と total-Hb の減少、Cyt. oxi. の一部還元、および血圧低下が観察された。30%パーフルオロデカリン製剤投与により、血圧が改善され、Cyt. oxi. も速やかに回復した。

D. 考察

無修飾 Hb 投与で血圧上昇が認められたが、これは Hb の NO 除去作用によるものと考えられ、SNO-Hb では NO 供給により Hb 除去作用が相殺されたため血圧上昇が認められなかったものと考えられる。いずれの場合も脳内血流および酸素化状態は変化せず、これは脳の血流保持機能に基づくものと思われ、両者とも酸素供給には問題はないことが示唆された。しかし、実験中血尿が出現したことから、両者は血中滞留時間が短く、臨床応用には適さないものと考えられる。

一方、SNO-Hb および SNO-PEG-Hb は脱血ショックで脳内への酸素供給能があり、血圧に関してもショック状態を改善することが示された。SNO-PEG-Hb で血圧回復が緩徐であったのは、その NO 供給能のためと考えられるが、血圧が完全に回復しない状態でも脳の呼吸状態改善が認められた。これは Stamler が提唱している酸素センサーとしての機能が SNO-PEG-Hb にあり、より酸素分圧の低いところで選択的に NO が放出され、血流が増加して酸素供給が高まることに由来する可能性がある。前記の血圧や血小板活性化、血中滞留能などの点と合わせ、本実験の結果は臨床応用可能な人工酸素運搬体として SNO-PEG-Hb が有用であることを示唆するものと考えられる。

また、新規パーフルオロカーボン乳剤ではパーフルオロデカリン濃度が 30%とまだ低く、酸素分圧を上昇させておく必要はあったものの、ショックに伴う脳内酸素化低下を改善することができた。今後製剤のパーフルオロデカリン濃度、粒子径等の改良を加え、生体適合性の優れた臨床応用可能な新規製剤の創製が可能と考えられた。

E. 結論

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の結果から、SNO-PEG-Hb が酸素供給能からみても臨床的に人工酸素運搬体として有用であること

が示唆された。新規パーフルオロカーボン乳剤の開発にも近赤外分光法を用い、臨床的に有用な製剤が創製可能であることが示唆された。

IV. 新規パーフルオロカーボン乳剤の創製

A. 研究目的

パーフルオロカーボン乳剤は我が国で開発され、海外でも高い評価を受けた人工酸素運搬体であるが、種々の問題点からその開発は中断された。平成 10 年度よりわれわれは、ミドリ十字により開発された初期のパーフルオロカーボン乳剤の問題点の克服を目指し、製剤改良研究を行い、安全性の高い材料を用いた、新規乳化法による機能的なパーフルオロカーボン乳剤の開発を行ってきた。同種輸血に対する我が国の安全性はトップレベルにあるものの、HIV などの輸血後感染症に関しては依然として window period が存在し、感染症のリスクはゼロではない。また、同種血の使用による同種免疫反応もまた皆無ではなく、さらに同種血には保存期限が存在する。これらの問題点のいくつかは、自己血輸血により解決されるが、自己血輸血では貯蔵できる量と期間に限りがあり、また、適応疾患も限られてしまい、現状では自己血輸血が一般化されたとは言い難い。酸素運搬能を有するパーフルオロカーボン乳剤により、自己血を希釈し使用するヘモダイリユーション法、および術中酸素輸血は自己血輸血の問題点を解決すると考えられる。すなわち、従来の術前の採血に加え、術直前に採血し、術中にはパーフルオロカーボン乳剤による酸素輸血を行ない、術後の輸血に自己血、あるいはパーフルオロカーボン乳剤を混合した自己血を使用することで、供給量の不足と保存期間の問題を解決できる。手術直前での採血は、宗教上の理由から保存自己血をも受け入れない患者に対しても適用可能であり、これら特殊な

患者に対しても輸血医療の道を開くことができる。パーフルオロカーボン乳剤の国際的な開発では、米国アライアンス社が中心となり、臨床試験が進行している。オキシジェントと名付けられたこの製剤は、ミドリ十字が開発した初期のパーフルオロカーボン乳剤の問題点である、冷凍保存の必要、酸素運搬能の不足、多量の合成界面活性剤の使用、蓄積性のある材料の使用といった問題点を解決した製剤である。しかし、高い粘性、使用したパーフルオロカーボンの肺からの早い消失に由来する障害、さらに細網内皮系に取り込まれることによる副作用などの問題点が残っている。本年度はこれらの問題点の回避を目的として、基材用のエマルジョンの PEG 修飾および添加物処理を行い、エマルジョンの安定化およびステルス化を企図した。

B. 研究方法

オレイン酸とフッ化炭素をエステル結合させた FO9962 は、オレイン酸が乳化剤であるレシチンの炭化水素と親和性を示し、フッ化炭素がパーフルオロデカリンと親和性を示すことで、安定な乳化膜の形成が期待できるものである。また、ホスファチジエタノールアミンに分子量 5000 のポリエチレングリコールを結合したものをステルス性リン脂質として用いた。

処方として乳化剤は、精製卵黄レシチンあるいは水素添加レシチンを主成分とし、等張化のためにグリセリンを加えた。高圧ジェット流型乳化機はデュアルフィード法とリバース法を組み合わせることで、パーフルオロカーボンの効率的な乳化が行えるが、これまでの装置はサンプルの必要量が多く、回収率も少なく、貴重で高価な材料を用いての製剤の試作には、かなりの無駄を覚悟で望まなくてはならなかった。そこで小型の装置の開発を行い、150 ml 程度で十分な製剤調製ができるミニ DeBEE を完成させ、エマルジョンの調製に供した。パーフルオロカーボンとしては

パーフルオロデカリン (10%) を用いた。

パーフルオロカーボン乳剤投与実験はラットを用い、大腿静脈にエマルジョンを投与後、経時的に全血 10 μ l を採血し、トルエンで抽出後、ECD を検出器としてガスクロでパーフルオロデカリンの血中濃度を定量した。内部標準物質としてジクロロエタンを用いた。パーフルオロデカリンはシス体とトランス体の混合物であるが、別々に定量した。

なお、さらに前記の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供する目的でパーフルオロデカリン濃度が 30% の製剤を作製した。

C. 研究結果

精製卵黄レシチンのみでも良好な乳化状態となったが、その粒子径は経時的に増加し、またエマルジョン粒子は放置すると下部に沈殿した。FO9962 を併用しても、エマルジョン粒子の沈殿を防ぐことはできなかった。しかし、エマルジョン粒子の合一速度は遅く、攪拌することで元の乳化状態に戻った。PEG リン脂質を併用すると、エマルジョン粒子の沈殿は効果的に抑えられた。経時的な粒子径の増大も抑制されるものの、完全には抑制できなかった。これに対し、FO9962 と PEG リン脂質を併用することで、外観変化と粒子径の経時的な増加を抑えることが可能であった。

ラット大腿静脈より、パーフルオロデカリンとして 3 g/kg の各エマルジョンを 20 分かけて投与したところ、シス体とトランス体ではいずれの場合も体内動態に違いは認められなかった。精製卵黄レシチンのみで乳化した場合と PEG リン脂質を併用した場合は、体内動態には違いが見られず、半減期約 6 時間で血中から消失した。FO9962 を併用した場合でも、半減期は約 6 時間で消失したが、さらに PEG リン脂質を併用すると、わずかではあるが血中濃度の持続が観察された。

また、30% パーフルオロデカリン製剤は

安定であり、粒子径は 300nm となったが、今後改良を重ねるためのプロトタイプの製剤として利用することができた。

D. 考察

FO9962 はオレイン酸の部分がレシチンの炭化水素部に親和性を示し、かつフッ化炭素部がパーフルオロデカリンに親和性を示し、膜構造を安定化させると考えられる。PEG リン脂質は粒子表面に水和相を形成し、網内系でのパーフルオロカーボン乳剤取り込を回避させると期待され、さらにエマルジョンの安定化にも寄与すると考えられる。実際、両者を使用したエマルジョンはより安定であり、また血中滞留時間の延長が認められた。

日本で開発されたフルオゾールはパーフルオロデカリンを主成分とし、安定性を高めるために、体内蓄積性の高いパーフルオロトリプロピルアミンと合成界面活性剤のプルロニックが使用されていたが、これらによる副作用が問題であった。第 2 世代ともいえるオキシジェントは、生体内蓄積性の少ないパーフルオロオクチルブロマイドをレシチンのみで高濃度に乳化した製剤であり、フルオゾールの問題点を解決したものであるが、肺からの消失が早いことによる肺への影響が懸念され、また、粘性が高い事や、細網内皮系に取り込まれることによる副作用が問題となっている。さらに、現在の乳化技術が不十分なことに由来する問題点も指摘される。本研究では、不十分な乳化技術による問題点は、我々が開発した新規な乳化機である高圧ジェット流型乳化機で解決し、さらに新規な物質を加えることで、素材としては最適であるにも関わらず、乳化が非常に困難であったパーフルオロデカリンの安定なエマルジョン作成が可能であることが示唆された。さらに、網内系への取り込みは、リポソームなどで検討されてきたステルス化技術を応用し、エマルジョンについても回避可能であることが示唆された。

また、30%パーフルオロデカリン製剤はの粒子径は 300nm となったが、これは PEG による見かけ上の数値である可能性がある。人工酸素運搬体としては粒子径 100~200nm が適当とされており、レシチン濃度の調整により径を縮小することが可能であるが、粒子径の測定方法を確立する必要がある。

パーフルオロカーボン乳剤は血球輸血代替のみならず、癌放射線治療、画像診断、臓器保存などにも応用可能と考えられる。今後パーフルオロデカリン濃度を高め、さらに粒子径、添加物濃度の決定などの改良を重ねることにより、臨床応用に適するパーフルオロカーボン乳剤の創製が可能と考えられた。

E. 結論

新規乳化機を用い、さらにエマルジョンに修飾を加えることにより、より安定であり、ステルス性を有し、臨床応用に耐える新規パーフルオロカーボン乳剤の創製が可能と考えられた（特許出願中）。

V. PEG-Hb および SNO-PEG-Hb のイヌ虚血心モデルにおける虚血改善作用の検討

A. 研究目的

われわれの以前からの *in vitro* およびラットを用いた *in vivo* 検討により、Hb 修飾体を人工酸素運搬体として臨床応用する場合、NO 供与能と血中滞留時間延長などの性質を付与された SNO-PEG-Hb が有用であろうとの結果が出されている。本研究では、大動物を用いた実験系で、SNO-PEG-Hb の生体適合性および有用性を検討することを企図し、特に酸素供与が有用と考えられるイヌ虚血心モデルにおいて PEG-Hb と SNO-PEG-Hb の虚血改善作用を比較した。

B. 研究方法

ビーグル犬を麻酔開胸後、冠動脈左前下行枝を頸動脈からの体外バイパスチューブにて選択的に灌流した。バイパスチューブに装着した電磁流量計により冠動脈左前下行枝への冠血流量を測定、さらに冠血流圧をモニターし、心拍数も同時にモニターした。また、冠動脈左前下行枝灌流域中心部に超音波クリスタルデメンジョンゲージを装着することにより、心筋長変化を測定し、局所心筋収縮性の指標である局所心筋短縮率を算出した。さらに冠静脈に採血用のチューブを挿入し、冠静脈血を採取し、酸素分圧および pH 変化を測定するとともに、動脈血との比較により心筋乳酸摂取率と心筋酸素摂取量を算出した。

冠灌流圧を 40%に制限し、心筋虚血が生じるように冠血流調節した状態で、バイパスチューブの側管より 10% PEG-Hb および SNO-PEG-Hb を冠血流の 10 分の 1 (1%) 置換して 20 分間投与した。

C. 研究結果

冠血流量は冠灌流圧の制限により前値の 25%程度に減少し、PEG-Hb はさらにそれを減少させたが、SNO-PEG-Hb では投与終了時には冠血流量が増加した。PEG-Hb でも左室心筋短縮率、pH、乳酸摂取率は改善したが、SNO-PEG-Hb は PEG-Hb より早期にそれらを改善し、その程度も大きかった。PEG-Hb では心筋酸素摂取量は減少したが、SNO-PEG-Hb ではその増加が認められた。

D. 考察

本実験の結果は、PEG-Hb と比較し、NO 供与能を有する SNO-PEG-Hb で、心筋虚血がより改善されることを示すものであった Stamler の仮説によれば、SNO-Hb はヘムに酸素が存在する状態では NO と強固に結合しているが、酸素が放たれる状態では NO 供与体として作用し、低酸素部の血流を増加させる可能性があるとしている。本実験の結果では、

SNO-PEG-Hb により冠血流量がむしろ増加したこと、pH の改善が早く、心筋酸素摂取率の増加が認められたことなどから、Stamler の言うように NO が実際に放出され、虚血を改善したとも考えられる。いずれにしても本研究の結果は、人工酸素運搬体として SNO-PEG-Hb が有用であり、虚血臓器の保護にも応用可能であることを示唆するものである。

E. 結論

イヌ冠動脈低灌流心筋虚血モデルにおいて、SNO-PEG-Hb は冠血流量を増加させ、心筋虚血を改善した。本実験により SNO-PEG-Hb の酸素供与体および NO 供与体としての機能が証明され、SNO-PEG-Hb が臨床的に有用であることが示唆された。

VI 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

A. 研究目的

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ビ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-セレクトインに注目し、ヘモグロビンが血小板活性化をもたらすかを検討した。NO 放出能を付加したヘモグロビン修飾体、分子バリアーとしての作用を持つポリエチレングリコール (PEG) を付加したヘモグロビン修飾体、その両方を付加したヘモグロビン修飾体は血小板活性化作用がより少ないかも検討した。またガラス板、コラーゲンをコーティングしたガラス板への血小板の接着に対するヘモグロビンとその修飾体の影響も検討した。

B. 研究方法

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。Wistar 系雄生ラット、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 CPD 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で検出する)を用いた。凝集素にはADPとコラーゲンを用いた。

フローサイトメトリー：健常ヒトPRPをヘモグロビン及びその修飾体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-セレクトチンを、FITC蛍光標識した抗P-セレクト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。

ガラス板に対する血小板の接着：ガラス板、及びコラーゲンでコーティングしたガラス板にヘモグロビンまたはその修飾体を塗布、乾燥させた後、健常ヒトPRPを加えガラス板、及びコラーゲンでコーティングしたガラス板に対する血小板の接着及び凝集を顕微鏡で観察した。イメージはコンピューターに保存し画像解析装置により定量評価した。

倫理面への配慮：研究の重要性を説明し、また静脈採血に伴う危険性も説明し理解を得て、インフォームドコンセントを得た後健常人から静脈採血を行った。

C. 結果

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。

フローサイトメトリー：対照群に比べヘモグロビン投与群で血小板IIb/IIIa発現が亢進した。SNOヘモグロビン投与群、PEGヘモグロビン投与群、SNO-PEGヘモグロ

ビン投与群ではIIb/IIIa上昇はヘモグロビン投与群に比べ軽度であった。

ガラス板に対する血小板の接着：ガラス板、及びコラーゲンでコーティングしたガラス板にヘモグロビンを塗布、乾燥させた後、健常ヒトPRPを加えガラス板、及びコラーゲンでコーティングしたガラス板に対する血小板の接着及び凝集を顕微鏡で観察するとヘモグロビンは有意に血小板の接着及び凝集を抑制した。また、SNOヘモグロビン、PEGヘモグロビン、SNO-PEGヘモグロビンではヘモグロビンよりもその効果が大きかった。

D. 考察

ヘモグロビン投与により血小板機能に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-セレクトチン発現程度(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-セレクト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-セレクト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-セレクト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。NO放出能を付加したヘモグロビン

修飾体は NO の血小板に対する好ましい凝集抑制作用により、分子バリアーとしての作用を持つポリエチレングリコール (PEG) を付加したヘモグロビン修飾体では PEG の分子バリアー効果により無修飾ヘモグロビンに比べ血小板に対する好ましくない作用が少ないと考えられる。更に、その両方を付加したヘモグロビン修飾体は血小板活性化作用がより少ないと考えられた。またガラス板、コラーゲンをコーティングしたガラス板への血小板の接着に対する修飾ヘモグロビンの影響も顕著であったことから修飾ヘモグロビンは血管内ステント、心臓外科手術における体外循環サーキット、あるいは人工血管のコーティング等に臨床応用出来る可能性が大きいことが示された。今後更に臨床応用の可能性を追求したい。

E. 結論

ヘモグロビン投与により血小板機能が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。ヘモグロビン修飾体は血小板活性化作用が減少していた。今後の臨床応用の可能性が大きいことが示された。

VII 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団外国人研究者招へい事業 (高度先端医療研究推進事業) による研究

A. 研究目的

人工赤血球の血小板機能への影響および血栓形成性の評価法の開発

B. 研究方法

ハイデルベルグ大学循環器内科学教室 準教授 (医学博士) トーマス・ノルト先生を平成 11 年 6 月 3 日—平成 11 年 6 月 10 日 (8 日間) 招へいした。平成 11 年 6 月 4 日は北海道大学医学部循環病態内科において講演を行った。6 月 5 日から 6 月 7 日までの間は札幌市内において、共同研究打ち合わせ、研究施設訪問、並びに北海道大学医学部循環病態内科のメンバーを交えて、人工赤血球の血小板活性化への影響評価方法の開発および動脈硬化性虚血性心疾患患者における影響に関する研究に関し意見交換を行った。6 月 8 日は北海道大学医学部臨床大講堂において講演会を開催した。(参会者 50 名)。6 月 9 日は北海道大学医学部循環病態内科大学院生への講演、研究の検討、助言、実験の指導、研究に従事した。

C. 研究結果 および D. 考察

人工赤血球として米国で臨床治験もされているセルフリーヘモグロビンは血管の収縮を招く。これはヘモグロビンの NO (一酸化窒素) への高い親和性のためと考えられる。すなわち NO-ヘモグロビンの相互作用により速やかに nitrite/nitrate および methemoglobin が生成される。血管収縮反応は NO による血管平滑筋グアニレートシクラーゼ活性化により血管拡張が阻害されるためと考えられる。ヘモグロビンによる NO 除去は血小板グアニレートシクラーゼ活性低下も招くであろう。この結果、血小板の反応性が亢進し、障害血管などの血栓形成性の高い場所で血小板の凝集と血栓形成を助長すると考えられる。このような現象は非顕在性の冠血管、脳血管に障害を持つ高齢者などで重大な副作用として発現する可能性がある。従って、血小板活性に影響の少ない人工赤血球の設計、開発、臨床応用を目指すこと、および適切な抗血小板薬を用いる方法を開発することは非常に重要である。人工赤

血球の血小板機能への影響評価方法の開発および動脈硬化性虚血性心疾患患者における影響に関する研究に関し今回外国人研究者を招へいたことにより得られた効果（成果）は、以下のとおりである。外国人研究者と大学院生、研究者との討論、意見交換は非常に活発で刺激的なものであった。その過程でハイデルベルグ大学医学部循環器内科学教室と北海道大学医学部循環器内科に共通した新たな関心、疑問、実験の技術的共通点、互いの得意とする点を認識した。（１）血小板活性化における遺伝的影響、個人差の影響、欧米で得られた抗血小板薬の臨床試験を日本に適用する場合の問題、（２）NO、一酸化炭素などガス状物質の血小板の形態と代謝に及ぼす影響、（３）種々の血栓溶解薬が血小板の活性化に与える影響についての意見、データ交換を行った。ハイデルベルグ大学医学部循環器内科学教室では、種々の血栓溶解薬が血小板の活性化に与える影響を研究中である。北海道大学医学部循環器内科ではガス状物質の血小板の形態と代謝に及ぼす影響を研究中である。一過性の虚血、再環流などの条件は血管作動物質の発現を介して後に血小板活性化をもたらすと考えられ、今後酸素分圧の変化が組織再構築に及ぼす影響を検討する必要があることで意見の一致をみた。活性化血小板の測定について、実際に機器を用いて指導して頂いた。本法は、意見交換の結果、我々の施設にも応用できることが判明した。本法は種々の血管作動物質を投与する時の血小板の動態を測定する目的にも、また肺血管内皮細胞、平滑筋細胞、冠状動脈の内皮細胞、平滑筋細胞などが障害された病態での測定にも幅広く応用可能である。本法は酸素運搬能を有する人工赤血球使用による血小板の変化が冠循環、肺循環、脳循環に及ぼす影響を研究するのにも有用となろう。新しい抗血小板薬の存在する条件での活性化血小板の評価検出法についても教示頂いた。講演会には北海道大学医学

部循環器内科のみならず、細胞薬理学教室、機能薬理学教室、免疫科学研究所、侵襲制御医学教室、などからも多数の参加があり、活発な意見交換、質疑応答があった。

E. 結論

外国人研究者との研究打ち合わせにより（１）レーザー散乱光を用いた高感度血小板凝集能測定装置を使い血小板凝集能に及ぼす人工赤血球の影響について検討を重ね、意見交換を継続していくこと、（２）フローサイトメーターを用いて高感度に血小板活性化を測定する技術の開発を継続し、血小板活性化に及ぼす人工赤血球の影響について検討を重ね、意見交換を継続していくこと、（３）抗血小板薬を使用した虚血性心疾患患者の凝固系、線溶系蛋白質の発現変化を共同で研究し、またドイツ人と日本人での反応の違いを比較し、人工赤血球使用時の血小板活性化を低減する戦略を共同で研究していくことを確認した。

VIII. SNO-PEG-Hb 製造の品質管理

A. 研究目的

セルフリーHb修飾体を用いた酸素運搬体の開発は、欧米で臨床試験の最終段階にあるものの、一昨年のBaxter社の失敗を契機に、有効性ではなく安全性を中心に見直しの気運が生じ、特に生体適合性についてFDAは基準を厳しくし、フェーズ3の臨床数を600例程度まで引き上げた。これまでに、Hbに起因する副作用として、血管収縮、腸管収縮、血小板活性化が確認され、さらにFDAはHb投与後に生ずる大量のヘム処理に関わる酸化ストレスを懸念している。このような状況の中で、我々が目的としているところの、Hbの副作用を軽減した修飾体の開発はまさに適切な戦略であったと考えられる。本年度は、その研究のレベルアップを目標に、まず定期

的な SNO-PEG-Hb の供給を行うことを目標に、品質管理を実践した。

B. 研究方法

製法は昨年度と同様である。Hb はヒト期限切れ赤血球から限外ろ過法により作成した。ただし、今年度は原料となる赤血球製剤の入手に苦勞し、多くの血液センター、特に宮城県赤十字血液センター、旭川赤十字血液センターのお世話になったことを記したい。NO 供与体として、亜硝酸およびグルタチオンより自家製造したニトロソグルタチオンまたは Dojindo 製ニトロソグルタチオンを使用した。Hb 濃度 50 μ M とし、0.1 M リン酸緩衝液 (0.5 mM EDTA) 中にて NO 供与体と室温で混合した。Hb と NO 供与体のモル比は 1 : 5-10 とした。場合によっては、メト化率を下げるためにモル比を一定のまま、希釈して製造を行った。

蛋白質結合 NO の解析は、試料を HPLC ゲルろ過カラム (Eicom pak GFC-200 または TSK-GEL SW4000XL) を用いて移動相 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5)、0.1 mM EDTA にて分離、ポストカラムにて 1.75 mM HgCl_2 を混和、ついで 1% sulfanilamide、0.1% N-naphthylethylenediamine、2% リン酸により亜硝酸を発色させ 540 nm の吸光度より定量した。

Hb への PEG 修飾は、日本油脂製サンプルライト DEAC-30HS (平均分子量 2956 のアミノ基結合型修飾剤) を用い、50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) にて、Hb 濃度 0.25 mM、Hb (テトラマー) と PEG 修飾剤のモル比 1 : 20 で氷温下 2 時間反応させた。この PEG-Hb への NO 付加は NO 供与体としてニトロソグルタチオンを用い、室温で 10 時間反応させた。

C. 研究結果

NO 付加 - NO 供与体として、ニトロソグルタチオンを NO 供与体とした場合、

Hb とのモル比が 1 : 10 以下であれば室温で 12 時間反応させても Hb メト化は認められず、NO は Hb のシステイン残基に選択的に結合した。メト化は Hb 濃度が低いほど小さく抑えられるものの、製造効率を考慮して、メト化率 10% を基準に作成を行った。この条件で SNO 化率は 30-80% まである程度制御可能であったが、メト化率と製造規模 (具体的には Hb 濃度が規定され、それによって製造で使用するボトルのサイズが規定された) を検索し、SNO 化率 30-40% を供給試料の基準とした。試料は、最終的にろ過滅菌し、Hb 濃度 10%、生理食塩水透析後に、35 mL サイズの無菌試験管に分注し、冷凍状態で出庫した。

D. 考察

昨年度と同様に中規模スケールでの製造を実施し、共同実験施設にて安定な実験データを得ることが可能となった。科学としての分野での新規発見はないものの、品質管理を試行し、lot に基づく管理を一元化し実験の客観性の保証に貢献したと考えられた。今年は特に共同実験者以外の他施設にも供給を行っており、実験体制の信頼度を上げることに寄与したものと確信する。

E. 結論

SNO-PEG-Hb の中規模製造に取り組み、それなりに品質管理を行った試薬の供給を実現した。

IX. Hb によるアラキドン酸代謝への影響

A. 研究目的

FDA が特に注目している酸化ストレスとヘムとの関連性を明らかにするために、独自にアラキドン酸代謝に及ぼす影響の解析を進める。

B. 研究方法

前述研究 VIII と同様に SNO-PEG-Hb を作成し、あわせてその途中生産物である、SNO-Hb、PEG-Hb を作成した。また、作成時の Hb と SNO-SG 比を変えて、SNO 化率の異なる SNO-PEG-Hb を準備した。アラキドン酸代謝は、非細胞系にて、Hb 濃度 0.1 から 1.0 μ M、pH 7.4 のリン酸系緩衝液、NADPH 有りなしの各種条件にて、適量のラジオアイソトープ標識アラキドン酸を含む 0.1 mM のアラキドン酸と室温で 10 分間反応させ、生成物を有機溶媒抽出し、油層を回収し乾固、移動相にて再溶解し逆相液体クロマトグラフィーにて分離、ポストカラムにてシンチレーターと混和し、放射能をカウントした。解析は、添加した標識アラキドン酸の放射能を 100% とし、そのうちのどの程度が代謝物領域に回収されるかを見た。

C. 研究結果

今回使用した移動相は、主に非極性代謝物を分解する系とし、HETE 類の分析を主として行ったが、Hb による代謝物は主により極性が高い領域、図中では保持時間がより短いフロント部分に多くの放射能が見いだされ、添加した総カウントを 100% とした場合、未修飾 Hb では極性領域に 2.77%、SNO-Hb では 2.44%、一方、PEG-Hb では 0.84%、SNO-PEG-Hb では 1.56% であった。また、Hb により極性物質が増加し、PEG 化により減少するものの、ニトロソ化では大きな変化は見られなかった。この点を確認するために、ニトロソ化率の異なる修飾物にて同様の実験を行ったが、やはり差は認められなかった。この酸化反応において NADPH の関与を検討したが、差は見られなかった。ヒト Hb 以外にも、ウシ Hb を準備し同様に行ったが、近似的な結果であった。

Hb により生成したアラキドン酸代謝物の同定は、適当な標識された市販標準物質がないために、容易ではない。現在の所、1)生成されたアラキドン酸代謝物を抽出

し、バイオアッセイにてその活性を検証する(血小板活性化作用があるかどうか)、2)代謝物の候補として、プロスタグランジン F2 α またはその 8-iso 体をまずは念頭に置いて、酵素免疫アッセイを確立し、微量定量を試みる、の 2 点が考えられる。特に 8-iso 体については、酸素運搬体研究ではなく病態生理学的な研究分野において最近注目を浴びており、生体内で非酵素的に生成され様々な生理作用を示すことが報告されている。血小板に対する作用については必ずしも十分なデータ蓄積はないものの、若干の作用があるとする報告が見られる。この点については、すでに市販の EIA キットを用いた検討を行ったが、Hb または PEG-Hb での生成は確認されず、今のところ否定的であった。

D. 考察

Hb による血小板活性化が分担研究者佐久間らの実験で確認され、その機構の解明が待たれる。Hb は NO を除去し、また NO は血小板抑制に作用する重要な因子であることから、血小板活性化には Hb による NO が重要と推測される。しかし、Hb によって活性酸素が生成し血小板を活性化する可能性も否定できない。そこで、活性酸素が生成するならばアラキドン酸代謝がまず影響を受けると考えられるため、Hb による *in vitro* アラキドン酸代謝を解析した。その結果、予想通り Hb にはアラキドン酸代謝能が確認され、興味あることに、SNO 化では抑制できないが、PEG 化により抑制される傾向が認められた。アラキドン酸代謝活性が、ニトロソ化ではなく PEG 化によって抑制された点については、研究打ち合わせでデューク大学スタムラー博士、エイベック社クリストファー博士と議論し、以下の可能性が示唆された。すなわち、ヘムには以前から peroxxygenase 活性があると考えられているが、Hb は酸化するとヘムが Hb 分子から脱落、そのヘムが peroxxygenase 活性によ

りアラキドン酸代謝を進め極性代謝物を生成する。一方、HbのPEG化によりそのアラキドン酸代謝活性は抑制されるが、クリストファー博士らの未発表データでは、HbのPEG化によりHbからのヘム脱落が顕著に抑制されることが見いだされているという（遊離ヘムが生体内で活性酸素を生成し、酸化ストレスを惹起するのではというFDAの質問に対する、彼らの社内実験データ）。すなわち、PEG化はHbのメト化を抑制は出来ないが、メト化に伴う遊離ヘムの生成を抑えることが可能とのことであった。従って、PEG化はヘム脱落を回避し間接的にアラキドン酸代謝への関与を抑制したものと推測された。PEG化の当初の目的は、Hbの分子量を増大し、腎糸球体および血管内皮間隙からのHb分子漏出を抑制し、血中半減期を延長することにある。今回の実験は、PEG化がHbによる血小板活性化という副作用を抑制する上でも貢献していることを示唆し、PEG化のあらたな役割を示すものと考えられた。PEG化の効果について、さらに慎重に検証を進める必要がある。

一方、NOは2価Hb、さらに3価Hbとも親和性があり、ヘムと容易に結合する。ヘムへのNO結合により、ヘムに依存するアラキドン酸代謝活性もまた抑制されるのではないかと考えられたが、Hbのニトロソ化では効果は見られなかった。この点については、ニトロソHbから遊離するNO関連物質はNOそのものとする報告もあるが、NOそのものではなくNO⁺とする説もある。今回、ヘムの代謝活性を抑制できなかったことを考慮すると、少なくとも今回の試験管内環境ではNOではなく別のNO関連物質として分解が進んでいるものと推測された。

今回の実験データは、アラキドン酸代謝物の構造をまだ決定していないという意味で、未だ予備的な実験データに過ぎない。しかし、Hbによってアラキドン酸代謝が進み、PEG化によって抑制可能という実

験結果は新しい事実であり、またPEG化修飾体の新しい可能性を強く示唆する成績である。今後、継続研究によってHbによるアラキドン酸代謝活性と、その血小板活性化との関連性を深く追求し、その意味づけを行いたい。

E. 結論

Hb修飾体をPEG化した場合の新しい効能として、ヘムに関わる酸化ストレスの軽減作用が示唆された。

X. SNO-PEG-Hbの生体内における物性の検索

A. 研究目的

人工酸素運搬体としての臨床的有効性と安全性と密接に関係するSNO-PEG-Hbの血中半減期の再評価を行い、SNO-PEG-Hbの物性の確定を企図した。

B. 研究方法

SNO-PEG-Hbの血中半減期を確定するため、WistarまたはBrown Norwayラットを使用し、下腿動静脈にカニューレ装着、SNO-PEG-Hbを125 mg/kgで投与後に経時的に採血し、血漿中のSNO-PEG-Hbは上述研究VIIIと同様にHPLCにて分析した。

C. 研究結果

SNO-PEG-HbのPEG化されたHb自体の血中半減期は約15時間、一方、SNO体の半減期はおよそ4時間と推定された。従って、SNO-PEG-Hbは比較的長い半減期を有するNOの緩徐な放出キャリアーであることが判明した。

D. 考察

SNO-PEG-Hbの物性について、一般的に低分子SNO体の半減期は短い。例えば、試験管内におけるSNO体の半減期は、

SNO-アルブミンで 10 時間以上であるが、SNO-penicillamine で 14 分、SNO-cysteine で 60 分、SNO-gluta-thione で 2.7 時間とされており、一般的に高分子蛋白質に結合したもののほど半減期は長い。血中では金属イオンが存在し分解も早く、さらに血管外への放出によりさらに加速されると推定される。従って、血管内投与される低分子 SNO 体のドナーとしての薬物は短寿命の作用である。さらに、このような低分子薬物は容易に血管外漏出し、いたるところで SNO を放出すると想定される。一方、今回の実験でも確認されたが、SNO-PEG-Hb の SNO 半減期は血中でも 4 時間であり、かつ Hb に PEG 化が行われており血管外漏出せず、そのために比較的長い寿命を持つことが確認された。このことは、Hb 修飾体の副作用を SNO 化により回避するという戦術を考える際に極めて有用であり、かつ緩徐な SNO 放出能をうまく利用した治療戦術が可能となり新たな酸素治療の可能性が示唆された。SNO-PEG-Hb は、PEG 化と SNO 化を同時に行った新しい Hb 修飾体である。今回の解析により、PEG 化の新しい効能としてヘムに関わる酸化ストレスの軽減作用が示唆され、また SNO 化では緩徐な SNO 放出が新たな特徴として確認された。

E. 結論

SNO-PEG-Hb の緩徐な SNO 放出が新たな特徴として確認され、SNO-PEG-Hb は酸素治療を目指す上で新しい基材となりうると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Satoshi Fujii, Daisuke Goto, Tarikuz Zaman, Noaki Ishimori, Keiko Watano, Takeaki Kaneko, Hitoshi Okada, Mitsuyuki Makiguchi, Toshiaki Nakagawa, Akita Kitabatake. Diminished Fibrinolysis and

Thrombosis: Clinical Implications for Accelerated Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 1998; 5: 76-81

2. Sakanoue J, Tamura M, Nakai K, Sakuma I, Kitabatake A. Redox states of cerebral tissues of rats substitutes by the liposome-encapsulated hemoglobin. In *Oxygen Transport to Tissues XXI*. Eke A, Delpy DT. eds. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, pp27-33, 1999

3. Sakamoto T, Woodcock-Mitchell J, Marutsuka K, Mitchell JJ, Sobel B, Fujii S: Tumor necrosis factor- α and insulin, alone and synergistically, induce plasminogen activator inhibitor-1 expression in adipocytes. *Am J Physiol* 1999; 276: C1391-1397

4. Goto D, Fujii S, Zaman T, Sakuma I, Gao M, Koyama T, Mitchell J, Woodcock-Mitchell J, Sobel BE, Kitabatake A. Long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats modulates coronary capillary network remodeling. *Angiogenesis* 1999; 3: 137-146

5. Togashi H, Sakuma I, Nakai K, Fujii S, Yoshioka M, Satoh H, Kitabatake A. S-nitrosylation of a newly developed polyethylene glycol-conjugated hemoglobin causes a marked inhibition of ex vivo platelet aggregation in the rat. In: Moncada S, Wilkum P, Gustaffson L, Higgs EA, eds. *The Biology of Nitric Oxide, Part 7*. Portland Press, London, 2000 (in press)

6. Sakuma I, Togashi H, Nakai K, Fujii S, Yoshioka M, Satoh H, Kitabatake A. Nitric oxide scavenging effects of hemoglobin injected intravenously into spontaneously diabetic rats on blood pressure and platelet aggregation. In: Moncada S, Wilkum P, Gustaffson L, Higgs EA, eds. *The Biology of Nitric Oxide, Part 7*. Portland Press; London, 2000 (in press)

7. Sakanoue J, Tamura M, Nakai K,

- Sakuma I, Satoh H, Kitabatake A. Redox states of cerebral tissues of rats substituted by the polyethyleneglycol-conjugated hemoglobin. In: Swartz H, Dunn J, eds. Oxygen Transport to Tissue XXII. Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 2000 (in press)
8. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫広子、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。集中治療 5(5):477-485, 1999
9. 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：ヘモグロビンと一酸化窒素との相互作用を考慮したヘモグロビン系酸素運搬体の設計。人工血液 7(2): 40-44, 1999
10. 佐久間一郎：第6回NO国際学会。血圧 6(11): 1136-1137, 1999
11. 仲井邦彦：酸素治療および赤血球代替物の安全性ならびに有効性評価基準に関するワークショップに参加して。人工血液 7(4):112-116, 1999.
2. 学会発表
1. Ichiro Sakuma, Kunihiro Nakai, Hiroko Togashi, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Sato, Akira Kitabatake: Effects of S-Nitrosohemoglobin on Blood Pressure, Platelet Aggregation and Brain $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ Level. 41st Annual World Congress-ICA'99 International College of Angiology, 1999.7.8. Sapporo, Japan
2. Ichiro Sakuma, Hiroko Togashi, Kunihiro Nakai, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Sato, Akira Kitabatake: Nitric oxide scavenging effects of hemoglobin injected intravenously into spontaneously diabetic rats on blood pressure and platelet aggregation. Biology of Nitric Oxide 6th International Meeting, 1999.9.5. Stockholm, Sweden, Acta Physiologica Scandinavica 1999; 167 (S645): 39.
3. Hiroko Togashi, Ichiro Sakuma, Kunihiro Nakai, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Sato, Akira Kitabatake: S-nitrosylation of a newly developed polyethylene glycolconjugated hemoglobin causes a marked inhibition of ex vivo platelet aggregation in the rat. Biology of Nitric Oxide 6th International Meeting, 1999.9.5. Stockholm, Sweden, Acta Physiologica Scandinavica 1999; 167 (S645): 12.
4. Ichiro Sakuma, Hiroko Togashi, Kunihiro Nakai, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Sato, Akira Kitabatake: S-nitrosylated polyethylene glycol-conjugated hemoglobin: a new oxygen carrier and nitric oxide donor. International Society for Heart Research the 16th Annual Meeting of the Japanese Section, 1999.12.1. Fukuoka, Japan, J Mol Cell Biol 1999; 31: A177
5. 藤井 聡、佐久間一郎、葛西瑞穂、北畠顕、仲井邦彦、佐藤洋、富樫広子、吉岡充弘、藤井ひとみ、釘物修：血小板 GPIIb-IIIa 活性化と α 顆粒放出に対する温度とヘモグロビン系酸素運搬体の影響。第2回北海道血栓血小板研究会。1999.1.29. 札幌
6. 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。1999.2.26. 札幌
7. 富樫広子、仲井邦彦、佐久間一郎、藤井聡、北畠顕、吉岡充弘：ヘモグロビン系酸素運搬体のラット循環機能に及ぼす影響。第72回日本薬理学会。1999.3.23. 札幌
8. 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：S-ニトロソヘモグロビンの人工酸素運搬体としての機能評価。第20回日本循環制御医学会総会。1999.5.14. 仙台。循環制御 20(Suppl): 51, 1999
9. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫広子、藤井聡、坂野上淳、田村守、吉岡充弘、佐藤洋、北畠顕：Hemoglobin 修飾体が自然発

症糖尿病ラット (OLETF) の循環動態および血小板凝集能に及ぼす影響. 第6回日本血液代替物学会年次大会. 1999.9.10. 東京. 人工血液 7(3): 77, 1999

10. 藤井 聡、佐久間一郎、葛西瑞穂、仲井邦彦、佐藤 洋、富樫廣子、吉岡充弘、北畠 顕:人口酸素運搬体の血小板活性化に及ぼす影響. 第6回日本血液代替物学会年次大会. 1999.9.10. 東京. 人工血液 7(3): 79, 1999

11. 坂野上淳、田村 守、仲井邦彦、佐藤洋、佐久間一郎、北畠 顕:近赤外分光法を用いた脱血ショック下における polyethyleneglycol-conjugated s-nitrosohemoglobin の酸素運搬能の評価. 第6回日本血液代替物学会年次大会. 1999.9.11. 東京. 人工血液 7(3): 79, 1999

12. 福島昭二、西尾琢也、岸本修一、竹内由和、仲井邦彦、佐久間一郎、坂野上淳、佐藤洋、北畠顕:O/W型パーフルオロカーボンエマルジョンの新規調整法の開発と体内動態制御. 第6回日本血液代替物学会年次大会. 1999.9.11. 東京. 人工血液 7(3): 85, 1999

13. 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-Nitroso-Polyethylene glycol-Hemoglobin 誘導体の開発. 第6回日本血液代替物学会年次大会. 1999.9.11. 東京. 人工血液 7(3): 83, 1999

14. 坂野上淳、田村 守、仲井邦彦、佐藤洋、佐久間一郎、北畠 顕:近赤外分光法を用いたヘモグロビン系人工酸素運搬体の酸素運搬機能の評価. 第38回日本ME学会北海道支部大会. 1999.9.18. 札幌

15. 佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、坂野上淳、藤井 聡、吉岡充弘、田村 守、佐藤 洋、北畠 顕: NO 供与能を有する hemoglobin 誘導体 s-nitroso glycol-conjugated hemoglobin の生体内における性質. 第2回日本血管細胞生物学会. 1999.9.24. 前橋.

16. 仲井邦彦、佐久間一郎、安河内徹、富

樫広子、坂野上淳、藤井聡、吉岡充弘、佐藤洋、北畠顕. NO 代謝物放出能を有する新しい酸素運搬体の開発 - S-Nitroso-PEG-Hemoglobin の作製. 第37回日本人工臓器学会総会. 1999.10.15. 名古屋

17. 福島昭二、西尾琢也、岸本修一、竹内由和、仲井邦彦、佐久間一郎、坂野上淳、佐藤洋、北畠顕. O/W型パーフルオロカーボンエマルジョンの新規調製法の開発と体内動態制御. 第37回日本人工臓器学会総会. 1999.10.15. 名古屋

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:一酸化窒素供与能を有するヘモグロビン系人工酸素運搬体の開発. 第13回日本ME学会秋季大会. 1999.10.28. 吹田

19. 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 供与能を有する各種 hemoglobin 誘導体の生体内における性質. 第29回日本心血管作動物質学会. 2000.2.5. 福岡. 血管 23(1): 10, 2000

20. 北畠 顕:新しい酸素運搬体の開発とその臨床応用. 厚生科学研究研究成果発表会「人工血液をつくる」. 2000.2.11.東京

21. 北畠 顕:酸素運搬機能を有する人工赤血球の開発に関する研究. 厚生科研人工血液研究成果発表会. 2000.2.23.東京

22. 佐久間一郎、福島昭二、仲井邦彦、北畠 顕. カレントコンセプト「人工酸素運搬体(赤血球)開発の現況」フルオロカーボンの開発. 日本医工学治療学会第14回学術大会. 2000.2.26. 東京. 医工学治療 12(Suppl.1): 64, 2000

G. 知的所有物の取得状況

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月国内特許申請:特願平 11-067239. 2000年2月国際特許申請中.