

分担研究報告書

酸素運搬機能を有する人工赤血球の開発に関する研究

分担研究者 佐久間一郎 北海道大学医学部附属病院講師

研究要旨 ヘモグロビン (Hb) 修飾体を人工酸素供与体として用いるためには、まず NO 供与能付与すべきであることを、ヒト類似の病態モデルである自然発症糖尿病ラットの血小板活性化への未修飾 Hb と SNO-Hb との作用の比較により証明した。さらに、臨床応用へ進むためには、SNO-Hb をポリエチレングリコール (PEG) で修飾した SNO-PEG-Hb を使用すべきであることを、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、さらに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、および *in vitro* の血小板への作用などを指標として確認した。また、大動物を使用した実験系としてイヌ虚血心モデルを用い、SNO-PEG-Hb の虚血改善作用が著明であることが証明された。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 を用いない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 化し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、臨床応用可能な製剤を創製する予定である。

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

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

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、図 1) 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。最終的に限界を過により未反応 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 (図 2)。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 (図 3)。

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 s-ニトロソ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 $50 \mu\text{M}$ 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 ($\text{pH } 8.0$)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 ($1\sim 1.5\%$) 麻酔下に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、ハローセン麻酔下に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 $20 \text{ 万}/\mu\text{I}$ 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 ($5 \mu\text{M}$) とコラーゲン ($10 \mu\text{g/ml}$) 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 $0.1\sim 1.0\%$ 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 ± 2.1 mmHg、投与後変化率: -0.6 ± 2.6 %)、未修飾 Hb では血圧が上昇し (n=9、 81.1 ± 2.9 mmHg、 15.8 ± 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 ± 2.0 mmHg、 4.7 ± 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 ± 3.3 mmHg、 8.5 ± 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 ± 0.7 mmHg、 5.2 ± 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 (図 4)。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 との間有意差が認められた (図 5B)。

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 (仲井分担研究報告書参照)。

分担研究者仲井の検討により、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 (図 6)

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 消去作用によるものと考えられ、SNO-Hb では NO 供給により Hb 消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、ホスファチジェ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。高压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、粘性が高いことや、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、臨床応用に耐えう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、さらに冠血流量をモニターし、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 (図 7)

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。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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

2. 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

3. 佐久間一郎：第6回NO国際学会。血圧 6(11): 1136-1137, 1999

4. 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

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, Wilkond 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, Wilkond 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)

2. 学会発表

1. Ichiro Sakuma, Kunihiro Nakai, Hiroko Togashi, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Sato, Akira Kitabatake: Effects of S-Nitroso-hemoglobin 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 Meetig of the Japanese
Section, 1999.12.1. Fukuoka, Japan, J
Mol Cell Cariol 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、劔物 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 7 2 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、北島 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. 佐久間一郎、福島昭二、仲井邦彦、北島顕. 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

北島 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.

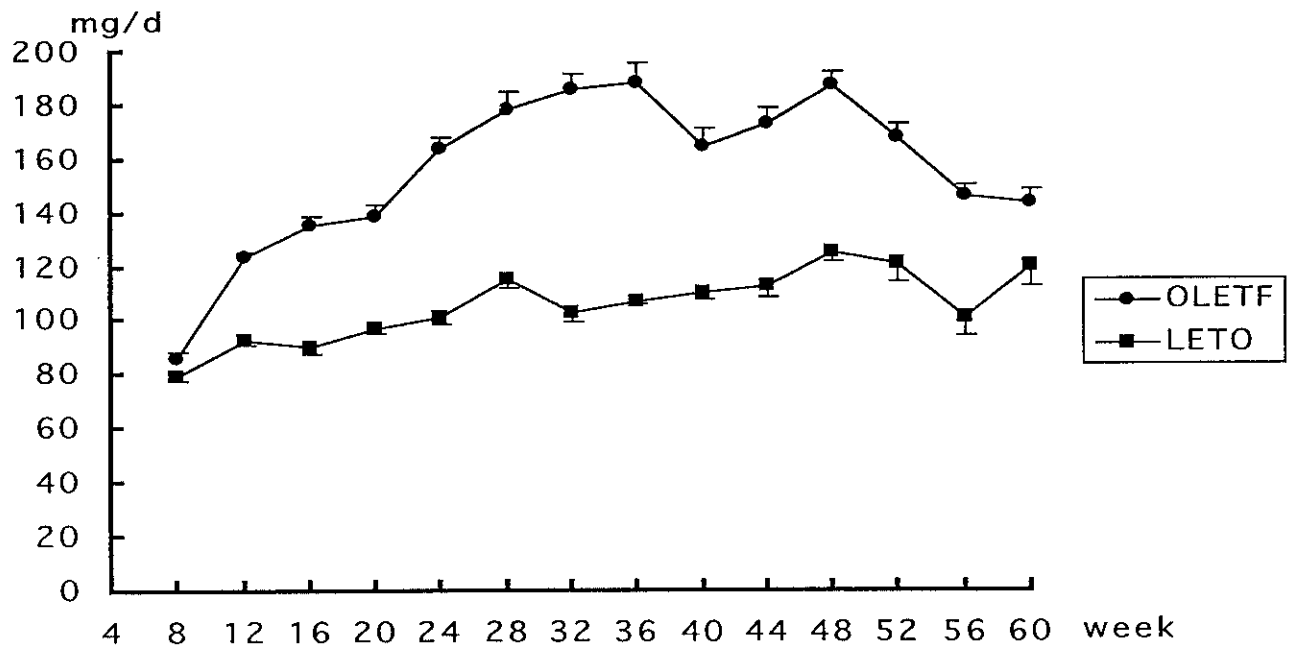


図 1. OLETF および LETO ラットにおける空腹時血糖値の推移

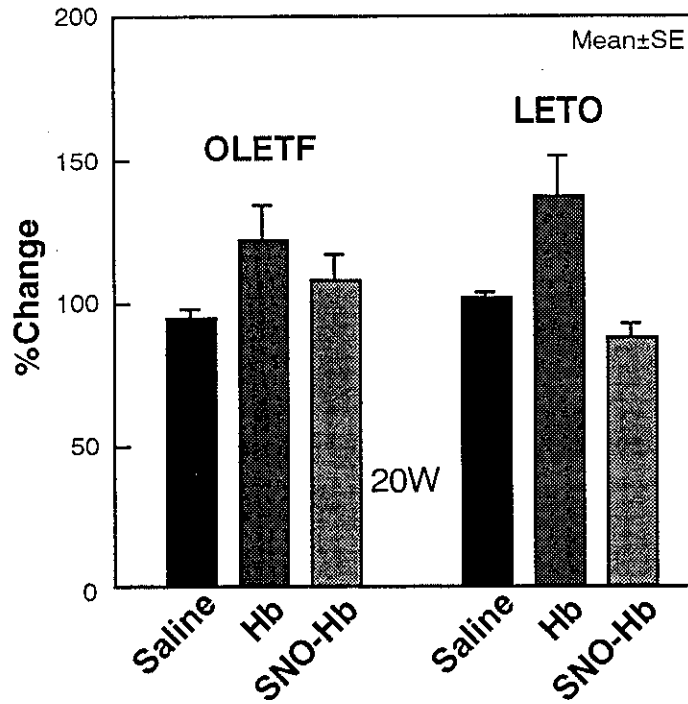


図 2. 20 週令 OLETF および LETO ラットにおける Hb もしくは SNO-Hb 静注の平均血圧への影響

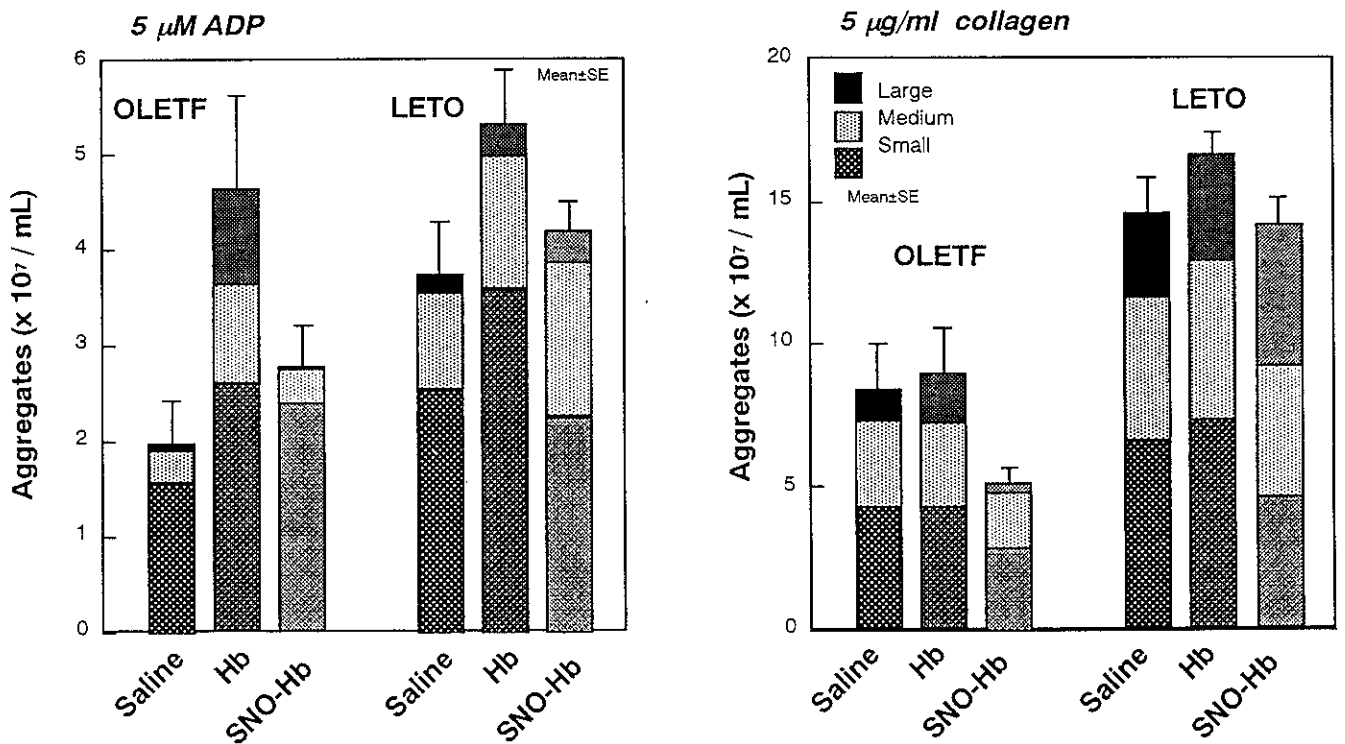


図 3. 20 週令 OLETF および LETO ラットにおける Hb もしくは SNO-Hb 静注の血小板凝集への影響

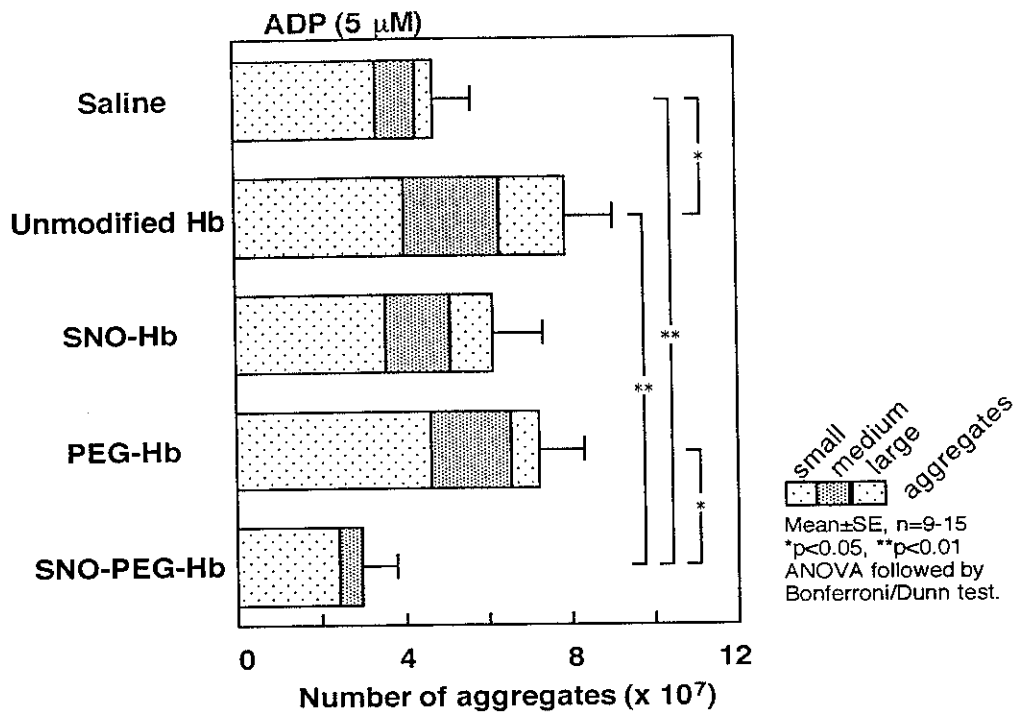


図 4. Brown Norway ラットへ各種 Hb 修飾体 125 mg/kg を静注した後の血液における ADP 惹起血小板凝集能の変化

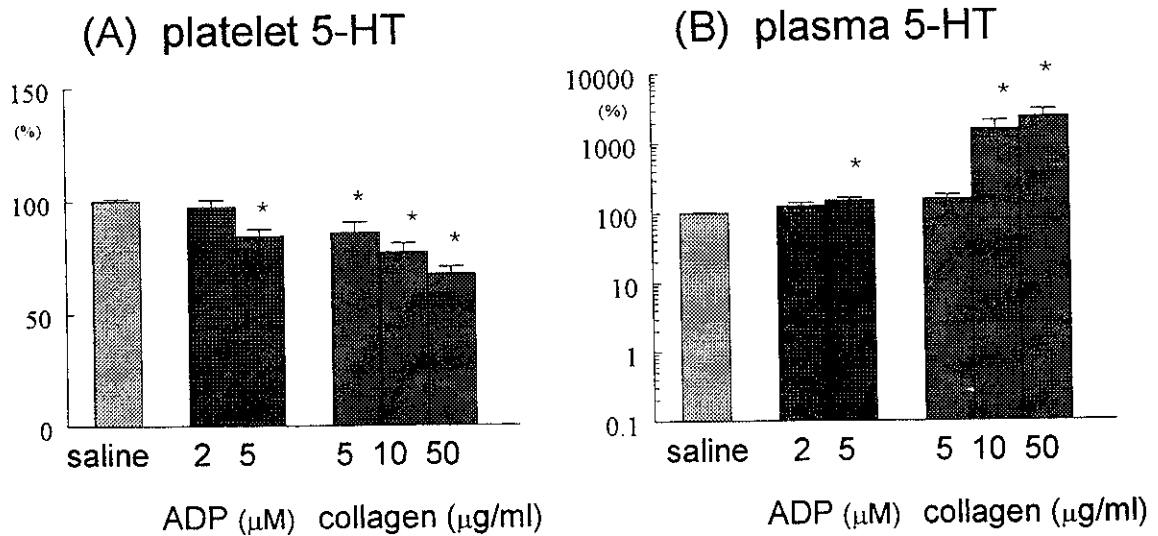


図 5. 血小板中 5-HT (A) と血漿中 NO_x (B) 濃度に及ぼす未修飾 Hb ならびに SNO-PEG-Hb の影響

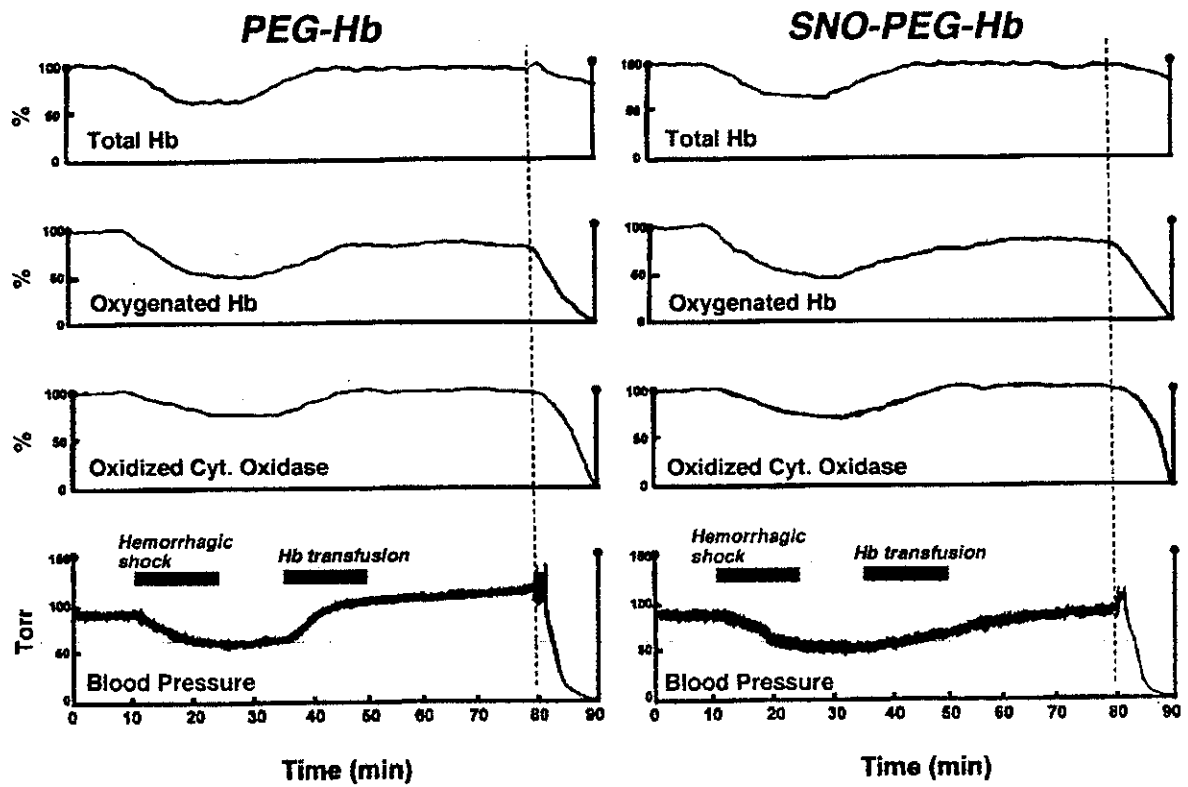


図6. ラット脱血ショックモデルにおける PEG-Hb および SNO-PEG-Hb 静注の脳内全ヘモグロビン、酸素化ヘモグロビン、チトクロームオキシダーゼ 酸化率および血圧に対する影響

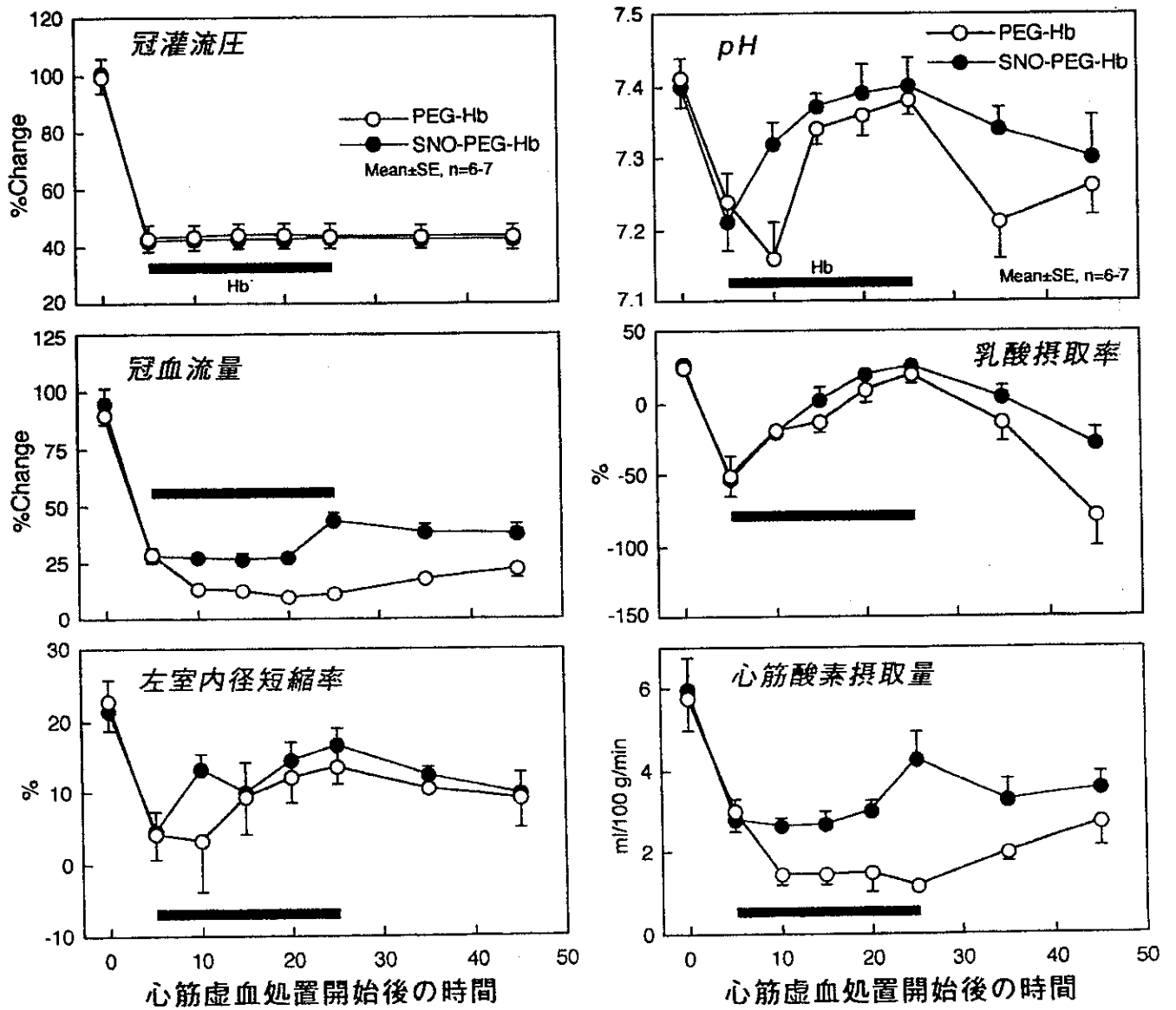


図7. イヌ冠動脈低灌流心筋虚血モデルにおける PEG-Hb および SNO-PEG-Hb 投与の効果

分担研究報告書

酸素運搬機能を有する人工赤血球の開発に関する研究

分担研究者 藤井 聡 北海道大学医学部附属病院講師

研究要旨 前年度までの検討により、従来のヘモグロビン修飾体を人工赤血球として用いた場合に血小板活性化が惹起され、血栓形成素因、糖尿病、ないしは有意な動脈狭窄が存在する場合には急性血栓症を誘導する危険性が考えられ、一酸化窒素（NO）放出能を付加したヘモグロビン修飾体（SNOヘモグロビン）では凝集抑制作用によりその危険性が回避される可能性を示す結果が得られた。本年度は昨年度まで用いた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に加え、ガラス板に対する血小板の接着を用いた評価系を用い、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（PEGヘモグロビン）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の活性化が少なく、さらにPEGにNOを付加したヘモグロビン修飾体（SNO-PEGヘモグロビン）は血小板活性化作用がより少ないことが明かとなった。また、ガラス板や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これら修飾ヘモグロビンの影響が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。上記の研究遂行に、ヒューマンサイエンス振興財団平成11年度外国人研究者招へい事業により招へいしたハイデルベルグ大学準教授トーマス・ノルト博士との共同研究が有用であった。

I 酸素運搬機能を有する人工赤血球の血小板活性化作用の評価

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-セレクトリンに注目し、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を検出する) を用いた。凝集素には ADP とコラーゲンを用いた。
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-セレクトリンを、FITC 蛍光標識した抗 P-セレクトリン抗体とフローサイトメトリーを用いて直接的に活性化血小板を測定した。PAC-1 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 (図 1)。
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 (図 2)。

D. 考察

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

II 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って得られた効果(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応用する場合の問題、(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。