

厚生科学研究費補助金

高度先端医療研究事業

臨床応用可能な人工赤血球の創製に関する研究

平成 12年度 総括研究報告書

主任研究者 土田 英俊

(早稲田大学大学院 理工学研究科)

平成 13 (2001) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書	1
「臨床応用可能な人工赤血球の創製に関する研究」 土田 英俊（早稲田大学 大学院 理工学研究科 教授）	
II. 分担研究報告書	
1. 土田 英俊（早稲田大学大学院 理工学研究科 教授）	5
2. 池田 久實（北海道赤十字血液センター 所長）	22
3. 小林 紘一（慶應義塾大学 医学部呼吸器外科 教授）	29
4. 末松 誠（慶應義塾大学 医学部医化学 教授）	36
5. 高折 益彦（岡山県赤十字血液センター 技術顧問）	41
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	43
IV. 研究成果の刊行物・別冊	48

総括研究報告書

臨床応用可能な人工赤血球の創製に関する研究

主任研究者 土田 英俊 早稲田大学大学院 理工学研究科 教授

研究要旨 本研究は、第1期厚生科研で確立された成果を基礎として、体内への必要充分量の酸素運搬と高い安全度を有する、臨床応用可能な人工赤血球の創製を目標とする。このため品質と安全が保証できる製造法の確立、物性と機能の規格を明確にすると共に、動物実験による厳密な評価を得て、臨床応用に適合する人工赤血球として完成させる。

第2期初年度(平成12年度)に得られた研究成果は、①細胞型ヘモグロビン(Hb)小胞体の調製において脂質水和法の工夫による高効率造粒法を確立、②安価に簡便合成でき、しかも血液適合性の高い新規な負電荷脂質とPEG脂質を合成、③メトHbの光還元法による酸素配位能の還元法を確立、④Hb小胞体が血液生化学的検査に及ぼす阻害作用の有無とその回避法を提案、⑤Hb小胞体が血小板や補体活性化に殆ど影響を与えないことを確認、⑥Hb小胞体の血漿凝固活性への影響を明示、⑦Hb溶液の加熱とDMMB光処理によるウイルス光不活化法を確立、⑧細網内皮系でHb小胞体が支障無く代謝されることを確認、⑨Hb小胞体投与時に肺微小循環動態に著変が無いことを確認、⑩ショック状態の肝臓ではヘムオキシゲナーゼ活性が亢進しており、非細胞型Hbの投与は内因性COの消去、ビリルビン過剰生成と胆汁分泌機能の低下をもたらしたが、細胞型Hb小胞体ではこれが抑制されたことを確認、⑪一酸化窒素を配位するリコンビナントアルブミン-ヘム(rHSA-FeP)投与後に血圧亢進が起らないことを見出した、⑫新規ポルフィリン誘導体の合成と酸素錯体寿命延長を実現、⑬人工酸素運搬体投与により腫瘍酸素分圧の向上に成功、⑭人工赤血球開発への前臨床研究、治験計画作成の準備に着手、である。

「臨床応用可能な人工赤血球の創製」に向け、十分な有効性と安全度を示すことができた。今後はヒトHb小胞体の完成度を、品質、製造価格、効果、安全性の観点から更に高めると共に、適応拡大に向けた基礎研究を展開する。全合成系についても製造工程の確立と先行する前者に追随して、性能と安全度の再確認とデータ集積を期待する。また臨床試験プロトコール並びに各種ガイドラインを完成させ、臨床試験への円滑な移行を期待する。

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 教授
高折 益彦 岡山赤十字血液センター 技術顧問

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、臨床応用可能な人工赤血球を創製する。

A. 研究目的

ヘモグロビン(Hb)小胞体 と 全合成系のリコンビナントアルブミン-ヘム(rHSA-FeP)複合体を対象に、

平成12年度の研究項目としては、Hb小胞体の調製における脂質水和法の検討 / 新規負電荷脂質の合成とHb小胞体の特徴 / 新規PEG脂質の合成と、凝集抑制機能の検討 / メトHbの光還元と、酸素配位能

の還元 / Hb小胞体の血液生化学的検査の阻害作用とその回避法 / rHSA-FePの一酸化窒素配位能 / 酸素錯体の安定度向上を目指した新規ポルフィリン誘導体の合成と酸素錯体寿命 / Hb小胞体の血小板放出能に対する影響 / Hb小胞体の補体活性に対する予備検討 / Hb小胞体の血漿凝固活性への影響 / Hb溶液の加熱処理によるウィルス不活化 / Hb溶液中のウィルス光不活化と抗酸化物質の影響 / 細網内皮系におけるHb小胞体の代謝過程 / 人工赤血球投与時の肺微小循環動態に関する研究 / rHSA-FeP投与後の血圧変化 / 人工赤血球の抗腫瘍効果増強作用に関する研究 / 非細胞型Hb・細胞型Hb小胞体の網内系での代謝と臓器機能恒常性に及ぼす影響の検討 / 人工赤血球開発への前臨床研究、治験計画作製に関する研究 / 以上である。

B. 研究方法

新しい脂質処理法として、DPPC/cholesterol/DPPG/PEG (5,000)-DSPEのベンゼン溶液から凍結乾燥して混合脂質粉末を調製。水和後、凍結融解を繰り返して、最後に凍結乾燥粉末とした。これにHb溶液を加え攪拌後、Extrusion法における膜透過性を評価した。 / グルタミン酸を出発物質として1,5-dipalmitoyl-L-glutamate-N-succinic acid (DPEA)を合成。これを含む混合脂質粉末を凍結融解・凍結乾燥法で調製し、常法によりHb小胞体を調製した。また、300mLスケールでHb小胞体の量調製を行った。 / 同様にグルタミン酸から新規PEG脂質を合成し小胞体表面を修飾、分子量の異なるPEG水溶液を添加して、小胞体凝集を生起するPEGの分子量（臨界分子量）を測定した。 / フラビンモノヌクレオチド (FMN)溶液をメトHb溶液に添加、450nm付近の光照射にて光還元を実施した。高濃度オキシHb溶液にMet/FMNを添加してHb小胞体を調製、自動酸化によるメト化の後、光還元を試みた。 / 血液生化学検査の検体として、ヒト血清に精製Hb、Hb小胞体、或いは生理食塩水を混合。またHb小胞体混合試料については、超遠心分離後の上清液を回収して検体とし、血液生化学検査を行った。 / rHSA-FeP水溶液中へNOを通気し、可視吸収スペクトルとESRスペクトル測定からニトロシルヘム錯体の配位構造を解明した。NO結合パラメータをレーザーフラッシュホトリシス法により決定した。 / ポルフィリン誘導体8種を合成し、

各々をrHSAに包接させた複合体のO₂及びCOの結合パラメータを測定した。

血小板浮遊液とHb小胞体を混合、上清を採取し、ELISAにてCRANTESレベルを測定した。また、CD62 PE標識抗体またはcontrol IgG PE標識抗体で染色し、フローサイトメトリーにてp-selectinの発現率を測定した。 / 補体活性化の指標としてTerminal Complement Complexを測定した。 / ヒト血清をHbVと混和し、遠心上清のSC5b-9レベルを測定した。 / 血漿とHb小胞体を混合し、血液凝固時間を測定した。 / 洗浄赤血球を溶血し、vesicular stomatitis virus (VSV)を添加。60℃にて1時間加熱処理を行い、VSV感染価を求めた。 / ストロマフリー溶液にVSV, HIVとジメチルメチレンブルー (DMMB)を添加し、発光ダイオード照射装置中で光不活化を行った。

Wistar ratに麻酔下尾静脈よりHb小胞体を投与後、犠牲死させ臓器を摘出、電子顕微鏡写真を撮影した。またHbの代謝過程で産生される鉄はベルリンブルー染色を、また脂質の蓄積の有無は、oil O red染色により確認した。 / Sprague-Dawleyラット胸壁にウィンドウチャンバーを固定し、肺微小循環をレーザー共焦点顕微鏡にて観察、FITCアルブミンで血漿部分を標識し血管径を測定した。Hb小胞体やHbO₂を静注し、心拍数や細小肺動脈径を計測した。 / Wistar ratに麻酔下 rHSA-FePを静注し、平均体血圧、心拍数を測定し、Hb溶液の投与と比較した。 / Ascites hepatoma LY80をDonryu rat大腿に移植し、内頸動脈よりカテーテルを総腸骨動脈分岐部に留置して人工酸素運搬体を動注投与し、腫瘍酸素分圧を燐光減衰時間から測定した。

Wistar ratに内毒素を腹腔内投与した後、分離灌流肝モデルを作製。門脈からHb, metHb, Hb小胞体を投与し15分間灌流(終濃度1.5g/dL)し、更に灌流を続行した。肝臓に取り込まれたHbやmetHbの分解は胆汁中ビリルビンのELISAによる定量にて、Heme oxygenase-1, inducible NO synthaseの発現はWestern blotting analysisより行った。

各分担研究者の研究計画の実現性、有効性を検討し、追加検討すべき項目を指摘し、可能な限り広範な領域の検討を行った。 / 将来的に臨床治験の可能

性のある全国の研究機関に調査表を配布。可能性の高い施設に訪問して現在までの研究進捗状況を説明した。／諸外国での臨床プロトコルを参考に独自の臨床治験計画を作成した。

C. 研究結果および考察

Hb小胞体の効率高い製造法として、予め前調製した小胞体の凍結乾燥粉末を用いて造粒の所要時間を飛躍的に短縮できた。多段式造粒装置を新規に設計し、数十LのHb小胞体分散液を短時間で収率高く処理できる目途が立った。／Hb小胞体の脂質二分子膜成分の負電荷リン脂質を簡便で高収率に合成できるカルボン酸型脂質に代替し、従来と同等の物性を有するHb小胞体を得られた。しかも血小板凝集や白血球活性化を全く認めない。／Hb小胞体の表面修飾剤として、これまでリン脂質(DSPE)結合型PEG脂質を使用してきたが、安価に量合成できるグルタミン酸結合型PEG脂質での代替を検討した。従来と同等の凝集抑制能が確認された。／可視光照射によるメトHbの非酵素的還元を目的として、酸化型フラビンにて高い量子収率($F = 0.12$)で還元させる条件を見出した。これによりメト化したHb小胞体の酸素結合解離機能を復元できた。／血清中に存在するHb小胞体が、その濁度や吸収などのために血液生化学検査の項目によっては測定誤差が生じる。測定前の超遠心分離操作により、殆ど全ての測定項目で阻害作用を解消できた。／rHSA-FeP複合体の6配位ニトロシル錯体形成を可視吸収スペクトルとESRより確認した。NO親和性はHbより9倍高いが、血管収縮作用は無い。／rHSA-FeP複合体の酸素錯体寿命の延長を検討。軸塩基としてヒスチジン、酸素配位座近傍の置換基としてシクロヘキサノイル基を導入したヘムで半減期が生理条件下で25hrと、従来の12倍も長く、極めて安定な酸素錯体を得られた。

Hb小胞体の負電荷脂質成分を改良したDPEA-HbVの血液成分との適合性について検討した。血小板の場合、混合率が増えるに従い、RANTESの自発的放出量が減少した。しかし、コラーゲン刺激によるRANTES放出にはDPEA-HbVの影響はみられなかった。補体に関しては、コントロールに比べ2-10倍程度のSC5b-9複合体形成がみられた。また、凝固活性については、プロトロンビン時間(PT)は混合比率が上昇するにつれ遅延する傾向がみられ、生理的食塩水の場合と相違は無かった。DPEA-HbVは活性化

部分トロンボプラスチン時間(APTT)においてコントロールと同程度の遅延をもたらした。しかし、DPPG-HbVは凝固を促進しAPTTを短縮した。／ウイルス不活化処理として期限切れヒト赤血球由来Hb溶液を加熱処理(60℃、1時間)した。空気及び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。しかし、空気雰囲気下では顕著なHbの酸化が起こった。一方、CO雰囲気下ではメトHb含量に大きな変化はみられなかった。／ジメチルメチレンブルー(DMMB)を用いた光処理によりSFHのウイルス不活化処理を行った。VSVが $3.3 \log_{10}$ 不活化された条件で、HIVは $3.7 \log_{10}$ 不活化された。VSVを $6.1 \log_{10}$ 不活化する条件で、SFH中のSOD、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼは95%以上の活性を維持しており、還元型グルタチオンも97%維持されていた。しかし、グルタチオンレダクターゼ活性は処理前の25%にまで低下した。メチレンブルー光処理でも同様な結果が得られた。

Hb小胞体投与1日後の肝・脾の電顕写真から、Kupffer細胞、マクロファージ食胞内に捕捉された小胞体構造が認められたが、1週間後には完全に消失していた。また遊離鉄や脂質沈着が1週間後に僅かに認められるものの、2週間後には完全に消失、Hb小胞体は速やかに代謝されることが明らかになった。／肺微小循環への影響をレーザー共焦点顕微鏡にてラットを用いて観測し、Hb小胞体の投与では肺循環に明らかな変化を惹起しないことが確認された。／rHSA-FeP複合体のNO親和性はHbより9倍高い。しかしラットに静注しても、血圧と心拍数の変化は観測されなかった。Hbと比較して等電点が負に大きいアルブミンの低い血管壁透過性に拠るものと考えられる。／人工酸素運搬体が各種がん治療の抗腫瘍効果増強に応用できるかどうかを検討、ラット移植腫瘍モデルに、酸素飽和した人工酸素運搬体を投与したところ、腫瘍内酸素分圧の上昇が認められた。

肝臓はHbを利用する人工赤血球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り本来メト化したHbの代謝に適した臓器デザインが明らかになった。人工赤血球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るため非細胞型Hbの

投与は内因性COを消去しビリルビンの過剰生成と胆汁分泌機能の低下が招来した。他方、細胞型Hb小胞体にはこのような作用を認めず、高い安全性が支持された。

研究班会議において、各分担研究者の研究計画を聴取、検討し、具体的な実施案の提言を行った。また全国関係施設への研究参加の可能性を検討した。さらにまた実施可能な治験計画案の作製を実施した。

D. 結論

細胞型のHb小胞体に関しては、原料Hbの効率高いウイルス不活化と小胞体造粒法の確立、安価な合成脂質への代替が可能となった。また、*in vivo*, *in vitro*試験からHb小胞体の血液適合性、代謝過程、微小循環動態の詳細研究から安全度が確認できた。他方、全合成のアルブミン-ヘム複合体に関しては、血圧亢進が起らない特徴が明らかとなり、分子設計と精密合成から酸素錯体寿命の更なる延長ができた。腫瘍組織酸素化に人工赤血球が有効であることも明らかになるなど、人工赤血球の新たな適用例の開発もできた。

量産工程の効率を更に向上させ、得られる試料の効力と安全度の確認を実施し、臨床試験プロトコール並びに各種ガイドラインを完成させて、臨床試験への円滑な移行を期待する。

1. ヘモグロビン小胞体の調製における脂質水和法の検討
2. 新規負電荷脂質の合成と、ヘモグロビン小胞体の特徴
3. 新規PEG脂質の合成と、凝集抑制機能の検討
4. メトヘモグロビンの光還元と、酸素配位能の復元
5. ヘモグロビン小胞体の血液生化学的検査の阻害作用と その回避法
6. リコンビナントアルブミン-ヘムの一酸化窒素配位能
7. 酸素錯体の安定度向上を目指した新規ポルフィリン誘導体の合成

主任研究者	土田 英俊	早稲田大学 大学院 理工学研究科	教授
研究協力者	武岡 真司	早稲田大学 大学院 理工学研究科	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
	宗 慶太郎	早稲田大学 理工総研	助手

研究要旨 細胞型のヘモグロビン(Hb)小胞体の製造法の検討として、予め前調製した小胞体の凍結乾燥粉末を用いることで造粒の所要時間を飛躍的に短縮できた。多段式造粒装置を新規に設計し、数十～数百LのHb小胞体分散液を短時間で収率高く処理できる目途が立った。 /

Hb小胞体の脂質二分子膜成分の負電荷リン脂質を簡便で収率高く合成できるカルボン酸型脂質に代替し、従来と同等の物性を有するHb小胞体を得られた。しかも血小板凝集や白血球活性化を全く認めない。 / Hb小胞体の表面修飾剤として、これまでリン脂質 (DSPE) 結合型PEG脂質を使用してきたが、安価に量合成できるグルタミン酸結合型PEG脂質での代替を検討した。従来と同等の凝集抑制能が確認された。 / 可視光照射によりメトヘモグロビンを非酵素的に還元させて酸素配位能を復元させることを目的として、酸化型フラビンの利用により高い量子収率($\Phi = 0.12$)で還元できる条件を見出した。これによりメト化したHb小胞体の酸素結合解離機能を復元できた。 / 血清中に存在するHb小胞体が、その濁度や吸収などのために血液生化学検査の項目によっては測定誤差が生じる。測定前の超遠心分離操作により、殆ど全ての測定項目で阻害作用を消失できた。 / 組替えヒト血清アルブミン(rHSA)に合成ヘム(FeP)を包接させたrHSA-FeP複合体の6配位ニトロシル(NO)錯体形成を可視吸収スペクトルとESRより確認した。NO親和性はHbより9倍高いが、血管収縮作用は無い。 / rHSA-FeP複合体の酸素錯体寿命の延長を検討。軸塩基としてヒスチジン、酸素配位座近傍の置換基としてシクロヘキサノイル基を導入したヘム(FecycP(His))系で半減期が生理条件下で25hrとなり、FepivP(Im)の12倍も長く、極めて安定な酸素錯体を得られた。

1. ヘモグロビン小胞体の調製における脂質水和法の検討

A. 研究目的

添加物を必要とせず、粒子径の揃った均一規格のヘモグロビン (Hb) 小胞体の調製には、均一細孔を有するフィルターを高圧で押し出すエクストルー

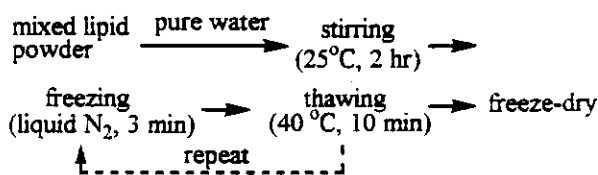
ジョン法が最も優れている。しかし、高濃度Hb溶液中では未水和脂質の残存や小胞体の凝集によるフィルターの目詰まりが課題であった。本研究では、エクストルージョン処理時間短縮、単位面積当りの処理量増大、収率向上を目的とし、脂質水和法について検討した。混合脂質粉末を予め水中で分子集合させ、凍結融解により粒子径と被覆層数を制御した

空小胞体を調製(前調製)した後、凍結乾燥させた粉末をHb溶液に再分散させ、エクストルージョン法により粒子径の制御とHbの内包を同時に行う方法を考案した。

B. 研究方法

1) 凍結融解・凍結乾燥前処理法

DPPC / cholesterol / DPPG / PEG (5,000)-DSPEを、5/5/1/0.033 のモル比でベンゼンに溶解させ (5 g/dL)、凍結乾燥して混合脂質粉末を調製した。今回検討した凍結融解・凍結乾燥前処理法をScheme 1に示す。凍結融解の条件は凍結(液体窒素中で3分静置)と融解(40℃の水浴中で10分静置)を繰り返した。



Scheme 1 Freeze-thaw/freeze-dry pretreatment method of the mixed lipid to prepare the HbV.

2) フィルター透過性

凍結融解した小胞体分散液を凍結乾燥した後、Hb溶液5 mL (35g/dL)で水和(25℃、2時間攪拌)し、これをEXTRUDER®(日油リポソーム製)に加え、加圧(20kg/cm²)しながら14℃で孔径3.0、0.8、0.65、0.45、0.30、0.22μmのアセチルセルロースフィルター(富士フィルム製)を順次透過させた。フィルター透過性は、透過液を目盛り付きシリンダーに受け、液面上昇速度をビデオ撮影し評価した。

C. 研究結果および考察

1) 凍結融解による前処理

混合脂質粉末を純水に分散させると粒子径1μmの多重層小胞体が形成される。この小胞体の粒径は凍結融解の繰返しにより減少し、3回で550 nm程度になった(Fig. 1)、更に凍結融解を繰り返しても粒子径は殆ど変化しないが、粒子径50 nmの小胞体の生成が認められた。エクストルージョンによる目的粒径が250 nmであるので、前調製時の粒子径が

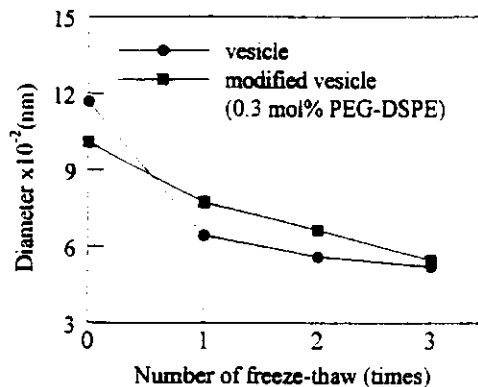


Fig. 1 Influence of the number of the freeze-thaw cycles on the diameter of the vesicles.

250nmより小さいと、フィルターを素通りして、Hb未内包小胞体の生成の原因となる。従って凍結融解回数は3回が最適であると考えられる。

2) フィルター透過性および内包効率の評価

予め水相中で小胞体分散液を凍結融解した後凍結乾燥させた粉末は、親水部を外に向けた小胞体構造

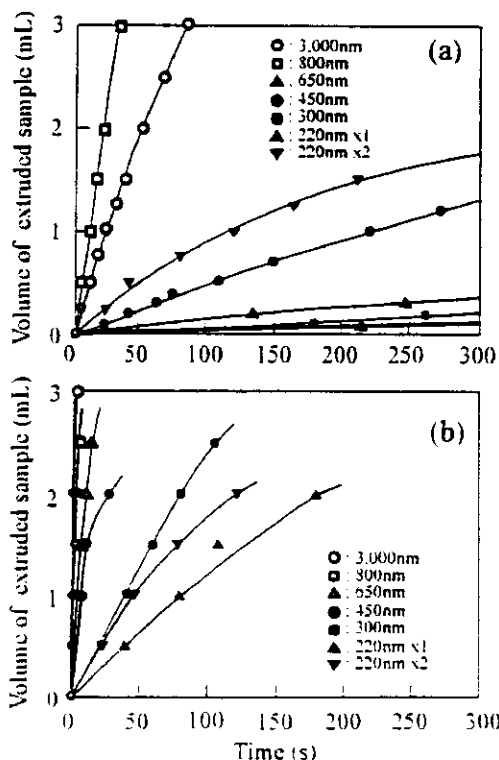


Fig. 2 Permeation profiles of the extrusion for HbV dispersions. (a) conventional method, (b) freeze-thaw/freeze dry pretreatment method

を保持しているため、高濃度のHb溶液へ比較的容易に再分散できた。粒子径は殆ど変化していないことから、凍結乾燥前の状態が保持されているものと推察される。

造粒時のフィルター透過では、従来法(水和攪拌のみ)と比較して全処理時間を27倍以上短縮できた (Fig. 2)。これは、前調製した空小胞体(550 nm程度)の凍結乾燥粉末とPEG修飾による小胞体の凝集抑制のためと考えられる。Hbの内包効率の指標となるHb/lipid重量比は1.6であり、従来法の1.7と同等の値が得られた。

D. 結論

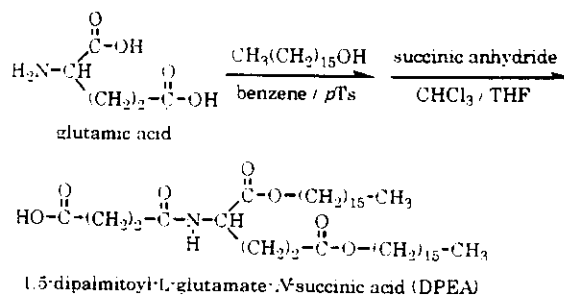
予め前調製した小胞体の凍結乾燥粉末を用いることでエクストルージョンに要する時間を飛躍的に短縮できた。また、フィルター単位面積当りの処理量が向上したため、収率も向上した。多段式(10段)にフィルターを設置した造粒装置の試作機にて評価を行ったところ、フィルター面積の増大に比例した処理液量の増大が確認され、数十~数百LのHb小胞体分散液を短時間で収率高く処理できる。

2. 新規負電荷脂質の合成 と ヘモグロビン小胞体の特徴

A. 研究目的

Hb小胞体の脂質成分として所定量の負電荷脂質を導入した場合、Hb小胞体表面の電荷密度や水和状態の調節、多重層小胞体の二分子膜間電荷反発による層数の制御、小胞体間の凝集抑制が可能となる。また、血中に投与した場合、血漿蛋白質、血球成分などとの相互作用の調節ができる。Hb小胞体の成分として従来ホスファチジルグリセロールを利用してきたが、一過性の血小板の凝集やそれによる血小板減少、或いは白血球の機能への影響などが明らかとなっている。

本研究では、簡便に合成できるカルボン酸型脂質をHb小胞体の負電荷成分として利用し、負電荷の効果を持続したまま、負電荷リン脂質に認められる影響の回避を目的とした。



Scheme 2 Synthesis of the 1,5-dipalmitoyl-L-glutamate -N-succinic acid

B. 研究方法

1) 負電荷脂質の合成

合成は以下のScheme 2に従い、グルタミン酸を出発物質として行った。

2) DPEA含有Hb小胞体の調製

Hb小胞体の脂質成分としてDPPC/cholesterol, DPEA/PEG-DSPEを、5/5/1/0.033のモル比で混合し、凍結融解・凍結乾燥法でHb小胞体を調製した。粒子径およびHb内包効率から負電荷脂質としての利用の可能性を検討した。また、300 mLスケールでHb小胞体の量調製を行った。

C. 研究結果および考察

1) DPEAの合成

グルタミン酸を利用して2本のアシル鎖を有するカルボン酸型脂質を設計、合成した。グルタミン酸の二つのカルボキシル基にp-トルエンスルホン酸を触媒としてヘキサデシルアルコールをエステル結合させた後、アミノ基に無水コハク酸をアミド結合させ、1,5-dipalmitoyl-L-glutamate-N-succinic acid (DPEA)を高収率(92%)で簡便に合成できた。構造はMS、IR、¹H-NMRにより同定した (Table1)。DPEAは有機溶媒に易溶であり、リン脂質やコレステロールとの均一混合体が容易に得られるため、リン脂質小胞体の負電荷成分として利用

Table 1 Characterization of DPEA.

yield (%)	MS	IR (cm ⁻¹)	¹ H-NMR	δ (ppm) ¹⁾
92	696.5	1735 (ν _{C=O} , ester)	0.88 (t, 6H, -CH ₃)	1.25 (s, 52H, -CH ₂ -)
	(calcd)	1699 (ν _{C=O} , acid)	2.40 (br, 2H, -CH ₂ CONH-)	4.06, 4.14 (t, 4H, -COOCH ₂ -)
	696.5	1643 (ν _{C=O} , amide)	4.60 (br, 1H, -CONHCH ₂ -)	5.56 (d, 1H, -CONH-)
	(found)			

1) solvent : CDCl₃, TMS standard

Table 2 The relationship between [Hb]/[lipid] and molar ratio of DPEA.

[DPEA] (mol%)	0	1.0	1.5	2.0
[Hb]/[lipid] (-)	0.7	1.6	1.5	1.5

できる。

2) DPEA含有Hb小胞体の調製

合成したDPEA（総脂質に対して0～17%）を導入したHb小胞体を1. に記載の方法により調製した。混合脂質(DPPC/cholesterol/DPEA=5/5/1)から凍結融解・乾燥前処理法により33 g/dLのHb溶液に分散(14℃, 5hr)した後、エクストルージョンによる造粒を3バッチ行ったところ、Hb/Lipid比は全て1.6であり、本法は再現性良く同一規格のHb小胞体を得られる方法であることを確認した。DPEAのモル比を変えて調製(25℃, 2hr水和攪拌)したヘモグロビン小胞体のHb/Lipid比は、DPEAを含有していない場合は0.7であり、DPEAのモル比を変化させても1.5～1.6の範囲に留まった (Table 2)。DPEAを少なくとも9 mol%以上導入すれば、Hb小胞体造粒時の被覆層数の減少に有効であり、Hb/Lipid比が向上することが明らかになった。

3) 凍結融解・乾燥前処理法によるDPEA含有Hb小

Table 3 Profiles of HbV sizing and stepwise extrusion using filter with different pore size.

Pore size (nm)	Particle Diameter (nm)	Yield of volume (%)	Limitation of volume (L/m ²)
Before			
extusion	601 ± 160	-	-
3,000	398 ± 100	96	> 37
650	304 ± 42	95	15
450	307 ± 37	98	>37
300	301 ± 46	100	> 64
220×1	263 ± 61	98	> 37
220×2	273 ± 65	100	> 64
220×3	257 ± 68	100	> 64

胞体の量調製

凍結融解・乾燥前処理法を用いてHb小胞体（脂質成分；DPPC/cholesterol/DPEA=5/5/1, PEG脂質；0.3 mol%）を量調製(300 mL)した。フィルター孔径650nmでの限界透過量が15(L/m²)（従来法での最小値は8.6(L/m²)), それ以外のフィルターでは37(L/m²)以上であった(Table 3)。従来法と比較して、孔径800 nm のフィルターを省略でき、またフィルター単位面積当たりの限界透過量を2倍向上出来たので、使用フィルター枚数を半分に削減できた。透過速度は5×10² (L/hr/m²) 以上であった。これは、エクストルージョンを用いた小スケール(総溶液量5 mL)実験(3×10² (L/hr/m²))とほぼ一致し、再現性があることが分かった。小胞体の粒径は、従来系と同様に260 ± 67 nm制御できた。

D 結論

Hb小胞体の負電荷成分を負電荷リン脂質から簡便、高収率で合成できるカルボン酸型脂質に代替できることが明らかになった。これにより、Hb小胞体調製時に必要な負電荷効果を保持させたまま、負電荷リン脂質が惹起する血小板凝集や白血球活性化などの副作用を回避できる。現在、kgスケールでの量合成も完了しており、Hb小胞体の原料として利用できる。

3. 新規PEG脂質の合成 と 凝集抑制機能

A. 研究目的

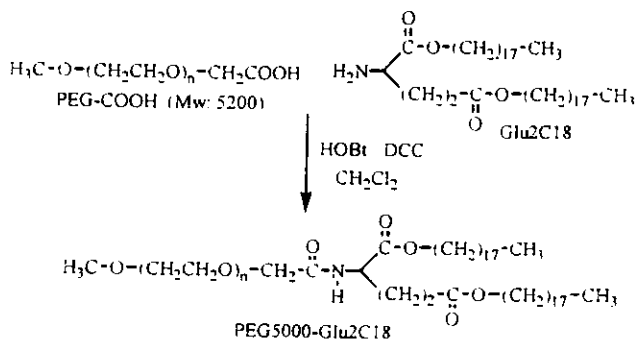
ポリエチレングリコール (PEG) 鎖で表面修飾したリン脂質小胞体は高い分散安定度を有し、投与時の良好な微小循環動態や血中滞留時間の延長などの効果が確認されている。

現在までジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE) の頭部にPEG鎖を結合させたPEG-DSPEを使用してきたが、安価に量合成できるPEG脂質への代替を目的としている。

B. 研究方法

1) PEG脂質の合成

PEG脂質の合成はScheme 3に従って行った。



Scheme 3 Synthesis of the PEG-lipid

2) 臨界分子量による凝集抑制効果の検討

小胞体分散液 (0.08wt%, 2mL) に分子量の異なるPEG水溶液 (15wt%, 500 μL) を添加して、溶液濁度 (600nm) が急激に増大するPEGの分子量 [臨界分子量 (M_c)] を測定した。

C. 研究結果および考察

1) 合成

疎水部のGlu2C18は前述のDPEAと同様の方法で合成した。分子量の大きなPEGを二分子膜に安定に固定するため、アシル鎖はステアロイル基とした。本PEG脂質は1ステップで簡便に合成でき、収率は78%と高く、カラム精製を必要としないため量合成が可能である。構造はIR、 $^1\text{H-NMR}$ より同定した (Table 4)。

Table 4 Characterization of PEG5000-Glu2C18.

yield (%)	IR (cm^{-1})	$^1\text{H-NMR}$ δ (ppm) ¹⁾
78	1736 ($\nu_{\text{C}=\text{O}}$, ester) 1685 ($\nu_{\text{C}=\text{O}}$, amide)	0.88 (t, 6H, $-\text{CH}_3$)
		1.25 (s, 60H, $-\text{CH}_2-$)
		3.38 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}-\text{O}-$)
		3.64 (PEG)
		4.65 (br, 1H, $-\text{CONHCH}-$)

1) solvent: CDCl_3 , TMS standard

Table 5 The M_c s of the water soluble polymer for the aggregation of the vesicles unmodified or modified with PEG-lipids.

sample	M_c
vesicle	1,570
vesicle with PEG-DSPE	15,000
vesicle with PEG-Glu2C18	14,400

2) 凝集抑制機能

リン脂質小胞体は水溶性高分子添加により凝集するが、添加高分子には凝集の下限臨界分子量 (M_c) が存在する。小胞体の分散安定度が高い程 M_c が大きくなるため、PEG脂質による凝集抑制機能の定量解析の指標となる。表面をPEGで修飾していない小胞体の M_c は1,570であるが、従来用いていたPEG-DSPE (総脂質に対して0.3 mol%) で表面修飾した場合、 M_c は15,000に増大する。同量のPEG-Glu2C18で表面修飾した場合の M_c は14,400であり、PEG-DSPEと同等の凝集抑制機能が明らかになった (Table 5)。

D. 結論

リン脂質小胞体の表面修飾に広く使用されているPEG-DSPEと同等の凝集抑制機能を有し、安価に簡便合成できるPEG脂質を得た。Hb小胞体の原料として、各種生化学検査や *in vivo* 評価を行う予定である。

4. メトヘモグロビンの光還元と酸素配位機能の復元

A. 研究目的

ヘモグロビン(Hb)はFe(II)の時に酸素を可逆的に結合するが、自動酸化により次第にFe(III)のメトヘモグロビン(metHb)となり酸素配位能を失う。そこで光照射によりmetHbを非酵素的に還元させる条件を見出し、メト化したヘモグロビン小胞体(metHbV)の酸素配位能の復元法を確立することを目的としている。酸化型フラビン(FMN)を犠牲試薬と共にmetHbに添加し、400 - 450 nm付近の可視光を照射すると還元型FMNH₂が生成し、これがmetHbを還元する現象が知られている(Yubisui et al., *J. Biol. Chem.* 255, 11694 (1980))。そこで平成12年度には、FMNを利用した可視光照射による高量子収率の光還元機構を解析して最適条件を見出し、ヘモグロビン小胞体(HbV)への導入を検討した。

B. 研究方法

FMN溶液を石英セルに注入し、450nm付近(超高圧水銀ランプ、L-42/HA-50フィルタ使用)の照射にて光還元を実施した。FMNの λ_{max} (445nm)の吸光度減少から、還元型フラビン(FMNH₂)の生起を、metHb還元速度はQ帯のスペクトル変化から追跡した。また、トリオキサライト鉄(III)カリウム(K₃[Fe(C₂O₄)₃]*3H₂O)を用いた化学光量計により、metHb溶液の吸収光子数を測定し、生成した還元体の分子数との比から量子収率(F)を決定した。更に、Native-PAGE電気泳動、等電点電気泳動(IEF)により還元前後でのHbの構造変化を確認。また、濃厚オキシ型Hb溶液にMet/FMNを添加し、常法によりHb小胞体を調製、自動酸化によりメト化させた後、照射によって還元を試みた。

C. 研究結果および考察

1) 犠牲試薬の検討

各種犠牲試薬(20 mM)をFMN(100 mM)溶液に添加して、FMNの光還元を行った。犠牲試薬としてメチオニン(Met)、アルギニン(Arg)、フェニルアラニン(Phe)を用いた場合は4分以内に還元反応が終了した。また、37℃、大気下で反応させたところ、Met以外のアミノ酸は犠牲試薬としての効果を失活してまう一方で、Metは高い化学的安定性を示し3日経っても効果を失わなかった。さらに、Metの酸化体がHbのグロビン鎖と反応性がないためMetを犠牲試薬として選択した。

そこでmetHb(100mM)/Met(20mM)としてmetHbの光還元におけるFMN濃度依存性について検

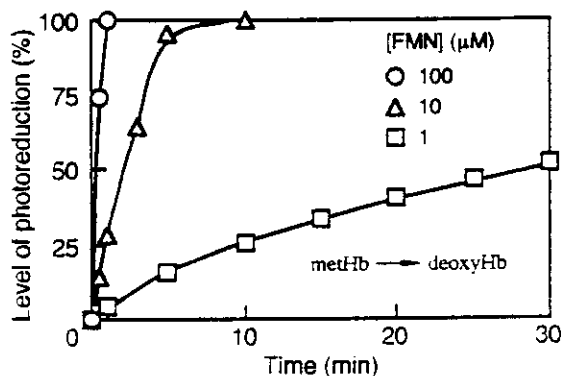


Fig. 3 Dependence of FMN concentration on photoreduction of metHb(100 μM) with Met(20 mM) in PBS at pH7.4 by irradiation at 450 nm in N₂.

討した(Fig. 3)。FMN濃度が1mMでは30分でも50%程度しか還元されなかったが、10mMでは約10分、100 mMでは約1分で還元反応が終了した。metHb(100 mM)/FMN(10 mM)としてmetHbの光還元におけるMet濃度依存性は(Fig. 4)、Met濃度が0.2 mMでは30分で約70%程度しか還元されなかったが、2 mMでは約20分、20 mMでは約10分で還元反応が終了した。しかし、Met無添加系でもmetHbが還元されたことからグロビンからの電子供与も考えられる。

3) 酸素分圧の依存性

HbV投与後の血漿中Hb濃度を想定し、高濃度のmetHb(5 g/dL)を光路長2 mmの石英セルに入れ、FMN/Metを添加し光還元を酸素共存下検討した(Fig. 5)。酸素分圧が0 Torrでは30分で約90%が還元された。酸素分圧が38 Torr(静脈血に相当)、149 Torr(大気圧に相当)の場合も遅くはなるが、40分で90%の還元が進行した。N帯励起による光還元では酸素共存下では不可能であったが、FMN添加系の光還元ではこれが可能になった。しかし、149Torrでは60分以降metHbが増大した。これはFMNH₂が酸素と反応すると活性酸素を生成するため、これにより一部メト化が生じるためと考えられる。さらに、光路長を短くすることで所要時間は短縮されるものと期待される。

4) 光還元の量子収率

FMN添加系では、Ar雰囲気下でFMNを10 mM添加したところ量子収率は0.05であったが、これにMetを20 mM添加することによって0.12まで上昇し

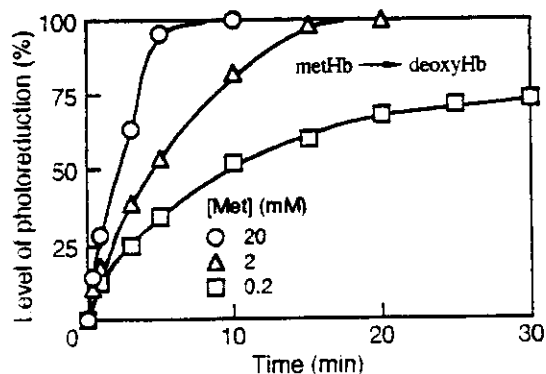


Fig. 4 Dependence of Met concentration on photoreduction of metHb(100 μM) with FMN(10 μM) in PBS at pH7.4 by irradiation at 450 nm in N₂.

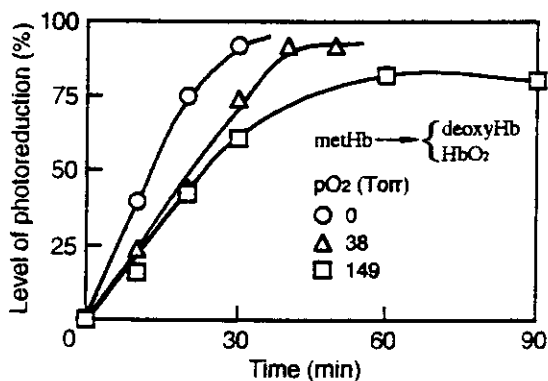


Fig. 5 Dependence of pO₂ on photoreduction of metHb (3.1 mM) with FMN(1 mM) and Met(20 mM) in PBS at pH7.4 by irradiation at 450 nm in 2 mm quartz cuvette.

た(Table 6)。他方、従来報告のUV-A領域のN帯励起による光還元での最大の量子収率は0.006であった。また、過渡吸収スペクトルでは光照射後30 ns以内にmetHbの還元の進行が確認された。これは既知の反応速度($5.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)よりも6桁速いことになる。

5) 光還元Hbの構造と機能の確認

metHbをFMN/Met存在下で光還元した還元体のIEFでは、等電点の変化を示さず、またNative-PAGE電気泳動でも分子量に変化が無く、Hb分子表面には反応の影響が見られなかった。また、光還元後のdeoxyHbに酸素を通気したところ速やかにoxyHbのスペクトルを示したことから、酸素配位能の復元が証明された(Fig. 6)。さらに、FMN(10 mM)/Met(100 mM)を内包させたHbVを調製し、これを自動酸化させてメト化率50%のmetHbV(10 mM)の光還元を実施した。約15分で完全に還元され(Fig. 7)、光還元後のdeoxyHbVに酸素を通気したところ速やかにoxyHbVのスペクトルを示した。

Table 6 Quantum yield (Φ) of the photoreduction of metHb measured with ferrioxalate actinometer.

composition	λ_{ex} (nm)	Φ
metHb(100 μM)/FMN(10 μM)/Met(20 mM) in Ar	450	0.12
metHb(100 μM)/FMN(10 μM) in Ar	450	0.05
metHb(10 μM)/Trp(1 mM) in Ar	365	0.006
metHb(10 μM)/mannitol(100 mM) in CO	365	0.006
metHb(10 μM) in CO	365	0.003

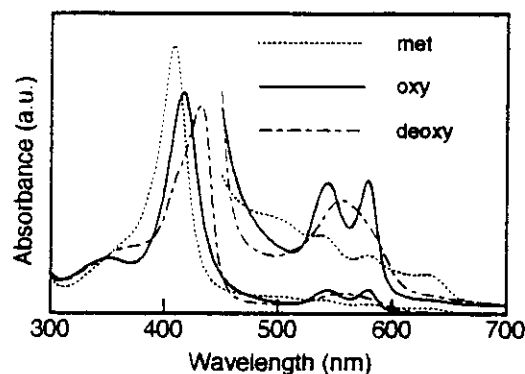


Fig. 6 UV/vis spectra of metHb, photoreduced deoxyHb with FMN(1 mM)/Met(20 mM), and its oxygenated form.

このことから、酸素輸液としてFMN/Metを内包させたHbVの効率的な還元法として、可視光照射による光還元が有効であることが示唆された。

D. 結論

メトヘモグロビンにFMNとMetを添加した系では、可視光による高い量子収率($\Phi = 0.12$)での光還元が可能になった。また大気圧下でも還元できる条件を見出した。さらにFMN/Metを内包したHb小胞体でも還元が進行し、酸素の結合解離能が復元できることを明らかにした。

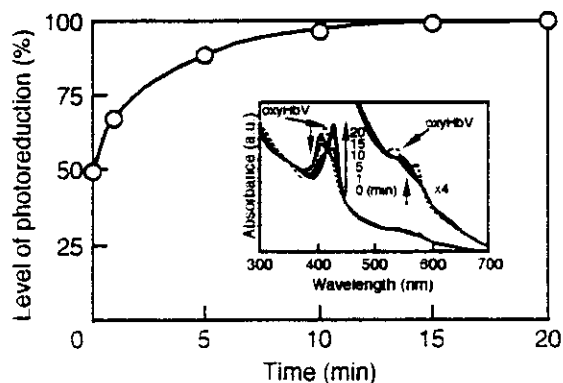


Fig. 7 Photoreduction of metHbV containing FMN (10mM)/Met(100 mM) in PBS at pH7.4 by irradiation at 450 nm in N₂. Inset: UV/vis spectral changes of metHbV containing FMN/Met.

5. ヘモグロビン小胞体の血液生化学的検査の阻害作用とその回避法

A. 研究目的

血液生化学検査は、病態を知る上で極めて重要であり、日常的に利用されている。非細胞型Hb溶液

の臨床試験において、血清中にHbが存在するために特に比色法や比濁法による測定値が実際の値からずれることが知られている。修飾Hbは血漿蛋白質と分子量が同等であるため除去が困難であり、具体的な対応策は考えられていない。一方、Hb小胞体でも同様に幾つかの項目で測定不能になる場合があ

Table 7 Summary of the influence of the presence of Hb or HbV on blood serum clinical chemistry and the effect of removal of HbV by ultracentrifugation to avoid the interference. Maximum deviations (md) in comparison with the control group are shown. "NG" indicates difficulty in accurate measurement. "Participation" indicates the contribution of the elements to the reaction.

Analyte	Method	Hb-mixed	HbV-mixed	HbV-mixed, -ultracentrifuged ^{h)}
1) Total protein	Colorimetric	NG (Participation)	NG (Participation)	md +11%
2) Albumin	Colorimetric	NG (Hb Abs.)	NG (Hb Abs.)	md +7%
3) Albumin/globulin ratio	Colorimetric	NG	NG	md ±8%
4) AST (GOT) ^{a)}	UV	NG (Hb Abs.)	NG (Hb Abs. · Turbid)	md +19%
5) ALT (GPT) ^{b)}	UV	md +20%	NG (Hb Abs. · Turbid)	md ±33%
6) LDH ^{c)}	UV	NG (Hb Abs.)	NG (Hb Abs.)	md +27%
7) ALP ^{d)}	Colorimetric	md -11%	NG (Hb Abs.)	md +8%
8) γ-GTP ^{e)}	Colorimetric	NG (Hb Abs.)	md -23%	md ±6%
9) Total bilirubin	Colorimetric	NG (Hb Abs.)	NG (Hb Abs. · Turbid)	md ±20% (mixing ratio ≤20%)
10) Direct bilirubin	Colorimetric	NG (Hb Abs.)	NG (Hb Abs. · Turbid)	md -8% (mixing ratio ≤20%)
11) Creatinine	Colorimetric	NG (Hb Abs.)	NG (Hb Abs.)	md ±7% (mixing ratio ≤30%)
12) Urea nitrogen	UV	md +9%	md ±12%	md ±7%
13) Uric acid	Enzymatic	NG (Enzyme Inhibition)	NG (Enzyme Inhibition)	md +6%
14) Amylase	Enzymatic	NG (Enzyme Inhibition)	md +33%	md ±6%
15) Lipase	Enzymatic	md ±25%	NG (Enzyme Inhibition)	md ±11%
16) CPK ^{f)}	UV	NG (Hb Abs.)	NG (Hb Abs.)	md +10%
17) Total cholesterol	Enzymatic	md ±5%	NG (Participation)	md ±9% (mixing ratio ≤40%)
18) Free cholesterol	Enzymatic	md -33%	NG (Participation)	md +4% (mixing ratio ≤20%)
19) β-Lipoprotein	Turbidimetric	NG (Hb Abs.)	NG (Hb Abs. · Turbid)	md ±10% (mixing ratio ≤20%)
20) HDL-cholesterol	Enzymatic	md -14%	NG (Turbid · Participation)	md +9% (mixing ratio ≤20%)
21) Neutral fat	Enzymatic	md -3%	md -19%	NG (Micelle precipitation)
22) Phospholipid	Enzymatic	md -7%	NG (Participation)	md ±5%
23) Free fatty acid	Enzymatic	md -27%	md +37%	md +9% (mixing ratio ≤30%)
24) Total lipid	Summation	md ±3%	NG (Participation)	md ±7%
25) K ⁺	Electrode	md +3%	md +15%	md +3%
26) Ca ²⁺	Colorimetric	NG (Hb Abs.)	NG (Hb Abs. · Turbid)	md -13%
27) Inorganic phosphorus	Colorimetric	NG (Hb Abs.)	NG (Hb Abs. · Turbid)	md -6%
28) Mg ²⁺	Colorimetric	md ±9%	NG (Hb Abs. · Turbid)	md ±14%
29) Fe ³⁺	Colorimetric	NG (Participation)	NG (Turbid)	md -8% (mixing ratio ≤40%)
30) Cu ²⁺	Colorimetric	md -2%	NG (Turbid)	md -7%

* a) aspartate aminotransferase, b) alanine aminotransferase, c) L-lactate dehydrogenase, d) alkaline phosphatase,

e) γ-glutamyltransferase, f) creatine phosphokinase, g) The values in parentheses indicate mixing ratios for accurate measurement.

り、臨床試験開始前に対応策を検討することが急務である。幸いにもHb小胞体(HbV)の粒径は血球成分よりも小さく、また血漿蛋白質よりも大きいため、遠心分離を用いれば分離/除去が可能であり、正確な測定ができると期待される。そこでヒト血清に各種混合比でHbまたはHb小胞体を添加したとき、HbVを超遠心分離により除去した後で血液生化学検査を行い、Hb小胞体の阻害作用と、超遠心分離による阻害回避法を検討することを目的とする。

B. 研究方法

ヒト血清に0, 10, 20, 30, 40, 50%の混合比で精製Hb(10g/dL)またはHbV (10g/dL), 生理食塩水を混合して5mLとし、検体とした。またHbV混合試料については、超遠心分離(50,000g, 20min)後の上清液を回収して検体とした。全30項目について血液生化学検査を行った(BML社依頼, Hitachi 7450, JEOL JCA-BM12)。Hb小胞体分散液に占めるHbV粒子の体積分率は40%なので、希釈率を考慮した。

C. 結果および考察

対照群の生理食塩水で血清を希釈した場合には、全項目の濃度は希釈度に応じて単調に低下する。これと比較した場合、HbV混合試料の検査では正確な測定が困難になる場合が多く、Hb溶液と同程度或いはそれ以上に多く認められた(Table 7)。これは、比色法やUV法においてHb吸収や懸濁による影響と考えられる。総蛋白質、脂質成分の定量では、ヘモグロビン、および小胞体膜成分も検出された。一方、HbVを超遠心分離した上清試料では、29項目でその影響がほぼ無くなった。尿酸や電解質など低分子成分の濃度も、上清試料には影響が無く、HbV二分子膜を透過することも無いと考えられた。中性脂肪に関しては、これが微粒子を形成しているので、超遠心分離によって相分離して溶液上部に集合したため、測定値は低くなった。

D. 結論

HbVでは血清の臨床化学検査において著しい阻害作用が認められたが、超遠心分離した後の上清では阻害作用はほぼ消失した。欧米で展開されている非細胞型のHb溶液系では血清からこれらを除去することは出来ない。従って、阻害作用を消失出来る

ことは、HbVの臨床応用における利点として主張できる。但し、中性脂肪は超遠心分離の操作によって分離されるため、測定値は過小評価された。本検討では主要な測定項目のみの検討であったが、例えば疎水性の高い物質の場合はHbVの二分子膜と相互作用することも考えられるので、今後はその他の測定項目についても検討する必要がある。

7. リコンビナントアルブミン-ヘムの一酸化窒素配位能

A. 研究目的

組替えヒト血清アルブミン(rHSA)に合成ヘム(FeP)を包接させて得たアルブミン-ヘム複合体(rHSA-FeP)は、生理条件下(pH7.3, 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。しかし、これを酸素輸液として利用する場合、血管から漏出する可能性があり、血管内皮弛緩因子である一酸化窒素(NO)の捕捉に伴う血圧の上昇が懸念される。しかしこれまでrHSA-FePのNO配位能は定量的解明されていなかった。そこで、本年度はrHSA-FeP複合体のNO配位能について詳細に検討した。

B. 研究方法

rHSA-FeP(deoxy体)水溶液(pH 7.4)は、既報に従って調製した。溶液中へNOを通気し、その可視吸収スペクトル変化からNO錯体の形成を実証した。NOガス内に微量に含まれるNO₂はKOH水溶液を通過させることにより除去。また、ESRスペクトル測定から得られたニトロシルヘム錯体の配位構造を解明した。NO親和性($P_{1/2}^{NO}$)はNO結合速度とNO解離速度の比から算出。NO結合速度定数(k_{on}^{NO})は、レーザーフラッシュホトリシス法により決定し、解離速度定数(k_{off}^{NO})は Mooreらの方法 (*J. Biol. Chem.* 251, 2788 (1976)) を用いて算出した。

C. 研究結果および考察

1. rHSA-FePのNO配位能

rHSA-FeP(deoxy体またはCO体)の水溶液へNOを通気すると、その可視吸収スペクトルは λ_{max} :

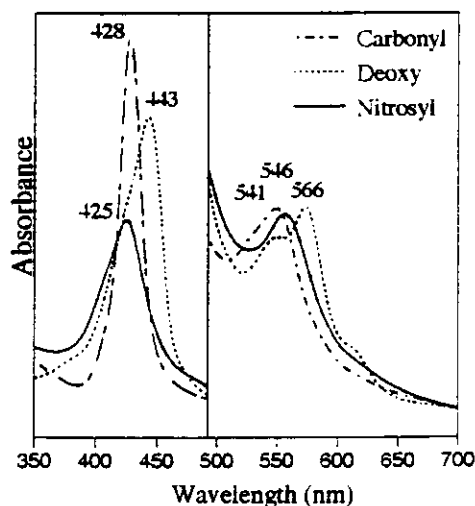


Fig. 8 Visible absorption spectral changes of rHSA-FeP in phosphate buffer (pH 7.4) at 25°C.

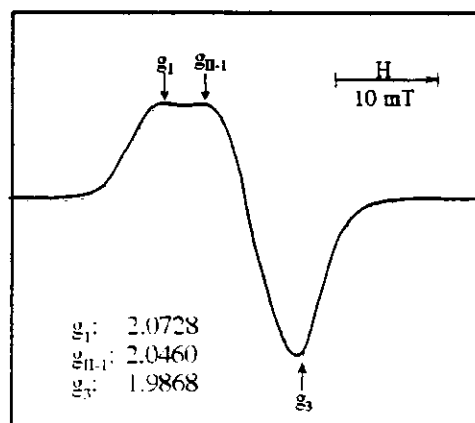


Fig. 9 ESR spectrum of rHSA-FeP(NO) in phosphate buffer (pH 7.4) at 77K.

425, 546 nmへ移行し、6配位型ニトロシルヘム錯体の形成を示した (Fig. 8)。77KにおけるESRスペクトルも6配位ニトロシル錯体の形成を示唆し (Fig. 9)、そのg値がニトロシルHbやMbのものと同じだったことから、FePはアルブミンに包接された場合でも、6配位型ニトロシル錯体を形成すると結論した。5配位Fe(II)ポルフィリン-イミダゾール錯体にNOが配位すると、NOのトランス効果により軸塩基が脱離し、5配位ニトロシル錯体となることが知られているが、分子内にイミダゾリル基を共有結合したFePでは、イミダゾールが解離することなく6配位型ニトロシル錯体が形成される。

2. rHSA-FePのNO結合パラメーター

rHSA-FePのNO親和性 ($P_{1/2}^{NO}$: 1.7×10^{-5} Torr) は、トルエン溶液中のFeP (1.8×10^{-3} Torr) に比べ、約1/100と低い (Table 8)。この小さなNO親和

性は速度論的には k_{on}^{NO} の低下に起因する。一般に、ヘムやヘム蛋白質へのNO結合反応は拡散律速であり、HbやMbの k_{on}^{NO} は、プロトヘム(イミダゾール)錯体(FePP(1-MeIm))の値の約1/10(約 1.7×10^7 M⁻¹s⁻¹)となる。興味あることにrHSA-FePの k_{on}^{NO} も、FePの値の1/60であり、ヘムを蛋白質の内部に包接させることにより、NO結合速度は合成系でも減少することが明らかとなった。

D. 結論

rHSA-FePはNOの通気により6配位型ニトロシル錯体を形成する。そのNO親和性 ($P_{1/2}^{NO}$: 1.7×10^{-5} Torr) は、トルエン溶液中のFeP (1.8×10^{-3} Torr) に比べ約1/100と低いが、Hbの値 ($P_{1/2}^{NO}$: 1.5×10^{-5} Torr) より9倍高い。しかし、rHSA-FeP溶液を静注

Table 9 NO-Binding parameters of rHSA-FeP at 25 °C.

	Solvent	$10^3 P_{1/2}^{NO}$ (Torr)	$10^3 k_{on}^{NO}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)	$10^4 k_{off}^{NO}$ (s ⁻¹)
FeP	toluene	0.018	8.9	2.3
rHSA-FeP(8)	water	1.7	0.15	0.67
FePP(1-MeIm)	water	0.57	1.8	2.9
Hb(T-state)	water	15	0.18	40
Mb	water	2.7	0.17	1.2

したラットでは、投与60分後まで、血圧と心拍数の変化は観測されない。アルブミンはHbに比べ等電点が負に大きいため血管透過性が低く、投与による急激な血圧亢進は起こさないと考えられる。

7. 酸素錯体の安定度向上を目指した新規ポルフィリン誘導体の合成

A. 研究目的

組換えヒト血清アルブミン(rHSA)に合成ヘムを包接させて得られたアルブミン-ヘム複合体の酸素錯体安定度の向上を目指して、新規ポルフィリン誘導体を設計・合成し、その酸素配位能を評価した。具体的には、軸塩基である2-メチルイミダゾリル基の代わりにヒスチジンを導入したFepivP(His)、酸素配位座近傍置換基であるピバロイル基の代わりに1-メチルヘキサノイル基を導入したFecycP(Im)、FecycP(His)、また、ポルフィリン環の両側にかさ高い極性置換基を導入したFeDP(H)、FeDP(OH)、FeDP(OMe)、FeDP(OAc)を合成し、酸素配位能と分子構造の相関を解明した。

B. 研究方法

ポルフィリン誘導体8種を合成し(Fig. 11)、各々

をrHSAに包接させた複合体の酸素配位能を決定した。得られたポルフィリン誘導体を8分子包接させたrHSA-FePは常法に従って調製した。O₂及び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、rHSA-FeP溶液([FeP]: 20 mM)に異なるO₂/N₂混合ガスを通気し、その時の可視吸収スペクトル変化から、Hill式を用いて酸素親和性($P_{1/2}$)を算出した。

C. 研究結果および考察

いずれのアルブミン-ヘム複合体も、従来のrHSA-FepivP(Im)と同様に、窒素雰囲気下では、軸塩基が分子内配位したFe(II)deoxy体を形成した。このdeoxy体溶液へO₂を通気すると、速やかにoxy体を生成し、その酸素結合解離は可逆的であった。続いてCOを通気すると安定なcarbonyl体を形成した。rHSA-FepivP(His)の酸素結合に伴う吸収スペクトル変化をFig. 12に示す。レーザーフラッシュフォトリシス後のCO、O₂再結合過程はrHSA-FepivP(Im)の場合と同様に、3成分から構成された(Fig. 13)。初めの第1成分は、イミダゾリル基の脱離に伴う反応で、残りの遅い2成分がdeoxy型へのCO再結合である。いずれの場合も速い反応と遅い反応の比は一定値(3)を示した。酸素結合パラメーターをTable 9にまとめた。

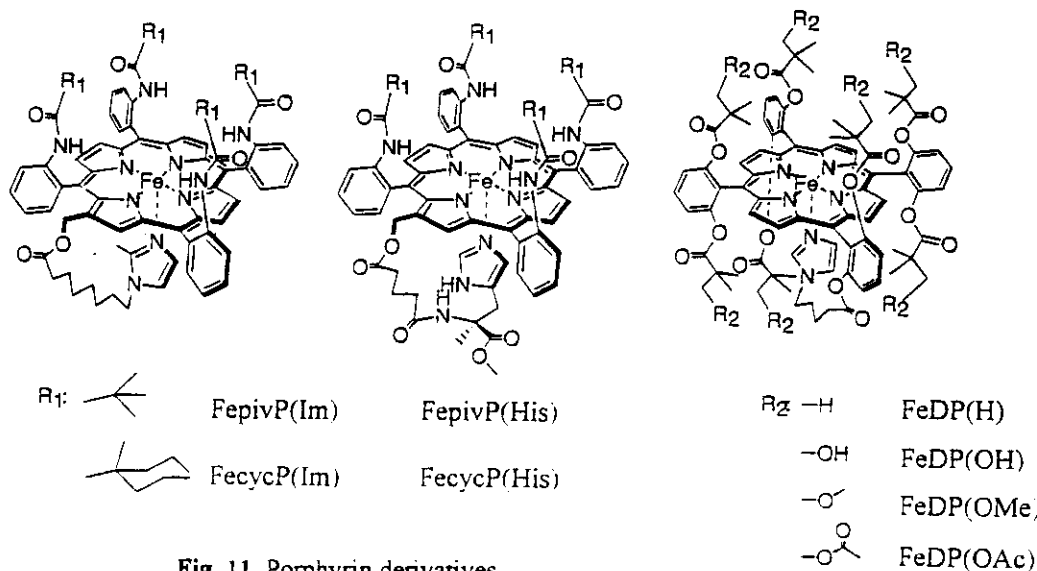


Fig. 11 Porphyrin derivatives.

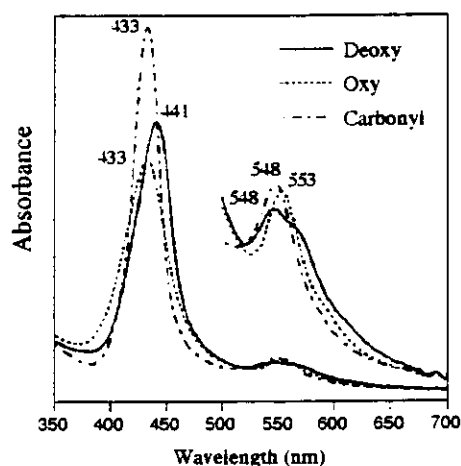


Fig. 12 Visible absorption spectral changes of rHSA-FepivP(His) in phosphate buffer (pH 7.4) at 25 °C.

有機溶媒中では、ピバロイル基をシクロヘキサノイル基に変換しても $P_{1/2}(O_2)$ に変化は見られないが、アルブミン包接系でも同様に $P_{1/2}(O_2)$ に変化はない。しかし、軸塩基を2-メチルイミダゾリル基からヒスチジンへ変換すると、酸素親和性は10倍以上増大した。これは、イミダゾール環の2位に存在するメチル基の立体障害がなくなったためである。速度論的にはヒスチジン型の高い酸素親和性は、 $k_{off}(O_2)$ の減少に起因した。

また、酸素錯体寿命はピバロイル基をシクロヘキサノイル基に変換すると5倍に、軸塩基を2-メチルイミダゾリル基からヒスチジン基へ変換すると、3倍に延長された。結果として、FecycP(His)の $\tau_{1/2}$ は

生理条件下で25hrとなり、FepivP(Im)の12倍も長く、きわめて安定な酸素錯体を形成することが明らかとなった。

D. 結論

アルブミン-ヘムの酸素錯体寿命はヘム構造を変換することにより延長できる。軸塩基としてヒスチジン、酸素配位座近傍の置換基としてシクロヘキサノイル基を導入したヘム(FecycP(His))系では $\tau_{1/2}$ が生理条件下で25hrとなり、FepivP(Im)の12倍も長く、きわめて安定な酸素錯体を形成する。

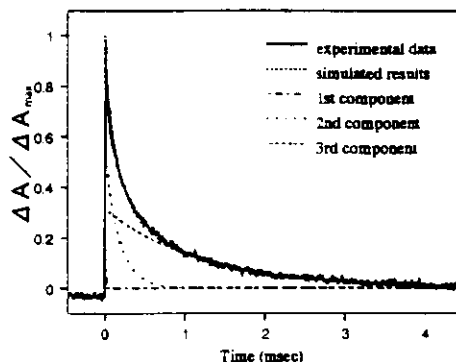


Fig. 13 Absorption decay of CO-rebinding to rHSA-FecycP(Im) after the laser flash photolysis.

Table 9 O_2 -Binding parameters of synthetic hemes at 25°C.

	$P_{1/2}$ (Torr)	$10^7 k_{on}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$10^2 k_{off}$ (s^{-1})*	$\tau_{1/2}$ (hr)**
FepivP(Im)	13	3.4 (0.95)	7.5 (2.0)	2
FecycP(Im)	13	4.6 (0.73)	9.8 (1.6)	9
FepivP(His)	~1	3.6 (0.61)	-	5
FecycP(His)	~1	5.4 (0.88)	-	25
FeDP(H)	28	1.1 (0.15)	5.0 (0.69)	5
FeDP(OMe)	23	1.1 (0.20)	4.1 (0.76)	2
FeDP(OAc)	23	0.89 (0.23)	3.2 (0.88)	2

*The slow component in parenthesis. **At 37°C under 100% O_2 .

E. 研究発表 (2000. 4. - 2001. 3.)

1. 論文発表

- 1) K. Sou, T. Endo, S. Takeoka, E. Tsuchida. "Polyoxyethylene-modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of polyoxyethylene-lipid into the vesicles". *Bioconjugate Chem.* 11, 372-379 (2000).
- 2) H. Sakai, K. Tomiyama, K. Sou, S. Takeoka, and E. Tsuchida. "Poly(ethyleneglycol)-conjugation and deoxygenation enable long term preservation of hemoglobin vesicles as oxygen carriers". *Bioconjugate Chem.* 11, 425-432 (2000).
- 3) S. Takeoka, K. Mori, H. Ohkawa, K. Sou, E. Tsuchida. "Synthesis and assembly of poly(ethylene glycol)-lipids with mono-, di-, and tetraacyl chains and a poly(ethylene glycol) chain of various molecular weights". *J. Am. Chem. Soc.* 122, 7927-7935 (2000).
- 4) H. Sakai, H. Hara, M. Yuasa, A.G. Tsai, S. Takeoka, E. Tsuchida, and M. Intaglietta. "Molecular Dimensions of Hb-based O₂ Carriers Determine Constriction of Resistance Arteries and Hypertension in Conscious Hamster Model". *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279, 908-915 (2000).
- 5) H. Sakai, H. Hara, A.G. Tsai, E. Tsuchida, and M. Intaglietta. "Constriction of resistance arteries determine L-NAME induced hypertention". *Microvasc. Res.* 60, 21 - 27 (2000).
- 6) H. Sakai, H. Onuma, M. Umeyama, S. Takeoka, and E. Tsuchida. "Photoreduction of Methemoglobin by Irradiation in Near-ultraviolet Region". *Biochemistry* 39, 14595-14602, (2000).
- 7) H. Sakai, K. Tomiyama, S. Takeoka, H. Horinouchi, K. Kobayashi, and E. Tsuchida. "Pretreatment to avoid interference effect of hemoglobin-vesicles (oxygen carriers) on blood serum clinical chemistry". *Clin. Chem.* (submitted).
- 8) T. Komatsu, Y. Matsukawa, E. Tsuchida. "Nitrosyl iron(II) complex of *meso*-tetrakis($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -*o*-pivalamidophenyl)porphyrin with a covalently linked 2-methyl-imidazolylalkyl group". *Chem. Lett.* 2000, 1060-1061 (2000).
- 9) T. Komatsu, Y. Matsukawa, E. Tsuchida. "Kinetics of CO- and O₂-binding to human serum albumin-heme hybrid". *Bioconjugate Chem.* 11, 772-776 (2000).
- 10) Y. Wu, T. Komatsu, E. Tsuchida. "Redox behavior of human serum albumin-heme hybrid on graphite electrode modified with didodecyldimethylammonium bromide". *Chem. Lett.* 2000, 1194-1195 (2000).
- 11) T. Komatsu, Y. Matsukawa, E. Tsuchida. "Reaction of nitric oxide with synthetic hemoprotein, human serum albumin incorporating tetraphenylporphyrinatoiron(II) derivatives". *Bioconjugate Chem.* 12, 71-75 (2001).
- 12) A. Nakagawa, T. Komatsu, E. Tsuchida. "Photoreduction of autooxidized albumin-heme hybrid in saline solution; revival of its O₂-binding ability". *Bioconjugate Chem.* 12, (2001). in press.
- 13) E. Tsuchida, T. Komatsu, Y. Wu. "Human serum albumin incorporating synthetic heme; A novel O₂-carrying hemoprotein". *Chinese J. Appl. Chem.* (2001). in press.

2. 論説

- 1) 土田英俊、酒井宏水、武岡真司. "人工血液の開発動向" *バイオサイエンスとインダストリー* 58, 252-255 (2000)
- 2) 土田英俊、小松晃之、酒井宏水 "酸素輸液(人工赤血球)の設計原理とその具体的構造" *血液・免疫・腫瘍 BIC Forum.* 6(1) 12-18 (2000)
- 3) 土田英俊、酒井宏水、武岡真司 "酸素輸液としての人工赤血球" 「バイオメティックスハンドブック」第7章(分泌と体内輸送系)第6節、長田義仁編、エ

ヌ・ティール・エス社 (2000).

4) A.G. Tsai, H.Sakai, E. Tsuchida, and M. Intaglietta. "Mechanical, microvascular, and cellular basis for the design of artificial blood". *人工血液* 8, 30 - 39 (2000)

5) 土田英俊、酒井宏水、海外文献紹介"Perflubron乳剤投与で整形手術時の輸血を遅延させることができる". *人工血液* 8, 21-25 (2000).

6) E. Tsuchida, "Is there a need for blood substitutes in the new millennium and what should we expect in the way of safety and efficacy?" *Artif. Cells Blood Substitues Immobilization Biotechnol.* 28, v-viii (2001).

3. 学会発表

1) 酒井宏水、富山賢一、武岡真司、土田英俊／ヘモグロビン小胞体の酸素輸送能と細網内皮系への影響／第49回高分子年次大会／2000.5.29-31／名古屋国際会議場

2) 酒井宏水、小沼浩人、武岡真司、土田英俊／照射によるメトヘモグロビンの非酵素的還元と酸素配位／第49回高分子年次大会／2000.5.29-31／名古屋国際会議場

3) 小松晃之／ポルフィリン組織体の構築とその酸素輸液への応用(若手招待講演)／第49回高分子年次大会／2000.5.29-31／名古屋国際会議場

4) 松川泰子、小松晃之、土田英俊／アルブミン-ヘム複合体のNO結合反応／第49回高分子年次大会／2000.5.29-31／名古屋国際会議場

5) 呉 宇平、小松晃之、土田英俊／Electrochemistry of Human Serum Albumin-Heme Hybrid／第49回高分子年次大会／2000.5.29-31／名古屋国際会議場

6) H. Sakai, H. Onuma, S. Takeoka, E. Tsuchida / Photoreduction of methemoglobin and application to hemoglobin-vesicles as oxygen carriers. / 1st International Conference of Porphyrins and

Phthalocyanines / 2000. June 25-30 / Dijon, France

7) H. Sakai, K. Tomiyama, S. Takeoka, E. Tsuchida / Hemoglobin-based oxygen carriers: Synthesis, physicochemical characterization and microcirculatory blood flow in relation with NO binding. / 1st International Conference of Porphyrins and Phthalocyanines / 2000. June 25-30 / Dijon, France

8) T. Komatsu, Y. Matsukawa, E. Tsuchida / Reaction of nitric oxide with human serum albumin incorporating tetraphenyl-porphinatoiron(II) Derivatives. / 1st International Conference of Porphyrins and Phthalocyanines / 2000. June 25-30 / Dijon, France

9) T. Komatsu, T. Yanagimoto, E. Tsuchida / Self-Assembled Fibers Made of Lipidporphyrinato-zinc(II) and -iron(II) Complexes with an Intramolecular Coordinated Axial Imidazole. / 1st International Conference of Porphyrins and Phthalocyanines / 2000. June 25-30 / Dijon, France

10) E. Tsuchida, T. Komatsu / Inclusion Complexes of Albumin-Lipidheme Playing a Role of Oxygen Infusions / 38th Macromolecular IUPAC Symposium / 2000. Nov. 9-14 / Warsaw, Poland.

11) 土田英俊／わが国における血液代替物研究(特別講演)／第7回日本血液代替物学会年次大会／2000.9.7-8／札幌かでの2・7

12) 武岡真司／酸素輸液開発の現状／第7回日本血液代替物学会年次大会／2000.9.7-8／札幌かでの2・7

13) 小松晃之、松川泰子、土田英俊／全合成系酸素運搬体(アルブミンヘム)のNO配位能第7回日本血液代替物学会年次大会／2000.9.7-8／札幌かでの2・7

14) 酒井宏水、堀之内宏久、富山賢一、池田英二、武岡真司、小林紘一、土田英俊／酸素輸液(ヘモグロビン小胞体)投与後の細網内皮系の病理学的検討／第7回日本血液代替物学会年次大会／2000.9.7-8／札幌