

- 15) 小松晃之、土田英俊／アルブミン-ヘム複合体（全合成系酸素輸液）の特徴と酸素輸送／第5回酸素ダイナミクス研究会／2000.9.／東京
- 16) 岡田智行、小松晃之、土田英俊／両面修飾テトラフェニルポルフィリン鉄(II)誘導体の合成と酸素配位に及ぼす置換基効果／第50回錯体化学討論会／2000.9.／草津
- 17) 松川泰子、小松晃之、土田英俊／ヒスチジンを軸塩基とするテトラフェニルポルフィリン鉄(II)誘導体の合成とアルブミン複合体の酸素配位／第50回錯体化学討論会／2000.9.／草津
- 18) 宗慶太郎、森かつら、大川春樹、武岡真司、土田英俊、／多アシル鎖型ポリオキシエチレン脂質とリン脂質小胞体の共集合状態／第49回高分子討論会／2000.9.／仙台
- 19) 中川晶人、小松晃之、土田英俊／光照射によるアルブミン-ヘムの還元反応／第49回高分子討論会／2000.9.／仙台
- 20) 柳本徹也、早川祥一、小松晃之、土田英俊／光照射によるアルブミン-ヘムの還元反応／第49回高分子討論会／2000.9.／仙台
- 21) 福富一平、酒井宏水、武岡真司、土田英俊／中空系膜型ガス交換器を用いる酸素輸液（ヘモグロビン小胞体）の製造工程／第38回日本人工臓器学会／2000.9.27-29／じばさん三重(四日市)
- 22) 富山賢一、酒井宏水、武岡真司、堀之内宏久、小林紘一、土田英俊／酸素輸液（ヘモグロビン小胞体）の細網内皮系に対する影響／第38回日本人工臓器学会／2000.9.27-29／じばさん三重(四日市)
- 23) E. Tsuchida. / "Plenary lecture: Recent progress of artificial blood project and novel products" / The 8th International Symposium on Blood Substitutes / 2000. Nov. 9-11 / Hotel Hyatt Regency / San Diego.
- 24) S. Takeoka, H. Sakai, K. Tomiyama, K. Sou, and E. Tsuchida. "PEG-conjugation and deoxygenation enable long term preservation of hemoglobin vesicles as oxygen carriers." (poster) / The 8th International Symposium on Blood Substitutes / 2000. Nov. 9-11 / Hotel Hyatt Regency / San Diego.
- 25) S. Takeoka, H. Sakai, H. Onuma, and E. Tsuchida. "Synthesis and physicochemical characterization of a series of Hb-based oxygen carriers: objective comparison between cellular and acellular types." (oral) / The 8th International Symposium on Blood Substitutes / 2000. Nov. 9-11 / Hotel Hyatt Regency / San Diego.
- 26) H. Sakai, H. Hara, 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."(oral) / The 8th International Symposium on Blood Substitutes / 2000. Nov. 9-11 / Hotel Hyatt Regency / San Diego.
- 27) H. Sakai, H. Horinouchi, K. Tomiyama, S. Takeoka, E. Ikeda, K. Kobayashi, and E. Tsuchida. "Influence of infusion of Hb-vesicles as O₂ carriers on phagocytic activity and histopathological examination of metabolism in reticuloendothelial systems." (poster) / The 8th International Symposium on Blood Substitutes / 2000. Nov. 9-11 / Hotel Hyatt Regency / San Diego.
- 28) H. Onuma, H. Sakai, S. Takeoka, and E. Tsuchida. "Photoreduction of Methemoglobin by Irradiation in Near-ultraviolet Region"(poster) / The 8th International Symposium on Blood Substitutes / 2000. Nov. 9-11 / Hotel Hyatt Regency / San Diego.
- 29) K. Sou, T. Endo, S. Takeoka, and E. Tsuchida. "Surface modification of the hemoglobin-vesicles by spontaneous incorporation of the poly(ethylene glycol)-lipids"(poster) / The 8th International Symposium on Blood Substitutes / 2000. Nov. 9-11 / Hotel Hyatt Regency / San Diego.

30) K. Mori, K. Sou, S. Takeoka, and E. Tsuchida. "Surface modification of phospholipid vesicles with multiacyl poly(ethylene glycol)(PEG)- lipids and the effect of molecular weight of PEG." (poster) / The 8th International Symposium on Blood Substitutes / 2000. Nov. 9-11 / Hotel Hyatt Regency / San Diego.

31) Y. P. Wu, T. Komatsu, E. Tsuchida. "Electrochemical studies of an albumin-heme hybrid as oxygen-carrying hemoprotein." (oral) / The 8th International Symposium on Blood Substitutes / 2000. Nov. 9-11 / Hotel Hyatt Regency / San Diego.

32) T. Yanagimoto, T. Komatsu, and E. Tsuchida. "Preservation stability of human serum albumin-heme as an O₂ infusion" (oral) / The 8th International Symposium on Blood Substitutes / 2000. Nov. 9-11 / Hotel Hyatt Regency / San Diego.

33) T. Komatsu, Y. Matsukawa, and E. Tsuchida. "NO-binding properties of recombinant human serum albumin incorporating synthetic heme (albumin-heme)" (oral) / The 8th International Symposium on Blood Substitutes / 2000. Nov. 9-11 / Hotel Hyatt Regency / San Diego.

34) T. Komatsu, T. Yanagimoto, S. Hayakawa, E. Tsuchida / Nano-structure and dioxygenation of self-assembled Lipidporphyrins in Aqueous Media. / The 2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies / 2000. Dec. 14-19 / Honolulu.

35) Y. Mastukawa, T. Komatsu, E. Tsuchida, "Reaction of Nitric Oxide with Recombinant Human Serum Albumin Incorporating Synthetic Hemes. / The 2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies / 2000. Dec. 14-19 / Honolulu.

36) A. Nakagawa, T. Komatsu, E. Tsuchida / Photoreduction of tetraphenylporphyrinato-iron(III) derivative incorporated into recombinant human serum albumin by LMCT irradiation. / The 2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies / 2000.

Dec. 14-19 / Honolulu.

37) E. Tsuchida, T. Komatsu, "Human Serum Albumin-Heme Hybrid as Dioxygen Infusion. / The 2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies / 2000. Dec. 14-19 / Honolulu.

38) 森武美保、中川晶人、小松晃之、土田英俊 / 4つのジアルキルホスホコリン基を有するテトラフェニルポルフィリンの合成とその自己組織体の特徴 / 第79日本化学会春季年会 / 2001.3.28-31 / 神戸

39) 小松晃之、松川泰子、土田英俊 / アルブミン-ヘム複合体の酸素錯体安定度に及ぼすヘム構造の効果 / 第79日本化学会春季年会 / 2001.3.28-31 / 神戸

40) 宮武 薫、小松晃之、土田英俊 / プロトヘム誘導体を包接したアルブミン複合体の特徴と酸素配位 / 第79日本化学会春季年会 / 2001.3.28-31 / 神戸

F. 知的所有権の取得状況

次の特許を出願済。

1) 「小胞体分散液の製造法」 (特願2000-344458)
Hb小胞体を短時間で収率高く造粒するための方法。

2) 「カルボン酸型脂質」 (特願2000-344459)
Hb小胞体の負電荷成分として利用できる合成脂質。

3) 「ヘモグロビン小胞体の光還元法」
(特願2000-175611)
酸化劣化したHb小胞体を光還元して酸素運搬能を還元させる方法。

4) 「両親媒性テトラフェニルポルフィリンFe(III)錯体の光還元方法」
(特願平11-096764、特開2000-24797)
高原子価金属ポルフィリン錯体をその配位子—中心金属間電荷移動吸収帯域の光照射により、相当する低原子価金属ポルフィリン錯体へ還元する光還元方法。

5) 「高原子価金属ポルフィリン錯体の光還元方法」
(特願平2000-69558、特開2000-281693)
高原子価金属ポルフィリン錯体をその配位子—中心

金属間電荷移動吸収帯域の光照射により、相当する低原子価金属ポルフィリン錯体へ還元する光還元方法。

6) 「スピントラップ剤」 (出願中)

生理条件下においても感度良く作用する一酸化窒素トラップ剤、一酸化窒素検出剤、および一酸化窒素吸着剤を提供する。

7) 「ポルフィリン集合体」 (出願中)

フェニル環オルト位に軸塩基であるイミダゾリル基を一つ導入した両親媒性長鎖アルキル基を有するテトラフェニルポルフィリン誘導体からなるポルフィリン集合体と、その製造法。

8) 「塩基性軸配位子を有する置換テトラフェニルポルフィリン化合物」 (出願中)

2位置に塩基性軸配位子として機能するヒスチジン誘導体を導入することにより、優れた酸素配位能を持たせたテトラフェニルポルフィリン金属錯体とその製造法。

分担研究報告書

臨床応用可能な人工赤血球の創製に関する研究

1. ヘモグロビン小胞体の血小板放出能に対する影響
2. ヘモグロビン小胞体の補体活性に関する予備検討
3. ヘモグロビン小胞体の血漿凝固活性への影響
4. ヘモグロビン溶液の加熱処理によるウィルス不活化
5. ヘモグロビン溶液中のウィルス光不活化と抗酸化物質への影響

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

研究要旨 ヘモグロビン小胞体(HbV)の負電荷脂質成分を改良した DPEA-HbV の血液成分との生体適合性について検討した。血小板との相互作用を検討したところ、混合率が20%、40%と増えるに従い、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。DPEA-HbVあるいは従来型 DPPG-HbV を血清と20%あるいは28%の割合で混合し、補体への影響を検討した。いずれのHbVでも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。DPEA-HbVあるいはDPPG-HbVを血漿と20%、40%、60%の比率で混合し、凝固活性に及ぼす影響を検討した。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、コントロールとして用いた生理的食塩水の場合と相違はみられなかった。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。

ウィルス不活化処理として期限切れヒト赤血球由来Hb溶液(SFH)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、vesicular stomatitis virus(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。IEFにおいても、空気雰囲気下で加熱処理したHbでは変性がみられたが、CO雰囲気下の処理ではHb泳動パターンに変化はみられなかった。SDS-PAGEではHb以外の蛋白質のバンドの減少がみられた。ジメチルメチレンブルーを用いた光処理によりSFHのウィ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。

1. ヘモグロビン小胞体の血小板放出能に対する影響

A. 研究目的

ヘモグロビン小胞体(HbV)は人工酸素運搬体の一つとして開発され、出血性ショックの動物モデルにおいて有効性が示されている。生体適合性の観点

からHbVの血球細胞や内皮細胞への影響を考慮する必要がある。

これまでに我々はdipalmitoylphosphatidylglycerol(DPPG)を構成成分とするHbV(DPPG-HbV)はヒト血小板放出反応に対する影響は無いということを示した。しかし、上記のDPPG-HbVをラットに投与すると血小板減少を起

こすことから、新しく1,5-dipalmitoyl-L-glutamate-N-succinic acid (DPEA) を構成成分とするHbV (DPEA-HbV) が開発され、ラットにおける血小板減少を回避する事が出来た。そこで今回、新しく開発されたHbVを用いてヒト血小板放出反応に対する影響を検討した。

B. 研究方法

40 mL全血 (クエン酸三ナトリウム加) から多血小板血漿 (PRP) を採取した。

1) 血小板からのRANTESの放出

血小板浮遊液 (PRP: 1.6×10^8 /mL) とDPEA-HbVを混合し (0%, 20%, 40%)、37°C、60分間ブレインキュベートした後、コラーゲン (1 μ g/mL) または緩衝液を添加して5分間のインキュベーションを行った。反応後上清を採取し、ELISAにてRANTESレベルを測定した。

2) p-Selectinの発現

血小板浮遊液 (PRP: 1.6×10^8 /mL) とDPEA-HbVを混合し (0%, 20%, 40%)、37°C、60分間インキュベートした後、1%パラホルムアルデヒドで固定した。PBSで1回洗浄した後、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。

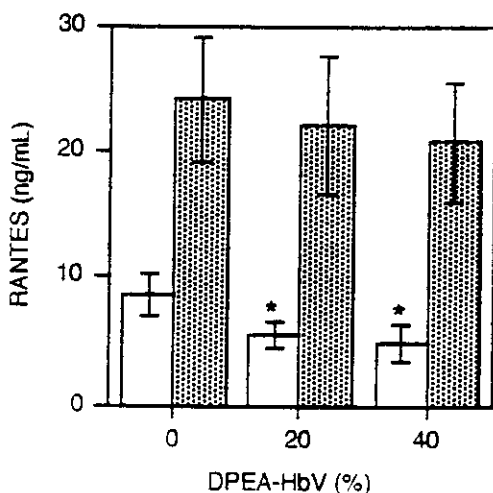


図1. 血小板からのRANTESの放出反応に対するDPEA-HbVの影響。

□ collagen (-) ▨ collagen (+)

N = 5, mean \pm SE.

*p < 0.05: v.s. HbV 0% collagen(-)

表1. 血小板p-selectinの発現率に対するDPEA-HbVの影響

| | DPEA-HbV | | |
|----------------|---------------|---------------|---------------|
| | 0% | 20% | 40% |
| p-Selectin (%) | 1.4 \pm 0.6 | 0.7 \pm 0.3 | 0.6 \pm 0.1 |

N = 4, mean \pm SD.

C. 研究結果

1) 血小板からのRANTESの放出反応に対するDPEA-HbVの影響

コラーゲン非存在下において血小板とDPEA-HbVをインキュベーションすると、自発的放出による反応上清中のRANTES量はコントロールに比べて有意に減少した (図1)。コラーゲン刺激による血小板からのRANTESの放出反応に対するDPEA-HbVの影響はみられなかった (図1)。

2) 血小板のp-selectinの発現に対するDPEA-HbVの影響

血小板とDPEA-HbVの37°C、60分間インキュベーションによる血小板のp-selectinの発現率に対する影響は見られなかった (表1)。

D. 考察

コラーゲン非存在下において血小板とDPEA-HbVのインキュベーションにより反応上清中のRANTESは血小板単独の場合よりも減少したが、放出反応の亢進はみられなかったこと、血小板のp-selectinの発現率に対するDPEA-HbVの影響はみられなかったことから血小板における生体適合性に関してはDPEA-HbVの安全性が示唆された。

2. ヘモグロビン小胞体の補体活性に関する予備検討

A. 研究目的

リポソーム包埋型ヘモグロビン (LEH) とヒト血清のインキュベーションによって補体の活性化が報告されている。そこでヘモグロビン小胞体においても同様な補体活性化がみられるか否かについて、DPPG-HbVとDPEA-HbVを用い検討した。

B. 研究方法

補体活性化の指標としてTerminal Complement Complex (TCC) をSC5b-9 (soluble, non-lytic form of TCC) ELA kit (QUIDEL, CA, USA) にて測定した。

健常人 (n=3) から採取した血清を、20% DPEA-HbV、等量の脂質量となる28% DPPG-HbV、対照のPBSと混和し、37℃、1時間インキュベーションした。15,000rpm (4℃, 45 min) の遠心上清を1/50ないし1/100に希釈後、上記kit にてSC5b-9レベルを測定した。

C. 研究結果

20% DPEA-HbV処理によって、いずれのドナー血清においてもSC5b-9レベルが増加し、そのレベルは6.5~19.7 µg/mLであった。28% DPPG-HbV処理においても、同様な増加がみられた (図2)。対照となるPBS混和のレベルに比べ、20% DPEA-HbV処理では4.5±1.2倍、28% DPPG-HbV処理では3.8±1.0倍で、有意差はみられなかった (p=0.07, paired t-test)。

D. 考察

Alving CRのグループの報告では、SC5b-9のコ

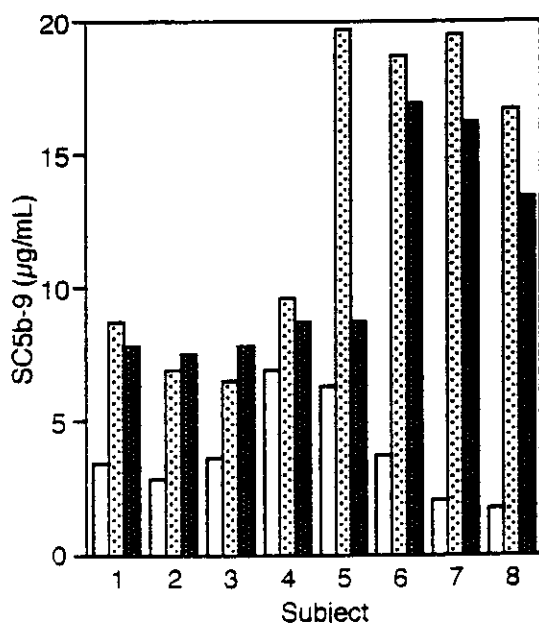


図2. ヘモグロビン小胞体が補体に及ぼす影響

□: PBS ▨: DPEA-HbV (20%)
■: DPPG-HbV (28%)

ントロールレベル (PBS) は2-10 µg/mLに対し、LEH (リン脂質濃度17 mM) 処理にて10-30 µg/mLに増加している。またドナー毎 (12名) の増加率は2-10倍の範囲にある。今回の20% DPEA-HbVのリン脂質濃度は、約15.4 mMに相当する。30 µg/mLにいたる検体はみられなかったものの、コントロールから1.4~10倍と増加した。PEG修飾により補体の活性化を抑制できるとされているが、用いた両LEHともPEG修飾されていることから、今回の結果はそれと相反する結果と思われる。今後は例数を増やすと共に、反応条件、活性化機序等についてさらに検討が必要と思われる。

3. ヘモグロビン小胞体の血漿凝固活性への影響

A. 研究目的

ヘモグロビン小胞体が輸注されることにより、血漿の希釈が起こる。それゆえ、凝固時間が延長することが懸念される。凝固時間に対してどのような影響があるのか、DPPG-HbVとDPEA-HbVを用い、プロトロンビン時間 (PT) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を比較検討した。

B. 研究方法

血漿とDPPG-HbVあるいはDPEA-HbVを20%、40%、60%v/vで混合し、血液凝固測定装置でPTおよびAPTTを測定した。対照として、生理的食塩水、PBSを用いた。

C. 研究結果

PTは血漿との混合比率が上昇するにつれて、凝固時間が遅延した (図3)。しかし、遅延の程度に4群間での相違は認められなかった。また混合比率20%では、目立った凝固時間の遅延はみられなかった。

APTTにおいても血漿との混合比率の上昇と共に、凝固時間が遅延した (図3)。DPEA-HbVは生食と同様な凝固時間の遅延をもたらしたが、DPPG-HbVは凝固時間を短縮させる傾向がみられた。

D. 考察

PTは外因系凝固、APTTは内因系凝固を反映するとされている。PTでは4群間で違いは見られなかったが、APTTでは生食に対しDPPG-HbVとDPEA-HbVで違いが見られた。DPEA-HbVとDPPG-HbVでは構成脂質が異なるため、表面荷電も異なっ

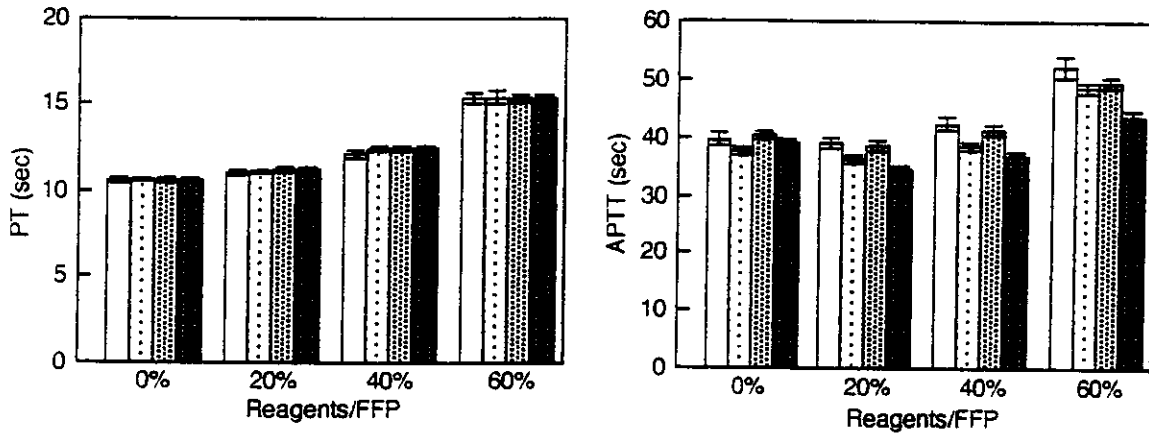


図3. DPPG-HbV及びDPEA-HbVが血漿凝固活性に及ぼす影響

□: Saline ▨: PBS ▤: DPEA-HbV ■: DPPG-HbV
 N = 5, mean ± SEM.

ていると考えられる。APTTでは反応開始に陰性荷電表面が関与している。DPPG-HbVで凝固時間が短縮したのは、DPPG-HbVの表面荷電がより陰性に傾いており、凝固カスケードが促進されたためかもしれない。一方、DPEA-HbVではコントロールである生食と同様な凝固時間の遅延がみられ、小胞体が凝固カスケードに及ぼす影響は、従来のDPPG-HbVより少ないと考えられた。

4. ヘモグロビン溶液中ウイルスの加熱処理による不活化

A. 研究目的

人工酸素運搬体の原料となるヘモグロビン溶液(SFH)の安全性をより高めるためには、ウイルス不活化法・除去法の導入は必須である。現在行われている液状加熱によるウイルス不活化効果について、空気及び一酸化炭素雰囲気下でのVSV不活化について検討した。

B. 研究方法

洗浄赤血球を等量のH₂Oで溶血し、vesicular stomatitis virus (VSV)を添加した。処理前検体を採取後、COガス置換し(30分間)、密閉後60

C. 1時間、溶液を攪拌しながら加熱処理を行っ

た。ガス置換を行わず空気下に放置して、同様に加熱処理した。処理前後の検体のVSV感染価は、Vero細胞を用いたブランクアッセイにより求めた。%Met-Hbは、シアンメトヘモグロビン法により測定した。ヘモグロビン、共存タンパク質について、SDS-PAGE、等電点電気泳動(IEF)で分析した。

C. 研究結果

加熱処理においては、空気及びCO雰囲気下いずれの場合も、VSVは5.8 log₁₀以上不活化された(表2)。しかし、空気雰囲気下では%Met-Hbが増大した(図4)。一方、CO雰囲気下では%Met-Hbに大きな変化はみられなかった。SDS-PAGEでは、加熱処理後にヘモグロビン以外のタンパク質バンドの減弱あるいは消失が観察された(図5)。IEFでは、空気存在下で加熱した場合メトヘモグロビン形成と思われる変化が観察されたのに対し、CO雰囲気下

表2. 加熱処理によるヘモグロビン溶液中VSVの不活化。

| Atmosphere | VSV titer (log TCID ₅₀) | | Inactivation (log ₁₀) |
|------------|-------------------------------------|-------|-----------------------------------|
| | Before | After | |
| Air | 5.3 ± 0.21 | -0.5* | >5.8 |
| CO | 5.5 ± 0.26 | -0.5* | >6.0 |

N = 3, mean = SD. * 検出限界以下

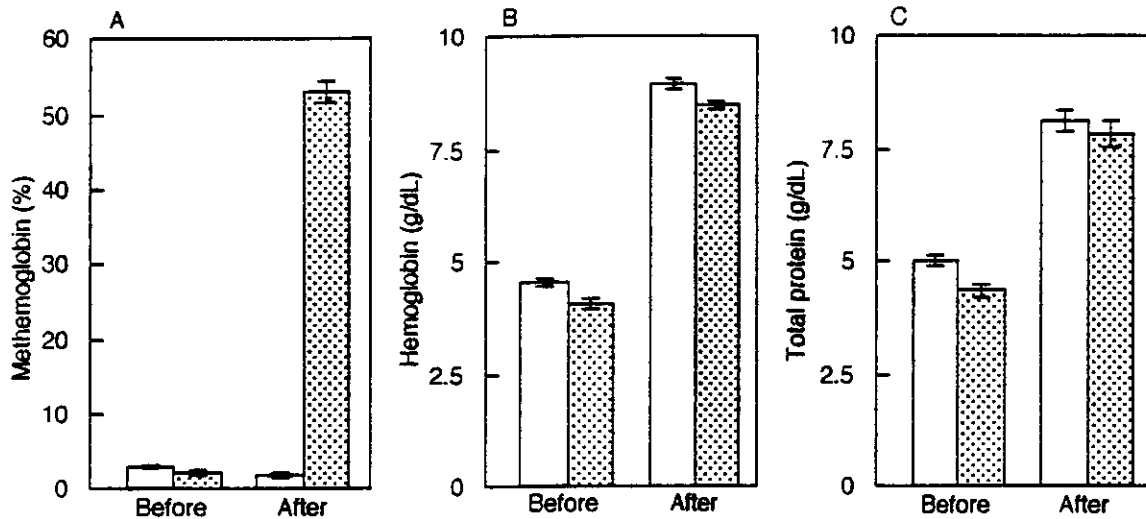


図4. ヘモグロビン溶液の加熱処理。

A. メト化率 B. ヘモグロビン濃度 C. タンパク質濃度

□: CO (n = 5, mean ± SD) ▨: Air (n = 3, mean ± SD)

ではヘモグロビンの変性は観察されなかった (図5)。

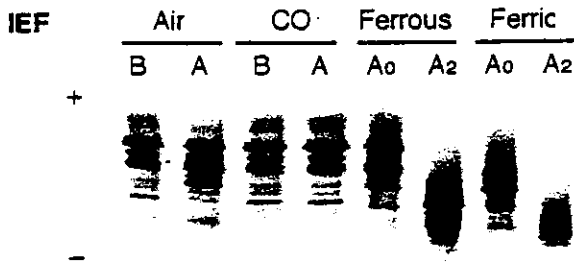
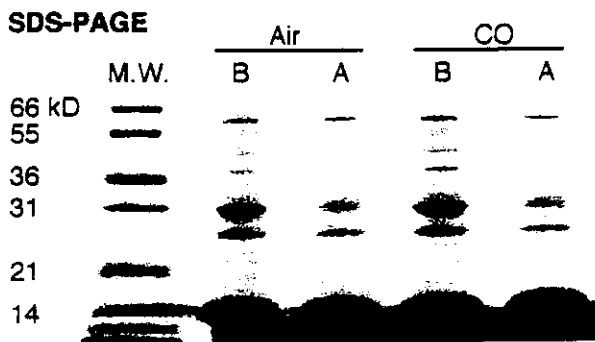


図5. 加熱処理前後のヘモグロビン溶液の電気泳動。

A: 加熱後, B: 加熱前

A₀: ヘモグロビンA₀

A₂: ヘモグロビンA₂

D. 考察

SFHに添加したVSVは、60℃、1時間の処理で、 $5.8 \log_{10}$ 以上の不活化が可能であった。ウイルス不活化能としては十分効果が高い処理であるといえる。ただし、加熱処理によるヘモグロビンの酸化を抑えるためには、CO置換する必要があった。以上のことから本方法は、赤血球代替物の原料となるSFHの安全性を高める方法として有効であると考えられた。

5. ヘモグロビン溶液中ウイルス光不活化と抗酸化物質への影響

A. 研究目的

期限切れ赤血球由来のSFHは人工赤血球の原料として重要である。生物由来原料はウイルスなどの病原体の感染に注意が必要である。既にわれわれは、methylene blue (MB) の誘導体である1,9-dimethylmethylene blue (DMMB)を用いたウイルス光不活化処理により、ヘモグロビン (Hb) に傷害を与えずにvesicular stomatitis virus (VSV) を $6.4 \log_{10}$ 不活化できる事を報告した。

SFHにはHbだけでなく抗酸化物質が共存する。

表3. DMMBによるSFH中ウイルスの光不活化

| Irradiation (J/cm ²) | Virus inactivation (log ₁₀) | |
|-------------------------------------|---|------------|
| | VSV | HIV |
| 0.69 | 3.3 ± 0.3 | >3.7 ± 0.1 |

DMMB: 2 μM, n = 4, mean ± SD.

もしこれらの活性が不活化処理後も維持されているならば、リポソーム型人工赤血球の場合、自身への酸素傷害を防げるメリットがある。DMMBを用いて光不活化処理をした際の、SFH中の抗酸化物質 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR), glutathione (GSH) への影響について調べた。VSVに加えて、不活化すべき最も重要なウイルスである human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) の光不活化も行った。さらにMBによる光処理を行い、DMMBによる結果と比較した。

表4. DMMBによるVSV光不活化とSFHへの影響

| | No irradiation | 1.37 J/cm ² irradiation (%control) |
|---------------------------------------|----------------|---|
| VSV inactivation (log ₁₀) | 0 | 6.1 ± 0.3 |
| Met-Hb (%) | 1.3 ± 0.1 | 2.0 ± 0.1 |
| SOD (U/mL) | 4.5 ± 0.03 | 4.5 ± 0.3 (99.3) |
| CAT (U/mg protein) | 70.3 ± 1.6 | 68.5 ± 1.2 (97.4) |
| GPX (mU/mL) | 93.4 ± 2.7 | 88.6 ± 2.1 (94.8) |
| GR (mU/mL) | 13.0 ± 1.3 | 3.2 ± 0.7 (24.7) |
| GSH (μM) | 47.8 ± 0.2 | 46.3 ± 0.6 (96.8) |

DMMB: 2 μM, n = 4, mean = SD.

B. 研究方法

1) SFHの調製

赤血球を洗浄後、2倍容の蒸留水で溶血し、遠心 (36,000g, 30 min) した。その後、上清をフィルター (0.22 μm) で濾過し、さらに中空糸膜 (75 nm) で濾過した。

2) 光照射

DMMBはAldrich社より購入した。SFH 900 μL、ウイルスと色素 100 μL を直径 35 mmのwell に添加 (液厚1 mm) し、発光ダイオード照射装置 (peak 655 nm; midpeak bandwidth 29 nm) 中で照射 (3.17 mW/cm²) した。

3) VSVの感染価

単層培養したVero細胞 (アフリカミドリザル腎臓由来) にRPMIで10倍希釈系列にしたウイルス液を添加し、37℃で1時間、ウイルス接種。ウイルス液除去後、寒天培地 (0.2% agar in RPMI medium containing 2% FCS) を添加し、37℃で2日間、培養した。その後、培地を除去し、染色液 (0.1% crystal violet in ethanol) で15分間の染色後、染色液を除去し、水で数回洗浄し、プラークを計数した。

4) HIVの感染価

RPMI (10% FCS) で3×10⁵/mLに調節したM10細胞 (ヒトリンパ球由来) を96穴プレートに添加 (100 μL/well) し、その上に10倍希釈系列にしたウイルス液を添加した後 (100 μL/well)、5日間、37℃で培養した。その後、細胞をスライドガラスにスミアし、1000倍希釈した抗HIV血清と反応させ、FITC抗ヒトIgGで染色した。感染価はReed&Muench法により計算した。

5) SFHの機能測定

ヘモグロビンのメト化率はシアンメトヘモグロビン法により測定した。SOD, GPX, GR, GSHの活性はCALBIOCHEM社のアッセイキットにより測定した。CATの活性は紫外部吸収測定法により測定した。

C. 研究結果および考察

DMMB光処理によりVSVが3.3 log₁₀不活化された時、HIVは3.7 log₁₀以上不活化された (表3)。これらの結果は、DMMB光処理によりHIVはVSVと同程度不活化されるという事を示唆している。

DMMB光処理を行った時の抗酸化物質に対する影

表5. MB光処理によるSFHへの影響

| | No irradiation | 1.37 J/cm ² irradiation (%control) |
|--------------------|----------------|---|
| SOD (U/mL) | 5.1 ± 0.4 | 5.3 ± 0.2 (103.3) |
| CAT (U/mg protein) | 72.1 ± 2.2 | 66.9 ± 2.2 (92.8) |
| GPX (mU/mL) | 78.4 ± 2.3 | 68.4 ± 2.8 (87.3) |
| GR (mU/mL) | 12.1 ± 0.6 | 1.6 ± 0.4 (13.6) |

MB: 32 μM, n = 4, mean ± SD.

響を調べた(表4)。VSVを6.1 log₁₀不活化した時、SOD、CAT、GPX、GSHの活性変化は僅かであった。GRは75%失活した。同様にMB光処理を行った時の抗酸化酵素に対する影響を調べた(表5)。GRが86%失活した時、SOD、CAT、GPX、GSHの活性変化は僅かであった。MB、DMMB共に一重項酸素に対する量子収率が大きい。従って、GRは一重項酸素の攻撃に対し感受性が高いと推測される。

F. 研究発表 (2000.4. - 2001.3)

1. 論文発表

1) H. Abe, H. Sugawara, J. Hirayama, H. Ihara, T. Kato, H. Ikeda, K. Ikebuchi. "Removal of parvovirus B19 from hemoglobin solution by nanofiltration". *Artif. Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol.* 28, 375-383 (2000).

2) J. Hirayama, S.J. Wagner, H. Abe, K. Ikebuchi, H. Ikeda. "Involvement of reactive oxygen species in hemoglobin oxidation and virus inactivation by 1,9-dimethylmethylene blue phototreatment". *Biol. Pharm. Bull.* 24, 418-421(2001).

3) S. Wakamoto, M. Fujihara, H. Abe, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, H. Ikeda, K. Ikebuchi. "Effects of poly (ethyleneglycol)-modified hemoglobin vesicles on agonist-induced platelet aggregation and RANTES release in vitro". *Artif. Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol.* (in press).

4) H. Abe, K. Ikebuchi, K. Niwa, O. Inanami, M. Kuwabara, M. Fujihara, J. Hirayama, H. Ikeda. "Superoxide generation from human polymorphonuclear

leukocytes by liposome-encapsulated hemoglobin". *Artif. Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol.* (submitted).

5) H. Abe, K. Ikebuchi, J. Hirayama, M. Fujihara, S. Takeoka, H. Sakai, E. Tsuchida, Ikeda H. "Virus inactivation in hemoglobin solution by heat treatment". *Artif. Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol.* (submitted).

2. 学会発表

1) 平山順一、他 / ジメチルメチレンブルー (DMMB) によるストローマフリーヘモグロビン (SFH) 中ウイルス光不活化と抗酸化酵素への影響 / 第48回日本輸血学会 / 2000. 5.25-27 / 神戸

2) Hirayama J. et al. / Virus photoinactivation in stroma-free hemoglobin (SFH) by 1,9-dimethylmethylene blue (DMMB). / 13th International Congress on Photobiology / 2000 Jul 1-6 / San Francisco.

3) 平山順一、他 / ジメチルメチレンブルー (DMMB) によるストローマヘモグロビン (SFH) のウイルス光不活化と抗酸化系への影響 / 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

4) 藤原収子、他 / リポソームがヒト末梢血白血球に及ぼす影響-TNF-αの産生とSOD内包化による抑制効果 / 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

5) 阿部英樹、他 / ヘモグロビン溶液中ウイルスの加熱による不活化 / 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

6) 池淵研二、他 / 血液事業の立場から / 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

1. 細網内皮系におけるヘモグロビン小胞体の代謝過程
2. 人工赤血球投与時の肺微小循環動態に関する研究
3. リコンビナントアルブミン-ヘム投与後の血圧変化
4. 人工赤血球投与による抗腫瘍効果増強作用に関する研究

| | | | |
|-------|--------|------------------|----|
| 分担研究者 | 小林 紘一 | 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 | 教授 |
| 研究協力者 | 堀之内 宏久 | 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 | 講師 |
| | 渡辺 真純 | 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 | 講師 |
| | 岩丸 有史 | 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 | 助手 |
| | 山内 徳子 | 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 | 助手 |
| | 山本 学 | 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 | 助手 |

研究要旨 ヘモグロビン小胞体(HbV)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。

人工酸素運搬体を投与し、ガス交換の場である肺微小循環への影響をレーザー共焦点顕微鏡を用いて解析した。ラットを用いて直接的に生体下で観測、生理食塩水、オキシヘモグロビン(分子状酸素運搬体)、ヘモグロビン小胞体(細胞型人工酸素運搬体)を用いて、肺細動脈の変化を観測し、ヘモグロビン小胞体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。

組換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NO親和性は、Hbより9倍高い。しかしこれを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。

また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。

1. 細網内皮系におけるヘモグロビン小胞体の代謝過程

A. 研究目的

体内投与されたヘモグロビン小胞体(HbV)は細網内皮系に捕捉され、この際、一過性の食能の低下を引き起こすがその後亢進し、2週間後には正常値に戻ることを確認している。また、ヘモグロビン抗体染色から、ほぼ1週間後にヘモグロビンが代謝さ

れていることも確認した。引続いて詳細を検討するため、平成12年度では電子顕微鏡観察によるHbVの小胞体の形態の消失の確認、ヘモグロビンが代謝されたときのヘム鉄の沈着の有無、また脂質成分の蓄積の有無を確認することを目的とした。

B. 研究方法

HbV分散液は、既報に従い合成した。生理食塩水に分散させてHb濃度を10g/dLとした。Wistar系

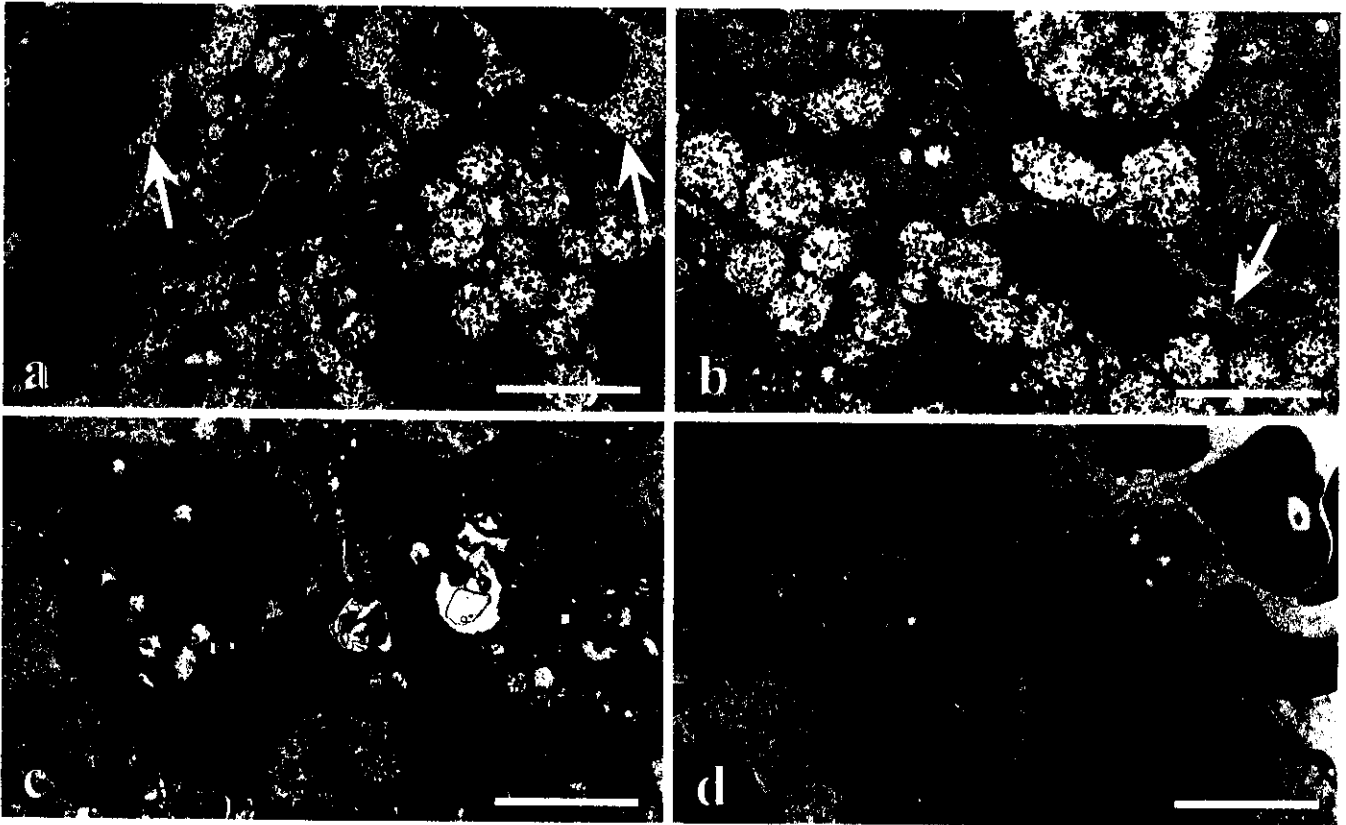


Fig. 1 Transmission electron microscopy of spleen (a, c) and liver (b, e) 1 (a, b) and 7 (c, d) days after infusion of HbV (20 ml/kg). The HbV particles are seen in the phagosomes (black arrows) and capillaries (white arrows) both in the spleen and liver after 1 day. After 7 days, no phagosomes with HbV particles can be observed (c, d). Bars indicate 5 μ m.

ラット(雄、体重約200g)を用い、エーテル麻酔下、尾静脈よりHb小胞体(20 ml/kg, 8匹)を投与した。腹部大動脈を切断して犠牲死させ臓器を摘出した。

電子顕微鏡観察の試料作成法は、先ず2.5%グルタルアルデヒド水溶液中で2mm³程度に臓器をカットして固定。次いで2%オスミウム水溶液で染色、Quetol 812で固定、Ultracut S microtomeで60-70 nmにスライスした。最後に酢酸ウラニル、鉛染色、クエン酸洗浄を経て、試料を作製した。電子顕微鏡JEM-100CX(日本電子)により写真撮影した。

光学顕微鏡観察の試料の作成法は、先ず各臓器をホルマリン固定しパラフィン包埋させ、ミクロトーム薄片を染色して行った。ヘモグロビンの代謝過程で産生されると考えられる鉄は、ベルリンブルー染色により行った。脂質の蓄積の有無の確認は、oil O red 染色により行った。

(倫理面への配慮)

外科的処置は全て全身麻酔下を実施、動物の苦痛を最小限にとどめた。なお動物実験は、文部省学術国際局長通知「大学等における動物実験について」

(文学情 第141号)および慶大医学部動物実験ガイドラインの倫理基準に沿って行った。

C. 研究結果および考察

肝臓と脾臓の電子顕微鏡写真において、投与1日後には食食細胞のファゴソーム(食胞)中に捕捉されている状態が確認された(Fig. 1)。また赤血球近傍にも粒子が存在し、投与1日後では血中にも多数存在していることを示している。赤血球と同様、HbV内部は鉄を含むため電子密度が高く、電子線の散乱が大きいため周りに比較して黒い粒子として見える。投与3日後には毛細管内には全く認められず、投与7日後にはHbV粒子は殆ど消失し、HbVの食食が確実に行われていることを確認した。

ベルリンブルー染色では、脾臓の白脾髄と、肝臓のクッパー細胞内とグリソン鞘に、投与3, 7日後に僅かに染色部位が認められた(Fig. 2)。HbVの代謝過程で遊離されたヘムは、ヘムオキシゲナーゼ-1で分解されると考えられる。一般に遊離鉄は、フェリチン蛋白質として蓄えられるが、鉄含量が50%以上に増大すると変性してヘモシデリンとして沈着し、

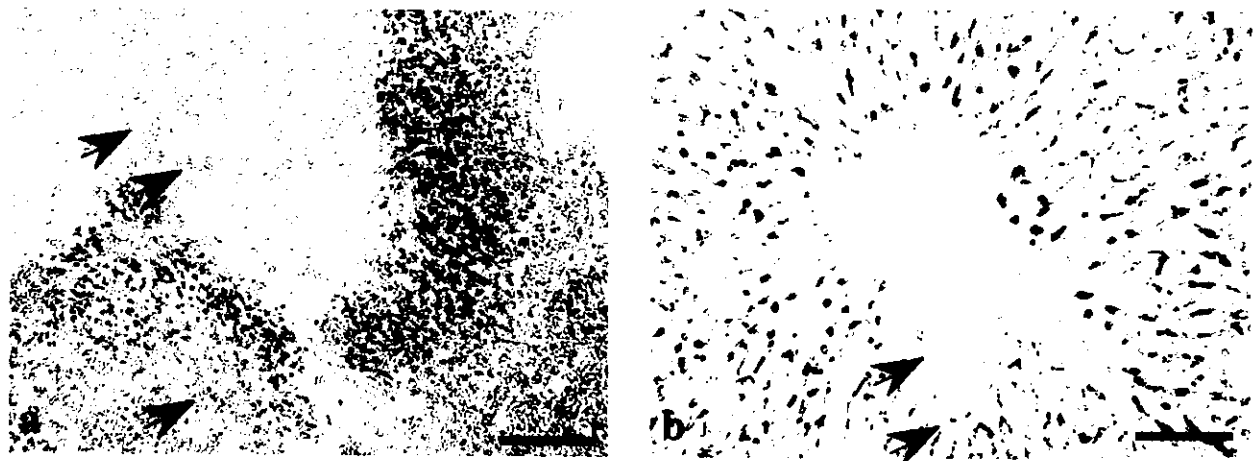


Fig. 2 Hemosiderin in spleen (a) and liver (b) 7 days after the bolus infusion of 20 ml/kg HbV suspension. Berlin blue stain was performed to examine the presence of hemosiderin. Slight deposition of hemosiderin is observed in both spleen (arrows in a) and liver (arrows in b). Bars indicate 100 μ m.

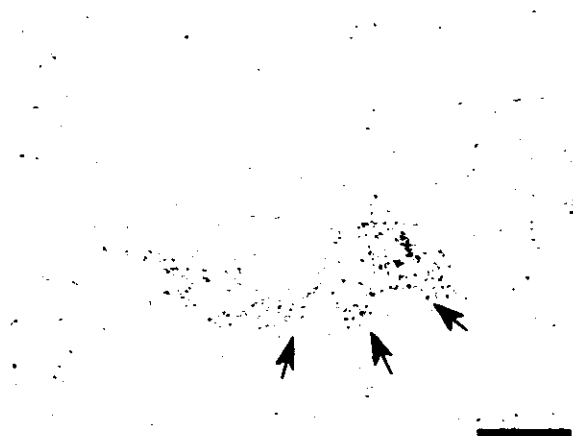


Fig. 3 Lipid deposition in the liver at 3 days after the bolus infusion of 20 ml/kg HbV suspension. The liver was stained with oil red O to confirm the presence of a domain of neutral lipid deposition. Slight lipid deposition is seen (arrows). A bar indicates 100 μ m.

本実験ではこれがベルリンブルー染色により検出された。しかし染色部位は極めて微量であり、14日後には完全に消失していた。従ってヘモシデリンの沈着は些少であり、鉄は通常の生理的反応により体内で再利用されていると考えられる。

一般にリン脂質とコレステロールから形成される小胞体は食食細胞に捕捉される。リン脂質はそこで代謝されるか、細胞膜の構成成分として再利用、或いは胆汁や呼気として体外に排泄される。他方、コレステロールは捕捉された後、リポ蛋白コレステロールとして血中出现、その後肝実質細胞に捕捉された後、胆汁中に排泄される。HbVの膜構成成分

も、同様の過程で代謝されると考えられる。オイルレッドO染色は投与3日後に肝臓でのみ確認されただけで、7日後には完全に消失していた(Fig. 3)。従ってリン脂質代謝過程の中間体であるグリセリドなどの中性脂質の沈着は僅かであり、代謝が速やかに進行していることを示している。

D. 結論

HbV分散液投与後の組織病理学的観察から、細網内皮系(脾臓、肝臓)でHbVの捕捉・代謝が行われ、1週間以内に代謝がほぼ完了することを確認した。また、HbVの投与が細網内皮系に不可逆な影響を与えるものではないと判断された。

(謝辞) 組織染色と解析において、池田英二先生(慶大医病理学科)の御協力を得た。

2. 人工赤血球投与時の肺微小循環動態に関する研究

A. 研究目的

人工赤血球を投与した際に肺微小循環で起る変化を生体下に観測し、その変化の原因を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

Sprague-Dawleyラットの胸壁に石英硝子製のウィンドウチャンバーを植込み固定した。肺微小循環の観察は、レーザー共焦点顕微鏡を主体とした生体血流観測装置を6-100 μm 程度の血管の血流循環動態を解析できるように設計した。肺微小循環の可視化はFITCアルブミンで血漿部分を標識し血管径を測定した。人工赤血球としてヘモグロビン小胞体(HbV)と比較試料としてオキシヘモグロビン(HbO₂)を用い、HbV群、HbO₂群、生理食塩水投与群に分け、各々2mLずつ静注し経時的に心拍数、細小肺動脈径を計測した。

C. 研究結果

FITCアルブミン投与により肺微小循環が可視化され、肺胞毛細血管および血管径約60 μm の肺動静脈を同定できた。細小肺動脈血管径はHbO₂投与群では投与前に比べ、投与後94.8 \pm 7.4%、5分後95.3 \pm 20.5%、60分後91.2 \pm 11.2%となり径の縮小傾向を認め、またHbV投与群では投与直後97.1 \pm 11.0%、5分後98.8 \pm 21.2%、60分後95.8 \pm 5.3%で、血管径に有意な差は認められなかった。生理食塩水投与群では、投与直後108.4 \pm 14.3%、5分後107.1 \pm 23.5%、60分後109.7 \pm 23%となり、増大傾向を示した。

また、心拍数はHbV投与では投与前163 \pm 12 beats/minが投与直後220 \pm 20 beats/minに上昇、その後1時間にわたり心拍数の増加が継続し、その後徐々に投与前の値に復した。生理食塩水投与群では心拍数の変動は有意ではなかった。

D. 考察

ヘモグロビン小胞体とヘモグロビンを投与したところ、肺微小循環は人工赤血球の種類により異なる反応性を示した。細胞型のヘモグロビン小胞体では肺微小循環に明らかな変化を与えず、分子状のヘモグロビンでは肺動脈の収縮を起こしたことは、生理活性物質である内因性一酸化窒素と相互に関連していると考えられた。

3. リコンビナントアルブミン-ヘムの一酸化窒素配位能と体内投与後の血圧変化

A. 研究目的

組換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(pH 7.3, 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。そこで、ラットへ投与した後の血圧変化を測定、ヘモグロビン溶液投与と比較検討することを目的とした。

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。Wistar rat (σ , 222 \pm 8.0 g)を用

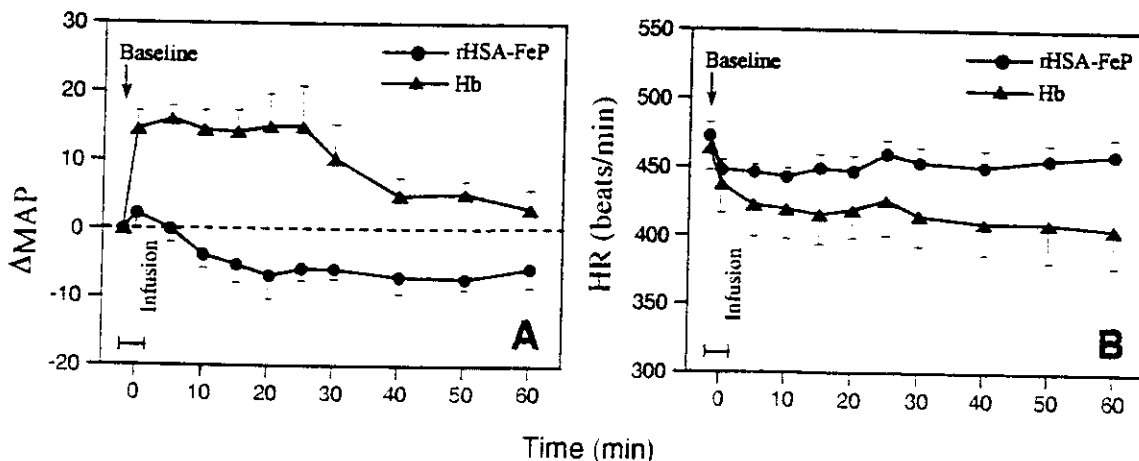


Fig. 4 Time dependence of MAP and HR after administration of rHSA-FeP in Wistar rats (n = 5).

いて実験を行った(n = 5)。Nembutalを腹腔内投与(50 mg/kg)し、全身麻酔をかけた後、後背位に固定し、右頸静脈にカテーテルを右心房付近まで挿入、V-lineを確保した。続いて頸二腹筋を縦方向に切開し、カテーテルを頸動脈に挿入、A-lineを確保して、血圧測定装置へ接続した。V-lineよりrHSA-FeP(300 mg/kg)を注入し、平均体血圧(MAP)、心拍数(HR)を連続測定した。また、同濃度のHb溶液(300 mg/kg)を投与した系(n = 5)を対照群とした。

C. 研究結果および考察

FePをrHSAに包接させることによりNO親和性が1/100に低下することを見出したが、HbのNO親和性($P_{1/2}^{NO}$: 1.5×10^{-5} Torr)に比べるとまだ9倍高い。つまり、これを酸素輸液として体内投与した場合、rHSA-FeP分子は内皮細胞を透過して平滑筋近傍まで到達して、NOを捕捉するので、血管収縮と血圧亢進、心拍数の低下を誘起するものと予想される。しかし、rHSA-FeP溶液をラットに静注したところ、投与60分後まで血圧と心拍数に全く変化は認められなかった(Fig. 13)。一方、Hb群では、投与5分後にDMAPが 16 ± 1.9 mmHgまで上昇し、HRも 464 ± 16 beats/minから60分後には 406 ± 27 beats/minまで低下した。rHSA-FeP投与群で血圧亢進が起きない理由は、アルブミンの表面電荷にあると考えている。すなわちアルブミンはHbに比べ等電点が負に大きく(pI: 4.8)、内皮細胞を取り囲む基底膜との間に静電反発を生じるために、その血管透過性はHbの約1/100と低い。つまり、rHSA-FePもHbに比べ血管透過性が低く、投与による急激な血圧上昇を起こさないと考えられる。腸管膜の微小循環動態観察、分離灌流肝の血管抵抗測定でも、rHSA-FeP投与による血管の収縮、血管抵抗の増大は認められなかった。

D. 結論

rHSA-FeP溶液を静注したラットでは、投与60分後まで、血圧と心拍数の変化は観測されなかった。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、血管内皮弛緩因子であるNOの捕捉が抑制され、投与による急激な血圧亢進は起こさないと考えられる。

4. 人工赤血球投与による抗腫瘍効果増強作用に関する研究

A. 研究目的

腫瘍組織は低酸素状態にあるため各種がん治療に対し抵抗性を持つ。従って、人工赤血球投与により腫瘍組織を酸素化できれば抗癌剤や放射線療法の抗腫瘍効果を増強できると考えられている。我々は移植腫瘍モデルに人工酸素運搬体を投与し、腫瘍内酸素分圧の上昇が得られるかを検討した。

B. 研究方法

人工赤血球：ヘモグロビン小胞体(HbV)、アルブミンヘム(rHSA-FeP)は物性デザインが可能な人工赤血球である。対照として5%アルブミン(rHSA)を用いた。方法：Ascites hepatoma LY80をDonryu rat大腿に移植し担癌モデルとし、人工赤血球を動注投与した。腫瘍酸素分圧(PTO_2)測定には、ポルフィリンの励起後燐光減衰時間から酸素分圧を測定するOxyspotを用いた。FiO₂ 0.99陽圧呼吸下、内頸動脈よりカテーテルを総腸骨動脈分岐部に留置した。動注前の腫瘍酸素分圧の平均値をコントロールとし、その後酸素飽和させた人工赤血球を2.5 ml/kg/minの速度で4分間動注した。15分間酸素分圧の測定を行い30秒ごとの平均値を求めた。

C. 研究結果

両者とも腫瘍酸素分圧の上昇を得た(Fig. 5)。増加率はrHSA-FeP群では最高約2.5倍に、HbV群では最高約1.8倍に増加した(rHSA-FeP群: P = 0.014, HbV群: P = 0.048)。

D. 考察

腫瘍組織の酸素分圧(PTO_2)は正常組織に比し著明に低下しており、単純に吸気中酸素濃度を高めても PTO_2 の上昇は得られない。このため、tumor oxygenationには人工赤血球投与等による直接的な酸素運搬が必要であると考えられる。

人工赤血球はその P_{50} や電荷、分子量等の性能を自由にデザインできるという特徴を持ち、また、粒子径が小さいこともあり、変形著しい腫瘍血管内を容易に通過していくことが可能と考えられ、それが結

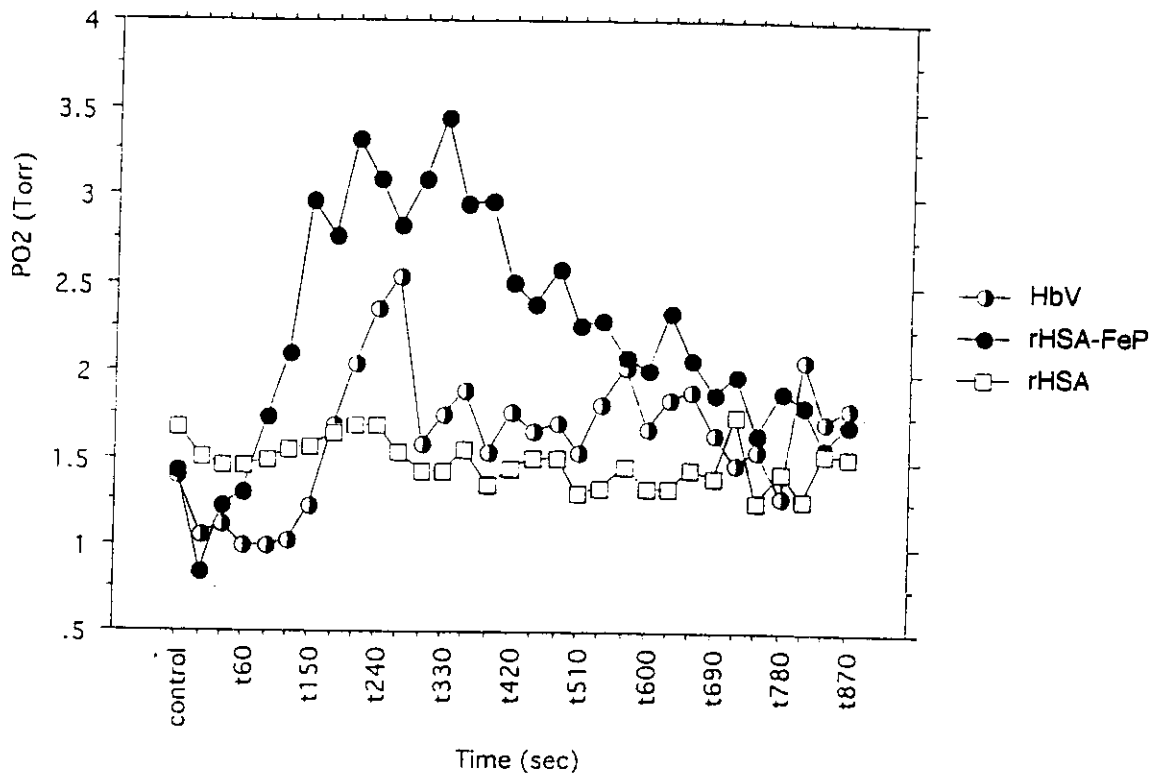


Fig. 5 O₂ tensions of LY80 tumor surface in rats (n = 4) following a 10 ml/kg arterial infusion of rHSA-FeP, HbV and rHSA ([rHSA] = 5 g/dL, FeP/rHSA (mol/mol) = 4, [Hb] = 5 g/dL)

果に反映されていると推察される。ただし今回の動注実験では、酸素分圧はある点を過ぎると時間経過とともに低下していく傾向にあり、また、過去の全身投与実験では確実なtumor oxygenationは得られていないことから、現時点では、酸素飽和した人工赤血球を腫瘍組織に到達させることが、腫瘍の酸素化に、まず必要であると考えられる。今回、移植腫瘍の動注モデルを作成したところ、人工赤血球投与による腫瘍内酸素分圧の改善を観測できた。

腫瘍血管の機能にはまだ不明な点も多く、*ex vivo*系における人工赤血球の腫瘍組織への到達が、腫瘍血管にどのような影響を与え、それが酸素分圧とどう関連しているか、今後検討してゆく必要があると考えられる。更に、1) tumor oxygenationによる腫瘍組織内の組織学的、生化学的変化の有無の検索。2) 各種癌治療と併用した抗腫瘍効果増強作用の検討。3) より効率の良い(腫瘍の性質に即した)人工赤血球のデザイン、等を引続き検討する予定である。

E. 結論

移植腫瘍モデルにおいて人工赤血球の動注投与により腫瘍酸素分圧の上昇が得られた。Adjuvantあるいはneo-adjuvantとして抗癌剤や放射線療法と併用することにより、抗腫瘍効果の増強が期待できる。

F. 研究発表 (2000.4. - 2001.3.)

1. 論文発表

1) A. Iwamaru, M. Watanabe, S. Yu, T. Ohtsuka, H. Horinouchi, K. Kobayashi. "Measurement of tumor blood flow using colored dye extraction microspheres in two rat tumor models". *Int. J. Oncol.* 18, 227-232 (2001).

2) H. Sakai, H. Horinouchi, K. Tomiyama, E. Ikeda, S. Takeoka, K. Kobayashi, and E. Tsuchida. "Hemoglobin-vesicles as O₂ carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system". *Am. J. Pathol.* (submitted).

3) A. Yoshizu, H. Horinouchi, K. Kobayashi, et al. "Resuscitation from hemorrhagic shock with hemoglobin-vesicle as an oxygen carrier in rabbit model". (to be submitted).

2. 論説

1) 小林紘一. "人工赤血球(人工酸素運搬体)②酸素運搬機能の評価" *血液・免疫・腫瘍 BIC Forum*, 6(1) 19-28 (2000).

2) 岩丸有史, 小林紘一. "海外論文紹介: 重症自己免疫性溶血性貧血症例に対するウシ重合ヘモグロビンの輸血". *人工血液* 8, 100-102 (2000).

3) 小林紘一. "人工血液"「第16回人工臓器学会卒後教育セミナー、人工臓器」川田志明 編、日本人工臓器学会、pp.45-51 (2000).

3. 学会発表

1) 岩丸有史, 井上芳正, 大塚崇, 堀口速史, 山内徳子, 安彦智博, 儀賀理暁, 澤藤誠, 渡辺真純, 川村雅文, 堀之内宏久, 小林紘一 / 2種の移植腫瘍モデルにおける、マイクロスフェアを用いた腫瘍血流の定量化と腫瘍血管の解析 / 第53回日本胸部外科学会総会 / 2000.10. / 大分

2) 山内徳子, 小林紘一, 堀之内宏久, 渡辺真純, 堀之内宏久, 岩丸有史 / 人工酸素運搬体投与時の肺微小循環動態の解析 / 第53回日本胸部外科学会総会 / 2000.10. / 大分

3) 岩丸有史, 小野滋司, 井上芳正, 大塚崇, 堀口速史, 山内徳子, 安彦智博, 儀賀理暁, 眞善康, 澤藤誠, 渡辺真純, 川村雅文, 堀之内宏久, 酒井宏水, 土田英俊, 小林紘一 / 移植肺癌モデルにおけるカラーードマイクロスフェアを用いた腫瘍血流の定量化と微小環境の観測 / 第100回日本外科学会総会 / 2000 / 東京サージカルフォーラム

4) 堀之内宏久, 山内徳子, 岩丸有史, 大塚崇, 田島敦志, 吉津晃, 泉陽太郎, 渡辺真純, 武岡真司, 酒

井宏水, 小松晃之, 土田英俊, 小林紘一 / ワークショップ2「人工血液臨床応用をとりまく問題点と対策」臨床の立場から / 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

5) 山内徳子, 山本学, 大塚崇, 岩丸有史, 渡辺真純, 堀之内宏久, 小林紘一, 武岡真司, 土田英俊 / 人工酸素運搬体投与時の肺微小循環動態の解析 / 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

6) T. Yamauchi, M. Yamamoto, T. Otsuka, M. Watanabe, H. Horinouchi, K. Kobayashi / The pulmonary microcirculation in living rats injected red cell substitutes. (poster) / The 8th International Symposium on Blood Substitutes / 2000. Nov. 9-11 / Hotel Hyatt Regency / San Diego.

7) 岩丸有史, 大塚崇, 渡辺真純, 堀之内宏久, 小林紘一 他, / 岩丸有史, 小山孝彦, 神山育男, 後藤太郎, 山本学, 井上芳正, 大塚崇, 堀口速史, 山内徳子, 安彦智博, 澤藤誠, 渡辺真純, 川村雅文, 堀之内宏久, 酒井宏水, 小松晃之, 土田英俊, 小林紘一 / 第101回日本外科学会総会 / 2001.4 / 仙台 (発表予定).

8) 山内徳子, 山本学, 大塚崇, 岩丸有史, 渡辺真純, 堀之内宏久, 小林紘一, 他 / 人工酸素運搬体投与時の肺微小循環動態の解析 / 第101回日本外科学会総会 / 2001.4 / 仙台 (発表予定).

9) T. Yamauchi, K. Kobayashi, H. Horinouchi, M. Watanabe, A. Iwamaru, et al. / Effect of red cell substitutes on the pulmonary artery microcirculation in living rats. / ATS 2001 / 2001. 5 (submitted).

非細胞型・細胞型ヘモグロビン酸素運搬体の網内系代謝の解析と 臓器機能恒常性に及ぼす影響の検討

分担研究者 末松 誠 慶應義塾大学医学部医化学 教授

研究要旨 肝臓はヘモグロビン(Hb)分子を修飾した人工酸素運搬体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。人工酸素運搬体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。細胞型のHb小胞体にはこのような作用は見られなかった。

A. 研究目的

ヘモグロビン(Hb)はハプトグロビンにより肝臓などに運搬されheme oxygenase (HO)により分解されて胆汁色素であるbiliverdinと一酸化炭素(CO)として代謝される。我々は最近肝臓で内因性に生成される一酸化炭素(CO)が類洞血管抵抗を生理的レベルに低く保つために必要不可欠であることを報告した(1, 2)。Hbをベースにした酸素運搬体はこのようなCOの効果をキャンセルする可能性があることを昨年報告したが、今年度はヘム分解の結果生じるビリルビンの生成動態と肝臓機能の修飾作用の関係について詳細な定量的検討を加えたので報告する。またショックなどの病態においては誘導型HOの発現が量的、部位的に変動することによりHb由来のヘムの分解の速度とコンパートメントが大きく変化することが示された。実験動物レベルとはいえこれらの結果は無細胞型ヘモグロビン修飾体を体内に投与した場合、ストレス応答を示した肝臓では通常では考えられない速度でヘム分解が進行し肝臓の胆汁分泌能や類洞血流維持に悪影響を及ぼす可能性があること、細胞型Hb製剤はヘム分解が緩やかに進み、臓器機能への影響も少ないことを示している。以下にその実験成績を示す。

B. 研究方法

既報の方法(3)によりラット分離灌流肝を作成し血

管抵抗と胆汁分泌をモニターした。ラットはmale Wistar strainを用い内毒素O111B4 (E coli) を4 mg/kgで腹腔内投与した群とvehicle投与群で比較検討した。門脈から終濃度1.5g/dlでHb, metHbおよびリポソーム封入型のHb小胞体 (HbV)を投与し15分間灌流したのちこれらを灌流回路から除去してさらに灌流を続行した。肝臓にとりこまれたHbやmetHbの分解は胆汁中のbilirubin-IXalpha(BR-IXα)をELISAで測定することにより施行した。また内毒素処置におけるHO-1やinducible NO synthase (iNOS)の発現はそれぞれの単クローン抗体を用いたWestern blotting analysisにより行った。また一部の実験では胆汁外嚢を作成しin vivoでHb, met Hb, HbVのいずれかを投与し胆汁流量とBR-IXαの変動と解析した。

C. 研究結果

内毒素処理によりHO-1とiNOSが著明に誘導され、免疫組織学的検討によりその大半は肝細胞に発現していることが確認された。図1に内毒素(LPS)投与6時間後の肝臓におけるNO、CO生成酵素であるiNOSとheme oxygenase-1 (HO-1)およびおのこのガスの生成量の変化を示す。Western解析に示すように内毒素投与により二つの酵素の発現は著明に増加した。正常肝に比べて約4倍にNOの代謝産物であるnitriteやCOが増加することが確認された。ここにNO生成酵素の阻害剤であるaminoguanidine

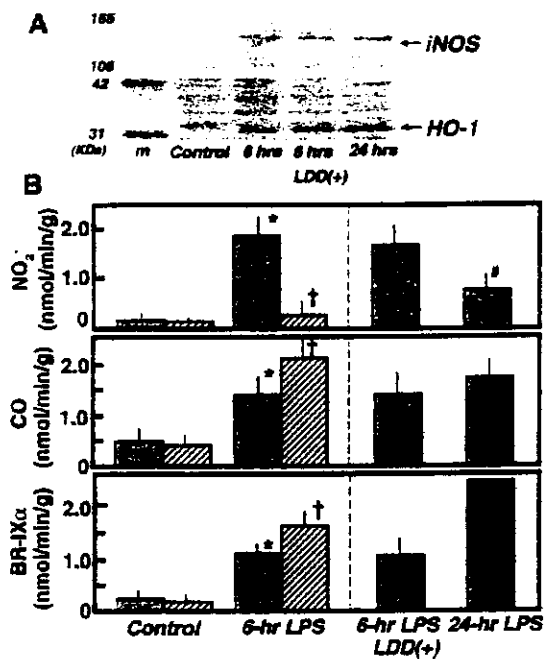


図1 内毒素暴露肝におけるiNOS HO-1の発現およびNO₂⁻, CO, bilirubin(BR)-IXαの生成。LDD(-): Kupffer cell減少処理。

(AG) 1mMを投与するとNO生成は著明に低下する一方、対照的にCOの生成が増加した。すなわちLPS刺激を受けた肝臓ではNOの低下に際してCOが代償的に増加することが明らかになった。またKupffer cellのNO、CO生成における役割を調べる目的でKupffer cellをapoptosisにより消去する薬剤であるliposome-encapsulated dichloro diphosphonate (LDD)を処理してもiNOSの発現およびNOの生成量には大きな低下は認めなかった。したがってNO生成の主要なコンパートメントは肝実質細胞であることが示唆された。

正常肝および内毒素肝に1.5 g/dlのHb, metHbおよびHbVを投与した際の血管抵抗の変動を図2に示した。基礎抵抗値は内毒素群で有意に高値を示した。Hbの投与では既報のごとく正常肝臓で抵抗の上昇を認めたが内毒素処理群では上昇反応は約2倍に達した。metHb投与では正常肝臓では昇圧反応を示さなかったが内毒素肝ではHbの50%程度の増加を示した。HbはCO、NOを共に消去するのに対しmetHbがNOのみを消去することを考慮すると、正常肝の血管抵抗がCOで制御されるのに対して内毒素肝では

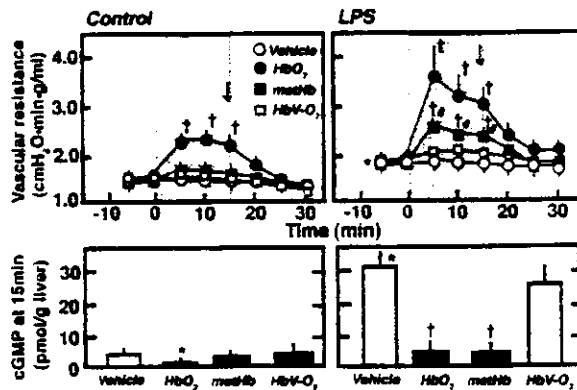


図2 正常および内毒素肝臓におけるHb, metHb, HbV投与時の血管抵抗の変動と投与15分後の組織cGMP量の変化。

NO依存性の血管抵抗上昇抑制作用が加わることを示唆している。またこれらのガス状メディエータの存在なしには各肝臓が生理的な血管抵抗維持ができなくなることも明らかにされた。HbVではこのような昇圧反応は正常、内毒素処理群双方で認められなかった。次に正常肝および内毒素肝に1.5 g/dlのHb, metHbおよびHbVを投与した際のBR-IXαの胆汁排泄量の変動を図3に示した。Hbの投与では正常では利胆が観察されたが、LPS肝では胆汁分泌の著明な低下が起こった。一方metHbやHbVと投与では両群ともに大きな変化は見られなかった。このことからNO、CO双方が同時に細胞外で捕捉されてしまうと胆汁流量が低下することが示唆された。またHb, metHbを投与すると数分以内に胆汁中にbilirubinが数倍に増加した。とくにmetHbでは15分後におけるbilirubin増加量はHbの3~4倍に達した。この増加はmetHb、Hbの投与停止後も続き急激に上昇した。一方HbV群ではbilirubin増加量はHb群の約30%程度にとどまった。投与30分後のbilirubinの生成量を考慮すると、hemeの分解速度は正常肝臓の数十倍に亢進していることが明らかになった(図3)。metHbがCOを捕捉しないことを考慮するとmetHb投与時には大量のCOが遊離していると考えられる。またHbVは肝臓での分解速度が非細胞型に比べて遅いことが明らかになった。

HbVの分解コンパートメントをさらに詳細に検討する目的でKupffer cellを減少させるLDDを処理した時のbilirubin生成動態の変化を図4に示した。LPSを

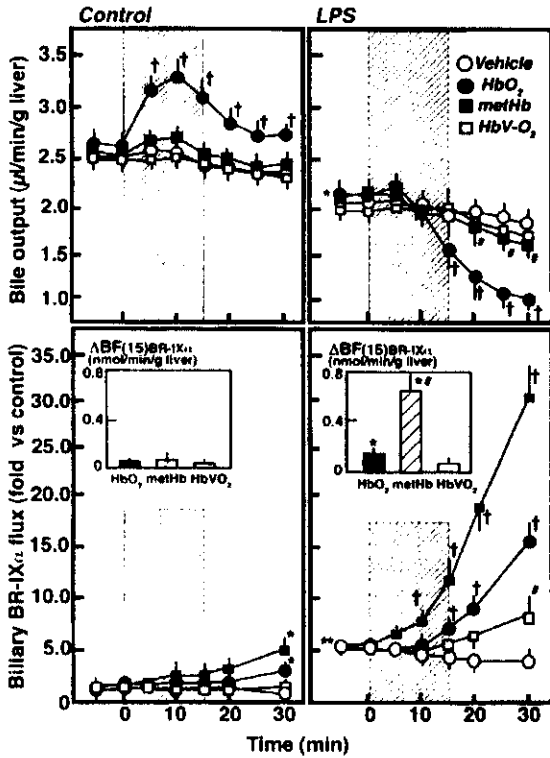


図3 正常肝臓(左)および内毒素肝臓(右)におけるHb, metHb, HbV投与時の胆汁流量とbilirubin (BR)-IXalphaの変動。各Hb製剤は15分間投与しperfusion circuitからwash outした。下段insertは15分におけるbilirubin-IXalphaの分泌量を示す。

処理した肝臓では蛍光ラテックス粒子のphagocytic clusterが観察されるがLDDの処理によりほぼ完全に消去された。このような状況では非細胞型Hbでは分解速度に変化は認めないが、HbVのヘム分解は有意に低下することからHbVの分解の主たるコンパートメントはKupffer cellであることが示された。一方こ

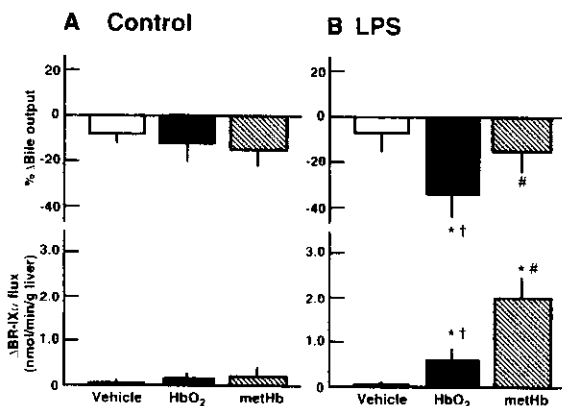


図5 In vivoにおけるHb metHb投与後の胆汁流量変化とbilirubin分泌量の変動。

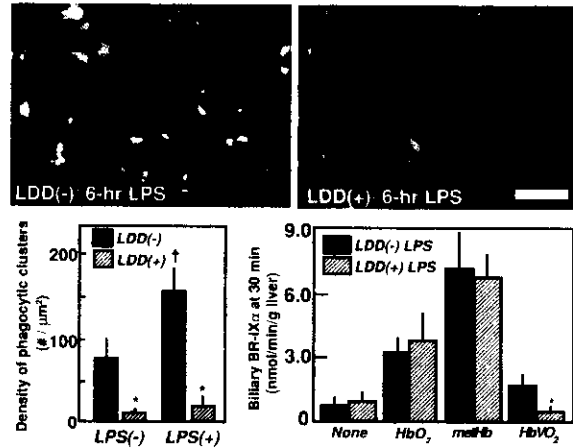


図4 内毒素肝臓におけるphagocytic activitiesの変化とLDD処理によるKupffer cell depletionによるbilirubin (BR)-IXalpha分泌量の変化。各Hb製剤は15分間投与しperfusion circuitからwash outした。HbVO₂のみがLDD処理により有意に減少した。*P<0.05

これらの成績は類洞血管内皮細胞を通過できるHb metHbが主に肝実質細胞で代謝されることも示唆していると考えられた。

これらの結果から実際にin vivoで非細胞型Hbを投与すると肝臓からの胆汁分泌が増加するか否かを検討したのが図5である。内毒素処理肝ではHbの投与により著明な胆汁低下とbilirubin分泌の増加を呈したが、metHbではbilirubinの増加のみで流量低下は起

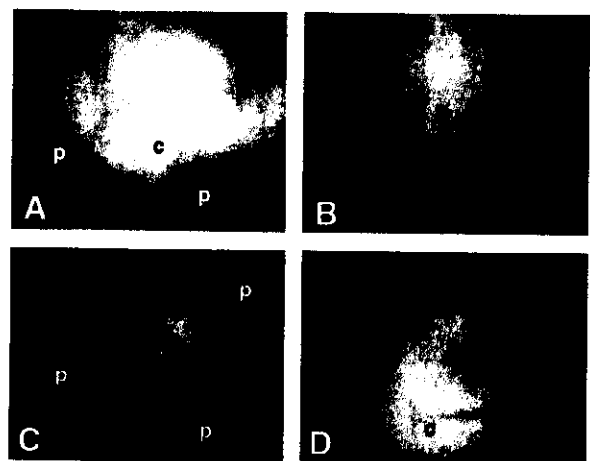


図6 HbおよびmetHbを投与した際の灌流肝におけるlobular perfusionの変化。A normal liver, B LPS liver, C LPS + Hb, D LPS + metHb。Hb投与時には門脈領域(P)に染色の著明な低下が起きていることが示される。Bar = 100 µm