

厚生科学研究費補助金

高度先進医療研究事業

臨床応用を目的とした生体機能代替可能な
人工赤血球の開発に関する研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北 島 顕

平成 13 (2001) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
臨床応用を目的とした生体機能代替可能な人工赤血球の開発に関する研究 北島 顕	1
II. 分担研究報告	
1. 臨床応用を目的とした生体機能代替可能な人工赤血球の開発に関する研究 佐久間一郎	16
2. 臨床応用を目的とした生体機能代替可能な人工赤血球の開発に関する研究 藤井 聡	28
3. 臨床応用を目的とした生体機能代替可能な人工赤血球の開発に関する研究 仲井 邦彦	33
4. 臨床応用を目的とした生体機能代替可能な人工赤血球の開発に関する研究 藤堂 省	38
5. 臨床応用を目的とした生体機能代替可能な人工赤血球の開発に関する研究 劔物 修	43
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	47
IV. 研究成果の刊行物・別刷	48

総括研究報告書

臨床応用を目的とした生体機能代替可能な人工赤血球の開発に関する研究

主任研究者 北畠 顕 北海道大学大学院医学研究科教授

研究要旨 本研究班では平成11年度までに人工赤血球として、高圧ジェット流反転型乳化機を用いた各種新規パーフルオロケミカル（PFC）製剤と、ヘモグロビン（Hb）修飾体としてポリエチレングリコール（PEG）修飾HbさらにSNO-PEG-Hbを創製した。平成12年度からはその臨床応用を企図した研究を推進するべく、ヒューマンサイエンス振興財団招へい外国人研究者米国ノースウエスタン大学医学部輸血部長の照屋純博士と米国の人工血液開発の現況とその臨床応用の可能性について討論し、臨床応用に即した実験を企画した。また、人工赤血球の臨床応用を可能とするためには、医療経済学的検討が必要であり、そのためにはまず適応があり、需要が見込まれる病態の特定とそのシミュレーションモデルでの検討が重要であることが確認された。平成12年度はまず30%PEG修飾PFC製剤について、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ラット血液70%置換モデルで酸素供与能を評価し、同製剤が生体内の酸素供給能からみて従来のFluosol-DA[®]を凌駕する製剤であることを明かした。また、PFC製剤の血小板活性化を検索し、PEG修飾タイプの活性化が軽微であることを確認した。さらに各種PFC製剤の臨床応用の可能性を探るため、脳死肝移植時の肝保護液への添加の有用性、および心臓外科手術での人工心肺施行時の同種血輸血回避への応用について検討した。肝臓に関しては37℃条件下において50%PEG修飾PFC製剤を20%添加し、さらにそれを酸素でバブリングした溶液中でラット単離肝を保存することより、灌流停止および再灌流による障害から肝細胞を保護することが可能であることが示された。人工心肺施行実験においては、ビーグル犬を用い、40%PEG修飾PFC製剤を最終血中濃度として約15%となるべく使用することにより、術中失血（ヘマトクリット15%）で生ずる乳酸濃度上昇、血液酸性化が回避され、失血による全身循環・代謝の悪化を改善可能であることが明らかとなった。次にHb修飾体に関しては、SNO-PEG-Hbの安定供給を行い、その臨床治験に向けて各種Hb修飾体とともに急性毒性試験を行った。全血液量の30%に相当するHb溶液を単回投与して肝機能および腎機能の変化を観察した結果、SNO-PEG-Hbは十分な生体適合性を有していることが示された。PEG-Hbにおいてはある程度の侵襲が示唆されたが、許容範囲内と考えられた。また、各種Hb修飾体の血小板活性化をin vivoおよびin vitroでレーザー散乱型血小板凝集能測定装置やフローサイトメトリーを用い、血小板凝集能や血小板CD62P発現を検索した。その結果、SNO-HbはNOの血小板凝集抑制作用により、PEG-Hb修飾体はPEGの分子バリアー効果により、無修飾Hbに比べ血小板活性化作用が少ないことが示された。また、Hb修飾体制剤の臨床応用としてイヌ原虫感染症における急性貧血への投与の有用性を検討した。イヌのバベシア感染症による急性貧血に対し、PEG-Hbを投与することにより臨床経過が改善され、原虫感染症に起因する急性貧血治療に対するHb修飾体制剤の臨床的有効性が確認された。一方、ウサギの大動脈遮断モデルを用い、大動脈手術時の脊髄麻痺回避へのSNO-PEG-Hbの応用を検索したが、本モデルでは側副血行路がないモデルであり、SNO-PEG-Hb投与は神経虚血保護薬では認められる脊髄麻痺改善効果を発揮できなかった。

分担研究者

佐久間一郎	北海道大学医学部附属病院講師
藤井 聡	北海道大学医学部附属病院講師
仲井 邦彦	東北大学大学院医学系研究科助教 授
藤堂 省	北海道大学大学院医学研究科教授
劔物 修	北海道大学大学院医学研究科教授

1. 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新規パーフルオロケミカル製剤の人工酸素運搬体としての機能評価 (佐久間)

A. 研究目的

人工酸素運搬体としてパーフルオロケミカル (PFC) エマルジョンが研究されてきた。PFCエマルジョンは、以前わが国で開発されたミドリ十字製 Fluosol-DA[®]が経皮的冠動脈拡張術での酸素補給液として製造許可を受けたものの、乳化技術の未熟に起因するPFC濃度の限界 (20%) による酸素供給能の低さ、血中滞留時間の短さ、一方PFCとして加えたFTPAの血中半減期が長いこと、さらにエマルジョン安定化のために加えた表面活性剤Pluonic F-68による網内系活性化などが問題となり、現在は製造中止されている。近年、米国で改良された60%PFC製剤 (Oxygent[®]) が、赤血球輸血代替で臨床第三相まで治験が進んでいた。しかし、血小板活性化に起因すると思われる脳卒中の増加により、治験が中断している。本研究班では平成10年度より神戸学院大学薬学部製剤学福島昭二講師と共同研究を行い、彼が特許を有する新規高圧ジェット流反転型乳化機を用いてPFCエマルジョン製剤の改良を加えてきた。そして、プロトタイプ製剤として、Fluosol-DAの主成分であるパーフルオロデカリンを30%含有し、血小板活性化防止、網内系に対するステルス化および分子サイズの増大を企図してエマルジョンの表面をポリエチレングリコール (PEG) で修飾したもの (Neo-PFC) を創製した。本研究ではNeo-PFCの酸素供給能を、以前より人工赤血球の機能評価に利用している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により、従来のFluosol-DAおよびバッファーと比較検討し、その

臨床的有用性を検索した。

B. 研究方法

雄性WistarラットをPentobarbital (50 mg/kg, i.p.) で麻酔し、100%酸素吸入下に大腿静脈からウシ血清アルブミン (BSA) を2%含有するPFC製剤もしくはバッファー溶液 (BSA-Saline buffer) を注入しつつ、同時に大腿動脈から1 ml/分で脱血し、最終的に70%の血液をPFC製剤もしくはBSA-Saline bufferに置換した。その後、酸素・窒素比を徐々に減少させ、酸素分圧を段階的に減少させた。大腿動脈血および頸静脈血中酸素濃度を逐次測定した。脳内の酸素化状態の把握には近赤外分光測定を行った。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, 805 nmの4波長の吸光度を同時に計測し、酸素化ヘモグロビン、脱酸素化ヘモグロビン、全ヘモグロビン、およびチトクロームオキシダーゼ (Cyt. ox.) 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。

PFC製剤の一方はミドリ十字製Fluosol-DA[®]であり、北海道大学電子科学研究所超分子分光教室に以前より冷凍保存されていたものである。もう一剤は本研究班研究協力者神戸学院大学薬学部製剤学福島昭二講師が新規に製作した30%パーフルオロデカリン製剤 (Neo-PFC) であり、同剤はエマルジョンの表面をポリエチレングリコール (DSPE-PEG) にて修飾している。乳化剤としては精製卵黄レシチンを使用し、新規高圧ジェット流型乳化機ミニDeBEEを用いて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安定したエマルジョン製剤を製造した。600 Torrにおいて、70%置換状態のFluosol-DAおよびNeo-PFCの酸素溶解度はそれぞれ10 vol%および12 vol%となった。

C. 研究結果

Fluosol-DAではFiO₂が100%~60%まで、チトクロームオキシダーゼが100%酸化されていたが、Neo-PFCではFiO₂が40%となるまで100%酸化が保たれ、その後も他群より酸素化が高い状態で推移した。一方、BSA-Saline bufferではFiO₂が80%から徐々に酸化率が減少した。静脈血PO₂はNeo-PFC > Fluosol-DA > BSA-Saline bufferとなった。FiO₂が100%~60%まではNeo-PFCとFluosol-DAの酸素

供与能は同等で、BSA-Saline bufferを有意に凌駕したが、FiO₂が40%~20%ではNeo-PFCの酸素供与能が他群より有意に高かった。一方、FiO₂が10%以下では三群間に有意差は認められなかった。

D. 考察

本研究で使用したNeo-PFCのPFC濃度は30%であり、Fluosol-DAの20%と比較して10%の増加のみであり、70%置換状態のFluosol-DAおよびNeo-PFCの酸素溶解度はそれぞれ10 vol%および12 vol%であったが、FiO₂が40%~20%において酸素供与能に有意差が認められた。図4で静脈血PO₂がNeo-PFC > Fluosol-DA > BSA-Saline bufferとなったが、酸素供給能が低い状態で静脈血の酸素濃度低下が起こったためと考えられる。本検討の結果、プロトタイプのPFC製剤であるNeo-PFCの酸素供与能がFluosol-DAに勝ることが明かとなったが、米国のPFC製剤 (Oxygent[®]) のPFC濃度は60%を達成している。またNeo-PFCはエマルジョンの表面をPEG修飾しているが、同修飾による有用性に関しては別に詳細な生物学的検討や毒性試験等を行い、検討を加える必要がある。PFC製剤の酸素供与能はPFC濃度に比例する事実を考えれば、今後さらに製剤の改良を加えてPFC濃度を高め、さらに臨床応用に近づく製剤を創製する必要があると思われる。

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、本研究班で創製されたPFC製剤であるNeo-PFCが生体内の酸素供給能からみて従来のFluosol-DAを凌駕する製剤であることが明かとなった。

2. ラット単離肝虚血再灌流モデルを用いたパーフルオロケミカル製剤による肝保護作用の検討 (藤堂)

A. 研究目的

脳死臓器移植がわが国でも開始され、脳死肝移植についても今後さらに症例数の増加が予想される。脳死肝移植実施上の問題点のひとつは、donor肝輸送時の肝細胞保護および再灌流時の肝細胞障害である。Donor肝は4°Cに保たれた保護液に浸して輸送され、その最大許容時間は24時間とされている。これはdonor心における4時間と比して余裕があるものの、その間できるだけ肝細胞が保護されること

が望ましいと思われる。肝臓は4°Cに保たれた状態でも多少酸素消費が行われているものと考えられ、その間に多少なりとも酸素を供給することは、donor肝輸送時の肝細胞保護および再灌流時の肝細胞障害回避に結びつく可能性がある。パーフルオロケミカル (PFC) 製剤はヘモグロビン修飾型の人工血液と異なり、4°Cにおいても理論上酸素供給が可能であることから、保護液に添加することにより肝細胞保護作用を発揮することが期待される。

本研究ではPFC製剤が肝移植時のdonor肝細胞保護に応用可能か否かを検討するため、われわれが薬剤の肝保護作用を評価するために利用しているラット単離肝虚血再灌流モデルを用い、非低温条件下でPFC製剤を混合した臓器灌流液が、灌流停止放置状態の摘出肝臓に酸素を供給することより、灌流停止および虚血再灌流に基づく種々のストレスによる障害から肝細胞を保護するか否かを検索した。

B. 研究方法

飲水と食餌を自由に与えた雄性Lewisラット (体重190~240 g) を実験に供した。ペントバルビタール (50 mg/kg) を腹腔内投与後、ヘパリン1000IUを陰茎背静脈より投与した。腹部横切開により腹膜内に到達し、総胆管にポリエチレンチューブ (Clay Adams, PE10) を挿入し、次いで、門脈に14G ETFEチューブ (Terumo, SURFRO) を挿入した。その後直ちに灌流回路とETFEチューブを連結し、肝臓を30 mlのKrebs-Henseleit bicarbonate buffer solution (KBS: 95% O₂、5% CO₂にて酸素化) にて、初期圧10 cmH₂Oにて灌流した。30 mlの灌流終了後、カニューレが付いた状態で肝臓を単離し、重量測定を行った後に虚血ユニットに移した。虚血ユニットは恒温槽 (37°Cに設定) とプラスチック製の外とうで囲まれており、内部は30 mlのKBSで満たされている。灌流終了後の肝臓は、同虚血ユニット内でKBSに浸された状態で90分間静置された。再灌流装置はコンピューターで制御されたローラーポンプ (Model Miniplus 3, Glison Electronics, Villers le Bel, France)、恒温ユニット、ハミルトン酸素化装置、門脈圧測定用圧測定装置とリザーバーからなっており、ハミルトン酸素化装置、門脈圧測定用圧測定装置およびリザーバーはサーモスタットにより制御された恒温キャビネットの中に設置されている。ハミルトン酸素化装置は常に95% O₂、5% CO₂ガスが吹き込まれた。単離肝臓の再灌流はKBSに10 micromol/hrでタウロコール酸を加えて行い、コンピューターに

より、門脈圧が常に5 cmH₂Oとなるように制御した。単離肝臓はレザバーの上に静置し、120分間再灌流された。

PFCは本研究班研究協力者である神戸学院大学薬学部薬効学福島昭二講師より供給されたもので、50%パーフルオロトリブチルアミン (FC-43) 50%を含有するエマルジョンであり、エマルジョンは精製卵黄レシチン (2.4%) からなり、表面修飾を0.12%のポリエチレングリコール (PEG) リン脂質により行っている。PFC製剤投与時は、電解質濃度をKBSと同様となるよう補正し、さらにその膠質浸透圧が水と同様であることから、ウシ血清アルブミン2%を加えた。なおPFC製剤は初期肝臓灌流用KBSと虚血ユニット内のKBSに添加し、再灌流液には添加しなかった。

本研究では再灌流までの処置を以下の3群に分けて行った (n=1~3)。第一群：KBSのみでPFCを添加しなかった群、第二群：PFCを20%添加し、KBSを95% O₂、5% CO₂ガスでバブリングしなかった群、第三群：PFCを20%添加し、KBSを95% O₂、5% CO₂ガスでバブリングした群。

肝障害の評価は以下の方法で行った。1) 門脈流量：5 cmH₂Oの定圧灌流における流量を計測し、持続的にモニターした。2) 胆汁排出量：胆管よりの再灌流120分間の胆汁排出量を計測した。3) LDH放出量：再灌流30、60、90、120分後の灌流液中のLDHを測定した。4) 酸素消費量：再灌流30、60、90、120分後の流入液および流出液中の酸素分圧を計測し、肝臓の酸素消費量を算出した。

C. 研究結果

再灌流90分後の門脈流量は、第一群：0.75 ± 0.06(SD) ml/min/g liver、第二群：0.56 ml/min/g liver、第三群：1.17 ± 0.30 ml/min/g liverとなり、第三群で有意の流量増加が認められ、肝血管抵抗の減少が確認された。胆汁排出は三群とも確認されなかった。再灌流120分後のLDH放出量は、第一群：4334 ± 365(SD) IU/L/g liver、第二群：3732 IU/L/g liver、第三群：3939 ± 470 IU/L/g liverとなり、PFC製剤使用群で減少傾向にあった。再灌流90分後の酸素消費量は、第一群：0.399 ± 0.024(SD) micromol/min/g liver、第二群：0.268 micromol/min/g liver、第三群：0.639 ± 0.195 micromol/min/g liverとなり、第三群で酸素消費の増加が確認された。

D. 考察

本研究の結果より、常温下においては本研究で用いた50%PFC製剤を20%添加し、さらにそれを常時酸素化した条件下では、灌流停止による虚血および再灌流に基づく種々のストレスに起因する障害から、肝細胞をある程度保護することが可能であることが明かとなった。本モデルは温粗血モデルであるため、肝細胞の障害および薬剤によるその保護作用が出現し易いモデルと考えられる。実際の生体肝移植においては、肝臓を4°Cで保存することから、実際の臨床をシミュレートした実験としては、今後まず低温下において同様な実験を度施行する必要があると考えられる。また臨床実地上、酸素のバブリングは装置等の問題から煩雑であり、輸送時に実施することは回避すべきものと思われるので、十分に酸素化したPFC添加液を保護液として用いた場合の肝保護効果を評価すべきであろう。これらの実験は平成13年度に遂行予定である。PFC製剤が生体肝移植時に実用化される可能性に関してはこれらを評価し、さらに大動物モデルで実験を繰り返した後に議論すべきと思われる。その際には、当然PFC製剤の安全性および医療経済的実用性がさらに検討される必要がある。

本研究で用いたPFC製剤はPEG修飾が施されている。PEG修飾はPFC製剤の免疫的ステルス性を高め、また血小板活性化を減弱させる作用をもたらすとされているが、それらが肝臓保護作用に寄与するか否かについては、PEG修飾を施していない製剤との比較検討が必要であり、現在実験を遂行中である。

本研究の結果は、脳死肝移植時の肝臓保護のみならず、脳死心移植時の心臓保護に応用できる可能性がある。脳死心はdonorから掲出後4時間以内に移植されなければならず、時間の制限が移植施設等を決定する重要なファクターとなっており、さらに交通事情等によりもし移送の遅延が起これば、recipientにも不利益が生ずる危険が高い。もしPFC製剤の使用により保存時間の延長がもたらされるならば、その臨床的有用性は非常に大きいと考えられる。今後、移植心保護へのPFC製剤の応用についても検討がなされるべきと思われる。

E. 結論

PFC製剤が肝移植時のdonor肝細胞保護に応用可能か否かを検討するため、ラット単離肝虚血再灌流モデルを用い、PFC製剤を混合した臓器灌流液が、灌流停止放置状態の摘出肝臓に酸素を供給することより、灌流停止時の肝細胞保護および再灌流に基づく種々のストレスによる肝細胞障害からの保護が可

能か否かを検索した。その結果、37°C条件下において50%PFC製剤を20%添加し、さらにそれを酸素でバブリングした溶液中で単離肝を保存することより、虚血および再灌流による障害から肝細胞を保護することが可能であること明かとなった。

3. ビーグル犬を用いた人工心肺施行時の失血時におけるパーフルオロケミカル製剤投与の有用性の検索（飼物）

A. 研究目的

同種輸血は最近の遺伝子技術を駆使してもウイルス感染症やGVHDなどを完全には回避できず、100%安全な治療法とはいえない。外科手術時、特に開心術では人工心肺の使用により血液希釈が起こり同種血輸血が必要となることがしばしばある。無輸血手術を拡大するために術前に患者本人から貯血を行うなどの方法により輸血回避が試みられており、自己血輸血は外科手術においてルーチンな方策となっているが、患者の術前状態に問題がある場合や循環血液量の少ない小児症例などでは不可能な症例が多く、いまだ無輸血手術施行率は低い状態である。パーフルオロケミカル（PFC）は酸素供与能を有し、PFCを脂質エマルジョンに溶解したPFC製剤は人工血液として利用可能である。実際米国においては、第2世代PFC製剤ともいべきOxygent[®]が、現在自己血輸血時のさらなる同種血輸血回避を目的として治験第3相を行っている。しかるに、同剤では冠動脈バイパス手術時の輸血回避目的に使用した治験において、脳卒中が増加し、治験が中断している。その理由として、PFC製剤による血小板凝集活性化の関与が疑われる。本研究班では、平成10年度より新規PFC製剤の開発研究を開始し、現在プロトタイプのパFC製剤を保有している。今回の検討では、同製剤が臨床的に有用であるか否かを検索する目的で、ビーグル犬を用い、小児における人工心肺使用時をシミュレートした実験系で、コントロール群、貧血群、PFC製剤輸血（少量投与および中等量投与）群において、全身の酸素供給が十分におこなわれるか否かを比較検討した。

なお、本研究の立案は本研究班分担研究者北海道大学大学院医学研究科循環病態内科佐久間一郎講師、東北大学大学院医学系研究科環境保健仲井邦彦助教授、神戸学院大学薬学部製剤学福島昭二講師、およびヒューマンサイエンス振興財団招へい申請外国人研究者米国ノースウエスタン大学輸血部長照屋純博士、さらに研究協力者北海道大学大学院医学研究科

循環病態外科今村道明助手と共に行い、動物実験は循環病態外科今村道明助手のグループと共同して遂行した。

B. 研究方法

実験動物として体重約10 kgの雌性ビーグル犬を使用した。A群：コントロール群として単純に人工心肺を回した群（プライミングボリュームが約550 ml必要であり、人工心肺中のヘマトクリット（Ht）は約30%となる）、B群：貧血群として手術時の出血をシミュレートし、瀉血を行ってHtを約15%とした群、C群：貧血（Ht15%）にPFC製剤を最終血中濃度約1.5%となるように加えた群、D群：貧血（Ht15%）にPFC製剤を最終血中濃度約15%となるように加えた群（各群n=3~5）とした。麻酔導入はケタミン5 mg/kg+ イソゾール10 mg/kg+ レペタン0.001 mg/kgで行い、適時イソゾール追加により麻酔を維持した。気管挿管後、人工呼吸管理を呼吸回数12/min、分時換気量10-15 L/kgで行い、動脈血CO₂を40 mmHgほどに設定した。

モニター項目としては心電図、大腿動脈圧、中心静脈圧、尿量、膀胱温をモニターした。

人工血液は神戸学院大学薬学部製剤学教室より提供された40%PFC溶液であり、内容はパーフルオロオクチルブロマイド（PFOB）28%、FO-9982 12%を精製卵黄レシチン（2.4%）に溶解し、さらにポリエチレングリコール（PEG）としてDSPE-50H（0.12%）を用いてPEG修飾を行ったものを使用した。本製剤の平均粒子サイズは約170 nmほどであった。投与量は循環血液量+プライミングボリューム550mlから計算し、循環血液中PFC濃度が1.5%（C群）もしくは15%（D群）となる量とした。また、D群ではPFC製剤の浸透圧が水と同様であることから、膠質浸透圧を保つ目的で、最終濃度が以下の値であるバッファー溶液に溶解して投与した（NaCl 0.8%, KCl 0.03%, CaCl₂ · 2H₂O 0.03%, MgCl₂ · 6H₂O 0.02%, NaHCO₃ 0.2%, Glucose 0.2%, ウシ血清アルブミン 3%）。

人工心肺使用プロトコールは、装置として人工心肺 polistan safe mini+テルモ人工心肺回路SS（プライミングボリューム550ml）+ECUM回路を使用し、大腿動脈送血（メドトロニック社製10Fr.）と経総頸静脈右房脱血（メドトロニック社製12Fr.）を行った。人工心肺はアセテートリンゲル液でプライミングし、カニューレーション前にヘパリン300単位/kgを投与した。B、C、D群では人工心肺開始前に約900 gの瀉血を行い、Htが15%程となるようにし

た後に人工心肺を開始した。C、D群ではこの際PFC製剤およびバッファー溶液をリザーバー内に投与した。A群ではそのまま開始し、流量80 ml/kg/minで灌流して膀胱温34°Cまで冷却した。冷却後2時間灌流を維持し、2時間後にB、C、D群では瀉血した血液を輸血し、その後回路中の血液をECUMで限外濾過して除水し、体内に戻した。同時に膀胱温36°Cまで復温した。A群では回路中の血液の除水、体内への返却と復温を行った。復温後、各群とも人工心肺をweaningし、その後8時間経過観察を行った。

採血ポイントとしては、1)人工心肺開始前、2)人工心肺開始直後、3)膀胱温34°C到達時、4)人工心肺維持1時間後、5)人工心肺維持2時間後、6)膀胱温36°C復温後、7)人工心肺終了後、8)終了4時間後、9)終了8時間後、の計9ポイントで動脈血採血を行った。測定項目としては、血液ガス分析、乳酸値、S100蛋白(中枢障害のマーカー)を測定した。

C. 研究結果

最高乳酸値はA群で 1.4 ± 0.5 mmol/L、B群で 5.0 ± 3.3 mmol/L、C群で 6.1 ± 1.2 mmol/L、D群で 2.9 ± 0.6 mmol/Lとなった。A群では乳酸値は一定であったが、B群、C群では瀉血後人工心肺を回している間、徐々に乳酸値の上昇が生じ、その上昇傾向はC群で顕著であった。D群では乳酸値の上昇は軽度に抑えられた。また、B群およびC群ではpHの低下が著明であり、特にC群で全身の浮腫の増加傾向が認められた。

S100蛋白は全群において上昇が認められなかった。

D. 考察

本研究では、本研究班で開発した新規PFC製剤が、実際の心臓外科手術をシュミレートした状態で酸素供与能を発揮し、臨床的に使用することに耐える物質であるか否かを検討した。本研究のA群(コントロール)は体重10 kgほどの小児に人工心肺を装着して開心術を施行し、しかも手術時に出血がなかった状態をシュミレートしたモデルである。この群では今回用いた規格の人工心肺を装着した後HTは30%ほどとなり、以後低温下でその値を2時間継続させたが、嫌気性代謝の指標である乳酸値の上昇が起こらず、また血液ガスが酸性に陥ることもなく経過した。

しかし、実際の心臓手術時にはある程度以上の出

血は不可避である。そのため人工心肺装着後の出血をシュミレートしたB群を検討した。B群では人工心肺開始前の瀉血によりHtを約15%とし、その状態で人工心肺を回し、低温下で2時間経過させたが、徐々に乳酸値の上昇と血液の酸性化が生じた。

C群はB群と同様に人工心肺開始前の瀉血でHtを約15%とした後、循環血液中PFC濃度が1.5%となるようにPFC製剤を投与した群である。この状態では、乳酸値はむしろB群より上昇し、血液の酸性化も進んだ。同様のPFC濃度の投与シュミレーションはOxygent[®]を用い、われわれが今回用いた実験条件より軽い条件でのものが報告されており、少なくとも動物の状態を悪くする結果は認められていない。C群では膠質浸透圧を補正する意味でのアルブミンの投与が行われず、そのため血液膠質浸透圧の低下が起こり、PFC粒子が血管外に漏出した可能性が高い。また、本研究で用いたPFCの濃度は40%であり、その酸素供与能は血液中に5%存在した状態で、常温の血漿溶存酸素と同等と計算される。従って、前述のOxygent[®]を用いた実験では、そのPFC濃度は60%であることから、われわれが使用した製剤の1.5倍の酸素保持能を有していたとしても、1.5%ほどの血中濃度で実際に酸素供与が有効に行われていたかは疑わしいと思われる。

C群でPFC少量投与の有効性が認められなかったことから、われわれは中等量のPFC投与の必要性を予想し、D群においてPFCの最終濃度が15%となるようにPFC製剤を投与するとともに、血液膠質浸透圧への影響を考慮して補正用のバッファーとともに投与を行った。その結果、B、C群で認められた貧血に伴うと考えられる乳酸値の産生および血液の酸性化が有意に抑制された。従って、現在の製剤であっても、15%程度の最終濃度となるまで投与量を増加させれば、大量の出血による15%程のヘマトクリットの低下を伴う貧血状態にも対応可能であることが示唆された。

本研究では、貧血に伴う中枢神経障害をモニターする目的でS100蛋白を測定したが、各群とも有意の変化を示さなかった。本研究程度の貧血では、イヌにおいてはS100蛋白上昇を認めるほどの中枢神経障害は惹起されないことが示唆された。

現在Oxygent[®]は第二世代のPFC製剤としてPFC濃度60%を達成し、臨床第3相治験を行ってきたが、冠動脈バイパス手術時に同種輸血回避目的にPFCを使用した治験において、脳卒中が増加したため治験が中断している。Oxygent[®]に関しては以前より、投与後に血小板減少が認められたことから、血小板

活性化とそれに引き続く血栓発生が危惧されていたが、今回のイベントもその理由による可能性が高いとされている。本研究班で開発中の製剤は、現在PFC濃度を40%まで上昇させたものであるが、PEG修飾を加え、血小板活性化を可能な限り抑制させることを企図して創製した。本製剤でもある程度血中濃度を上昇させれば、手術時の失血に対応でき、自己血輸血の不足状態において同種輸血回避に使用可能であることが示唆された。しかし、PFC製剤の血中濃度を上昇させることにより、Oxygent[®]で問題となったように血小板活性化を始めとする副作用の可能性が増大することも確かである。本実験系では、採血ポイントで採血した動脈血について、現在血液凝固系、血清補体価、炎症性サイトカイン、血液生化学等の検索をすべく検体を集め、測定準備中である。また、現在の実験をさらに繰り返し、各群の動物数を増加させて確実なデータを取得するとともに、実験施行時の血小板凝集能検索を予定している。

PFC製剤の投与量を減らし、しかも効果的な組織酸素供給を可能とするためには、PRF製剤の溶存PFC濃度を増加させる方策も可能である。現在、さらにPFC濃度を増加させ、しかも安定な新製剤の創製を北海道大学大学院医学研究科循環病態内科北畠顕教授、佐久間一郎講師、東北大学大学院医学系研究科環境保健仲井邦彦助教授とともに神戸学院大学薬学部製剤学福島昭二講師に依頼し、共同開発中である。新製剤が創製された場合には、今回の検討と比較することを予定している。

E. 結論

ビーグル犬を用い、小児での人工心肺使用手術時の出血をシュミレートし、本研究班で創製した新規PFC製剤による同種輸血回避の可能性を検索した実験系で、PFC製剤を最終血中濃度として約15%となるべく使用することにより、失血による全身循環・代謝の悪化を改善できることが明らかとなった。

4. SNO-PEG-Hbの安定供給とラットを用いた各種Hb溶液の急性毒性試験 (仲井)

A. 研究目的

蛋白質へのpolyethylene glycol (PEG) 修飾は、一般的に免疫原性の低下、血中半減期の増加など生体適合性を高めると考えられている。実際に、米国ではすでに複数のPEG修飾蛋白質による臨床研究が進められており、HbへのPEG修飾に関しても、我々のPEG修飾剤とは異なるものの、Enzon社によ

るPEG修飾ウシHb、Apex Bioscience社によるPEG修飾ヒトHbによる臨床研究が実際に進められている。PEG修飾Hbの生体適合性は良好とされており、これまでにHbによる一酸化窒素不活性化に起因する血管収縮以外は重大な副作用は報告されていない。我々は、このPEG修飾Hbにさらに一酸化窒素誘導体を付加したSNO-PEG-Hbを研究開発しているが、その生体適合性を検証するため、ラットによる急性毒性実験を実施し、未修飾HbやPEG-Hbとの比較を行った。また、主任研究者施設に向けて品質管理を行ったPEG-HbとSNO-PEG-Hb製剤の供給を行った。

B. 研究方法

製法は昨年度と同様である。Hbはヒト期限切れ赤血球から限外ろ過法により作成した。原料となる赤血球製剤は宮城県赤十字血液センター、旭川赤十字血液センターより供給を受けた。なお、赤血球製剤の主流が保存液であるMAP添加製剤に移行し、さらに少なくないケースで白血球不活化を意図したエックス照射済製剤であった。そのような経歴をもった期限切れ赤血球製剤は、洗浄工程で生理食塩水を加えるのみで容易に溶血し、またその状況から酸化物の増加が示唆された。Hbの精製の歩留まりのみならず、その後の修飾工程におけるHb酸化を考慮するならば、良質の原料血確保は期限切れ製剤の不足のみならず質の上でも今後の重要な課題となるものと予想された。製法であるが、まず未修飾HbからPEG-Hbを作成した。未修飾Hbの酸素親和性を制御する目的で、嫌氣的条件でpyridoxal 5'-phosphateによる修飾を行い、次いでHbアミノ基へのPEG修飾を実施した。HbのPEG修飾としては、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) を用いた。PEG-Hbをそのまま製剤として使用する場合は、生理食塩水に透析し濃縮して冷凍保存した。SNO-PEG-Hb製造は、PEG-Hbに対してNO供与体としてニトロソグルタチオン (Dojindo製) を使用し、s-ニトロソ化を行った。HbとNO供与体のモル比は1:5-10、反応条件は昨年度と同様とし、製造後にPEG-Hbと同様な処置を行って凍結保存した。製造後の有効期限は、PEG-Hbで1年、SNO-PEG-Hbで2ヶ月とした。

蛋白質結合NOの解析は、試料をHPLCゲルろ過カラム (Eicom pak GFC-200またはTSK-GEL SW4000XL) を用いて移動相10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5)、0.1 mM EDTAにて分離、ポストカラ

ムにて 1.75 mM HgCl₂ を混和、ついで 1% sulfanilamide、0.1% N-naphthylethylene-diamine、2% リン酸により亜硝酸を発色させ 540 nm の吸光度より定量した。

上記と同様に SNO-PEG-Hb を作成し、その途中生産物である、未修飾 Hb、PEG-Hb、さらに対照として BSA を用いてラット急性毒性試験を実施した。各溶液の蛋白質濃度は 5% とし、生理食塩水に透析し使用した。ラットを笑気麻酔し、尾静脈より全血液量の 30% 相当量を投与し、血液材料は投与前、1 日後、3 日後、7 日後、さらに 14 日後に同じく尾静脈から抗凝固剤として EDTA を用いて採血し、血漿を得た。採血による貧血を回避するため、投与後 1 日目、3 日目の採血群は別個体とした。測定項目は、肝機能の指標として GOT、GPT を分析し、腎機能の指標として BUN と creatinine を分析した。GOT と GPT は、和光純薬工業・トランスアミナーゼ C-II-テストワコー (POP・TOOS 法) を用い、血漿中の Hb そのものが正誤差を与えるため、プロトコールを改訂し Hb ブランクを置き補正した。BUN は和光純薬工業・尿素窒素 B-テストワコー (ウレアーゼ・インドフェノール法) を用いた。creatinine は、和光純薬工業・クレアチニン-テストワコー (Jaffe 法) によった。

病理組織学的解析を行うため、同様な投与実験を行い、腎臓、肝臓を摘出、中性ホルマリン固定した。標本作製と病理所見は、株式会社・新薬開発研究所・中央研究所に委託し、ヘマキシリン・エオジン染色染色を行い解析した。

C. 研究結果

昨年度と同様に、Hb 濃度 10%、生理食塩水透析、濾過滅菌、メト化率 10% 以内 (努力目標 5% 以内)、SNO 化率 35-40% (Hb テトラマー当たり二個の SH を有し、100% SNO 化はテトラマー当たり 2 個の SNO が結合する)、冷凍状態で出庫した。製造上の最大の障害はメト化率であり、ウシ Hb は容易に変性しやすく、ヒト Hb も SNO 化工程における Hb 濃度を 0.3% 程度まで希釈するとメト化率が低下した。従って、製造上は Hb 希釈に伴う製造器具とその後の濃縮透析工程の効率化が最大の課題であった。

全血液量の 30% に相当する蛋白質溶液を尾静脈から投与した。ラットの死亡例はなく、全個体解剖する 14 日目まで生存した。肝機能の変化を把握するため、血漿中 GOT、GPT を分析した。通常、このような分析は波長 450 nm 付近の吸光度を用いるため投与 1 日後では Hb がバックグラウンドをあげる

ため、Hb ブランクを置いて補正した。その結果、いずれの群でも GOT、GPT は投与 1 日後に上昇し、その程度は GOT は PEG-Hb > 未修飾 Hb > BSA > SNO-PEG-Hb の順であり、GPT は PEG-Hb > 未修飾 Hb > SNO-PEG-Hb > BSA の順であった。いずれの変化も投与後 3 日目には前値に回復し一過性の変化であることが示された。次に、腎機能変化を把握するために BUN と creatinine を分析した。BUN は BSA、Hb 溶液投与群ともに一過性の低下を示し、3 日目には回復した。creatinine は BSA と PEG-Hb、SNO-PEG-Hb 投与群は特徴ある変化を示さなかったが、未修飾 Hb 投与群のみ 3 日目から上昇し、14 日後も持続して高値を示した。

次に、病理組織学的検査であるが、肝臓では各投与群に共通して、限局性被膜炎及びその修復性変化としての限局性線維性被膜肥厚がみられたほか、被膜炎に付随したと考えられる所見として被膜内肉芽腫及び巣状壊死が認められた。具体的には、限局性被膜炎は BSA 投与群の 1 日目で 5/6 例、7 日目で 6/8 例、14 日目で 4/8 例、未修飾 Hb 投与群の 1 日目 6/6 例全例、7 日目で 7/8 例、14 日目で 0/7 例、PEG-Hb 投与群の 1 日目で 3/6 例、7 日目で 6/8 例、14 日目で 4/7 例、SNO-PEG-Hb 投与群の 1 日目で 4/6 例、7 日目で 8/9 例に、14 日目で 1/7 例に認められ、その発現頻度はいずれの群においても期間の経過とともに消退傾向を示した。限局性線維性被膜肥厚は BSA 投与群の 1 日目で 1/6 例、7 日目で 8/8 例全例、14 日目で 6/8 例、未修飾 Hb 投与群の 1 日目で 1/6 例、7 日目で 6/8 例、14 日目で 4/7 例、PEG-Hb 投与群の 1 日目で 0/6 例、7 日目で 6/8 例、14 日目で 7/7 例全例、SNO-PEG-Hb 投与群の 1 日目で 0/6 例、7 日目で 6/9 例、14 日目で 6/7 例に認められ、その発現頻度はいずれの群においても期間の経過とともに増加傾向を示した。また、被膜内肉芽腫が BSA 投与群の 14 日目、PEG-Hb 投与群の 7 日目と 14 日目及び SNO-PEG-Hb 投与群の 7 日目で各 1 例、巣状壊死が BSA 投与群の 1 日目で 1 例、未修飾 Hb 投与群の 1 日目で 5 例と 14 日目で 1 例、PEG-Hb 投与群の 1 日目と 14 日目で各 1 例、SNO-PEG-Hb 投与群の 1 日目で 1 例に認められ、巣状壊死の発現頻度が未修飾 Hb 投与群で他の投与群と比較し高い傾向が観察された。

一方、腎臓では、未修飾 Hb 投与群に赤色 (血色素性) 円柱と限局性近位尿細管上皮硝子滴変性の発現及び限局性尿細管好塩基性変化・萎縮の経時的な増加が観察され、PEG-Hb および SNO-PEG-Hb 投与群に近位尿細管上皮空胞化が認められたものの、

BSA投与群に特異的な所見はみられなかった。具体的には、赤色（血色素性）円柱は未修飾Hb投与群の1日目で5/6例、7日目で4/8例に、限局性近位尿細管上皮硝子滴変性は未修飾Hb投与群の1日目で1/6例に認められた。限局性尿細管好塩基性変化・萎縮は未修飾Hb投与群において1日目で1/6例（軽度）、7日目で7/8例（軽微～軽度）、14日目で6/7例（軽微～中等度）に認められ、期間の経過とともに増強傾向を示した。他群ではBSA投与群の1日目で2/6例、7日目で5/8例、14日目で3/8例に、PEG-Hb投与群の7日目で4/8例、14日目で3/7例に、SNO-PEG-Hb投与群の1日目で3/6例、7日目で2/9例に軽微～軽度に認められた。このほか、発現頻度が低いか各投与群間の差がない所見として、限局性間質内細胞浸潤、近位尿細管上皮内好酸性小体、硝子円柱、石灰沈着、化膿性腎盂腎炎、腎盂炎、腎盂拡張が若干認められた。

D. 考察

昨年度と同様に中規模スケールでの製造を継続し、赤血球製剤の確保とエックス線照射製剤からのHb精製で、歩留まりの低下と溶血や酸化という課題を残したものの、順調に共同実験施設に供給した。

SNO-PEG-Hbの生体適合性を急性毒性試験によって評価すべく、ラットへの単回投与実験を実施した。毒性試験としては繰り返し投与実験や投与量依存的な変化をも見るべきと考えられるが、資金的にも時間的にも全てを実施することは困難と考え、ヒトへの応用を想定し赤血球製剤の投与が行われる全血液量の30%程度を目安に、評価を実施した。その結果、BSAを対照としてもSNO-PEG-Hbは生体適合性に優れていることが示された。肝機能では病理組織学的にはPEG-HbやSNO-PEG-HbとBSAに顕著な差は認められないものの、GOTやGOPで評価する限り、PEG-Hbの生体への侵襲は軽くないものと判断された。しかしながら、このような一過性の肝機能変化はこれまでも他のHb製剤で確認されており、その上で前臨床試験や臨床試験が進められている。今のところ、生体適応性では血管収縮以外で特に副作用は報告されておらず、従ってPEG-Hbについても許容しうる侵襲と考えられた。ただし、GOTなどの細胞逸脱酵素は肝細胞の破壊によって外に放出されることを考えれば、そのメカニズムの解明が求められよう。また、病理上はPEG-HbとSNO-PEG-Hbで顕著な差は認められないものの、後者ではGOTなどの上昇は軽度であり、その理由は不明である。生体適合性に関する実験研究が今後

も重要と結論された。

一方、腎機能では血漿生化学検査と病理組織学的検査の結果が一致し、未修飾Hbで侵襲度が高く、同じHb溶液でもPEG化したもので侵襲は軽度であった。すなわち、未修飾Hbでは赤色円柱が高頻度に認められ、尿細管の変成も投与後14日後も持続した。この結果は、血漿生化学検査でcreatinineの持続的な高値が観察されたことと事象が一致した。未修飾Hbの標的臓器は以前から指摘されているとおり腎臓と考えられ、PEG化によってその毒性を軽減することができるものと考えられた。ただし、PEG-HbやSNO-PEG-Hb投与群は、未修飾Hb投与群と比較して侵襲は軽度であるものの、BSA投与群では観察されない近位尿細管上皮空胞化が観察された。Hbによる腎毒性は、Hb分子の尿細管再吸収、腎循環における血管収縮、Hb分子に起因する酸化ストレス、などが原因論として論じられている。未修飾HbへのPEG化はこのうち糸球体ろ過を回避し尿細管への障害を回避する上で有効と考えられた。一方、SNO-PEG-Hbは血管収縮活性がPEG-Hbに比べ小さいことをすでに報告した。PEG-HbとSNO-PEG-Hb投与群の尿細管細胞に見られた近位尿細管上皮空胞化が同じ程度ならば、そのような障害は血管収縮に起因する虚血ではなく酸化ストレスと関連性があるかもしれない。Hb製剤は必然的にヘム鉄を含み、生体内で代謝されて鉄を放出する。このようなヘム鉄は酸化を受けて活性酸素の産生に関与する危険性がある。Hb修飾体は製剤としての血中半減期は短く、投与された大量のヘム含有蛋白質が短期間で代謝されることを考慮すれば、生体の処理能力を一時的に越える可能性はある。今後、安全性の観点からヘム代謝を含む詳細な解析が求められるかもしれない。また、大量投与を行わずに人工赤血球の活用を行うような病態モデルを考案し、より少量でより大きな効果を得るような研究開発の視点が求められよう。

E. 結論

SNO-PEG-Hbの中規模製造に取り組み、試薬の供給を継続した。また基礎検討では、SNO-PEG-Hbの生体適合性をラットを用いた急性毒性試験で評価し、血漿生化学検査、病理組織学的検査からSNO-PEG-Hbは十分な生体適合性を有するものと判断された。またPEG-HbはSNO-PEG-Hbよりも肝機能への侵襲は高いものの、腎機能変化を含め許容範囲と考えられた。今後も生体適合性に関する基礎検討が必要であるものの、

SNO-PEG-Hbは酸素治療を目指す上で新しい基材となりうる事があらためて確認された。

5. 各種ヘモグロビン修飾体およびパーフルオロケミカル製剤の血小板活性化に関する研究 (藤井)

A. 研究目的

血小板による血栓形成は急性冠症候群や脳梗塞の発生機序に深く関与することが良く知られている。P-セレクトリン(CD62P)は血小板の α 顆粒に存在する膜糖蛋白で、血小板が活性化されると速やかに細胞表面に発現し接着能を発揮する。一方、一酸化窒素(NO)は血小板凝集、粘着を抑制することが良く知られている。セルフリーのヘモグロビン(Hb)修飾体は、人工赤血球代替物として開発された。われわれはヘムのNO取込みによってNOを消去し、血管収縮や血小板の活性化をもたらすことを報告してきた。Hb 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)は、NO消去作用が少なく、むしろNO供与体として機能することも我々は示してきた。この特徴は人工赤血球代替物として利用できることが期待されるためHbとその修飾体として、未修飾のセルフリーのHb、NO放出能を付加したHb修飾体としてS-ニトロソ化したSNO-Hb、Hb分子に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)修飾を行ったPEG-Hb、PEG-HbをさらにS-ニトロソ化したSNO-PEG-Hbを用いて血小板活性化作用を比較検討した。

B. 研究方法

我々が開発してきたHbとその修飾体として、未修飾のセルフリーのHb、S-ニトロソ化したSNO-Hb、Hb分子にポリエチレングリコール(PEG)修飾を行ったPEG-Hb、PEG-HbをさらにS-ニトロソ化したSNO-PEG-Hbがある。我々は今までの研究で、NO放出能を付加したHb修飾体、分子バリアーとしての作用を持つPEGを付加したHb修飾体、その両方を付加したHb修飾体は血小板活性化作用がより少ないか検討した。また、血小板がガラス板に接着する性質を利用して、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Hbとその修飾体の影響も検討した。健康ヒト多血小板血漿(platelet rich plasma, PRP)にHbを加え活性化された血小板表面に発現されたP-セレクトリンをフローサイトメトリー法により測定した。ラットを1~1.5%ハロサンで麻酔し、大腿静脈からHbおよびHb修飾体を投与し、大腿動脈から

採血し、採血した血液からPRPを作成した。このPRPを用いてADPとコラーゲンによる凝集反応を調べた。

C. 結果

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Hbまたはその修飾体を塗布後PRPを加え血小板の接着及び凝集を顕微鏡で観察した。Hb投与群で血小板CD62P発現が亢進した。SNO-Hb投与群でCD62P上昇はHb投与群に比べ軽度であった。ガラス板およ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Hbは有意に血小板の接着及び凝集を抑制した。また、SNO-Hb、PEG-Hb、SNO-PEG-HbではHbよりもその効果が大きかった。

SNO-Hbにポリエチレングリコール修飾したSNO-PEG-Hbが、血圧にもたらす作用を調べ、各種ヘモグロビン修飾体と比較した。ラットを1~1.5%ハロサンで麻酔し、大腿静脈からHbおよびHb修飾体を投与し、大腿動脈から血圧と心拍数を測定した。また、大腿動脈から採取した血液からPRPを作成した。このPRPを用いてADPとコラーゲンによる凝集反応を調べた。各種ヘモグロビン修飾体による血圧の変化をみると、未修飾のHbを投与すると、投与後に明らかな血圧上昇がみられた。S-ニトロソ化したSNO-Hb、SNO-PEG-Hbを投与した場合、血圧上昇は軽度であった。平均血圧に対するHb修飾体の影響をみると未修飾Hbを投与した場合に有意な血圧上昇がみられ、SNO-Hb、SNO-PEG-Hbの場合には、血圧上昇は軽度であった。

レーザー散乱粒子計測法を用いて、ADPとコラーゲンによる、血小板凝集に対するHbの影響を調べた。レーザー散乱粒子計の測定原理は直進する光が細かい粒子に当たると、散乱光が生じる。散乱光の強さは、粒子径の2乗に比例して大きくなる。この現象を利用して、レーザービームの照射領域を通過する凝集塊粒子の大きさや数を測定する。ADPによる血小板凝集に対するHb修飾体の影響を調べた。実験結果では、ADPによって、5~10個の血小板からなる小凝集塊が急速に形成され、続いて10~100個の血小板からなる中凝集塊、100~1000個の血小板からなる大凝集塊が形成される。未修飾のヘモグロビンを投与した場合のADPによる血小板凝集は、中凝集塊も比較的早く形成され、さらに、中、大凝集塊の著明な増加がみられた。大凝集塊の増加は、S-ニトロソ化したHbの場合には少なく、特に

SNO-PEG-Hbを投与した場合には、コントロールよりも減少した。Hbによる中、大凝集塊の増加は、S-ニトロソ化したHbでは少なく、SNO-PEG-Hbを投与した場合には、コントロールよりも減少した。コラーゲンによる血小板凝集に対するHb修飾体の影響を調べた結果ではADPよりも強い凝集反応が起きており全凝集塊の数と、中、大凝集塊の比率が増加した。コラーゲンによる血小板凝集は未修飾Hb投与によって増大し、S-ニトロソ化したHbでは、凝集の増大が抑えられる傾向にあった。濁度法によって求めた凝集率でも同様の結果を得た。

D. 考察

血栓形成素因、糖尿病や有意な動脈狭窄が存在する場合Hbがもたらす血小板活性化は、血栓を誘導する可能性もある。糖尿病では発症早期から微小血管再構築に異常を来している。また、血管造影剤の使用は血小板を活性化させる可能性がある。血管病変に伴い発現が増加する血管作動物質は血栓性を変化させる。NOを付加したHb修飾体はNOの血小板凝集抑制作用により、分子バリアーとしての作用を持つPEGを付加したHb修飾体ではPEGの分子バリアー効果により、無修飾Hb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。両方を付加したHb修飾体は血小板活性化作用がより少ない可能性があると考えられる。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Hbの影響も顕著であった。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Hbの影響も顕著であったことから修飾Hbは血管内ステント、心臓外科手術における体外循環、人工血管のコーティング等に臨床応用出来る可能性も大きいことが推察された。

未修飾のセルフリーHbは、血圧上昇をもたらす、血小板凝集を亢進させた。S-ニトロソ化したHb、特にSNO-PEG-Hbは、未修飾Hbにくらべて血圧上昇と血小板凝集が軽度であり、人工赤血球として利用できる可能性があった。

福島らが製作したPEGを付加したPFCについて preliminary に同様の方法を用いて検討した。PFC自体のレーザー散乱光に与える影響を除外した測定条件において、PFC濃度5%まではレーザー散乱光を用いて測定した血小板凝集作用は軽微であった。またP-セレクトリンをフローサイトメトリーにより測定してもPFC濃度5%までは血小板活性化は軽微であった。ビーグル犬のPRPについてもレーザー散乱光を用いて血小板凝集能は測定可能であることを

確認している。平成13年度はこれらの成果をふまえ福島らが製作したPFCについてレーザー散乱光を用いて測定した血小板凝集作用、またP-セレクトリンをフローサイトメトリーにより測定して血小板に与える種々のPFCの作用をより詳細に検討を加え血小板に及ぼす影響の少ない実用PFC濃度を決定すると共に、より安全なPFC製剤の開発に寄与したい。この目的にわれわれの開発した遺伝子改変動物を用いることも有用であろう。また犬PRPについてもレーザー散乱光を用いて血小板凝集能は測定可能であることが確認されたので大動物でのPFCおよびPEGを付加したPFCの影響を評価していく。

最近 Alliance Oxygent社の製剤によりstroke発生率が上昇することが報告された。この事実は我々が開発中の人工血液の血栓止血系に対する影響を慎重に評価するシステムの重要性を示し、またより血小板に与える影響が少ない安全な製剤の開発が急務であることを示している。高齢者をはじめとして、血栓形成傾向を有する患者には人工血液を使用する場合、極めて慎重な研究と配慮が必要とされる。血栓症は急性の臓器虚血に直接つながるばかりではなく、近年生活習慣病などの慢性疾患にも関与することが明らかとなってきた。また今年度の我々の報告で我々の製剤は酸素運搬のみならず、血小板が活性化することが予測される各種病態、例えば血管内ステント、心臓外科手術における体外循環、人工血管のコーティング等に臨床応用出来る可能性も大きいことが推察された。血小板抑制薬には血小板減少症や出血傾向等の重大な副作用が生じ得ることが報告されている。われわれの製剤は血管内ステント留置後の抗血小板薬の使用を減らしたり、心臓外科手術における体外循環の安全性向上や、人工血管の開存率上昇等に貢献することも考えられる。今後更にずり応力存在下でのヒト血液を用いたフローチェンバーにおける血小板活性化の検討、大動物での検討などを行い臨床応用の可能性を検討したい。

E. 結論

健常ヒトPRPをHbに加え活性化された血小板表面に発現されたP-セレクトリンをフローサイトメトリーを用いて測定した。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Hbまたはその修飾体を塗布後PRPを加え血小板の接着及び凝集を顕微鏡で観察した。Hb投与群で血小板CD62P発現が亢進した。SNOHb投与群でCD62P上昇はHb投与群に比べ軽度であった。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Hbは有意に血小板の接着及び凝集を抑制した。また、SNOHb、PEGHb、SNO-PEGHbではHbよりもその効果が大きかった。血栓形成素因、糖尿病や有意な動脈狭窄が存在する場合Hbがもたらす血小板活性化は、血栓を誘導する可能性もある。NOを付加したHb修飾体はNOの血小板凝集抑制作用により、分子バリアーとしての作用を持つPEGを付加したHb修飾体ではPEGの分子バリアー効果により、無修飾Hb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。両方を付加したHb修飾体は血小板活性化作用がより少ない可能性があると考えられた。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Hbの影響も顕著であったことから修飾Hbは血管内ステント、心臓外科手術における体外循環、人工血管のコーティング等に臨床応用出来る可能性も大きいことが推察された。

6. 人工赤血球の臨床応用の可能性に関する検討

ヒューマンサイエンス振興財団招へい外国人研究者米国ノースウエスタン大学医学部輸血部長の照屋純博士に米国の人工血液開発の現況とその臨床応用の可能性について討論し、臨床応用に即した実験を企画した。また、人工赤血球の臨床応用を可能とするためには、医療経済学的検討が必要であり、そのためにはまず適応があり、需要が見込まれる病態の特定とそのシュミレーションモデルでの検討が重要であることが確認された（文献9、10参照）。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujii H, Fujii S, Togashi H, Yoshioka M, Nakai K, Satoh H, Sakuma I, Kitabatake A, Kenmotsu O: Attenuation of hypothermia-induced platelet activation and platelet adhesion to artificial surfaces in vitro by modification of hemoglobin to carry S-nitric oxide and polyethylene glycol. *Thromb Res* 100(6): 519-528, 2000
2. Sakanoue J, Tamura M, Sato H, Nakai K, Sakuma I, Kitabatake, A: Redox states of cerebral tissues of rats substituted by the polyethyleneglycol-conjugated hemoglobin. *Oxygen transport to tissues XXII*, Swartz H, Dunn J eds, Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York. 2001 in press

3. Hiroko Togashi, Ichiro Sakuma, Kunihiko Nakai, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Sato and Akira Kitabatake: S-nitrosylation of a newly developed polyethylene glycol-conjugated hemoglobin causes a marked inhibition of ex vivo platelet aggregation in the rat. *The Biology of Nitric Oxide Part 7*. ed Moncada, S., Wilkumund, P., Gustaffson, L. and Higgs, E.A., Portland Press, London. p23, 2000

4. Ichiro Sakuma, Hiroko Togashi, Kunihiko Nakai, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Sato and Akira Kitabatake: Nitric oxide scavenging effects of hemoglobin injected intravenously into spontaneously diabetic rats on blood pressure and platelet aggregation. *The Biology of Nitric Oxide Part 7*. ed Moncada, S., Wilkumund, P., Gustaffson, L. and Higgs, E.A., Portland Press, London. p75, 2000

5. Nakai K, Togashi H, Yasukohchi T, Sakuma I, Fujii S, Yoshioka M, Satoh H, Kitabatake A: Preparation and characterization of SNO-PEG-hemoglobin as a candidate for oxygen transporting material. *Int J Artif Organs*: 2001, in press

6. 仲井邦彦、佐久間一郎、福島昭二、竹内由和、佐藤 洋、北島 顕: パーフルオロカーボン (PFC) : 第2世代PFCによる挑戦. *人工血液* 8(1): 43-51, 2000

7. 佐久間一郎: NOの功罪—進化および臨床からみた知見—. *日本薬理学雑誌* 115(5) 311, 2000

8. 仲井邦彦、佐久間一郎: S-ニトロソ-PEG-ヘモグロビンの製法と解析: 酸素運搬体としての応用. 生体内一酸化窒素 (NO) 実験プロトコル. 吉村哲彦編. 共立出版株式会社、東京. pp280-284, 2000.8.

9. 仲井邦彦、佐久間一郎、福島昭二、照屋 純、竹内由和、佐藤 洋、北島 顕: 人工酸素運搬体開発の課題. *血液・免疫・腫瘍* 6(1): 29-34, 2001

10. 照屋 純、佐久間一郎、仲井邦彦、北島 顕: 赤血球代替物の臨床応用の可能性. *人工血液* 9: 2001, in press

11. 佐久間一郎、仲井邦彦、菅原 武、佐藤 洋、北島 顕: s-ニトロソヘモグロビンの基礎と臨床. *THE LUNG perspectives* 9(2): 191-194, 2001

2. 学会発表

1. J Sakanoue, M Tamura, K Nakai, H Sato, I

- Sakuma, A Kitabatake: Oxygen Transporting Capacity and Vascular Activity of Polyethylene-glycol-Conjugated S-Nitrosohemoglobin During Hemorrhagic Shock. The First International Conference: Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. 2000.6.4. San Francisco, U.S.A., Nitric Oxide 4(3): 243, 2000
2. Nakai K, Togashi H, Sakuma I, Fujii S, Yoshioka M, Satoh H, Kitabatake A: Preparation and characterization of S-nitroso-PEG-Hemoglobin as a candidate for oxygen transporting material. XXVII Congress, European Society for Artificial Organs, 2000.9.1. Lausanne, Switzerland
 3. K. Nakai, H. Togashi, I. Sakuma, T. Yasukohchi, S. Fujii, M. Yoshioka, H. Satoh, A. Kitabatake: REPARATION AND CHARACTERIZATION OF S-NITROSYLATED AND POLYETHYLENE GLYCOL-MODIFIED HEMOGLOBIN AS A CANDIDATE OXYGEN TRANSPORTING CARRIER. The 8th International Symposium on Blood Substitutes, 2000.11.10. San Diego, U.S.A.
 4. H. Togashi, K. Nakai, H. Sakuma, S. Fujii, M. Yoshioka, H. Satoh, A. Kitabatake: EFFECTS OF HEMOGLOBIN DERIVATIVES ON PLATELET FUNCTION IN RATS. The 8th International Symposium on Blood Substitutes, 2000.11.10. San Diego, U.S.A.
 5. Mitsuhiro Fukao, Satoshi Nawate, Ichiro Sakuma, Atsushi Sato, Takao Makino, Akira Kitabatake, Morio Kanno: Estrogen Upregulates Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Mediated Responses Through the Increased Expression of Gap Junctional Protein Connexin-43 in Mesenteric Arteries of the Middle-Aged Female Rat. The 3rd Workshop on Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor. 2000.6.15. Abbaye des Vaux de Cernay, France
 6. Subrina Jesmin, Ichiro Sakuma, Taeko Sugawara, Satoshi Fujii, Akira Kitabatake: INCREASED ANGIOGENESIS AND OVEREXPRESSION OF ANGIOGENIC GROWTH FACTORS IN THE HEART AT AN EARLY STAGE OF TYPE 2 DIABETES : PROTECTIVE OR A SEED FOR CARDIOMYOPATHY ? The 4th Annual Meeting of the Japanese Society of Heart Failure. 2000.10.8. Kobe, Japan、 J Heart Failure 6: 61, 2000
 7. Subrina Jesmin, Ichiro Sakuma, Satoshi Fujii, Satoshi Nawate, Takao Makino: Angiotensin II Type I Receptor Antagonist Suppresses Cardiac Angiogenesis and Fibrosis at an Early Stage of Type II Diabetes Mellitus. The 73rd Scientific Sessions of American Heart Association, 2000.11.13. New Orleans, U.S.A., Circulation 102: II-132, 2000
 8. Satoshi Nawate, Mitsuhiro Fukao, Ichiro Sakuma, Atsushi Sato, Yasuhiro Akaishi, Takao Makino, Satoko Watanuki: Estrogen Upregulates Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Mediated Responses Through the Increased Expression of Gap Junctional Protein Connexin-43 in Mesenteric Arteries of the Middle-Aged Female Rat. The 73rd Scientific Sessions of American Heart Association, 2000.11.14. New Orleans, U.S.A., Circulation 102: II-186, 2000
 9. Taeko Sugawara, Satoshi Fujii, Sabrina Jesmine, Ichiro Sakuma, Tomiyasu Koyama, Hiroko Togashi, Tarikuz Zaman. Angiotensin II Mediates Coronary Capillary Network Remodeling in Obese Diabetic Rats: Implications for Treatment of Type II Diabetes. The 73rd Scientific Sessions of American Heart Association, 2000.11.14. New Orleans, U.S.A., Circulation 102: II-231, 2000
 10. Subrina Jesmin, Ichiro Sakuma, Taeko Sugawara, Satoshi Fujii, Akira Kitabatake: LONG-ACTING CALCIUM CHANNEL BLOCKER, BENIDIPINE, INHIBITS CARDIAC ANGIOGENESIS AND REMODELING IN TYPE II DIABETES. International Society for Heart Research the 17th Annual Meetig of the Japanese Section, 2000.12.6. Suita, Japan、 J Mol Cell Cardiol 32: A110, 2000
 11. Subrina Jesmin, Ichiro Sakuma, Taeko Sugawara, Satoshi Fujii, Akira Kitabatake: ANGIOTENSIN II TYPE I RECEPTOR ANTAGONIST SUPPRESSES CARDIAC REMODELING AT AN EARLY STAGE OF TYPE II DIABETES. International Society for Heart Research the 17th Annual Meetig of the

- Japanese Section, 2000.12.6. Suita, Japan、 J Mol Cell Cardiol 32: A105, 2000
12. Sakuma I, Jesmin S, Fujii S, Kitabatake A. Long acting calcium channel blocker, benidipine, inhibits cardiac capillary angiogenesis and remodeling at an early stage of type II diabetes mellitus. The 50th Annual Scientific Sessions of the American College of Cardiology. 2001.3.19. Orlando, U.S.A. J Am Coll Cardiol 37: 177A, 2001
13. Subrina Jesmin, Ichiro Sakuma, Satoshi Fujii, Akira Kitabatake: PIVOTAL ROLE OF ANGIOTENSIN II IN CORONARY NETWORK REMODELING IN DIABETES: POSSIBLE INVOLVEMENT OF AKT-NITRIC OXIDE PATHWAY. The 65th Annual Meeting of the Japanese Circulation Society, 2001.3.26. Kyoto, Japan
14. Subrina Jesmin, Ichiro Sakuma, Satoshi Fujii, Akira Kitabatake: CAN INHIBITION OF ANGIOTENSIN II TYPE II RECEPTOR BE A NOVEL ANTI-ANGIOGENIC THERAPEUTIC APPROACH FOR PREVENTION OF DIABETIC CARDIOMYOPATHY? The 65th Annual Meeting of the Japanese Circulation Society, 2001.3.27. Kyoto, Japan
15. Subrina Jesmin, Ichiro Sakuma, Satoshi Fujii, Akira Kitabatake: A LONG ACTING CALCIUM CHANNEL BLOCKER SUPPRESSES CARDIAC ANGIOGENESIS AND FIBROSIS AT AN EARLY STAGE OF TYPE II DIABETES MELLITUS. The 65th Annual Meeting of the Japanese Circulation Society, 2001.3.27. Kyoto, Japan
16. 佐久間一郎, 仲井邦彦, 富樫廣子, 藤井 聡, 吉岡充宏, 佐藤 洋, 北畠 顕: NO供与能を有する各種hemoglobin誘導体の生体内における性質. 日本心脈管作動物質学会, 2000.2.5. 福岡
17. 佐久間一郎, 福島昭二, 仲井邦彦, 北畠 顕: 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. I): 64, 2000
18. 富樫廣子, 吉岡充弘, 仲井邦彦, 佐藤 洋, 藤井 聡, 佐久間一郎, 北畠 顕: ヘモグロビン系人工酸素運搬体への血小板機能に及ぼす影響-血中セロトニン動態による検討. 第5回北海道セロトニン(5-HT₂)研究会, 2000.2.26. 札幌
19. 佐久間一郎, 福島昭二, 仲井邦彦, 北畠 顕: 人工酸素運搬体としての新たなフルオロカーボンエマルジョンの開発: 第39回日本エム・イー学会大会, 2000.5.19. 東京
20. 佐久間一郎, 仲井邦彦, 富樫廣子, 坂野上 淳, 藤井 聡, 吉岡充宏, 田村 守, 佐藤 洋, 北畠 顕: Nitric oxide 供与能を有するヘモグロビン誘導体 s-nitroso-polyethylene glycol-conjugated hemoglobin の人工酸素運搬体としての特性: 第21回日本循環制御医学会総会, 2000.5.27. 東京
21. 仲井邦彦, 佐久間一郎, 佐藤 洋, 北畠 顕: 酸素運搬体開発の方向性. 第7回日本血液代替物学会年次大会. 2000.9.7. 札幌、人工血液 8: 69, 2000
22. 富樫廣子, 仲井邦彦, 佐久間一郎, 藤井 聡, 佐藤 洋, 吉岡充弘, 北畠 顕: 血中セロトニン動態からみたヘモグロビン系人工酸素運搬体の血小板作用. 第7回日本血液代替物学会年次大会. 2000.9.7. 札幌、人工血液 8: 78, 2000
23. 福島昭二, 西尾琢也, 岸本修一, 竹内由和, 仲井邦彦, 田村 守, 坂野上 淳, 佐久間一郎, 北畠 顕: 新たなパーフルオロカーボンエマルジョンの調製と評価. 第7回日本血液代替物学会年次大会. 2000.9.8. 札幌、人工血液 8: 72, 2000
24. 浅沼博司, 北風政史, 真田昌爾, 野出孝一, 高島成二, 坂田泰彦, 朝倉正紀, 扇田久和, 佐久間一郎, 北畠 顕, 仲井邦彦, 葛谷恒彦, 堀 正二: 虚血心におけるSNO-PEG-Hb の冠血流増加・心筋代謝及び収縮不全の改善作用. 第7回日本血液代替物学会年次大会. 2000.9.8. 札幌、人工血液 8: 72, 2000
25. 藤井 聡, 藤井 ひとみ, 仲井邦彦, 佐久間一郎, 剣物 修, 北畠 顕: SNO-PEG-Hb の血小板に及ぼす影響: 血管内ステント、心臓外科手術における体外循環、人工血管のコーティング等臨床応用にむけての基礎的検討. 第7回日本血液代替物学会年次大会. 2000.9.8. 札幌、人工血液 8: 82, 2000
26. 菅原 武, 佐久間一郎, 藤井 聡, 北畠 顕, 富樫廣子, 吉岡充宏, 剣物 修, 仲井邦彦, 佐藤 洋: 各種ヘモグロビン誘導体の血小板への影響: s-ニトロソ-ポリエチレングリコール修飾ヘモグロビンの人工酸素運搬体としての有用性の検討. 第4回北海道血栓・血小板研究会. 2001.1.26. 札幌
27. 北畠 顕: 臨床応用を目指した酸素運搬体の開発と展望. 厚生科学研究(人工血液研究推進事業)平成12年度研究成果発表会「人工血液をつくる」. 2001.2.11. 東京
28. 菅原 武, 佐久間一郎, 仲井邦彦, 富樫廣子,

- 藤井 聡、劔物 修、吉岡充宏、佐藤 洋、北畠 顕：各種ヘモグロビン誘導体の肝微小循環系への影響：s-ニトロソ-ポリエチレングリコール修飾ヘモグロビンの人工酸素運搬体としての有用性の検討。第26回日本微小循環学会総会。2001.2.15. 倉敷
29. 浅沼博司、北風政史、高島成二、真田昌爾、野出孝一、朝倉正紀、扇田久和、坂田泰彦、仲井邦彦、葛谷恒彦、多田道彦、佐久間一郎、北畠 顕、堀正二：SNO-PEG-HB Reduces the Severity of Myocardial Ischemia via Coronary Vasodilatation in Canine Ischemic Hearts. 第65回日本循環器学会学術集会。2001.3.27. 京都
30. 赤石康弘、富岡拓志、佐久間一郎、北畠 顕、服部裕一、菅野盛夫：種々の血管拡張薬の冠拡張作用に対する、クエン酸シルデナフィル（バイアグラ）による増強効果の多様性について—バイアグラを服用する虚血性心疾患患者には、いかなる冠拡張薬を投与すべきか？第64回日本循環器学会学術集会、2000.4.2. 大阪
31. 菅原多恵子、藤井 聡、ザマンAKMタリクツ、ジャスミン・サブリーナ、古本智夫、金子壮朗、佐久間一郎、北畠 顕、富樫広子：アンジオテンシン変換酵素はII型糖尿病ラット心微小血管再構築を改善する。第64回日本循環器学会学術集会、2000.4.3. 大阪
32. 菅原多恵子、藤井 聡、AKMタリクツ ザマン、サブリーナ ジャスミン、古本智夫、金子壮朗、佐久間一郎、富樫広子、北畠 顕：II型糖尿病ラット心微小血管再構築に対するアンジオテンシン変換酵素阻害薬の影響。第3回フォーラム高血圧と臓器障害。2000.2.12 東京
33. 縄手 聡、深尾充宏、佐藤篤司、佐久間一郎、牧野隆雄、山田陽一、服部裕一、當瀬規嗣、北畠 顕：血管内皮由来過分極因子 (EDHF) 反応に対するエストロゲンの影響-ギャップ結合蛋白-コネキシン (Cx)43 発現変化の関与。第4回分子生理研究会 (第37回日本臨床生理学会総会サテライト研究会)。2000.11.18. 奈良、日本臨床生理学会雑誌 30(Suppl): 114, 2000
34. 佐久間一郎、Subrina Jesmin、北畠 顕：冠微小循環構築リモデリングの制御機構。第26回日本微小循環学会総会。2001.2.15. 倉敷
35. 縄手 聡、佐久間一郎、牧野隆雄、北畠 顕：Estrogen upregulates EDHF-mediated responses through the increased expression of gap-junctional protein connexin43 in the mesenteric arteries of the middle-aged-female rats. 第65回日本循環器学会学術集会。2001.3.27. 京都

倫理面への配慮に関する付記

本研究班の分担研究において、実験動物に対する動物愛護上の配慮に関しては、分担研究者佐久間一郎、藤井 聡、仲井 邦彦、藤堂 省、劔物 修に係るすべての研究について、動物実験遂行機関であった北海道大学医学部および麻布大学獣医学部における「動物実験に関する指針」に従い動物実験計画書を各学部動物実験委員会に提出し、それらの承認を受けた研究であったことを申し添えます。

分担研究報告書

臨床応用を目的とした生体機能代替可能な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 本研究班では人工赤血球の臨床応用を企図し、高圧ジェット流反転型乳化機を用いた新規パーフルオロケミカル（PFC）製剤と、ヘモグロビン（Hb）修飾体としてポリエチレングリコール（PEG）修飾HbさらにSNO-PEG-Hbを創製してきた。本研究では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、ラット血液置換モデルで新規PFC製剤の酸素供給能を評価した。その結果、本研究班で創製されたPFC製剤は生体内の酸素供給能からみて従来のFluosol-DAを凌駕する製剤であることが明かとなった。また、Hb修飾体の臨床応用として、イヌ原虫感染症における急性貧血への投与の有用性を検討した。イヌのバベシア感染症による急性貧血に対し、PEG-Hbを投与することにより臨床経過が改善され、原虫感染症に起因する急性貧血治療に対する新規Hb修飾体制剤の臨床的有効性が確認された。

1. 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新規パーフルオロケミカル製剤の人工酸素運搬体としての機能評価

A. 研究目的

人工酸素運搬体としてパーフルオロケミカル（PFC）エマルジョンが研究されてきた。PFCエマルジョンは、以前わが国で開発されたミドリ十字製Fluosol-DA経皮的冠動脈拡張術での酸素補給液として製造許可を受けたものの、乳化技術の未熟に起因するPFC濃度の限界（20%）による酸素供給能の低さ、血中滞留時間の短さ、一方PFCとして加えたFTPAの血中半減期が長いこと、さらにエマルジョン安定化のために加えた表面活性剤Pluonic F-68による網内系活性化などが問題となり、現在は製造中止されている。近年、米国で改良された60%PFC製剤（Oxygent[®]）が、赤血球輸血代替で臨床第三相まで治験が進んでいた。しかし、血小板活性化に起因すると思われる脳卒中の増加により、治験が中断している。本研究班では平成10年度より神戸学院大学薬学部製剤学福島昭二講師と共同研究を行い、彼が特許を有する新規高圧ジェット流反転型乳化機を用いてPFCエマルジョン製剤の改良を加えてきた。そして、プロトタイプの製剤として、Fluosol-DAの主成分であるパーフルオロデカリンを30%含有

し、血小板活性化防止、網内系に対するステルス化および分子サイズの増大を企図してエマルジョンの表面をポリエチレングリコール（PEG）で修飾したもの（Neo-PFC）を創製した。本研究ではNeo-PFCの酸素供給能を、以前より人工赤血球の機能評価に利用している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により、従来のFluosol-DA[®]およびバッファーと比較検討し、その臨床的有用性を検索した。

B. 研究方法

雄性WistarラットをPentobarbital（50 mg/kg, i.p.）で麻酔し、100%酸素吸入下に大腿静脈からウシ血清アルブミン（BSA）を2%含有するPFC製剤もしくはバッファー溶液（BSA-Saline buffer）を注入しつつ、同時に大腿動脈から1 ml/分で脱血し、最終的に70%の血液をPFC製剤もしくはBSA-Saline bufferに置換した。その後、酸素・窒素比を徐々に減少させ、酸素分圧を段階的に減少させた。大腿動脈血および頸静脈血中酸素濃度を逐次測定した。脳内の酸素化状態の把握には近赤外分光測定を行った。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, 805 nmの4波長の吸光度を同時に計測し、酸

素化ヘモグロビン、脱酸素化ヘモグロビン)、全ヘモグロビン、およびチトクロームオキシダーゼ (Cyt. ox.) の酸化率を演算により同時に連続的に算出した。入射光はグ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。

用いた PFC 製剤の一方はミドリ十字製 Fluosol-DA[®]であり、北海道大学電子科学研究所超分子分光教室に以前より冷凍保存されていたものである。もう一剤は本研究班研究協力者神戸学院大学薬学部製剤学福島昭二講師が新規に製作した30%パーフルオロデカリン製剤 (Neo-PFC) であり、同剤はエマルジョンの表面をポリエチレングリコール (DSPE-PEG) にて修飾している。乳化剤としては精製卵黄レシチンを使用し、新規高圧ジェット流型乳化機ミニDeBEEを用いて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安定したエマルジョン製剤を製造した (図1)。両PFC製剤および赤血球の性質、および70%置換状態の各PFC製剤の酸素溶解曲線を表1および図2に示す。図2の5.5%は正常状態での動脈血と静脈血における酸素分圧較差を示す。600 Torrにおいて、70%置換状態のFluosol-DAおよびNeo-PFCの酸素溶解度はそれぞれ10 vol%および12 vol%となる。それらと比較し、BSA-Saline bufferに70%置換した状態では、酸素分圧を上昇させても酸素溶解度が低いことが理解される。

C. 研究結果

図3に吸入酸素・窒素分圧比を段階的に変化させた際のラット脳内チトクロームオキシダーゼ酸化率を示す。Fluosol-DAではFiO₂が100%~60%まで、チトクロームオキシダーゼが100%酸化されていたが、Neo-PFCではFiO₂が40%となるまで100%酸化が保たれ、その後も他群より酸素化が高い状態で推移した。一方、BSA-Saline bufferではFiO₂が80%から徐々に酸化率が減少した。図4に吸入酸素・窒素分圧比を段階的に変化させた際の動脈血および静脈血PO₂を示す。静脈血PO₂はNeo-PFC > Fluosol-DA > BSA-Saline bufferとなった。図5は動脈血PO₂、静脈血PO₂および酸素溶解度から計算された酸素供与能を示す。FiO₂が100%~60%まではNeo-PFCとFluosol-DAの酸素供与能は同等で、BSA-Saline bufferを有意に凌駕しているが、FiO₂が40%~20%ではNeo-PFCの酸素供与能が他群より有意に高かった。一方、FiO₂が10%以下では三群間に有意差は認められなかった。

D. 考察

本研究で使用したNeo-PFCのPFC濃度は30%であり、Fluosol-DAの20%と比較して10%の増加のみであり、70%置換状態のFluosol-DAおよびNeo-PFCの酸素溶解度はそれぞれ10 vol%および12 vol%であったが、FiO₂が40%~20%において酸素供与能に有意差が認められた。図4で静脈血PO₂がNeo-PFC > Fluosol-DA > BSA-Saline bufferとなったが、酸素供給能が低い状態で静脈血の酸素濃度低下が起こったためと考えられる。本検討の結果、プロトタイプのPFC製剤であるNeo-PFCの酸素供与能がFluosol-DAに勝ることが明かとなったが、米国のPFC製剤 (Oxygent) のはPFC濃度は60%を達成している。またNeo-PFCはエマルジョンの表面をPEG修飾しているが、同修飾による有用性に関しては別に詳細な生物学的検討や毒性試験等を行い、検討を加える必要がある。PFC製剤の酸素供与能はPFC濃度に比例する事実を考えれば、今後さらに製剤の改良を加えてPFC濃度を高め、さらに臨床応用に近づく製剤を創製する必要があると思われる。

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、本研究班で創製されたPFC製剤であるNeo-PFCが生体内の酸素供給能からみて従来のFluosol-DAを凌駕する製剤であることが明かとなった。

2. イヌの原虫感染症に伴う急性貧血への新規ヘモグロビン修飾体の臨床応用

A. 研究目的

人工酸素運搬体は血中半減期が短く慢性貧血には適応がない。しかしながら、急性に貧血が転化する際には緊急避難的な応用が期待され、特に適当な代替血がない場合に実際に臨床的な評価が試みられてきた。例えば地中海貧血患者の急性転化、マラリア感染症 (輸血システムが十分な地域が少なくなく、感染血を輸血してしまう危険性が高い現状がある)、さらに自己免疫性貧血 (全ての同種血輸血が無効) などである。また、人工酸素運搬体の血中半減期は実際には1日程度である。人工赤血球代替物の開発の理由として、同種血輸血回避が謳われているものの、外科・救急医療領域でも大量の出血に際して使用された場合、数日後には循環から消失するため、

血中ヘモグロビン (Hb) 濃度を維持するためには、人工赤血球代替物の繰り返し投与または同種血の追加が必要となる。前者の場合、大量投与による鉄負荷と生体適合性が問題となり、後者の場合には、人工物は同種血の回避という当初の目的と矛盾してしまう。以上の問題点を考慮するならば、人工赤血球代替物の血中半減期が短いことを利用し、一時的な酸素運搬の代替に特化させた臨床応用を考慮すべきであり、適当な同種血が準備できないような貧血症例では、臨床的に極めて有用となると期待される。

そこで本研究では、麻布大学獣医学部伝染病学研究室並河助教との共同研究により、イヌの原虫感染症に伴う急性貧血に対し、本研究班で開発した新規Hb修飾体を臨床応用することを検討した。獣医領域では輸血供給システムは必ずしも完全ではなく、供血犬を多数飼育し同種血輸血を維持しているが、血液型不適合や消費量のばらつきなどの制限により企業化が難しく、現在緊急時への対応はなかなか困難である。イヌの原虫感染症のなかでバベシア感染症では、急性貧血に陥るケースがあり、その際有効な治療薬はなく、患者が急性期を乗り越えて自立的に回復することで不顕性感染に向かう。すなわち、急性期の貧血を乗り越えることで治療も可能となる事情がある。本研究ではその貧血期を支援するために新規Hb修飾体を投与し、その結果治療効果が得られるか否かを検討することを目的とした。

B. 研究方法

実験犬にバベシアを感染させ、急性貧血を惹起した。貧血が顕著となった段階で、本研究班で開発した新規Hb修飾体であるポリエチレングリコール修飾 (PEG) -Hb投与群と無処置群に分け、経過観察を行った。

C. 研究結果

PEG-Hb投与群は一時的に体力を回復し、臨床経過も改善された。血中Hb量は無処置群の約1.5~2倍の値を維持し、急性貧血治療への臨床的有効性が示唆された。

D. 考察

本研究はイヌをモデルとした臨床試験であり、獣医学分野への貢献も大きいと期待されるが、ヒトでもマラリアなど急性期に治療法のない貧血を伴う原虫感染症はいまだ世界に広く流行しており、そのような疾患への治療実験モデルとしても有用と思われる。また、人工赤血球代替物の臨床応用を考える場

合、人工血液製剤に関する医療経済を考慮する必要がある。もし人工赤血球製剤の臨床適応疾患が確実に存在し、製品の需要が確保されれば、製剤についての原材料費、製造費、販売価格等が算出され、原料のHbの確保等に関しても明確に企画を立て、企業化が可能か否か決定する方向に進むことができると考えられる。

今後、PEG-Hb投与のタイミングや投与量などを検討しつつ、症例数を積み重ねPEG-Hb、次いでさらに副作用の少ないことが今までの本研究班の検討で確認されているSNO-PEG-Hbの有効性を検証する予定である。

E. 結論

イヌのバベシア感染症による急性貧血に対し、PEG-Hbを投与することにより臨床経過が改善され、原虫感染症に起因する急性貧血治療に対する新規人工赤血球製剤の臨床的有効性が確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujii H, Fujii S, Togashi H, Yoshioka M, Nakai K, Satoh H, Sakuma I, Kitabatake A, Kenmotsu O: Attenuation of hypothermia-induced platelet activation and platelet adhesion to artificial surfaces in vitro by modification of hemoglobin to carry S-nitric oxide and polyethylene glycol. *Thromb Res* 100(6): 519-528, 2000
2. Nakai K, Togashi H, Yasukohchi T, Sakuma I, Fujii S, Yoshioka M, Satoh H, Kitabatake A: Preparation and characterization of SNO-PEG-hemoglobin as a candidate for oxygen transporting material. *Int J Artif Organs*: 2001, in press
3. Hiroko Togashi, Ichiro Sakuma, Kunihiro Nakai, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Sato and Akira Kitabatake: S-nitrosylation of a newly developed polyethylene glycol-conjugated hemoglobin causes a marked inhibition of ex vivo platelet aggregation in the rat. *The Biology of Nitric Oxide Part 7*. ed Moncada, S., Wilkum, P., Gustaffson, L. and Higgs, E.A., Portland Press, London. p23, 2000
4. Ichiro Sakuma, Hiroko Togashi, Kunihiro Nakai, Satoshi Fujii, Mitsuhiro Yoshioka,