

- 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., Wilkond, P., Gustaffson, L. and Higgs, E.A., Portland Press, London. p75, 2000
5. 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. pp27-33, 2000
6. Hiroshi Tomioka, Yuichi Hattori, Mitsuhiro Fukao, Watanabe H, Yasuhiro Akaishi, Atsushi Sato, Kim TQ, Ichiro Sakuma, Akira Kitabatake, Morio Kanno: Role of endothelial Ni^{2+} -sensitive Ca^{2+} entry pathway in regulation of EDHF in porcine coronary artery. *Am J Physiol* 280(2): H730-H737, 2001
7. MingYue Liu, Yuichi Hattori, Mitsuhiro Fukao, Atsushi Sato, Ichiro Sakuma, Morio Kanno: Alterations in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle. *Br J Pharmacol* 132(5): 1035-1046, 2001
8. 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
9. 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) 実験プロトコール. 吉村哲彦編. 共立出版株式会社、東京. pp280-284, 2000.8.
10. 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
11. 佐久間一郎、深尾充宏、服部裕一、北島 顕: 血管をめぐる課題・内皮由来過分極因子 (EDHF) の心・循環系における役割. *血管と内皮* 10(特別増刊号): 19-30, 2000
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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、北島 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. *血圧* 7(7): 746-750, 2000
16. 佐久間一郎: 高血圧におけるNO (一酸化窒素) の関わり. *Kyo* 124: 1-6, 2000
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 Polyethyleneglycol-Conjugated S-Nitroso-hemoglobin 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. Yasukobchi, 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 Caridol 37: 177A, 2001
13. Subrina Jesmin, Ichiro Sakuma, Satoshi Fujii, Akira Kitabatake: PIVOTAL ROLE OF ANGIOTENSIN II IN CORONARY NETWORK REMODELING IN DIADETES: POSSIBLE INVOLVEMENT OF AKT-NITRIC OXIDE PATHWAY. The 65th Annual Meeting of the Japanese Clrculation 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 NOBEL 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 BOLCKER SUPPRESSES CARDIAC ANGIOGENESIS AND FIBROSIS AT AN EARLY STAGE OF TYPE II DIABETES MELLITUS. The 65th Annual Meeting of the Japanese Clrculation

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. 佐久間一郎: 人工赤血球の需要と医療経済. 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, 剣物 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, サマン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, 富樫廣子: 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 サマン, サブリーナ ジャスミン, 古本智夫, 金子壮朗, 佐久間一郎, 富樫廣子, 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,

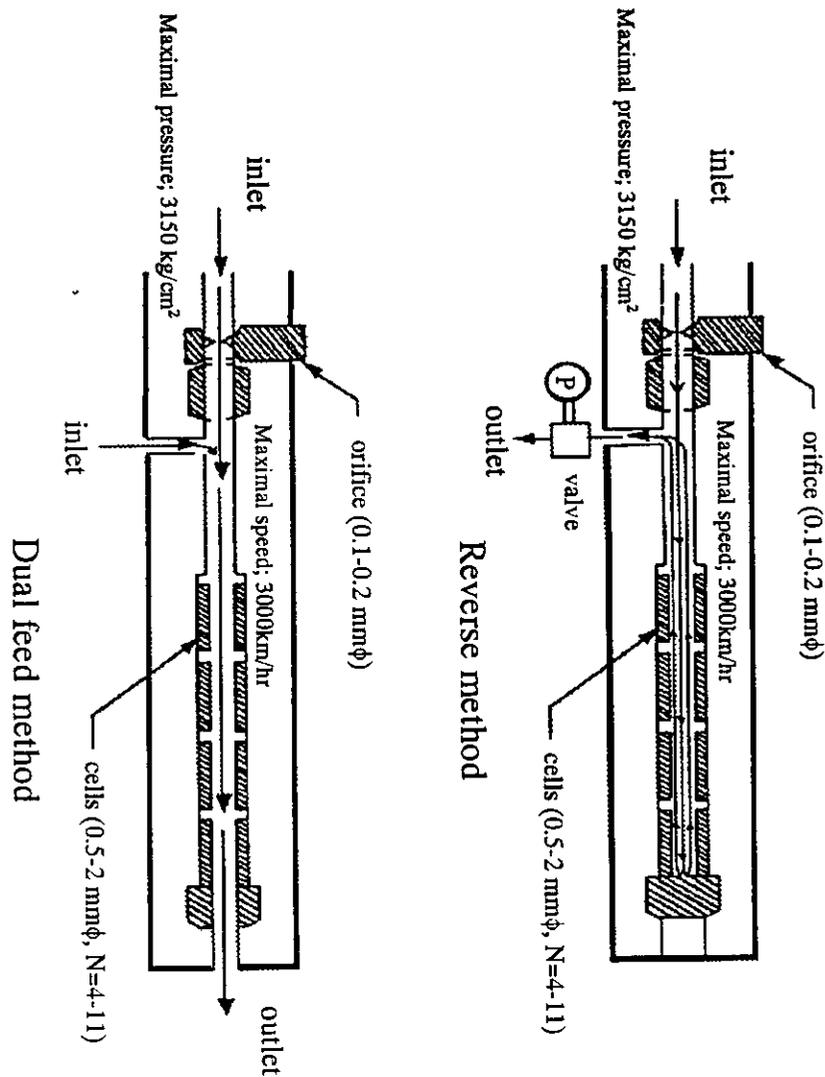
牧野隆雄, 山田陽一, 服部裕一, 當瀬規嗣, 北畠 顕: 血管内皮由来過分極因子 (EDHF) 反応に対するエストロゲンの影響-ギャップ結合蛋白-コネキシン (Cx)43 発現変化の関与. 第4回分子生理研究会 (第37回日本臨床生理学会総会サテライト研究会). 2000.11.18. 奈良、日本臨床生理学会雑誌 30(Suppl): 114, 2000

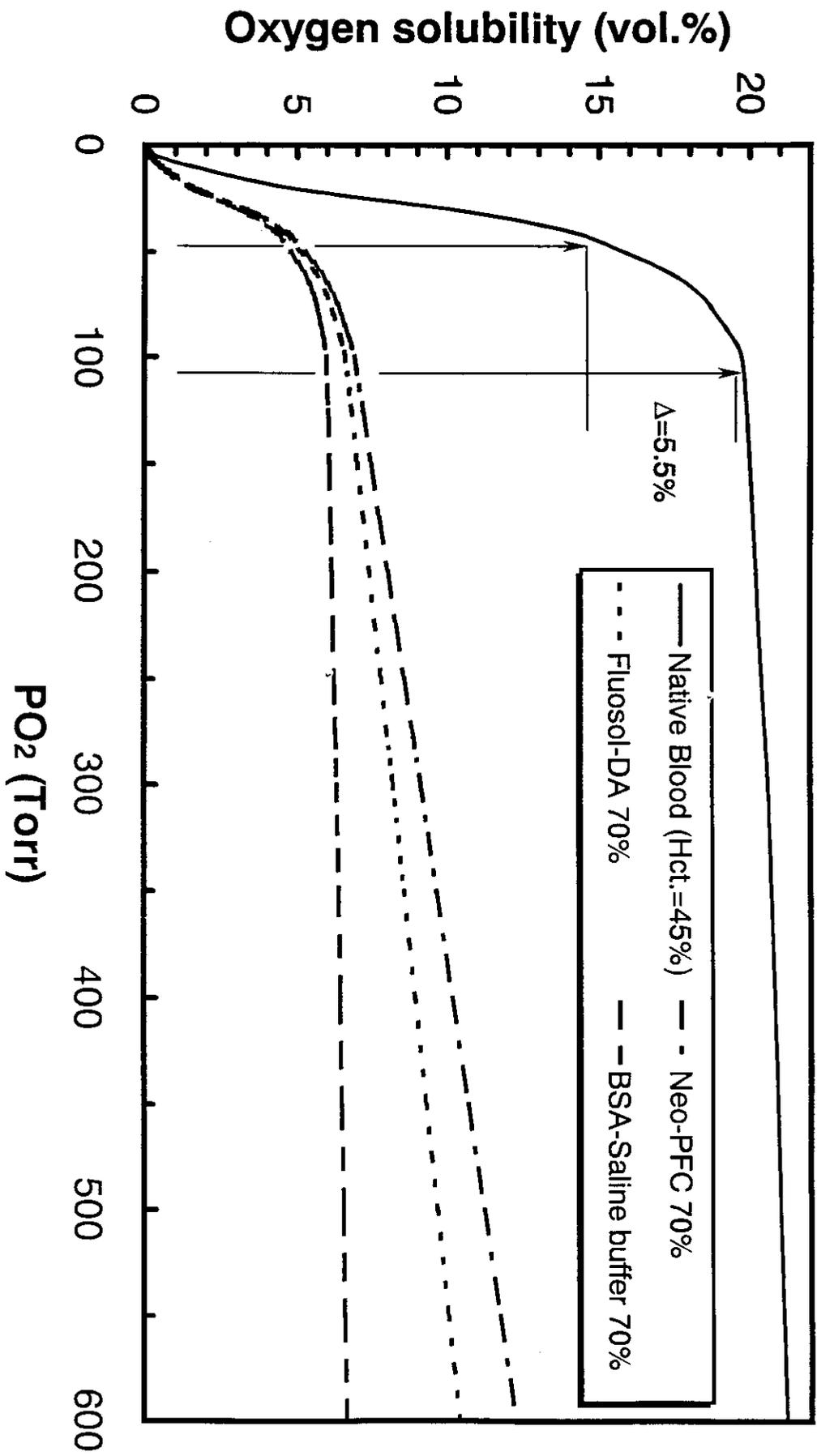
34. 佐久間一郎, Subrina Jesmin, 北畠 顕: 冠微小循環構築リモデリングの制御機構. 第26回日本

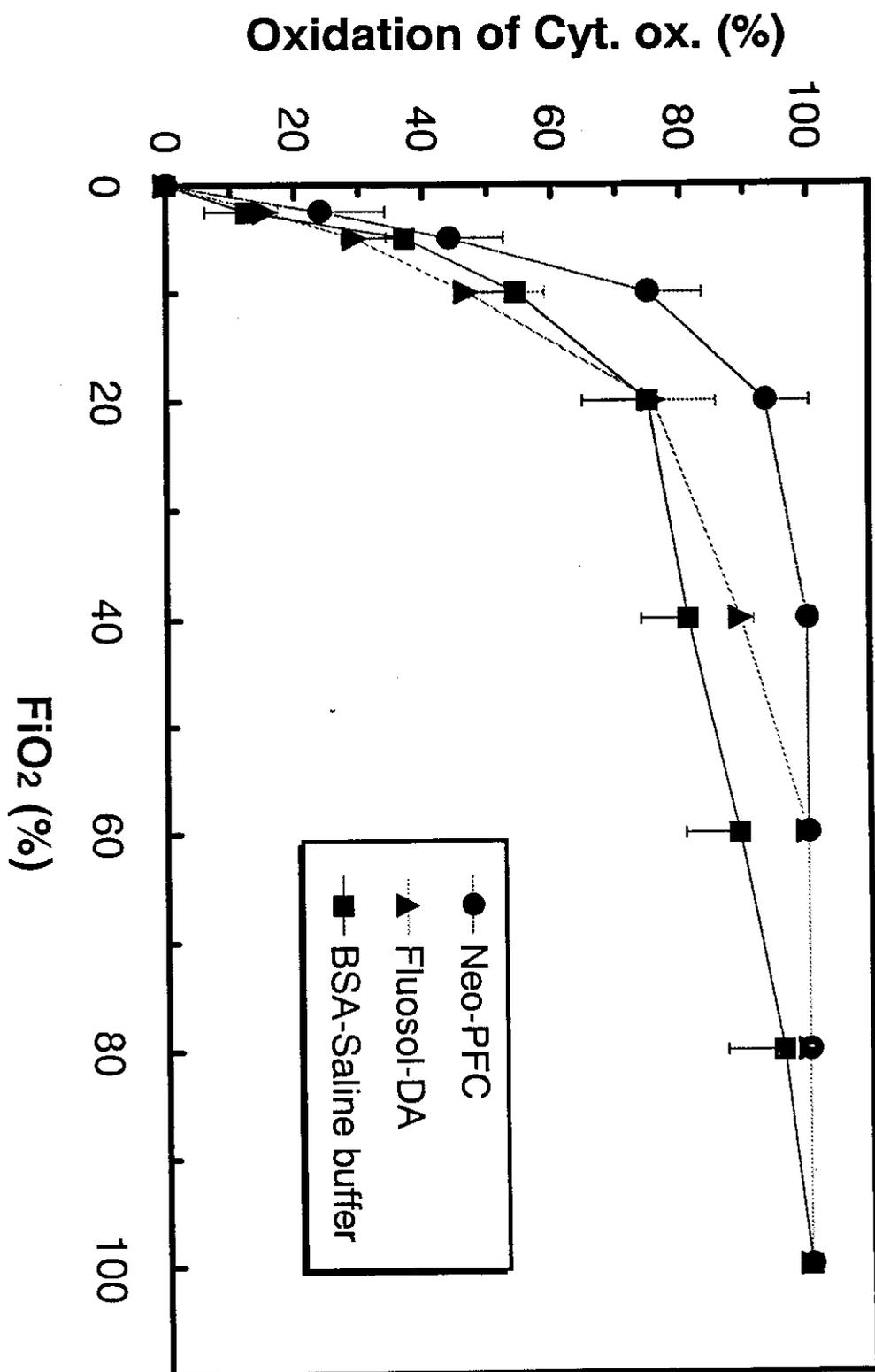
微小循環学会総会. 2001.2.15. 倉敷

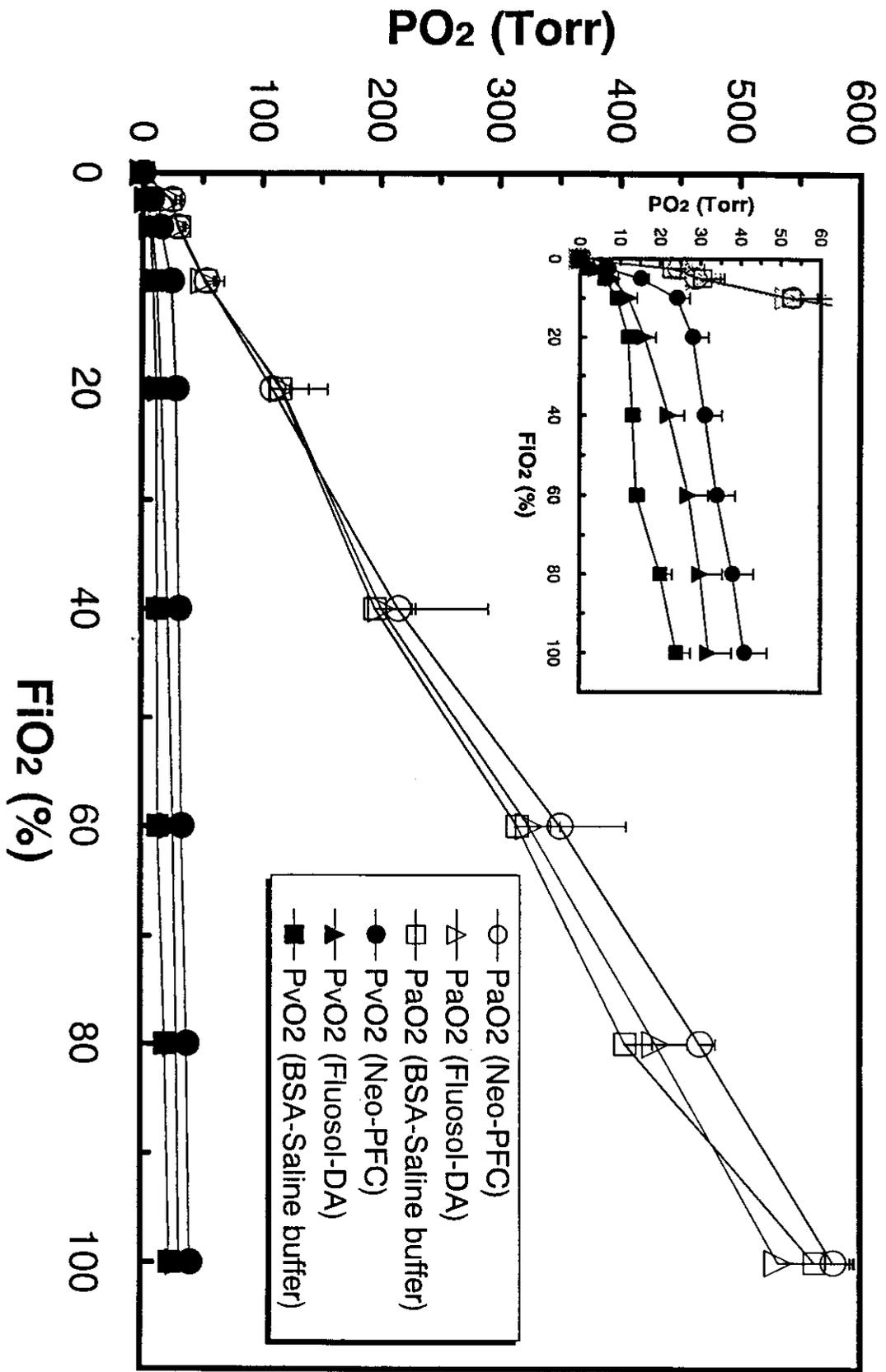
35. 縄手 聡, 佐久間一郎, 牧野隆雄, 北畠 顕: Estrogen upregulates EDHF-mediated responses through the increased expression of gap-junctional protein connexin43 in the mesenteric arteries of the middle-aged-female rats. 第65回日本循環器学会学術集会. 2001.3.27. 京都

図1

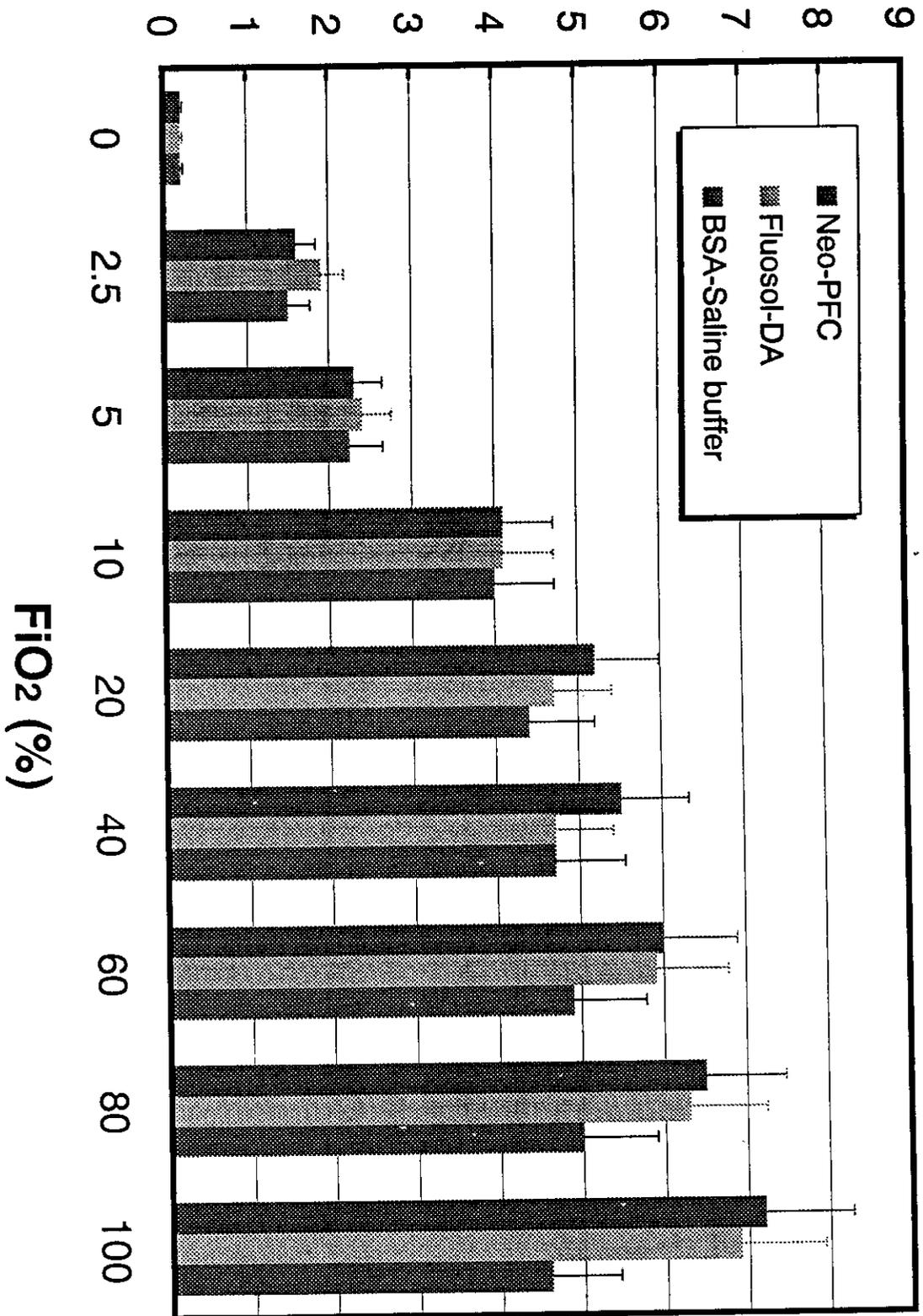








Oxygen Delivery (vol %)



	Neo-PFC	Fluosol-DA® (Green Cross Co.)	Stored Blood
PFC	perfluoro-decalin (PFD)	perfluoro-decalin (PFD) perfluoro-triisopropylamine (FTPA)	-
PFC conc. (w/v)	30%	20%	-
Surfactant (w/v)	egg yolk lecithin (4%)	Pluronic F68 (2.7%) egg yolk lecithin (0.4%)	-
Particle diameter (µm)	0.1-0.35	0.2-0.3	5-8
Shelf-time	-	2 years (frozen)	5 weeks
Viscosity (cP)	2.4 (37 °C)	2.7 (37 °C)	5 (37 °C)
Isotonicity	Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.5)	Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.3)	-
Half-time in body	7 days (PFD)	7 days (PFD) 60 days (FTPA)	60 days
Toxicity (LD50)	-	144 ml (rats)	-

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 藤井 聡 北海道大学医学部附属病院講師

研究要旨 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。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。一酸化窒素(NO)は血小板凝集、粘着を抑制する。ヘモグロビン(Hb)はNOを不活化する結果血小板凝集を増強する可能性がある。そこで本研究では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ポリエチレングリコール(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。健常ヒト多血小板血漿(platelet rich plasma, 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。SNO-Hb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、SNO-Hb、PEG-Hb、SNO-PEG-Hb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。今後更に臨床応用の可能性を検討したい。

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-セレクチ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。

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(論文1)。

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(論文2)。

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と数を測定する。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(論文2)。

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(論文3、4)。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(論文5)。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うる(論文6)。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、血圧上昇をもたらし、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-セレクチ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-セレクチ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(論文7)。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(論文8)、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(論文9-10)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(論文11-16)。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(論文1)。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-セレクチ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。

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, Kenmotsu O, Kitabatake A. 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* 2000; 100: 519-528

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. Ogawa T, Fujii S, Urasawa K, Kitabatake A. Effects of nonionic contrast media on platelet aggregation: assessment by particle counting with laser-light scattering. *Jpn Heart J* 2001; 42: 115-124
 4. Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Iino N, Fujii S, Kitabatake A, Shimokawa H, Takeshita A. Critical role of Rho kinase and MEK/ERK pathways for angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor-1 gene expression. *Arterioscler Throm Vasc Biol* (in press)
 5. Ishimori N, Iwabuchi K, Fujii S, Watano K, Iwabuchi C, Ato M, Chiba H, Tanaka S, Kitabatake A, Onoe K. Mixed allogeneic chimerism with wild-type strains ameliorates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Leukocyte Biol* (in press)
 6. Togashi H, Sakuma I, Nakai K, Fujii S, Yoshioka M, Sato H, Kitabatake A: S-nitrosylation of a newly developed polyethylene glycol-conjugated hemoglobin causes a marked inhibition of ex vivo platelet aggregation in the rat. *The biology of nitric oxide part 7*. Moncada S, Wilkum P, Gustaffson L and Higgs EA eds, Portland Press, London. 2000: 23
 7. Sakuma I, Togashi H, Nakai K, Fujii S, Yoshioka M, Sato H, Kitabatake A. 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*. Moncada S, Wilkum P, Gustaffson L and Higgs EA eds, Portland Press, London. 2000: 75
 8. 藤井 聡、北畠 顕：新しい動脈硬化危険マーカーとその意義 フィブリノーゲン、vWF、PAI-1 *Progress in Medicine* 1999; 19: 1864-1868
 9. 北畠 顕、藤井 聡：血栓症の大規模臨床試験 2. 心臓 a 虚血性心疾患 血栓と循環 1999; 4: 61-62
 10. 藤井 聡、北畠 顕 凝固系と線維素溶解系の血管医学への応用：最近の展開 血管と内皮 2000; 特別増刊: 31-40
 11. 藤井 聡 動脈硬化と線溶系 *Atherothrombosis* 2000; 3: 31-33
2. 学会発表
1. 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
 2. 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.
 3. 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.
 4. Furumoto T, Saito N, Fujii S, Mikami T, Kitabatake A. Antihypertensive therapy does not improve endothelial dysfunction in patients with high plasma levels of inflammatory markers. *Hypertens Res* 2000; 23: 74
 5. Fujii S, Furumoto T, Saito N, Goto D, Zaman T, Watano K, Ishimori N, Kaneko T, Sugawara T, Mikami T, Kitabatake A. Endothelial function and fibrinolysis in patients with hypertension and high plasma levels of inflammatory markers. *Fibrinolysis and Proteolysis* 2000; 14 (Suppl 1): 36
 6. Furumoto T, Fujii S, Saito N, Mikami T, Kitabatake A. Diminished endothelial function and hypofibrinolysis in high risk patients with hypertension and high plasma levels of inflammatory markers: need for antiinflammatory strategy. *Hypertension* 2000; 36: 684
 7. Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Fujii S, Kitabatake A, Takeshita A. Critical roles of Rho kinase and MEK/ERK pathways for angiotensin

- II induced plasminogen activator inhibitor-1 gene expression Hypertension 2000; 36: 721
8. Kaneko T, Fujii S, Matsumoto A, Kitabatake A. Effects of basic fibroblast growth factor (BFGF) on plasminogen activator inhibitor type-1 and tissue factor promoters in endothelium. J Mol Cell Cardiol 2000; 32: A92
9. Kaneko T, Fujii S, Matsumoto A. Basic fibroblast growth factor activates plasminogen activator inhibitor type-1 and tissue factor promoter through ETS-1 and EGR-1 in vascular endothelial cells: implications for molecular link between atherothrombosis and angiogenesis. Circulation 2000; 102: II-258
10. Furumoto T, Saito N, Kaneko T, Sugawara T, Goto D, Urasawa K, Mikami T, Fujii S, Kitabatake A. Importance of hypertension as a coronary risk factor by measurement of flow mediated dilation of brachial arteries and markers of fibrinolysis and inflammation. Hypertension Res 2001; 24: A23
11. Furumoto T, Fujii S, Saito N, Mikami T, Urasawa K, Kitabatake A. Association of coagulation and fibrinolytic parameters with brachial artery flow mediated dilation and carotid artery intima-media thickness: indicator of patients with high risk for coronary artery disease. J Am Coll Cardiol 2001; 37: 251A
12. 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. 日本心臓血管作動物質学会, 2000.2.5. 福岡
13. 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
14. 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
15. 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
16. 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おける基礎的検討. 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
17. 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
18. 菅原 武, 佐久間一郎, 仲井邦彦, 富樫廣子, 藤井 聡, 剣物 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
19. 古本 智夫, 藤井 聡, タリクツ サマン, 後藤大祐, 綿野敬子, 石森直樹, 金子壮朗, 菅原多恵子, 北畠 顕: Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor Prevents Fibrinolysis Disruption in Obese Mice 心血管内分泌代謝学会, 2000.5.21
20. 石森直樹, 藤井聡, 綿野敬子, 北畠顕: Mixed allogeneic chimerism は apoE ノックアウトマウスにおける動脈硬化病巣進展を抑制する 第64回日本循環器学会学術集会, 2000.4.2
21. 石森直樹, 岩淵和也, 藤井聡, 綿野敬子, 葛西瑞穂, 千葉仁志, 小野江和則, 北畠顕: Mixed allogeneic chimerism は apoE ノックアウトマウスにおける動脈硬化病巣進展を抑制する 第32回日本動脈硬化学会, 2000.6.1
22. 藤井聡, 石森直樹, 綿野敬子, 北畠顕, 岩淵和也, 小野江和則: 骨髄キメラマウスを用いた細胞工学的手法による動脈硬化病巣進展抑制の研究 第1回血管病研究会, 2000.8.19
23. 綿野敬子, 藤井聡, 石森直樹, 北畠顕 アログラフト炎症因子の粥状動脈硬化巣における発現 第64回 日本循環器学会学術集会 2000.4.1
24. 綿野敬子, 岩淵和也, 藤井聡, 石森直樹, 阿戸学, 小野江和則 アログラフト炎症因子(AIF)-1はマクロファージのIL-6・-10・-12産生を増強する 第30回 日本免疫学会学術集 2000.11.14 厚生科学研究費補助金(高度先進医療研究事業)

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 仲井邦彦 東北大学大学院医学系研究科環境保健医学助教授

研究要旨 継続してSNO-PEG-HbおよびPEG-Hb製造を担当し、共同研究者への供給を行った。品質管理体制を整え、ロット管理、品質管理表を添付した。次に基礎研究として、SNO-PEG-HbおよびPEG-Hbの生体適合性を検討するため、ラットを用いた急性毒性試験を実施した。全血液量の30%に相当するHb溶液を単回投与し、肝機能および腎機能の変化を観察したが、対照の5% bovine serum albumin (BSA)投与群と比較し、GOT、GPT値はPEG-Hb>未修飾Hbの順に上昇し、SNO-PEG-Hb投与群はBSA投与群と同等か若干高値を示したのみであった。ただし、PEG-Hb投与群の変化も一過性の上昇であり、3日目には前値に回復した。血漿尿素窒素 (BUN) はBSA、Hb溶液投与群ともに一過性に低下し3日目に回復した。creatinineは未修飾Hb投与群のみで3日目から上昇し14日後も持続的に高値を示した。以上からSNO-PEG-Hbは十分な生体適合性を有していることが示され、PEG-Hbにおいて大きな侵襲が示唆されたが、PEG修飾Hbでこれまでに報告されている生体反応と同一であり、許容範囲内と考えられた。

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 Buiscience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

1) SNO-PEG-Hb製造

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、嫌気的条件下で 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、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 (Eicompak 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-naphthylethylenediamine、2% リン酸により亜硝酸を発色させ540 nmの吸光度より定量した。

2) 各種Hb溶液の急性毒性試験

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。標準作製と病理所見は、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

1) SNO-PEG-Hb製造

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。

2) 各種Hb溶液の急性毒性試験

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ものがあらためて確認された。

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, 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., Wilkund, 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., Wilkund, P., Gustaffson, L. and Higgs, E.A.,

Portland Press, London. p75, 2000

5. 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. pp27-33, 2000
6. 仲井邦彦、佐久間一郎、福島昭二、竹内由和、佐藤 洋、北畠 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. 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.
8. 仲井邦彦、佐久間一郎、福島昭二、照屋 純、竹内由和、佐藤 洋、北畠 顕: 人工酸素運搬体開発の課題. *血液・免疫・腫瘍* 6(1): 29-34, 2001
9. 佐久間一郎、仲井邦彦、菅原 武、佐藤 洋、北畠 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
10. 照屋 純、佐久間一郎、仲井邦彦、北畠 顕: 赤血球代替物の臨床応用の可能性. *人工血液* 9: 2001, in press

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 Polyethyleneglycol-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. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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體 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
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
16. 菅原 武, 佐久間一郎, 仲井邦彦, 富樫廣子, 藤井 聡, 剣物 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

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 藤堂 省 北海道大学大学院医学研究科教授

研究要旨 わが国でも脳死肝移植が開始されたが、donor肝輸送時の肝細胞保護および再灌流時の肝細胞障害が問題となる。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、ラット単離肝虚血再灌流モデルを用い、37°C条件下でPFC製剤を混合した臓器灌流液が、酸素供給能に基づき灌流停止および再灌流による障害から肝細胞を保護できるか否かを検索した。その結果、常温下において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、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唆された。

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、37°C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腔内に到達し、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、