

厚生科学研究費補助金

高度先端医療研究事業（人工血液開発分野）

## 臨床応用可能な人工赤血球の創製 に関する研究

（研究課題番号：H12-血液-002）

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 土田 英俊

（早稲田大学 理工学総合研究センター）

平成 14 (2002) 年 4 月

## 目次

I. 総括研究報告書	1
土田英俊（早稲田大学 名誉教授／理総研 顧問研究員）	
II. 分担研究報告書	
1. 土田英俊（早稲田大学 名誉教授／理総研 顧問研究員）	5
2. 池田久實（北海道赤十字 血液センター 所長）	28
3. 小林絃一（慶応大学 医学部 教授）	37
4. 末松 誠（慶応大学 医学部 教授）	43
5. 高折益彦（東宝さとう病院 名誉院長）	46
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	49
IV. 研究成果の刊行物・別冊	54

## 臨床応用可能な人工赤血球の創製 に関する研究

主任研究者 土田 英俊 早稲田大学 名誉教授／理工学総合研究センター 顧問研究員

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

第 2 期 2 年度 (平成 13 年度) に得られた研究成果は、① 前年度に開発された安定化小胞体組成の脂質成分の前処理法と新しいアミノ酸型脂質を利用する製造工程の詳細設計による数 lit 規模の製造の達成、② Hb 精製工程での安定化のための HbCO 化処理および残留 O<sub>2</sub> の電解除去処理、次いで脱 CO 化処理法の確立、③ 製造コストに最大の影響あるリン脂質類の価格を 1/10 以下にするため、両性イオン型アミノ脂質からなる Hb 小胞体の構築を含め、リン脂質使用を減量した系を提案、④ metHb の光電子還元、加えて Hb 小胞体から活性酸素や過酸化脂質生成の皆無を確認、⑤ 蛋白質を含まない新しいリポドヘム小胞体、アルブミン-ヘムを含め量合成の確立と動物投与試験による血管径や血圧変動を惹起しないことの証明、⑥ 保存中における $\gamma$ 線照射赤血球の溶血度変化、⑦ Hb 小胞体の *in vitro* 安全性評価として、セロトニン放出および PAC-1 発現から血小板活性、SC5b-9 から補体活性化、カリクレン-キニン系の影響を評価、⑧ 前年度に作成された前臨床試験プロトコル安全性試験 (40%交換輸血試験) に従って動物試験を実施、全身動態と血液生化学試験項目の計測、⑨ 肝微小循環観察から試料投与による循環障害や出血ショック状態の回避試験を実施し、ショック蘇生液、また体外循環灌流液としての効能評価、⑩ ラット投与時の肺微小循環応答を Hb、修飾 Hb (非細胞型) と細胞型 (Hb 小胞体) とで比較し、投与量設定に関する知見を得た。⑪ 臨床適応に対応する製剤としての物性規格と臨床治験の実施計画、また安全性・有効性に関する基準を立案。

## 分担研究者

池田 久實 北海道赤十字血液センター 所長  
小林 紘一 慶應義塾大学 医学部 教授  
末松 誠 慶應義塾大学 医学部 教授  
高折 益彦 東宝塚さとう病院 名誉院長

## A. 目的

ヘモグロビン (Hb) 小胞体を初めとする人工赤血球の製造方法の確立、物性値の確定表、*in vitro*,

*in vivo* 評価を行い、必要に応じた改良も行い、充分量の酸素を安全に体組織に輸送できる臨床応用可能な人工赤血球創製の実現。また、これに追従させて全合成系酸素運搬体 (リポドヘム小胞体、アルブミン-ヘム) についても検討した。

平成 13 年度の研究目的は、製造工程条件の確立、連結型造粒装置の評価/CO 化、脱 CO 化処理の効率化/電極法による Hb 溶液の完全脱酸素化と deoxyHb の加熱によるウイルスの不活化/新規ア

ミノ酸型脂質の合成と Hb 小胞体への利用／フラビン系光増感剤を用いたメトヘモグロビンの光還元／過酸化水素と Hb との反応による過酸化脂質生成過程／新しいリポドヘム小胞体の合成とその酸素親和度評価／アルブミン-ヘムの製造工程改良と動物試験による微小循環動態／血小板活性化・補体活性化・血漿凝固活性への影響／未照射系と比較した、 $\gamma$  線照射赤血球製剤の経時変化／肺微小循環動態への影響／安全性試験(40%交換輸血試験)／細網内系代謝の解析と臓器機能恒常性への影響／前臨床研究、治験計画に関する検討である。

## B. 方法

脂質組成処理では、Hb 小胞体 (HbV) の二分子膜を構成する混合脂質粉末を水和させ、液体窒素を用いた凍結と 40°C の湯浴を用いた融解の繰返法を用いる粒径制御。この凍結乾燥粉末に Hb を加え、Extruder を用いる粒径制御における透過性試験、その挙動をビデオ撮影により解析。連結型造粒装置へと発展させた。CO 化、脱 CO 化処理では、永柳工業製中空糸膜型モジュール、テルモ製市販人工肺 (CAPIOX-II)、柴田科学製大型液膜光照射装置を、光源は東京理科製 Na-ランプ(400W)を使用、電極法による溶液からの完全脱酸素化装置は自作。ウイルスには VSV を用いて Reed-Muench 法からウイルス感染価を算出。合成した新しいアミノ酸型脂質から Hb 小胞体を調製、物性を評価。フラビンモノヌクレオチドを光増感剤、EDTA などを電子供与体として用い、メトヘモグロビンを 400～450nm の可視光照射にて還元。過酸化水素と Hb を混合後、可視分光からフェリル体、メト体を定量し、定法にて過酸化水素、鉄イオン、過酸化脂質を定量。4 本のジアルキルグリセロホスホコリン基をポルフィリン面上に導入したリポドヘムを合成して、自己組織化させて小胞体とし、定法にて酸素結合反応を解析。日本ミリポア製限外濾過装置を用いてアルブミン-ヘムの製造工程を改良、ラ

ットに投与して腸間膜の微小循環動態を観測。血小板浮遊液に HbV を添加してセロトニン放出量から血小板活性化度を定量、全血と HbV とを混合後 FITC 標識 PAC-1 を添加して、陽性血小板をフローサイトメトリーにて計測。補体活性度を SC5b-9、C4d、Bb 値から EIA キットにて夫々定量した。血漿凝固活性への影響は、血漿中高分子キニノーゲンの変化をウエスタンブロット法にて解析した。 $\gamma$  線照射、未照射赤血球製剤を保存中経時的に採取し、溶血率を遠心分離後の上清ヘモグロビン濃度から測定。ラット肺微小循環動態は共焦点顕微鏡を用いて HbV 投与後経時的測定に成功した。定法によりラットに HbV を 40%まで交換投与して安全性試験を行なった。また、肝臓左葉の一部表面を倒立型生体顕微鏡にて観測収録した。

## C. 結果および考察

HbV 製造工程の簡略化のために、平成 12 年度にて提案された凍結融解・凍結乾燥による脂質組成処理法を実用化するために、脂質水和体の凍結融解条件(濃度、温度、予備凍結)を決定した。その際、脂質濃度の増大や凍結速度の低下は逆効果となるため条件設定が重要であることを再認識。3 回操作を繰返して得られる脂質水和体の凍結乾燥粉末を高濃度 Hb 溶液中に分散・水和させると、500 nmφ の小胞体分散液となる。この方法利用により HbV 造粒時の押出圧力は大幅低下できるので、異なる孔径のフィルターを設置した押出器を連結して透過させる方法を考案し装置を試作評価し、造粒時間は従来の 1/100 程度まで短縮される。前年度開発の多段式造粒装置に本成果を組込んだ多段連結式造粒装置の設計ができており、数十 lit 規模のスケールアップが計画されている。Hb の精製あるいは HbV 製造時のメト化防止策として、Hb を安定な CO 体とするが、大量処理を想定して中空糸膜型モジュールの構造、材質、運転条件などを検討し、大型液膜光照射装置を用いる脱 CO 化と共に量産工程における装置設計指針を得たので、平成 14

年度までに装置を完成させる。また、Hb の deoxy 体は CO 体に匹敵する安定度を持つが、完全な脱酸素化法として Hb の結合酸素を電解除去する手法を考案した。予めガス交換膜モジュールを用いて脱酸素化を行ない、本電解装置を組合せて完全な脱酸素化が可能となった。研究室規模では CO 体は取扱い容易であるが、製造プラントでは無酸素条件は困難ではない。deoxy 体の加熱処理(62°C、12 時間)により 10<sup>6</sup>以上の VSV 不活化率を確認し、無酸素雰囲気下でのウイルス不活化工程の導入が見込めた。更に、高価なリン脂質に代わる両イオン性脂質としてアミノ酸型脂質を新規に合成、基礎物性の整理と共に HbV の膜主成分としてリン脂質に代わり得ることを明らかにした。

酸素を結合したオキシ体を生体投与すると次第に酸化されてメト体となる。これを再びオキシ体に還元する方法として、フラビンモノヌクレオチドと EDTA を共存させて可視光照射によりメト体を還元する方法を検討した。本系を HbV 内に構築すれば、経皮的な可視光照射により、生体内での酸素運搬能を保持できる。更に、Hb はオキシ体自身、あるいは生体組織から発生した過酸化水素と反応してメト体やフェリル体となり、一部は変性してヘムや鉄イオンを遊離する。これが酸化ストレス時に活性酸素類の更なる発生や毒性の高い不飽和脂質の過酸化を招来し、Hb 由来の副作用に繋がること懸念されている。しかし、HbV 内で生じたフェリル体や鉄イオンは小胞体外へ漏出されずに、活性酸素は小胞体内部で消去されることから、小胞体構造によって Hb の安全性が飛躍的に向上することを証明できた。

全合成系酸素輸液として、量合成容易なリポドヘムを新規に合成してリポドヘム小胞体としての性能を評価した。さらに、アルブミン-ヘムの量産工程を確立し、40°Cで1年間の保存可能を確認、腸間膜の微小循環動態観測にて投与後血管径に変動がないことを明らかにした。

平成 12 年度に新規な負電荷脂質 (DPEA) を合成し、その基本物性を明らかにできたので、平成 13 年度では、DPEA を含有する HbV の表面をポリエチレングリコール(PEG)にて修飾したヘモグロビン小胞体(ここでは特に PEG-DPEA-HbV と表記)の血液成分との生体適合性について検討した。ヒト血小板活性化は、セロトニン放出反応と血小板活性化マーカー(PAC-1)の発現を指標にした。血小板に HbV を添加しても、コラーゲンの存在、非存在下において反応上清中のセロトニン濃度に統計的有意差はなく、セロトニン放出反応の亢進もみられなかった。PAC-1 発現では、ADP 刺激、未刺激のいずれも増加傾向がみられ、血小板の活性化を促すものと考えられた。今後、血小板活性化や血小板凝集に関して詳細に検討する。

補体活性化の指標として血清中 SC5b-9 を測定したところ、PEG-DPEA-HbV は PBS に比し 4 倍の増加がみられ、古典経路と第 2 経路の両方の関与が推測された。しかし、血漿中では SC5b-9 値の有意な増加は陽性コントロールの Zymosan A における 1/10 程度であった。

陰性荷電表面への接触が活性化の引き金となるカリクレイン-キニン系への影響を検討した。従来の PEG-DPPG-HbV では活性化の指標となる高分子キニノーゲンの分解を誘起したが、PEG-DPEA-HbV では分解はみられなかった。

また、γ線照射の赤血球では保存中の溶血度が未照射よりも高いことが判明したので、平成 14 年度は凍結保存の可能性について検討する。

人体のガス交換場である肺微小循環動態(肺細小動脈径、血圧および右室圧の変化)に与える影響を解明するために、レーザー共焦点顕微鏡を用いた。HbV はラット肺微小循環動態に明らかな変化を惹起しないことを確認した。

前年度決定の方法(麻酔、体温維持などの詳細な条件)のもと、40%交換輸血試験を行い、循環動

態と血液ガスパラメータ、および血液生化学項目を6時間追跡し安全性を評価。全身の循環動態、体温、呼吸数、血液ガス組成共に正常値を推移した。また、血液生化学の各測定項目は、前値から殆ど変動無く、安定に推移し安全性は高い。代謝臓器である肝機能を反映する血液生化学パラメータ値の増大や血中貪食細胞である好中球数の増大が観測されたが、これらはHbVの血中滞留時間と関連しており、HbVの貪食作用に伴う変化と思われる。微量に混入するエンドトキシンによっても変動する値でもあるので今後の検討を要する。

ヘム分解酵素、heme oxygenaseは肝臓に豊富に存在し、肝臓はHbの代謝に適した機能を有するが、HbVの代謝臓器としての肝臓あるいは網内系の応答に関する解析は極めて重要であるため、検討を重ねてきた。肝微小循環系ではHbVは投与直後に類洞内のKupffer細胞に取り込まれ、一過性に類洞血管の狭小化を来すものの、数分で正常に復する。他方、Hbを小胞体化せずそのまま投与すると一定時間の血管狭窄が認められる。肝血流の維持機能はCO濃度との関連を示しており、HbVの小胞体構造の重要性と網内系の処理能力を考慮した適正投与量に上限の存在を意味するものとして、次年度(平成14年度)では、更に明確にしたい。

更に赤血球代替物としての必要条件、安全性・有効性に関する基準、実行可能な臨床治験の実施計画の作成を行ない、近未来の臨床治験のガイドライン・プロトコール作成の参考となる。

#### D. 結論

物性規格を満足するHbVの量産は略々確立されたとして良い。ウイルス不活化や長期保存のための重要な工程(脱酸素化など)に実用化の目途がついた。更に、高価なリン脂質を用いない小胞体やメトHbの光還元システムの構築など、次世代HbVも確実に進展してきている。平成13年度は安全性を中心に、in vitro, in vivo 評価を進めており、

多項目に関して結果が得られた。際立った副作用は認められないが、補体や好中球の活性や肝臓など網内系に生化学的・構造的な変化が可逆的に認められ、HbVの代謝に関連していた。この点、平成14年度での反復投与試験や長期生存試験の詳細な検討を待つことになる。全合成系のアルブミン-ヘムも量合成可能となり、修飾Hb系でみられる微小循環動態の変化を全く認められず、興味深いことである。長期保存安定度も高い(1年以上)。新しいリピドヘム小胞体も提案した。臨床治験着手にむけた試料性能、安全性規格、臨床試験プロトコールなども意見がまとまりつつある。

早期完成を目指したい。

## 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. 脂質組成処理工程の確定と連結型造粒装置の評価
2. CO 化、脱 CO 化処理の効率化
3. 電極法による Hb 溶液からの完全脱 O<sub>2</sub> 工程と deoxyHb 系のウイルス加熱不活化
4. 新しいアミノ酸型脂質と Hb 小胞体への利用
5. 増感剤を用いるメトヘモグロビンの還元活性化
6. Hb 小胞体系での過酸化脂質生成の否定
7. リピドヘム小胞体の酸素親和度
8. アルブミン-ヘム製造工程改良 と 微小循環動態

主任研究者 土田 英俊 早稲田大学 名誉教授／理工学総合研究センター 顧問研究員

研究協力者 武岡 真司 早稲田大学大学院 理工学研究科 助教授

小松 晃之 早稲田大学 理工学総合研究センター 講師

酒井 宏水 早稲田大学 理工学総合研究センター 講師

小柳津研一 早稲田大学 理工学総合研究センター 講師

宗 慶太郎 早稲田大学 理工学総合研究センター 助手

黄 宇彬 早稲田大学 理工学総合研究センター 研究員

**研究要旨** 造粒工程時間は、脂質分子集合体分散液の凍結融解条件(濃度、温度、予備凍結)、連結式造粒装置の透過法により、約 1/100 程度まで短縮できた。また、製造過程では安定な HbCO 体として扱うが、簡便な扱いとしては中空糸膜型モジュールを用いる CO 化、脱 CO 化、あるいは光照射大型液膜装置を用いた脱 CO 化を行い、量産工程と装置設計指針を確立。このほか、電極法にて OxyHb 溶液を完全脱酸素系とし、この deoxy 体を加熱処理(62℃、12 時間)してウイルス不活化率 10<sup>6</sup> (6log) 以上とすることを確認。更に、両イオン性脂質代替物としてグルタミン酸誘導体が有効であることを確認、高価なリン脂質に代わる Hb 小胞体膜の主成分として利用できる可能性が明らかにされた。メト体(電子移動による中心鉄の高酸化状態)は光増感剤添加による可視光照射により大気下で数十秒の短時間で還元できることが明らかとなり、酸素配位活性が回復する。細胞型 Hb 小胞体系では内包 Hb のメト体やフェリル体による過酸化脂質生成は否定された。全合成系酸素輸液として、リピドヘム小胞体の可能性を追求した。性能評価から有用性を確認、アルブミン-ヘムの生産工程を確立、40℃で 1 年間の保存可能を確認、腸間膜の微小循環動態観測から投与後血管径に変動がないことを解明した。

# 1. 脂質組成処理工程の確定と連結型造粒装置の評価

## A. 目的

高濃度 Hb (35~40 g/dL) を内包する粒子径分布の狭い Hb 小胞体を、迅速かつ高収率で調製できる工程の確立を目的とした。前年度では、混合脂質粉末を水和させて繰返しの凍結融解法により、フィルター透過の extrusion 効率を飛躍的増大させ、造粒時間を大幅短縮できることを報告した。

今年度はスケールアップのための条件設定(凍結融解方法、温度、濃度)を検討すると共に、迅速かつ無菌的処理のできる連結型造粒装置を試作、有効利用できることを評価した。

## B. 方法

### 1) 脂質組成処理条件の設定

脂質粉末(DPPC/cholesterol/DPEA/PEG(5,000)-DSPE; モル比 5/5/1/0.033)を NaOH 水溶液に分散させ ([NaOH]=7.6 mM, [lipids]=5 g/dL) 22 °C で 2 時間攪拌した。この分散液を分注し、純水にて濃度を 1、2、3、5 g/dL に調整した。凍結融解の操作は凍結(液体窒素中で 10 分静置)と融解(40 °C の水浴中で 20 分静置)を繰り返した。また、2 g/dL の系について、ドライアイスで予備凍結(2 時間)し、-85 °C の冷凍庫(19 時間静置)あるいは液体窒素(10 分静置)で凍結し、融解(40 °C の水浴中で 13 分静置)する操作を三回繰返し、分散溶液を凍結乾燥した脂質粉末を得た。

### 2) フィルター透過性

凍結融解処理した小胞体分散液を凍結乾燥粉末とした後、Hb 溶液 5 mL (35 g/dL) で水和(25 °C、2 時間攪拌)し、これを EXTRUDER® (Lipex Biomembranes Inc.) に加え、14 °C で加圧(20 kgf/cm<sup>2</sup>) 下、孔径 3.0 μm、0.45 μm、0.30 μm、0.22 μm のアセチルセルロースフィルター(富士フィルム製)を順次透過させた。フィルター透過性は、透過液を目盛りシリンダーに受け、液面上昇

速度をビデオ撮影して解析した。

## C. 結果および考察

### 1) 脂質組成処理条件の設定

凍結融解時の脂質濃度が異なる試料のフィルター透過挙動を図 1 に、予備凍結した試料を図 2 に示す。また、各試料についての Hb 内包効率を表 1 にまとめた。

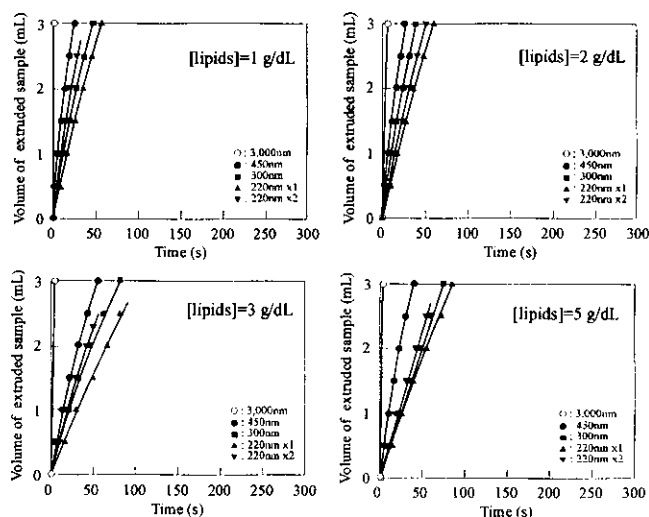


Fig. 1 Influence of the concentration of lipids during the freeze-thaw treatment on the membrane permeability of the extrusion for HbV dispersions.

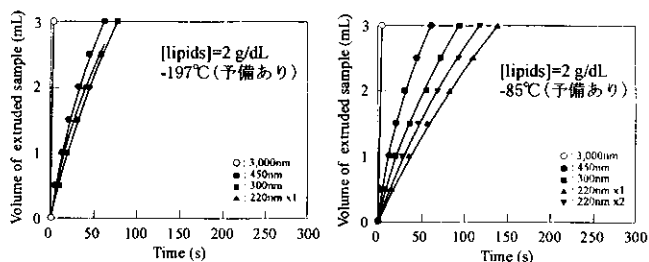


Fig. 2 Influence of the pre-freezing conditions on the membrane permeability at the extrusion of HbV dispersions.

Table 1 Influence of the freeze-thawing conditions on the encapsulation efficiency of Hb.

Freezing condition	[Hb]/[lipids]
1 g/dL (in liquid N <sub>2</sub> )	1.9
2 g/dL (in liquid N <sub>2</sub> )	1.8
3 g/dL (in liquid N <sub>2</sub> )	1.7
5 g/dL (in liquid N <sub>2</sub> )	1.7
2 g/dL (in freezer with pre-freezing)	1.8
2 g/dL (in liquid N <sub>2</sub> with pre-freezing)	1.8



脂質組成処理工程のスケールアップには、処理容量を考慮すると脂質濃度は高い方が望ましいが、脂質濃度が 3 g/dL 以上ではフィルター透過性能が低下した (図 1)。これは、高濃度系では凍結融解操作にて逆に小胞体が凝集融合して巨大化する例も出るためである。また、Hb 内包効率も濃度上昇に伴い低下する傾向にあるため (表 1)、凍結融解時の脂質濃度は 2 g/dL に決定した。

次に、凍結条件について検討した。冷却剤として汎用されるドライアイス、液体窒素の気化熱はドライアイス (-78.9 °C) : 553 Jg<sup>-1</sup>、液体窒素 (-196 °C) : 204 Jg<sup>-1</sup> であるので、気体発生量の少ないドライアイスの方が作業安全性の面では好ましい。

脂質分散液の凍結時の放出熱量は次式より 751 Jg<sup>-1</sup> と概算される。

$$E = C_p \times \Delta T_{40-0} + E_s + \sum (C_{pT} \times \Delta T_{0-180})$$

ここで、 $C_p$  : 水の定圧比熱 (4.18 Jg<sup>-1</sup>°C<sup>-1</sup>)

$E_s$  : 水の凝固熱 (334 Jg<sup>-1</sup>)

$C_{pT}$  : 固体の定圧比熱

Ref. CRC Handbook of Chemistry & Physics

冷却に必要な総熱量の 44 % (334 Jg<sup>-1</sup>) が凝固に消費されるので、予備凍結により液体窒素の使用量は大幅に削減できる。ドライアイスで予備凍結した場合、液体窒素のみで凍結した場合に比較してフィルター透過速度は半分程度に低下するが、処理をしない場合に比較すると 10 倍以上の透過速度が得られる。また予備凍結のみで液体窒素で最終凍結しない場合は更に透過速度が低下する (図 2)。スケールアップした場合、ドライアイスで直径 8.5cm のボトル中心部まで凍結させるのに 3 時間以上を要するため、氷の結晶成長によって小胞体の一部が濃縮されて融合し、巨大粒子が生成するようになる。

以上より、透過性、内包効率、さらに脂質組成の処理効率を考慮して、脂質を 2g/dL で水和、ドライアイスで一時間程度予備冷却 (半凍結状態)

した後、液体窒素で凍結させる方法を採用した。

## 2) 連結型造粒装置の評価

簡素化造粒工程は連結型装置の試作と成った (図 3)。

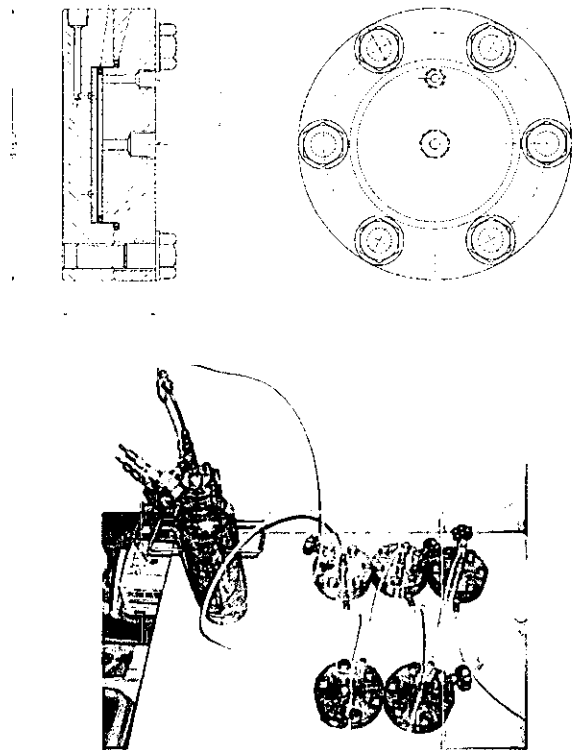


Fig. 3 The series of 5 extruders to prepare the HbV. (upper) a plan and (lower) an experimental apparatus

この装置を用いて Hb 小胞体を造粒した時のフィルター透過挙動を図 4 に示す。最大耐圧は 40 kgf/cm<sup>2</sup> であり、連結末端での圧力損失を考慮して 2 ないし 3 連結とした。前述の処理をした脂質組成粉末を用い、透過速度の速い孔径 3、0.8 μm のフィルターを連結とし、0.65、0.45、0.3 μm を 3 連結、比較的透過速度が遅い 0.22 μm を 2 連結にした 3 つの系に順次試料分散液を透過させて挙動を解析し、3、0.8 μm を連結した系での透過速度が大きく 30 秒以内に 100 mL を処理できる。次の 3 連結では 0.3 μm のフィルターでの圧力損失が予想されるものの 6 分で 100 mL、0.22 μm では 9 分で 100 mL を透過できる。

従って、100 mL 透過させるのに要する実質時間は 15 分程度であり、処理溶液量の増大に応じて膜面積を増大させればスケールアップ可能である。従来、造粒中のフィルター交換に長時間を費やしていたが、本装置の使用により予め装置にフィルターを設置して連結すれば途中でのフィルター交換の必要がなくなり、大幅な時間短縮が可能となる。

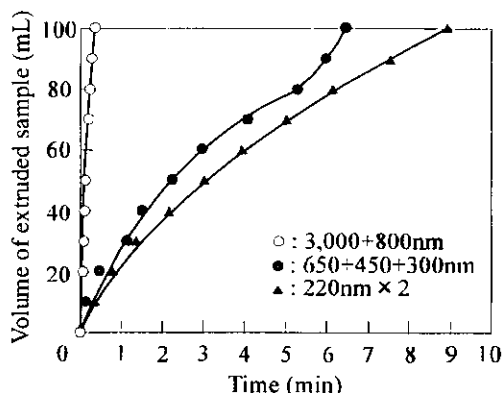


Fig. 4 The membrane permeability of the extrusion for HbV dispersions with series extruder.

#### D. 結論

スケールアップに対応する処理条件として、既にこの条件で試作品 800 g を例とする良好な透過性が確認されている。

また、前述の処理により数段連結の結果、著しい向上が見られる。従来の 7 段階から 3 段階まで簡略化して、従来の造粒時間を約 1/100 に短縮できた。加えての溶液の回収率は 93% に向上した。この値は dead volume の相対的減少によるものである。

## 2. CO 化、脱 CO 化処理の効率化

### A. 目的

ヘモグロビン小胞体 (HbV) の製造工程において、Hb を一酸化炭素化 (CO 化) して安定としたのち 60°C にて加熱処理して夾雑蛋白質の除去とウイルスの不活化を同時に行う工程と、濃厚 Hb 溶液を小胞体に内包したのち CO を O<sub>2</sub> に交換する工程 (脱 CO 化) が含まれる。今年度は、これらの配位子置換の効率向上を目的とした。

### B. 方法

#### 1) 中空糸膜型モジュールによる Hb の CO 化

シリコン膜モジュール (NAGASEP®, 永柳工業製、膜面積: 0.33 m<sup>2</sup>) のガス側に CO を吹送 (0.1 L/min) し、Hb 溶液 (1.0, 5.0, 10 g/dL, 1.0 L) を一定流速 (1.0 L/min) にて循環させ (図 5)、経時的に Hb 溶液の少量採取から、CO 化率を計測。また、(1) 式よりガス交換率を求めた。

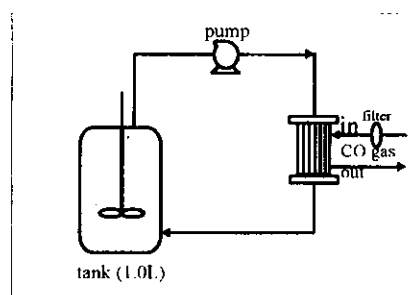


Fig. 5 System for carbonylation of Hb with using NAGASEP®.

$$C_t = C' (1 - \exp(-\frac{W}{V} \times t \times \alpha)) \quad \dots (1)$$

$C_t$ : HbCO conversion in tank at t min

$C'$ : initial HbO<sub>2</sub> concentration

$W$ : flow rate (L/min)

$V$ : tank volume (L)

$\alpha$ : CO conversion ratio

$t$ : time (sec)

#### 2) 同法による Hb の脱 CO 化

人工肺 (CAPIOX-II®, 最大循環流速: 1.0 L/min) のガスポートに O<sub>2</sub> の通気速度を変化させ、溶液ポート (血液) に 1 L の精製 Hb を循環させた。可視光 (Na ランプ, 400 W) を照射して経時的

に試料の少量採取から、CO 化率を計測 (図 6)。

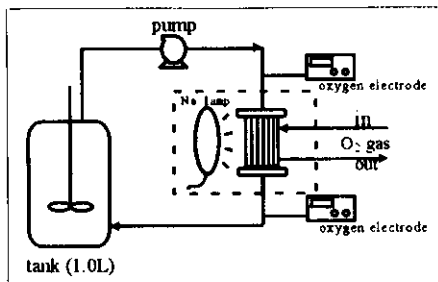


Fig. 6 System for decarbonylation of Hb using an artificial lung.

\*点線内はアルミ板で遮光。

3) 光照射大型液膜装置を用いた Hb の脱 CO 化  
大型エバポレーター改造機 (柴田科学製, 図 7)  
のフラスコ (50 L) 内に O<sub>2</sub> を吹送して (1.0 L/min)  
充満させた。10 g/dL の Hb 溶液 (0.1~2.0 L, CO  
化率 90 %) を注入口から導入し、一定回転数 (約  
20 rpm) にて回転させた。可視光 (Na ランプ, 400  
W) を照射し、Hb 溶液の CO 化率を経時的に計測。

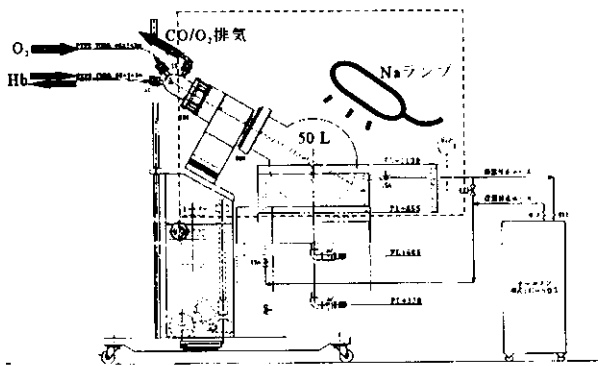


Fig. 7 Large-scale apparatus for decarbonylation of a Hb solution using liquid membrane and visible light illumination.

\*点線内はアルミ板で遮光。

### C. 結果および考察

#### 1) 中空糸膜型モジュールによる Hb の CO 化

NAGASEP® を 8 回オートクレーブ滅菌 (121°C, 20 min) し、Hb 溶液 (5.0 g/dL) を循環させたが、中空糸の閉塞やハウジングからの漏洩はなく、高い耐久性を確認。

NAGASEP® による CO 化処理 (CO 化率 95 % 以

上) 時間は、Hb 濃度の増大と共に延長され、10 g/dL、1.0 L で 13 分を要した (図 8)。NAGASEP® におけるガス交換率の濃度効果は、Hb 濃度増大と共に、交換率が低下し、10 g/dL では 23 % であった (図 9)。

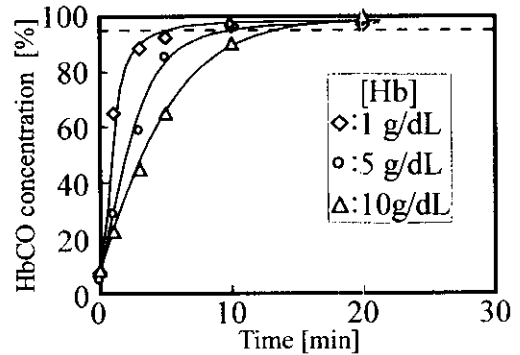


Fig. 8 Time course of HbCO concentration using NAGASEP®.

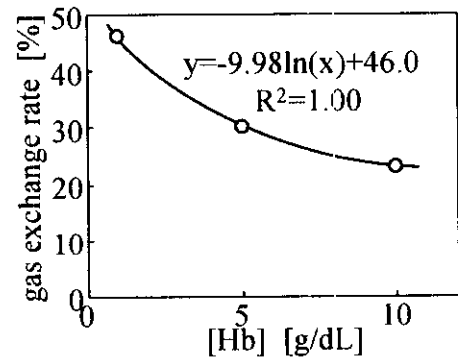


Fig. 9 The relationship of [Hb] and gas exchange rate using NAGASEP®. Gas exchange rate is  $\alpha \times 100$ .

人工肺 (CAPIOX-II®、多孔質ポリプロピレン膜、膜面積: 0.8 m<sup>2</sup>) では、Hb 濃度が 15 g/dL における交換率 100 % であった。15 g/dL での NAGASEP® のガス交換率は (図 9 参照) 19 % で、CAPIOX-II® は NAGASEP® の 2.4 倍の膜面積を持つので、15 g/dL では CAPIOX-II® の方が約 2.2 倍効率が高いことに成る。この相違は、膜材質と構造の相違 (多孔質膜とガス透過膜) から説明できる。洗浄再利用できるシリコン膜は経済性は高い。また、式 (1) を用いたスケールアップ予測では、10 g/dL、10 L の Hb 溶液を循環流速 2 L/min で処理すれば、65 分での CO 化が可能である。

## 2) 中空糸膜型モジュール（人工肺）を用いた Hb の脱 CO 化

循環流速 1.0 L/min 未満では循環流速の増加に応じて境膜抵抗が減少し、脱 CO 化時間が短縮されるが、1.0 L/min 以上ではほぼ一定値を示したことから、循環流速を 1.0 L/min に設定した（表 2）。

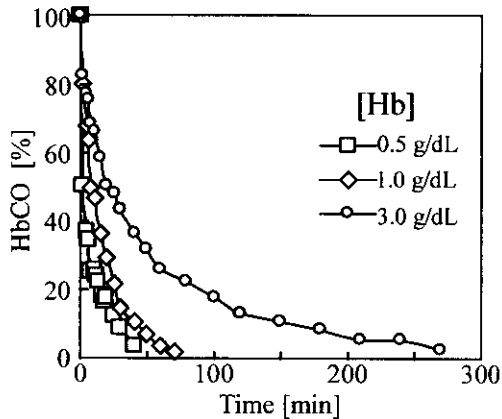


Fig. 10 Influence of the Hb concentration on the rate of CO removal from Hb solution.

Table 2 Decarboxylation time of 1.0 L Hb solution on various conditions.

[Hb] (g/dL)	Circulation rate (L/min)	O <sub>2</sub> flow rate (L/min)	Decarboxylation time <sup>1)</sup> (min)
1.0	0.5	1.0	80
1.0	1.0	1.0	55
1.0	1.5	1.0	51
1.0	1.0	0.5	60
1.0	1.0	0.75	55
1.0	1.0	1.0	55
0.5	1.0	1.0	37
1.0	1.0	1.0	55
3.0	1.0	1.0	240

<sup>1)</sup>Decarboxylation time means the time for CO conversion from 100% to 5%.

O<sub>2</sub> 通気速度の影響はほとんど認められず、0.5 L/min で十分であると判断された。これは中空糸膜型モジュールではガス側の CO、O<sub>2</sub> 拡散抵抗が律速過程ではないことを示している。

Hb 濃度を 0.5 g/dL から 1.0 g/dL にすると脱 CO 化処理に要する時間も 2 倍程度に延長したが、

3.0 g/dL の脱 CO 化時間は 240 分程度と予想より長くなった。これは高濃度系ではポリプロピレン製中空糸膜表面への Hb の吸着が生起しやすいこと、可視光強度の不足などの原因が考えられる。従って、Hb 濃度は約 1.0 g/dL 前後での処理が望ましいと判断できる（図 10、表 2）。

## 3) 光照射大型液膜装置を用いた Hb の脱 CO 化

本装置では回転中でも液送ポンプの送液方向の切換えによって Hb 溶液の注入と吸出を反復させることが出来る。Hb 溶液（10 g/dL）の CO 化率の経時変化を図 11 に示した。Hb 溶液量を 0.1、0.5、1.0、2.0 L に増大させると、CO 化率 5% までの所要時間は、54 分、134 分、290 分、616 分となる。

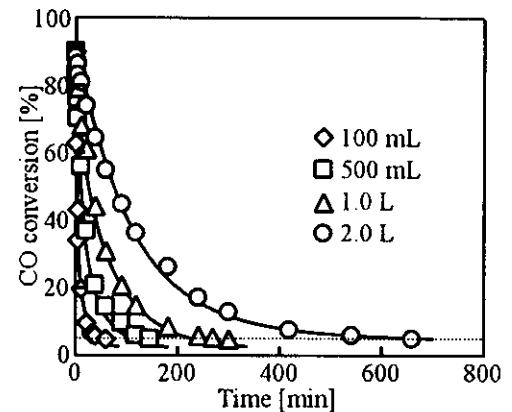


Fig. 11 Time course of decarboxylation using a large-type evaporator. Broken line indicates 5% HbCO.

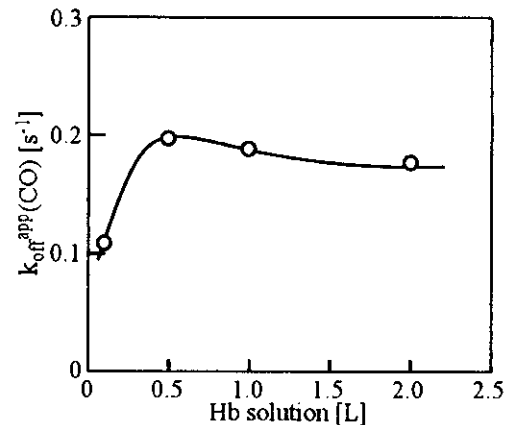


Fig. 12 The relationship between  $k_{\text{off}}^{\text{app}}(\text{CO})$  and the quantity of Hb solution in the flask of the large-type evaporator.

また、減衰曲線の一次近似を行って求めた脱 CO 化の見かけの速度定数  $k_{app}(CO)$  と Hb 溶液量の関係を図 12 に示す。Hb 溶液量 0.1 L での値以外はほぼ一定である。このことから、本装置では 2.0 L 以上の溶液量でも効率を低下させずに処理できる。逆に、0.2 L での効率の低下は、溶液量が少なすぎるために、帯状の液膜になり光の照射位置のずれが原因と考えられる。

本装置では、フラスコ形状の工夫による照射効率の向上や均一な液膜形成が課題となるが、改良に依り 10 g/dL、2.0 L の場合の Hb 溶液の処理速度は従来系の 7 倍以上、また follow fiber (人工肺利用系) の 3.5 倍以上の向上を可能にした。

#### D. 結論

Hb の CO 化と脱 CO 化工程は、CAPIOX-II®では連続的処理が可能で、CO 化の効率こそ NAGASEP®に比較して約 2.2 倍高いものの、ポリプロピレン製膜表面への蛋白質吸着のため長時間使用に耐えず、再利用不可の点で劣ると判断。

シリコン膜製の NAGASEP®は CAPIOX-II®よりもガス透過性に劣るものの、可視光透過効率が高いため、脱 CO 化に有効であると判断された。

他方、光照射大型液膜装置を用いる脱 CO 化工程は、2L のバッチ処理が連続的に行えるのでスケールアップに対応できる。均一な液膜形成が可能なフラスコの形状を工夫すれば、もっと効率を高めることが可能となる。

### 3. 電極法による Hb 溶液からの完全脱 O<sub>2</sub> 工程と deoxyHb 系のウイルス加熱不活化

#### A. 目的

ヒト Hb 溶液の安全度向上を目的とする加熱ウイルス不活化法導入計画は、Hb の熱耐性向上が不可欠となる。CO 化による耐熱向上に基づく安定化 Hb 溶液では、脱 CO 化操作を必要とするので、その煩雑改善が望まれている。Hb 溶液から完全に脱

酸素して得られる deoxyHb の熱安定度は高く、更に、Hb 小胞体の長期保存にも脱酸素化処理が必須条件となる。脱酸素化による 100% の deoxyHb を得る過程はガス交換膜処理でも困難で、Hb 溶液からの完全脱酸素化技術 (0.1 Torr 以下) 確立が望まれた。今年度は低濃度水素ガス共存の電解処理による酸素を水に還元する操作を経由して完全脱酸素化技術を確立した。また、完全な脱酸素状態での Hb 溶液のウイルス不活化可能を確認。

#### B. 方法

##### 1) 電極法による Hb 溶液、Hb 小胞体分散液の脱酸素化

Hb は常法に従って精製する。アロステリック因子としてピリドキサール 5'-リン酸の添加による酸素親和度 ( $P_{50}$ ) を調節。Hb 小胞体 (HbV) 分散液では濃厚 Hb 溶液と混合リン脂質、Presome PPG-1 (日本精化) を原料として、常法に従い調製、得られた小胞体分散液に PEG (5,000)-DSPE (Sunbright DSPE-50H、日油製) 水溶液添加、所定時間静置する方式で外表面を PEG 鎖修飾した (分子集合科学の利用)。これらの試料溶液をリン酸緩衝生理塩水 (PBS) にて適当濃度に調整し、CAPIOX II®を用い、酸素分圧 10 Torr に調節し、これを二室塩橋連結式電解槽の陰極側に導入、これを窒素下で封入。陽極側には窒素置換した PBS を導入して、2% の水素を含有する窒素ガスを通気させ、作用極にはステンレス電極、参照電極は Ag/AgCl を用い、定電位電解装置を用いて陰極電位 0.56 V として電解した。

##### 2) 加熱によるウイルス不活化試験

電極法により Hb 溶液を完全脱酸素化し、vesicular stomatitis virus (VSV) を添加、62°C、10 時間加熱処理し、単層培養した Vero 細胞 (アフリカミドリザル腎臓由来) に 10 倍希釈した VSV 試料を添加して 37°C で 3-5 日間培養して、ウイルス感染価を Reed-Muench 法を用いて計測。

### C. 結果および考察

#### 1) 電極法による Hb 溶液、Hb 小胞体分散液の脱酸素化

酸素分圧 10 Torr の PBS 溶液、Hb 溶液([Hb]=1.0 g/dL、2.5 g/dL)80 mL を電解し、電流値の推移を観測(図 13)、陰極反応は酸素の拡散律速であることを Tafel 式から確認。陽極槽は、H<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> ガス流量や溶液攪拌条件が通電量に影響しない様に設定。電流値は 2 相近似型減衰挙動を示し、PBS が最も早く減衰し一定値を示すが、1.0 g/dL、2.5 g/dL Hb 溶液の順であり、初期減衰の勾配は 3 系共に略同じ傾向にあり、これは水相に物理溶解している酸素の電解によると推定される。また、第 2 の減衰は Hb に結合している酸素の電解によるものと推定される。また、電流が一定値に達した段階における酸素分圧は検出限界(0.1 Torr)以下であった。

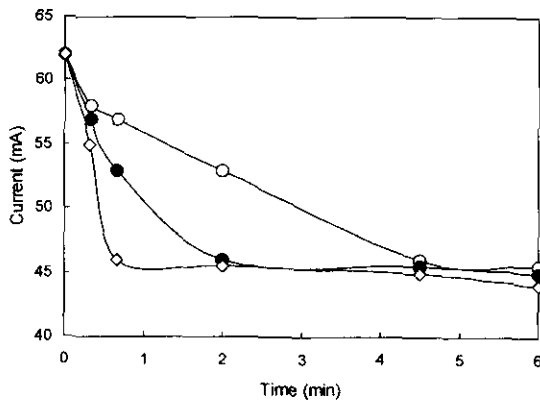


Fig. 13 Change of the current with deoxygenation time for different concentrations of Hb (80 mL) by the electrochemical system at 13 °C: (○) [Hb] 2.5 g/dL; (●) 1.0 g/dL; (◇) PBS.

そこで、一定値に達するまでの時間を脱酸素化時間とし、濃度の異なる Hb 溶液に対して求めた処、濃度の増大と共に比例的に増大し、5 g/dL Hb 溶液 (80 ml、P<sub>50</sub>=25 Torr) の処理には約 9 分を要した。また、酸素親和度(P<sub>50</sub>)の異なる Hb 溶液(2.5 g/dL) の脱酸素化時間は、P<sub>50</sub> の値が小さくなる、すなわち酸素親和度が高い Hb 溶液の方が増大した。これらの結果は、Hb に配位した酸素の脱離が律速段階であることを示している。

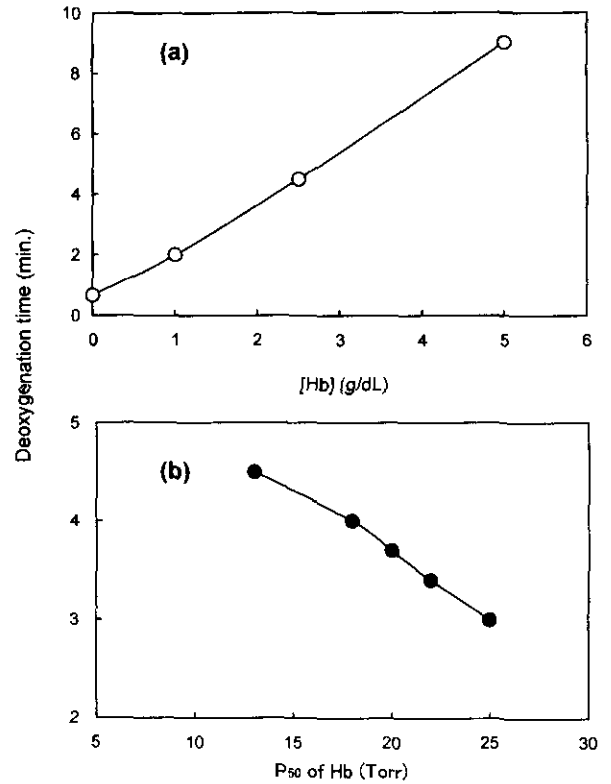


Fig. 14 Effect of the oxygenated Hb on the deoxygenation of Hb solution (80 mL) by the electrochemical system at 13 °C: (a) Hb with different concentrations; (b) Hb (2.5 g/dL) with different P<sub>50</sub>.

次に、本電解反応では反応中に OH<sup>-</sup>が生じるため溶液 pH の増大が懸念される。上記の実験では PBS を用いたのでその問題はないが、生理塩水を用いた場合の影響を観測した。酸素分圧 10 Torr からの完全脱酸素化の際、pH は 6.4 から 9.7 に増大するが、5 g/dL の Hb 生理塩水溶液では、pH は 6.6 から 7.2 に増大しただけで、Hb の優れた緩衝効果が認められた。また、HbV の生理塩水分散液で同様の測定を行なった処 pH は 6.7 から 8.9 まで増大したが、20 分以内に 7.4 まで戻り一定値となった。これは、HbV の構成二分子膜が OH<sup>-</sup>や H<sup>+</sup>の移動に対して抵抗となり、平衡に達するまでに時間を要したものと考察される。何れの系も Hb の利用においては、pH の最終的な変動は僅かであり問題は無いと判断される。

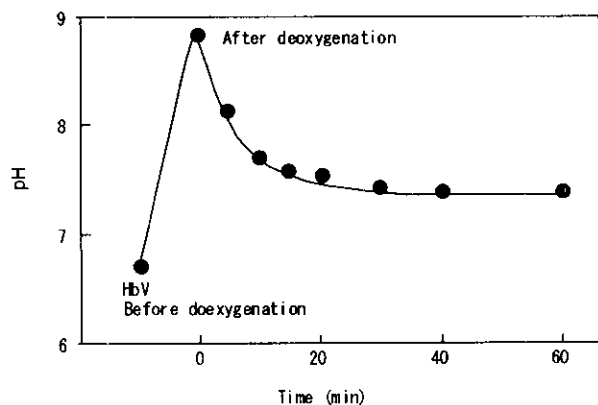


Fig. 15 pH change of the deoxygenated HbV (6 mL, [Hb]=10 g/dL) by the electrochemical system using a 2 cm<sup>2</sup> stainless steel sheet.

## 2) 加熱によるウイルス不活化試験

完全に脱酸素化した Hb 溶液に VSV を添加した試料を、62°C、10 時間加熱処理の結果は、加熱処理前ではメト化率が高かった試料では、加熱後メト化率の大幅な減少が認められ、メト体の熱変性が確認された(表 3)。他方、deoxyHb では加熱による変性を認めなかった。これは deoxyHb の熱変性温度が 79°C と高いことによる。

Table 3 Result of Hb with heat treatment at 62 °C for 10h

sample no.	before heating		after heating		decrease of Hb (%)	decrease of met Hb (%)	decrease of deoxy Hb (%)
	[Hb] (g/dL)	metHb (%)	[Hb] (g/dL)	metHb (%)			
1	3.49	13.1	3.08	3.4	11.4	9.8	1.6
2	2.99	13.2	2.74	4.5	8.3	8.4	-0.1
3	4.14	5.5	3.88	1.7	6.2	3.6	2.6
4	4.11	16.5	3.63	2.9	11.6	13.2	-1.6

Table 4 Inactivation of VSV by heat treatment at 62 °C for 10h

sample no.	TCID <sub>50</sub> /mL		inactivation (log)
	before	after	
1	10 <sup>5.00</sup>	<10 <sup>-0.5</sup>	>5.5
2	10 <sup>5.60</sup>	<10 <sup>-0.5</sup>	>6.1
3	10 <sup>5.75</sup>	<10 <sup>-0.5</sup>	>6.3
4	10 <sup>5.50</sup>	<10 <sup>-0.5</sup>	>6.0

加熱処理前の 10<sup>5.00</sup>TCID<sub>50</sub> の VSV 活性が加熱処理後では検出限界の 10<sup>-0.5</sup>TCID<sub>50</sub> 以下まで低下しており、平均で 10<sup>6</sup> 以上のウイルス不活化率が達

成できた(表 4)。これは CO 化 Hb の加熱によるウイルス不活化率と同値であった。

更に、60°Cにて 10 時間加熱処理した Hb 溶液を大気下 37°Cにて攪拌してメト化率の推移を測定した処、図 16 に示す様に完全な脱酸素状態で加熱処理した Hb は、CO 化 Hb の状態で加熱処理した Hb と同様の推移を示したが、人工肺による脱酸素化で酸素分圧 10Torr の Hb 溶液を加熱処理した系ではメト化率は急激に増大し、Hb が変性し易いことが示された。

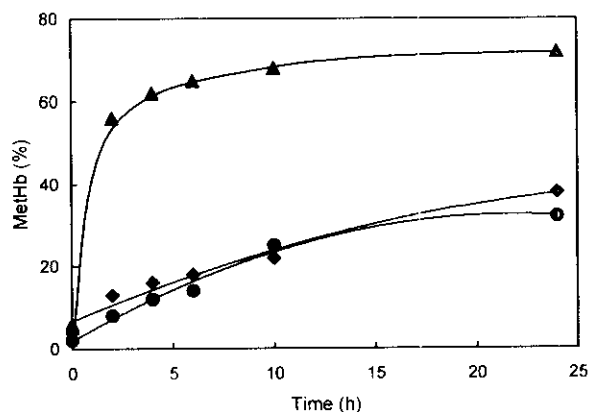


Fig. 16 Change of metHb of different Hb (37 °C, air) after heat treatment at 60 °C for 10 h: (▲) HbO<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub> = 10 Torr; (◆) HbO<sub>2</sub> from HbCO; (●) HbO<sub>2</sub>, PO<sub>2</sub> = 0 Torr.

## D. 結論

電極法による脱酸素化法の利点は、微量の希薄水素ガス導入による酸素の完全除去法として有効であり、添加剤を用いないクリーンな処理工程が実現できる。pH の増大も問題はなく、この結果、脱酸素状態で加熱処理は、Hb 原液のウイルス不活化に適用できることが明らかにされた。既存ガス交換モジュールにて 10 Torr 以下に脱酸素化してから、本法実施の連続処理で完全脱酸素化が可能となる。

#### 4. 新しいアミノ酸型脂質と Hb 小胞体への利用

##### A. 目的

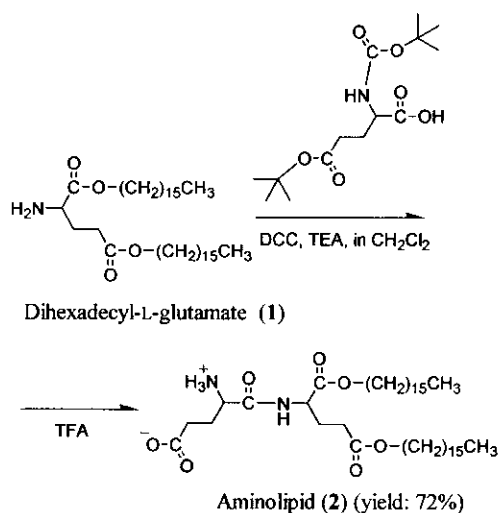
静注を目的とする Hb 小胞体は高い安全度が要求される。小胞体膜構成成分として高純度リン脂質の使用が必須であるが、安価で簡便利用できる合成脂質を検討した。

既に前年度で負電荷脂質とポリエチレングリコール(PEG)脂質は合成の脂質類似体であるが実用上脂質代替できる例を本研究者らは報告済みである。今年度は膜の主成分になる両イオン性アミノ酸型脂質の基礎物性を整理すると共に、従来のリン脂質(DPPC)使用系と比較し、詳細に検討した。

##### B. 方法

###### 1) アミノ酸脂質の合成

研究者らが開拓した系の合成を Scheme 1 に示した。



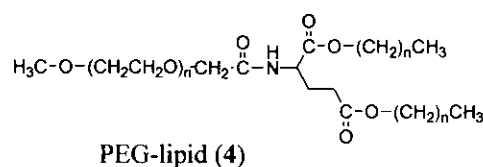
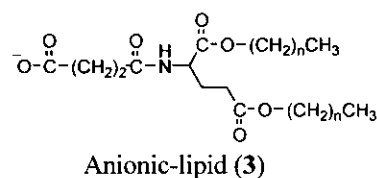
Scheme 1 Synthesis of the aminolipid.

構造は MS、IR、<sup>1</sup>H-NMR により同定した。

**Aminolipid (2)**: 薄層クロマトグラフィ (シリカゲルプレート、クロロホルム/メタノール (4/1) (容量/容量): R<sub>f</sub>: 0.24 (モノスポット)。赤外吸収スペクトル (cm<sup>-1</sup>): 1739 (ν<sub>C=O</sub> (エステル)); 1661 (ν<sub>C=O</sub> (アミド)); 1567 (δ<sub>N-H</sub> (アミド))。<sup>1</sup>H-NMR スペクトル (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz, δ (ppm)): 0.88 (t, 6H, -CH<sub>3</sub>); 1.26 (s, 52H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 1.61 (m, 4H, -CO-O-C-CH<sub>2</sub>); 1.70~2.20 (m, 4H, glu β-CH<sub>2</sub>); 2.32, 2.41 (m, 4H, glu γ-CH<sub>2</sub>); 3.40 (m, 1H, -CH

-CO-NH-) 4.07, 4.12 (t, 4H, -CO-O-CH<sub>2</sub>-); 4.51 (m, 1H, -CH-NH-CO-)。MS (FAB) C<sub>42</sub>H<sub>79</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub>Na についての計算値: 746.6; 実測値: 747.7 (M<sup>+</sup>H)<sup>+</sup>。

また、負電荷脂質(3)および PEG 脂質(4)は前年度報告した方法に依った。



###### 2) 物性測定

脂質粉末をリン酸緩衝溶液 (pH 7.4) に分散させ、示差走査熱量分析 (DSC) により相転移温度(T<sub>c</sub>)、転移エンタルピー(ΔH)を計測、集合形態は透過電顕(TEM)により観察。単分子膜作成装置 (協和界面科学製) から分子占有面積を決定。

###### 3) Hb 内包効率

混合脂質粉末 (2/cholesterol/3/4、あるいは DPPC/cholesterol/3/PEG-DSPE : モル比 5/5/1/0.003) を Hb 溶液 (40 g/dL) に分散させ、EXTRUDER<sup>®</sup> (Lipex Biomembranes Inc., 最終孔径 220 nm) 透過にて粒子径を制御後、遊離 Hb を除去した。単位脂質重量当りの保持 Hb 重量から内包効率を算出した。また、Hb の漏出率は一週間後までを経時的計測。

##### C. 結果および考察

###### 1) 合成

アミノ酸型脂質(2)の合成は疎水部(1)に親水基をアミド結合させる段階と、脱保護の 2 段階のみで完了する。グルタミン酸のアミノ基およびカルボキシル基の保護基として、TFA による酸処理で一



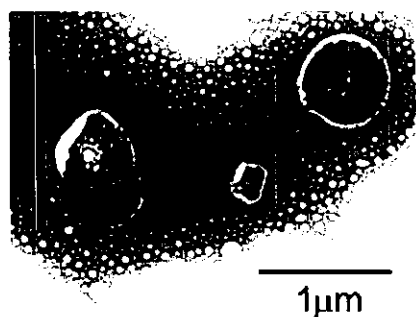
度に脱保護できる t-BOC と t-butyl ester を選択した。収率は 2 段階で 72% と高収率であった。溶解度の相違を利用した再結晶と濾別により精製体を得るので、量合成に適している。

## 2) 物性

分子占有面積は疎水部 **1** と同等の値であり、**2** の幾何学的分子形状は円筒型あるいは楔型である。また、 $T_c$  が **1** と比較して 2~3°C 上昇することから、分子充填状態は両イオン性親水部の導入により向上した (表 5)。

**Table 5** Physicochemical properties of the aminolipid

materials	A (nm <sup>2</sup> )	$T_c$ (°C)	$\Delta H$ (kcal/mol)
<b>1</b>	0.47	49.4	8.7
<b>2</b>	0.47	51.9	6.2
DPPC	0.58	41.0	8.6



**Fig. 17** Transmission electron micrograph of **2**-vesicles.

**2** は単独で二分子膜小胞体を形成できる (図 17)。 $T_c$  は相当するアシル鎖長を有するリン脂質 (DPPC) に比較して 10°C 程度高く、分子充填状態の高い二分子膜小胞体の形成が明らかになった。負電荷脂質 **3**、PEG 脂質 **4**、およびコレステロールと混合すると小胞体の分散安定度は向上し、リン脂質を全く使用しない安定な小胞体分散液も得られる。

## 3) Hb 小胞体への適用

エクストルージョンによりアミノ酸型脂質小胞体の粒子径は、目的とする粒子径 238±64 nm に調

節できた。単位脂質重量当りの保持 Hb 重量は 1.8 であり、リン脂質小胞体と同等の内包効率であった (表 6)。エクストルージョンにより効率よく粒子径の調節と被覆層の剥ぎ取りを行えるので、各種水溶性分子を高効率で内包できる。Hb の酸素親和度調節のため、Hb 溶液にピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) の適量を溶解させると、酸素親和度もリン脂質小胞体系と同値を示す。所定量の PLP 導入のまま内包されていると判断できる。生理条件下 (pH 7.4, 37°C) で一週間静置した後も Hb の漏出は観測されず、二分子膜小胞体構造は熱力学的に安定度の高い状態で長期間安定保持された。

**Table 6** Encapsulation efficiency of Hb into vesicles.

Parameters	<b>2</b> /chol/3/4 (5/5/1/0.033)	DPPC/chol/3/PEG- DSPE (5/5/1/0.033)
Diameter (nm)	238±64	250~280
[Hb]/[lipid]	1.8	1.7~1.9
$P_{50}$ (Torr)	34	33
pH	7.4	7.4

## D. 結論

本研究の結果は、*vitro test* からは Hb 小胞体構成成分としてのリン脂質分子を合成脂質で代替した、新しい Hb 小胞体の可能性が明らかになった。現状では、Hb 小胞体溶液調製の経費の 70% をリン脂質価格が占めるので、これを 10~20% に減少させられる可能性を示したものと云える。

今後、コレステロール、負電荷脂質、PEG 脂質との混合比の最適化、生体適合性、生分解性試験を行い、Hb 小胞体への適応の可能性を検討する予定である。

## 5. 増感剤を用いるメトヘモグロビンの還元活性化

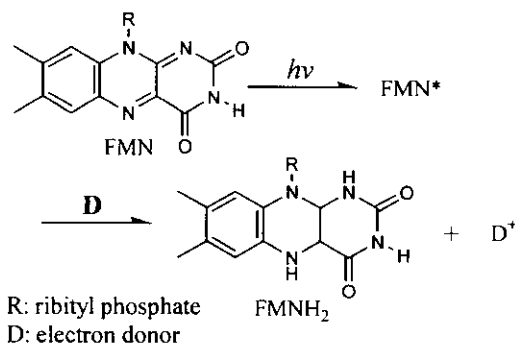
### A. 目的

ヘモグロビン(Hb)は Fe(II)のときに酸素を可逆的に結合するが、自動酸化により Fe(III)のメトヘモグロビン(metHb)となり酸素配位能を失う。生体内の電子媒体である補酵素フラビン類が可視光照射で速やかに還元体に変換され、metHb を還元する系(Yubisui et al., *J. Biol. Chem.* 255, 11694 (1980))をヘモグロビン小胞体(HbV)内水相に構築することを目的としている。

前年度ではフラビンモノヌクレオチド(FMN)の電子供与体としてメチオニンが有効であることを見出し小胞体への導入を試みたが、二分子膜の透過性が高いため調製後経時的に漏洩が起こり、十分な還元効果が得られなかった。そこで今年度では、分子量が大きい(二分子膜透過性が低い)電子供与体探索と、metHb 還元促進条件を検討した。

### B. 方法

光路長 2 mm の石英セル中に FMN、電子供与体[EDTA (Mw. 292.2)、メチオニン(Met) (Mw. 149.2)、メチオニン二量体 (Mw. 280.4)、その他アミノ酸類、糖類など]、metHb ([heme] = 3.1 mM)を加え、波長 400~450 nm の可視光(超高压水銀ランプ、L-42/HA-50 フィルタ使用)を照射し metHb の光還元を行った。試料を経時的採取し、UV/vis 分光から還元率を測定。窒素雰囲気下、大気下還元前後の Hb について、Native-PAGE、等電点電気泳動: IEF (Pharmacia, PhastGel)を比較、相違を観測した。



### C. 結果および考察

FMN(100 μM)に電子供与体(20 mM)を添加、窒素雰囲気下光照射は、電子供与体 (EDTA) では 30 秒以内、メチオニン(Met)では 4 分以内、糖類 (単糖、オリゴ糖)では 10 分程度となり、FMN を 100% 還元するので、EDTA と Met では電子供与体として有効を確認した。メチオニン二量体は電子供与体として機能せず、逆に FMN の還元は阻害される。

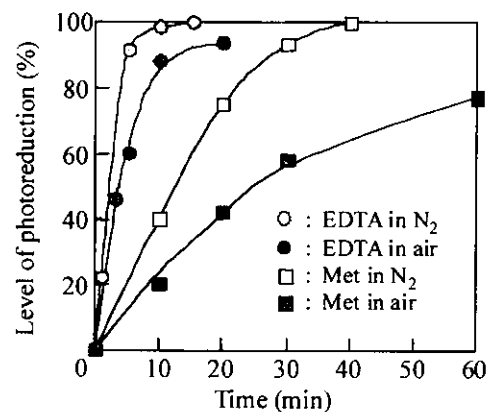


Fig. 18 Photoreduction of metHb ([heme]=3.1 mM) with FMN (1.0 mM)/electron donors (20 mM) by photoirradiation (450 nm).

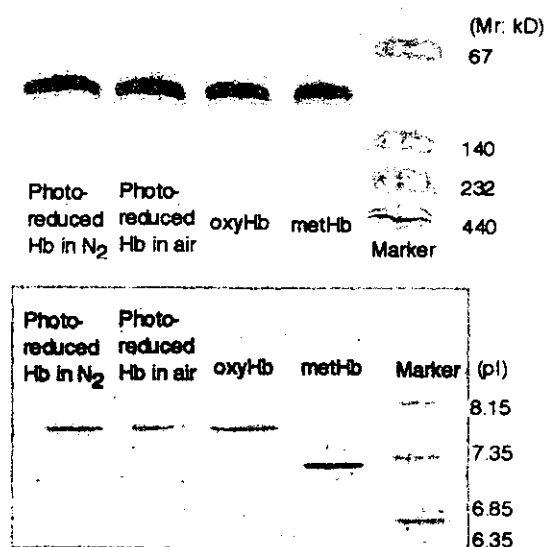


Fig. 19 Native-PAGE (top) and IEF (bottom) of photoreduced Hb in the presence of FMN/EDTA in N<sub>2</sub> or in aerobic atmospheres.

そこで FMN (1.0 mM)/EDTA (20 mM) を metHb に添加したところ、窒素雰囲気下 15 分以

内に FMN は 100%還元され、大気下でも 20 分で 95%まで還元される (図 18)。FMN (1.0 mM)/Met (20 mM)の場合には、窒素雰囲気下 40 分で 100%還元され、大気下では 60 分で 75%まで還元されるが、その後 metHb の増加を認める。還元型 FMNH<sub>2</sub>は酸素との反応性が高く、発生した活性酸素種による Hb のメト化のため大気下での還元率低下を招来したものと判断している。電気泳動では(図 19)、光還元後の Hb に分子量や表面電荷の変化は認められない。

## D. 結論

FMN / EDTA の組合せが現在のところ metHb の光還元にも最も有効である。EDTA は Met に比較して分子量も大きく、4 個の負電荷 (カルボン酸由来) を帯びるので、二分子膜透過は低いと予想され、本系を活用した HbV 調製を検討したい。また、引続き FMN に最適な電子供与体探索を行い、分子構造や電子状態との相間を解明する。

## 6. Hb 小胞体系での過酸化脂質生成の否定

### A. 目的

ヘモグロビン(Hb)は生体内で発生する過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)と反応して、フェリル体やメト体を生じ、ヘムや鉄イオンの放出が起こる。特に、強力な酸化剤であるフェリル Hb は不飽和脂質の過酸化などの細胞毒性が知られている。Hb 由来酸素輸液は、非細胞型の修飾 Hb と細胞型の Hb 小胞体(HbV)に大別されるが、これらの酸素輸液が生体内にて発生する、あるいは酸素輸液自身から生ずる H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と反応後、与える影響を明らかにする必要がある。

今年度では、非細胞型と細胞型の酸素輸液について、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と Hb との相互作用、反応生成物の影響解明を目指した。

## B. 研究方法

### 1) Hb 試料(Hb, HbV)

期限切れヒト赤血球(北海道赤十字血液センター提供)を洗浄後、低張溶血、一酸化炭素(CO)化、加熱処理、膜分離を経た精製後、脱 CO を行なって、精製 Hb(40 g/dL)を得た。この Hb 溶液に脂質粉末 (PPG-I、日本精化、DPPC/cholesterol/ DPPG = 5/5/1、モル比)を混合水とさせ、多重層小胞体を得た。高圧押出法により二分子膜小胞体を造粒後、未内包 Hb を遠心分離し、0.3mol%の PEG-DSPE にて表面修飾して HbV (平均粒径 250±20nm) を調製。

### 2) 方法

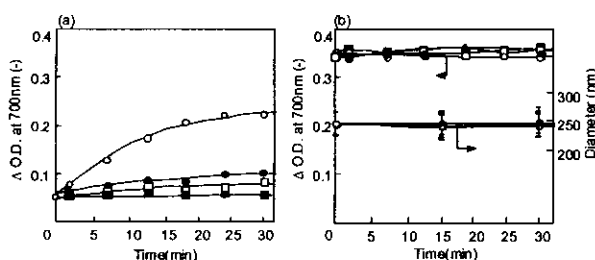
Hb 試料([heme] : 20 μM, 37 °C)に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を勘定して 1~100 当量添加し、紫外・可視分光 (450~700nm)、濁度(700nm)、そして HbV の場合動的散乱法による粒径分布を測定。酸素分圧変化を同時に酸素電極にて測定した。また、経時的に試料を採取して、horseradish peroxidase を用いた H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による p-hydroxyphenyl acetic acid から [1,1'-biphenyl]-3,3'-diacetic acid への酸化反応を蛍光測定(Ex: 317nm, Em: 406nm)し、残存 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を定量した。遊離 Fe<sup>3+</sup>はフィルター付遠心チューブ(cutoff 10 kDa)にて試料分離後、ICP 発光分析により定量。脂質変性の有無は、凍結乾燥した HbV のクロロホルム抽出成分を液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS)にて解析。

不飽和脂質から構成される卵黄レシチン小胞体を Hb 試料溶液に混合し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加して 37°Cにて 30 分間反応させた後、トリクロロ酢酸を加えて試料を遠心分離し、上清にチオバルビツール酸を添加して 100°Cで 30 分間加熱した。得られたマロンアルデヒドを蛍光測定(Ex:532 nm, Em:553 nm)から定量して、脂質の過酸化価を算出した。

## C. 結果および考察

Hb 試料 (Hb, HbV)に対して H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加する

と直ちに  $O_2$  発生が認められ、酸素電極計測からも確認される。この  $H_2O_2$  分解は Hb の示すカタラーゼ様触媒作用である。Hb と HbV の  $H_2O_2$  分解速度定数  $k_a$  は、各々  $1.8 \times 10^3$ ,  $3.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  であり、カタラーゼ ( $2.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) の  $10^{-4}$  倍程度小さな値となる。試料に対して 10 当量の  $H_2O_2$  を反応させると、フェリル体およびメト体の形成が観察され、100 当量以上では主にフェリル体が形成された後、脱色が認められた。Hb 溶液の場合には不溶性の白色凝集体の形成に伴う濁度上昇が観察された(図 20(a))。他方、HbV 分散液では、 $H_2O_2$  との反応による濁度変化を認めず(図 20(b))、粒径は全く変化しない。

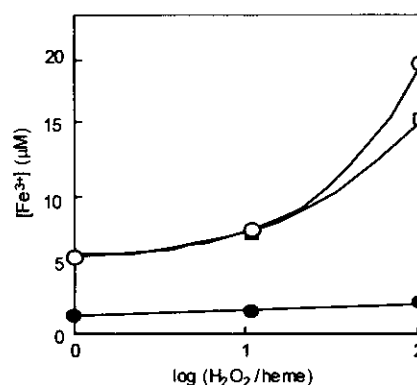


**Fig. 20** Changes in solution state of Hb (a) and in dispersion state of Hb vesicle (b) during the reaction with  $H_2O_2$  at  $37^\circ\text{C}$ . Hb or Hb vesicle ([heme]=20mM) was reacted with  $H_2O_2$  (20mM(□), 200mM(●) and 2mM(○), respectively). (■):Hb solution or Hb vesicle dispersion without the addition of  $H_2O_2$ .

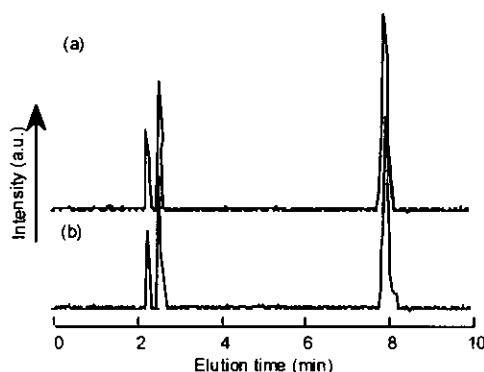
Hb 溶液では  $H_2O_2$  添加濃度の増加に伴い、へムから遊離する  $Fe^{3+}$  濃度が増大し、へム濃度に対して  $H_2O_2$  を 100 当量添加で、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間後には Hb から全ての Fe 遊離 ( $Fe^{3+}$ ) が認められた(図 21)。HbV では、Hb から放出した  $Fe^{3+}$  は二分子膜バリアー能のため小胞体内に留まっており外水相への漏出が抑制されている。ポリオキシエチレン 10-ラウリルエーテル添加による小胞体可溶化前後の比較からも明らかにされた(図 21, ●, □)。

また、 $H_2O_2$  との反応後における HbV 構成脂質の LC-MS 分析から、DPPC、コレステロール、あるいは DPPG など構成単位以外の成分や新しいピークの出現はみられず、 $H_2O_2$  やフェリル体による脂質成分の分解や過酸化反応は起こらないことが

確認できている(図 22)。



**Fig. 21** Released  $Fe^{3+}$  from Hb (○), Hb vesicle (●) or Hb vesicle solubilized with lauryl ether (□) after the reaction with  $H_2O_2$  and incubation at  $37^\circ\text{C}$  for 24hr. All samples have the same heme concentration of 20mM.



**Fig. 22** The LC-MS elution profiles of the lipid components of Hb vesicles ([heme]=2 mM) (a) before and (a) after the reaction with 20 mM  $H_2O_2$ . The peaks at around 2.2, 2.5, and 7.9 min correspond to DPPG, cholesterol, and DPPC, respectively.

過酸化され易い不飽和部を多く含有する卵黄レシチン(EYL)小胞体分散液を Hb 試料と混合した系に  $H_2O_2$  を添加し、EYL の過酸化物価を測定した。遊離  $Fe^{3+}$  をキレート剤 (デフェロキシアミンメシレート : DFO) に共存させると、Hb 溶液では、フェリル体による卵黄レシチン小胞体の過酸化が認められる(図 23)。他方、DFO 無添加系では  $H_2O_2$  添加濃度の増加に伴い、脂質の酸化が進行し、Hb から遊離した  $Fe^{3+}$  と  $H_2O_2$  とのいわゆる Fenton 反応で形成されるヒドロキシラジカルが契機となる脂質の酸化促進機構が明らかにされた。他方、HbV では、DFO の有無に関わらず脂質酸化反応