

は大幅に抑制される。これは小胞体系ではフェリル体や遊離 Fe^{3+} が小胞体二分子膜を透過し難いため、EYL 小胞体との反応が抑制されるためと考察される。

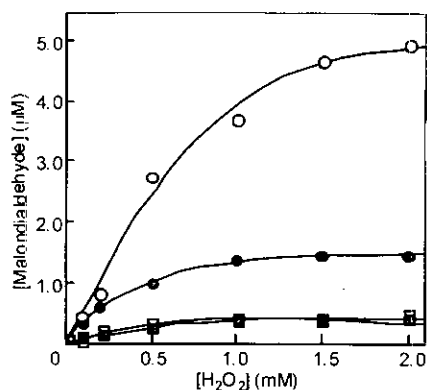


Fig. 23 Lipid peroxidation of EYL vesicles catalyzed by Hb samples during the reaction with H_2O_2 in the presence or absence of DFO. ●: Hb, ○: Hb + DFO, □: Hb vesicle, ■: Hb vesicle + DFO, respectively.

D. 結論

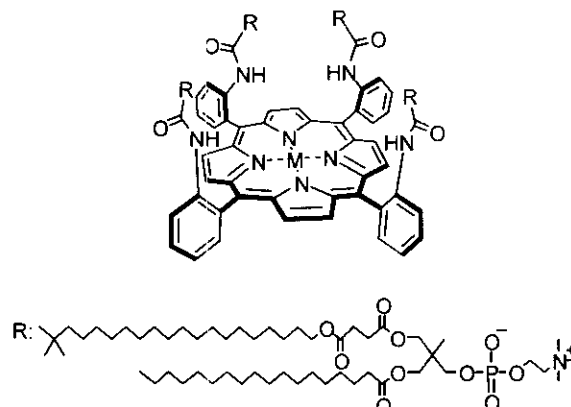
Hb を脂質二分子膜で被覆することにより、 H_2O_2 と Hb の反応速度は半分近くになり、また HbV は飽和型脂質を利用しているため過酸化脂質は生起しない。加えて、フェリル体や遊離 Fe^{3+} が生起しても HbV 内水相に保持されるため、外部添加した EYL 小胞体の不飽和脂質を過酸化させない。これらの結果は、虚血再灌流やエンドトキシンショックなど H_2O_2 の局所濃度が高くなっている病態において、Hb 小胞体は Hb 溶液と比較して細胞毒性は大幅に抑制されることを示唆している。

7. リピドヘム小胞体の酸素親和度

A. 目的

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両親媒性構造のヘム誘導体 (リピドヘム) は、水相系で自己集合して小胞体組織を構成し、生理条件下 (pH 7.3, 37 °C) で安定な酸素配位錯体を生成する。今回、2 本のアシル鎖結合部位であるグリセロールを、トリメチロールエタンに変換するだけで、合成工程数を 6 段階少

なくすることに成功、リピドヘムの新顔として、量産可能な誘導体 (1) を設計し、それが水中で自己組織化し構成するリピドヘム小胞体の酸素配位能が、従来系に比べ遜色ないことを実証した。



Lipidheme (1) M: Fe(III) a, Fe(II) b

B. 方法

1) リピドヘムの合成

1 の構造解析は TLC、UV-vis、IR、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル、MS、元素分析により実施した。ジアルキルホスホコリン基の二本のアシル鎖をつなぐ骨格部位としてトリメチロールエタンを用いると、従来のグリセロール型リピドヘムに比べ、反応工程を 6 段階減らし、計 8 段階で目的化合物 1a を得ることができた。総収率は大幅に向上、現在ではグラム単位の生産も可能となった。

2) リピドヘム水分散液の調製と酸素配位

1a/ラウリルイミダゾール (Lim) (1/2.2~3.4 (モル比)) の混合薄膜にリン酸緩衝液 (pH 7.4) を加え、窒素雰囲気下、超音波攪拌 (プローブ型、5 min) すると、赤色透明の均一分散液が得られる。この 1a 水分散液に、窒素雰囲気下、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 水溶液を添加し、中心鉄(III)を還元、酸素あるいは一酸化炭素の吹込みに伴う UV-vis. スペクトル変化を観測した。磁気円二色性スペクトル (1.5 T) は、JASCO J-820 により測定。赤外吸収スペクトルは CaF_2 溶液セルを用いて、JASCO FT/IR-410 により測定した。

C. 結果および考察

1) 合成と構造

メタルフリー体の¹H-NMR スペクトルを図 24 に示す。

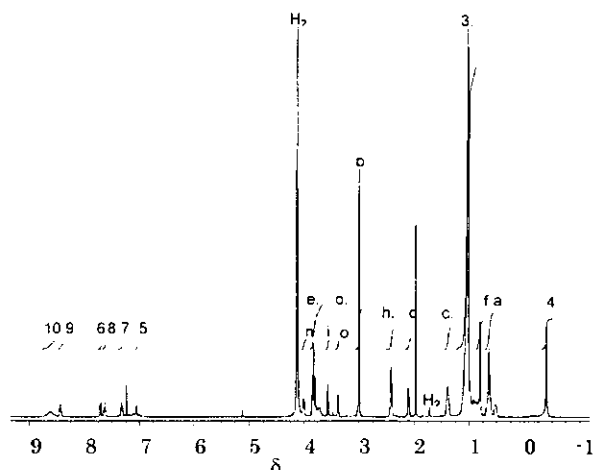


Fig. 24 ¹H-NMR of free-base lipidporphyrin.

コリンメチル基のピーク (p, 3.0 ppm) 積分値 (36 H) と、2,2-ジメチル基のピーク (4, -0.4 ppm) 積分値 (24 H) の比から、ポルフィリンに4つのジアルキルホスホコリン基が結合していることを明らかにした。

得られたリポドヘム水分散液はきわめて安定で、調製6ヵ月後でも沈殿凝集を認めない。電子顕微鏡 (TEM) 観察からリポドヘムが自己集合して粒径約100 nmの一枚膜小胞体を形成していることが明らかとなった (図 25 a)。膜厚 (10 nm) が、リポドヘム分子長 (4.5 nm) の二倍に相当することから、二分子膜構造であると推定できる。

グラファイト基板に乾燥させた小胞体の原子間力顕微鏡 (AFM) 観察でも、均一な円盤像が得られ、その高さ (21 nm) が二分子層膜の厚みの二倍に一致したことから二分子膜構造が裏付けられた (図 25 b)。リポドヘムの分子占有面積は 2.2 nm² で、小胞体一つを構成するリポドヘムの分子数は 2.3 × 10⁴ 個と見積もられた。

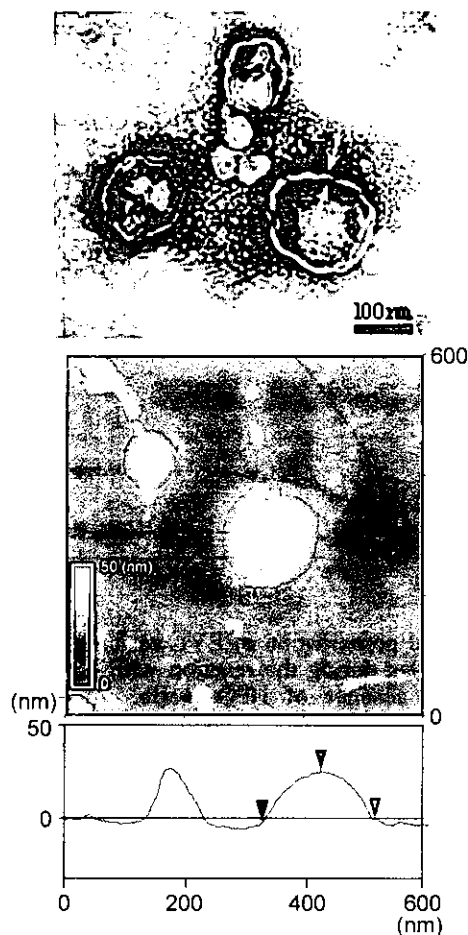


Fig. 25 (a) TEM and (b) AFM image of lipidheme vesicle.

2) 酸素結合反応

1b 小胞体の UV-Vis. スペクトルは、窒素雰囲気下で λ_{\max} : 436, 538, 568 nm を示し、**1b** の両軸配位座に LIm が配位した 6 配位鉄(II)低スピン錯体の形成を示唆した。そこへ酸素を通気すると速やかに酸素錯体 (λ_{\max} : 435, 543 nm) が得られ、この酸素結合解離は酸素/窒素の吹込みに伴い可逆的に観測できた。酸素親和度 ($P_{1/2}$) は 30 Torr (37 °C) とヒト血液 (27 Torr) に近く、酸素錯体の半減期は 17 hr (37 °C) と長い。

1b 小胞体の磁気円二色性(MCD) スペクトルは、窒素、一酸化炭素、酸素下でそれぞれ異なるパターンを示した。窒素下では LIm が両軸配位座に2つ結合し、一酸化炭素、酸素下ではその1つが一酸化炭素、酸素に置き換わった Fe(II)6 配位低スピ

錯体の形成を示した。また、酸素化型リポドヘム小胞体の赤外吸収 (IR) スペクトルには、配位酸素の伸縮振動 ($\nu(\text{O}=\text{O})$: 1155 cm^{-1}) が観測され、酸素錯体の生成が明確となった。 $\nu(\text{O}=\text{O})$ や一酸化炭素錯体の $\nu(\text{C}=\text{O})$: 1970 cm^{-1} の値は、類似構造のテトラフェニルヘム (ベンゼン溶液中) と同等であり、配位気体分子の電荷分極構造に溶媒や自己組織化の影響は少ないと考えられる。

D. 結論

トリメチロールエタン骨格のジアルキルホスホコリン基を有するリポドヘムは量産可能なヘム誘導体であり、それが水中で自己組織化して形成する二分子膜小胞体は、酸素分圧に応答して可逆的に酸素分子を結合解離できる新しい全合成系酸素運搬体となり得ることを明らかにした。

8. アルブミン-ヘム製造工程改良 と 微小循環動態

A. 目的

組換えヒト血清アルブミン (rHSA) に疎水性リポドヘム (Lh) を包接させたアルブミン-ヘム複合体 (rHSA-Lh) は、生理条件下 ($\text{pH } 7.3, 37^\circ\text{C}$) で酸素を可逆的に結合解離できる合成ヘム蛋白質である。rHSA-Lh を酸素輸液として利用する際、血管内皮弛緩因子である一酸化窒素に対する親和度はヘモグロビン (Hb) より 9 倍高いため、一酸化窒素の捕捉に伴う血圧上昇が懸念される。しかしラット投与後の血圧亢進や心拍数の低下は全く認められなかった。今年度は、さらに詳細な動物試験を実施するため、量産を目的とした製造工程の改良、rHSA-Lh 溶液の長期保存安定度の評価、腸間膜の微小循環動態を観察した。

B. 方法

1) rHSA-Lh の製造工程の改良

Lh-CO 体のエタノール溶液を rHSA 水溶液に混

合、得られた溶液を Pellicon (Milipore 社) にて定容量限外濾過し、エタノールを除去した。濃縮後塩濃度を調整して $0.22\text{ }\mu\text{m}$ の除菌フィルターを透過させて rHSA-Lh 溶液を得た。

2) 保存安定度試験

rHSA-Lh 溶液 ([rHSA]: 5 g/dL , [Lh]: 6 mM) を 5 mL のバイアル瓶に封入した後、一酸化炭素を通気し、遮光下、 $5, 25, 40^\circ\text{C}$ にて保存、一定期間ごとに各バイアルを開封し、溶液物性、酸素結合パラメーターを測定した。

3) 微小循環動態観測

Nembutal を Wistar rat (♂, 約 300 g , $n=2$) 腹腔内へ注射 (50 mg/kg) し、全身麻酔後、左大腿静脈にカテーテルを挿入、腹部を切開し、腸間膜を観測台の上に展開した。窒素置換生理塩水 (37°C) で観測部位を湿らせ、乾燥しないように保った。一定時間経過後 V-line より rHSA-Lh (400 mg/kg , 1 mL/min) を注入、腸間膜細動脈径と細静脈径の変化を投与後 90 分まで観測した。

C. 結果および考察

1) rHSA-Lh の製造工程の改良

rHSA 水溶液に Lh-CO 体のエタノール溶液を混合し、得られた溶液を定容量限外濾過すると、エタノールが効率よく除去された。濃縮後、塩濃度を調整して滅菌するだけで、rHSA-Lh 溶液が得られる工程を確立した。従来 rHSA-Lh 溶液の調製工程は、rHSA 水溶液と Lh エタノール溶液の混合、エタノールの減圧除去 (各 2 回)、限外濾過、透析の計 6 段階からなり繁雑であった。今回、混合時の pH 調整の最適化、限外濾過法の変更など、製造工程を改良して、例えば 50 mL の rHSA-Lh 溶液は 2 日間で調製できるようになった。

2) 保存安定度

rHSA-Lh 溶液の調製直後における溶液物性値、酸素結合パラメーターを Table 7 にまとめた。保存温度によらず調製 12 ヶ月後でも沈殿凝集を全く認めず、各値はいずれも一定値を保った (図 26,

27)。Lh/rHSA (mol/mol) 比: 7.3 に変化はなかった。以上、rHSA-Lh は高い保存安定度を有することが明らかとなった。

Table 7 Solution properties and O₂-binding abilities of rHSA-Lh at 25°C.

Lh conc. (mM)	5.78
rHSA conc. (g/dL)	5.0
Lh/rHSA (mol/mol)	7.7
Density (g/cm ³)	1.0125
Viscosity (cP)	1.09
Turbidity (—)	0.0055 (Abs. at 900 nm)
pH (-)	7.23
COP (Torr)	18
Additive agents	Sodium <i>n</i> -octanate ^{a)} Sodium N-acetyl-L-tryptophan ^{a)}
pI	4.9
$P_{1/2}$ (Torr)	31.5 (at 37 °C)
k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	1.2×10^7
$\tau_{1/2}$ (hr)	ca. 2.0 (at 37 °C in 100% O ₂)

a) 5.3-fold molar ratio to rHSA.

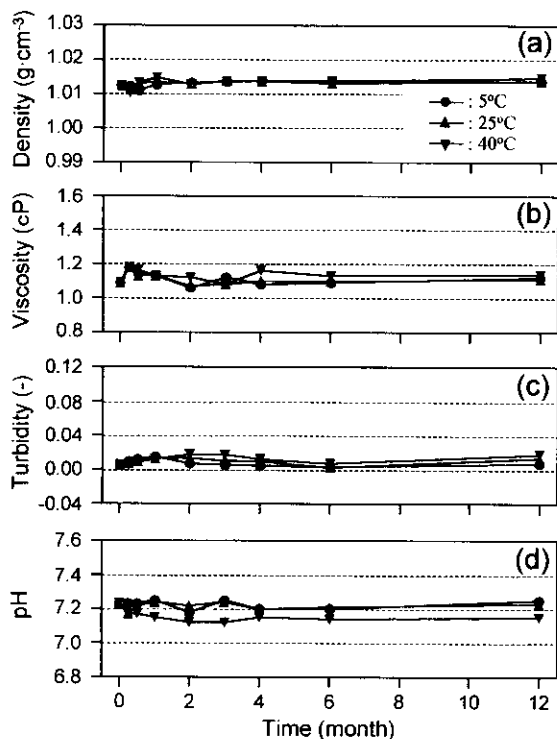


Fig. 26 Changes in the solution property of rHSA-Fe(II)P under an CO atmosphere at 5, 25, 40°C, respectively; (a) density at 37°C, (b) viscosity at 37°C and share rate of 325 s⁻¹, (c) turbidity (absorption of the diluted samples ([Fe(II)P] = 10 μM) at 900 nm), (d) pH at 25°C.

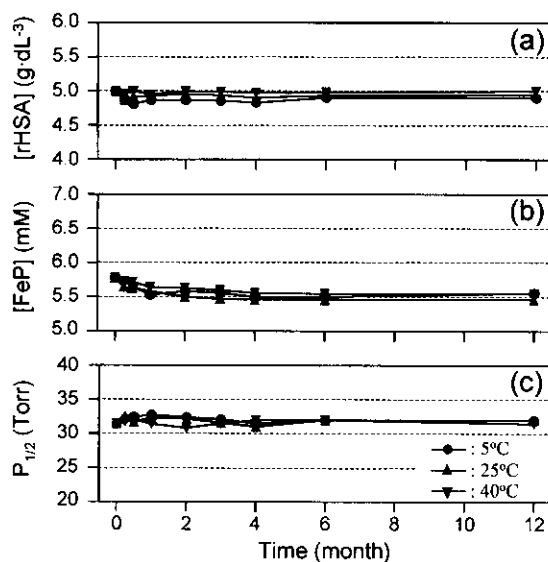


Fig. 27 Changes in the concentration and O₂-binding affinity of rHSA-Fe(II)P under a CO atmosphere at 5, 25 and 40°C, respectively; (a) albumin concentration measured by BCG method, (b) the FeP concentration measured by cyano-metHb method, (c) the O₂-binding affinity ($P_{1/2}$).

3) 微小循環動態

rHSA-Lh 分子が内皮細胞を透過して平滑筋近傍まで到達し一酸化窒素を捕捉すると、血管収縮、血圧亢進、心拍数の低下を誘起する可能性が懸念される。しかし実際に rHSA-Lh 溶液をラットへ静注しても、血圧と心拍数に全く変化はなかった。この理由は、アルブミンの表面電荷にあると考えられている。アルブミンは Hb に比べ等電点が低く (pI: 4.8)、内皮細胞を取り囲む基底膜との間に負電荷間の静電反発を生じるために、その血管内皮透過性は Hb の約 1/100 と低い。従って、rHSA-Lh も血管内皮透過性が低く、投与による急激な血圧上昇を起こさないと考えられる。

rHSA-Lh 溶液を投与後も、腸間膜の細動脈径、細静脈径に変化はなかった。rHSA-Lh 溶液投与 90 秒後 (Hb 溶液投与時に最も血圧の上昇した時間) における腸間膜の顕微鏡像を図 28 に示す。血管径のみならず、血流 (3-4 mm/s)、白血球の流れ、血小板数に変化はないことが明らかとなった。

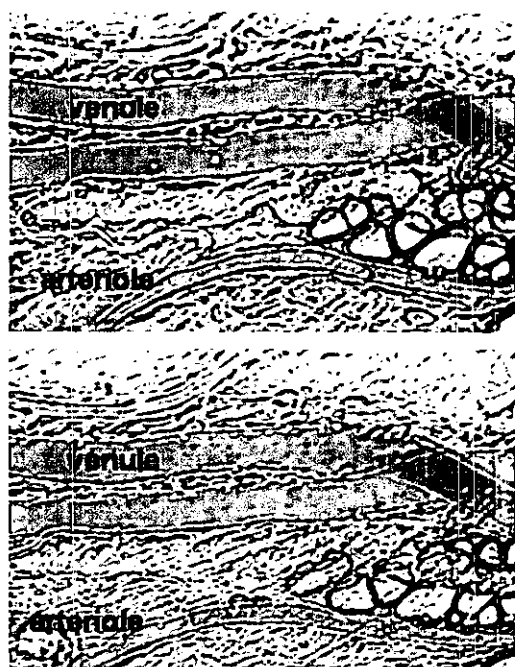


Fig. 28 Video prints showing intestinal microcirculation of anesthetized rats. (top) before injection, (bottom) 90 s post-injection

D. 結論

アルブミン-ヘム複合体 (rHSA-Lh) 溶液の量産を目指した製造工程の改良を行い、短時間で効率よく調製できる方法を確立した。得られた rHSA-Lh 溶液の長期保存安定度を評価、12 ヶ月後でも溶液物性、酸素結合能力に変化がないことを実証した。ラット投与後の腸間膜微小循環動態を観察、投与 90 分後まで血管径に変化がないことを証明した。アルブミンは Hb に比べ等電点が低いため血管内皮透過性が低く、投与による急激な血管収縮は起こさない。

この rHSA-Lh 溶液を腫瘍低酸素領域へ投与すると、腫瘍部の酸素分圧が有意に上昇する。この上昇率は、従来報告されている修飾 Hb 製剤の値に比べて明らかに高い。放射線や抗癌剤治療の増感剤効果として期待できるので、担癌ラットの動物実験を継続している。また、プロトヘムから誘導したリポドヘム包接アルブミン-ヘムの酸素配位も明らかにされてきている。代謝系に容易に受入れられる製剤確立を目指し、錯体化学的見地からもその条件設定を酸素配位能の定量から進めている。

9. 研究業績

A. 論文発表

1. T. Komatsu, Y. Matsukawa, E. Tsuchida, "Reaction of nitric oxide with synthetic hemoprotein, human serum albumin incorporating tetraphenyl-porphyratoiron(II) derivatives", *Bioconjugate Chem.*, **12**, 71-75 (2001).
2. T. Komatsu, Y. Matsukawa, K. Miyatake, E. Tsuchida "O₂-Adduct complex of *meso*-tetrakis ($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -*o*-pivalamidophenyl)porphyrinato-iron(II) with an intramolecularly coordinated proximal histidine", *Chem. Lett.*, **2001**, 668-669 (2001).
3. A. Nakagawa, T. Komatsu, E. Tsuchida, "Photo-reduction of autooxidized albumin- heme hybrid in saline solution: Revival of Its O₂-binding ability", *Bioconjugate Chem.*, **12**, 648-652 (2001).
4. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Tomiyama, E. Ikeda, S. Takeoka, K. Kobayashi, and E. Tsuchida, "Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: Influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system." *Am. J. Pathol.*, **159**, 1079-1088 (2001).
5. T. Komatsu, T. Okada, M. Moritake, E. Tsuchida, "O₂-Binding properties of double-sided porphyrinatoiron(II)s with polar substituents and their human serum albumin hybrids", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **74**, 1695-1702 (2001).
6. T. Komatsu, S. Hayakawa, T. Yanagimoto, M. Kobayakawa, A. Nakagawa E. Tsuchida, "Iron(II) complex of octopus-porphyrin with a covalently linked proximal imidazole: Self-assembly and O₂-coordination in aqueous media", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **74**, 1703-1707 (2001).
7. Y. Wu, T. Komatsu, E. Tsuchida, "Electrochemical studies of albumin-heme hybrid in aqueous media by modified electrode", *Inorg. Chim. Acta*, **322**,

120-124 (2001).

8. T. Yanagimoto, A. Nakagawa, T. Komatsu, E. Tsuchida, "Photoreduction of a self-assembled (lipidporphyrinato)iron(III) complex in saline by LMCT excitation: Co-aggregated hyaluronic acid allows an irreversible electron transfer", *Bull. Chem. Soc., Jpn.*, **74**, 2123-2128 (2001).
9. Y. Huang, S. Takeoka, H. Sakai, H. Abe, J. Hirayama, K. Ikebuchi, H. Ikeda, E. Tsuchida. "Complete deoxygenation from a hemoglobin solution by an electrochemical method and heat treatment for virus inactivation", *Biotechnol. Progress*, **18**, 101-107 (2002).
10. H. Sakai, Y. Masada, S. Takeoka, and E. Tsuchida. "Characteristics of bovine hemoglobin for the potential source of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier.", *J. Biochem.*, (2002) (in press).
11. H. Sakai, T. Sato, Y. Maekawa, and E. Tsuchida. "Capillary blood flow during severe hemodilution observed by non-invasive transcutaneous technique using a flash epi-illumination". *Microvasc. Res.*, (2002) (in press).
12. Y. Naito, I. Fukutomi, Y. Masada, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, H. Abe, J. Hirayama, K. Ikebuchi, H. Ikeda. "Study of virus removal from hemoglobin solution using PLANOVATM-15N." *J. Artif. Organs*, **6** (2002) (in press).
13. I. Fukutomi, H. Sakai, S. Takeoka, H. Nishide, E. Tsuchida, and K. Sakai. "Carbonylation of oxyhemoglobin solution using a membrane oxygenator." *J. Artif. Organs*, **6** (2002) (in press).
14. T. Komatsu, Y. Matsukawa, E. Tsuchida, "Effect of heme structure on O₂-binding properties of human serum albumin-heme hybrids: Intramolecular histidine coordination provides a stable O₂-adduct complex", *Bioconjugate Chem.*, **12**, (2002) (in press).
15. E. Tsuchida, T. Komatsu, Y. Matsukawa, T. Okada, "Human serum albumin incorporating synthetic hemes as an O₂-carrying hemoprotein: Control of O₂-binding ability by heme structure", *Macromol. Sympo*, **167**, (2002) (in press).
16. E. Tsuchida, T. Komatsu, Y. Matsukawa, A. Nakagawa, H. Sakai, K. Kobayashi, M. Suematsu, "Human serum albumin incorporating synthetic heme: Red blood cell substitute without hypertension by nitric oxide scavenging", *J. Biomed. Mater. Res.*, **58**, (2002) (in press).
17. K. Kobayashi, T. Komatsu, Y. Matsukawa, A. Iwamaru, M. Watanabe, E. Tsuchida, "Oxygenation of hypoxia region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic hemes", *J. Biomed. Mater. Res.*, **58**, (2002) (in press).
18. E. Tsuchida, T. Komatsu, T. Yanagimoto, H. Sakai, "Preservation stability and in vivo administration of albumin-heme hybrid solution as an entirely synthetic O₂-carrier", *Polym. Adv. Technol.*, **13**, (2002) (in press).
19. 土田英俊、酒井宏水 "酸素輸液(ヘモグロビン小胞体)" 「微粒子工学体系」第二巻 応用技術、第12章1節, pp. 665-669, フジ・テクノシステム, (2002).

B. 学会発表

1. H. Sakai, A.G. Tsai, S. Takeoka, E. Tsuchida, and M. Intaglietta / Molecular dimensions of oxygen carriers and microvascular function (Invited lecture) / *The 7th World Congress of Microcirculation* / August 19-23, 2001 / Sydney, Australia

2. R. Wettstein, S. Schramm, A. Banic, M. Leunig, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, D. Erni / Normovolemic hemodilution with hemoglobin vesicles improve oxygenation in ischemic hamster flap model. / *The 7th World Congress of Microcirculation* / August 19-23, 2001 / Sydney, Australia
3. T. Komatsu, M. Moritake, E. Tsuchida / Self-assembled bilayer vesicle made of tetraphenylporphyrin with dialkylphosphocholine groups: Nano-structure and O₂- coordination / *IUPAC 9th International Symposium on Macromolecule-Metal Complexes* / Aug. 19-23, 2001 / New York (USA)
4. A. Nakagawa, T. Komatsu, E. Tsuchida / Photoreduction of self-assembled lipidporphyrinato-iron(III) complex in saline by LMCT excitation / *IUPAC 9th International Symposium on Macromolecule-Metal Complexes* / Aug. 19-23, 2001 / New York (USA)
5. T. Komatsu, E. Tsuchida / Human serum albumin incorporating lipidhemes as an oxygen-infusion / *The 6th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies* / Sept. 2-6, 2001 / Eilat (Israel) **(Key Note Lecture)**
6. T. Komatsu, M. Moritake, E. Tsuchida / Self-assembled bilayer vesicle made of amphiphilic porphyrin: Nano-structure and O₂-coordination / *The 6th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies* / Sept. 2-6, 2001 / Eilat (Israel)
7. H. Sakai, S. Takeoka, M. Intaglietta, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Safety of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: Influence on microcirculation and metabolism in reticuloendothelial system (RES) / *The International Symposium on Bio-integrated Materials and Tissue Engineering.* / March 7-8, 2002 / National Museum of Emerging Science and Innovation (Nippon Kagaku Miraikan), Tokyo.
8. K. Sou, R. Klipper, B. Goins, W.T. Phillips, S. Takeoka, E. Tsuchida / Circulation persistence and biodistribution of the hemoglobin-vesicles (HbV) in Rats / *The International Symposium on Bio-integrated Materials and Tissue Engineering.* / March 7-8, 2002 / National Museum of Emerging Science and Innovation (Nippon Kagaku Miraikan), Tokyo.
9. S. Takeoka, Y. Teramura, T. Yonetani, E. Tsuchida / Effect of Hb-Encapsulation with Vesicles on H₂O₂ Reaction and Lipid Peroxidation / *The International Symposium on Bio-integrated Materials and Tissue Engineering.* / March 7-8, 2002 / National Museum of Emerging Science and Innovation (Nippon Kagaku Miraikan), Tokyo.
10. T. Komatsu, A. Nakagawa, E. Tsuchida / O₂-Carrying synthetic hemoprotein: Human serum albumin incorporating lipidheme / *The International Symposium on Bio-integrated Materials and Tissue Engineering.* / March 7-8, 2002 / National Museum of Emerging Science and Innovation (Nippon Kagaku Miraikan), Tokyo.
11. 小松晃之、松川泰子、岡田智行、土田英俊 / 近位塩基を有する新規ヘムの合成とアルブミン複合体の酸素配位能 / 第 50 回高分子学会年次大会 / 2001.5.23-25 / 大阪国際会議場
12. 政田陽平、酒井宏水、武岡真司、土田英俊 / ウシヘモグロビン小胞体 (酸素輸液) の特徴 / 第 50 回高分子年次大会 / 2001.5.23-25 / 大阪国際会議場
13. 武岡真司、寺村裕治、T. Yonetani、土田英俊 / 非細胞型ヘモグロビン由来酸素輸液と過酸化水素との相互作用とその影響 / 第 50 回高分子年次大会 / 2001.5.23-25 / 大阪国際会議場
14. 土田英俊、武岡真司、酒井宏水 / 我国の人工赤

- 血球開発の現状／第8回日本血液代替物学会年次大会／2001.9.4-5／シェーンバッハ・サボー（東京）
15. 武岡真司、寺村裕治、T. Yonetani、土田英俊／細胞型・非細胞型ヘモグロビンと過酸化水素との相互作用とその影響／日本血液代替物学会第8回年次大会／2001.9.4-5／シェーンバッハ・サボー（東京）
16. 宗 慶太郎、内藤祉康、武岡真司、土田英俊／ヘモグロビン小胞体造粒工程の改良／日本血液代替物学会第8回年次大会／2001.9.4-5／シェーンバッハ・サボー（東京）
17. 酒井宏水、富山賢一、政田陽平、武岡真司、堀之内宏久、小林紘一、土田英俊／血液生化学的検査におけるヘモグロビン小胞体の阻害作用とその回避法／第8回日本血液代替物学会年次大会／2001.9.4-5／シェーンバッハ・サボー（東京）
18. 中川晶人、森武美保、小松晃之、小林 修、土田英俊／全合成系酸素輸液としてのリポドヘム小胞体の構造と酸素輸送能／第8回日本血液代替物学会／2001.9.4-5／シェーンバッハ・サボー（東京）
19. 小松晃之、土田英俊／全合成系酸素輸液：アルブミン-ヘム複合体、-ヘム構造が酸素配位能に与える効果-／第8回日本血液代替物学会／2001.9.4-5／シェーンバッハ・サボー（東京）（依頼講演）
20. A.G Tsai, H. Sakai, R. Wettstein, E. Tsuchida, and M. Intaglietta / The unusual properties of effective blood substitutes／第8回日本血液代替物学会年次大会／2001.9.4-5／シェーンバッハ・サボー（東京）
21. 宗 慶太郎、土田英俊、森 かつら、武岡真司／アミノ酸型脂質の人工赤血球への利用 (I) ／第50回高分子討論会／2001.9.12-14／早稲田大学大久保キャンパス
22. 森 かつら、武岡真司、宗 慶太郎、土田英俊／アミノ酸型脂質の人工赤血球への利用 (II) ／第50回高分子討論会／2001.9.12-14／早稲田大学大久保キャンパス
23. 内藤祉康、武岡真司、土田英俊／ヘモグロビン小胞体の押出製造法における分子集合制御効果／第50回高分子討論会／2001.9.12-14／早稲田大学大久保キャンパス
24. 武岡真司、寺村裕治、T. Yonetani、土田英俊／活性酸素種とヘモグロビンの相互作用と脂質二分子膜による内包効果／第50回高分子討論会／2001.9.12-14／早稲田大学大久保キャンパス
25. 酒井宏水、土田英俊／ヘモグロビン小胞体（酸素輸液）の光還元とメト体の酸素配位機能還元／第49回高分子討論会／2001.9.12-14／早稲田大学大久保キャンパス
26. 福富一平、武岡真司、酒井宏水、土田英俊／リポポリサッカライド(LPS)とヘモグロビン小胞体の共集体现象とLPS定量法の確立／第49回高分子討論会／2001.9.12-14／早稲田大学大久保キャンパス
27. 小松晃之、森武美保、土田英俊／リポドポルフィリンが自己組織化して形成する二分子膜小胞体の特徴と酸素配位／第50回高分子討論会／2001.9.12-14／早稲田大学大久保キャンパス
28. 中川晶人、森武美保、小松晃之、小林 修、土田英俊／リポドポルフィリンとイミダゾール誘導体が自己組織化して形成する組織体の特徴と酸素配位／第50回高分子討論会／2001.9.12-14／早稲田大学大久保キャンパス
29. 小松晃之、森武美保、土田英俊／ポルフィリンが自己組織化して構成する二分子膜小胞体の特徴と酸素配位能／第51回錯体化学討論会／

2001.9.28-30/松江

30. 武岡真司、森 かつら、宗 慶太郎、土田英俊/アミノ酸型脂質によるヘモグロビン小胞体の構築/日本化学会第 81 春季年会/2002.3.26-29/早稲田大学西早稲田キャンパス
31. 内藤祉康、武岡真司、西出宏之、宗 慶太郎、土田英俊/凍結融解法により分子集合制御した小胞体を用いる高濃度ヘモグロビンの内包/第 81 日本化学会春季年会/2002.3.26-29/早稲田大学西早稲田キャンパス
32. 政田陽平、武岡真司、西出宏之、酒井宏水、土田英俊/フラビン系光増感剤を用いたメトヘモグロビンの還元/第 81 日本化学会春季年会/2002.3.27-29/早稲田大学西早稲田キャンパス
33. 宗 慶太郎、武岡真司、土田英俊、R. Klipper、B. Goins、W.T. Phillips/放射化ラベルを利用した酸素輸液(ヘモグロビン小胞体)の体内動態評価/第 81 日本化学会春季年会/2002.3.26-29/早稲田大学西早稲田キャンパス
34. 森武美保、小松晃之、西出宏之、土田英俊/リピドポルフィリンが自己組織化して形成する小胞体の微細構造と酸素配位/第 81 日本化学会春季年会/2002.3.26-29/早稲田大学西早稲田キャンパス
35. 小松晃之、森武美保、西出宏之、土田英俊/2種のリピドポルフィリンが共組織化して形成する二分子膜小胞体の光電子移動反応/第 81 日本化学会春季年会/2002.3.26-29/早稲田大学西早稲田キャンパス
36. 石原星児、小松晃之、西出宏之、土田英俊/イミダゾリル基を有するリン脂質の合成とプロトポルフィリン共組織体の特徴/第 81 日本化学会春季年会/2002.3.26-29/早稲田大学西早稲田キャンパス

37. 中川晶人、小松晃之、土田英俊/アルブミン-ヘムの酸素結合過程と配位構造/第 81 日本化学会春季年会/2002.3.26-29/早稲田大学西早稲田キャンパス

C. 特許

日本国特許

1. 土田英俊、武岡真司、宗 慶太郎、大川春樹/樹枝状分岐構造を持つ両親媒性化合物(特許第 3181276 号 登録日 2001.4.20)/Hb 小胞体の表面修飾に使用できる非リン脂質型 PEG 脂質。
2. 土田英俊、武岡真司、黄 宇彬/脱酸素装置(特願 2001-190302)/Hb 小胞体の脱酸素化装置。
3. 土田英俊、武岡真司、宗 慶太郎、森 かつら/両イオン性脂質およびその用途(特願 2001-254733)/Hb 小胞体の膜成分として利用できるアミノ酸型脂質。
4. 土田英俊、武岡真司、寺村裕二、阿閉友保/酸素運搬体システム(特願 2002-51732)/還元剤と中間電子媒体を内在させた Hb 小胞体システム。

国際特許

1. 土田英俊、武岡真司、宗 慶太郎、森 かつら/カルボン酸型脂質(出願番号 PCT/JP01/09829, 米国/EPC 加盟全国)/Hb 小胞体の負電荷成分として使用できる非リン脂質型負電荷脂質。
2. 土田英俊、武岡真司、宗 慶太郎、遠藤太郎、内藤祉康/小胞体分散液の製造方法(出願番号 PCT/JP01/09828, 米国/EPC 加盟全国)/凍結融解を利用した Hb 小胞体の迅速な造粒法。

D. 報道

1. 高分子化学を応用し欠点克服、人工赤血球、進む研究/読売新聞 夕刊/2001.4.9(月)
2. 急ピッチで進む人工血液開発/日刊工業新聞/2001.7.23(月)
3. 人工血液完成近づく/日本経済新聞/2002.3.22(金)

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

分担課題：ヘモグロビン小胞体と血液成分の相互作用

1. ヘモグロビン小胞体の血小板活性化への影響
2. ヘモグロビン小胞体の補体活性化への影響
3. ヘモグロビン小胞体の血漿凝固活性への影響
4. ガンマ線照射, 未照射赤血球製剤の保存中の変化

分担研究者 池田 久實 北海道赤十字血液センター 所長
 研究協力者 東 寛 北海道赤十字血液センター 研究部長
 藤原 満博 北海道赤十字血液センター 研究部
 阿部 英樹 //

若本 志乃舞 //

研究要旨 ポリエチレングリコール修飾ヘモグロビン小胞体 (PEG-DPEA-HbV) の血液成分との生体適合性について検討した。PEG-DPEA-HbV がヒト血小板活性化に及ぼす影響を、セロトニン放出反応と血小板活性化マーカー、PAC-1 の発現を指標にして行ったところ、血小板に HbV を添加した群では、コラーゲン存在および非存在下において反応上清中のセロトニン濃度は血小板単独の場合よりも減少する傾向があったが、統計的有意差はなかった。またセロトニン放出反応の亢進もみられなかった。PAC-1 発現は、未刺激、ADP 刺激のいずれにおいても増加がみられ、この増加は PAC-1 発現を増加させる sub maximum 濃度の ADP 0.1 μ M で顕著であった。このことから、セロトニンの放出反応を指標とすると、HbV は血小板活性化に影響しないようにみえるが、PAC-1 を血小板活性化マーカーとして用いると、HbV は血小板の活性化を促すと考えられた。

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、PEG-DPPG-HbV とも PBS に比し 4 倍の増加がみられた。PEG 修飾の効果について DPPG-HbV を用いて検討したところ、血清中 SC5b-9 レベルは PEG 修飾有りのほうがやや高い傾向にあった。また SC5b-9 のレベルの増加には classical pathway と alternative pathway の両経路が関与していることが推測された。次により生体に近づけるため血清ではなく血漿を用い PEG-DPEA-HbV の影響を検討したところ、SC5b-9 レベルの有意な増加がみられたが、これらのレベルは陽性コントロールである Zymosan A 処理の場合のほぼ 1/10 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。旧来の DPPG-HbV、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が起こっていたが、現行の PEG-DPEA-HbV では変化はみられなかった。

ガンマ線照射が赤血球製剤の品質に及ぼす影響を検討した。溶血率はガンマ線 25Gy 照射、未照射群とも 14 日目以降に上昇した。照射群では 21 日目以降、未照射群に比べより高い溶血率を示し、42 日目には未照射群の 2 倍の 1% 近くまで上昇した。メト化率は、保存開始後から上昇したが、照射、未照射群に違いはみられなかった。

1. ヘモグロビン小胞体の血小板活性化への影響

A. 目的

ヘモグロビン小胞体 (HbV) 投与に際して、ヒト血液成分、特に血小板に対する影響の検討を、血小板の α 顆粒に含まれる生理活性物質放出反応、血小板活性化マーカーの発現を指標として検討して来ている。これまでに、DPPC/CH/DPPG または DPPC/CH/DPEA を構成成分とする HbV (PEG-DPPG-HbV, PEG-DPEA-HbV) はコラーゲン刺激によるヒト血小板からの α 顆粒に存在する炎症性ケモカインや RANTES の放出反応に対して影響しないこと、また、PEG-DPEA-HbV は未刺激血小板の P-selectin(α 顆粒に存在する接着分子) の発現にも影響を与えないことを明らかにした。

今年度は PEG-DPEA-HbV のヒト血小板活性化に対する影響を血小板の濃染顆粒に存在する、セロトニンの放出反応と血小板上の膜糖蛋白 (α IIb β 3) の構造変化を認識する血小板活性化マーカー、PAC-1 の発現を指標にして検討した。PAC-1 は血小板上の α IIb β 3 (GP IIb-IIIa, CD41/CD61) が活性化して構造変化を起こした時に発現するエピトープを認識する IgM 型モノクローナル抗体である。このエピトープはフィブリノーゲンの結合部位またはその近辺とされている。PAC-1 の発現の臨床的意義についての検討は少ない。しかし、低濃度の ADP 刺激によっても発現の増加がみられることから高感度でかつ特異的な血小板活性化マーカーとして有用であるとされている。

B. 方法

1) 血小板からのセロトニン放出

全血 (クエン酸三ナトリウム加) から多血小板血漿 (PRP) を採取。この血小板浮遊液 (PRP: 1.6×10^8 /ml) と PEG-DPEA-HbV (0, 20, 40%) を 37°C, 60 分間インキュベーションした後、コラーゲン (1 μ g/ml) またはバッファーを添加して 5 分間のインキュベーション、反応後上清を採取し、ELISA kit にてセロトニンを測定した。

2) PAC-1 の発現

全血 (クエン酸三ナトリウム加) を採取した。全血と HbV (0, 20, 40%) を 37°C, 60 分間にてインキュベーションした後、全血と HbV の混合液を HEPES Tyrode's buffer で 5 倍に希釈。

HEPES Tyrode's buffer で 25 倍に希釈した FITC 標識 PAC-1 またはコントロール IgM 50 μ l に (1) の混合液 40 μ l と ADP 10 μ l (最終濃度 0, 0.1, 5, 10 μ M) を添加し、ピペッティングで混和後、室温、暗所で 20 分間のインキュベーションを行った。反応後 1% パラホルムアルデヒド 400 μ l を添加して固定した。1 時間の固定後、PBS 1 ml を添加して 1 回洗浄 (2500 rpm, 5 min) し、ペレットを 90 μ l の PBS に再浮遊させ、PBS で 25 倍に希釈した PE 標識 CD41 (血小板膜糖蛋白 GP IIb) またはコントロール IgG 10 μ l を添加し、室温、暗所で 20 分間のインキュベーションを行った。反応後、PBS 1 ml を添加して 1 回洗浄し、PBS に再浮遊した。フローサイトメトリーにて scatter gram 上で血小板高密度領域にゲートを設定し、更に CD41 陽性細胞をゲートして PAC-1 陽性細胞率を測定した。

C. 結果

1) 血小板からのセロトニン放出に対する PEG-DPEA-HbV の影響

コラーゲン非存在下において血小板と PEG-DPEA-HbV をインキュベーションすると、反応上清中のセロトニンレベルはコントロール (HbV=0%) よりも低い傾向がみられたが、有意差はなかった (図 1)。血小板と PEG-DPEA-HbV をインキュベーションした後、コラーゲン刺激をした反応上清中のセロトニンレベルはコントロール (HbV=0%) よりも低い傾向がみられたが、有意差を認めなかった (図 1)。

2) 血小板の PAC-1 の発現に対する HbV の影響

未刺激血小板と PEG-DPEA-HbV をインキュベーション

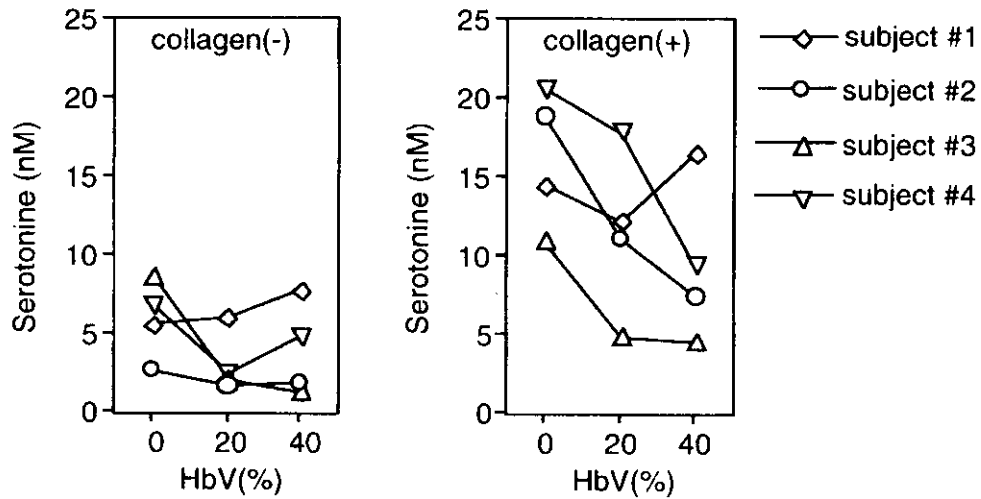


図1. 血小板からのセロトニンの放出反応に対するPEG-DPEA-HbVの影響.

オンすると、PAC-1 陽性血小板の割合は HbV0%では 0.4-0.9%, HbV20%では 1.1-5.9%, HbV40%では 2.3-7.9%と、わずかながら増加傾向がみられた (図 2). 血小板と PEG-DPEA-HbV をインキュベートした後、ADP 0.1 μM で刺激すると、PAC-1 陽性血小板の割合は HbV0%では 6.6-43.8%, HbV20%では 29.5-67.9%, HbV40%では 39.5-74.5%と増加した (図 2). 血小板と PEG-DPEA-HbV をインキュベートした後、ADP 5 μM で刺激すると、PAC-1 陽性血小板の割合は HbV0%では 51.8-86.7%, HbV20%では 79.1-93.6%, HbV40%では 81.6-94.4%と増加した. ADP 10 μM 刺激においても HbV0%では 53.3-87.2%, HbV20%では 81.4-94.3%, HbV40%では 82.7-95.5%と増加した (図 2).

D. 考察

コラーゲン存在および非存在下において血小板と PEG-DPEA-HbV のインキュベーションにより反応上清中のセロトニンは血小板単独の場合よりも減少する傾向があったが、有意差はなかったこと、セロトニン放出反応の亢進はみられなかったことからセロトニンの放出反応を指標とすると、PEG-DPEA-HbV は血小板活性化に影響しないと考えた.

他方、血小板と PEG-DPEA-HbV のインキュベーションにより、未刺激、ADP 刺激のいずれにおいても PAC-1 陽性血小板の割合の増加がみられ、この増加は PAC-1 発現を増加させる sub maximum の ADP 濃

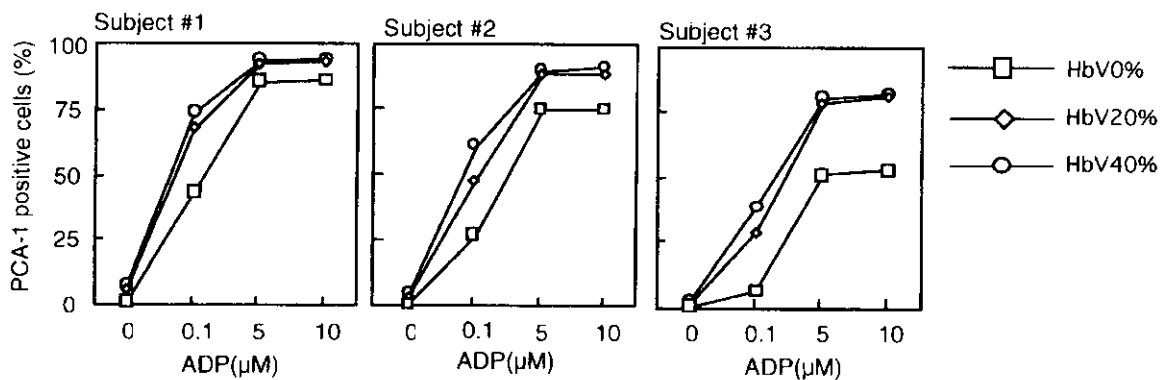


図2. 血小板のPAC-1の発現に対するPEG-DPEA-HbVの影響.

度, 0.1 μM で顕著であった. このことから PAC-1 を血小板活性化マーカーとして用いると, PEG-DPEA-HbV は血小板活性化を促進すると考えられた. しかし, 本検討においてみられた PEG-DPEA-HbV による血小板の PAC-1 発現増加の原因と臨床的意義については不明であるため, 今後の検討課題である.

2. ヘモグロビン小胞体の補体活性化への影響

A. 目的

補体系は 20 種近い血漿蛋白質によって構成され, 主として抗原抗体複合体によって活性化されると, 細菌などの成分で活性化される 2 つの経路があり, 生体防御の役割に関係がある. 活性化された補体とその断片は各種炎症, 貪食作用亢進, 細胞破壊作用などの活性を示す場合がある. Liposom-encapsulated Hb (LEH) が補体を活性化させることは, Rudolph らによって報告されている (*Transfusion* 37, 150-159, 1997 など). そこで HbV についてヒト血清とヒト血漿を用いた *in vitro* 評価を試みた.

1) PEG-DPEA-HbV と PEG-DPPG-HbV との比較

Phosphatidylglycerol を陰性荷電構成脂質としてもつ旧来型 (PEG-DPPG-HbV) のものと 1,5-dipalmitoyl-L-glutamate-N-succinic acid (DPEA) に変更された現行のもの (PEG-DPEA-HbV) とで比較をおこなった.

2) PEG 修飾の効果

PEG 修飾が補体活性化に影響するかどうか PEG 修飾をしていない DPPG-HbV と PEG 修飾した PEG-DPPG-HbV を用いて比較検討をおこなった. さらに補体活性化の機序において classical pathway と alternative pathway の関与について検討をおこなった.

3) HbV によるヒト血漿の補体活性化

補体が関与したアナフィラキシーショックで, 高い血漿 SC5b-9 レベルが報告されている. そこでヒト血漿を用いた *in vitro* の系において, HbV による補体活性化の有無について計測した.

B. 方法

1) PEG-DPEA-HbV と PEG-DPPG-HbV との比較

補体活性化の指標として terminal complement complex (TCC) を SC5b-9 (soluble, non-lytic form of TCC) を EIA kit (QUIDEL, CA, USA) にて測定した.

健常人 ($n=8$) から採取した血清を, 20% PEG-DPEA-HbV, 28% PEG-DPPG-HbV, 対照の PBS とそれぞれ混和し, 37°C, 1 時間インキュベーションした. 15,000 rpm (4°C, 45 min) の遠心上清を希釈後, 上記 kit にて SC5b-9 レベルを測定した.

2) HbV によるヒト血清補体活性化に対する PEG 修飾の影響

あらかじめ採取した健常人血清 ($n=4$) を, 28% PEG-DPPG-HbV, 28% 未修飾 DPPG-HbV, 対照の PBS と混和し, 37°C, 1 時間インキュベーションした. 15,000 rpm (4°C, 45 min) の遠心上清を希釈し, 補体活性化の指標として SC5b-9 レベルを, classical pathway の活性化の指標として C4d を, alternative pathway の指標として Bb fragment をそれぞれの EIA kit (QUIDEL, CA, USA) にて測定した.

3) HbV によるヒト血漿補体活性化

ヘパリン採血により採取した健常人血漿 ($n=5$) を, 20% PEG-DPEA-HbV, 40% PEG-DPEA-HbV, 対照の PBS と混和し, 37°C, 1 時間インキュベーションした. EDTA を最終濃度 10 mM にて添加し, 反応を停止した. 15,000 rpm (4°C, 45 min) の遠心上清を希釈後, SC5b-9 EIA kit にて測定した. 補体活性化の陽性コントロールとして, PBS に懸濁し

た Zymosan A (Sigma) を 10 mg/ml で使用した。EDTA 採血によって得た血漿中の SC5b-9 の値を正常値とした。

C. 結果

1) PEG-DPEA-HbV と PEG-DPPG-HbV との比較

20% PEG-DPEA-HbV の場合の SC5b-9 レベルは対照の PBS に比べ 4 倍程度の増加がみられたが、同じ脂質量とした 28% PEG-DPPG-HbV の場合と有意差はみられなかった (図 3)。

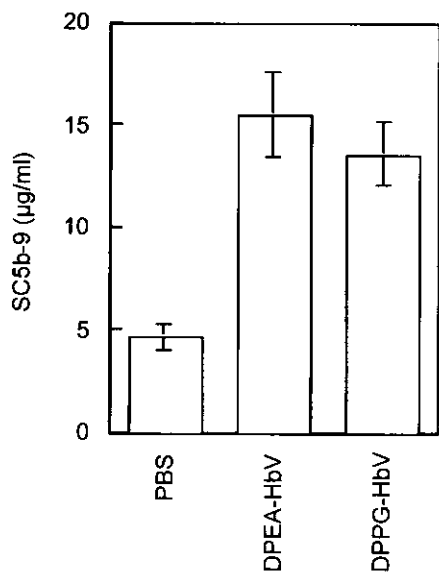


図3. ヒト血清中のSC5b-9レベルに対するPEG-DPEA-HbVおよびPEG-DPPG-HbVの影響。

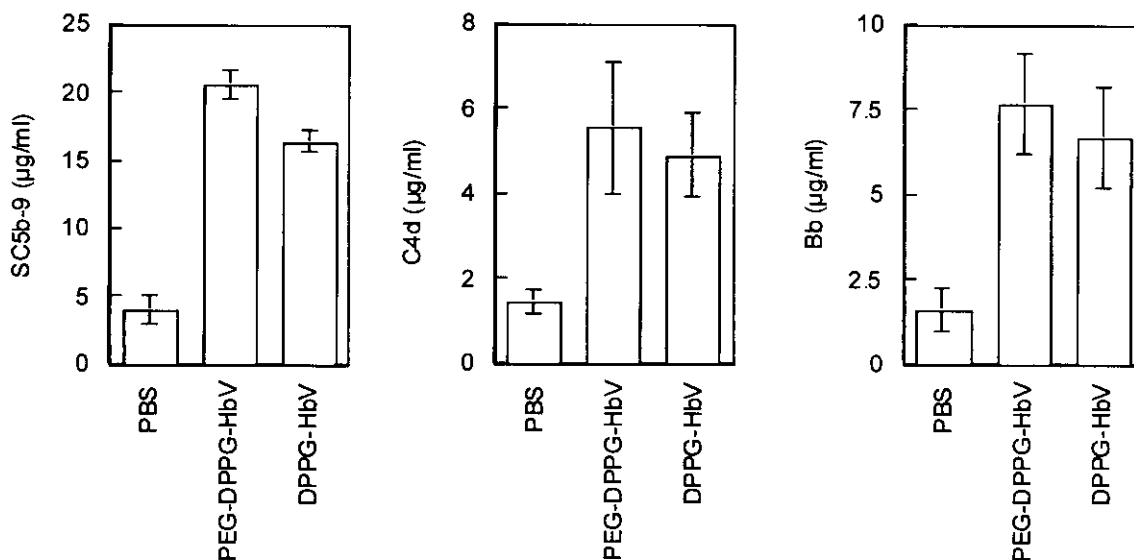


図4. PEG(+/-) DPPG-HbV処理によるヒト血清SC5b-9, C4d, Bb fragmentレベルの変化。

2) HbVによるヒト血清補体活性化に対するPEG修飾の影響

SC5b-9 のレベルに関し、PEG 修飾のほうがやや高い傾向にあり、PEG 修飾による抑制効果はみられなかった (図 4)。C4d, Bb fragment のレベルは PEG 修飾の有無にかかわらず、どの個体においても、増加がみられ classical pathway と alternative pathway の両方が関与していることが推測された。また PEG 修飾による抑制効果はみられなかった。

3) HbVによるヒト血漿補体活性化

血漿と 20%, 40% PEG-DPEA-HbV 処理 (n=5) により、SC5b-9 レベルは対照の $0.31 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ から、 $10.0 \pm 1.33 \mu\text{g/ml}$, $16.0 \pm 2.83 \mu\text{g/ml}$ へ、有意な増加を示した (図 5)。これらのレベルは、陽性コントロールの Zymosan A 処理の場合のほぼ 1/10 であった。

D. 考察

ヒト血清を用いた in vitro での評価系 (検討 1, 2) において、HbV による補体活性化を認めた。この補体活性化においては、classical と alternative pathway の両方が関与していること

が示唆された。陰性荷電の脂質から構成されたりリポソームによる補体活性化が PEG 修飾によって抑制されるという報告があるが、DPPG-HbV による補体活性化は、用いられている PEG 濃度では抑制できなかった。より生体に近い検体であるヒト血漿を用いた *in vitro* での評価系においても、血清の場合と同様に補体活性化がみられた (検討 3)。補体が関与したアナフィラキシーショック等を発症した患者 2 名において、それぞれの SC5b-9 レベルは正常値 0.225 $\mu\text{g/ml}$ から 45 $\mu\text{g/ml}$ 、0.09 $\mu\text{g/ml}$ から 40 $\mu\text{g/ml}$ への増加が報告されている。In vitro の結果と臨床例とを直接比較はできないため、動物モデルにおいて HbV 投与による補体活性化の検討が必要である。

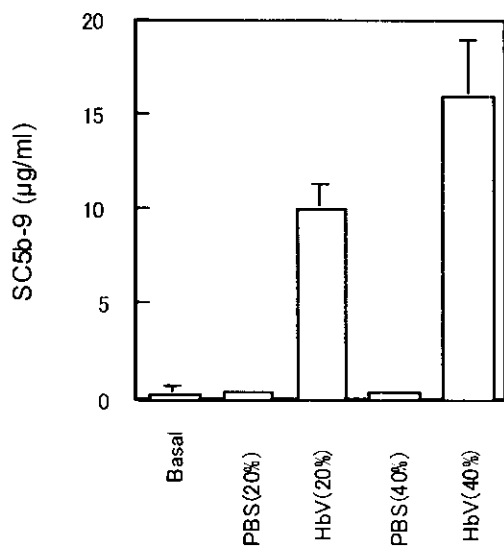


図5. ヒト血漿中のSC5b-9レベルに対するPEG-DPEA-HbVの影響。

3. ヘモグロビン小胞体の血漿凝固活性への影響

A. 目的

ヘモグロビン小胞体の生体適合性を評価する指標の一つとして、血漿の凝固活性に及ぼす影響を検討した。その結果、旧来の DPPG あるいは PEG-DPPG を構成成分とする HbV は影響を及ぼすものの、現行の PEG-DPEA を構成成分とする HbV はコントロールとして用いた生理的食塩水と同等の生体適合性を示した。その要因が HbV の表面荷電の違いによるものかどうか確かめるため、市販の 3 種類の小胞体 (陽性荷電, L(+); 弱陰性荷電, L(-); 強陰性荷電, L(2-); 日本油脂) を用いて検討した。

B. 方法

HbV と小胞体だけの生理的食塩水中のゼータ電位を測定した (Photal ELS-8000, 大塚電子)。またカリクレイン-キニン系への影響は、血漿に HbV あるいはリポソームを添加し、37°C、24 時間インキュベート後、血漿中高分子キニンノーゲンの変化をウェスタンブロット法にて解析した。

C. 結果

DPPG-HbV は陰性荷電を持っているが、PEG-DPPG-HbV、PEG-DPEA-HbV はほぼ中性荷電であった (表 1)。

表 1. 小胞体の表面荷電

小胞体	ゼータ電位 (mV)	粒子径 (nm)
DPPG-HbV	-14.5	239.7
PEG-DPPG-HbV	-3.4	221.7
PEG-DPEA-HbV	-2.6	209.9
L (+)	25.2	195.1
L (-)	-14.4	161.3
L (2-)	-47.2	162.0

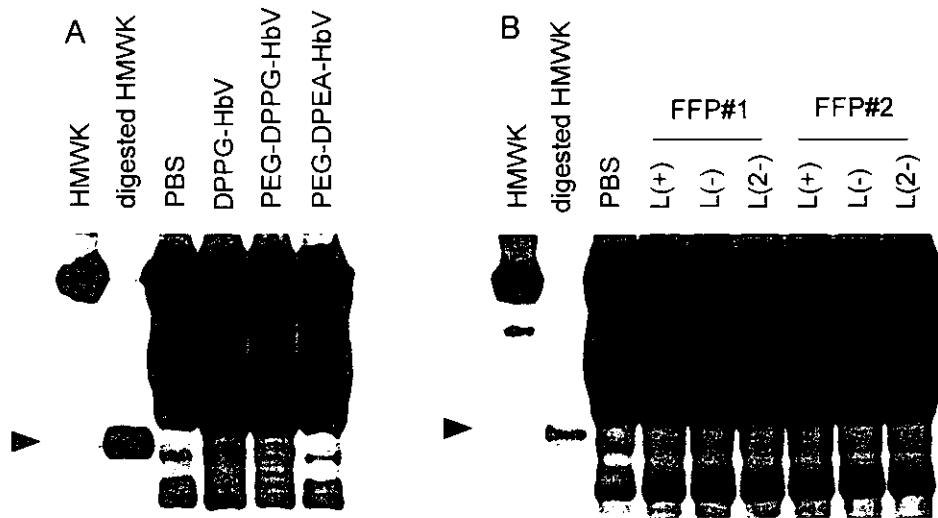


図6. 血漿中高分子キニノーゲンの変化.
 HMWK, 高分子キニノーゲン; digested HMWK, 分解高分子キニノーゲン; L (+), 陽性荷電中空リポソーム; L (-), 弱陰性荷電中空リポソーム; L (2-), 強陰性荷電中空リポソーム.

しかし陰性荷電表面との接触で活性化されるカリクレイン-キニン系の高分子キニノーゲンの分解は、PEG-DPEA では活性化されないのに対しPEG-DPPG で活性化された (図 6A). また、小胞体

のみを用いた検討では弱陰性荷電リポソーム (L(-)) では APTT の短縮が見られたが、強陰性荷電小胞体 (L(2-)) では逆に延長した (図 7). 何れの荷電の小胞体においても、高分子キニノーゲンの分解は観測されていない (図 6B).

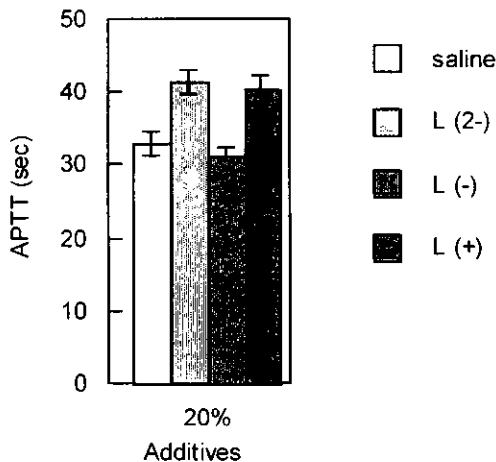


図7. 中空リポソームが血漿APTTに及ぼす影響.
 N=5, mean \pm SD.

D. 考察

APTT およびカリクレイン-キニン系では反応開始に陰性荷電表面が関与している. APTT の短縮や高分子キニノーゲンの分解を小胞体表面荷電の違いだけで説明することは困難であるとされたが、現在検討中の PEG-DPPA-HbV は、血漿凝固系 と カリクレイン-キニン系に対する影響は殆ど無く、高い生体適合性保持が確認された.

4. ガンマ線照射、未照射赤血球製剤の保存中の変化

A. 目的

ヘモグロビン小胞体にはヒト赤血球由来のヘモグロビンが用いられている。ヒト赤血球は、日赤血液センターで期限切れとなった赤血球製剤から調製しているが、保存による溶血がヘモグロビン回収率に悪影響を及ぼす。加えてほぼ全ての赤血球製剤がガンマ線照射（15～50 Gy）されていることから、未照射の製剤に比べ溶血が亢進する可能性があるため、その程度と両者の違いを検討した。

B. 方法

赤血球製剤にガンマ線 25 Gy（ガンマセル 40, Nordion）を照射し、4-6℃で保存した。経時的にサンプリングし、上清ヘモグロビン濃度、赤血球内ヘモグロビンメト化率を測定。

C. 結果

溶血率は照射、未照射群とも14日目以降に上昇した（図8A）。照射群では21日目以降、未照射群に比べより高い溶血率を示し、42日目には未照射

群の2倍にまで達したが、それでも溶血率は1%未満であった。

メト化率は、保存開始後から上昇したが、照射、未照射群に違いはみられなかった（図8B）。

D. 考察

日赤では致死率の高い副作用である輸血後移植片対宿主病を防止する目的で、全ての赤血球製剤に対し放射線照射を行っている。その為、今回の結果が示すように、有効保存期限の21日間を過ぎた後、未照射の製剤に比べ溶血率が上昇することになった。そのレベルは照射後保存42日目で1%未満と低いものの、赤血球からのヘモグロビン回収率が低下することには変化はない。一方、ヘム鉄の酸化により生成する酸素運搬能を有しないメトヘモグロビン量は、照射群、未照射群で差は見られず、放射線照射の影響は無いと考えた。血液製剤の有効利用をより進めるためには、期限切れ直後に凍結し、その後の溶血を完全阻止する方法が有効と思われ、今後の検討を要する。

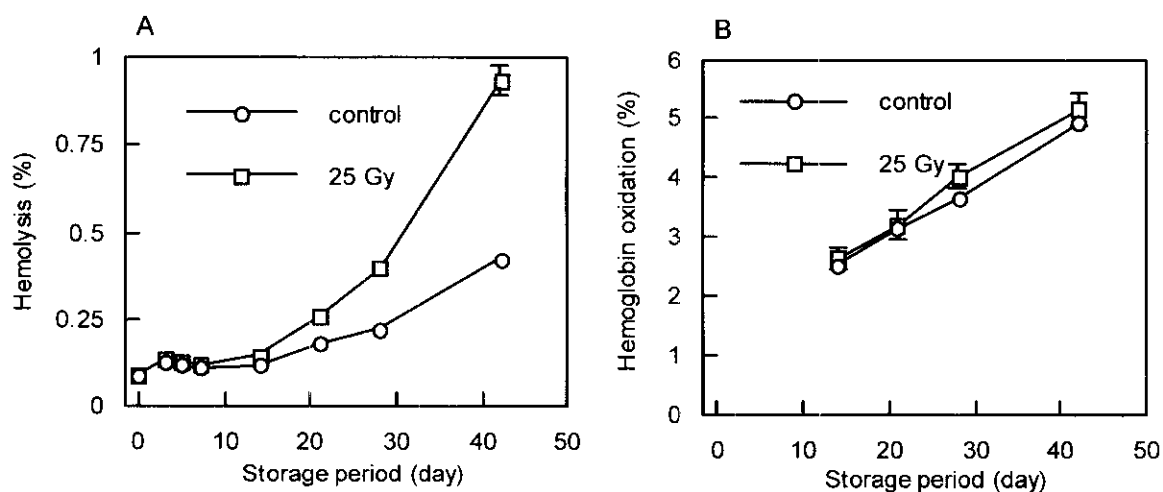


図8. 放射線照射が保存赤血球製剤の品質に及ぼす影響。
A, 溶血率；B, メト化ヘモグロビン率. N=3, mean ± SD

5. 研究業績

A. 論文発表

1. 平山順一, 阿部英樹, 東 寛, 池淵研二, 池田久實, “1,9-Dimethylmethylen blueによるストローマフリーヘモグロビンのウイルス光不活化”, *人工血液*, **9**, 83-87 (2001).
2. S. Wakamoto, M. Fujihara, H. Abe, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, H. Ikeda, K. Ikebuchi, “Effects of poly(ethyleneglycol)-modified hemoglobin vesicles on agonist-induced platelet aggregation and RANTES release in vitro”, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*, **29**, 191-201 (2001).
3. T. Ito, M. Fujihara, H. Abe, M. Yamaguchi, S. Wakamoto, S. Takeoka, H. Sakai, E. Tsuchida, H. Ikeda, K. Ikebuchi, “Effects of poly (ethylene glycol)-modified hemoglobin vesicles on N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine- induced responses of polymorphonuclear neutrophils in vitro”, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*, **29**, 427-437 (2001).
4. J. Hirayama, H. Abe, N. Kamo, K. Ikebuchi, H. Ikeda, “Comparison of the effects of different antiviral treatments on the antioxidant systems of stroma-free hemoglobin”, *Photochemistry and Photobiology*, **74**, 461-464 (2001).
5. H. Abe, K. Ikebuchi, K. Niwa, O. Inanami, M. Kuwabara, M. Fujihara, J. Hirayama, H. Ikeda, “Superoxide generation from human polymorphonuclear leukocytes by liposome-encapsulated hemoglobin”, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*, **29**, 275-283 (2001).
6. H. Abe, K. Ikebuchi, J. Hirayama, M. Fujihara, S. Takeoka, H. Sakai, E. Tsuchida, H. Ikeda, “Virus inactivation in hemoglobin solution by heat treatment”, *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology*, **29**, 381-388 (2001).
7. Y. Huang, S. Takeoka, H. Sakai, H. Abe, J. Hirayama, K. Ikebuchi, H. Ikeda, E. Tsuchida. “Complete deoxygenation from a hemoglobin solution by an electrochemical method and heat treatment for virus inactivation”, *Biotechnol. Progress*, **18**, 101-107 (2002).
8. N. Shibuya-Fujiwara, F. Hirayama, Y. Ogata, A. Matsuda, S. Sekiguchi, H. Ikeda, K. Ikebuchi, “Liposome-encapsulated superoxide dismutase suppresses liposome-mediated augmentation of TNF-alpha production from peripheral blood leucocytes”, *Life Sci*, **69**, 2007-2015 (2001).
9. J. Hirayama, H. Abe, H. Azuma, K. Ikebuchi, H. Ikeda, “Virus inactivation of stroma-free hemoglobin by photosensitization with 1,9-dimethylmethylen blue”, *Trends in Photochemistry and Photobiology*, (2002) (in press).

B. 学会発表

1. 阿部英樹 他/ヘモグロビン小胞体が血漿凝固及び血漿タンパク質に及ぼす影響/日本血液代替物学会第8回年次大会/2001.9.4-5/シエンバツハ・サポー(東京)
2. H. Abe, *et al.*/Reinforcement of the viral safety of hemoglobin solution by filtration and heat treatment/第54回 アメリカ血液銀行協会総会/2001.10.13-17/San Antonio, TX

分担課題：ヘモグロビン小胞体の投与試験による酸素運搬機能と安全度の評価

1. ヘモグロビン小胞体投与時の肺微小循環動態に関する研究
2. ヘモグロビン小胞体の安全性試験（40%交換輸血試験）

分担研究者 小林 紘一 慶應義塾大学医学部外科学 教授

研究協力者 堀之内 宏久 慶應義塾大学医学部外科学 講師

渡辺 真純 慶應義塾大学医学部外科学 講師

岩丸 有史 慶應義塾大学医学部外科学 助手

山内 徳子 慶應義塾大学医学部外科学 助手

山本 学 慶應義塾大学医学部外科学 助手

研究要旨：酸素運搬体を投与しガス交換の場である肺微小循環に与える影響をレーザー共焦点顕微鏡を用いて解析した。ラットにオキシヘモグロビン(Hb)、ヘモグロビン小胞体(HbV)、生理食塩水を投与して直接的に生体下で、肺細小動脈径、血圧および右室圧の変化などを観測し、HbV では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。

HbV の安全性試験として全血液量の 40%を交換し、全身動態の変動と 6 時間後の血液生化学試験項目の測定を実施した。HbV 投与に対する顕著な変動は認められず、安全性が確認できた。

1. ヘモグロビン小胞体投与時の肺微小循環動態に関する研究

A. 目的

ヘモグロビン小胞体(HbV)を投与した際に肺微小循環でおこる変化を生体下に観測、その変化の程度や原因に関する知見を Hb 投与の場合と比較しながら得ることを目的とした。

B. 方法

Sprague-Dawley ラットの胸壁にウィンドウチャンパーを植え込み固定した。肺微小循環の観察は、レーザー共焦点顕微鏡を主体とした生体血流観測装置を 6-100 μ m 程度の血管の

血流循環動態を解析できるように設計した。FITC アルブミンで血漿部分を標識し肺微小循環動態を可視化して細小肺動脈径を測定した。試料としてヘモグロビン (Hb) およびヘモグロビン小胞体 (HbV) を用い、Hb 投与群、HbV 投与群、生食投与群 (n = 6) とした。各々2 ml ずつ静注し経時的に血管径を計測した。また左内径動脈、右外径静脈に挿管し、同様に試料を投与した後、経時的に各々血圧、右室圧を測定した。呼気中の一酸化窒素濃度は、試料投与前後で測定した。

（倫理面への配慮）手術は吸入麻酔による全身麻酔、気管内挿管後人工換気下に行い、動物の苦痛を最小限にとどめた。

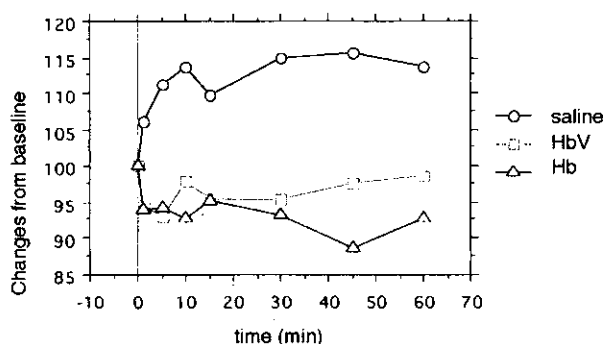


Figure 1. Changes in the diameter of pulmonary arterioles after infusion of saline, HbV or Hb into rats. Baseline: 100%

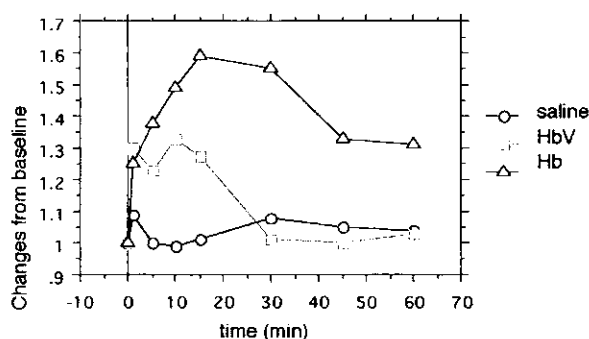


Figure 2. Changes in mean arterial pressure after infusion of saline, HbV or oxyHb into rats

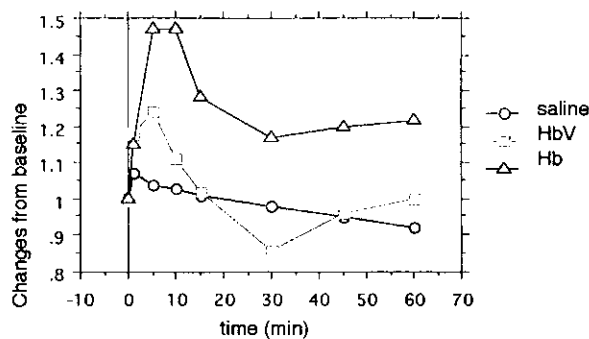


Figure 3. Changes in right venticle pressure after infusion of saline, HbV or oxyHb into rats

C. 結果

細小肺動脈血管径(**Fig. 1**)は、Hb 投与群では投与前に比べ投与直後 $93.9 \pm 7.3\%$ となり径の縮小傾向を認め、60 分後も $92.7 \pm 6.2\%$ と縮小したままだった。また HbV 投与群では投与直後 $94.5 \pm 3.3\%$ と縮小傾向を示したものの 10 分後 $97.9 \pm 4.2\%$ 、60 分後 $98.6 \pm 4.2\%$ と次第に前

値に復した。生食投与群では投与直後 $106.1 \pm 11.5\%$ 、5 分後 $111.2 \pm 9.3\%$ 、60 分後 $113.7 \pm 8.9\%$ となり増大傾向を示した。

血圧(**Fig. 2**)は Hb 投与群では投与前に比べ投与直後より上昇し始め、5 分後には前値の 1.47 ± 0.63 倍、60 分後でも 1.22 ± 0.45 倍と上昇傾向を認めた。HbV 投与群では 5 分後 1.24 ± 0.45 倍と昇圧傾向を示したものの、60 分後 1.00 ± 0.27 倍と次第に前値に復した。生食投与群では投与直後 1.07 ± 0.21 倍、5 分後 1.04 ± 0.6 倍、60 分後 0.92 ± 0.15 倍となり有意な変化を認めなかった。

右室圧(**Fig. 3**)は Hb 投与群では投与直後より上昇し始め、15 分後には前値の 1.59 ± 1.2 倍、60 分後でも 1.31 ± 0.47 倍と上昇傾向を認めた。HbV 投与群では 5 分後 1.23 ± 0.56 倍と昇圧傾向を示したものの 60 分後 1.03 ± 0.23 倍と次第に前値に復した。生食投与群では投与直後 1.09 ± 0.16 倍、5 分後 1.00 ± 0.2 倍、60 分後 1.04 ± 0.11 倍となり有意な変化を認めなかった。呼気中の一酸化窒素濃度は現在実験中であり、Hb 投与前後の値を測定した ($n = 1$)。投与前は $5.9 \sim 8.8$ ppb、投与直後は $6.0 \sim 10.5$ ppb と有意な変化を認めなかった。

D. 考察

肺微小循環は酸素運搬体の種類により異なった反応性を示し、HbV では肺微小循環に明らかな変化を与えず、Hb では肺動脈の収縮、血圧および右室圧の上昇を起こしたことは、生理活性物質である内因性一酸化窒素と相互に関連していると考えられた。呼気中の一酸化窒素の測定は測定条件、測定装置の設定、測定値の記録方法など今後の課題である。