

20010674

厚生科学研究費補助金

高度先進医療研究事業

臨床応用を目的とした生体機能代替可能な
人工赤血球の開発に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 北 畠 顕

平成 14 (2002) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
臨床応用を目的とした生体機能代替可能な人工赤血球の開発に関する研究	1
北畠 顕	
II. 分担研究報告	
1. 臨床応用を目的とした生体機能代替可能な人工赤血球の開発に関する研究	9
佐久間一郎	
2. 臨床応用を目的とした生体機能代替可能な人工赤血球の開発に関する研究	21
藤井 聡	
3. 臨床応用を目的とした生体機能代替可能な人工赤血球の開発に関する研究	26
仲井 邦彦	
4. 臨床応用を目的とした生体機能代替可能な人工赤血球の開発に関する研究	36
藤堂 省	
5. 臨床応用を目的とした生体機能代替可能な人工赤血球の開発に関する研究	41
劔物 修	
6. 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	49
小田切 優樹	
7. 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	58
並河 和彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	61
IV. 研究成果の刊行物・別刷	62

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

総括研究報告書

臨床応用を目的とした生体機能代替可能な人工赤血球の開発に関する研究

主任研究者 北畠 颯 北海道大学大学院医学研究科教授

研究要旨 本研究班では人工赤血球の臨床応用を企図し、SNO-PEG-Hb および新規パーフルオロケミカル（PFC）製剤の開発を行ってきた。本年度は、新規 PFC 製剤については PEG 付き製剤と PEG なし製剤の毒性試験を施行し、前者がより安全であることを確認した。さらにより安全な製剤をめざし、粒子サイズの減少、同時添加物質の調整を行う予定である。PFC 製剤への同時添加物質としては、アルブミンが必要であることが分かっていたが、 α 1 酸性糖タンパクが PFC 製剤投与による免疫反応を抑え、また電解質溶液への添加の際にも PFC 製剤の安定性を高めることが示唆された。PFC 製剤は小児心臓手術シュミレーション実験で、血液増量剤としての有用性が確認され、無輸血手術への応用が期待される。一方、移植肝保護液に添加し、4℃条件下で酸素を肝臓へ供給することにより、移植肝の viability 増加への貢献が可能と考えられるが、本年度の実験で用いた 5% 溶液では肝保護作用は検出出来なかった。今後、PFC 濃度を高めた実験を施行する必要がある。SNO-PEG-Hb の臨床応用としては、急性原虫症などによる急性貧血の際の投与が考えられ、本年度からマラリア感染症シュミレート実験として、イヌのバベシア感染症による寄生虫性急性貧血への有効性を検索した。量的問題からまず PEG-Hb を使用したが、効果は認められるものの劇的ではないため、今後 SNO-PEG-Hb の投与実験を行う。また、SNO-PEG-Hb は人工血管などのコーティング材として用い、血栓付着防止に利用できる可能性が示された。NO 供与能を有する SNO-PEG-Hb の脳虚血-再開通障害治療への応用の可能性を追究する目的で、一過性脳虚血ラットにおける脳機能障害に対する影響を検討したところ、虚血-再開通直後の SNO-PEG-Hb 投与により、歯状回領域における LTP 形成不全ならび短期記憶学習障害の改善を示す成績が得られた。この作用機序はまだ不明であるが、SNO-PEG-Hb が有する NO 供与・消去の両方に機能するユニークな性質が原因となっている可能性がある。今後、その機序を含め、臨床応用に向けて実験を行う予定である。

分担研究者
佐久間一郎
北海道大学医学部附属病院講師
藤井 聡
北海道大学医学部附属病院講師
仲井 邦彦
東北大学大学院医学系研究科助教授
藤堂 省
北海道大学大学院医学研究科教授
劔物 修
北海道大学大学院医学研究科教授
小田切 優樹
熊本大学薬学部教授
並河和彦
麻布大学獣医学部助教授

血小板活性化に起因すると思われる脳卒中の増加により、治験が一時中断している。本研究班では平成 10 年度より神戸学院大学薬学部製剤学福島昭二助教授と共同研究を行い、同共同研究者が特許を有する新規高圧ジェット流反転型乳化機を用いて PFC エマルジョン製剤に改良を加えてきた。そして、プロトタイプ製剤として、Fluosol-DA^R の主成分であるパーフルオロデカリンを用い、血小板活性化防止、網内系に対するステルス化および分子サイズの増大を企図してエマルジョンの表面をポリエチレングリコール (PEG) で修飾した製剤を創製した。本研究では同剤臨床応用の第一歩として、ラットを用いた急性毒性試験を共同研究者佐久間一郎講師、仲井邦彦助教授および研究協力者福島昭二助教授、北海道大学大学院医学研究科機能薬理学富樫廣子助教授と共に行った。

I. 新規 PFC 製剤の急性毒性試験

A. 研究目的

人工酸素運搬体としてパーフルオロケミカル (PFC) エマルジョン製剤が検討されてきた。PFC エマルジョンは、以前わが国で最初に開発されたミドリ十字製 Fluosol-DA^R が経皮的冠動脈拡張術での酸素補給液として製造許可を受けている。しかるに、当時の乳化技術の未熟に起因する PFC 濃度の限界 (20%) のための酸素供給能の低さ、血中滞留時間の短さ、また PFC として加えた FTPA の血中半減期が長いこと、さらにエマルジョン安定化のために加えた表面活性剤 Pluonic F-68 による網内系活性化などが問題となり、製造は中止されている。近年、米国で改良された 60%PFC 製剤 (Oxygent^R) は、赤血球輸血代替用途で臨床第三相まで治験が進んでいる。しかし、

B. 研究方法

使用した新規 PFC 製剤は、PEG 表面修飾 PFC エマルジョンであり、レシチン (水素添加精製大豆レシチン NC-61) 5 g、パーフルオロカーボンとしてパーフルオロデカリン (PFD) 90 g、フッ化アルコール・パルミチン酸エステル 5 g、フッ化アルコール・ラウリン酸エステル 5 g を、PEG 化リン脂質として DSPE - 12T を 0.15 g 含有し、注射用上流水を適量加えて約 40% (w/v) としたものである。コントロールエマルジョンとしては、上記処方では DSPE - 12T を除いた処方とした。

調製法は以下の様である。

1. レシチンを水に分散させ、加温しながらスターラーを用いて分散した。

2. 高圧ジェット流型乳化機 (DeBee 2000) を用い、デュアルフィード法でレシチン分散液をさらに分散した。

3. DSPE - 12T をを使用する場合は、レシチン分散後、DSPE - 12T を徐々にデュアルフィード部より投入した。

4. 3種の成分が完全に混合したパーフルオロカーบอนを、デュアルフィード部より徐々に投入し、粗乳化した(運転圧力 15000 psi)。

5. 乳化機をリバース法に組み換え、本乳化した(運転圧力 30000 psi)。

6. エマルジョンを回収し、使用するまで 4℃にて保存した。

計測された平均粒子径は PEG 表面修飾 PFC エマルジョンが 300 nm、コントロール PFC エマルジョンが 240 nm であった。

ラットへの投与時には 2 種の PFC (PFC-control と PFC-PEG) を十分に振盪し、50

%Glucose : 40%PFC=1 : 9 となるように混ぜ、37 度恒温槽にて 5 分間温めた。調整後 1~2 時間以内にジエチルエーテルにて麻酔した Wistar-ST ラットの尾静脈内に投与した。投与量は全血液量の(体重の 1/13)の 30%とした。一方、コントロール群として 50%グルコース溶液と精製水を 1 : 9 で混合し、グルコース濃度 5%として等張とした後、ラットに投与した(5%Glucose 群)。PFC-control (PFC-C 群) は 13 匹に、PFC-PEG (PFC-PEG 群) は 24 匹に投与し、各群を 3 群に分け、1 日、7 日、14 日後にウレタン麻酔下に開腹し、脾臓を結紮・摘出し、3.7%ホルマリン溶液にて灌流固定を行った。肝臓、腎臓、肺及び脾臓について病理組織標本作製し検査を行った。

肝臓は外側左葉の一部を、腎臓は右側を短軸方向に、肺は左肺の一部を、脾臓は中央部を短軸方向に切り出し、脱水後パラフィン包埋したブロックから 3 μm の薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

採血を投与前はすべてのラットについて、その他は 8 時間後、3 日後および殺処分前に尾静脈より約 1.5 ml EDTA 採血にて行った。

倫理面への配慮

実験にあたっては、前もって北海道大学医学部動物研究委員会に実験計画書を提出し、裁可を得た。

C. 実験結果

5%Glucose 群と PFC-PEG 群は死亡したものはなかったが、PFC-C 群は 13 匹中、5 匹が 8 時間以内に、7 匹が 1 日未満で死亡し、1 日目まで生存したものは 1 匹のみであった。

病理所見：

1. 5%Glucose 群

被験物質投与に起因すると考えられる変化が肝臓にのみ認められた。

1) 肝臓

被験物質投与に起因すると考えられる変化として、肝細胞空胞変性(糖原蓄積と考えられる空胞の細胞質内発現が投与 7 日の 2/3 例に軽度~中等度、投与 14 日の 1/3 例に軽微に認められた。

2) 腎臓

被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

3) 肺

病理組織学的に特記すべき変化は認められなかった。

4) 脾臓

ラットでは生理的に発現する変化として髄外造血が投与7日の3/3例と投与14日の1/3例にみられ、投与1日では認められなかったが、その程度は軽微で生理的変動の範囲内と考えられた。

2. PFC-C 群

被験物質投与に起因すると考えられる変化が肝臓及び脾臓に認められた。

1) 肝臓

被験物質投与に起因すると考えられる変化として、肝細胞壊死（単細胞又は巣状壊死）が投与8時間の2/3例に軽微～軽度、投与1日の死亡例（2/3例）で軽微、生存例（1/3例）で中等度（壊死部への出血を伴う）に認められた。また、投与1日の生存例には小葉中心性肝細胞腫脹が中等度に認められた。

このほか、生理的変動の範囲内と考えられる変化として小葉中心性肝細胞内空胞（脂肪滴と考えられる）が投与8時間の2/3例に軽微に認められたが、空胞内物質は糖原である可能性も否定できない。

2) 腎臓

被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

3) 肺

病理組織学的に特記すべき変化は認められなかった。

4) 脾臓

被験物質投与に起因すると考えられる変化として、赤脾髄の出血性浮腫性壊死、辺縁帯消失、白脾髄萎縮及び炎症性細胞浸潤が認められた。

赤脾髄の出血性浮腫性壊死は、辺縁帯を含め赤脾髄の全領域にわたって構成細胞の消失及び出血を伴う弱好酸性浮腫状壊死の形態を示してみられ、投与8時間では3/3例に軽度～中等度に、1/3例（軽度例）で炎症性細胞浸潤を伴って認められた。投与1日では程度が増強し、3/3例に高度に認められた。

辺縁帯消失は赤脾髄の出血性浮腫性壊死の程度に依存し、投与8時間及び投与1日の各3/3例に認められた。白脾髄萎縮は白脾髄内リンパ球の減少を示して投与1日の各3/3例に軽度～中等度にみられ、赤脾髄の出血性浮腫性壊死の波及の結果像と考えられる。

3. PFC-PEG 群

被験物質投与に起因すると考えられる変化が肝臓、肺及び脾臓に認められた。

1) 肝臓

被験物質投与に起因すると考えられる変化として、肝細胞壊死、小葉中心性肝細胞変性、網内系の活性化、小肉芽腫及び髄外造血が認められた。

肝細胞壊死は単細胞又は巣状壊死の形態を示し投与8時間でのみ3/3例に軽微に認められた。小葉中心性肝細胞変性は肝細胞の空胞化、腫脹、好酸性低下等の形態を示してみられ、投与8時間で発現しなかったが、投与1日で3/3例に軽微～軽度、7日で2/3例に軽微～中等度、14日で3/3例に軽度～中等度に認められた。網内系の活性化は、空胞を含有（食食物質は不明）し腫脹したクッパー細胞あるいはマクロファージと考えられる細胞の単細胞性あるいは集簇性発現（集簇巣）を類洞内に示してみられ、投与1日で3/3例に軽微、7日で3/3

例に軽度～中等度、14日で3/3例に軽度に認められた。小肉芽腫は網内系の活性化で発現した空胞化・腫脹細胞からの移行を示し、空胞化・腫脹の消失（食食物質処理の終了）した類上皮細胞（組織球）の小集簇の形態でみられ、投与7日で2/3例に軽微、14日で3/3例に軽度に認められた。髄外造血は投与14日の3/3例に軽微に認められた。

このほか、生理的変動の範囲内と考えられる変化として小葉中心性肝細胞内空胞（脂肪滴と考えられる）が投与8時間、1、7及び14日でそれぞれ1/3、1/3、2/3及び2/3例にいずれも軽微に認められたが、空胞内物質は糖原である可能性も否定できない。

2) 腎臓

被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

自然発生乃至発現頻度が低く偶発的と考えられる変化として、近位尿細管上皮内好酸性小体及び限局性尿細管好塩基性変化・萎縮が認められた。近位尿細管上皮内好酸性小体は投与7日及び14日でその発現数及び程度が投与8時間及び1日と比較してやや減弱したが、一般的にストレス状態においてその消失を示すことが知られており、他臓器（特に脾臓）障害による動物の一般状態悪化を反映するものと考えられる。また、限局性尿細管好塩基性変化・萎縮は投与7日及び14日でその発現数が投与8時間及び1日と比較して増加したが、その程度はいずれも軽微で自然発生の変動の範囲内と考えられる。

3) 肺

被験物質投与に起因すると考えられる変化として、脾臓及び肝臓と同様に小肉芽腫

が投与7日で3/3例に軽微～軽度、投与14日で2/3例に軽微に認められたが、これら動物のうち3例には一部小肉芽腫内に多核巨細胞の混在がみられた。

4) 脾臓

被験物質投与に起因すると考えられる変化として、網内系の活性化、炎症性細胞浸潤、小肉芽腫、髄外造血及び被膜炎が認められた。

網内系の活性化は、空胞を含有（食食物質は不明）し腫脹した細網細胞あるいはマクロファージと考えられる細胞の単細胞性あるいは集簇性発現（集簇）を赤脾髄内に示してみられ、投与8時間、1日及び7日ですべて3/3例に中等度～高度、14日ですべて3/3例に軽度に認められた。炎症性細胞浸潤は投与8時間及び1日だけにのみ、それぞれ3/3例に軽度～中等度及び3/3例に軽微～軽度に認められた。小肉芽腫は網内系の活性化で発現した空胞化・腫脹細胞の集簇からの移行を示し、空胞化・腫脹の消失（食食物質処理の終了）した類上皮細胞（組織球）の小集簇の形態でみられ、投与7日ですべて3/3例に軽微～軽度、14日ですべて3/3例に中等度に認められた。髄外造血は投与7日の2/3例に軽度、投与14日の3/3例に中等度に認められた。髄外造血は貧血に対する反応として増強することが知られており、骨髄での造血能力の低下が示唆される。被膜炎は投与7日の1/3例に軽微、投与14日の3/3例に軽度～中等度に認められた。

血液生化学所見：

血清 GPT (IU) は、5%Glucose 群で、前、1日、3日、7日、14日後にそれぞれ24、25、23、27、28と変化せず、PFC-C群では前27、8時間後165と上昇し、1日

後（1匹のみ生存）では513と著増した。PFC-PEG群では、前、8時間、1日、3日、7日、14日後にそれぞれ26、72、49、61、54、42と一時増加傾向となったが、14日目にはほぼ正常化した。

血清クレアチニン(mg/dl)は、5%Glucose群で、前、1日、3日、7日、14日後にそれぞれ0.86、0.65、0.73、1.03、0.52とほぼ変化せず。PFC-C群では前1.04、8時間後1.25と上昇した。PFC-PEG群では、前、8時間、1日、3日、7日、14日後にそれぞれ0.92、1.28、1.42、0.99、0.91、0.70と、一旦上昇を認めたが、3日目には正常化した。

D. 考案

今回の毒性試験では、全血液量の30%という比較的大量の投与を行った。PFC製剤の最大の問題点のひとつは、脾臓や肝臓など網内系での取り込みであり、今回の病理所見はそれを裏付けるものである。

今回の試験では、コントロールに用いたPEGなし製剤では、30%で13匹中12匹が1日以内に死亡するという毒性を示した。死亡原因は明かではないが、血栓症が最も考えられる。一方、PEG付きの新製剤では死亡例はなく、やはり脾臓や肝臓など網内系の活性化所見は認められたものの、14日目にはかなり沈静化している。また、生化学所見も、肝臓と腎臓機能で一過性の数値上昇を認めたが、時間とともに鎮静化した。

これらのPFC-CとPFC-PEGの差は、PEG付加の有無に由来しており、PFC製剤におけるPEGの重要性を示すものと思われる。PEGは免疫反応からの回避作用を有するが、一方、本研究班の成績から血小

板活性化阻止作用も示されている。本実験において、血小板活性化の抑制がPFC-PEGで存在したか否かについては、現在各種マーカーを検索中である。

本実験においては、PFC-PEGはPFC-Cと比べ、安全性に利点を有していたが、病理所見等を考慮しても、かなりの反応を生体に与えている。この回避のためには、まず今回やや大きかった粒子径を小さくすることが望ましいと思われる。また、PFC-PEGは膠質浸透圧が低く、そこにも生体にとって有害である可能性が考えられる。この点に関しては、本研究班で小田切優樹教授の検討されたアルブミンあるいは α 1酸性糖タンパクの添加が有効と思われる。特に後者は抗炎症作用を有するとされており、今後実験で検討する予定である。

E. 結論

新規PFC製剤の毒性試験を行った。PEG付き製剤はPEGなし製剤と比較し、安全性の面で優位であったが、一過性の肝・腎酵素上昇を伴う生体反応を惹起した。この主因は肝臓や脾臓などの網内系の賦活化と考えられる。今後実用化を目指すためには、その反応性を抑制することが必要であり、粒子サイズを小さくすること、さらにアルブミンや α 1酸性糖タンパクの同時投与を試みる必要があると考えられた。

その他の実験結果は、各分担研究者の報告書を参照のこと

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 25(5): 322-328, 2001
2. Jun Sakanoue, Mamoru Tamura, Shoji Fukushima, Yoshikazu Takeuchi, Ichiro Sakuma and Akira Kitabatake: Assessment of newly developed perfluorocarbon emulsion: oxygen carrying capacity as the blood substitute in vivo. *Art Cells Blood Subs Immob Biotech* 29(5): 389-397, 2001
3. Kiyoshi Mori, Hiroko Togashi, Ken-ichi Ueno, Machiko Matsumoto, Mitsuhiro Yoshioka: Aminoguanidine prevented the impairment of learning behavior and hippocampal long-term potentiation following transient cerebral ischemia, *Behav Brain Res* 120: 159-168, 2001
4. Kiyoshi Mori, Hiroko Togashi, Taku Kojima, Machiko Matsumoto, Satoshi Ohashi, Ken-ichi Ueno, Mitsuhiro Yoshioka: Different effects of anxiolytic agents, diazepam and 5-HT_{1A} agonist tandospirone, on hippocampal long-term potentiation in vivo. *Pharmacol Biochem Behav* 69: 367-372, 2001
5. Hiroko Togashi, Kiyoshi Mori, Yoshitada Itoh, Machiko Matsumoto, Ken-ichi Ueno, Satoshi Ohashi, Hiroshi Otani, Mitsuhiro Yoshioka: Involvement of interleukin-1 β / nitric oxide pathway in the postischemic impairment of long-term potentiation of the rat hippocampus, *Neurosci Lett* 313: 133-136, 2001
6. Kunihiko Nakai, Ichiro Sakuma, Hiroko Togashi, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Satoh, Akira Kitabatake: S-nitrosylated polyethylene glycol-conjugated hemoglobin derivative as a candidate material for oxygen therapeutics. In: *Polymer drugs in the clinical stage: Advantages and prospects*. Maeda H, ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002 in press
7. 藤井 聡、藤井ひとみ、富樫廣子、吉岡充宏、仲井邦彦、佐藤 洋、佐久間一郎、剣物 修、北島 顕：ヘモグロビン系人工酸素運搬体の血小板に及ぼす影響と人工材料としての臨床応用の可能性。 *人工血液* 10: 2002 in press
8. 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
9. 佐久間一郎：NO：生理活性物質／血管作動物質、 *Vascular Biology Navigator*。丸山征郎、安藤譲二、佐藤靖史編。メディカルレビュー社、東京。pp50-51, 2001.4.20.
10. 北島 顕：NO を放出する新たな Hb 修飾体が注目。 *KIDS* 10(4): 5-6, 2001
11. 佐久間一郎：医療経済からみた人工赤血球の展望。 *KIDS* 10(4): 6, 2001

12. 藤井 聡、藤井ひとみ、富樫廣子、吉岡充宏、佐久間一郎、仲井邦彦、佐藤洋、北島 顕、劔物 修：ヘモグロビン系人工酸素運搬体を用いた抗血栓性材料の開発. 循環制御 23(1): 31-34, 2002
1. 学会発表
 1. 菅原 武、佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、藤井 聡、藤井ひとみ、吉岡充宏、佐藤 洋、劔物 修、北島 顕：各種ヘモグロビン誘導体静注の肝臓・腎臓への影響：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22回日本循環制御医学会総会. 2001.5.11. 徳島
 2. 佐久間一郎、福島昭二、坂野上淳、仲井邦彦、佐藤 洋、田村 守、北島 顕：新規パーフルオロカーボンエマルジョンの生体内運搬供与能の検討. 第40回日本ME学会大会. 2001.5.11. 名古屋、日本
 3. 菅原 武、佐久間一郎、富樫廣子、仲井邦彦、吉岡充弘、佐藤 洋、北島 顕：SNO-hemoglobin 修飾体の生体適合性—急性毒性試験から—. 第1回日本NO学会学術集会. 2001.5.26-27. 福岡
 4. 仲井邦彦、富樫廣子、佐久間一郎、菅原 武、吉岡充弘、佐藤 洋、北島 顕：S-nitroso-PEG-hemoglobin 修飾体の生体適合性—急性毒性試験の成績から—. 第8回日本血液代替物学会. 2001.9.4. 東京
 5. 藤井 聡、福島昭二、藤井ひとみ、佐久間一郎、仲井邦彦、劔持 修、西尾琢也、竹内由和、北島 顕：Perfluorocarbon(PFC)製剤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の可能性. 第8回日本血液代替物学会. 2001.9.4. 東京
 6. 佐久間一郎：人工酸素運搬体の臨床適応へ向けての留意点—SNO-PEG-Hbの生体適合性と臨床応用への可能性—. 第8回日本血液代替物学会. 2001.9.5. 東京
 7. 浅沼博司、北風政史、真田昌爾、野出孝一、高島成二、朝倉正紀、扇田久和、佐久間一郎、北島 顕、堀 正二：虚血心における人工酸素運搬体 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49回日本心臓病学会学術集会. 2001.9.25. 広島
 8. 菅原 武、佐久間一郎、坂野上淳、富樫廣子、仲井邦彦、吉岡充弘、佐藤 洋、田村 守、北島 顕：脱血ショックラットにおけるS-ニトロソヘモグロビン修飾体の酸素運搬能の評価. 第42回日本脈管学会総会. 2001.11.22. 和歌山
- G. 知的所有権の出願・登録状況 なし

分担研究報告書

臨床応用を目的とした生体機能代替可能な人工赤血球の開発に関する研究

分担研究者 佐久間 一郎 北海道大学医学部附属病院講師

研究要旨 酸素運搬能を有する人工赤血球の臨床応用を企図し、一酸化窒素(NO) 供与能を有する SNO-PEG-Hb の脳虚血-再開通障害治療への応用の可能性を追究した。最初に、有用性の高い評価系を確立する目的で、一過性脳虚血モデルを作製し、その妥当性を行動学的、神経生化学的ならびに電気生理学的に検討した。両側総頸動脈閉塞による不完全脳虚血(2VO) および両側椎骨動脈閉塞を加えた完全脳虚血(4VO) ラットでは、10 分間の虚血後、時間とともに海馬 CA1 領域および歯状回領域における長期増強(LTP) 形成が障害された。また、虚血後 4 日目に施行した行動学的検討から、一過性脳虚血ラットでは、短期あるいは長期学習記憶機能が障害されることが明らかとなった。さらに、これら遅発性の脳機能障害に先行して、海馬 NO 産生の亢進が認められた。誘導型 NO 合成酵素阻害薬により、虚血後の海馬 NO 産生は抑制され、歯状回領域における LTP 形成不全ならび学習記憶関連行動障害の改善が認められたのに対して、非選択的 NO 合成酵素阻害薬処置により、4VO ラットの死亡率は増加した。このように、脳虚血-再開通障害における NO は、関わる NO 合成酵素アイソフォームおよび虚血後の時間経過によって異なった役割を担っていることが示唆された。2VO ラットでは、虚血-再開通直後の SNO-PEG-Hb 投与により、歯状回領域における LTP 形成不全ならび短期学習記憶障害の改善を示す成績が得られた。今後、SNO-PEG-Hb の酸素運搬能ならびに NO 供与能との関連性を含めた検討を行うことにより、脳虚血障害における治療戦略としての人工酸素運搬体の可能性を探る予定である。

I. 酸素運搬能を有する人工赤血球の治療
応用のための脳虚血-再開通障害モデルに
関する検討

A. 研究目的

酸素運搬能を有する人工赤血球の臨床応用の一環として、脳虚血-再開通障害治療への応用の可能性を追究するに先立ち、有用性の高い評価系としての脳虚血障害モデルの確立を図った。

脳には海馬 CA1 領域や大脳皮質の錐体細胞など、虚血に対して脆弱な神経細胞群が存在することが知られており、脳虚血応答機構に関する多くの研究は、これら海馬 CA1 領域における遅発性神経細胞死 (delayed neuron cell death: DND) を指標として行われてきた。しかし、血流低下が軽度で神経細胞死がみられない場合でも、神経細胞の電気的活動の障害が認められることが知られている。我々は、遅発性神経細胞死を

伴わない脳機能障害モデルとの観点から、一過性脳虚血ラットを作製し、その行動学的、神経生化学的ならびに電気生理学的特性を検討した。

長期増強 (long-term potentiation: LTP) は、興奮性入力に対するシナプス後ニューロンの反応が短時間の高頻度刺激によって増強し、その後、長時間にわたって持続する現象である。シナプスの可塑的変化を示すこの現象は、ある種の記憶と関連する電気生理学的現象と考えられている。LTPの形成過程には種々の分子が関与することが知られており、なかでも細胞間情報伝達物質として多様な生理機能を担っている一酸化窒素 (nitric oxide: NO) については、LTP 形成における機能的役割とともに、脳虚血-再開通障害との関連性も報告されている。しかしながら、脳虚血時の NO 役割に関しては、細胞内カスケードの一員として細胞障害性に働くという報告と保護的に作用するという相反する報告があり、関与する NO 合成酵素 (NO synthase: NOS) のアイソフォームとの関連性が推測されている。

そこで、脳虚血-再開通後の脳機能障害としての海馬 LTP および学習記憶関連行動の変化と海馬 NO 産生との関連性を、特に、誘導型 NOS (iNOS) 由来 NO 産生に焦点を当て検討した。一過性脳虚血モデルとしては、両側総頸動脈閉塞による不完全脳虚血 (2-vessel occlusion: 2VO) および両側椎骨動脈閉塞を加えた完全脳虚血 (4-vessel occlusion: 4VO) ラットを用いた。

B. 研究方法

実験プロトコルを図-1に模式的に示した。

一過性脳虚血モデルの作製: 10~15 週齢の Wistar 系雄性ラットを使用した。4VO モ

デルは Pulsinelli らの方法にしたがって作製した。両側椎骨動脈を電氣的に永久焼灼し、7 日後に両側総頸動脈を 10 分間閉塞した。2VO モデルには両側総頸動脈 10 分間閉塞のみを施行した。

薬物投与: iNOS 阻害薬 aminoguanidine (AG) および非選択的 NOS 阻害薬 N^ω-nitro-L-arginine methylester (NAME) は虚血施行 30 分前および血流再開後 24 時間毎に 10mg/kg を腹腔内に投与した。

NO 酸化代謝物の測定: 海馬における NO 産生の指標として、窒素酸化物をマイクロダイアシリス法にて測定した。実験の 2 日前に、ケタミン (100mg/kg) の腹腔内投与によって麻酔したラットを定位脳固定装置に固定し、海馬 (anterior, -5.8 mm; lateral, 3.0 mm, Δ 30° ; depth, 3.3 mm) にガイドカニューレを埋め込んだ。透析用プローベ (膜長; 3 mm) はガイドカニューレを介して海馬内へ挿入し、リンガー溶液で流速 1 μl/min にて 2 時間以上灌流した後にサンプリングを開始した。サンプリングは虚血-再開通後約 12 時間にわたって持続的に行い、加えて 24 時間 (1 日) 後および 96 時間 (4 日) 後にも行った。10 分間毎に得られた透析液は、auto-injector により高速液体クロマトグラフィー (HPLC) へ自動注入し、窒素酸化物を Griess 法にて測定した。また、一部のラットについては、NOS 阻害薬投与前後に血液 200 μl を採取し、3,000 回転、10 分間遠心した後、除蛋白 (血漿 50 μl にメタノール 150 μl を加え混和した後、10,000 回転、10 分間遠心) し、透析液と同様の方法で血漿中 NO²⁻ および NO³⁻ 濃度を測定した。測定原理は、NO²⁻ を酸性溶液中でスルファニドアミドと反応させてジアゾニウム塩とし、これに N-ナフチルエチレンジアミンを加えてジアゾ化合物とした後、そ

の吸光度を測定するものである。NO³⁻は還元カラムによりNO²⁻とし、同様に測定した。得られた値はNO²⁻とNO³⁻の和(NO_x)として表し、虚血前値を100%として評価した。

海馬長期増強(LTP)の測定:脳虚血-再開通後4日目にNO代謝産物を定量した後、LTPを測定した。ハロセン麻酔下、Schaffer側枝に刺激電極を、CA1に記録電極を挿入した。テスト刺激により、population spikeの振幅が50%になる刺激強度で誘発した波形を30秒間隔で5回平均加算し、5分毎に導出記録した。波形が安定した後、400Hzのテタヌス刺激を加え、その後60分間連続観察した。また、貫通線維(perforant path: p.p)に刺激電極を、歯状回(dentate gyrus: DG)に記録電極を挿入して、同様にLTPを記録した。テタヌス刺激前値を100%とした時の経時変化とその曲線下面積(area under the curve: AUC)を以て評価した。

学習記憶関連行動の検討:脳虚血-再開通後4日目に、一部のラットについて、短期学習機能の評価系であるY-迷路装置による自発交替行動(spontaneous alternation behavior)および長期学習機能の評価系である恐怖条件付け(contextual fear conditioning)によるすくみ行動(freezing behavior)を、LTPの測定に先立って観察した。

統計学的解析:得られた結果は、平均値±標準誤差(MEAN±SEM)で表し、両側t-検定にて統計学的有意差を検討した。有意水準は危険率5%に設定した。

倫理面の配慮

実験計画を北海道大学医学部動物実験委員会に提出し、実験方法、麻酔法、実験の意義などについての承認を得た後、実験を

行った。

C. 実験結果

1. 不完全虚血ラット(2VO)の評価

2VOによる海馬NO_xの変化:図-2に示すように、2VOラットでは両側総頸動脈10分間の閉塞後、約5時間後から海馬NO_xは徐々に増加し、7時間後には対照群である偽手術群(sham)に比較して有意差が認められた。一方、24時間後、96時間後(4日目)における海馬NO_xレベルについては、有意な変化は認められなかった。しかし、正常のラットではAG(10mg/kg)を腹腔内投与しても海馬NO_xレベルはほとんど変化しなかったのに対して、2VOラットではAGによってNO_xレベルの抑制がみられた。この海馬NO_xにおける反応は、NAME(10mg/kg)によっても同様に観察され、いずれもsaline投与対照群に比較して有意差が認められた。

2VOによる海馬LTPの変化:図-3と図-4に、LTPに対する2VOの影響を示した。虚血後4日目のLTP形成は、2VOによって、海馬CA1、DGいずれのシナプスにおいても有意に障害された。また、この2VOによるLTPの障害は、AGの腹腔内投与により改善された。

2VOによる学習記憶関連行動の変化:2VOによって、Y-迷路試験による自発交替行動の障害が認められた。

2. 完全虚血ラット(4VO)の評価

4VOによる海馬NO_xの変化:4VOラットでは10分間の虚血-再開通後、海馬NO_xレベルの上昇がみられ、虚血後1日目の変化は対照群に比較して有意であった。また、4VOラットにおける虚血後1日目、4日目のNO_x

の変化は AG 処置によって抑制された。

4VO による海馬 LTP の変化：図-5 に海馬 LTP に対する 4VO の影響をまとめた。4VO によって海馬 CA1 ならびに歯状回いずれのシナプスにおいても LTP の形成が有意に抑制された。また、この LTP の抑制は、AG 前処置によって減弱し、歯状回における LTP 形成については 4VO 群との間に有意差が認められた。一方、10 分間の完全脳虚血 (4VO) によって、死亡例は認められなかったが、NAME 処置により、5 例中 3 例が死亡した。

4VO による海馬 LTP と海馬 NO 産生の関連性についての検討：図-6 に示すように、虚血後 4 日目の海馬歯状回 LTP と虚血後 1 日目の NO_x レベルの間には有意の負の相関が認められた。すなわち NO_x レベルが高いラットほど LTP 形成が強く障害されていた。

4VO による学習記憶関連行動の変化：図-7 および図-8 に示すように、4VO によって、短期ならびに長期学習記憶の障害が観察された。すなわち、Y-迷路試験による自発交替行動の障害に加え、恐怖条件付け 24 時間後にみられるすくみ行動が、4VO によって有意に抑制された。このような短期ならびに長期学習記憶の障害は、いずれも AG 処置によって改善された。

D. 考察ならびに結論

一酸化窒素 (NO) 供与能を有する人工酸素運搬体である SNO-PEG-Hb の脳虚血-再開通障害治療への応用の可能性を検討するにあたって、妥当性の高い評価系を確立する目的で、一過性脳虚血モデルを作製し、行動学的、神経生化学的ならびに電気生理学的に検討した。

一過性脳虚血モデルである 2 VO および 4 VO ラットを用いて、脳虚血-再開通障害における NO の役割を特に、iNOS 由来 NO 産

生に焦点をあて、海馬 LTP との関連性から追究した。その結果、一過性脳虚血後、海馬 LTP 形成の抑制に先立って、海馬 NO 産生が増加することが明らかとなった。この反応は虚血の程度に依存していた。また、iNOS の阻害薬である AG 処置によって抑制された。

生体内において NO は NOS により L-アルギニンを基質として生成される。NOS には iNOS の他に神経型 NOS (nNOS)、内皮型 NOS (eNOS) が存在し、中枢神経系にはこれら 3 種類の NOS アイソフォームが存在する。虚血-再開通後における NO 産生の増加がどのアイソフォームを介して産生されるかは現在のところ結論が得られていないが、我々は、虚血後の海馬 NO_x 増加が、炎症性サイトカインの拮抗性アナログによって抑制されること、また NO_x レベルの時間推移が、iNOS 由来の NO 産生を引き起こす LPS 腹腔内投与後のそれと類似し、しかも iNOS 阻害薬 AG によって抑制されることを見出している。これらの事実から、虚血後の海馬 NO_x 増加が iNOS の活性化による NO 産生増加を主要機序としていることが推測される。しかしながら、我々は nNOS 阻害薬が LTP の形成不全を軽度ながら改善するとの知見を得ており、nNOS 由来の NO が虚血後の LTP 形成に対して障害的に作用している可能性も否定できない。これに対して、非選択的な NOS 阻害薬である NAME 処置によって、4VO ラットの生存率が低下した。このことは、eNOS 由来の NO が虚血再開通障害に対して、保護的に働いていることを示唆している。

虚血後 4 日目にみられた海馬歯状回シナプスにおける LTP 形成不全は AG 処置によって改善され、4VO ラットでは、虚血後 1 日目の海馬 NO_x レベルと有意の負の相関を示

した。これに対して、CA1 シナプスにおける LTP は AG により改善されなかった。また、虚血後 4 日目に観察された自発交替行動および恐怖条件付け後のすくみ行動の抑制は、AG 処置によって改善された。これらの事実は、海馬記憶回路の入力路である歯状回領域におけるシナプス伝達が、ある種の記憶形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。実際、我々がこれまで行ってきた研究では、多くの虚血-再開通障害の治療薬は歯状回シナプスの伝達効率に対して改善効果を示す。換言すれば、一過性脳虚血ラットにおける歯状回シナプス伝達効率の測定は、脳虚血-再開通に伴った脳機能障害の評価系として有用であるといえよう。

II. 脳虚血-再開通障害に対する SNO-PEG-Hb の効果に関する検討

A. 研究目的

酸素運搬能を有する人工赤血球の臨床応用という観点から、一酸化窒素 (NO) 供与能を有する SNO-PEG-Hb の、一過性脳虚血ラットにおける脳機能障害に対する改善効果の有無を検討した。

上記の研究結果に基づき、軽度脳機能障害を示す 2VO ラットを用いた。脳機能の指標として、虚血後 4 日目の海馬歯状回シナプスにおける LTP ならびに短期学習記憶関連行動を指標とした。

B. 研究方法

一過性脳虚血モデルの作製：10～15 週齢の Wistar 系雄性ラットを用い、両側総頸動脈 10 分間閉塞による 2VO モデルを作製した。

Hb 修飾体の調整ならびに投与：期限切れ赤血球製剤より、高純度 stroma-free Hb を作製した。嫌氣的条件下に PEG 修飾を行っ

た。さらに PEG-Hb へ NO 付加するために、*s*-ニトロソグルタミンを NO 供与体として用い、室温にて 10 時間反応させ、SNO-PEG-Hb を調整した。SNO-PEG-Hb は、実際の臨床応用を想定して、脳虚血-再開通直後に尾静脈内へ投与した。投与量は 250 mg/kg とした。

海馬長期増強 (LTP) の測定：先の研究に準じて、LTP の測定は脳虚血-再開通後 4 日目に行った。ハロセン麻酔下、貫通線維 (perforant path: p.p) に刺激電極を、歯状回 (dentate gyrus: DG) に記録電極を挿入して、LTP を記録した。テタヌス刺激前値を 100% とした時の経時変化とその曲線下面積 (area under the curve: AUC) を以て評価した。

学習記憶関連行動の検討：脳虚血-再開通後 4 日目に、LTP の測定に先立って、Y-迷路試験による自発交替行動を観察した。

倫理面の配慮

実験計画を北海道大学医学部動物実験委員会に提出し、実験方法、麻酔法、実験の意義などについての承認を得た後、実験を行った。

C. 実験結果

2VO による海馬 LTP の変化に対する SNO-PEG-Hb の効果：2VO によって傷害された虚血後 4 日目の歯状回領域における LTP 形成は、虚血-再開通直後に SNO-PEG-Hb 250 mg/kg を静脈内投与することによって有意に改善された。

2VO による学習記憶関連行動の変化：2VO ラットの Y-迷路試験における自発交替行動の障害は、虚血-再開通直後に SNO-PEG-Hb 250mg/kg を静脈内投与することによって改善された。

D. 考察ならびに結論

NO 供与能を有する SNO-PEG-Hb の脳虚血-再開通障害治療への応用の可能性を追究する目的で、一過性脳虚血ラットにおける脳機能障害に対する影響を検討した。現在までに行った 2VO ラットを用いた研究では、虚血-再開通直後の SNO-PEG-Hb 投与により、歯状回領域における LTP 形成不全ならび短期記憶学習障害の改善を示す成績が得られた。

我々は先の研究において、一過性脳虚血ラットでは、海馬 LTP の障害や学習記憶機能障害が認められること、これら遅発性の脳機能障害に先行して、海馬 NO 産生亢進が観察されることを報告した。誘導型 NO 産生酵素阻害薬により、虚血 24 時間後の NO 産生は抑制され、歯状回領域における LTP 形成不全ならび記憶学習関連行動障害の改善が認められたのに対して、非選択的 NO 産生酵素阻害薬処置により 4VO ラットの死亡率は増加するなど、各 NOS 阻害薬は異なる作用態度を示すことから、虚血後の時間経過によって、関連する NO 合成酵素アイソフォームおよび NO の役割が異なっている可能性が推測される。

一過性脳虚血ラットの海馬 LTP 形成障害や記憶学習機能障害といった遅発性の脳機能障害に対する SNO-PEG-Hb の改善作用の機序に関しては不明である。SNO-PEG-Hb の NO 供与能が、虚血後の時間経過において、どのように関わっているのか興味の持たれるところである。この点に関しては、NO 供与能を持たない PEG-Hb との比較実験によって明らかされるものと期待される。

今後、SNO-PEG-Hb の酸素運搬能ならびに NO 供与能との関連性を含めた検討を行うことにより、脳虚血障害における治療戦略と

しての人工酸素運搬体という新たな展開を図りたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 25(5): 322-328, 2001
2. Jun Sakanoue, Mamoru Tamura, Shoji Fukushima, Yoshikazu Takeuchi, Ichiro Sakuma and Akira Kitabatake: Assessment of newly developed perfluorocarbon emulsion: oxygen carrying capacity as the blood substitute in vivo. *Art Cells Blood Subs Immob Biotech* 29(5): 389-397, 2001
3. Kiyoshi Mori, Hiroko Togashi, Ken-ichi Ueno, Machiko Matsumoto, Mitsuhiro Yoshioka: Aminoguanidine prevented the impairment of learning behavior and hippocampal long-term potentiation following transient cerebral ischemia, *Behav Brain Res* 120: 159-168, 2001
4. Kiyoshi Mori, Hiroko Togashi, Taku Kojima, Machiko Matsumoto, Satoshi Ohashi, Ken-ichi Ueno, Mitsuhiro Yoshioka: Different effects of anxiolytic agents, diazepam and 5-HT_{1A} agonist tandospirone, on hippocampal long-term potentiation in vivo. *Pharmacol*

- Biochem Behav 69: 367-372, 2001
5. Hiroko Togashi, Kiyoshi Mori, Yoshitada Itoh, Machiko Matsumoto, Ken-ichi Ueno, Satoshi Ohashi, Hiroshi Otani, Mitsuhiro Yoshioka: Involvement of interleukin-1 β / nitric oxide pathway in the postischemic impairment of long-term potentiation of the rat hippocampus, *Neurosci Lett* 313: 133-136, 2001
 6. Kunihiko Nakai, Ichiro Sakuma, Hiroko Togashi, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Satoh, Akira Kitabatake: S-nitrosylated polyethylene glycol-conjugated hemoglobin derivative as a candidate material for oxygen therapeutics. In: *Polymer drugs in the clinical stage: Advantages and prospects*. Maeda H, ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2002 in press
 7. 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
 3. 佐久間一郎: NO: 生理活性物質/血管作動物質、*Vascular Biology Navigator*. 丸山征郎、安藤譲二、佐藤靖史編. メディカルレビュー社、東京. pp50-51, 2001.4.20.
 9. 佐久間一郎: 医療経済からみた人工赤血球の展望. *KIDS* 10(4): 6, 2001
 10. 藤井 聡、藤井ひとみ、富樫廣子、吉岡充宏、佐久間一郎、仲井邦彦、佐藤洋、北畠 顕、劔物 修: ヘモグロビン系人工酸素運搬体を用いた抗血栓性材料の開発. *循環制御* 23(1): 31-34, 2002
 11. 藤井 聡、藤井ひとみ、富樫廣子、吉岡充宏、仲井邦彦、佐藤 洋、佐久間一郎、劔物 修、北畠 顕: ヘモグロビン系人工酸素運搬体の血小板に及ぼす影響と人工材料としての臨床応用の可能性. *人工血液* 10: 2002 in press
2. 学会発表
 1. 菅原 武、佐久間一郎、仲井邦彦、富樫廣子、藤井 聡、藤井ひとみ、吉岡充宏、佐藤 洋、劔物 修、北畠 顕: 各種ヘモグロビン誘導体静注の肝臓・腎臓への影響: 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22回日本循環制御医学会総会. 2001.5.11. 徳島
 2. 佐久間一郎、福島昭二、坂野上淳、仲井邦彦、佐藤 洋、田村 守、北畠 顕: 新規パーフルオロカーボンエマルジョンの生体内運搬供与能の検討. 第40回日本ME学会大会. 2001.5.11. 名古屋、日本
 3. 菅原 武、佐久間一郎、富樫廣子、仲井邦彦、吉岡充弘、佐藤 洋、北畠 顕: SNO-hemoglobin 修飾体の生体適合性—急性毒性試験から—. 第1回日本NO学会学術集会. 2001.5.26-27. 福岡
 4. 仲井邦彦、富樫廣子、佐久間一郎、菅原 武、吉岡充弘、佐藤 洋、北畠 顕: S-nitroso-PEG-hemoglobin 修飾体の生体適合性—急性毒性試験の成績から—. 第8回日本血液代替物学会. 2001.9.4. 東京
 5. 藤井 聡、福島昭二、藤井ひとみ、佐久間一郎、仲井邦彦、劔物 修、西尾琢也、竹内由和、北畠 顕:

Perfluorocarbon(PFC)製剤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の可能性. 第8回日本血液代替物学会. 2001.9.4. 東京

6. 佐久間一郎：人工酸素運搬体の臨床適応へ向けての留意点－SNO-PEG-Hbの生体適合性と臨床応用への可能性. 第8回日本血液代替物学会. 2001.9.5. 東京
7. 浅沼博司、北風政史、真田昌爾、野出孝一、高島成二、朝倉正紀、扇田久和、佐久間一郎、北畠 顕、堀 正二：虚血心における人工酸素運搬体 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49回日本心臓病学会学術集会. 2001.9.25. 広島
8. 菅原 武、佐久間一郎、坂野上淳、富樫広子、仲井邦彦、吉岡充弘、佐藤 洋、田村 守、北畠 顕：脱血ショックラットにおけるS-ニトロソヘモグロビン修飾体の酸素運搬能の評価. 第42回日本脈管学会総会. 2001.11.22. 和歌山

G. 知的所有権の出願・登録状況 なし

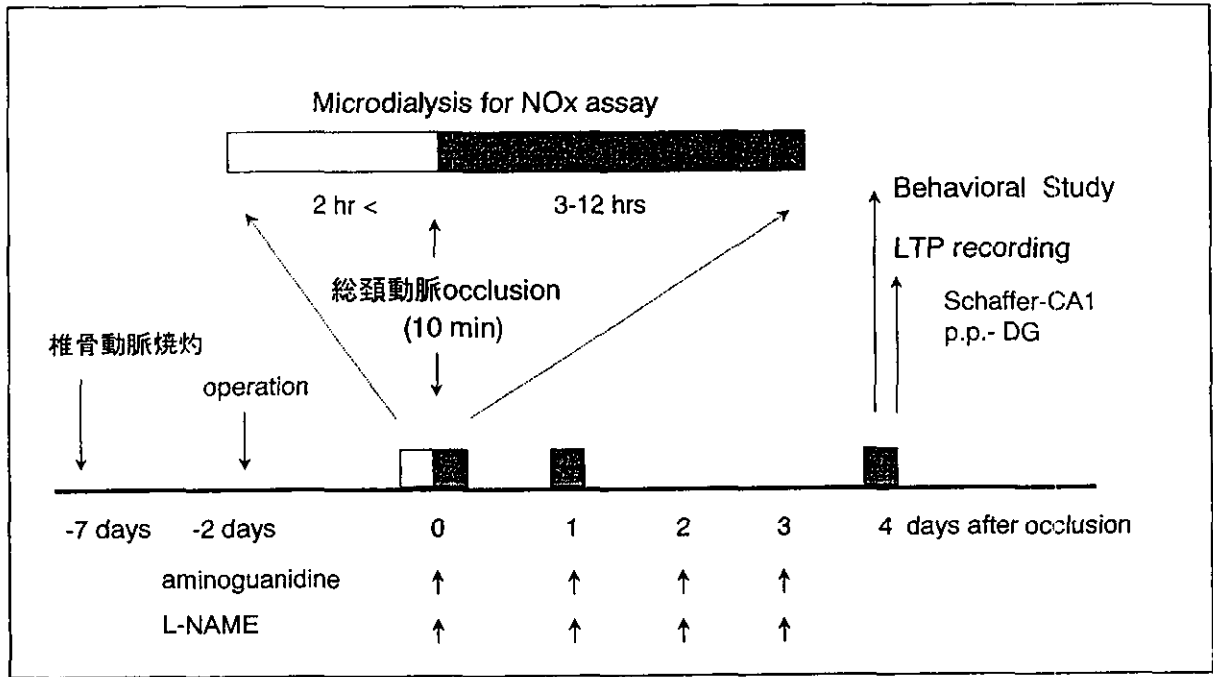


図-1 実験プロトコール

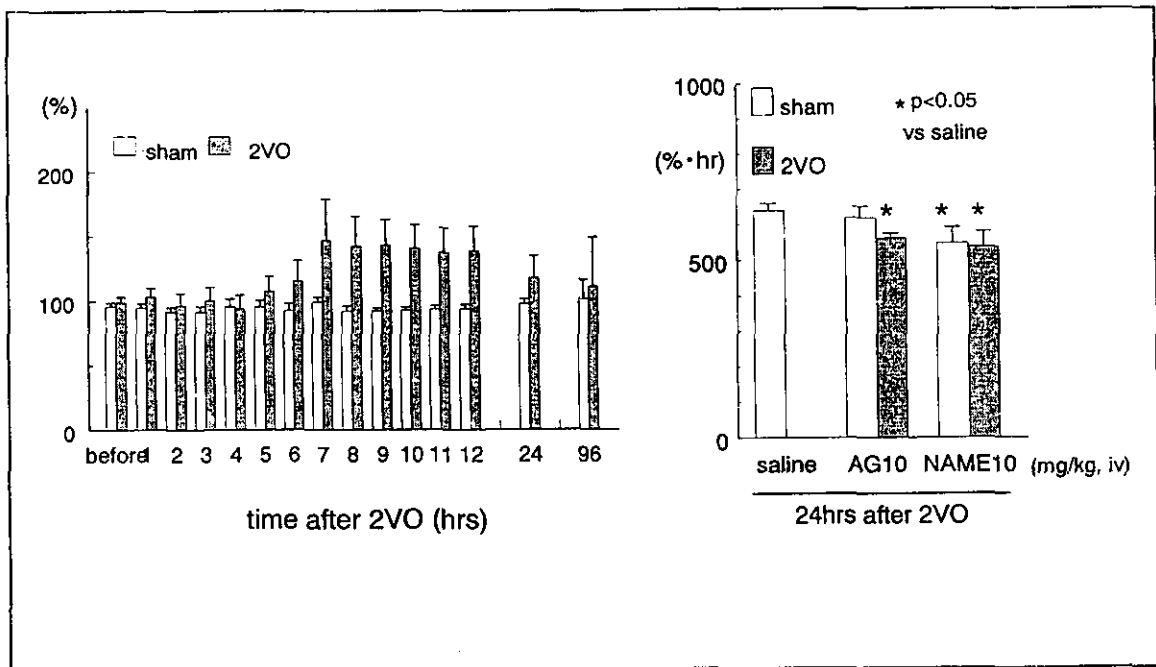


図-2 4VOによるラット海馬NO代謝産物レベルの経時的変化

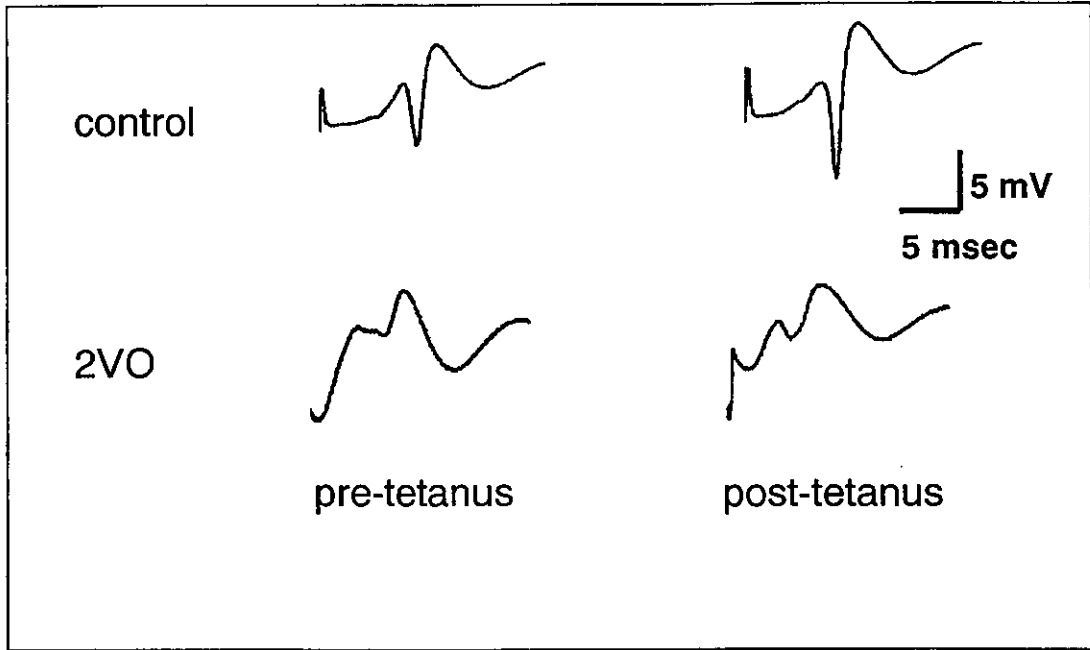


図-3 2VOによるラット海馬歯状回LTPの変化

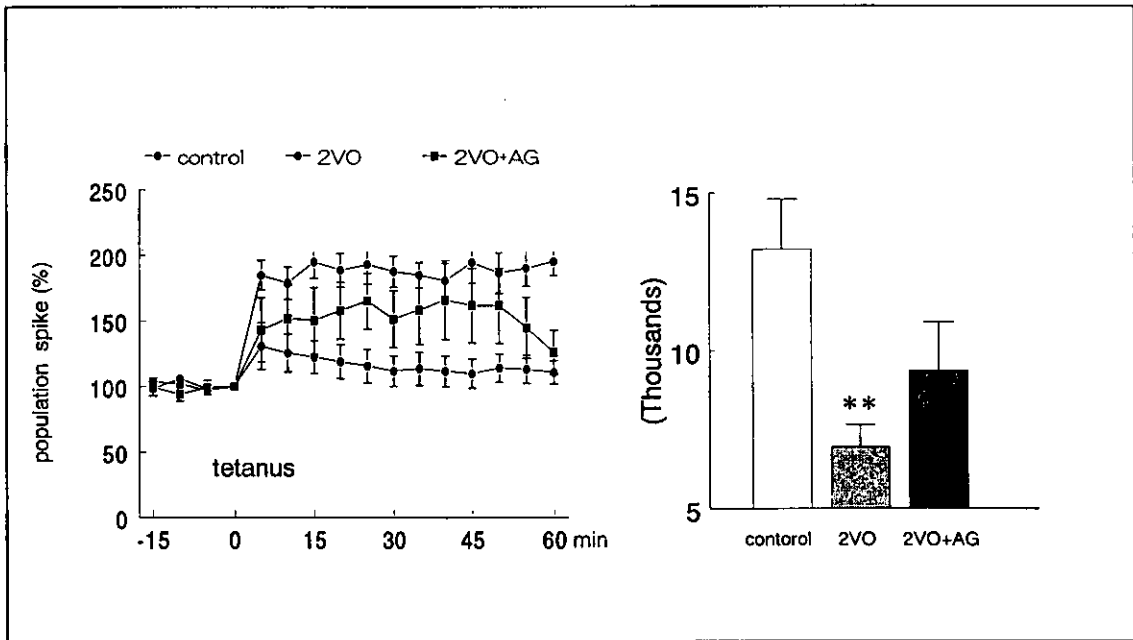


図-4 2VOによるラット海馬LTPの経時的変化とaminoguanidineによる影響