

図-5 4VOラットにおける海馬CA1および歯状回シナプスにおけるLTPの変化

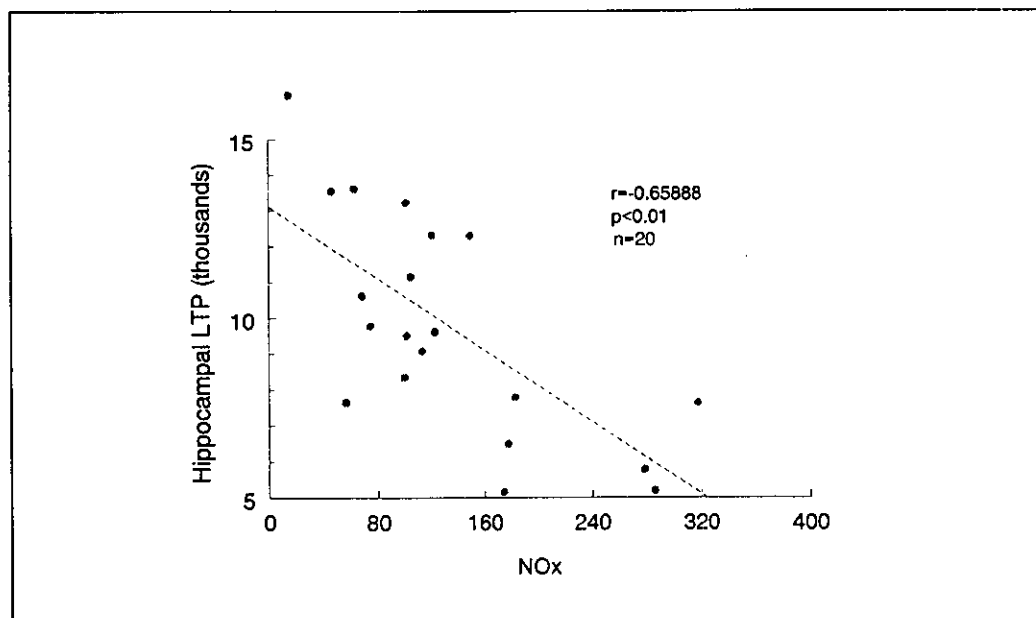


図-6 4VOラットにおける海馬歯状回LTPとNO産生の相関性

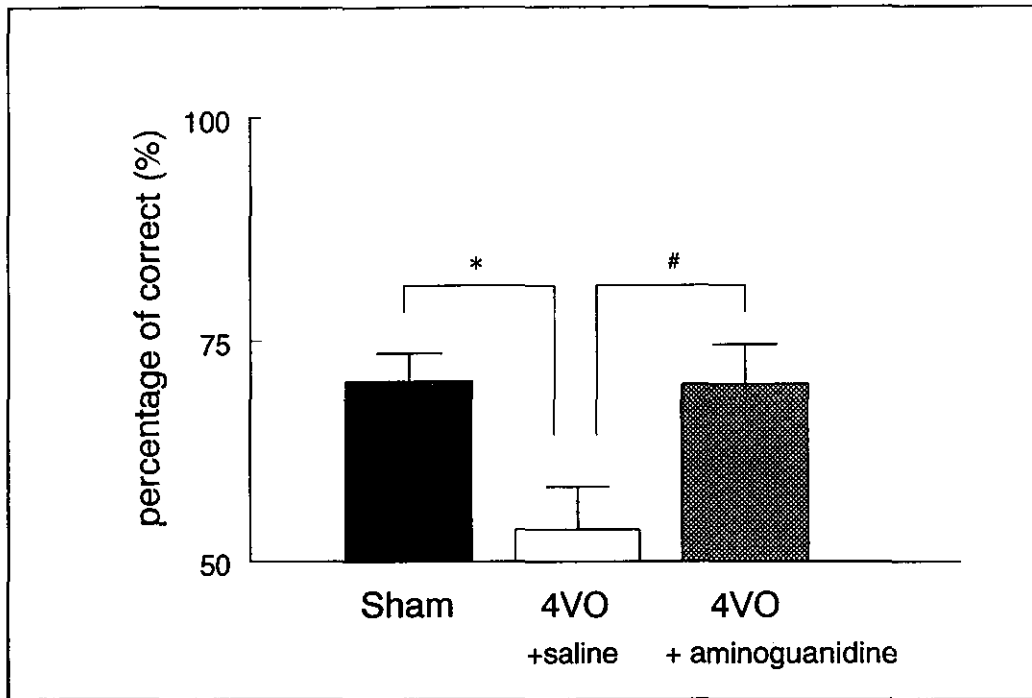


図-7 4VOによるラット自発交替行動の変化—Y迷路試験による評価  
 \* $p < 0.05$  vs sham; #  $p < 0.05$  vs 4VO

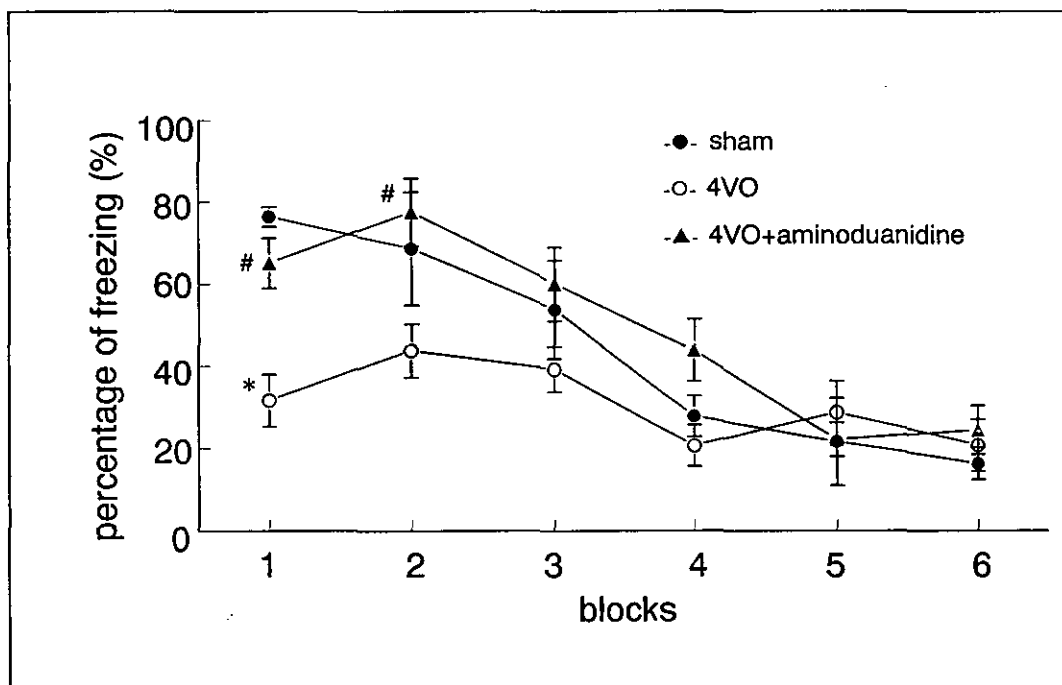


図-8 4VOによるラットすくみ行動の変化—恐怖条件付けによる評価  
 \* $p < 0.05$  vs sham; #  $p < 0.05$  vs 4VO

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 人工材料に抗血栓性を付加するためには、物理化学的処理を施す、生理活性物質を材料表面に結合させる、生体組織自身を利用するなどの方法がある。一酸化窒素(NO)は血管拡張作用がある。我々はヘモグロビン(hemoglobin, Hb)の\*鎖のSH基をニトロソ化したSNO-Hbを作成し、血管収縮を抑制しながら酸素を運搬する物質を開発してきた。一方、NOは血小板凝集、粘着を抑制する。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。NO放出能を付加したHb修飾体(SNO-Hb)、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(PEG-Hb)、その両方を付加したHb修飾体(SNO-PEG-Hb)の血小板活性化作用がより少ないかを検討した。また人工材料への応用の可能性を考慮して、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粘着に対するHbとその修飾体の影響も検討した。Hb添加群で血小板活性化のマーカーであるP-セレクトリン発現が亢進した。SNO-Hb添加群でP-セレクトリン発現の上昇はHb添加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。修飾Hbの人工酸素運搬体としての特質は、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く将来性が期待できる。

A. 研究目的

血小板は代用臓器や人工臓器の人工材料表面と接触して刺激され粘着・凝集反応を起こす。血小板 $\beta_3$ インテグリンであるIIb/IIIaは活性化血小板において構造が変化し、フィブリノゲン結合部位が発現し、その結果血小板同士が結合する。IIb/IIIaに対するモノクローナル抗体は急性冠症候群の血小板血栓の予防に有効である。これ

は血栓形成過程に細胞接着機構が極めて重要であることを示唆する。一方、細胞接着分子の一つであるP-セレクトリンは血小板の $\alpha$ 顆粒や血管内皮細胞のWeibel-Palade小体の顆粒膜に存在する膜糖蛋白で、血小板がトロンビンや活性酸素の刺激により活性化されると速やかに細胞表面に発現し、白血球膜上のSialyl Lewis<sup>x</sup>糖鎖をリガンドとして接着能を発揮する。従って、IIb/IIIa

やP-セレクチンは血小板活性化のマーカーとしても使用されている。

一酸化窒素(nitric oxide, NO)は内皮で産生され、抗血栓作用を有し、血小板のguanylate cyclaseを活性化させ、細胞質内cGMP濃度を上昇させて血小板凝集、粘着を抑制する。血漿蛋白質は血管グラフトのコーティングに用いられる。しかしヘモグロビン(hemoglobin, Hb)はNOをその分子内に容易にトラップし不活化する結果、血小板の活性化を増強する可能性がある。HbにはNO放出能を付加でき、またポリエチレングリコール(polyethylene glycol, PEG)は分子バリアーを形成して人工材料に抗血栓性を付加できることが知られている。そこでNO放出能を付加したHb修飾体、PEGを付加したHb修飾体、その両方を付加したHb修飾体を作成した。本研究では血小板 $\beta_3$ インテグリンと細胞接着分子であるP-セレクチンに注目し、Hbが血小板活性化をもたらすか、また修飾されたHbは血小板活性化作用がより少ないかについて検討した。

## B. 研究方法

### 1. S-ニトロソ化しポリエチレングリコール鎖を結合させたHbの作成

Hbとしてヒトまたはウシ赤血球よりHbを抽出して膜成分を除去したstroma free Hbを調整し、透析後実験に使用した。S-ニトロソ化しポリエチレングリコール鎖を結合させたHbの作成はNakaiらの方法にて作成した。

### 2. フローサイトメトリーによる活性化血小板の検出

健常ヒト多血小板血漿(platelet rich plasma, PRP、100 $\mu$ l)をHb及びその修

飾体(0-0.5%)と20分間、22 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。活性化された血小板表面に発現されたP-セレクチンを、FITC蛍光標識した抗P-セレクチン抗体(CD62P)とフローサイトメトリーを用いて、直接的に活性化血小板を測定した。PAC-1はGPIIb/IIIaに対するモノクローナル抗体で、静止状態のGPIIb/IIIaにはほとんど結合せず、活性化されたGPIIb/IIIaにのみ結合する。すなわち、構造変化を受けたGPIIb/IIIa上のフィブリノゲン結合部位を認識する。PAC-1もフローサイトメトリーを用いて活性化血小板を直接的に測定した。

### 3. 人工材料への血小板の粘着・凝集

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粘着・凝集に対するHbとその修飾体の影響も検討した。ガラス板に対する血小板の粘着・凝集の測定には、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、乾燥させた後、健常ヒトPRPを加えガラス板、及びコラーゲンでコーティングしたガラス板に対する血小板の粘着及び凝集を顕微鏡で400倍で観察した。イメージはコンピュータに保存し、画像解析装置により定量評価した。

### 4. 人工酸素運搬体の持つ抗炎症作用の評価系の確立

人工酸素運搬体の持つ抗炎症作用を評価する系を確立することを目的とした。一般に炎症反応に対して肝細胞が急性相蛋白を産生することが知られている。したがって人肝臓由来細胞を培養して炎症惹起性サイトカインとしてインターロイキン1および6を添加した。急性相蛋白として培養上清中のPAI-1をウエスタンブロットにて測定

可能か検討した。

#### 倫理面への配慮

倫理面へ配慮としては、健常協力者に研究の重要性を説明し、また静脈採血に伴う危険性も説明し理解を得て、インフォームドコンセントを得た後、静脈採血を行った。

#### C. 研究結果

対照群に比較して、Hb 添加群で血小板への CD62P と PAC-1 の結合が亢進した。SNO-Hb 添加群、PEG-Hb 添加群、SNO-PEG-Hb 添加群では CD62P と PAC-1 の結合の上昇は Hb 添加群に比べ軽度であった。

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対する血小板の粘着についてみると、Hb は有意に血小板の粘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。

人肝由来細胞は未刺激状態では急性相蛋白 PAI-1 産生は非常に少なかった。しかし炎症惹起性サイトカインの刺激により豊富に急性相蛋白 PAI-1 を産生した。PAI-1 は mRNA をノーザンブロットにて、また蛋白をウェスタンブロットで測定可能であった。

#### D. 考案

Hb 修飾体を人工赤血球として用いた場合、血栓形成素因、糖尿病、または有意な動脈狭窄が存在する可能性の高い高齢者の場合には Hb がもたらす血小板活性化は、脳梗塞や心筋梗塞を誘導する可能性が考えられる。酸素運搬体の適応は健常人のみならず種々の病態生理下で使用されることを念頭に置いて、副作用の少ない材料を開発する必要

がある。SNO-Hb は血小板を活性化させずに、血管内腔側から NO で血管拡張させながら酸素を供給するので脳梗塞や心筋梗塞で局所的に治療に使える。

今回の検討では無修飾 Hb は血小板の活性化を亢進させた。一方、血小板の粘着・凝集を抑制した。血小板の粘着・凝集の観察の比較対照がガラス板表面またはコラーゲンであり、ガラス板表面やコラーゲンが血小板にとっては非常に粘着性が高く、かつ活性化も引き起こしやすい物質であることを考慮すると、血小板の粘着・凝集における無修飾 Hb の影響は、これら血栓原性の強い物質から、血小板を隔離したことの効果とも考えられる。対照として、血小板への影響がより少ない蛋白、たとえばアルブミンなどを用いていたら無修飾 Hb は粘着・凝集を亢進させた可能性も考えられる。また、コラーゲンコートしたガラス板に Hb 修飾体を塗布した場合より、ガラス板に直接 Hb 修飾体を塗布したほうが血小板の粘着・凝集抑制がみられた原因については今後さらに検討する必要がある。

人工材料の血栓形成のメカニズムとして、血液との接触反応により瞬間的に材料表面への血漿蛋白の吸着が起こり、吸着蛋白の種類で、その後起こる血小板の粘着凝集の程度がきまる。材料の化学組成、表面組成、表面構造により血漿蛋白との吸着様式がきまる。Hb 由来の陰性荷電はガラス板に陰性荷電を与えて血小板の吸着作用を弱めたと考えられる。PEG-Hb は長鎖 PEG を有するという構造的特徴による物理的な血液成分の付着抑制作用がある。PEG は親水性でガラス板には吸着しにくく、PEG-Hb の疎水性の Hb 部分でガラス板に着いていたと思われ、

Hb と PEG-Hb ではガラス板についた Hb の量が異なった可能性がある。Hb 自身にも血球成分の粘着を抑制する作用が報告されている。さらに NO 放出能を付加した Hb 修飾体は NO の血小板に対する好ましい抑制作用により、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 に比較して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。更に、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と考えられた。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修飾 Hb の影響も顕著であったことから、修飾 Hb は血管拡張作用を持った人工酸素運搬体としての作用のみならず血管内ステント、心臓外科手術における体外循環サーキット、あるいは人工血管のコーティング等に臨床応用出来る可能性が大きいことが示された。

人肝由来細胞は未刺激状態では急性相蛋白 PAI-1 産生は少なかった。しかし炎症惹起性サイトカインの刺激により豊富に急性相蛋白 PAI-1 を産生した。PAI-1 は mRNA をノーザンブロットにて、また蛋白をウエスタンブロットで測定可能であった。今後このシステムを用いて NO 放出能を持つ人工酸素運搬体の抗炎症作用を検討する予定である。

#### E. 結論

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、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。修飾 Hb の人工酸素運搬体としての特質は、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く将来性が期待できる。

#### 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. 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

3. 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

##### 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. 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

3. 藤井 聡:ヘモグロビン系人工酸素運搬体の応用:P心臓外科手術における体外循環、人工コーティング、心筋保護等臨床応用にむけての基礎的検討.第6回日本心臓血管麻酔学会学術大会. 2001.10.6. 札幌

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）

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

研究分担者 仲井 邦彦 東北大学大学院医学系研究科助教授

研究要旨 S-nitroso-PEG-Hb (SNO-PEG-Hb) の生理学的な意義を考察した。SNO-Hb が見出された当時、一酸化窒素(NO) を巡っては、生体内で主に NO として存在し NO として機能し代謝を受ける、との考えが主流であり、SNO 体に変換されて代謝される経路はほとんど注目されていなかった。しかしながら、近年、細胞膜上に存在しニトロソ体を能動的に細胞内に取り込むための酵素やチャネルが見出され、さらに SNO 体を特異的に分解する酵素が同定されるに及んで、ニトロソ体代謝は NO 情報伝達経で極めて重要な地位を有するものであることが明確になった。従って、SNO-PEG-Hb は単なる血管収縮作用を持たない酸素運搬体ではなく、生理活性を有するニトロソ体と酸素を同時に運搬するキャリアーとしての意義が強調されよう。その生理学的意義に戻れば、SNO は NO と異なり、ヘムを標的とせずおもに SH を標的とする。SH 基が重要なレドックス制御を行う場合、SNO は様々な情報伝達系に影響しうることとなる。この可能性を検証するため、本研究の研究代表者に提案し、脳梗塞モデルへの応用研究を立案した。その成果は他の分担研究報告（分担研究者佐久間）の成果に反映された。本研究では、その他に SNO-PEG-Hb の製造と供給を担っており、その点でも SNO 体の代謝を考慮した安定製造法を検討した。

S-nitroso-PEG-Hb の生理学的意義とその作成に関する考察

A. 研究目的

一酸化窒素の生物学的な作用は、細胞防御、機能調節、細胞障害の3つの側面を有する。その多様な生理活性は、NO の化学形態に深く関連し、さらに様々な構成成分との化学的な反応または相互作用を通して

生成される派生物によって示される場合もあると考えられる。特に、近年ニトロソチオールチオールの生成、運搬、作用に関して新しい知見が集積しつつあり、その生物学的な意義の解明が急速に進められているところである。本研究では、その研究状況について、文献的に再度考察を行い S-nitroso-PEG-Hb (SNO-PEG-Hb)の意義について検討すると共に、その上で SNO-PEG-Hb による



酸素治療の戦略に関する考察を行うと共に、SNO-PEG-Hb の製法について検討を行った。

#### B. S-nitroso 体の生理学的意義に関する研究

一酸化窒素には 3 つのレドックス種があり、いわゆる NO である NO ラジカル（以降、NO と記載した場合には NO ラジカルを指す）、ニトロソニウム (NO<sup>+</sup>)、ニトロシルが存在する。NO は不対電子を 1 個有するフリーラジカルである。このうち、生理学的には NO ラジカルと、NO が酸化されて生ずるニトロソニウムイオンが生体内で存在するため、生物学的にも重要な化学種となる。

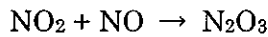
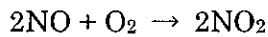
ラジカルは一般的に化学的に不安定で高反応性であるが、NO ラジカルは比較的安定で反応性も低い。一方、反応の対象が高反応性であるラジカルや金属イオンの場合には、NO は特異的に高い反応性を示す。従って、生体内における NO の全ての生理作用は、金属イオンまたはラジカルとの反応から開始されると言っても過言ではないとされている(1)。実際に、NO は金属イオンとの親和性が高く、マンガン、鉄、コバルト、銅、モリブデンなどの生体微量金属イオンおよびそれらを含む蛋白質・酵素に対しニトロシル配位子として速やかに結合し（ニトロシル化）、その機能を調節する。なかでもヘム鉄を含む可溶性グアニル酸シクラーゼは NO によって活性化され cGMP の生合成に寄与する。Hb 系酸素運搬体の副作用である血管収縮は、Hb のヘム鉄がニトロシル化され結果的に NO を消去するためと想定されている。以上は、本研究班

が創立された頃の、NO に関する主要な理解であり、故に SNO-PEG-Hb は NO を放出し、故にヘムが不活化され酸素運搬能をも奪う可能性が指摘されていた。しかし、実際には SNO-PEG-Hb は安定でありメト化は十分に抑制可能であった。従って、SNO-PEG-Hb に保持される NO 代謝物は NO を発生させず、にもかかわらず NO 様の作用を有する、という一見矛盾した現象が確認されることとなった。この疑問点は、以下のニトロソチオールに関する発見によって氷解した。

まず、NO<sup>+</sup>は通常は強酸性条件下でのみ安定的に存在し、生体内では NO<sup>+</sup>供与体が求核試薬をニトロソ化する場合に生成する。生体内での主な求核試薬はグルタチオンやメタロチオネインと推測される。特にグルタチオンの細胞内濃度を考慮すると、通常の求核試薬はほとんどがグルタチオンと推測される。この NO<sup>+</sup>は生体内半減期が長く、化学反応性も低く、主な標的分子はチオールを有する SH 分子である。グルタチオンがニトロソ化されたものがニトロソグルタチオンであり、本研究で用いる SNO-PEG-Hb の製造に際しても、合成ニトロソグルタチオンを NO<sup>+</sup>ドナーとして使用している。

この NO<sup>+</sup>の生理学的な供給源であるが、生体内 NO は、上記で述べたように酸素分子、スーパーオキシド、脂質ペルオキシラジカルなどのラジカルと速やかに特異的に反応する。このうち、生体内に豊富に存在する酸素（3 重項状態のラジカル）による NO 酸化反応は、NO の寿命や拡散距離に大きく影響する主要な反応経路を提供すると考えられ、反応は次式のように進行する

という。



この三酸化二窒素は NO+を供与することができる強力なニトロソ化試薬であり、この中間生成物が生体内チオールのニトロソ化反応の主役と考えられている。ただし、三酸化二窒素は水溶液中で急速に加水分解反応を引き起こし亜硝酸イオンに酸化される（疎水環境中では安定であるという）。従って、細胞質内では比較的高濃度に存在するグルタチオンなどがニトロソ化の求核試薬になると推測されている理由の1つでもある。また、このニトロソグルタチオンなどの低分子ニトロソチオールの生成には、銅イオンが関与することが示され、さらに銅を豊富に内包するセルロプラスミンが存在すると効率よくニトロソ化反応が進行することも示されている(2)。細胞内における銅イオンの利用性などについては、まだ十分な機構の解明は為されていないようである。

さて、NO と NO+の違いは何であろうか？前者はラジカルと金属イオンが主な標的である。一方、NO+の標的はチオールと考えられ、チオールの酸化還元を介したレドックス制御に関与し生物学的な機能を演ずることが示唆されている。さらに前者は生物学的な半減期が極めて短い、後者は半減期が長く、またタンパク質の SH 基に転移したニトロソ体の半減期はさらに長い。ここ数年、このようなニトロソ体の機能に関心が多く寄せられた。

Fig. 1 に NO と NO+について比較を試みた。

タンパク質のニトロソ化に伴うレドック

ス制御に関しては、多くの知見が集積している。その総説的な記述は割愛するが、特に注目される点は、ニトロソ体から放出された NOx による抗炎症性作用である。例えば、 $\alpha$ 1-protease inhibitor (PI) をニトロソ化し実験的な肝の虚血性再灌流障害の際に投与すると、細胞内逸脱酵素の放出を顕著に緩和する(3)。この PI は血漿中に比較的大量に存在するセリンプロテアーゼであるが、その存在意義は未だ明確ではなかった。この報告は、肝臓で生合成される PI が炎症性部位に運ばれ、そこでニトロソ化を効率よく受け（アルブミンの SH 基よりもはるかに高効率でニトロソ化される）、その後新たに抗炎症性作用を獲得する、という実験事実を示すものである。すなわち、ニトロソ化 PI がどのような機構で抗炎症性作用を有するかはまだ明確ではないが、一酸化窒素の生物学的作用を論じる上で、NOではなく NO+として作用するという、新しい可能性を提示した意義は大きい。実際に我々も PEG-Hb と SNO-PEG-Hb による急性毒性を比較し、後者で顕著に侵襲性が低いことを確認し、昨年度の報告書で述べた通りである（この成果は付録の別刷りによっても示す）。

このニトロソ体の生物学的意義を論じる上で、最大の課題はイオンであるニトロソチオールが細胞膜をどのように通過するか、という課題であった。NO はガス状メディエーターであり容易に細胞膜を通過するが、ニトロソチオールは自由に透過し得ない。ニトロソ体が生物学的作用を有するにはなんらかの能動的な輸送系が必須であり、その輸送系の存在が予見されていた。この点については、2000年以降2つの論文が発表

され、それぞれ細胞膜に存在する Cell-surface Protein Disulfide Isomerase (4)、*L*Amino Acid Transporter (5)がニトロソ体の能動輸送に関わるという仮説が提出された (Fig. 2)。前者は、細胞膜上でニトロソチオールが変換されて NO になり、酸素によって酸化されて三酸化二窒素が生成、膜内は疎水性環境であるために三酸化二窒素の半減期が長く、細胞内でのニトロソチオール生成に有効に利用される、という仮説である。後者は、アミノ酸輸送タンパク質のチャネルをニトロソシステインなら通過できることを利用し、細胞内外で他のニトロソ体からニトロソシステインに変換されその後細胞内に取り込まれ再びニトロソ体に変換されるという仮説である。

次に、ニトロソ体の輸送系が存在するならば、その細胞内濃度を調節する代謝系が必須となる。この酵素も GSH-dependent formaldehyde dehydrogenase としてごく最近になって同定された(6)。NADH と GSH 依存性にニトロソグルタチオンをアンモニアまで分解する反応を触媒し、機能からはニトロソグルタチオン還元酵素であることが示されている。以上から輸送系、代謝系が存在することが証明され、その細胞内濃度を能動的に制御しうる可能性が強く示唆された。ニトロソ体が SH 基のレドックス制御に積極的に関わる上での条件が揃いつつあるといえよう。NO の生成からニトロソ体への変換とその代謝への流を Fig. 3 にまとめた。ここで図中 RSNO は高分子蛋白質に結合したニトロソ体であり、高寿命であり NO<sup>+</sup>のリザーバーとして機能する一方で、細胞外で挙動しキャリアーとして作用すると推測される。生物活性を

示すためには、ニトロソグルタチオンなど再び低分子ニトロソ体に変換されることが必要と推測される。また細胞内に取り込まれるには、前述の酵素やチャネルが利用され、細胞内での過剰なニトロソ体は代謝されることが示された。

### C. 臨床応用を想定した検討

このニトロソチオールの最大の標的分子は SH 基である。例えば、細胞内情報伝達系で重要な役割を担う Nf-kB は分子内の p50 の SH 基のニトロソ化を受けてその転写活性が抑制される(7)。また、前述のように、ニトロソ化 PI は再灌流障害に際しその障害の程度を軽減する。その抗炎症性作用の1つの機序として、なんらかの転写因子の抑制や、細胞内酵素のレドックス制御の可能性が示唆されよう。

すでに我々は心筋虚血時に SNO-PEG-Hb を灌流し、心機能が顕著に回復することを示した。血管内から与えるニトロソ体は、血管内皮などの細胞内に取り込まれ、そこでなんらかの作用を示す可能性が示唆される結果である。SNO-PEG-Hb によるこの抗炎症性作用に関する可能性を検証するため、1つの提案として脳梗塞モデルにおける再灌流障害の回避を意図した使用が想定された。この検証作業は現在も他の分担研究施設にて実施中であり、現在までにかなり有望な結果が出され本報告書にも提出されるが(研究分担者佐久間)、その総合的な報告は次年度になるものと推測される。

現在までに多くの酸素運搬体が開発され、臨床応用を想定した使用法が試みられている。しかしながら、酸素運搬体の最大の欠

点は、実は血中半減期が極めて短い点にある。非細胞性 Hb 修飾体の場合、PEG 修飾を行っても半減期は 24 時間程度であり、赤血球の半減期には遠く及ばない。そのため、貧血の治療には向かず、最終的には輸血が必要であり輸血代替を必ずしも満足するものではない。一方で、非細胞性 Hb は粘性や扱い易さから、酸素運搬能を利用した酸素治療への応用が期待されている。

SNO-PEG-Hb の場合、酸素運搬に加えニトロソチオールの運搬が可能であり、その付加価値を酸素治療に応用することが期待される。副作用の回避を含め、より少量の使用で、明確な利益が得られる適応病態を探ることが必須であり、酸素治療の視点が重要と考えられた。

#### D. S-nitroso 体の製造に関する検討

SNO-PEG-Hb の安定製造において、最大の課題は Hb のメト化と、またメト化を極力回避するために反応中の Hb 濃度を希釈することが経験的に必須で、そのために製造系が巨大化する事が上げられる。故に、製造工程の最大の目標は、ニトロソグルタチオンから Hb への NO<sup>+</sup>の特異的で安定的な転移を保証することにある。

この点について、上記の研究から、蛋白質 SH への NO 転移に際して遊離グルタチオンが共存した場合、NO<sup>+</sup>のなんらかの転移が連鎖的に発生し、その過程で生成した NO に起因する Hb のメト化が危惧された。Hb 溶液は赤血球溶血液由来であり、赤血球由来のグルタチオンを含有する可能性があるためであり、この点を検証するため、SNO-PEG-Hb 作成に先立ち、Hb 溶液を透析した場合と、透析せずそのまま修飾作業

を行った場合で、メト化率を比較した。その結果、メト化は透析した場合に 8.3%、透析を行わなかった場合で 8.0%であり、本質的な差は認められなかった。従って、透析膜で除外しうる液性因子は Hb のメト化には関与しないことが示唆された。

次に、微量の銅イオンの存在が NO 転移に有利になる可能性が示唆され、特にセルロプラスミンといった銅イオン結合蛋白質の応用が示唆された。そこで、SNO-PEG-Hb 製造に際し、セルロプラスミンや銅メタロチオネインなどの因子を添加し、同様に比較を行ったが、今のところ際だった改善は認められていない。

この研究の中における分担研究者の第 1 義的な任務は SNO-PEG-Hb の製造であり、必要量を適宜製造して、共同研究者施設または外部に供給する作業を分担してきた。その製造法の改良を追求しているものの、現在までにその抜本的な解決には到っていない。将来、SNO-PEG-Hb の量産化が必要になった際には、新たな検討が必要となる。

#### E. 結論

SNO-PEG-Hb の生理学的な作用を再検討し、その結論に立脚して脳梗塞モデルにおける酸素治療への応用を研究班に提案した。その成果が出つつあり、有望な結果であった。また製法の簡略化、効率化にも応用を考え取り組んだが、その分野では抜本的な進展は見出されなかった。今後とも製剤の供給を担当しつつ、適応病態の模索や臨床研究への発展を意図した貢献を模索したい。

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* 24:322-328, 2001.
2. Nakai K, Sakuma I, Togashi H, Yoshioka M, Satoh H, Kitabatake A: S-Nitrosylated polyethylene glycol-conjugated hemoglobin derivative as a candidate material for oxygen therapeutics. In: Maeda H, editor. *Polymer drugs in the clinical stage: Advantages and prospects*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002 in press
3. 佐久間一郎, 仲井邦彦, 菅原武, 佐藤洋, 北島頭. s-ニトロソヘモグロビンの基礎と臨床. *THE LUNG perspectives* 9:191-194, 2001.
4. 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、北島 頭：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
5. 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 頭、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

2. 学会発表

1. 菅原 武、佐久間一郎、仲井邦彦、富樫広子、藤井 聡、藤井ひとみ、吉岡充宏、佐藤 洋、劔物 修、北島 頭：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、北島頭：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. 仲井邦彦、富樫広子、佐久間一郎、菅原 武、吉岡充弘、佐藤 洋、北島頭：S-nitro-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
4. 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 頭：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
5. 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、北島 頭：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. 大阪

G. 知的所有権の取得状況なし

#### 図説明

Fig. 1. NO と NO<sup>+</sup>の化学的性質の比較

Fig. 2. 細胞外からニトロソチオールを細胞内に能動輸送するためのシステム

Fig. 3. ニトロソチオールの代謝経路—NO から NO<sup>+</sup>に到る流れ

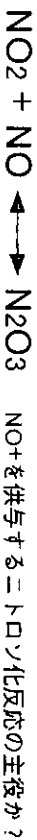
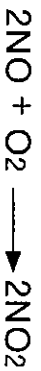
#### 参考文献

1. 吉村哲彦. 生体内 NO のレドックス種の反応と活性—最近の進歩. In: 吉川敏一, editor. 酸化ストレス—フリーラジカル医学生物学の最前線. 東京: 医歯薬出版; 2001.p.149-152.
2. Inoue K, Akaike T, Miyamoto Y, Okamoto T, Sawa T, Otagiri M, et al.: Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. *J Biol Chem* 1999;274:27069-27075.
3. Ikebe N, Akaike T, Miyamoto Y, Hayashida K, Yoshitake J, Ogawa M, et al. Protective effect of s-nitrosylated a1-protease inhibitor on hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295:904-911.
4. Ramachandran N, Root P, Jiang XM, Hogg PJ, Mutus B.: Mechanism of transfer of NO from extracellular s-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;97:9539-9544.
5. Li X, Rose G, Dongre N, Pan H-L, Tobin JR, Eisenach JC: S-nitroso-l-cysteine releases norepinephrine in rat spinal synaptosomes. *Brain Res* 2000;872:301-307.
6. Liu L, Hausladen A, Zeng M, Que L, Heitman J, Stamler JS: A metabolic enzyme for s-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* 2001;410:490-494.
7. Marshall HE, Stamler JS. Inhibition of NF- $\kappa$ B by s-nitrosylation. *Biochemistry* 2001;40:1688-1693.

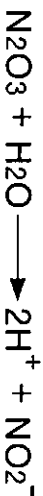
## NO

ラジカル一般：化学的に不安定で高反応性

NOラジカル：比較的安定で反応性も低い。金属イオンやラジカルなど高反応性物質とは特異的で高い反応性を示す。ただし、生体内でNO単独でひき起こす意味ある反応はグアニル酸シクラーゼの活性化など遷移元素との反応に限定。

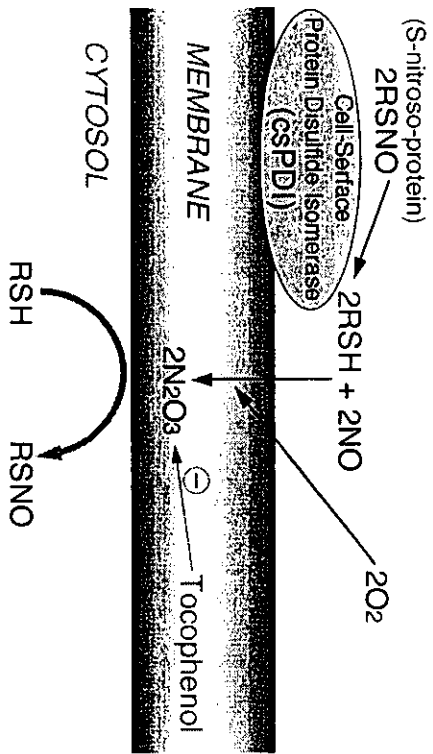


水溶液中では速やかに以下の反応で代謝される

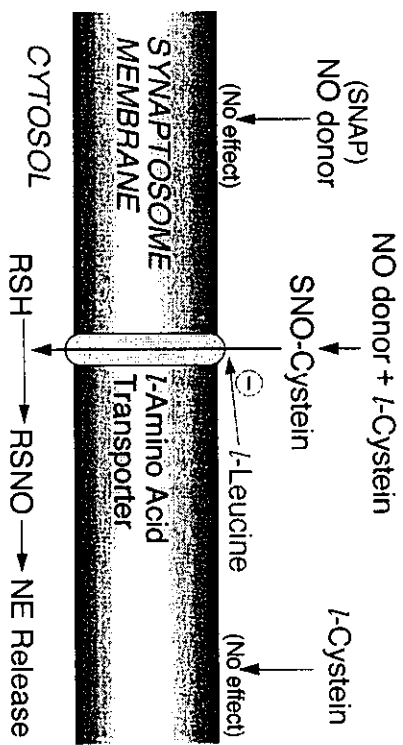


## NO+

- ・化学的には強酸条件でのみ生成
- ・生理的にはNO+ドナーが求核試薬をニトロソ化する場合に生成
- ・水溶液中でN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>が不安定であり、高濃度のGSHのみが生理的な求核試薬か？
- ・疎水性環境では安定で、膜タンパク質などがニトロソ化されやすい。ただしビタミンEが消去剤として作用する
- ・RSNOからのNO放出は未確定、
- ・機能タンパク質のニトロソ化による構造変化が機能調節となる (新しい機能調節機構)



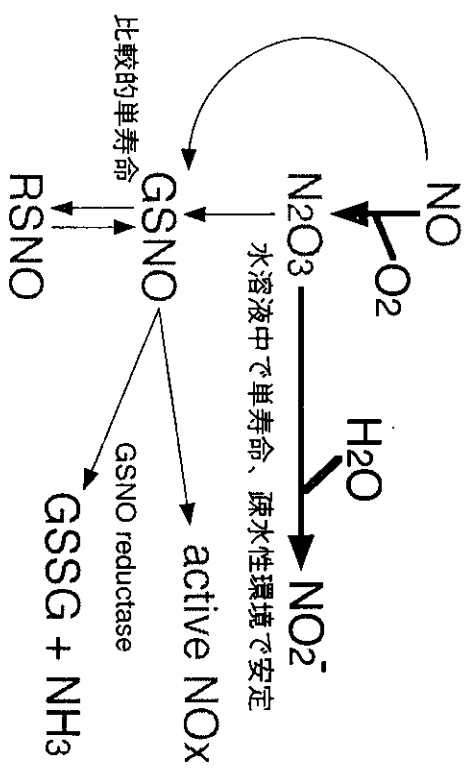
Ramachandran et al., PNAS 98:9539, 2001.



X. Li et al., Brain Res 872:301, 2000.

Fig. 2 細胞外から能動的に細胞内にRSNOを輸送する系の存在⇒RSNOはもっと重要な機能を有していると期待できる





高寿命で安定、ヘムとの親和性なし  
 Endogenous NO reservoirとしての期待と  
 NOの有するAntioxidant作用を引き継ぐ

Fig. 3

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 脳死肝移植では、donor 肝輸送時の肝細胞保護および再灌流時の肝細胞障害が問題となる。肝臓は 4℃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、その間に人工酸素運搬体により酸素を供給することは、donor 肝輸送時の肝細胞保護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℃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。本年度は新規に設計された PFC 製剤（FC43）を使用し、実際の肝移植時をシュミレートした低温下条件において、5%PFC 製剤を混合した臓器保護液が、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よる障害から肝細胞を保護するか否かを検索した。結果として、再灌流後門脈流量、胆汁排出量、LDH、AST、ALT 放出量、酸素消費量および乳酸排出量に関し、PFC 添加群と非添加群間で有意差は認められなかった。5%PFC 製剤では酸素溶解度がコントロールの 50%増となるのみであり、今後 PFC 濃度を増加させて効果を検索する必要があると考えられた。

ラット単離肝灌流モデルを用いたパーフルオロケミカル製剤（FC-43）による肝保護作用の検討

A. 研究目的

脳死臓器移植がわが国でも行われるようになり、脳死肝移植についても今後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℃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℃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℃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。ただし、PFC 製剤は親油性の PFC をエマルジョンに溶解したものであり、エマルジョンの種類によっては保護液中の 2 価イオンと反応して凝集や融合を起こす可能性があり、製剤の設計が重要となる。また、凝集塊が形成された場合には、毛細管での栓塞が問題となる可能性がある。

本研究班では 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、昨年度ラット単離肝虚血再灌流モデルを用いて非低温条件下で実験を行い、ある程度の成果が得られたが、その際栓塞形成が問題となった。今年度は、新規 PFC 製剤を再設計し、実際の肝移植時をシュミレートした低温下条件において、PFC 製剤を混合した臓器灌流液が、灌流停止放置状態の摘出肝臓に酸素を供給することより、灌流停止および虚血再灌流に基づく種々のストレスによる障害から肝細胞を保護するか否かを検索した。

## B. 研究方法

飲水と食餌を自由に与えた雄性 Lewis ラット（体重 190~240 g）を実験に供した。ペントバルビタール（50 mg/kg）を腹腔内投与後、ヘパリン 1000IU を陰茎背静脈より投与した。腹部横切開により腹膜内に到達し、総胆管にポリエチレンチューブ（Clay Adams, PE10）を挿入し、次いで、門脈に 14G ETFE チューブ（Terumo, SURFRO）を挿入した。その後直ちに灌流回路と ETFE チューブを連結し、肝臓を 30 ml の氷冷 Lactate Ringer 液にて、初期圧 10 cmH<sub>2</sub>O 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とプラスチック製の外とうで囲まれている。次いで、氷冷 UW 液もしくは PFC 製剤添加 UW 液で門脈から肝臓を灌流した後、30 ml の同液で満たした状態で、4℃にて 24 時間静置された。その後、30 ml の氷冷 Lactate Ringer 液も用い初期圧 20 cmH<sub>2</sub>O にて wash out し、再灌流装置に接続した。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り、ハミルトン酸素化装置、門脈圧測定用圧測定装置およびリザーバーはサーモスタットにより制御された恒温キャビネットの中に設置された。ハミルトン酸素化装置には常に 95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> ガスが吹き込まれた。単離肝臓の再灌流は 37℃条件下で、2%BSA を添加した Krebs-Henseleit 液に 30 μl/hr でタウロコール酸を加えて行い、コンピューターにより、門脈圧が常に 5 cmH<sub>2</sub>O となるように制御した。単離肝臓はレザバーの上に静置し、120 分間再灌流された。

PFC 製剤は本研究班研究協力者の神戸学院大学薬学部薬効学福島昭二助教授より供給されたもので、パーフルオロカーボン（FC-43）50 g に界面活性剤として HCO-60 を 2.5 g を加え、注射用水 73.3 g およびグルコース 5 g を添加して全量 100 ml（PFC: 50% w/v）とした製剤であり、平均粒子径は 166.5 nm であった。調製法としては、注射用水にグルコースと HCO-60 を溶解させた後、パーフルオロカーボンを、高压ジェット流型乳化機で乳化した。乳化は、まずデュアルフィード法にて粗乳化した後、背圧

制御システムを組み込んで本乳化した。

PFC 製剤は使用前に UW 液に 10% (1 : 9) で混合し、PFC 濃度としては 5% に調整して使用した。

本研究では再灌流までの処置を以下の 2 群に分けて行った (n=4)。PFC 非添加群 : UW 液のみで PFC を添加しなかった群、PFC 添加群 : PFC を UW 液に 5% 添加して肝臓を灌流した群。なお、PFC を 5% 添加した状態では、溶液中の酸素溶解量は非添加時の約 50% 増となると計算される。

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

#### 倫理面の配慮

実験に際しては、実験計画を北海道大学医学部動物実験委員会に提出し、認可を受けた後に施行した。

#### C. 研究結果

再灌流後門脈流量は徐々に増加し、60 分後には定常状態となり、PFC 添加群で非添加群に比し、やや低下傾向となったものの両群間で有意差は認められなかった。胆汁排出は、PFC 添加群で非添加群に比し、やや低下していたが両群間で有意差は認めら

れなかった。LDH、AST、ALT 放出量は、時間経過とともに増加したが、PFC 添加群で非添加群に比し、やや増加していたものの、両群間で有意差は認められなかった。酸素消費量は、溶液 1 ml あたり PFC 非添加群で 0.00547 ml、PFC 添加群で 0.00887 ml と計算された。乳酸排出量は PFC 添加群で非添加群に比し、やや低下傾向を認めたが、両群間で有意差は認められなかった。

#### D. 考察

本研究の結果より、低温下において本研究で用いた 50%PFC 製剤を 5% 添加し、それを非酸素化条件で UW 液に静置した状態では、乳酸産生が低下傾向にあったものの、灌流停止による虚血および再灌流に基づく種々のストレスに起因する障害から、肝細胞を明確に保護するとの結論は得られなかった。本モデルは冷粗血モデルであるが、これは実際の生体肝移植において肝臓を 4°C で保存することから、臨床をシュミレートした実験と考えられる。通常の臨床では単離後 12 時間以内に移植を行うが、本実験では 24 時間静置しており、障害がある程度起こるので保護薬の有効性を検索するには適した方法である。

本実験で、PFC 製剤の有効性が確認されなかった原因としては、まず添加濃度が 5% と低く、十分に酸素溶解量を上昇出来なかった点が挙げられる。今後、10%、15% と PFC 濃度を上昇させ、保護効果を検索する必要があると思われる。ただし、濃度上昇に伴い、栓塞発生の危険上昇や細胞障害増加の可能性があるので、より毒性が低いレンチンを用い、酸素溶解度の高い PFC を使用するべきと思われる。これらの実験は、