

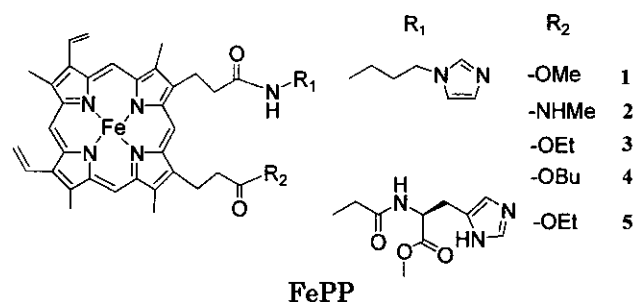
散しているため、血漿の粘度を増大させ、微少血管系では灌流圧が高くなり、低濃度の方が良い可能性があること、などが考えられる。今後更に詳細を検討する必要がある。

## 6. 近位塩基を有するプロトヘム誘導体の合成とアルブミン複合体の酸素結合反応

### A. 目的

代謝経路を考慮して近位塩基を有するプロトヘム誘導体(FePP)を分子設計・精密合成し、それらをヒト血清アルブミン(rHSA)に包接させた新しいアルブミン-プロトヘム複合体(rHSA-FePP)を調製、より安定な酸素錯体を形成できるヘム構造を明らかにすることを目的とした。

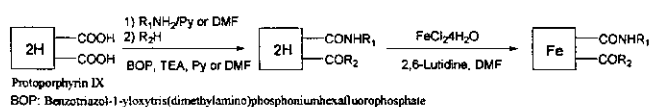
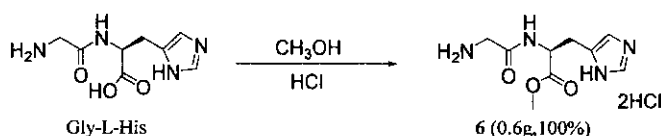
具体的には、軸塩基としてイミダゾリルプロピルアミノ基、あるいはO-メチル-L-ヒスチジルグリシル基を導入したFePP 1~5を合成し、DMF中における酸素配位を観測するとともに、rHSA複合体の酸素配位能について検討した。



### B. 方法

#### 1) 合成

FePP 1~5は以下のスキームに従い合成した。



Protoporphyrin IX  
BOP: Benzotriazol-1-yl-oxytris(dimethylamino)phosphoniumhexafluorophosphate

#### 2) DMF中における酸素錯体の生成

Arで脱気したFePP 1, 2, 3, 5 (Fe(III)体)のDMF溶液(20 μM)中へ亜二チオン酸ナトリウム-クラウンエーテル錯体のメタノール溶液を添加し、中心鉄をFe(II)に還元、deoxy体を得た。そこへ酸素を吹き込むことによりoxy体、さらに一酸化炭素を通気することによりcarbonyl体を得た。

#### 3) 酸素親和性測定

3, 5のDMF溶液について、異なる酸素分圧に対するUV-vis.スペクトル変化から、Drago式を用いて酸素親和性( $P_{1/2}$ )を決定した。

#### 4) rHSA-FePP複合体の調製

rHSAのリン酸緩衝水溶液([rHSA]=20 μM, pH7.3)に、Ar雰囲気下でFePP(CO)錯体のEtOH溶液を加え、rHSA-FePP(CO)錯体([FePP]=20 μM)を得た。光照射(500W ハロゲンランプ)によりCOを解離させた後、O<sub>2</sub>を通気し酸素錯体を得た。

#### 5) rHSA-FePP複合体の酸素配位能測定

上記3と同様にしてrHSA-1, -3, -5リン酸緩衝水溶液の酸素親和性を決定した。またUV-vis.スペクトルにおける酸素錯体吸収の経時変化から、酸素錯体半減期( $t_{1/2}$ )(25°C)を決定した。

### C. 結果および考察

#### 1) 合成

グリシル-L-ヒスチジンのC末端をメチルエステルとして、化合物6を合成した。FePP 1~5のフリーベース体は、BOPを縮合剤として一段階で合成できた。5の場合、イミダゾール環NHを保護しなくとも選択的にアミノ基末端が反応し、目的化合物が得られた。反応終了後、反応溶液(PyまたはDMF溶液)を水中に滴下し、析出したポルフィリンを遠心分離する方法により、従来のクロロホルムを用いた抽出操作に比べ、短時間で高効率で、目的物を単離できるようになった(収率は15%から30%に上昇)。FeCl<sub>2</sub>を用いて中心鉄を導入して、1~5のFe<sup>3+</sup>錯体を得た。2は1に比べ極性が高く、メタノール、エタノールに対する溶解性は増大し

た。疎水性の高い **4** の合成も試みたが、ブチルエステル体の形成は認められなかった。

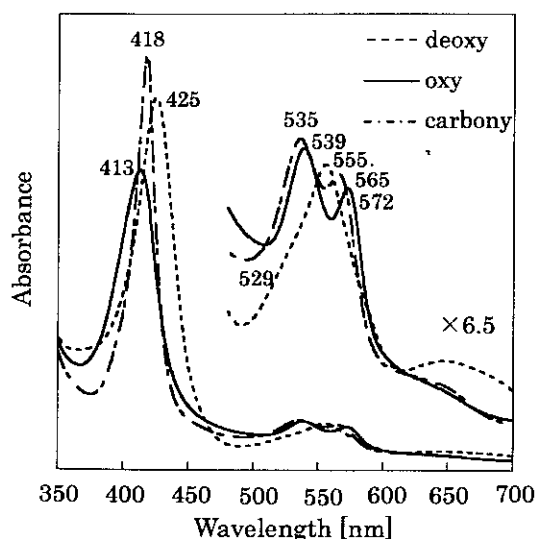
## 2) DMF 中における酸素錯体の生成と酸素親和性

Ar 雰囲気下における FePP **1**, **2**, **3**, **5** の UV-vis. スペクトルは Fe(II)5 配位高スピン錯体の形成を示し、軸塩基部位の分子内配位が明らかとなった。そこへ酸素を通気すると、スペクトルは速やかに酸素錯体型へ移行し、酸素結合解離は可逆的であった。FePP **2**, **3**, **5** の deoxy, oxy, carbonyl 体の  $\lambda_{\max}$  は **1** (chelated heme) の値と同等であり (表 8)、プロピオン酸残基 R<sub>2</sub> の構造変化や、イミダゾリル基からヒスチジル基の変換による酸素錯体への電子的効果はないと考えられる。

**Table 8** Absorption maxima ( $\lambda_{\max}$ ) of FePP **1**, **2**, **3**, and **5**.

| Compounds             | deoxy [nm]    | oxy [nm]      | carbonyl [nm] |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>1</b> (25°C)       | 424, 532, 559 | 412, 542, 575 | 420, 539, 567 |
| <b>1</b> (15°C)*      | 427, 530, 558 | 414, 543, 575 | 420, 540, 569 |
| <b>2</b> (25°C)       | 426, 537, 559 | 415, 543, 575 | 420, 539, 567 |
| <b>3</b> (25°C)       | 421, 533, 557 | 409, 539, 571 | 418, 537, 565 |
| <b>3</b> (5°C)        | 423, 529, 557 | 413, 539, 572 | 418, 536, 564 |
| <b>5</b> (25°C)       | 423, 533, 555 | 408, 540, 575 | 419, 537, 568 |
| <b>5</b> (5°C)        | 425, 529, 555 | 413, 539, 572 | 418, 535, 565 |
| rHSA- <b>1</b> (25°C) | 420, 536, 561 | 414, 540, 567 | 419, 541, 566 |
| rHSA- <b>3</b> (25°C) | 420, 540, 561 | 416, 538, 567 | 421, 543, 567 |
| rHSA- <b>5</b> (25°C) | 422, 539, 561 | 418, 540, 571 | 422, 541, 569 |

\*DMF/H<sub>2</sub>O=7/3, T.G.Traylor et al., JACS, 1979, 101, 6716.



**Fig. 21** UV-vis. absorption changes of **5** in DMF at 25 °C.

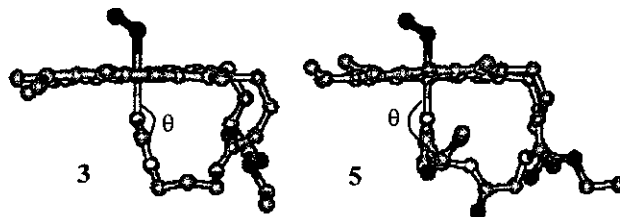
5°Cにて測定を行ったところ、UV-vis. スペクトルのパターンは 25°Cの時に比べ、より明確となった (図 21)。

異なる酸素分圧に対する吸収スペクトル変化から FePP **3**, **5** の酸素親和性( $P_{1/2}$ )を各々0.3、0.2 Torr と決定した(表 9)。ヒスチジンの pKa(6.0)はアセトアミドプロピルイミダゾールの値(6.6)に比べて低い、**5** の酸素親和性は **3** と比較してやや高い。これは、イミダゾール環とピロールβ位間の Spacer 一部の構造の違いによるものと考えられる。分子シミュレーションにより見積もった **3** におけるイミダゾール環の配位角度( $\theta$ )は 160°と小さく、**5** (173°)に比べて歪んでいることが示唆された(図 22)。

**Table 9** O<sub>2</sub>-binding affinities of **1**, **3** and **5** in DMF at 25°C.

| FePP     | $P_{1/2}$ (Torr) |
|----------|------------------|
| <b>1</b> | 0.3*             |
| <b>3</b> | 0.3              |
| <b>5</b> | 0.2              |

\*DMF, T.G.Traylor et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1982, 11, 117.



**Fig. 22** Molecular simulation of **3** and **5** in DMF.

## 3) rHSA-FePP 複合体の酸素配位能

Ar 雰囲気下における rHSA-**1**, -**3**, -**5** の UV-vis. スペクトルは、Fe(II)6 配位低スピン型を示し (図 23)、アミノ酸残基が中心鉄に配位していると考えられる。そこへ酸素を通気すると速やかに酸素錯体が形成された。各複合体の deoxy 体、oxy 体、carbonyl 体のスペクトルパターン、 $\lambda_{\max}$  はほぼ一致した。**2** は極性が比較的高いため、rHSA に取り込まれにくかった。FePP を rHSA に包接させるには、適度な疎水性が必要と考えられる。

rHSA-**3**, -**5** の  $P_{1/2}$  はいずれも 0.1 Torr であった (表 10)。また、rHSA-**1**, -**3**, -**5** の半減期( $\tau_{1/2}$ 、

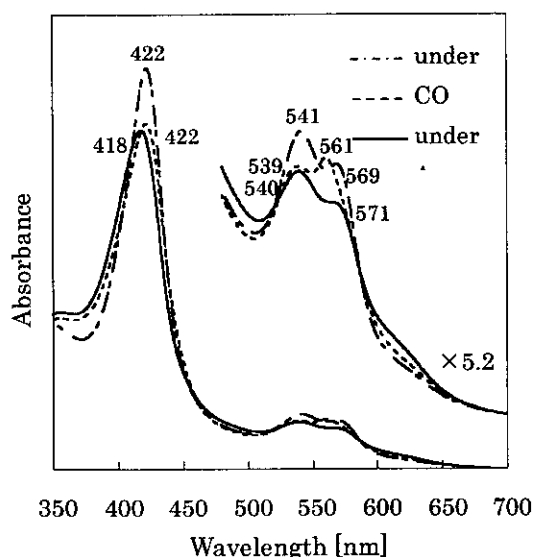
25°C)を、各々20、50、90minと決定した(表10)。R<sub>2</sub>の構造としてはメチル基よりエチル基の方が、また、軸塩基としてはヒスチジルグリシル基を導入した方が酸素錯体の安定度は増大することが分かった。

より疎水性の高いエチル基がFePPをrHSA内部に固定すること、また、上述したようにヒスチジル基の歪みがないことの2つがこの理由として推測される。

**Table 10** O<sub>2</sub>-binding affinities and half-life time of rHSA-1,- 3 and -5 in phosphate buffer (pH 7.3) at 25 °C.

| FePP | P <sub>1/2</sub> (Torr) | τ <sub>1/2</sub> (min) |
|------|-------------------------|------------------------|
| 1    | 1*                      | 20                     |
| 3    | 0.1                     | 50                     |
| 5    | 0.1                     | 90                     |

\*H<sub>2</sub>O/MTAB, T.G.Traylor et al., JACS, 1984, 106, 5132.



**Fig. 23** UV-vis. absorption changes of rHSA-5 in phosphate buffer (pH 7.3) at 5 °C.

### C. 結論

軸塩基としてイミダゾリルプロピルアミノ基、及び O-メチル-L-ヒスチジルグリシル基を有するプロトヘム誘導体(1、2、3、5)を合成、何れも DMF 中で酸素錯体を形成した。FePP 3、5 の P<sub>1/2</sub> は各々 0.3、0.2 Torr (25°C)と決定され、この違いは軸塩基配位子の配向角度の差に起因するものと考えら

れた。rHSA-1、-3、-5 は酸素錯体を形成(25°C)、O-メチル-L-ヒスチジルグリシル基を有するプロトヘム誘導体 5 を包接した系が、最も高い酸素錯体安定度(τ<sub>1/2</sub>: 90 min)を示した。

輸血代替としての酸素輸液を考慮した場合、更なる酸素錯体安定度の向上、P<sub>1/2</sub> 値の増大が必要となる。これは電子吸引基の導入など、ヘム構造の工夫・調節により可能となる。しかし、高酸素親和性アルブミン-ヘムは現時点でも腫瘍低酸素部位の酸素化などの適応には充分効果を発揮するものと考えている。

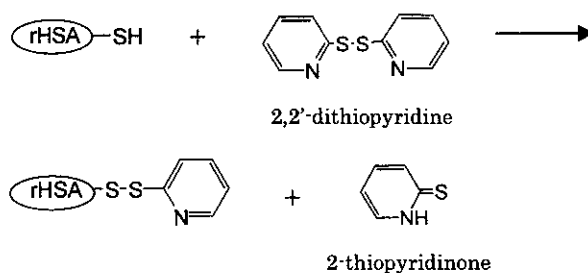
## 7. ヒト血清アルブミン二量体の物理化学的特徴と溶液物性

### A. 目的

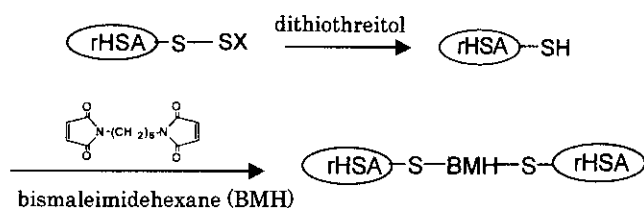
ヒト血清アルブミンの二量体に16分子のヘム誘導体を包接させたアルブミン-ヘム二量体水溶液は、コロイド浸透圧(COP)を生理的条件に保ちながら、ヒト血液を上回る量の酸素を運搬できる新しい酸素輸液として期待できる。本研究は、組換えヒト血清アルブミン(rHSA)二量体の効率高い合成法を確立するとともに、物理化学的特徴、及びCOEや溶液粘度を明らかにすることを目的とした。

### B. 方法

#### 1) アルブミン Cys<sup>34</sup>メルカプト分率の定量



## 2) アルブミン二量体の合成と精製



$\text{N}_2$  雰囲気下、DTT で前処理した rHSA 水溶液 (リン酸緩衝液 10 mM、pH 7.0) に BMH の EtOH 溶液を 30 分間隔で 3 分割して添加し、二量体を形成させた (BMH/rHSA=0.5 (mol/mol)、[EtOH]=15 vol%)。精製はゲルカラムクロマトグラフィー (Sephacryl S-200HR、展開溶媒: 生理塩リン酸緩衝液 (PBS、10 mM、pH 7.4)) により行った。rHSA 二量体の純度は、HPLC (Shodex Protein KW-803) により決定し、Native PAGE 電気泳動測定から分子量を確認した。

## 3) アルブミン二量体の構造と溶液物性

MALDI-TOF/MS (マトリックス: sinapinic acid) により分子量を測定。UV 吸収スペクトルにおける 280 nm の吸光度からモル吸光係数 ( $\epsilon_{280}$ ) を、CD スペクトルにおける 208 nm のモル楕円率から  $\alpha$ -ヘリックス含量を算出した。熱変性温度 ( $T_d$ ) は DSC 測定から決定。また、COP は 4420 Colloid Osmometer (WESCOR) を用いて測定し、溶液粘度はキャピラリー粘度計 (Anton PAAR DSC 300) を用いて 37 °C にて測定した。

## 4) アルブミン二量体と血球成分との相互作用

rHSA (5.0 wt%) 水溶液、rHSA 二量体 (8.5 wt%) 水溶液をそれぞれラット全血液と 1/1 (v/v) で混合し、光学顕微鏡観察から赤血球の形態変化を観測した。また、混合前後の赤血球、白血球、血小板の数を多項目自動血球計数装置 (Sysmex KX-21) により計測して比較した。

## C. 結果および考察

## 1) アルブミン Cys<sup>34</sup> の還元とメルカプト分率定量

アルブミン Cys<sup>34</sup> のメルカプト分率は、2,2'-dithiopyridine との反応により生成する 2-thiopyridinone (2TP) の定量値から決定できる。2TP のモル吸光係数 (343 nm) を  $8.1 \times 10^3$  ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) (PB、10 mM、pH 7.0) と算出、rHSA のメルカプト分率は 17 % と低かった。そこで小過剰 (3 倍モル) の dithiothreitol を添加し Cys<sup>34</sup> を還元、rHSA のメルカプト分率が 100 % になることを確認した。

## 2) アルブミン二量体の合成と精製

BMH による rHSA 架橋反応の収率は rHSA 濃度の増大とともに上昇し、15 wt% で 41 % に達した (図 24)。しかし、rHSA 濃度 20 wt% では 16% に低下し、これは BMH が反応溶液に溶解しなくなったためと考えられる。

BMH 添加量の増加 (1.0~2.5 倍モル量)、EtOH 溶液から DMSO 溶液への変換、反応時間の延長、また 50°C の加熱も試みたが、これ以上の収率の向上は認められなかった。

Sephacryl S-200HR のゲルカラムクロマトグラフィーを用いる精製により、rHSA 二量体を純度 98% (回収率 80%) で単離できた (図 24)。Native PAGE 電気泳動から、rHSA 二量体の分子量 (約 130 kDa) を確認した。

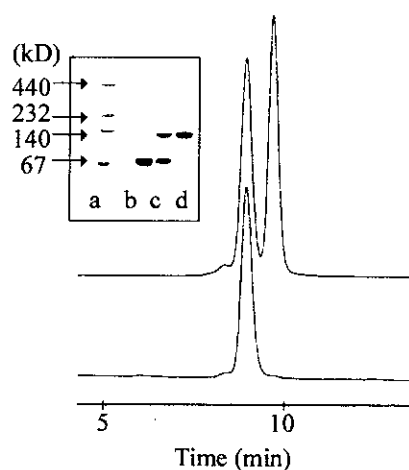


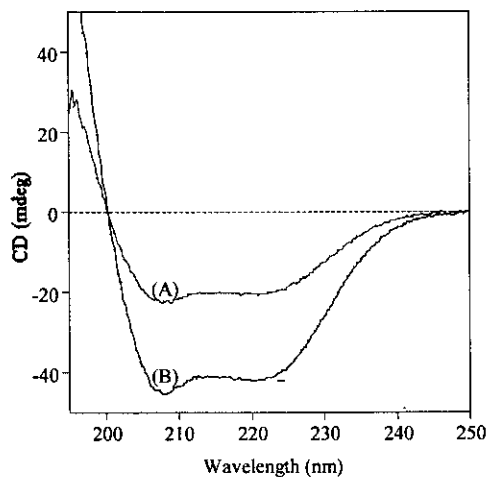
Fig. 24 HPLC elution curves and native-PAGE patterns of rHSA dimer. (a): markers, (b): rHSA, (c): mixture after the reaction, (d): purified rHSA dimer.

### 3) アルブミン二量体の構造

rHSA 二量体の MALDI-TOF/MS には、m/z 132,741 に明瞭な分子イオンピークが観測され、この値は計算値 (133,180 Da) とほぼ一致した (表 13)。また、rHSA 二量体のメルカプト分率は 0 % であり、Cys<sup>34</sup> の SH 基がすべて BMH と反応したことを示す。rHSA 二量体の  $\epsilon_{280}$  は rHSA の 2 倍、pI 値は 4.8 で rHSA と同等であった (表 11)。CD スペクトルは、208、222 nm に極小値を持つ負のスペクトルパターンを示し、その楕円率度は rHSA の 2 倍で、 $\alpha$ -ヘリックス含量 (53 %) は rHSA の値 (52 %) とほぼ一致した (図 25)。

**Table 11** Physicochemical parameters of rHSA dimer.

| parameters  | rHSA             | rHSA dimer        |
|---|------------------|-------------------|
| Mw (Da)   |                  |                   |
| obs. (MALDI-TOF/MS)   | 66,331           | 132,741           |
| (COP)   | $66 \times 10^3$ | $136 \times 10^3$ |
| calc.   | 66,451           | 133,180           |
| Cys <sup>34</sup> -SH (%)                                     | 17               | 0                 |
| pI  | 4.8              | 4.8               |
| $\epsilon_{280} (\times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1})$ | 3.4              | 6.8               |
| $\alpha$ -helix (%) (from CD spectra)                         | 52               | 53                |
| Td (°C)   | 63.1             | 64.8              |
| [( $\Delta H$ (kJ/mol))]                                      | [760]            | [1270]            |



**Fig. 25** CD spectra of (A) rHSA and (B) rHSA dimer ([rHSA], [rHSA dimer]=2.0  $\mu\text{M}$ ).

これらの結果から、rHSA の二次構造や表面電荷は架橋により変化しないことが明らかとなった。DSC 測定から決定した rHSA 二量体の  $T_d$  は 64.8 °C で rHSA とほぼ等しく、架橋による熱安定

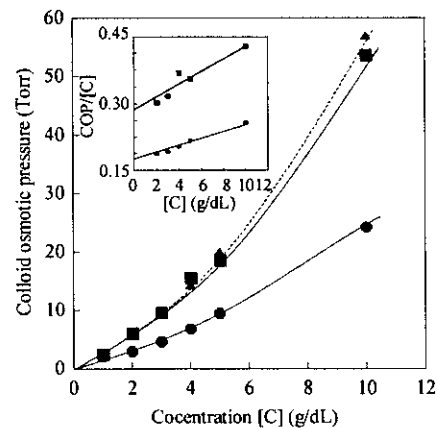
度の上昇はない。むしろ  $\Delta H$  は 1.7 倍増に留まり、ユニット当たりの熱安定性はやや低下したものと考えられる。

さらに、rHSA 二量体に対するワルファリン、ジアゼパムの結合定数は、各々  $9.2 \times 10^{10} (\text{M}^{-2})$ 、 $3.0 \times 10^{10} (\text{M}^{-2})$  で、分子結合能は rHSA 単量体と変わらないことがわかった。

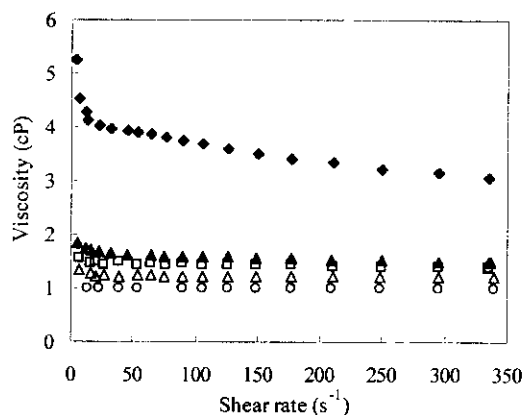
### 4) アルブミン二量体の溶液物性

rHSA 5.0 wt% 溶液の COP (19 Torr) と同じ値を有する rHSA 二量体溶液の濃度は、8.5 wt% であり、100 wt% ではなかった。これは rHSA 濃度が上昇すると、分子間の静電的反発力により COP 曲線が比例関係から逸脱するためである。また、[C] vs. COP/[C] プロットの y 切片から rHSA 二量体の分子量を約 136 kDa と算出でき、rHSA (66kDa) の 2 倍での計算値を一致した (図 26)。

rHSA 二量体 8.5 wt% 水溶液の粘度曲線はニュートン性を示し、ずり速度 230  $\text{s}^{-1}$  における粘度 (1.2 cP) は、rHSA 5.0 wt% や 8.5 wt% 水溶液 (1.0 cP) よりも高い値を示した (図 27)。異なる濃度の粘度測定から、rHSA 二量体の固有粘度 ( $[\eta]$ ) を 0.29 と決定した。ラット全血液と 1/1 (v/v) で混合した後も凝集や沈殿の惹起は認められず、混合溶液の粘度は 1.8 cP と低い値を維持した。



**Fig. 26** Colloid osmotic pressures of rHSA dimer (●), rHSA (■) and HSA (▲, ref. 1) (pH 7.4, 22 °C). Inset shows relationship between [C] and COP/[C]. ref. 1 G. Scatchard et al., *J. Clin. Invest.* **23**, 165-170 (1944)

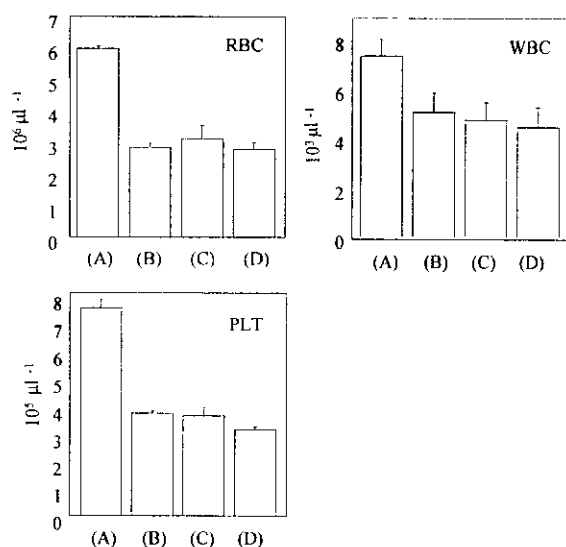


**Fig. 27** Change in the viscosity of rHSA dimer at various shear rates (◆: rat blood, ▲: mixture of rHSA dimer and blood (1/1, v/v), □: mixture of rHSA and blood (1/1, v/v), △: rHSA dimer 8.5 wt%, ○: rHSA 5.0 wt%).

### 5) アルブミン二量体と血球成分との相互作用

rHSA (5.0 wt%)、及び rHSA 二量体 (8.5 wt%) とラット全血液との混合溶液 (1/1, v/v) を光学顕微鏡により観察、混合 4 時間後 (37 °C) でも赤血球の形状 (表面の状態、直径 8 μm) に全く変化はなく、凝集や連鎖形成も見られなかった。

rHSA 二量体血液混合溶液の赤血球数、白血球数、血小板数はそれぞれ混合前の約 50% 減となり、生理食塩水血液混合溶液や rHSA 血液混合溶液の値とほぼ同等であった (図 28)。



**Fig. 28** Blood counts of RBC, WBC, and PLT. (A): rat whole blood, (B): mixture of saline and blood, (C): mixture of rHSA and blood, (D): mixture of rHSA dimer and blood.

### D. 結論

rHSA 二量体の効率高い合成法 (収率 41%)、精製法 (純度 98%) を確立した。rHSA の二次構造、表面電荷は二量体形成後も変化しなかった。rHSA 二量体の物理化学パラメーター、分子結合能を決定。rHSA 5.0 wt% 溶液と同じ COP を有する rHSA 二量体溶液の濃度は、8.5 wt% であった。rHSA 二量体を血液と混合した後も、凝集や沈殿の惹起は認められず、血球数にも変化はなかった。

### 8. 研究業績

#### A. 論文発表

- H. Sakai, Y. Masada, S. Takeoka, E. Tsuchida, "Characteristics of bovine hemoglobin for the potential source of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier.", *J. Biochem.* **131**, 611 - 617 (2002).
- I. Fukutomi, H. Sakai, S. Takeoka, H. Nishide, E. Tsuchida, K. Sakai, "Carbonylation of oxyhemoglobin solution using a membrane oxygenator.", *J. Artif. Organs* **5**, 102-107 (2002).
- 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* **5**, 141-145 (2002).
- T. Komatsu, Y. Matsukawa, E. Tsuchida, "Effect of Heme Structure on O<sub>2</sub>-Binding Properties of Human Serum Albumin-Heme Hybrids: Intramolecular Histidine Coordination Provides a Stable O<sub>2</sub>-Adduct Complex", *Bioconjugate Chem.*, **13**, 397-402 (2002).
- H. Sakai, T. Sato, Y. Maekawa, E. Tsuchida, "Capillary blood flow during severe hemodilution observed by non-invasive transcutaneous technique using a flash epi-illumination.", *Microvasc. Res.*,

- 64, 120-126 (2002).
6. E. Tsuchida, T. Komatsu, Y. Matsukawa, T. Okada, "Human Serum Albumin Incorporating Synthetic Hemes as an O<sub>2</sub>-Carrying Hemoprotein: Control of O<sub>2</sub>-Binding Ability by Heme Structure", *Macromol. Symp.*, **186**, 1–6 (2002).
  7. H. Sakai, S. Takeoka, R. Wettstein, A.G. Tsai, M. Intaglietta, E. Tsuchida, "Systemic and Microvascular responses to the hemorrhagic shock and resuscitation with Hb-vesicles", *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283**, H1191-H1199 (2002).
  8. S. Takeoka, Y. Teramura, T. Atoji, E. Tsuchida, "Effect of Hb-encapsulation with vesicles on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaction and lipid peroxidation.", *Bioconjugate Chem.*, **13**, 1302–1308 (2002).
  9. E. Tsuchida, T. Komatsu, T. Yanagimoto, H. Sakai, "Preservation Stability and *in vivo* Administration of Albumin-heme Hybrid Solution as an Entirely Synthetic O<sub>2</sub>-Carrier", *Polym. Adv. Technol.*, **13**, 845–850 (2002).
  10. T. Komatsu, M. Miritake, A. Nakagawa, E. Tsuchida, "Self-organized Lipid-porphyrin Bilayer Membranes in Vesicular Form: Nanostructure, Photophysical Properties and Dioxygen Coordination", *Chem. Eur. J.*, **8**, 5469–5480 (2002).
  11. K. Kobayashi, T. Komatsu, A. Iwamaru, Y. Matsukawa, M. Watanabe, H. Horinouchi, E. Tsuchida, "Oxygenation of Hypoxia Region in Solid Tumor by Administration of Human Serum Albumin Incorporating Synthetic Hemes", *J. Biomed. Mater. Res.*, **64A**, 48–51 (2003).
  12. 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.*, **64A**, 257–261 (2003).
  13. H. Sakai, K. Tomiyama, Y. Masada, S. Takeoka, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, "Pretreatment of serum containing Hb-vesicles (oxygen carriers) to avoid their interference in laboratory tests", *Clin. Chem. Lab. Med.*, **41**, 222-231 (2003).
  14. Y. Huang, T. Komatsu, A. Nakagawa, E. Tsuchida, "Compatibility of Albumin-based O<sub>2</sub>-Carrier (Albumin-heme) with Blood Cell Components *in vitro*", *J. Biomed. Mater. Res.*, **64**, (2003) (in press).
  15. E. Tsuchida, A. Nakagawa, T. Komatsu, "Coordination Structure of Active Site in Synthetic Hemoprotein (Albumin-heme) with Dioxygen and Carbon Monoxide", *Macromol. Symp.*, **187**, (2003) (in press).
  16. A. Nakagawa, T. Komatsu, N. Ohmichi, E. Tsuchida, "Synthetic Dioxygen-carrying Hemoprotein: Human Serum Albumin Including Iron(II) Complex of Protoporphyrin IX with an Axially Coordinated Histidylglycyl-propionate", *Chem. Lett.*, **32**, (2003) (in press).
  17. D. Erni, R. Wettstein, S. Schramm, C. Contaldo, Hiromi Sakai, Shinji Takeoka, Eishun Tsuchida, M. Leunig, A. Banic, "Normovolemic hemodilution with hemoglobin-vesicle solution attenuates hypoxia in ischemic hamster flap tissue.", *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **64A**, (2003) (in press).
  18. K. Sou, Y. Naito, T. Endo, S. Takeoka, E. Tsuchida, "Efficient up-scale production of hemoglobin-vesicles (HbV) using the freeze-thawing and rapid extrusion.", *Biotechnol.*

*Prog.*, **19**, (2003) (in press).

19. 酒井宏水, 富山賢一, 政田陽平, 武岡真司, 堀之内宏久, 小林絃一, 土田英俊, “酸素輸液(ヘモグロビン小胞体)を含有する血液の生化学検査”, *人工血液* **10**, 47-53 (2002).
  20. 小松晃之, 森武美保, 土田英俊, “自己組織化リピドヘム小胞体のナノ構造と酸素結合能”, *人工血液* **10**, 120-125 (2002).
- B. 学会発表**
1. H. Sakai, E. Tsuchida. / Safety and Efficacy of Hemoglobin-vesicles as an Oxygen Infusion System / Farewell Symposium of Dr. Joachim C. Bakker (Sanquin Research at CLB) / 2002.4.25 / Amsterdam
  2. 酒井宏水, Marcos Intaglietta, 武岡真司, 土田英俊 / ヘモグロビン小胞体の *in vivo* 酸素輸送機能と代謝過程 / 第 51 回高分子学会年次大会 / 2002.5.29-31 / パシフィコ横浜
  3. H. Sakai, Y. Masada, S. Takeoka, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Influence of Hb-vesicles (artificial O<sub>2</sub> carriers) on serum clinical chemistry / International Conference of "Current Issues on Blood Substitutes Research" / 2002.6.5-8/ Stockholm.
  4. H. Sakai, R. Wettstein, A.G. Tsai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Intaglietta. / Systemic and Microvascular responses to hemorrhagic shock and resuscitation with Hb-vesicles as oxygen carriers in conscious hamster model / International Conference of "Current Issues on Blood Substitutes Research" / 2002.6.5-8/ Stockholm
  5. H. Sakai, Y. Masada, S. Takeoka, E. Tsuchida. / Characteristics of bovine hemoglobin for the potential source of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers for veterinary use / International Conference of "Current Issues on Blood Substitutes Research" / 2002.6.5-8/ Stockholm
  6. H. Sakai, S. Takeoka, A.G. Tsai, E. Tsuchida, M. Intaglietta. / Molecular dimensions of Hb-based O<sub>2</sub> carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension in conscious hamster model. / International Conference of "Current Issues on Blood Substitutes Research" / 2002.6.5-8/ Stockholm
  7. R. Wettstein, S. Schramm, A. Banic, M. Leunig, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, D. Erni / Normovolemic hemodilution with hemoglobin vesicles improves oxygenation in ischemic hamster flap skin. / International Conference of "Current Issues on Blood Substitutes Research" / 2002.6.5-8/ Stockholm
  8. S. Schramm, C. Contaldo, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Leunig, A. Banic, D. Erni / Liposome encapsulated hemoglobin provides better oxygenation in ischemic, collareralized hamster flap tissue than cellular hemoglobin. / International Conference of "Current Issues on Blood Substitutes Research" / 2002.6.5-8/ Stockholm
  9. A.G. Tsai, P. Cabrales, H. Sakai, M. Intaglietta / Microvascular oxygen distribution and capillary perfusion during induced hyperoxia and hypoxia / International Conference of "Current Issues on Blood Substitutes Research" / 2002.6.5-8/ Stockholm
  10. H. Sakai, Y. Masada, S. Takeoka, and E. Tsuchida / Photoreduction of methemoglobin and restoration of oxygen binding ability of hemoglobin-vesicles. / 2nd International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines / 2002.6.30 - 7.5 / Kyoto



11. H. Sakai, A.G. Tsai, S. Takeoka, M. Intaglietta, and E. Tsuchida / In vivo O<sub>2</sub> tension measurement using palladium porphyrin after infusion of hemoglobin-vesicles as O<sub>2</sub> carriers. / 2nd International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines / 2002.6.30 - 7.5 / Kyoto
12. H. Sakai, Y. Masada, S. Takeoka, and E. Tsuchida / Photoreduction of methemoglobin by irradiation in the near ultraviolet region. / 6th International Porphyrin-heme symposium in association with 9th International SPACC symposium. / 2002.7.6-7 / Tokyo, Waseda University
13. Y. Masada, H. Sakai, S. Takeoka, and E. Tsuchida / Photoreduction of methemoglobin by irradiation of visible light using flavin. / 6th International Porphyrin-heme symposium in association with 9th International SPACC symposium. / 2002.7.6-7 / Tokyo, Waseda University
14. H. Sakai, S. Takeoka, M. Intaglietta, and E. Tsuchida. / Subcutaneous Microvascular Responses to infusion of hemoglobin-vesicles (HbV) as oxygen carriers. / The 30th annual meeting of the International Society on Oxygen Transport to Tissues (ISOTT) / 2002. 8. 24-28/ Manchester, UK.
15. 政田陽平、酒井宏水、武岡真司、土田英俊、堀之内宏久、山本学、池田栄二、小林絃一 / 出血性ショック蘇生液としてのヘモグロビン小胞体の評価 / 第9回日本血液代替物学会年次大会 / 2002.9.4-5 / 熊本市国際交流会館
16. 酒井宏水、堀之内宏久、政田陽平、武岡真司、小林絃一、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体投与後の血液生化学検査 / 第9回日本血液代替物学会年次大会 / 2002.9.4-5 / 熊本市国際交流会館
17. 山本学、堀之内宏久、小林絃一、政田陽平、酒井宏水、武岡真司、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体による交換輸血試験 / 第9回日本血液代替物学会年次大会 / 2002.9.4-5 / 熊本市国際交流会館
18. 酒井宏水、武岡真司、Reto Wettstein, Amy G Tsai, Marcos Intaglietta、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体による出血ショック蘇生後の全身動態と微小循環動態 / 第9回日本血液代替物学会年次大会 / 2002.9.4-5 / 熊本市国際交流会館
19. 酒井宏水、武岡真司、堀之内宏久、小林絃一、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体投与後の組織病理学のおよび血液生化学的検討 / 第40回日本人工臓器学会大会 / 2002.10.2-5 / 札幌
20. 堀之内宏久、小林絃一、渡辺真純、泉陽太郎、江口圭介、山本学、武岡真司、酒井宏水、小松晃之、土田英俊 / 人工赤血球：研究開発の現状と臨床応用 / 第40回日本人工臓器学会大会 / 2002.10.2-5 / 札幌
21. H. Horinouchi, H. Sakai, K. Tomiyama, E. Ikeda, S. Takeoka, E. Tsuchida, and K. Kobayashi. / Hemoglobin-Vesicles as Oxygen Carriers: Influence on Phagocytic Activity and Histopathological Changes in Reticuloendothelial System. (poster) / The 13<sup>th</sup> Keio University International Symposium for Life Sciences and Medicine (Research and Development of Artificial Oxygen Carriers. -Its Frontline-. / 2003.2.28-3.1 / Keio Univ.
22. M. Yamamoto, H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, S. Takeoka, E. Tsuchida, and K. Kobayashi. / 40% Blood Exchange-Transfusion with Hb-vesicles in Rats and Observation of Hematological and Serum Clinical Laboratory Tests for 2 Weeks. (poster) / The 13<sup>th</sup> Keio University International Symposium for Life Sciences and Medicine (Research and Development of Artificial Oxygen Carriers. -Its Frontline-. / 2003.2.28-3.1 / Keio Univ.

23. H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, E. Ikeda, S. Takeoka, M. Suematsu, K. Kobayashi, and E. Tsuchida / Daily Repeated Infusion of Hb-vesicles (HbV) into Wistar Rats for Two Weeks: A Preliminary Safety Study. (poster) / The 13<sup>th</sup> Keio University International Symposium for Life Sciences and Medicine (Research and Development of Artificial Oxygen Carriers. -Its Frontline-. / 2003.2.28-3.1 / Keio Univ.
24. S. Takeoka, K. Sou, H. Sakai, and E. Tsuchida / Encapsulation effects of concentrated hemoglobin with phospholipid membrane / The 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo
25. H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, E. Ikeda, S. Takeoka, M. Suematsu, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Daily repeated infusion of Hb-vesicles (HbV) into Wistar rats for two weeks: Preliminary safety study. / The 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo
26. H. Horinouchi, H. Sakai, T. Tomiyama, E. Ikeda, S. Takeoka, E. Tsuchida, and K. Kobayashi. / Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: Influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. / The 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo
27. C. Contaldo, S. Schramm, R. Wettstein, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, D. Erni. / The influence of hemodilution and oxygen affinity of hemoglobin vesicles on the oxygenation in ischemic hamster flap tissue. / The 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo
28. H. Sakai, K. Tomiyama, Y. Masada, S. Takeoka, H. Horinouchi, K. Kobayashi, and E. Tsuchida. / Pretreatment of blood serum containing Hb-vesicles for accurate clinical laboratory tests. (poster) / The 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo
29. H. Sakai, Y. Masada, H. Onuma, S. Takeoka, E. Tsuchida / Reduction of metHb via electron transfer from photoreduced flavin and restoration of O<sub>2</sub> binding ability of Hb-vesicles as an O<sub>2</sub> carriers. (poster) / The 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo
30. H. Sakai, S. Takeoka, R. Wettstein, A.G. Tsai, M. Intaglietta, and E. Tsuchida. / Systemic and microvascular responses hemorrhagic shock and resuscitation with Hb-vesicles. (poster) / The 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo
31. H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, M. Yamamoto, E. Ikeda, S. Takeoka, K. Kobayashi, and E. Tsuchida. / Resuscitation from hemorrhagic shock with Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin (poster) / The 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo
32. H. Sakai, Y. Suzuki, M. Kinoshita, S. Takeoka, N. Maeda, and E. Tsuchida / Oxygen release from Hb-vesicles: comparison with red blood cells and acellular hemoglobin solution using an artificial oxygen permeable narrow tube with 28  $\mu$ m inner diameter. (poster) / The 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo

33. S. Hisamoto, H. Sakai, I. Fukutomi, S. Takeoka, E. Tsuchida. / Detection of lipopolysaccharide in hemoglobin-vesicles by Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test with pretreatment of surfactant. (poster) / The 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo
34. M. Yamamoto, H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, S. Takeoka, E. Tsuchida, and K. Kobayashi. / 40% blood exchange-transfusion with Hb-vesicles in rats and observation of hematological and serum clinical laboratory tests for 2 weeks (poster) / The 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo
35. A. Iwamaru, M. Watanabe, K. Wasano, S. Ono, H. Horinouchi, H. Sakai, T. Komatsu, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Tumor oxygenation using the hemoprotein (rHSA-FeP) and the hemoglobin-vesicle (HbV) in a rat LY80 tumor model (poster) / The 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo
36. 寺村裕治、阿閉友保、武岡真司、土田英俊、西出宏之 / チオール類の二分子膜透過を利用するメトヘモグロビン小胞体の還元 (IJ09) / 第 51 回高分子年次大会 / 2002 年 5 月 29 日 / 神奈川
37. 武岡真司、阿閉友保、寺村裕治、西出宏之、Takashi Yonetani、土田英俊 / 過酸化水素によるヘモグロビンのメト化機構と小胞体内包効果 (IJ08) / 第 51 回高分子年次大会 / 2002 年 5 月 29 日 / 神奈川
38. Shinji Takeoka, Yuji Teramura, Tomoyasu Atoji, Eishun Tsuchida / Effect of Hb-Encapsulation with Vesicle against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaction and lipid peroxidation / Current Issues on Blood Substitutes Research / 2002 年 6 月 7 日 / Stockholm
39. Shinji Takeoka, Yuji Teramura, Tomoyasu Atoji, Eishun Tsuchida / Effect of Hb Encapsulation with lipid membrane on reaction with active oxygen species (P-18) / 6th International Porphyrin-Heme Symposium in a Association with 9th International SPACC Symposium / 2002 年 7 月 7 日 / Tokyo
40. Yuji Teramura, Tomoyasu Atoji, Shinji Takeoka, Hiroyuki Nishide, Eishun Tsuchida / Reduction of methemoglobin in a vesicle using electron mediator and thiols (P-19) / 6th International Porphyrin-Heme Symposium in a Association with 9th International SPACC Symposium / 2002 年 7 月 7 日 / Tokyo
41. 寺村裕治、阿閉友保、武岡真司、土田英俊 / 活性酸素に対するヘモグロビン小胞体の安定性 (I-4) / 第 9 回日本血液代替物学会年次大会 / 2002 年 9 月 3 日 / 熊本
42. 阿閉友保、寺村裕治、武岡真司、土田英俊 / カタラーゼを内包した Hb 小胞体の安定性 / 第 40 回日本人工臓器学会大会 / 2002 年 10 月 2 日 / 札幌
43. Tomoyasu Atoji, Yuji Teramura, Shinji Takeoka, Eishun Tsuchida / Reduction of methemoglobin vesicles by using membrane permeation thiol compounds / 9th International Symposium on Blood Substitutes / 2003 年 3 月 4 日 / Tokyo
44. Yuji Teramura, Hideo Kanazawa, Shinji Takeoka, Eishun Tsuchida. / Prolongation of the oxygen-carrying ability of catalase-encapsulated Hb vesicles *in vivo* / 9th International Symposium on Blood Substitutes / 2003 年 3 月 4 日 / Tokyo
45. 金澤秀雄、寺村裕治、武岡真司、土田英俊、西出宏之 / カタラーゼ共封入ヘモグロビン小胞体の機能評価 (1) / 日本化学会第 83 春季年会

／2003年3月20日／東京

46. 阿閉友保、寺村裕治、武岡真司、土田英俊、西出宏之／カタラーゼ共封入ヘモグロビン小胞体の機能評価(2)／日本化学会第83春季年会／2003年3月20日／東京
47. 武岡真司／細胞型赤血球代替物の開発動向／第14回北海道輸血シンポジウム／2002年10月／北海道
48. 武岡真司／血球成分の機能代替の現状と展望／第82回慶應医学会総会／2002年11月／東京
49. 宗慶太郎、森かつら、武岡真司、土田英俊／アミノ酸型合成脂質による人工赤血球の構築／第51回高分子学会年次大会／2002.5.29-31／パシフィコ横浜
50. K. Sou, R. Klipper, B. Goins, W.T. Phillips, S. Takeoka, and E. Tsuchida / Circulation persistence and biodistribution of the hemoglobin-vesicles (HbV) in rats / International Conference of "Current Issues on Blood Substitutes Research / June 5-8, 2002 / Stockholm
51. 宗慶太郎、Robert, Klipper<sup>2</sup>, Beth, Goins, William, T. Phillips、武岡真司、土田英俊／<sup>99m</sup>Tcラベル化ヘモグロビン小胞体の体内動態評価／第40回日本人工臓器学会／10.2-4, 2002／京王プラザホテル札幌
52. 宗慶太郎、Robert, Klipper, Beth, Goins, William, T. Phillips、武岡真司、土田英俊／<sup>99m</sup>Tcラベル化ヘモグロビン小胞体の体内動態評価／第9回日本血液代替物学会年次大会／2002.9.4-5／熊本市国際交流会館
53. K. Sou, R. Klipper, B. Goins, W.T. Phillips, S. Takeoka, and E. Tsuchida / Pharmacokinetics of the Hemoglobin-Vesicles (HbV) in Rats / The 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo
54. K. Sou, Y. Naito, A. Yamaguchi, S. Takeoka, M. Suematsu, and E. Tsuchida / Effect of the Synthetic Amino-Lipids Formulating Hemoglobin-Vesicles (HbV) on the Circulation Level of the Blood Cells / The 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo
55. S. Takeoka, K. Sou, H. Sakai, and E. Tsuchida / Encapsulation effects of concentrated hemoglobin with phospholipid membrane / The 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo
56. 内藤 社康、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40回日本人工臓器学会／10.2-4, 2002／京王プラザホテル札幌
57. 小松晃之、森武美保、西出宏之、土田英俊／両親媒性テトラフェニルポルフィリン-プロトポルフィリンからなる二分子膜小胞体の光電子移動反応／第51回高分子学会年次大会／2002年5月／横浜
58. 中川晶人、小松晃之、土田英俊／アルブミンに包接させたヘムの酸素結合過程と配位構造／第51回高分子学会年次大会／2002年5月／横浜
59. 小松晃之、中川晶人、土田英俊／アルブミン-ヘムのO<sub>2</sub>、CO配位構造と再結合過程のピコ秒時間分解解析／第9回日本血液代替物学会／2002年9月／熊本
60. 中川晶人、小松晃之、土田英俊／アルブミン-プロトヘム複合体の合成とその酸素配位／第9

回日本血液代替物学会／2002年9月／熊本

Phthalocyanines / 30 June–5 July 2002 / Kyoto

61. 黄 宇彬、小松晃之、中川晶人、土田英俊／アルブミン-ヘムの血液適合性:in vitro における評価／第9回日本血液代替物学会／2002年9月／熊本
62. 中川晶人、小松晃之、土田英俊／アルブミン-プロトヘム複合体の合成と酸素配位／第40回日本人工臓器学会／2002年10月／札幌
63. 小松晃之、土田英俊／酸素輸送合成ヘム蛋白質(アルブミン-ヘム)の機能制御／第40回日本人工臓器学会／2002年10月／札幌
64. 堀之内宏久、小林紘一、渡辺真純、泉陽太郎、山本 学、武岡真司、酒井宏水、小松晃之、土田英俊／人工赤血球:研究開発の現状と臨床応用／第40回日本人工臓器学会／2002年10月／札幌
65. 大道直美、中川晶人、小松晃之、西出宏之、土田英俊／近位塩基を有する鉄プロトポルフィリンの合成とアルブミン包接体の酸素結合反応／第83日本化学会春季年会／2003年3月／東京
66. 小黒有希子、小松晃之、寺村裕治、武岡真司、土田英俊／ビスマレイミドヘキサシキサン架橋ヒト血清アルブミンの特徴／第83日本化学会春季年会／2003年3月／東京
67. T. Komatsu, E. Tsuchida / Serum Albumin Included Iron-porphyrins as a Novel Synthetic O<sub>2</sub>-Carrying Hemoprotein / 2<sup>nd</sup> International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines/ 30 June–5 July 2002 / Kyoto (Invited Lecture)
68. Akito Nakagawa, T. Komatsu, E. Tsuchida / Coordination Structure and Geminate Recombination of Albumin-heme with O<sub>2</sub> and CO / 2<sup>nd</sup> International Conference on Porphyrins and
69. Y. Huang, T. Komatsu, E. Tsuchida / Biocompatibility of Albumin Included Hemes as a Synthetic O<sub>2</sub>-Carrier / 2<sup>nd</sup> International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines / 30 June–5 July 2002/ Kyoto
70. M. Moritake, T. Komatsu, H. Nishide, E. Tsuchida / Self-organized Lipid-porphyrin Bilayer Membranes in Vesicular Form: Nano-structure and O<sub>2</sub>-Coordination / 2<sup>nd</sup> International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines / 30 June–5 July 2002 / Kyoto
71. E. Tsuchida, T. Komatsu, A. Nakagawa / Serum Albumin Included Hemes as a Novel Synthetic O<sub>2</sub>-Carrying Hemoprotein / 6<sup>th</sup> International Porphyrin-Heme Symposium / 6–7 July 2002 / Tokyo
72. T. Komatsu, M. Moritake, H. Nishide, E. Tsuchida / Self-organized Lipid-porphyrin Bilayer Membranes in Vesicular Form: Nano-structure, Photophysical Property and O<sub>2</sub>-Coordination / 6<sup>th</sup> International Porphyrin-Heme Symposium / 6–7 July 2002 / Tokyo
73. T. Komatsu, E. Tsuchida / O<sub>2</sub>-Carrying Albumin: Oxygen-Binding Property and Efficacy as Red Blood Cell Substitute / 30<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Society on Oxygen Transport to Tissues / 24–28 August 2002 / Manchester
74. T. Komatsu, E. Tsuchida / Serum Albumin Including Synthetic Hemes as an Oxygen-Carrying Hemoprotein / 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes / 3–5 March 2003 / Tokyo (Invited Lecture)
75. A. Nakagawa, T. Komatsu, E. Tsuchida, "Human Serum Albumin Hybrids Including Iron Complex

of Protoporphyrin IX with a Proximal Base and Their Dioxygenation", 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes, Tokyo, 3-5 March 2003.

76. Y. Huang, T. Komatsu, E. Tsuchida / Compatibility of Albumin-heme with Blood Cell Components / 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes / 3-5 March 2003 / Tokyo

77. H. Yamamoto, T. Komatsu, Y. Huang, S. Takeoka, H. Horinouchi, K. Kobayashi, I. Hirotsu, T. Kai, E. Tsuchida / Exchange Transfusion of Albumin-heme as an Artificial Oxygen Carrier into Anesthetized Rats: Physiological Responses and Oxygen Delivery / 9<sup>th</sup> International Symposium on Blood Substitutes / 3-5 March 2003 / Tokyo

### C. 特許

#### 国際特許

1. 両イオン性脂質およびその用途 (PCT 出願番号 PCT/JP02/08419, 米国/EPC 加盟全国/カナダ) (安定な二分子膜小胞体を形成し、Hb 小胞体の膜成分として利用できるアミノ酸型脂質) / 土田英俊、武岡真司、宗慶太郎、森かつら

### D. その他刊行物

1. バイオマーケット“人工血液○血液製剤の問題点で潜在市場は大、国内で人工赤血球の臨床評価へ” 日経バイオテク (2003年3月3日号)

## 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： 1. Hb 小胞体がヒト血清補体に及ぼす影響  
 2. Hb 小胞体がラット補体および血液細胞に及ぼす影響  
 3. ヘモグロビン溶液中血液型物質定量法の確立  
 4. アルブミン-ヘムがヒト血清補体および血小板に及ぼす影響 (予備検討)

|       |       |              |      |
|-------|-------|--------------|------|
| 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 | 北海道赤十字血液センター | 研究部  |
|       | 山口 美樹 | 北海道赤十字血液センター | 研究部  |
|       | 若本志乃舞 | 北海道赤十字血液センター | 研究部  |

## 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 (HbV) 投与が免疫系に及ぼす影響について、ヒト血清及びラットを用いて検討した。HbV を 20%及び 40% (v/v) で血清と混合し、37°C、1 時間反応後の補体価を測定したところ、血清希釈による補体価の低下がみられたものの、それ以上の低下はみられなかった。一方、強陰性荷電 PEG 未修飾リポソームでは著明な補体価の低下がみられた。このことから HbV はヒト補体系を活性化しないことが明かとなった。同様に、ラット血清を用い検討を行ったところ、HbV はラット補体系も活性化しないことが明かとなった。循環血液量の 20%相当の HbV を尾静脈から top-load し、経時的に採血して補体価、血球数、白血球画分の変動を観察した。HbV 投与群、空リポソーム投与群とも投与後 3 日目に補体価は投与前値から 10-20%低下したものの、投与 2 週間後には投与前値に戻った。In vivo においては一過性の補体価の低下がみられた。赤血球数、血小板数、白血球数は投与後 1 週間の観察では変化はみられなかった。投与 6 時間後に一過性の好中球割合の上昇、リンパ球割合の低下がみられたが、1 日後には投与前の値に戻り、その後 1 週間変化しなかった。リンパ球サブセットは変化せず、T リンパ球活性化も観察されなかった。従って、HbV 投与は一過性に補体系や白血球に影響を及ぼすもののその程度は小さく、感染性因子に対する生体防御機能にはほとんど影響を及ぼさないと考えられた。

ヒト赤血球から調製したヘモグロビン (Hb) 溶液中の A 型物質定量法として、A 型赤血球膜から抽出したグリコホリン A とマウスモノクローナル抗体を用いた競合 EIA 法を確立した。B 型、O 型溶血液とは反応せず、A 型に高い特異性があることが確かめられた。検出感度は 80-325 ng グリコホリン A/ml であり、アッセイ内変動係数は 24.9%、アッセイ間変動係数は 10.1%であつ

た。

アルブミン-ヘム (rHSA-Heme) の生体適合性について、補体系、血小板への影響を検討した。rHSA-Heme とヒト血清あるいは血漿を混合し、37°C、1 時間反応後の補体価を測定したところ、若干の補体価の低下および SC5b-9 生成がみられた。また、血小板活性化の指標となる CD62P、PAC-1 の発現には影響を及ぼさなかった。

## 1. Hb 小胞体がヒト血清補体に及ぼす影響

### A. 研究目的

リポソームは補体系を活性化することが指摘されている。実際、リポソーム包埋ヘモグロビン (LEH) は補体系を活性化する。そこで異なる脂質組成で表面を PEG 修飾している Hb 小胞体 (HbV) に関し、ヒト血清を用いて補体活性の惹起の可能性について検討した。

### B. 研究方法

DPPC/cholesterol/DPEA/PEG-DSPE(5/5/1/0.3) を構成脂質とする HbV を健常人ヒト血清 (n = 5) と 20%あるいは 40% (v/v) で混合し、37°C、1 時間反応させた。反応終了後、15,000 rpm で 45 分間遠心して HbV を沈殿させ、その上清について補体価 CH50 をキット (NEW ワンポイント CH50KW、日本ビーシージーサプライ) を用いて測定した。対象として、生理食塩水、強陰性荷電 PEG 未修飾リポソーム (コートソーム EL、日本油脂) を血清と混合し、同様な反応を行った。

### C. 研究結果

補体価 CH50 は HbV 混合による血清希釈により低下した。しかし、20%添加、40%添加のそれぞれにおいて、HbV 群、生食群間には CH50 の値に差がみられなかった (図 1)。一方、強陰性荷電リポソーム添加群では顕著な CH50 の低下がみられた。

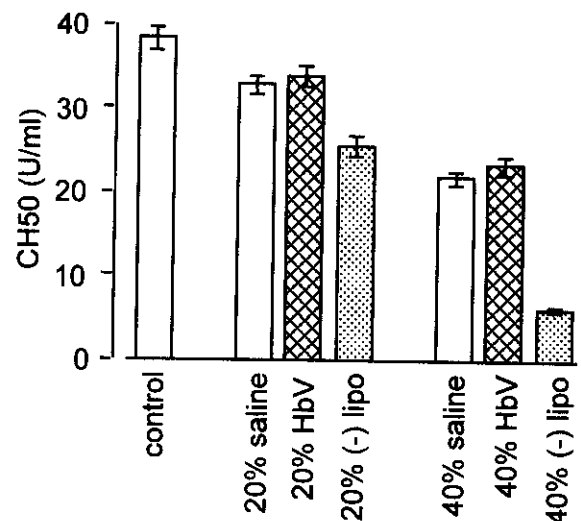


図 1. HbV がヒト血清補体に及ぼす影響。HbV、生理的食塩水、強陰性荷電リポソーム ((-)lipo) を血清と混合後、37°C、1 時間反応。遠心上清の補体価を測定した (n = 5, mean ± SEM)。

### D. 考察

本反応系は、生食添加では CH50 は変化せず、強陰性荷電リポソームでは CH50 が低下することから、補体への影響をみる系として適していると考えられる。HbV では 20%および 40%v/v で血清に加えても、CH50 の低下はみられなかった。このことから、HbV はヒト血清補体系を活性化しないと考えられた。

## 2. Hb 小胞体がラット補体および血液細胞に及ぼす影響

### A. 研究目的

HbV の安全性試験として、ラットへの topload 輸注モデルを用い、免疫系、生体防御系に及ぼす影響について検討した。免疫系の主たるもの一つとして、末梢血液細胞の白血球画分、リンパ球



サブセットの変化、生体防御系として補体価の変動を観察した。

## B. 研究方法

WKAH (Wistar King) ラット血清と HbV、ヘモグロビンを包埋していない空リポソームおよび生理食塩水を 20%あるいは 40% (v/v) で混合し、37°C、1 時間反応させた。反応終了後、15,000 rpm で 45 分間遠心して HbV を沈殿させ、その上清中の補体価 CH50 をキット (NEW ワンポイント CH50KW、日本ビーシージーサプライ) を用いて測定した。

WKAH ラット、♂、体重約 300 g を用い、循環血液量の 20% (v/v) の HbV (約 3.3 mL) をエーテル麻酔下、尾静脈より輸注した。空リポソームおよび生理食塩水もコントロールとして輸注した。末梢血液は投与前、投与 6 時間、1、3、7 日後 (補体測定では 14 日後も) に採取した。抗凝固剤 ACD を用いて尾静脈から採血し、血球数は自動血球測定装置 (A<sup>c</sup>・T diff™, COULTER) にて測定した。フローサイトメーター (EPICS XL, COULTER) を用い、白血球画分は前方・側方散乱光分析により、リンパ球サブセットは蛍光標識抗体による表面抗原分析により測定した。同時に採血した血液から血清を分離し、15,000 rpm で 45 分間遠心して HbV あるいは空リポソームを沈殿させた後、補体価 CH50 をキットにて測定した。

## C. 研究結果

In vitro 試験において、補体価 CH50 は HbV 混合による血清希釈により低下した。しかし、20% 添加、40% 添加のそれぞれにおいて、HbV 群、空リポソーム群、生食群間には CH50 の値に差がみられなかった (図 2)。HbV および空リポソーム投与 3 日目に補体価 CH50 は 10-20% 低下した。しかしその後徐々に上昇し、2 週間後には投与前と同じ値に回復した (図 3)。

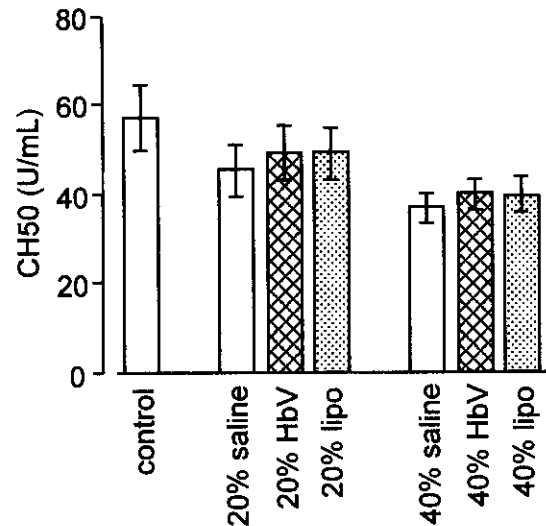


図 2. HbV がラット血清補体に及ぼす影響。

HbV、空リポソーム、生理的食塩水を血清と混合後、37°C、1 時間反応。遠心上清の補体価を測定した (n = 5, mean ± SD)。

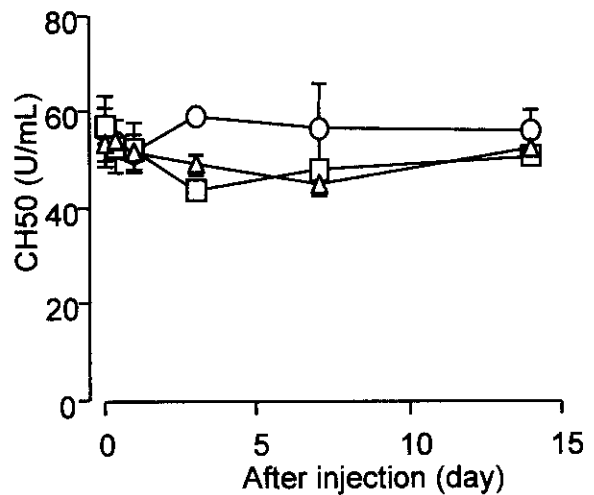


図 3. HbV 投与がラット血清補体に及ぼす影響。

HbV、空リポソーム、生理的食塩水を循環血液量の 20%v/v で topload 投与し、経時的に補体価を測定した。△ : HbV、□ : 空リポソーム、○ : 生食 (n = 3-4, mean ± SD)。

観察期間中、HbV、空リポソーム、生食群のいずれにおいても、総白血球数、赤血球数、血小板数に変化は見られなかった (図 4)。投与 6 時間後には、HbV および空リポソーム群において顆粒球%の上昇、リンパ球%の減少がみられた (図 5)。

その変化はHbV群の方が空リポソーム群よりも顕著であった。白血球画分の変化は、投与 1 日後には投与前と同じレベルに回復し、その後 1 週間変化しなかった。投与 6 時間後に一過性にリンパ球%が減少したとき、T 細胞、B 細胞、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞の分布は変化しなかった (図 6)。T

細胞の活性化はみられなかったが、NK 細胞の割合においては統計的に有意な一過性の低下がみられた (図 7)。

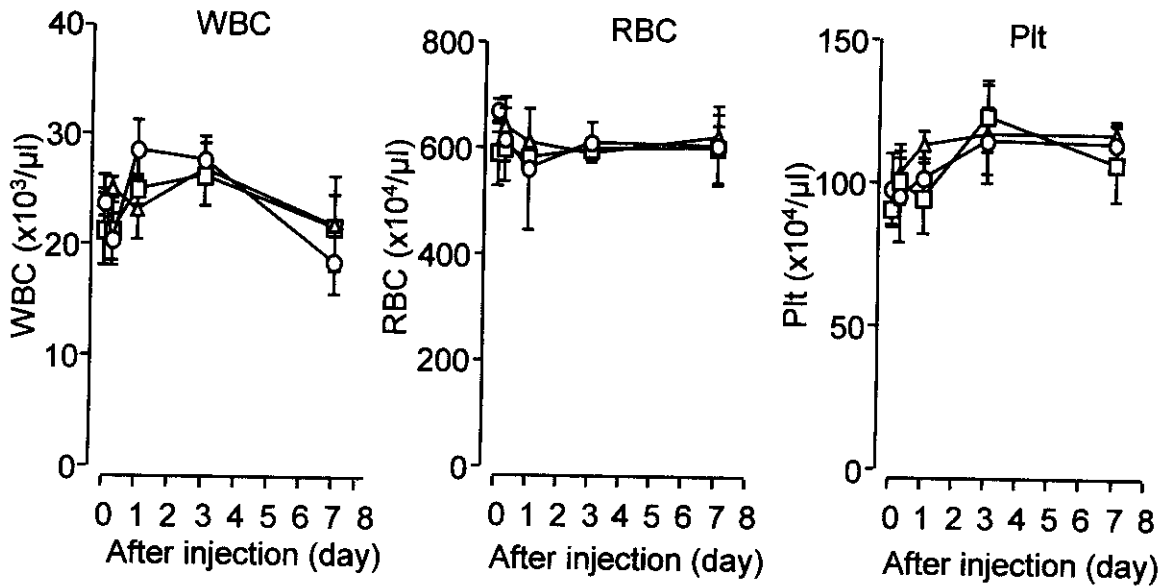


図 4. HbV 投与がラット末梢血球に及ぼす影響。HbV、空リポソーム、生理的食塩水を循環血液量の 20%v/v で topload 投与し、経時的に白血球数、赤血球数、血小板数を測定した。△ : HbV、□ : 空リポソーム、○ : 生食 (n = 3-4, mean ± SD)。

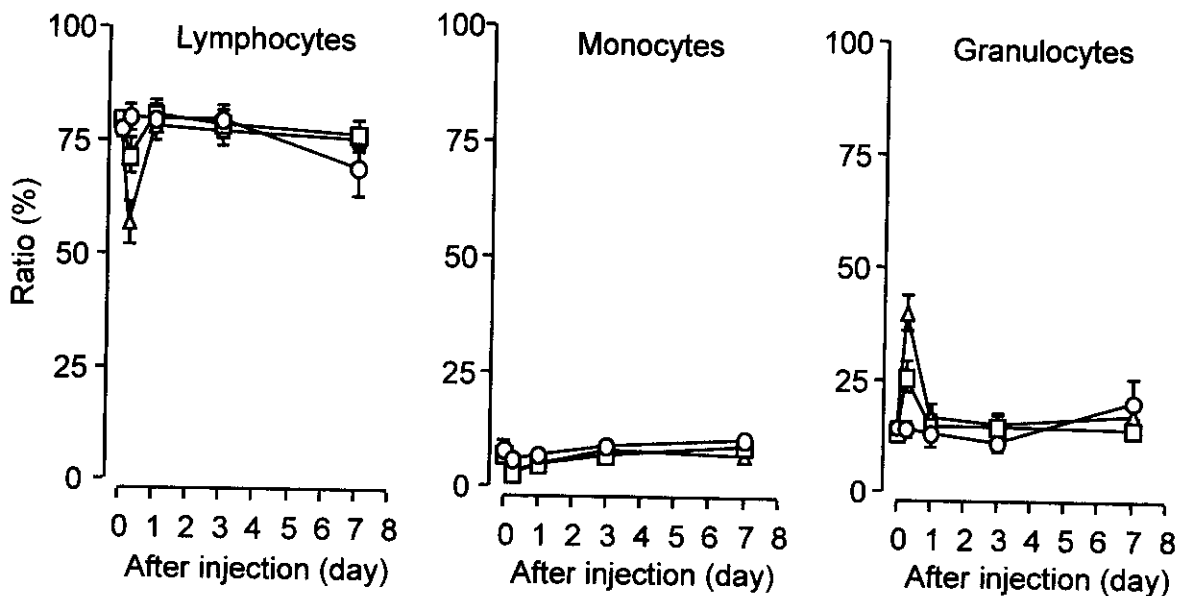


図 5. HbV 投与がラット末梢血白血球に及ぼす影響。HbV、空リポソーム、生理的食塩水を循環血液量の 20%v/v で topload 投与し、経時的にリンパ球、単球、顆粒球の割合を測定した。△ : HbV、□ : 空リポソーム、○ : 生食 (n = 3-4, mean ± SD)。

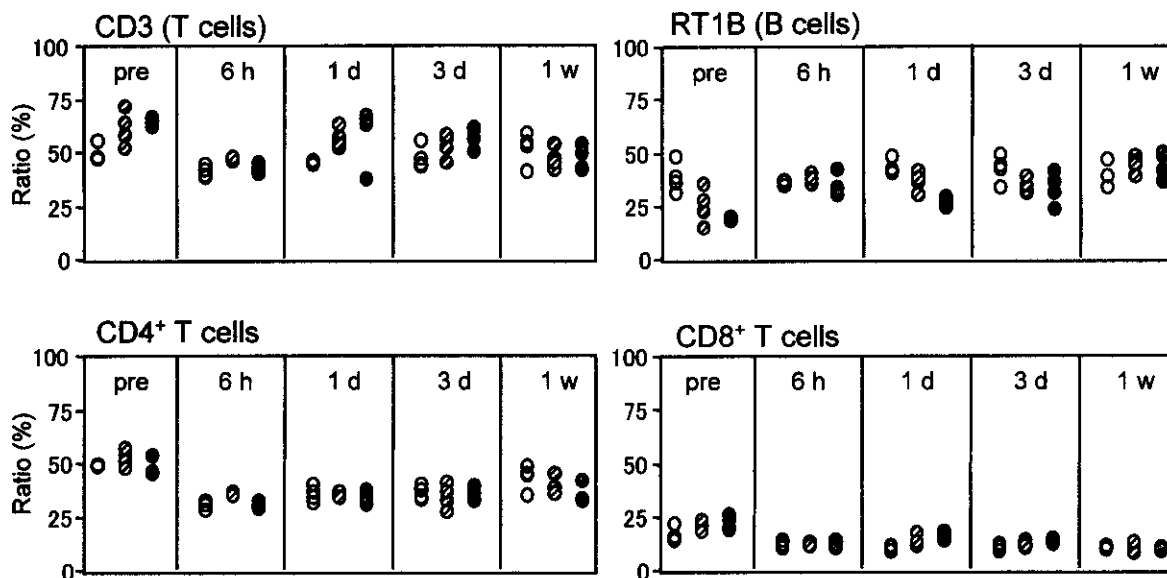


図 6. HbV 投与がラット末梢血リンパ球サブセットに及ぼす影響。HbV、空リポソーム、生理的食塩水を循環血液量の 20%v/v で topload 投与し、経時的にリンパ球サブセットの割合を測定した。●：HbV、◎：空リポソーム、○：生食 (n = 3-4, mean ± SD)。

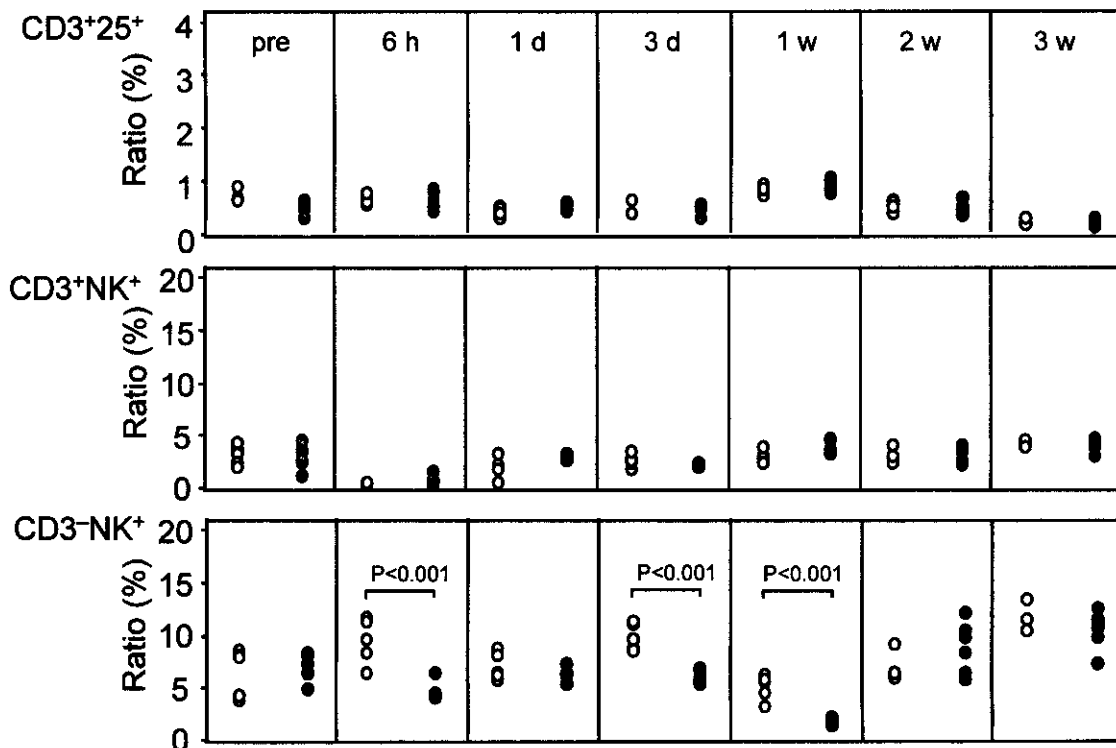


図 7. HbV 投与がラット末梢血リンパ球サブセットに及ぼす影響。HbV、生理的食塩水を循環血液量の 20%v/v で topload 投与し、経時的にリンパ球サブセットの割合を測定した。●：HbV、○：生食 (n = 5-6, mean ± SD)。

## D. 考察

ラット血清を用いた *in vitro* 試験では HbV 混合により CH50 は変化せず、HbV は補体を活性化しないことが分かった。しかしラットへの投与試験では、投与 3 日目に 10-20% の補体価の低下が観察された。その後徐々に回復したことから、肝臓での補体産生が一時的に抑制されたのかも知れない。ラットに HbV を投与したところ、投与 6 時間後に顆粒球%の上昇、リンパ球%の減少がみられたが、1 日後には元に戻っており、影響は少ないと考えられた。顆粒球%上昇、リンパ球%減少の要因は不明である。またそれらの程度は空リポソームに比して HbV で大きく、内包 Hb の何らかの影響が考えられる。以上、HbV 投与は末梢血白血球および補体に影響を及ぼしたもののその程度は小さく、また一過性であったことから、HbV 投与後も宿主の生体防御機能は十分維持されることが示唆された。

## 3. ヘモグロビン溶液中血液型物質定量法の確立

### A. 研究目的

人工酸素運搬体の利点の一つは血液型を有さず、それゆえ患者の血液型を選ばずに輸注できることである。従って、赤血球を溶血して製造するヘモグロビン (Hb) 溶液中の型物質を知ることは品質管理上非常に重要である。そこでヘモグロビン溶液中の型物質を高感度に検出・定量するため、モノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定 (EIA) 法を確立する。

### B. 研究方法

ヘモグロビン溶液中の型物質検出法として競合 EIA 法を確立することとした。グリコホリン A をコーティング抗原、標準物質として用いるため、A 型赤血球膜から抽出、精製を行った。まず A 型赤血球を生理的食塩水で洗浄後、4 倍容の H<sub>2</sub>O で溶血し、遠心により赤血球膜 (ストローマ) を得た。SDS により膜タンパク質を可溶化し

WGA-sepharose アフィニティーカラムにて精製した。SDS-PAGE 上で単一バンドとなる A 型グリコホリン A が得られ、コーティング抗原および標準物質として用いることが確認できた。

96 穴イムノプレート (マキシソープ, NUNC) に 5 µg/ml グリコホリン A (pH 9.6) を 50 µl/well で分注し、4°C、over night の吸着反応を行った。PBS で 2 回洗浄後、1%スキムミルク/1%ゼラチン溶液 (pH 9.6) を 100 µl/well で分注し、室温、2 時間反応させブロッキングを行った。PBS/0.1% Tween20 で 5 回洗浄した後、測定に用いた。グリコホリン A 系列希釈溶液及び Hb 溶液に等量の 1/1000 希釈抗 typeA マウスモノクローナル抗体 (Calbiochem) を加え、その混合溶液を 50 µl/well でグリコホリン A コーティングプレートに分注し、室温、1 時間反応させた。PBS/0.1% Tween20 で 5 回洗浄した後、1/5000 希釈したパーオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 (DAKO) を 50 µl/well で分注し、室温、1 時間反応後、再度洗浄、発色基質を加え、室温、30 分反応後、450 nm の吸光度を測定した。

A、B、O、AB 型溶血液は、それぞれの型の洗浄赤血球を 2 倍容の H<sub>2</sub>O で溶血後 H<sub>2</sub>O と同量の 1.8% NaCl を添加して、15,000 rpm、20 分間遠心し、その上清として調製した。

### C. 研究結果

典型的な標準曲線を図 8 に示す。グリコホリン A 濃度に依存したシグモイド型の標準曲線を得ることが出来た。系列希釈液として PBS および B 型溶血液を比較したところ、同様な反応曲線および検出感度が得られた (図 8A)。定量可能範囲を明確にするため吸光度を logit 変換しプロットしたところ、高い相関率が得られ (PBS 希釈  $r = 0.995$ , B 型溶血液  $r = 0.993$ ) (図 8B)、検出感度は 80-325 ng glycophorine/ml 定量範囲 80-2500 ng glycophorine/ml であった。