

図 19. Hb 小胞体および oxyHb 投与後の呼気中の NO 濃度。

D. 考察

肺循環において内因性血管弛緩因子である一酸化窒素は重要な役割を果たしている。Hb を使用した人工酸素運搬体 (Hb 小胞体) の肺循環に与える影響について内因性の一酸化窒素の変化から検討した。生食投与群では一酸化窒素の産生量は投与前、投与後を通して大きな変化を起こさなかったことから、10%程度の循環血液量の増加は一酸化窒素濃度に影響しないことが明らかとなった。OxyHb 投与群では投与直後より右室圧も持続的に上昇し、呼気中の一酸化窒素量も増大していた。右室圧の上昇は、OxyHb が血管内皮の間隙から間質へ漏出し、一酸化窒素を捕捉するため血管平滑筋が収縮し、血管抵抗が増すためであると考えられた。

一方 HbV 投与群では右室圧は一過性に上昇した後、投与前値に戻る傾向を示した、一酸化窒素排出量は投与前後を通して殆ど変化しなかった。Hb 小胞体は 250 nm の粒径を持ち、血管内皮の間隙を通過することはできないことを考えると、Hb 小胞

体投与後の一過性の血管収縮は、一酸化窒素捕捉による血管収縮以外のファクターが存在すると思われた。

今後血液中の一酸化窒素誘導体の NO_2 , NO_3 を経時的に測定するとともに、L-NAME などを投与して NO 産生を消去した動物での Hb 小胞体による肺動脈圧への影響を調べることで、血管弛緩因子としての役割のある一酸化窒素の動態についても解析を進める必要があると考えられた。

報 文

H. Sakai, H. Horinouchi, Y. Masada, S. Takeoka, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Topload infusion of hemoglobin-vesicles (oxygen carriers) into Wistar rats a safety study: Influence on organ function observed by serum clinical laboratory tests. *Biomaterials*. (to be submitted).

H. Sakai, H. Horinouchi, Y. Masada, M. Yamamoto, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi. "Resuscitation from hemorrhagic shock with hemoglobin-vesicles (oxygen carriers) suspended in recombinant human serum albumin." *Crit. Care Med.* (submitted).

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)

K. Kobayashi, T. Komatsu, A. Iwamaru, Y. Matsukawa, H. Horinouchi, M. Watanabe, E. Tsuchida. Oxygenation of hypoxic region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic hemes. *J Biomed Mater Res.* 64A, 48-51 (2003).

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. Meater. Res.* 64A, 257-261 (2003).

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)

学会発表

H. Sakai, Y. Masada, S. Takeoka, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Influence of Hb-vesicles (artificial O₂ carriers) on serum clinical chemistry / International Conference of "Current Issues on Blood Substitutes Research" / 2002.6.5-8/ Stockholm.

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

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

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

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

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

K. Kobayashi and E. Tsuchida / Safety and efficacy of hemoglobin-vesicles and albumin-hemes (Video session) / The 13th 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

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 13th 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.

T. Komatsu, H. Yamamoto, Y. Huang, S. Takeoka, H. Horinouchi, K. Kobayashi, I. Hirotsu, T. Kai, and E. Tsuchida / Exchange transfusion of albumin-heme as an artificial oxygen carriers into anesthetized rats: physiological responses and oxygen delivery (poster) / The 13th 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

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 13th 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.

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 13th 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.

K. Kobayashi / Evaluation of artificial oxygen carriers in vivo -History and perspective of Keio-Waseda Joint Project of oxygen infusions- (president lecture) / The 9th International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo

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 9th International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo

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 9th International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo

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 9th International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo

H. Sakai, Y. Masada, H. Onuma, S. Takeoka, E. Tsuchida / Reduction of metHb via electron transfer from photoreduced flavin and restoration of O₂ binding ability of Hb-vesicles as an O₂ carriers. (poster) / The 9th International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo

H. Yamamoto, T. Komatsu, Y. Huang, S. Takeoka, H. Horinouchi, K. Kobayashi, I. Hirotsu, T. Kai, and E.

Tsuchida. / Exchange transfusion of albumin-heme as an artificial oxygen carrier into anesthetized rats: Physiological responses and oxygen delivery (poster) / The 9th International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo

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 9th International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo

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 9th International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo

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 9th International Symposium on Blood Substitutes (ISBS) / 2003.3.3-5. / Keio Plaza Inter-continental, Tokyo

分担課題：微小循環における一酸化窒素 (NO) の bioavailability 評価系の確立

分担研究者 末松 誠 慶應義塾大学医学部 医化学教室 教授

研究要旨

修飾ヘモグロビン (Hb) を用いた人工酸素運搬体の生体適合性を考える上で最も重要な要件に NO の bioavailability の維持がある。多くの Hb-based oxygen carrier には NO の消去能があり、血管収縮などの副作用の原因となっている。修飾 Hb が生体で NO の恒常性にどのような影響を与えるかについては、in vitro における NO 消去効率だけでなく粒子サイズや表面修飾による電荷変化など多彩な factor が血管壁への到達性を規定しているため、最終的には微小循環における NO の消去を実際に検証する必要がある。平成 14 年度の分担研究でこれをある程度定量的に評価できる系を確立した。詳細な解析の結果、血液コンパートメントからの NO の拠出系の存在が示唆され、従来考えられてきた微小血管における NO の availability に関する paradigm に大きな変化がもたらされた。

A. 研究目的

平成 14 年度は Hb-based oxygen carrier をはじめとするバイオミメティクスを体内投与した際に生じる血管内皮細胞の機能変動を in vivo で評価する系として NO の bioimaging 技術の確立を行い、腸間膜における血管内皮細胞由来の NO のリソースについて興味深い知見を得た。これまで NO のリソースは血管内皮と神経系と考えられてきたが、我々の得た知見は血流中から供給されるリソースの存在を示唆するものであった。腸間膜微小循環における解析から抵抗血管となる細動脈の末梢では、血管内皮細胞由来の NO synthase (NOS3) の発現はあってもごくわずかであり、血管の外周からアプローチする神経線維と周囲の散在する肥満細胞に発現する神経由来 NOS (NOS1) が主要なリソースであることが判明した。これに対して細静脈内皮細胞では NOS3 が優位に発現しており、NOS の活性抑制によって細動脈収縮より先に白血球接着などの炎症反応が先立って惹起されること

が明らかになった。

B. 研究方法

Wistar 系雄性ラット (280 - 300 g) を pentobarbital sodium の筋肉内注射で麻酔し、腹部正中切開により回盲部腸間膜微小循環を倒立型生体ビデオ顕微鏡により観察した。腸間膜表面を 95%N₂・5%CO₂ で飽和した Krebs-Henseleit buffer で superfusion した。Buffer に diamino fluorescein (DAF)-2 AM を 10μM で添加して持続的に表面還流した。DAF 自身は非蛍光物質であるが、細胞内で NO と結合するとほぼ不可逆的に蛍光複合体を形成する。20 分間灌流した画像を 488nm のレーザー共焦点画像として 8-bit digital image としてコンピュータに取り込み、さらに 20 分間 (20 - 40 分) における蛍光の増加を算出した。蛍光強度を calibration するために DAF-NO complex である DAF-2-Triazole の既知濃度溶液でグレーレベルとの直線関係を樹立し、蛍

光濃度を apparent DAF-2T として表現した。20 分間の蛍光強度の増加率 (%DAF-2T) で各群の蛍光変化を比較検討した。

C. 研究結果・考察

図1に DAF-2DA を負荷した腸間膜微小循環の蛍光画像を示した。細動脈、最静脈の血管内皮細胞に蛍光が検出できた。間質に散在する細胞にも蛍光が検出されるが、これらの細胞は toluidin blue 染色との superimpose により大半は肥満細胞であることが判明した。これらの結果は血管内皮細胞や肥満細胞は構成的に NO を享受する細胞であることが示された。

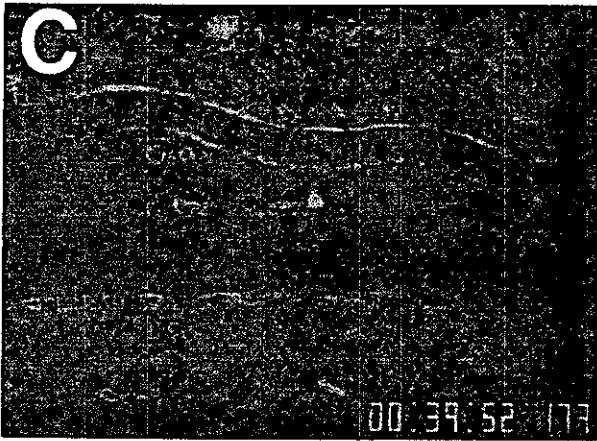


図1 DAF-2DA による微小血管内皮細胞における NO のバイオイメーキング。(文献 21 より引用) 上の血管が細動脈、下が細静脈。間質の陽性細胞は多くが肥満細胞でこれらには neural NOS が発現している。

図2に NOS をすべて抑制できる阻害剤である L-NAME を 100 μ M あるいは 7-NI 100 μ M を superfusion した際の蛍光増加反応への効果を示した。またこの画像情報から蛍光強度の変化を各群で比較したものを図3に示した。L-NAME 投与により、DAF 蛍光はまず細静脈サイドで低下したが、細動脈サイドの蛍光は有意な低下を示さなかった。L-NAME 1mM では細動脈でも有意な低下を示したが、baseline の蛍光の 40%程度はこの条件下でも抑制されなかった。これに対し、7-NI ではまず細動脈サイドで著明な蛍光の低下が起こり、細静脈サイドでは低下が起らなかった。7-NI を 1 m M まで増加させても、同様に蛍光は baseline の 40%程度が両方のサイドで残った。両者の阻害剤はほぼ同程度の分子量であるため L-NAME により蛍光信号が低下しない理由は薬剤の局所へのアクセスの違いではなく、NOS に依存しない NO の供給メカニズムの存在を示唆した。

我々はさらに NOS isozyme の分布を免疫組織化学的に解析したところ、NOS3 は細動脈内皮細胞にはほとんど発現しておらず、細静脈サイドには発現が見られた。一方、NOS1 は細動脈サイドには著明に発現し、周囲に散在する肥満細胞にも著明な発現が見られた。したがってこの部位の NO の約 60%は血管の外側から、残りは血液コンパートメントから供給され、血管内皮細胞自身からの供給はあってもごくわずかであると考察された。今後、この実験系を用いて各種の人工酸素運搬体を投与した際の NO の消去効果を検討していく予定である。

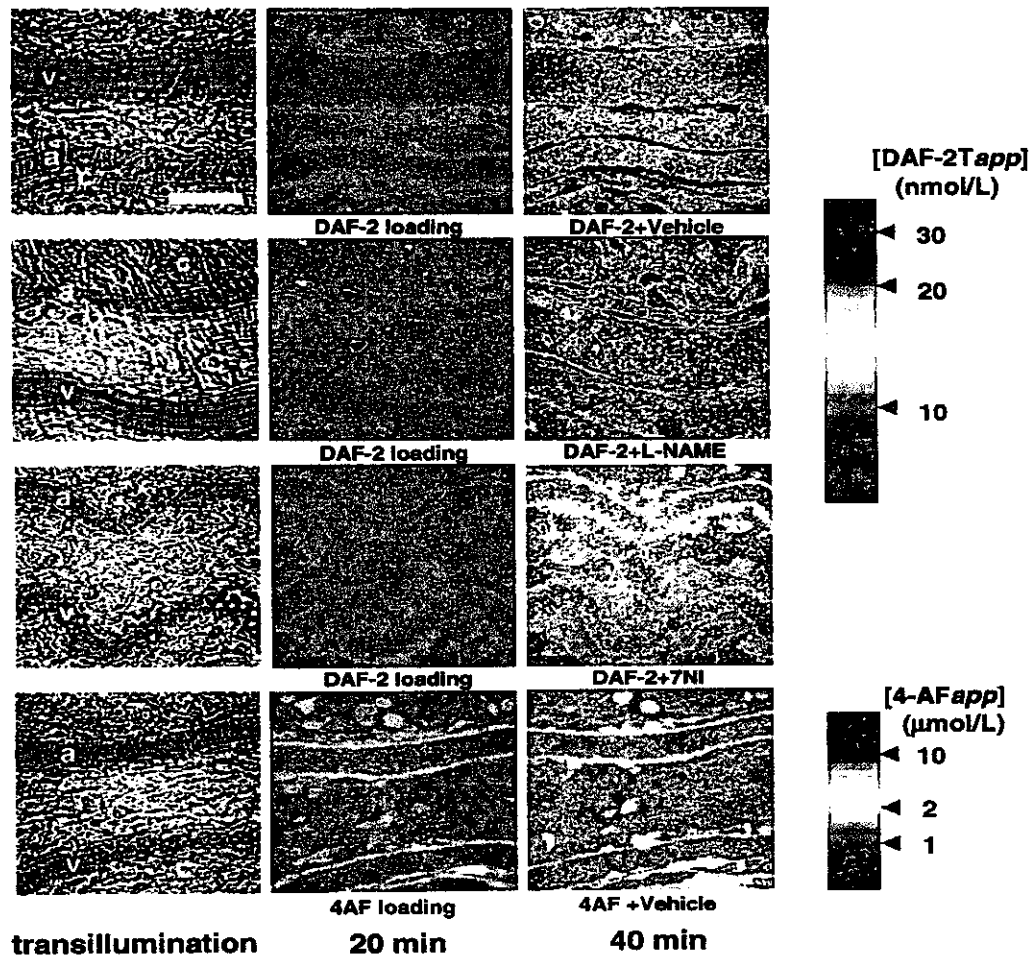


図2 diaminofluorescein (DAF)によるラット腸間膜微小循環におけるNOのbioimaging analysis. 最上段：DAF-2をsuperfusionし最初の20分の基礎負荷(DAF-2 loading)が終了して20分で血管内皮細胞や間質に散在する肥満細胞において蛍光が発生するのがわかる。第2段：腸間膜に100 nmol/LのL-NAMEをsuperfusionして局所のNO synthaseを阻害すると主に静脈サイド(V)で蛍光増加が著明に減少する。またneural NOS (NOS1)の阻害剤である7-nitroindazole (7-NI)を100 nmol/Lでsuperfusionすると逆に動脈サイド(a)で蛍光増加が著明に抑制される。またNOの結合に関係なく蛍光を発する色素である4-aminofluorescein (4-AF) diacetateを腸間膜にsuperfusionすると血管内皮細胞と間質の肥満細胞に負荷されることから、これらの細胞にesteraseが存在し、プローブが負荷できることが示された。

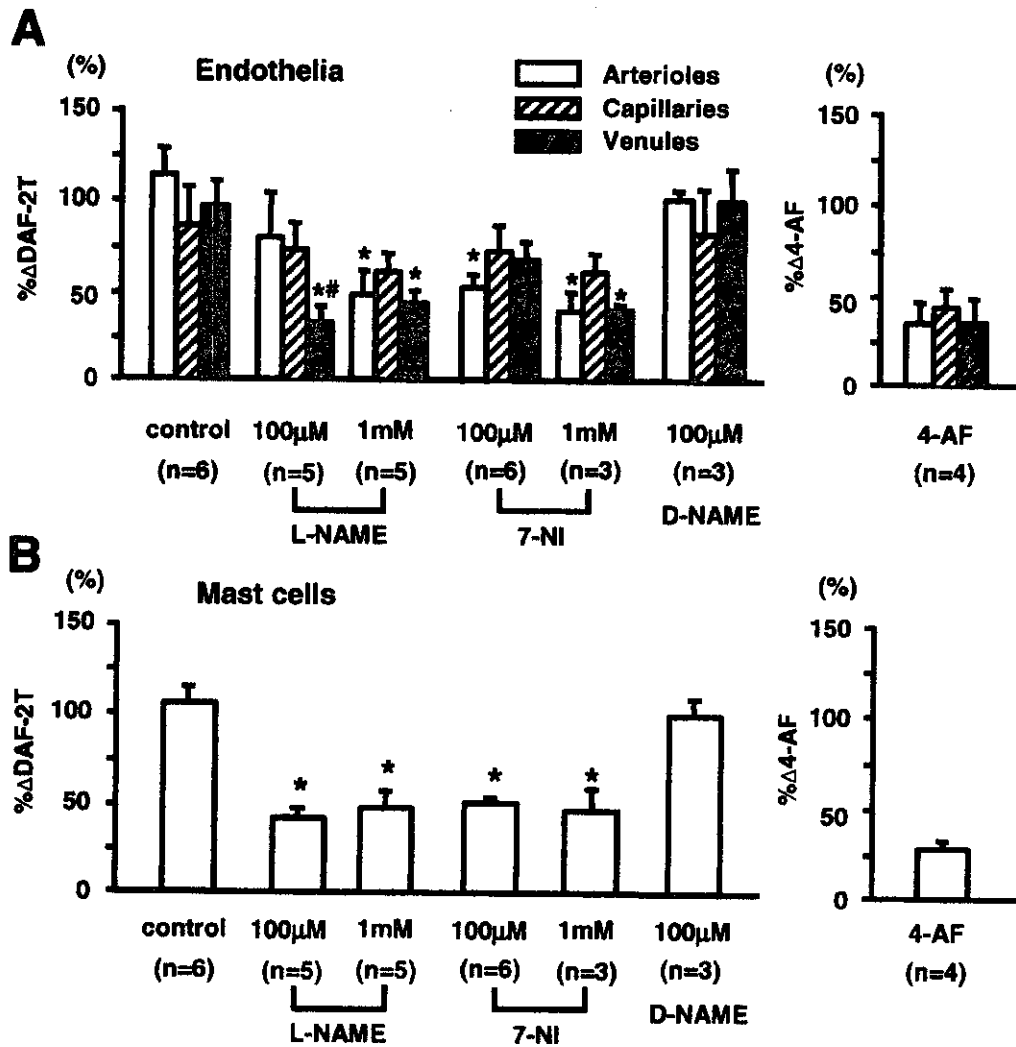


図3 L-NAME および 7-nitroindazole (7-NI)による DAF 蛍光の抑制効果

L-NAME を superfusion するとまず静脈サイドから抑制が始まり、1mmol/L に至り動脈サイドでも抑制がかかるようになる。一方 NOS1 の選択的阻害剤である 7-NI ではまず動脈サイドに抑制がかかり、1mmol/L に至って静脈サイドで抑制がかかるようになった。いずれの場合も十分な NOS 阻害剤の存在下でも全体の蛍光の 40%程度は抑制ができないことが示された(A)。これは NOS1 が主要なリソースである肥満細胞の蛍光でも同様であった (B)。

D. 研究業績

1. Takamiya, R., Murakami, M., Goda, N., Makino, N., Kajimura, M., Takamiya, Y., Yamaguchi, T., Ishimura, Y., Hozumi, N., Suematsu, M. Stabilization of mast cells by heme oxygenase-1: an anti-inflammatory role. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H861-H870 (2002).
2. Suematsu, M., Suzuki, H., DeLano, F.A., Schmid-Schoenbein, G.W. The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension. *Microcirculation* **9**, 259-276 (2002).
3. Morisaki, H., Katayama, T., Kotake, Y., Handa, M., Ikeda, Y., Takeda, J., Ito, M., Suematsu, M. Carbon monoxide modulates endotoxin-induced microvascular leukocyte adhesion through platelet-dependent mechanisms. *Anesthesiology*. **97**, 701-709 (2002).
4. Kajimura, M., Shimoyama, M., Tsuyama, S., Suzuki, T., Ihara, H., Kozaki, S., Tsubota, K., Oguchi, Y., Suematsu, M. Visualization of gaseous monoxide reception by soluble guanylate cyclase in rat retina. *FASEB J* **17**, U126-U148 (2003).
5. Kashiwagi, S., Kajimura, M., Yoshimura, Y., Suematsu, M. Nonendothelial source of nitric oxide in arterioles but not in venules: Alternative source revealed in vivo by diaminofluorescein microfluorography. *Circ Res* **91**, e55-e64 (2002).
6. Suematsu, M., and Kashiwagi, S. Visualization of gaseous signal transduction in biological system. *Antioxid. Redox Signal.* In press (2003).
7. Murai, M., Yoneyama, H., Ezaki, T., Suematsu, M., Terashima, Y., Harada, A., Hamada, H., Asakura, H., Ishikawa, H., Matsushima, K. Subendothelial dome of gut Peyer's patches is the essential anatomical site in initiating acute graft-versus-host disease. *Nat. Immunol.* **4**, 154-160 (2003).

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： 血液代替物開発への安全性、治験計画作成に関する研究

分担研究者 高折 益彦 東宝塚さとう病院 名誉院長

研究要旨

日本国内、ならびに諸外国との文書交換との文書交換を材料に現在当研究班にて作成されている人工赤血球を用いての治験計画を作成した。この場合、特に医療倫理面での配慮、明確な有効性の効果判定を得ることに重点を置いた。また作成された製品の無菌性に関する研究を行い、それをふまえて無菌性を完全なものとした。

A. 研究目的

1. 現在当研究班にて作成されている人工赤血球の安全性の一部としてその無菌性を検討し、その改善を計ること
2. 前臨床試験にてその安全性と有効性が確立され、かつ第1相試験にても安全性が認められた場合をふまえて、次の第2相試験での臨床治験の具体的な計画を構築することを目的とした。

B. 研究方法

1. 早稲田大学理工学総合研究センターより送付された人工赤血球(ヒトヘモグロビン小胞体・生理食塩水浮遊液)を室温1週間、4℃で1-4週間の定温保存、3週間の凍結保存の後、液体培地、および寒天培地に移し、37℃にて2週間好氣的、ならびに嫌氣的に培養して細菌、ならびに真菌の発生状況を検討した。
2. 国内、ならびに国外の主な研究施設に現在当研究班で開発中の人工赤血球の性状を紹介して、もし将来このような人工赤血球を入手された場合、これを用いて臨床治験を行うとするとすればいか

なる治験計画を立案されるかアンケート形式にて質問した。特に、治験対象者とで交わす informed consent を得るための方法、それに必要な時間について詳細な回答を求めた。その結果をもとに独自の治験計画を立案した。

C. 研究結果

1. 第1回配布のHb小胞体についてはグラム陰性桿菌が検出された。直ちに製剤担当分担研究員に連絡、最終段階で製品の濾過に用いるフィルターを孔径0.2 μmのものに変更した。その結果、室温、4℃低温の1週間、4週間の別なくいかなる細菌、真菌も検出されなくなった。
2. アンケートから得られた結果では、informed consent を得るには平均5.2時間を要することが、また緊急手術を対象とした場合、この種の治験で informed consent を得ることは43%の施設で困難であることが認められた。さらに中心静脈カテーテルの挿入、動脈ラインの確保には少なくともこの種の治験でも実施可能であることが認められた。その結果、われわれは希釈式自己血輸血での血液置換液

として開発中の人工血液を適応させることが倫理的にも、また有効性判定の确实性の点においても最も優れている結果を得た。

D. 考察

製品の無菌性に関しては今後も抜取り検査を続けて確認して行くことが必要である。しかし一貫した工業生産を行う時期となれば無菌性は一段と确实なものとなろう。しかし今後は炭酸ガス封入による滅菌法などを検討していくべきものと考えた。

臨床治験に関しては、希釈式自己血輸血で行うべきであるとの結論は得たが、現製品が生理塩水を媒質としているために膠質物質の添加は必須と思われる。血小板機能への影響を考えるとアルブミンは膠質物質として好ましい。しかしアルブミン製造資源としてのヒト血漿の供給問題、その価格等を考慮すれば人工膠質を使用せざるを得ない。しかし今回作成した治験計画に記述したごとく出血血液量に等量の人工血液、それに加えてその 1/2 量の人工膠

質液を使用することにより、2000 mL 程度の血液交換に適応できると思われた。

E. 結論

現在開発中の人工血液の細菌学的安全性は確保できることが認められた。また臨床治験では希釈式自己血輸血へ本製品を応用することが最も適切であると結論された。

F. 研究発表

論文発表

1. 高折益彦, “人工血液としての条件 – liposome-encapsulated hemoglobin の有効性、安全性への検討”, *人工血液* **10**, 28-35 (2002).
2. 高折益彦, “人工血液 (HbV) 安全性、有効性に関する治験計画経の検討”, *人工血液* **10**, 99-106 (2002).

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： Hb 小胞体による血液置換時の微小循環動態に関する研究

分担研究者 外 須美夫 北里大学医学部麻酔科 教授

研究要旨

赤血球代替物のヘモグロビン(Hb)小胞体を用いて血液置換を行い、微小循環での血流及び白血球応答について検討した。麻酔下の Golden hamster の右頸動脈より 0.5ml の脱血と、右頸静脈より Hb 小胞体またはアルブミン (Alb) 0.5ml の注入を合計 6 クール (総量 3.0ml) の血液置換を行ない、ヘマトクリット、白血球、体血圧、心拍数を測定した。左頬袋粘膜の細静脈を露出し、血液置換中の細静脈の血流量、血流速度、血液量を計測した。また、細静脈にロイコトリエン B4 (LTB4) を局所投与し、光学顕微鏡下に白血球の粘着(adhesion)、血管外遊走(migration)を計測した。平均体血圧は、Hb 小胞体では置換前は 99 mmHg、置換後は 102 mmHg に保たれたが、Alb では 98 から 80mmHg へと有意に低下した。血液置換中の頬粘膜微小血管血流量、微小血管血流速度は、Hb 小胞体では次第に低下傾向にあるが、Alb では置換終了まで保たれた。LTB4 の投与による白血球の細静脈壁への粘着及び壁肥厚は、Alb に比べ Hb 小胞体では有意に抑制された。また、血管外遊走白血球数は、Hb 小胞体で有意に減少した。Hb 小胞体による約 40%置換では、心拍数、体血圧は保たれ、また起炎物質による血管壁への白血球の粘着、血管外遊走が抑制された。

A. 目的

赤血球代替物の Hb 小胞体を用いて血液置換を行い、体循環への影響と微小循環での血流及び白血球応答について検討する。とくに、炎症時に生じる白血球の白血球の粘着と血管外遊走に Hb 小胞体による血液置換がどのように影響するかを検討する。

B. 方法

Golden hamster を腹腔内ウレタン麻酔後、気管切開し、自発呼吸下に右頸動静脈にカニューレを挿入した。右頸動脈より 0.5ml の脱血と、右頸静脈より Hb 小胞体または Alb 0.5ml の注入を 1 クールとして、合計 6 クール (総量 3.0ml) の血液置換

を行ない、ヘマトクリット、白血球、体血圧、心拍数を測定した。左頬袋粘膜の細静脈を露出し、Hb 小胞体及び Alb で血液置換中の細静脈の血流量 (Flow)、血流速度(Velocity)、血液量(Mass)を計測した。また、異なった hamster で同様の血液置換後、細静脈にロイコトリエン B4 (LTB4) を局所投与し、光学顕微鏡下に白血球の粘着(adhesion)、血管外遊走(migration)を計測した。

C. 結果

ヘマトクリットは、Hb 小胞体で 38%、Alb で 39% 低下した。白血球は 45%減少した。平均体血圧は、Hb 小胞体では置換前は 99 mmHg、置換後は 102 mmHg と保たれたが、Alb では 98 から 80mmHg

へと有意に低下した。心拍数の平均値は、Hb 小胞体で 412 から 392 bpm へ、Alb で 418 から 390 bpm へ軽度減少した。また、血液置換中の類粘膜微小血管血流量、微小血管血流速度は、Hb 小胞体では次第に低下傾向にあるが、Alb では置換終了まで保たれた。微小血管血液量は、差を認めなかった。さらに、LTB₄ の投与による白血球の細静脈壁への粘着及び壁肥厚は、Alb に比べ Hb 小胞体では有意に抑制された。また、血管外遊走白血球数は、Hb 小胞体で有意に減少した。

D. 考察

Hb 小胞体はヘモグロビンを核として周囲を脂質で被覆して作成した物質で、酸素運搬能をもち赤血球の代替物として期待されている。今回の Hb 小胞体による約 40% 置換では、心拍数、体血圧は保たれ、また起炎物質による血管壁への白血球の粘着、血管外遊走は抑制された。一方、局所血流量は Alb に比べ低下する傾向にあり、白血球動態については血流量の違いが影響している可能性も考えられた。

E. 結論

Hb 小胞体を用いた 40% 血液置換により心拍数、体血圧は維持され、白血球動態は抑制された。出血時の Hb 小胞体の使用は、血圧を維持し、また白血球による細胞障害を抑制する可能性が示唆される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

Sumio Hoka, Akiko Ozawa, Yoshihiro Nara / Effect of artificial oxygen carrier on neutrophil movement in the microvasculature of hamster cheek pouch. / IX International Symposium on Blood Substitutes, Tokyo 2003

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：Hb 小胞体の全身の血管透過性に及ぼす影響

分担研究者 小川 龍 日本医科大学 教授

研究要旨

赤血球代替物が体内において、血管作動性因子を誘導・遊離して血管の透過性を亢進しては臨床応用できない。そこで当研究班が開発したヘモグロビン(Hb)小胞体が血管内に輸注したときに血管の透過性に与える影響について検討した。ウイスター系ラットを対象に 10% Hb 小胞体を体重の 1/50 量を静脈内投与した。10 分後色素であるポントカインスカイブルーを 50mg/kg を静脈内投与した。60 分後に屠殺して、主要臓器を摘出して細胞間室に移行した色素量を定量した。Hb 小胞体投与群は対照群に比較して、筋肉、肝臓、腸管、心臓、肺において色素含有量に差が見られなかったことから、Hb 小胞体が血管透過性を亢進しないことが示された。

A. 研究目的

ヘモグロビン小胞体 (HbV) は脂質を用いた小胞体に Hb を包埋した人工赤血球であり、臨床応用が期待される。Hb 小胞体の問題点の一つに血管透過性の有無がある。その理由は、細菌由来脂質や脂質代謝産物は血管透過性を発揮することが報告されている¹⁾。また Hb 小胞体が白血球や血小板に作用してサイトカインなどを遊離する可能性がある。そこで本研究ではラットを対象とし、Hb 小胞体が血漿と結合している色素の血管外移行を促進するかどうかを検討した。

B. 研究方法

体重 300-350 g のウイスター系ラットを実験対象とした。ラットは購入後 1 週間 23℃ のケージで水分と固形飼料を自由に摂らせて飼育した。動物を 6 匹ずつ 3 群に分け、第 1 群は無処置対象群として、5% アルブミン、Hb 小胞体を当為寄せず、生理的食塩水と色素と投与した。第 2 群は対象群で 5% アルブミンと色素を投与した、第 3 群は実験群で、色素および Hb 小胞体を投与した。

ペントバルビタール 50 mg/kg を腹腔内投与して麻酔した。伏臥位に固定し、尾錠脈に 24G テフロン外套針刺入し、外套を留置した。第 1 群では、生食液を体重の 5% (平均 15.8 mL) を 30 分を要して輸注した 10 分後、ポントカイン・スカイ・ブルー (PSB) を 50mg/kg (平均 15.8 mg) 投与した。第 2 群では静脈より 5% ヒトアルブミン液を体重の 5% (16.6 mL) 投与した 10 分後に、PSB (50mg/kg、平均 16.6 mg) を静脈内投与した。第 3 群は 10g/dL に調整した Hb 小胞体を体重の 5% (17.3 mL) 輸注した 10 分後に、PSB (50mg/kg、平均 16.6 mg) を投与した。提供された Hb 小胞体試料は、投与前に 10 分間酸素を送吹して、脱窒素を行った。PSB を投与してから 60 分後に頸髄骨折により屠殺してから、上・下大静脈を切離し、左室へカニュレを留置し、生食液で循環血液を体外に洗い出した。その後、組織 (腹筋、肝臓、腸管、心臓、肺) を一部摘出し、これらの臓器に含まれる色素濃度を定量した。操作は Ishida ら²⁾の方法に従った。

摘出した臓器は生理液で洗浄し、質重量を測定後密封小プラスチック試験管に封じ、冷凍保存し

た。臓器色素量定量時は、臓器を 10 倍量の 6% 硫酸ナトリウム溶液と共に均質化し、臓器重量の 30 倍量のアセトンを加えて色素を抽出した。抽出液の 590nm での吸光度より PSB の濃度を定量した。色素濃度は臓器 1g あたりの色素濃度 ($\mu\text{g/g}$) で表現した。得られた数値は平均値で代表し、分散の度合いは平均偏差で示した。3 群間の度鬱臓器色素含有量平均値の非同等性は一次元配置分散分析で検討した。そして任意 2 群間の同一臓器の平均値の差は t 検定で行ったが、有位水準を ($P=0.05/3=0.017$) とした。

C. 研究結果

3 群のラットの体重は、第 1 群 (6 匹) $315 \pm 12\text{g}$ 、第 2 群 (6 匹) $332 \pm 10\text{g}$ 、第 3 群 (6 匹) $345 \pm 17\text{g}$ で差はなかった。3 群の 5 個の臓器の PBS 濃度は表 1 に示す。3 群の筋肉、肝臓、腸管、心筋、肺の色素濃度は、分散分析において、群内においてもまた群間には有意な差は観察されなかった。

D. 考察

Hb 小胞体は二分子膜を構成する脂質に Hb を加え、Hb を小胞体化したものである。Hb 小胞体が白血球や血小板を刺激して、サイトカインやセロトニンなどの血管作動性物質を誘導分泌するなら血管透過性を亢進する可能性がある。本研究においては、体重の 5% に相当する量の生食液、5% アルブミン、10% Hb 小胞体を脱血せずに輸注した。この設定は臨床とは異なるが、脱血を行わなかった理由は、可能な限り平常な状態において Hb 小胞体の血液細胞あるいは血漿への影響を把握するためであった。実験の設定ではラットの循環血液量

は過剰となり、血漿成分は血管外へ押出される方向にあった。生食液は 3/4 が血漿より細胞間質へ移行することから、循環家適量の増加作用は軽度であった。しかし 5% アルブミン群、10% Hb 小胞体群では循環家適量は倍増したと考えられる。そのような状態においても、血漿蛋白質と結合していた色素の血管外移動が有意に増加しなかったことは、血管透過性が亢進しなかったことを示している。

以上の結果は Hb 小胞体が循環血液中へ輸注されても、血管の透過性亢進を生じないことを示した。この結果は Hb 小胞体を臨床応用する場合、大きな意味がある。

E. 結論

Hb 小胞体は体重の 5% の量を輸注しても、血管の透過性を亢進しない。この結果は Hb 小胞体が血液細胞成分あるいは血漿成分に作用して、血管作動性物質を誘導・遊離することが少ないことを示している。

F. 研究発表

日本麻酔科学会関東甲信越地方会で発表の予定である。その後日本麻酔科学会の機関誌 “J Anesthesia” へ投稿の準備をしている。

引用文献

- 1) Fujii E., Irie K., Ogawa R. et al., Role of nitric oxide and prostaglandins in lipopolysaccharide-induced increase in vascular permeability in mouse skin. *Eur. J. Pharmacol.* 297: 257-63, 1996.
- 2) Ishida H., Irie K., Suganuma T. et al., A lipid A analog ONO-4007 induces tolerance to plasma leakage in mice. *Inflamm. Res.*, 51, 038-43, 2002

表 1 臓器の色素含有量 (平均±標準偏差)

	臓器の色素濃度 ($\mu\text{g/g}$)				
	筋肉	肝臓	腸管	心筋	肝臓
第 1 群	8.2 ± 2.8	12.6 ± 3.9	18.5 ± 6.2	9.6 ± 2.6	16.9 ± 3.4
第 2 群	12.8 ± 4.0	18.6 ± 2.8	17.7 ± 4.0	16.0 ± 4.3	19.3 ± 4.5
第 3 群	12.0 ± 3.7	20.1 ± 6.7	17.3 ± 7.1	12.4 ± 4.1	22.4 ± 3.7

別添 6

表 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日 (impact factor)	刊行書店名	執筆者名
<i>J. Biochem.</i> 131 , 611 - 617 (2002). “Characteristics of bovine hemoglobin for the potential source of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier.”	2002 年 4 月 (1.990)	Japanese Biochemical Society	Hiromi Sakai Yohei Masada Shinji Takeoka Eishun Tsuchida
<i>J. Artif. Organs</i> 5 , 102-107 (2002). “Carbonylation of oxyhemoglobin solution using a membrane oxygenator.”	2002 年 4 月	Japanese Society for Artificial Organs	Ippei Fukutomi Hiromi Sakai Shinji Takeoka Hiroyuki Nishide Eishun Tsuchida Kiyotaka Sakai
<i>J. Artif. Organs</i> 5 , 141-145 (2002). “Study of virus removal from hemoglobin solution using PLANOVATM-15N.”	2002 年 4 月	Japanese Society for Artificial Organs	Yoshiyasu Naito Ippei Fukutomi Yohei Masada Hiromi Sakai Shinji Takeoka Eishun Tsuchida Hideki Abe Junichi Hirayama Kenichi Ikebuchi Hisami Ikeda
<i>Bioconjugate Chem.</i> , 13 , 397-402 (2002). “Effect of Heme Structure on O ₂ -Binding Properties of Human Serum Albumin-Heme Hybrids: Intramolecular Histidine Coordination Provides a Stable O ₂ -Adduct Complex”	2002 年 5 月 (3.044)	The American Chemical Society	Teruyuki Komatsu Yasuko Matsukawa Eishun Tsuchida
<i>Microvasc. Res.</i> 64 , 120-126 (2002). “Capillary blood flow during severe hemodilution observed by non-invasive transcutaneous technique using a flash epi-illumination.”	2002 年 7 月 (1.474)	Academic Press Inc.	Hiromi Sakai Toshiyuki Sato Yasunori Maekawa Eishun Tsuchida
<i>Macromol. Symp.</i> 186 , 1-6 (2002). “Human Serum Albumin Incorporating Synthetic Hemes as an O ₂ -Carrying Hemoprotein: Control of O ₂ -Binding Ability by Heme Structure”	2002 年 8 月 (0.634)	Wiley-V C H Verlag GMBH	Eishun Tsuchida Teruyuki Komatsu Yasuko Matsukawa Tomoyuki Okada
<i>Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.</i> 283 , H1191-H1199 (2002). “Systemic and Microvascular responses to the hemorrhagic shock and resuscitation with Hb-vesicles”	2002 年 9 月 (3.232)	American physiological Society	Hiromi Sakai Shinji Takeoka R. Wettstein A.G. Tsai M. Intaglietta Eishun Tsuchida
<i>Bioconjugate Chem.</i> , 13 , 1302-1308 (2002). “Effect of Hb-encapsulation with vesicles on H ₂ O ₂ reaction and lipid peroxidation.”	2002 年 10 月 (0.406)	The American Chemical Society	Shinji Takeoka Yuji Teramura Tomoyasu Atoji Eishun Tsuchida
<i>Polym. Adv. Technol.</i> , 13 , 845-850 (2002). “Preservation Stability and <i>In Vivo</i> Administration of Albumin-heme Hybrid Solution as an Entirely Synthetic O ₂ -Carrier”	2002 年 10 月 (0.701)	John Wiley & Sons INC	Eishun Tsuchida Teruyuki Komatsu Tetsuya Yanagimoto Hiromi Sakai

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日 (impact factor)	刊行書店名	執筆者名
<i>Chem. Eur. J.</i> , 8 , 5469–5480 (2002). “Self-organized Lipid-porphyrin Bilayer Membranes in Vesicular Form: Nanostructure, Photophysical Properties and Dioxygen Coordination”	2002年12月 (4.614)	John Wiley & Sons LTD	Teruyuki Komatsu Miho Miritake Akito Nakagawa Eishun Tsuchida
<i>J. Biomed. Mater. Res.</i> , 64A , 48–51 (2003). “Oxygenation of Hypoxia Region in Solid Tumor by Administration of Human Serum Albumin Incorporating Synthetic Hemes”	2003年1月 (2.105)	John Wiley & Sons INC	Koichi Kobayashi Teruyuki Komatsu Arifumi Iwamaru Yasuko Matsukawa Masazumi Watanabe Hirohisa Horinouchi Eishun Tsuchida
<i>J. Biomed. Mater. Res.</i> , 64A , 257–261 (2003). “Human Serum Albumin Incorporating Synthetic Heme: Red Blood Cell Substitute without Hypertension by Nitric Oxide Scavenging”	2003年1月 (2.105)	John Wiley & Sons INC	Eishun Tsuchida Teruyuki Komatsu Yasuko Matsukawa Akito Nakagawa Hakai Sakai Koichi Kobayashi Makoto Suematsu
<i>Clin. Chem. Lab. Med.</i> 41 , 222-231 (2003). “Pretreatment of serum containing Hb-vesicles (oxygen carriers) to avoid their interference in laboratory tests”	2003年2月 (1.595)	Walter de Gruyter & CO	Hiromi Sakai Kenichi Tomiyama Yohei Masada Shinji Takeoka Hirohisa Horinouchi Koichi Kobayashi Eishun Tsuchida
<i>J. Biomed. Mater. Res.</i> , 64 , (2003). “Compatibility of Albumin-based O ₂ -Carrier (Albumin-heme) with Blood Cell Components <i>in vitro</i> ”	印刷中 (2.105)	John Wiley & Sons INC	Yubin Huang Teruyuki Komatsu Akito Nakagawa Eishun Tsuchida
<i>Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.</i> 64A , (2003). “Normovolemic hemodilution with hemoglobin-vesicle solution attenuates hypoxia in ischemic hamster flap tissue.”	印刷中 (3.232)	American physiological Society	D. Erni R. Wettstein S. Schramm C. Contaldo Hiromi Sakai Shinji Takeoka Eishun Tsuchida M. Leunig A. Banic
<i>人工血液</i> 10 , 47-53 (2002). “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”	2002年6月	日本血液代替物学会	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
<i>人工血液</i> 10 , 120-125 (2002). “自己組織化リポドヘム小胞体のナノ構造と酸素結合能”	2002年8月	日本血液代替物学会	小松晃之, 森武美保, 土田英俊
<i>Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.</i> 283 , H861-H870, (2002). “Stabilization of mast cells by heme oxygenase-1: an anti-inflammatory role.”	2002年9月 (3.232)	American physiological Society	Takamiya R. Murakami M., Goda N. Makino N. Kajimura M. Takamiya Y. Yamaguchi T. Ishimura Y., Hozumi N. Suematsu M.

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日 (impact factor)	刊行書店名	執筆者名
<i>Microcirculation</i> 9, 259-276 (2002). The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension.	2002年8月 (2.306)	Nature American Inc., New York	Suematsu M., Suzuki H. DeLano, F.A. Schmid-Schoenbein G.W.
<i>Anesthesiology</i> 97, 701-709 (2002). Carbon monoxide modulates endotoxin-induced microvascular leukocyte adhesion through platelet-dependent mechanisms.	2002年9月 (3.381)	Lippincott Williams & Wilkins	Morisaki H. Katayama T., Kotake Y. Handa M., Ikeda Y. Takeda J., Ito M. Suematsu M.
<i>FASEB J</i> 17 U126-U148 (2003). Visualization of gaseous monoxide reception by soluble guanylate cyclase in rat retina.	2003年1月 (8.817)	Federation Amer. Soc. Exp. Biol., Bethesda	Kajimura M. Shimoyama M. Tsuyama S., Suzuki T. Ihara H. Kozaki S. Tsubota K., Oguchi Y. Suematsu M.
<i>Circ Res</i> 91, e55-e64 (2002). Nonendothelial source of nitric oxide in arterioles but not in venules: Alternative source revealed in vivo by diaminofluorescein microfluorography.	2002年12月 (9.213)	Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia	Kashiwagi S. Kajimura M. Yoshimura Y. Suematsu M.
<i>Antioxid. Redox Signal</i> . In press (2003) Visualization of gaseous signal transduction in biological system.	印刷中		Suematsu M. Kashiwagi S.
<i>Nat. Immunol.</i> 4, 154-160 (2003). Subendothelial dome of gut Peyer's patches is the essential anatomical site in initiating acute graft-versus-host disease.	2003年2月 (17.431)	Nature America, Inc.	Murai M., Yoneyama H. Ezaki T., Suematsu M. Terashima Y. Harada A., Hamada H. Asakura H. Ishikawa H. Matsushima K.
人工血液 10, 28-35 (2002). 人工血液としての条件 - liposome-encapsulated hemoglobin の有効性、安全性への検討”	2002年2月	日本血液代替物学会	高折益彦
人工血液 10, 99-106 (2002). 人工血液 (HbV) 安全性、有効性に関する治験計画”	2002年9月	日本血液代替物学会	高折益彦

研究成果による知的所有権の取得状況

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

その他刊行物

- 1) バイオマーケット “人工血液〇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)

20021044

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.73－P.75の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。