

20021045

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14年度 総括・分担研究報告書

平成15年3月

主任研究者 北 畠 顕

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 北島 颯	1
II. 分担研究者	
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 佐久間 一郎	8
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 藤井 聡	15
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 仲井 邦彦	18
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 藤堂 省	24
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 劔物 修	35
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 小田切 優樹	40
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 並河 和彦	44
8. 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 宮尾 秀樹	47
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	53
IV. 研究成果の刊行物・別刷	55

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 北島 顕 北海道大学医学研究科教授

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）エマルジョン製剤の開発を行ってきた。本年度は、SNO-PEG-Hb については、臨床での投与時にその NO 放出能が肝細胞への細胞傷害軽減に作用する可能性を検索する目的で、interleukin (IL)-1 と IL-6 のヒト肝由来細胞 HepG2 での障害の指標として plasmin activator inhibitor-1 (PAI-1) 産生に及ぼす影響を評価した。IL-1 および IL-6 は濃度依存性に PAI-1 産生を増加したが、SNO-PEG-Hb は濃度依存性に培養上清中の抗原量から予測される PAI-1 産生を抑制し、SNO-PEG-Hb はまた PAI-1 活性も抑制した。これらの抑制作用は NO 放出能のない PEG-Hb では見られず、培養上清の総蛋白量には変化が見られなかったことから、SNO-PEG-Hb は NO を放出により肝細胞での PAI-1 産生を抑制すること示唆された。SNO-PEG-Hb は線溶系を改善し、血栓形成に抑制的に働くと考えられ、SNO-PEG-Hb は血管拡張性と抗血栓性を備えた好ましい人工赤血球となり得る可能性が示された。また、SNO-PEG-Hb の脳虚血-再開通障害治療への応用の可能性について、一過性脳虚血モデルラットを用いて検討した。両側総頸動脈閉塞による不完全脳虚血 (2VO) ラットにおける海馬 CA1 領域および歯状回領域における長期増強 (LTP) 形成は、虚血 (10 分間)-再開通後 4 日目まで、時間とともに障害された。2VO による LTP 形成障害は、虚血-再開通後の SNO-PEG-Hb 処置により改善される傾向を示した。再開通 48 時間後 SNO-PEG-Hb 処置群における LTP 形成は、vehicle 処置 2VO 群との間に有意差が示した。一方、PEG-Hb は 2VO による LTP 形成障害を改善せず、逆に、再開通直後 PEG-Hb 処置群における LTP 形成は、vehicle 処置 2VO 群に比較して有意に抑制されたことから、NO 供与能を有する SNO-PEG-Hb が脳虚血-再開通障害における新たな治療戦略となる可能性が示された。一方、中大脳動脈梗塞モデルへの SNO-PEG-Hb 投与と梗塞層の縮小効果を検討し、ラットの頸動脈から先端を太くした合成糸を末梢に通し、中大脳動脈分岐部で中大脳動脈を閉塞させた。1 または 2 時間の閉塞後、糸を抜去して閉塞を解除し再灌流させ 10% SNO-PEG-Hb (処置群) または生理食塩液 (対照群) 0.25 ml/100 gBW を尾静脈より投与した。再灌流 24 時間または 48 時間後に神経障害スコアを記録し、断頭後脳を 2mm 切片に切り梗塞層の容積と百分率を求めたが、神

心臓虚血再灌流障害に対する新規パーフルオロケミカルエマルジョンの効果

A. 研究目的

人工赤血球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、以前わが国では世界に先駆けてミドリ十字製 Fluosol-DA[®] 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た。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%) による低酸素供給能、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、製造が中止された。近年、米国で改良された 60%PFC 製剤 (Oxygent[®]) 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た。しかし、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、治験が中断され、治験から撤退の見込みである。

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 エマルジョン製剤の改良を行ってきた。そして、Fluosol-DA[®] 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) にて修飾した新規製剤を創製した。同製剤は生体内投与後の副作用の軽減、血小板活性化の低減など bioavailability の高いことを確認している。

また昨年度から、単離臓器保護用にさらに新たな製剤を創生し、昨年度から移植臓器保護目的で、その有効性を検討してきた。本研究では心臓虚血再灌流障害に対する新規 PFC 製剤の有用性の検討を行った。

B. 研究方法

使用した PFC エマルジョン製剤は本研究班の研究協力者、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、PFC (FC-43) 820 g に界面活性剤 (乳化剤) として HCO-60 を 33 g を加え、注射用水 1200 を添加して PFC 50% (w/v) としたものである。調製法としては、窒素置換した注射用水に HCO-60 を分散し、窒素気流下、高圧ジェット流型乳化機を用い、デュアルフィード法 15,000 psi の運転圧力で FC43 を乳化した。その後、30,000 psi の運転圧力にて本乳化し、平均粒子径 210 nm のエマルジョン製剤とした。本 PFC エマルジョン製剤は、冷所あるいは室温保存において、数ヶ月間は安定であった。

使用動物：体重 400-500g の Hartley 系雄性モルモットを使用した。Krebs-Henseleit 液 (KHS) を対照群とし、KHS+5% PFC エマルジョン (BSA 1%含有) 群、KHS+15% PFC エマルジョン (BSA 3%含有) 群、KHS+30% PFC エマルジョン (BSA 3%含有) 群、計 4 群を比較検討した (各群 n=6)。PFC エマルジョン群に使用した BSA 濃度は KHS 群の虚血前の灌流速度を対照とした予備実験により決定した。

使用 buffer：使用した Krebs-Henseleit 液の組成は、NaCl 118.2 mmol/L, NaHCO₃ 25 mmol/L, KH₂PO₄ 1.0 mmol/L, KCl 4.83 mmol/L, MgSO₄ 2.37 mmol/L, CaCl₂ 2.5

mmol/L and Glucose 11.1 mmol/L である。また、PFC エマルジョン群では Krebs-Henseleit 液の電解質組成と同様になるよう電解質を補正した。

実験プロトコール：CO₂ 通気下で、モルモットの頸椎垂脱臼を行い心臓を摘出した。心臓ランゲンドルフ灌流装置を用いて、大動脈圧 30 mmHg、左室拡張期圧 10 mmHg、心表面温度 37°C 下で心臓を灌流後 30 分安定化した後、30 分間灌流 (pre-ischemic period) した。その後虚血 (37°C、30 分間) とし、45 分間再灌流 (reperfusion period) を実施した。なお、灌流液は 95% O₂、5% CO₂ で通気した。

測定項目および測定方法：血行動態の指標として心拍数、左室 Developed pressure (左室収縮気圧-左室拡張期圧)、Coronary flow rate (ml/g/min) を継続的に測定した。再灌流性不整脈として、心室細動 (VF) の持続時間および頻度を検討した。また、この再灌流性不整脈とノルエピネフリン放出量には正の相関性があることが知られているので、高速液体クロマトグラフィーにてノルエピネフリン (NE) を測定した。

統計処理：対照群と他群の比較は、unpaired student t test、虚血前との比較には、paired student t test を実施した。

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

血行動態：Coronary Flow Rate (ml/g/min) は、対照群で虚血前が 5.07 ±

0.68、再灌流 10 分後が 3.40 ± 0.87、再灌流後 45 分後が 2.89 ± 0.68 であり、虚血前と比較して有意に低値を示した。同様に、他の 3 つの PFC エマルジョン群も再灌流後 45 分の時点の数値は、虚血前と比較し有意に低値を示した。なお、虚血前、再灌流後 10 分および再灌流 45 分の対照群の数値は他の 3 つの PFC エマルジョン群と有意差を認めなかった。

心拍数は、対照群と 15% PFC エマルジョン群および 30% PFC エマルジョン群の推移には有意差を認めなかったが、5% PFC エマルジョン群は再灌流後、45 分の時点で有意に低値を示し、これは、虚血前の数値と比較しても有意に低値であった。

Developed pressure は、対照群および 5% PFC エマルジョン群では、虚血前の数値と比較し、再灌流 10 分および 45 分時点では有意な低値を示したが、15% PFC エマルジョン群および 30% PFC エマルジョン群では虚血前の数値と変化を認めなかった。また、対照群と比較し、5% PFC エマルジョン群では再灌流 10 分および 45 分時点で有意な低値を示したが、15% PFC エマルジョン群および 30% PFC エマルジョン群では対照群との間に有意差を認めなかった。

再灌流性不整脈：VF 持続時間は、対照群では、281.57 ± 62.09 秒であったが、5% PFC エマルジョン群 (292.33 ± 56.08 秒)、15% PFC エマルジョン群 (44.0 ± 15.17 秒) および 30% PFC エマルジョン群 (0 ± 0 秒) と、PFC エマルジョン群は濃度依存性に VF 持続時間を抑制した。同様に、VF 発生頻度も対照群および 5% PFC エマルジョン群では 100% 出現したが、15% PFC エマルジョン群では 83.3%、30% PFC エマルジョン群では

0%と、PFC エマルジョン群では濃度依存性にVF出現頻度が抑制された。

NE 放出量は、対照群では 1069.74 ± 177.31 pmol/g、5% PFC エマルジョン群 594.44 ± 71.31 pmol/g、15% PFC エマルジョン群 332.83 ± 18.67 pmol/g および 30% PFC エマルジョン群 248.94 ± 55.46 pmol/g と濃度依存性に減少した。また、この NE 放出は、NE neuronal uptake inhibitor である desipramine、および sodium-hydrogen exchanger inhibitor である EIPA により抑制されたことから、主に carrier-mediated NE release 機構を介すものと考えられた。

D. 考案

本研究により、新規 PFC エマルジョンは単離モルモット心の虚血再灌流障害を軽減することが明らかとなった。

PFC エマルジョン添加群では、15% 以上を投与された群で、虚血再灌流に Developed Pressure の低下が軽減された。この際、NE 放出も抑制され、その結果 VT 発生も減少した。この NE 放出抑制は、carrier-mediated と考えられたが、PFC エマルジョンにより虚血時の酸素供給がある程度保たれた結果、交感神経終末の ATP sensitive な NE 放出機構を正常に機能することができたためと推察される。

本研究の結果から、心筋虚血時に PFC 型人工血液を投与することにより、心機能はある程度保持し得ることが示唆された。しかし、本研究で用いられた FC-43 は生体内投与の安全性が確認されていないので、さらに bioavailability が高い PFC を使用した製剤を用い、in vivo で検討をする必要

がある。また今後、さらに大型動物（イヌやブタ）の心臓を使用し、同様の心機能保護作用が得られるか否か検討する必要もあろう。

E. 結論

新規 PFC エマルジョン製剤を用い、心臓虚血再灌流障害を PFC エマルジョンが軽減するか否かを検討した。PFC エマルジョンを 15% 以上含有する液で灌流した場合、明らかに心筋保護作用が得られ、その際は NE 放出減少と VT 発生の減少が認められた。

PFC エマルジョン製剤には心臓虚血再灌流障害があり、今後臨床応用を進めるべく製剤の改良の必要性が示唆された。

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. Kunihiko Nakai, Ichiro Sakuma, Hiroko Togashi, Mitsuhiro Yoshioka, Hiroshi Satoh, Akira Kitabatake: S-nitro-sylated 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, 2003 in press
2. Yutaka Makino, Michiaki Imamura, Mitsuhiro Isaka, Shoji Fukushima, Ichiro Sakuma, Kunihiko Nakai, Satoshi Fujii, Akira Kitabatake,

- Yoshikazu Takeuchi, Osamu Kenmotsu, Keishu Yasuda: Artificial blood usage for non-transfusion cardiopulmonary bypass. *Artificial Organs* 2003 in press
3. 6. Mitsuhiro Isaka, Ichiro Sakuma, Michiaki Imamura, Yutaka Makino, Shoji Fukushima, Kunihiko Nakai, Norihiko Shiiya, Osamu Kenmotsu, Akira Kitabatake and Keishu Yasuda MD: The effects of a novel perfluorooctyle bromide emulsion administered during cardiopulmonary bypass: inflammatory reaction. *Artificial Organs* 2003, in press
 4. 佐久間一郎、北島 顕: NO と病態. 人工赤血球. *医学のあゆみ* 204(9): 631-635, 2003
 5. 藤井 聡、藤井ひとみ、富樫廣子、吉岡充弘、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: 31-34, 2002
 6. 藤井 聡、藤井ひとみ、富樫廣子、吉岡充弘、仲井邦彦、佐藤 洋、佐久間一郎、北島 顕、劔物 修: ヘモグロビン系人工酸素運搬体: 体外循環、人工血管コーティング、心筋保護等臨床応用にむけての基礎的検討. *Cardiovascular Anesthesia* 6: 67-71, 2002
 7. 藤井 聡、藤井ひとみ、富樫廣子、吉岡充弘、仲井邦彦、佐藤 洋、佐久間一郎、劔物 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: 17-20, 2002
2. 学会発表
 1. Subrina Jesmin, Hiroko Togashi, Hiroshi Otani, Kunihiko Nakai, Ichiro Sakuma, Mitsuhiro Yoshioka, Akira Kitabatake: An s-Nitrosylated Hemoglobin Derivative Protects Rat Brain From Cerebral Ischemia. 第67回日本循環器学会学術集会、福岡、2003.3.29. *Circulation J* 67(Suppl I): 221, 2003
 2. Isaka M, Imamura M, Makino Y, Fukushima S, Nakai K, Shiiya N, Sakuma I, Kenmotsu O, Kitabatake A, Yasuda K: Inflammatory Reactions Induced by an Application of Perfluorooctylbromide Protective Effects of a Novel Perfluorocarbon Emulsion Administered during Cardiopulmonary Bypass. Tokyo, 2003.3.4. *Artificial Blood* 11(1): 86, 2003
 3. Isaka M, Imamura M, Makino Y, Fukushima S, Nakai K, Shiiya N, Sakuma I, Kenmotsu O, Kitabatake A, Yasuda K: Inflammatory Reactions Induced by an Application of Perfluorooctylbromide Emulsion during Cardiopulmonary Bypass with Moderate Hemodilution. The 9th International Symposium on Blood Substitutes. Tokyo, 2003.3.4. *Artificial Blood* 11(1): 110, 2003
 4. Fukushima S, Kubota H, Kishimoto S, Sakuma I, Nakai K, Fujii S, Kitabatake A, Takeuchi Y: Effect of Pegylation on Stability, Toxicity, and Pharmacokinetics of Per-

- fluorocarbon Emulsion as Blood Substitutes. The 9th International Symposium on Blood Substitutes. Tokyo, 2003.3.4. Artificial Blood 11(1): 122, 2003
5. T Sugawara, K Nakai, H Togashi, I Sakuma, S Fujii, M Yoshioka, H Satoh A Kitabatake: S-nitroso-PEG-Hemoglobin as a Candidate for oxygen transporting material. The 13th World Congress of the International Society for Artificial Organs, Osaka, Japan 2002. 11. 6.
 6. K Nakai, H Togashi, T Sugawara, I Sakuma, M Yoshioka, H Satoh, A Kitabatake: Safety evaluation of S-nitrosylated pegylated hemoglobin as a candidate oxygen carrier. The 13th World Congress of the International Society for Artificial Organs, Osaka, Japan 2002. 11. 6.
 7. Satoshi Fujii, Ichiro Sakuma, Keiko Watano, Daisuke Goto, Tomoo Furumoto, Takeaki Kaneko, Taeko Sugawara, Jie Dong, Naoki Ishimori, Yukihiro Nakai, Tetsuya Mishima, Zaman Tarikuz, Akira Kitabatake, Kunihiro Nakai: Novel Polyethylene Glycol Conjugated S-Nitrosylated Hemoglobin Potentially Inhibits Platelet Activation and Adhesion to Artificial Surfaces: Therapeutic Implications for Platelet-Rich Thrombus. 第 66 回日本循環器学会学術集会、札幌、2002. 4. 25. . Circulation J 66(Suppl I): 198, 2002
 8. 井坂光宏, 今村道明, 椎谷紀彦, 牧野裕, 福島昭二, 佐久間一郎, 仲井邦彦, 佐藤 洋, 北島 顕, 安田慶秀: 体外循環における人工血液添加の有効性. 第 40 回日本人工臓器学会大会、札幌、2002. 10. 4.
 9. 菅原 武, 富樫広子, 井坂光宏, 仲井邦彦, 藤井 聡, 佐久間一郎, 吉岡充弘, 安田慶秀, 佐藤 洋, 北島 顕: SNO-PEG-ヘモグロビン修飾体の生体適合性—肝臓と腎臓への影響—. 第 40 回日本人工臓器学会大会、札幌、2002. 10. 4.
 10. 佐久間一郎, 仲井邦彦, 福島昭二, 富樫廣子, 菅原 武, 藤井 聡, 並河和彦, 小田切優樹, 藤堂 省, 劔持 修, 吉岡充弘, 北島 顕: 臨床応用を目的とした人工赤血球の開発. 第 9 回日本血液代替物学会年次大会、熊本、2002. 9. 4.
 11. 浅沼博司, 野出孝一, 真田昌爾, 高島成二, 佐久間一郎, 北島 顕, 仲井邦彦, 堀 正二, 北風政史: 人工酸素運搬体 SNO-PEG-Hb の虚血心筋保護作用—NO 供与体としての役割. 第 2 回日本 NO 学会学術集会、東京、2002. 5. 24.
 12. 北島 顕, 佐久間一郎, 藤井 聡, 吉岡充弘, 富樫廣子, 仲井邦彦, 藤堂 省, 劔物 修, 安田慶秀, 福島昭二, 小田切優樹, 並河和彦: 臨床応用をめざした人工赤血球の開発. 第 2 回産学連携フォーラム—医学 2 0 0 2、東京、2002. 12. 18.
- 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 一酸化窒素(NO)供与能を有する人工酸素運搬体 SNO-PEG-Hb の脳虚血-再開通障害治療への応用の可能性について、一過性脳虚血モデルラットを用いて検討した。両側総頸動脈閉塞による不完全脳虚血(2VO)ラットにおける海馬 CA1 領域および歯状回領域における長期増強(LTP)形成は、虚血(10分間)-再開通後4日目(Day 4)まで、時間とともに障害された。2VOによるLTP形成障害は、虚血-再開通後のSNO-PEG-Hb処置により改善される傾向を示した。再開通48時間後(Day 2) SNO-PEG-Hb処置群におけるLTP形成は、vehicle処置2VO群との間に有意差が示した。一方、PEG-Hbは2VOによるLTP形成障害を改善せず、逆に、再開通直後(Day 0) PEG-Hb処置群におけるLTP形成は、vehicle処置2VO群に比較して有意に抑制された。これらの事実は、一酸化窒素(NO)供与能を付与したヘモグロビン修飾体、SNO-PEG-Hbが脳虚血-再開通障害における新たな治療戦略となる可能性を示唆するものである。

一酸化窒素供与能を有する人工酸素運搬体の脳虚血-再開通障害治療への応用に関する研究

A. 研究目的

我々は、人工酸素運搬体として、ヘモグロビン(Hb)修飾体の開発を進めてきた。すなわち、未修飾ヘモグロビンについて知られている血管収縮作用、腸管収縮作用、腎作用および血小板凝集惹起作用などの有害作用の軽減をはかるべく、ポリエチレングリコール(PEG)修飾によって分子サイズの増大を図り、加えてHbのβ鎖のSH基にNOを結合させる(s-ニトロソ化)ことによってNO供与能を付与したHb(SNO-PEG-Hb : SPEG)を作製し、評価を行ってきた。

SPEGは酸素供与能とNO供与能を有し、特に低酸素分圧部位において選択的に酸素供給を行うことが期待されている。また、PEG化することによって、未修飾ヘモグロビンで懸念されるHbのヘム代謝の結果として生じるラジカル産生を抑制することが示唆されている。

これらの根拠に基づいて、SPEGの急性脳循環不全治療への応用を企図し、一過性脳虚血モデルである2血管閉塞(2VO)ラットを用い、脳虚血-再開通後の海馬長期増強(long-term potentiation: LTP)におよぼす影響を検討した。対照として、PEG-Hb(PEG)およびフリーラジカル消去作用が知られているEdaravoneについても同様の実験を行い、SPEGの効果と比較検討した。

B. 研究方法

一過性脳虚血モデルの作製：

10～12 週齢の Wistar 系雄性ラットを使用した。2VO モデルはハロタン麻酔下に両側総頸動脈を10分間動脈クレンメにて閉塞することにより作製した。

Hb 修飾体の調整ならびに薬物投与：

期限切れ赤血球製剤より、高純度 stroma-free Hb を作製した。嫌気的条件下に PEG 修飾を行った。さらに PEG-Hb へ NO 付加するために、NO 供与体として s-ニトロソグルタチオンを用い、室温にて10時間反応させ、SPEG を調整した。

SPEG は、臨床応用に際しての投与時間 (Therapeutic time window) を想定して、脳虚血-再開通直後 (Day 0)、24 時間後 (Day 1)、48 時間後 (Day 2) あるいは 96 時間後 (Day 4) に、それぞれ、尾静脈内へ単回投与した。投与量は 250mg/kg とした。

PEG と同じ 250mg/kg を、Edarabone は 3 および 10mg/kg を、脳虚血-再開通直後 (Day 0)、24 時間後 (Day 1) あるいは 96 時間後 (Day 4) に尾静脈内に投与した。

海馬長期増強 (LTP) の測定：

2VO ラットにおける海馬における LTP は、虚血-再開通後 4 日目まで、時間とともに障害されることから、LTP の測定は脳虚血-再開通後 4 日目に行った。LTP 記録は、神経再生能が知られている歯状回顆粒細胞層シナプスについて実施した。

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 (the area under the curve: AUC) を以て、SPEG、PEG ならびに Edaravone の効果を評価した。

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出した。有意水準は危険率 5%に設定した。

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. 研究結果

2VOによる海馬LTP形成不全に対するSPEGの効果：

2VOによって障害された虚血4日目の歯状回領域におけるLTP形成は、虚血-再開通後にSPEG 250mg/kgを静脈内投与することによって改善される傾向を示した。SPEG のLTP改善効果は Day 2処置群において顕著であり、vehicle処置 2VO群との間に有意差が認められた(図-1A&B)。

2VOによる海馬LTP形成不全に対するPEGの効果：

2VOによって障害された虚血4日目の歯状回領域におけるLTP形成は、虚血-再開通後にPEG 250mg/kgを静脈内投与することによって改善されなかった。SPEG Day 0 処置群ではLTP障害が改善される傾向を示したのに対して、PEG Day 0 処置群ではむしろLTP形成不全を増悪し、両者の間には統計学的有意差が認められた(図-2A&B)。

2VOによる海馬LTP形成不全に対するEdaravoneの効果：

虚血-再開通直後 (Day 0) の Edaravone 処置 (3, 10 mg/kg, i. v.) は、用量依存性に 2VO による LTP 形成不全を改善した。Edaravone 処置 (10 mg/kg, i. v.) による LTP 改善効果は、Day 0 処置群において最も顕著であり、vehicle 処置 2VO 群との間に有意差が認められた (図-3A&B)。

D. 考察

酸素供与能に加え NO 供与能を有するヘモグロビン修飾体である SPEG は、2VO による LTP

形成障害に対して改善作用を示した。この効果は NO 供与能を有しないヘモグロビン修飾体 PEG では認められなかったことから、SPEG の NO 供与能が寄与している可能性が推測された。

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。シナプスの可塑的变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。なかでも歯状回領域におけるシナプス伝達効率、多くの脳循環障害治療薬によって改善されることから、脳虚血-再開通に伴った脳機能障害の評価系として用いられてきた。SPEG はいくつかの脳循環障害治療薬と同様に、2VO による LTP 形成障害を改善作用した。しかし、その改善効果は、時間的効果 (Therapeutic time window) という観点からは、従来の脳循環障害治療薬とは幾分様相と異なるものであった。たとえば、フリーラジカル消去作用を有する Edaravone の LTP 改善効果は、虚血-再開通直後 (Day 0) 処置群において最大であった。それに対して、SPEG の効果は、虚血-再開通直後 (Day 0) より Day 2 処置群において顕著であった。このように SPEG と Edaravone 間に Therapeutic time window における差が生じた理由は現在のところ不明である。Edaravone は主としてヒドロキシラジカルを捕捉することが知られている。虚血-再開通にともなって発生するラジカル分子種の時間的・空間的違いに起因するのかもしれない。また、フリーラジカル捕捉作用が期待されている PEG が 2VO による LTP 形成障害を改善せず、反対に悪化させたという事実は、SPEG による LTP 改善効果が単なるフリーラジカル捕捉作用では説明できないことを示しているのかもしれない。

SPEG は NO 供与能を有するヘモグロビン修飾体として、その多様な生理機能が注目されている。Hb の・鎖の SH 基に結合している NO が虚血-再開通障害部位においてどのような動態を

示すのかについては、NO 分子種、生体内における NO 担体蛋白等を含め不明の点が多い。一過性脳虚血ラット海馬では、LTP 形成障害に先行して NO 産生の亢進が観察される。誘導型 NO 産生酵素 (iNOS) 阻害薬により、虚血-再開通 24 時間後の NO 産生は抑制され、歯状回シナプスの LTP 形成不全は改善される。それに対して、非選択的 NO 産生酵素阻害薬は、一過性脳虚血後の死亡率を増加させる。このように、虚血-再開通後の時間経過によって、関連する NOS アイソフォームあるいは NO の役割が異なることが推測されており、それが SPEG の LTP 改善作用にみられる Therapeutic time window として反映されている可能性がある。事実、2VO により、e-NOS、n-NOS、iNOS の発現はいずれも増加し、再開通直後 (Day 0) の Edaravone 処置は、2VO による n-NOS および iNOS 蛋白の発現を抑制するが、eNOS については反対に蛋白発現増加が認められた (図-4A-C)。SPEG 処置によって再開通障害部位において NO 動態がどのように変化するのか、それが虚血後の NOS 発現とそのような関連性を示すのかについては今後の課題である。

E. 結論

NO 供与能を有するヘモグロビン修飾体 SPEG は脳虚血-再開通障害による LTP 形成障害を改善した。NO 供与能を有しない PEG ではこのような改善効果は得られなかったことから、SPEG の脳虚血-再開通に伴った脳機能障害改善効果には、NO が重要な役割を担っている可能性がある。また、既存のフリーラジカルシカベンジャー Edaravone あるいは NOS 阻害薬による改善効果とは、Therapeutic time window の点において異なるという事実は、SPEG が既存の薬物とは異なった作用機序を有する可能性を示唆するものである。換言すれば、既存の治療薬との併用が期待できることから、新たな急性脳循環障害治療の戦略となる可能性がある。今後、SPEG の NO 供与能や酸素親和性に関する検討を

含む、さらなる研究が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kunihiro 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, 2003 in press
 2. Yutaka Makino, Michiaki Imamura, Mitsuhiro Isaka, Shoji Fukushima, Ichiro Sakuma, Kunihiro Nakai, Satoshi Fujii, Akira Kitabatake, Yoshikazu Takeuchi, Osamu Kenmotsu, Keishu Yasuda: Artificial blood usage for non-transfusion cardiopulmonary bypass. Artificial Organs 2003 in press
 3. Mitsuhiro Isaka, Ichiro Sakuma, Michiaki Imamura, Yutaka Makino, Shoji Fukushima, Kunihiro Nakai, Norihiko Shiiya, Osamu Kenmotsu, Akira Kitabatake and Keishu Yasuda MD: The effects of a novel perfluorooctyle bromide emulsion administered during cardiopulmonary bypass: inflammatory reaction. Artificial Organs 2003, in press
 4. 佐久間一郎、北畠 顕: NOと病態. 人工赤血球. 医学のあゆみ 204(9): 631-635, 2003
 5. 藤井 聡、藤井 ひとみ、富樫 廣子、吉岡 充弘、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: 31-34, 2002
 6. 藤井 聡、藤井 ひとみ、富樫 廣子、吉岡 充弘、仲井 邦彦、佐藤 洋、佐久間一郎、北畠 顕、劔物 修: ヘモグロビン系人工酸素運搬体: 体外循環、人工血管コーティング、心筋保護等臨床応用に向けての基礎的検討. Cardiovascular Anesthesia 6: 67-71, 2002
 7. 藤井 聡、藤井 ひとみ、富樫 廣子、吉岡 充弘、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: 17-20, 2002
- ##### 2. 学会発表
1. Subrina Jesmin, Hiroko Togashi, Hiroshi Otani, Kunihiro Nakai, Ichiro Sakuma, Mitsuhiro Yoshioka, Akira Kitabatake: An s-Nitrosylated Hemoglobin Derivative Protects Rat Brain From Cerebral Ischemia. 第67回日本循環器学会学術集会、福岡、2003.3.29. Circulation J 67(Suppl I): 221, 2003
 2. Isaka M, Imamura M, Makino Y, Fukushima S, Nakai K, Shiiya N, Sakuma I, Kenmotsu O, Kitabatake A, Yasuda K: Inflammatory Reactions Induced by an Application of Perfluorooctylbromide Protective Effects of a Novel Perfluorocarbon Emulsion Administered during Cardiopulmonary Bypass. Tokyo, 2003.3.4. Artificial Blood 11(1): 86, 2003
 3. Isaka M, Imamura M, Makino Y, Fukushima S, Nakai K, Shiiya N, Sakuma I, Kenmotsu O, Kitabatake A, Yasuda K: Inflammatory Reactions Induced by an Application of Perfluorooctylbromide Emulsion during Cardiopulmonary Bypass with Moderate Hemodilution. The 9th International Symposium on Blood Substitutes. Tokyo,

2003. 3. 4. Artificial Blood 11(1): 110, 2003
4. Fukushima S, Kubota H, Kishimoto S, Sakuma I, Nakai K, Fujii S, Kitabatake A, Takeuchi Y: Effect of Pegylation on Stability, Toxicity, and Pharmacokinetics of Perfluorocarbon Emulsion as Blood Substitutes. The 9th International Symposium on Blood Substitutes. Tokyo, 2003. 3. 4. Artificial Blood 11(1): 122, 2003
 5. T Sugawara, K Nakai, H Togashi, I Sakuma, S Fujii, M Yoshioka, H Satoh A Kitabatake: S-nitroso-PEG-Hemoglobin as a Candidate for oxygen transporting material. The 13th World Congress of the International Society for Artificial Organs, Osaka, Japan 2002. 11. 6.
 6. K Nakai, H Togashi, T Sugawara, I Sakuma, M Yoshioka, H Satoh, A Kitabatake: Safety evaluation of S-nitrosylated pegylated hemoglobin as a candidate oxygen carrier. The 13th World Congress of the International Society for Artificial Organs, Osaka, Japan 2002. 11. 6.
 7. Satoshi Fujii, Ichiro Sakuma, Keiko Watano, Daisuke Goto, Tomoo Furumoto, Takeaki Kaneko, Taeko Sugawara, Jie Dong, Naoki Ishimori, Yukihito Nakai, Tetsuya Mishima, Zaman Tarikuz, Akira Kitabatake, Kunihiko Nakai: Novel Polyethylene Glycol Conjugated S-Nitrosylated Hemoglobin Potently Inhibits Platelet Activation and Adhesion to Artificial Surfaces: Therapeutic Implications for Platelet-Rich Thrombus. 第66回日本循環器学会学術集会、札幌、2002. 4. 25. . Circulation J 66(Suppl I): 198, 2002
 8. 井坂光宏, 今村道明, 椎谷紀彦, 牧野 裕, 福島昭二, 佐久間一郎, 仲井邦彦, 佐藤 洋, 北島 顕, 安田慶秀: 体外循環における人工血液添加の有効性. 第40回日本人工臓器学会大会、札幌、2002. 10. 4.
 9. 菅原 武, 富樫広子, 井坂光宏, 仲井邦彦, 藤井 聡, 佐久間一郎, 吉岡充弘, 安田慶秀, 佐藤 洋, 北島 顕: SNO-PEG-ヘモグロビン修飾体の生体適合性—肝臓と腎臓への影響—. 第40回日本人工臓器学会大会、札幌、2002. 10. 4.
 10. 佐久間一郎, 仲井邦彦, 福島昭二, 富樫廣子, 菅原 武, 藤井 聡, 並河和彦, 小田切優樹, 藤堂 省, 劔持 修, 吉岡充弘, 北島 顕: 臨床応用を目的とした人工赤血球の開発. 第9回日本血液代替物学会年次大会、熊本、2002. 9. 4.
 11. 浅沼博司, 野出孝一, 真田昌爾, 高島成二, 佐久間一郎, 北島 顕, 仲井邦彦, 堀 正二, 北風政史: 人工酸素運搬体 SNO-PEG-Hb の虚血心筋保護作用—NO 供与体としての役割. 第2回日本NO学会学術集会、東京、2002. 5. 24.
 12. 北島 顕, 佐久間一郎, 藤井 聡, 吉岡充弘, 富樫廣子, 仲井邦彦, 藤堂 省, 劔物修, 安田慶秀, 福島昭二, 小田切優樹, 並河和彦: 臨床応用をめざした人工赤血球の開発. 第2回産学連携フォーラム—医学2002、東京、2002. 12. 18.
- G. 知的所有権の出願・登録状況 なし

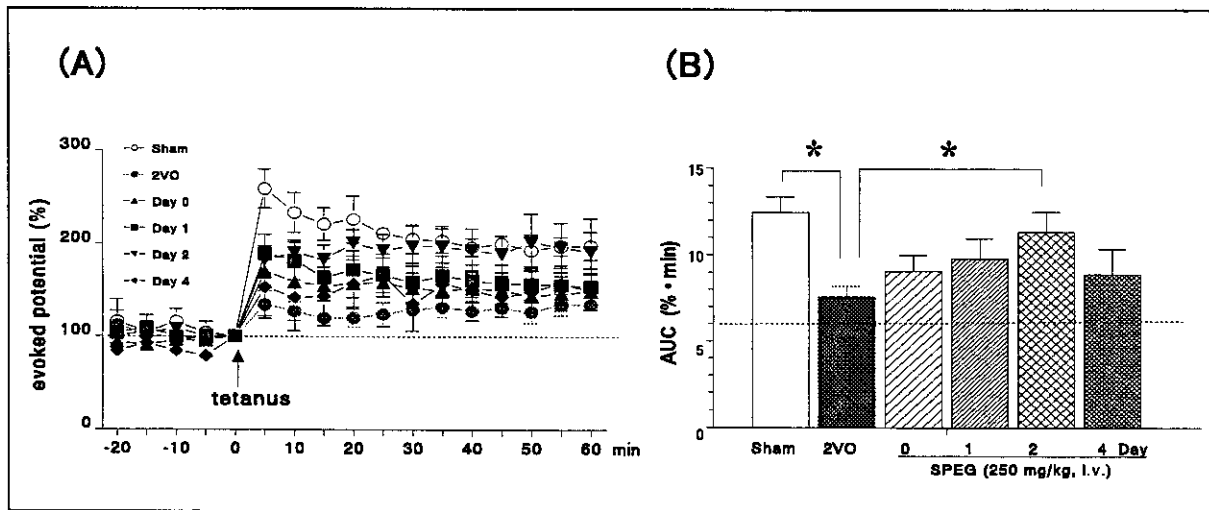


図-1 2VOによる海馬LTP形成不全に対するSPEGの効果

(A) 時間的推移

(B) 曲線下面積 (AUC) による評価

海馬歯状回領域におけるLTPは虚血4日目 (Day 4) に記録した。

SPEG 250mg/kgは、それぞれ、脳虚血-再開通直後 (Day 0)、24時間後 (Day 1)、48時間後 (Day 2) あるいは96時間後 (Day 4、tetanusの20分前) に尾静脈内へ単回投与した。P<0.05

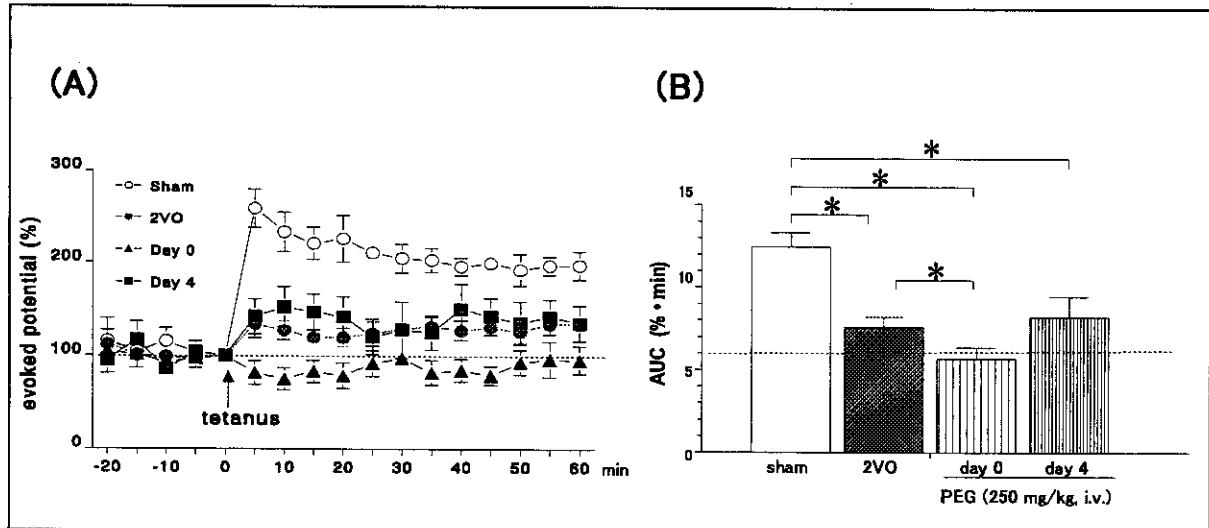


図-2 2VOによる海馬LTP形成不全に対するPEGの効果

(A) 時間的推移

(B) 曲線下面積 (AUC) による評価

海馬歯状回領域におけるLTPは虚血4日目 (Day 4) に記録した。

PEG 250mg/kgは、それぞれ、脳虚血-再開通直後 (Day 0)、あるいは96時間後 (Day 4、tetanusの20分前) に尾静脈内へ単回投与した。P<0.05

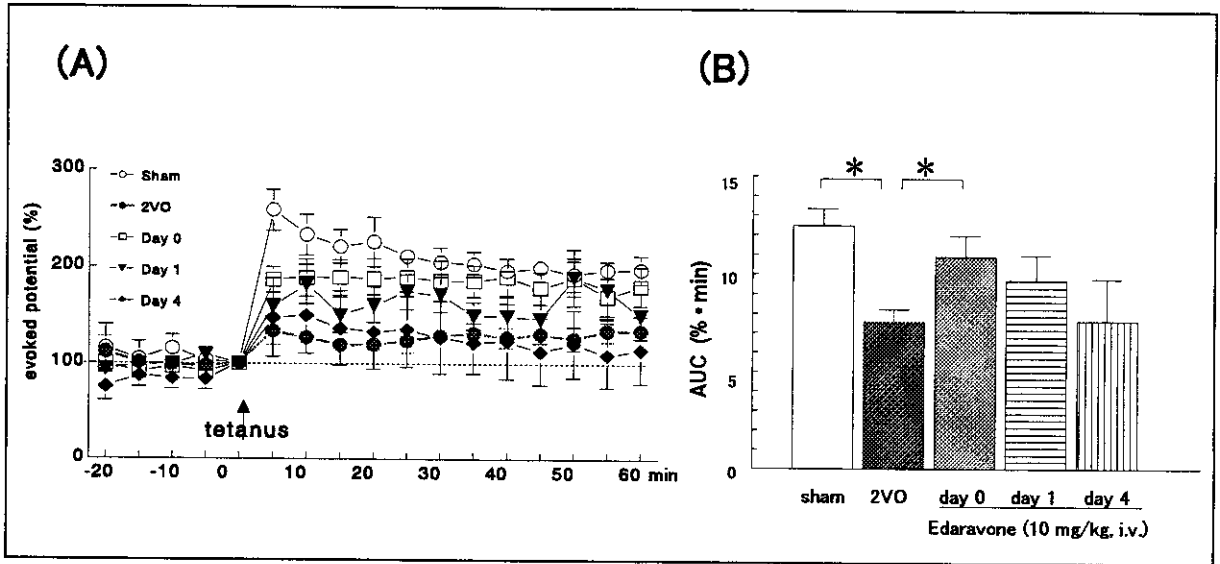


図-3 2VOによる海馬LTP形成不全に対するEdaravoneの効果

(A) 時間的推移

(B) 曲線下面積 (AUC) による評価

海馬歯状回領域におけるLTPは虚血4日目 (Day 4) に記録した。

Edaravone 10mg/kgは、それぞれ、脳虚血-再開通直後 (Day 0)、24時間後 (Day 1)、あるいは96時間後 (Day 4、tetanusの20分前) に尾静脈内へ単回投与した。

$P < 0.05$

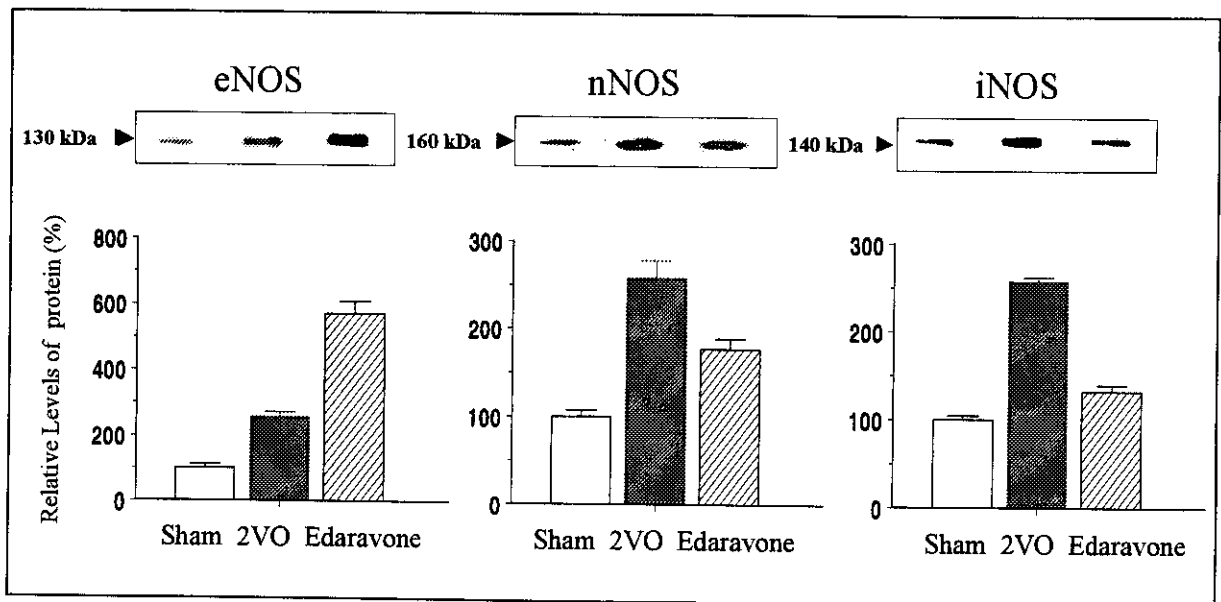


図-4 2VOによる海馬NOS発現に対するEdaravoneの効果

NOS蛋白発現は、虚血4日目 (Day 4) の海馬について、ウェスタンブロット法により解析した。Edaravone 10mg/kgは、脳虚血-再開通直後 (Day 0) に尾静脈内へ単回投与した。 $P < 0.01$

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 ヘモグロビン (Hb) 修飾体系の人工赤血球では一酸化窒素 (NO) 消去作用等により肝細胞障害を惹起する可能性があるが、NO 供与能を有する人工赤血球 SNO-PEG-Hb ではむしろ抗炎症作用を有することが期待される。本研究では SNO-PEG-Hb の肝細胞に対する影響を、interleukin (IL)-1 と IL-6 のヒト肝由来細胞 HepG2 での plasmin activator inhibitor-1 (PAI-1) 産生に及ぼす影響を評価した。IL-1 および IL-6 は濃度依存性に PAI-1 産生を増加したが、SNO-PEG-Hb は濃度依存性に培養上清中の抗原量から予測される PAI-1 産生を抑制した。SNO-PEG-Hb はまた PAI-1 活性も抑制した。これらの抑制作用は NO 放出能のない PEG-Hb では見られなかった。培養上清の総蛋白質量には変化が見られなかったことから、SNO-PEG-Hb は NO を放出により肝細胞での PAI-1 産生を抑制すること示唆された。SNO-PEG-Hb は線溶系を改善し、血栓形成に抑制的に働くと考えられ、SNO-PEG-Hb は血管拡張性と抗血栓性を備えた好ましい人工赤血球となり得る可能性が示された。

肝細胞におけるサイトカインの PAI-1 発現誘導におよぼす人工赤血球の影響に関する研究

A. 研究目的

我々は人工赤血球として Hb 修飾体の開発を進め、未修飾 Hb が有する血管収縮作用、腸管収縮作用、腎作用および血小板凝集惹起作用などの有害作用の軽減をはかるべく、ポリエチレングリコール (PEG) 修飾によって分子サイズの増大を図り、加えて Hb の β 鎖の SH 基に NO を結合させて s-ニトロソ化することによって NO 供与能を付与した SNO-PEG-Hb を作製し、評価を行ってきた。Hb 修飾体系の人工赤血球では、NO 消去作用等により肝細胞にも

障害を与える可能性があるが、SNO-PEG-Hb では NO 供与能により、むしろ抗炎症作用を発揮する可能性がある。

本研究では SNO-PEG-Hb の肝細胞に対する影響を、interleukin (IL)-1 と IL-6 のヒト肝由来細胞 HepG2 での plasmin activator inhibitor-1 (PAI-1) 産生に及ぼす効果により評価した。

B. 研究方法

Human HepG2 細胞を用い、未修飾 Hb 群、PEG 修飾 Hb 群、SNO-PEG 修飾群および生理食塩水群の計 4 群について検討した (各群の n=6、最終濃度は、0、0.01、0.03、0.1、0.3、1%)。

DMEM 培地で培養した HepG2 細胞を IL-1 (1ng/ml) で刺激後、培養 24 時間後の培養液中の PAI および抗 PAI を ELISA にて、総蛋白濃度を Braunford 法にて測定した。動脈を 10 分間動脈クレンメにて閉塞することにより作製した。

PAI-1 産生のウエスタンブロットによる評価には、ヒト肝由来細胞株(HepG2)を使用した。培養細胞をサイトカインで刺激し、PAI-1 の発現変化を蛋白レベル(ウエスタンブロット)で検討した。サイトカインによる PAI-1 発現上昇を確認後、サイトカインと共に SNO-PEG-Hb を加えその PAI-1 産生に及ぼす影響を評価した。

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。stroma free Hb の作成、および 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 SNO-PEG-Hb 作成は分担研究者の仲井が行った。

培養上清を採取後、等量の総たんぱく質をゲル電気泳動にかけ、P V D F 膜に転写後、ミルクでブロッキングした後、ヒト PAI-1 に特異的なマウスモノクローナル抗体を反応させた。アルカリフォスファターゼでラベルした 2 次抗体を用いて PAI-1 バンドを検出した。得られたバンドはデンシトメーターで定量した。コントロールには既知量のヒトリコンビナント PAI-1 を用いた。

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. 研究結果

IL-1 は濃度依存性に PAI-1 産生を増加した。Western blot では 1ng/ml では 2.0 ± 0.3 倍、2.5ng/ml では 1.8 ± 0.6 倍の増加が認められた。IL-6 も同様の効果が認められ、1ng/ml で 1.2

± 0.2 倍の増加が認められた。3-hydroxymethylglutaryl CoA (HMGCoA) reductase inhibitor である mevastain は 10mM で PAI-1 産生を 1.4 ± 0.1 倍に増加した。

また、SNO-PEG-Hb は濃度依存性に培養上清中の抗原量から予測される PAI-1 産生を抑制した。非投与群では PAI-1 抗原量は 793 ± 291 ng/ml に対し、0.01%では 669 ± 191 ng/ml、0.03%では 605 ± 179 ng/ml、0.1%では 487 ± 180 ng/ml であった。SNO-PEG-Hb はさらに PAI-1 活性も抑制した。非投与群では 9.0 ± 6.4 AU/ml に対し、0.01%では 8.0 ± 5.6 AU/ml、0.03%では -1.8 ± 8.9 AU/ml であった。これらの低下は NO 放出能のない PEG-Hb では認められなかった (PAI-1 抗原量は 0.1%で 704 ± 386 ng/ml) ことより、SNO-PEG-Hb に特徴的な変化であることが示唆された。培養上清の総蛋白量には変化が認められなかった。

D. 考察

本研究では、IL-1 および IL-6 は濃度依存性にヒト肝由来細胞 HepG2 からの PAI-1 産生を増加したが、SNO-PEG-Hb は濃度依存性に培養上清中の抗原量から予測される PAI-1 産生を抑制した。SNO-PEG-Hb はまた PAI-1 活性も抑制した。これらの抑制作用は NO 放出能のない PEG-Hb では見られず、培養上清の総蛋白量には両者で変化が見られなかった。

症惹起性サイトカインは肝細胞で PAI-1 産生を増加させ線溶系を抑制する可能性があるが、SNO-PEG-Hb は NO の放出により、肝細胞での PAI-1 産生を抑制することが示唆された。従って、SNO-PEG-Hb は線溶系を改善し、その結果血栓形成に抑制的に働く可能性が考えられた。

E. 結論

本研究の結果より、NO-PEG-Hb はその NO 供与能に基づき、血管拡張性と抗血栓性を備えた好ましい人工赤血球となり得る可能性が示さ

れた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 藤井 聡、藤井 ひとみ、富樫 廣子、吉岡 充弘、佐久間一郎、仲井 邦彦、佐藤 洋、北島 颯、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: 31-34, 2002
2. 藤井 聡、藤井 ひとみ、富樫 廣子、吉岡 充弘、仲井 邦彦、佐藤 洋、佐久間一郎、北島 颯、劔物 修 ヘモグロビン系人工酸素運搬体：体外循環、人工血管コーティング、心筋保護等臨床応用にむけての基礎的検討 Cardiovascular Anesthesia 6: 67-71, 2002
3. 藤井 聡、藤井 ひとみ、富樫 廣子、吉岡 充弘、仲井 邦彦、佐藤 洋、佐久間一郎、劔物 修、北島 颯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: 17-20, 2002

2. 学会発表

1. Fukushima S, Kubota H, Kishimoto S, Sakuma I, Nakai K, Fujii S, Kitabatake A, Takeuchi Y: Effect of Pegylation on Stability, Toxicity, and Pharmacokinetics of Perfluorocarbon Emulsion as Blood Substitutes. The 9th International Symposium on Blood Substitutes. Tokyo, 2003.3.4. Artificial Blood 11(1): 122, 2003
2. T Sugawara, K Nakai, H Togashi, I Sakuma, S Fujii, M Yoshioka, H Satoh A Kitabatake: S-nitroso-PEG-Hemoglobin as a Candidate for oxygen transporting material. The 13th World Congress of the

Internaional Society for Artificial Organs, Osaka, Japan 2002.11.6.

3. Satoshi Fujii, Ichiro Sakuma, Keiko Watano, Daisuke Goto, Tomoo Furumoto, Takeaki Kaneko, Taeko Sugawara, Jie Dong, Naoki Ishimori, Yukihito Nakai, Tetsuya Mishima, Zaman Tarikuz, Akira Kitabatake, Kunihiro Nakai: Novel Polyethylene Glycol Conjugated S-Nitrosylated Hemoglobin Potently Inhibits Platelet Activation and Adhesion to Artificial Surfaces: Therapeutic Implications for Platelet-Rich Thrombus. 第66回日本循環器学会学術集会、札幌、2002.4.25. Circulation J 66(Suppl I): 198, 2002
4. 菅原 武、富樫広子、井坂光宏、仲井邦彦、藤井 聡、佐久間一郎、吉岡充弘、安田慶秀、佐藤 洋、北島 颯：SNO-PEG-ヘモグロビン修飾体の生体適合性—肝臓と腎臓への影響—。第40回日本人工臓器学会大会、札幌、2002.10.4.
5. 佐久間一郎、仲井邦彦、福島昭二、富樫廣子、菅原 武、藤井 聡、並河和彦、小田切優樹、藤堂 省、劔持 修、吉岡充弘、北島 颯：臨床応用を目的とした人工赤血球の開発。第9回日本血液代替物学会年次大会、熊本、2002.9.4.
6. 北島 颯、佐久間一郎、藤井 聡、吉岡充弘、富樫廣子、仲井邦彦、藤堂 省、劔物修、安田慶秀、福島昭二、小田切優樹、並河和彦：臨床応用をめざした人工赤血球の開発。第2回産学連携フォーラム—医学2002、東京、2002.12.18.

G. 知的所有権の出願・登録状況 なし

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

分担研究者 仲井邦彦 東北大学医学系研究科助教授

研究要旨 S-nitroso-PEG-Hb (SNO-PEG-Hb) の製造と供給を引き続き担当した。本年度では、脳梗塞モデルなど酸素治療を展開するための材料として、酸素親和性が高い材料を作成し、その一部を試作として供給した。すなわち、期限切れ赤血球製剤から Hb を精製し、pyridoxalation 操作を行わずに、pegylation を実施し、その後に S-nitrosylation を行った。Hb の変性（メト化）は 10% 以内と良好であり、従来の製剤よりも簡便なことから安定供給が可能と考えられた。

高酸素親和性 S-nitroso-PEG-Hb の作成の
試み

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、これらの知見に基づき S-nitroso-PEG-Hb を応用した研究展開を行っている。しかし、毛細血管に酸素を供給

するためには、酸素親和性を上げることも 1 つの課題となっている。すなわち、通常の酸素親和性では、Hb は細動脈の段階ですでに酸素を放出してしまい、実際に酸素を供給すべき毛細血管で酸素供給は不完全にしか行われぬ。このため、Hb から酸素を放しにくくすることも 1 つの考察の対象になろう。最終的にはそれは実験的に検証されるべきと考え、そのための Hb 製剤の作成を行った。

B. 研究方法

1) SNO-PEG-Hb 製造

基本的な製法は従来通りである。Hb はヒト期限切れ赤血球から限外ろ過法により作成した。原料となる赤血球製剤は旭川赤十字血液センターより供与を受け使用した。

まず未修飾 Hb から PEG-Hb を作成した。従来は未修飾 Hb の酸素親和性を低下させる目的で、嫌氣的条件下で pyridoxal 5'-phosphate による修飾を行うが、期限切れ赤血球製剤は保存中に 2,3-DPG が枯渇し酸素親和性は高い。従って、pyridoxal 5'-phosphate による処理を省略することで高酸素親和性の Hb 製剤の作成を行った。工程では、次いで Hb アミノ基への PEG 修飾を実施した。Hb の PEG 修飾としては、日本油脂製サンブライト DEAC-30HS (平均分子量 2956 のアミノ基結合型修飾剤) を用いた。PEG-Hb をそのまま製剤として使用する場合、生理食塩水に透析し濃縮して冷凍保存した。SNO-PEG-Hb 製造は、PEG-Hb に対して NO 供与体としてニトロソグルタチオン (Dojindo 製) を使用し、s-ニトロソ化を行った。Hb と NO 供与体のモル比は 1 : 5-10、反応条件は昨年度と同様とし、製造後に PEG-Hb と同様な処置を行って凍結保存した。製造後の有効期限は、PEG-Hb で 1 年、SNO-PEG-Hb で 2 ヶ月とした。

蛋白質結合 NO の解析は、試料を HPLC ゲルろ過カラム (Eicompak GFC-200 または TSK-GEL SW4000XL) を用いて移動相 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5)、0.1 mM EDTA にて分離、ポストカラムにて 1.75 mM HgCl₂ を混和、ついで 1% sulfanilamide、0.1% N-naphthyl-ethylenediamine、2% リン酸により亜硝酸を発色させ 540 nm の吸光度より定量した。NO 供与体として、亜硝酸およびグルタチオンより自家製造したニトロソグルタチオンまたは Dojindo 製ニトロソグルタチオンを使用した。Hb 濃度 50 mM とし、0.1 M リン酸緩衝液 (0.5 mM EDTA) 中にて NO 供与体と室温で混合した。Hb と NO 供与体のモル

比は 1 : 5-10 とした。場合によっては、メト化率を下げるためにモル比を一定のまま、希釈して製造を行った。

蛋白質結合 NO の解析は、試料を HPLC ゲルろ過カラム (Eicompak GFC-200 または TSK-GEL SW4000XL) を用いて移動相 10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5)、0.1 mM EDTA にて分離、ポストカラムにて 1.75 mM HgCl₂ を混和、ついで 1% sulfanilamide、0.1% N-naphthyl-ethylenediamine、2% リン酸により亜硝酸を発色させ 540 nm の吸光度より定量した。

Hb への PEG 修飾は、日本油脂製サンブライト DEAC-30HS (平均分子量 2956 のアミノ基結合型修飾剤) を用い、50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) にて、Hb 濃度 0.25 mM、Hb (テトラマー) と PEG 修飾剤のモル比 1 : 20 で氷温下 2 時間反応させた。この PEG-Hb への NO 付加は NO 供与体としてニトロソグルタチオンを用い、室温で 10 時間反応させた。

作成した Hb 製剤の酸素親和性は、Hemox Analyzer を使用し、Hepes 緩衝液 pH 7.4、塩濃度 100 mM、20 度の条件で測定を行った。

倫理面への配慮

実験にあたっては、東北大学大学院倫理委員会に実験計画書を提出し、裁可を得た。

C. 研究結果

製剤の規準は、これまでと同様に、Hb 濃度 10%、生理食塩水透析、濾過滅菌、メト化率 10%以内 (努力目標 5%以内)、SNO 化率 35-40% (Hb テトラマー当たり二個の SH を有し、100% SNO 化はテトラマー当たり 2 個の SNO が結合する)、冷凍状態で出庫した。製造上の最大の障害はメト化率であるが、