

### C. 結果および考察

体重に対する脾臓重量比は血液交換前に  $0.33 \pm 0.04\%$  であったが、保存赤血球分散液で血液交換すると1日後に  $0.42 \pm 0.05\%$ 、3日後に  $0.48 \pm 0.06\%$ 、7日後に  $0.47 \pm 0.06\%$  になり、約1.5倍の増大となった。しかし14日後には  $0.33 \pm 0.06\%$  に低下し、血液交換前の値にまで回復した。この一過性の脾臓肥大は、人工赤血球(Hb小胞体)で血液交換した場合にも認められる。保存赤血球は血中滞留時間が短くなり、脾臓に捕捉されていることが示唆された。また、14日後の脾臓にヘモジデリンの沈着が認められた。今後は、組織病理検査により、鉄の沈着の有無やヘムオキシゲナーゼ-1、-2の誘導、活性造血作用への影響など更に詳細を検討する必要がある。

### D. 結論

保存赤血球を用いて40%血液交換を行ったところ、脾臓肥大が観測された。機序については今後の組織病理検査の結果が待たれるが、付加価値赤血球製剤の投与に際しても、体内動態や血中半減期などについても今後検討する必要がある。

## 研究業績

### A 論文発表

1. C. Contaldo, S. Schramm, R. Wettstein, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Leunig, A. Banic, D. Erni. Improved oxygenation in ischemic hamster flap tissue is correlated with increasing hemodilution with Hb vesicles and their O<sub>2</sub> affinity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285: H1140-H1147 (2003).
2. H. Sakai, Y. Suzuki, M. Kinoshita, S. Takeoka, N. Maeda, E. Tsuchida. O<sub>2</sub>-Release from Hb-Vesicles Evaluated Using an Artificial Narrow O<sub>2</sub>-Permeable Tube: Comparison with RBC and Acellular Hb. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H2543-H2551 (2003).
3. Y. Teramura, H. Kanazawa, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida. The prolonged oxygen-carrying ability of Hb vesicles by coencapsulation of catalase *in vivo*. *Bioconjugate Chem.* 14: 1171-1176 (2003)
4. H. Sakai, S. Hisamoto, I. Fukutomi, K. Sou, S. Takeoka, and E. Tsuchida. Detection of lipopolysaccharide in hemoglobin-vesicles by *Limulus* amoebocyte lysate test with kinetic-turbidimetric gell clotting analysis and pretreatment with a surfactant. *J. Pharm. Sci.* 93, 310-321 (2004).
5. H. Sakai, H. Horinouchi, Y. Masada, M. Yamamoto, S. Takeoka, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. *Crit. Care Med.* 32, 539-545 (2004).
6. H. Sakai, H. Horinouchi, Y. Masada, S. Takeoka, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Metabolism of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model. *Biomaterials* 25, (2004) (in press, Oct. 27th, 2003).
7. 土田英俊、宗慶太郎、酒井宏水、小松晃之、武岡真司、堀之内宏久、末松誠、小林紘一。酸素輸液(人工赤血球)の安全度と体組織への酸素輸送”麻酔 53(増刊号) S55-S66 (2003)

### B 学会発表

1. H. Sakai, K. Sou, S. Takeoka, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Physicochemical properties of Hb-vesicles (HbV) and their O<sub>2</sub> transporting efficiency *in vivo*. / 7th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies / 2003.9.21-24 / Fort Lauderdale, Florida
2. 久本修治, 酒井宏水, 武岡真司, 土田英俊 / 界面活性剤を用いたヘモグロビン小胞体のリポポリサッカライド定量法 / 第41回日本人工臓器学会大会 / 2003.10.30-11.1 / 仙台市民会館
3. 酒井宏水, 武岡真司, 堀之内宏久, 小林紘一, 土田英俊 / 人工赤血球 (ヘモグロビン

小胞体)の反復投与による安全度評価／第41  
回日本人工臓器学会大会／2003.10.30 - 11.1  
／仙台市民会館

4. H. Sakai, K. Sou, S. Takeoka, K. Kobayashi, E.

Tsuchida. / Rheological Properties of PEG-  
modified Hb-vesicles (HbVs) and their oxygen-  
transporting capacity in vivo. / The Spring 2004  
ACS National Meeting / March 28-April 1, 2004  
/ Anaheim, CA, USA

**厚生労働科学研究費補助金**  
**(医薬安全総合研究事業：ヘモグロビンアロステリーを利用した付加価値赤血球製剤の創製と救急医療への応用研究班)**

**分担研究報告書**

—網羅的代謝計測技術による NO, CO による赤血球の機能修飾解析—

分担研究者 加柴 美里 (慶應義塾大学医学部)

**要旨**

赤血球が酸素運搬や酸塩基平衡の調節に関与するだけでなく、積極的に微小循環血流維持作用を発揮している可能性が示唆されてきている。具体的には赤血球が血管内の酸素濃度を感知して NO などの低分子のガスや有機酸を活発に放出、回収を行い、その一部が血管拡張や血小板活性化制御に関与する可能性が示されつつある。本分担研究は、血管作動物質のシンクリザーバーとしての赤血球の分子機構解明を試みることにより、高い酸素運搬能と微小循環血流保持機能を付与した新しい赤血球製剤開発に必要な不可欠な理論基盤を構築することを目的とし、赤血球中のメタボライトを網羅的に解析した。酸素分圧の低下に伴い解糖系代謝産物量が低下し、ミトコンドリアを持たない赤血球での主要な ATP 産生機構である解糖系の亢進を確認したにもかかわらず、細胞内 ATP 値に変化は認められなかった。この一見相反する結果から、低酸素刺激により細胞の外に ATP が放出されたとの仮説をたて検証したところ、細胞外 ATP 量の変動を確認した。

**A. 研究目的**

近年、赤血球が血管内の酸素濃度を感知して一酸化窒素 (NO) などの低分子のガスや有機酸を活発に放出、回収を行い、その一部が血管拡張や血小板活性化制御に関与している可能性が示されつつある<sup>1,2</sup>。つまり、これまでの精製ヘモグロビン修飾体による人工酸素運搬体では赤血球が本来保持しているこのような付加価値機能を完全に補完することはできないことを意味している。

本分担研究では、赤血球の代謝と、

その内外への物質輸送を網羅的に解析することにより、血管作動物質のシンクリザーバーとしての赤血球の血管機能制御の分子機構解明を試みた。

赤血球による血管機能制御機構として、赤血球に最も多く含まれるタンパク質であり、その立体構造が酸素の脱着により規定されるヘモグロビン (Hb) に注目し、酸素分圧の変動等、Hb の立体構造を変動する刺激により赤血球内外の代謝産物量が如何に変動するかを検討した。具体的には、赤血球内 metabolite を、分子

量 70-1000 の有機分子を一斉解析できる高性能のキャピラリー電気泳動/質量分析装置 (CE-MS) を駆使して網羅的に定量分析し (メタボローム解析法)、種々の微小血管レベルの環境でどのような代謝産物の放出が起るかを系統的に分析同定した。興味ある物質 (ATP 等) に関しては細胞内外の物質移動もあわせて解析した。

本赤血球の分子機構の解明は付加価値人工酸素運搬体を作成する理論基盤として重要と考えられる。

## B. 研究方法

### B-1 赤血球内メタボライトの網羅的解析

健康人または Male Wistar Rat から得た赤血球を用いた。ヘパリン採血後、バッファーにて 4 回洗浄して採取した赤血球画分を実験に用いた。赤血球をヘマトクリット 40-50 程度になるようにバッファーに suspend し、ガスタイトバイアルに設置後、on ice 下で Ar<sub>2</sub> または air をパージしたのち 37 度で incubate した。Incubate 後、遠心操作により赤血球画分を分離し、速やかにクロロフォルム-メタノール抽出を行い、水層を試料として用いた。この際、内部標準物質として PIPES 及び methionine sulfone を添加した。抽出サンプル中の高分子物質を分子量 5,000 のセントリカットを用いて除去後、キャピラリー電気泳動/質量分析装置 (CE-MS) を用いて定量解析を行った。尚、本解析は慶應義塾大学先端生命科学研究所 曾我朋義先生との共同研究による。

### B-2 赤血球から放出される ATP 量の定量

B-1 と同じように採取した赤血球をバッファー中にヘマトクリット 10 % になるように suspend し、air 下、または Ar<sub>2</sub> 下にて一定時間 37 度で反応したのち、遠心分離にて上清を採取し、上清中の ATP 量を定量した。ATP 量の定量は ATP determination kit (Molecular Probes) を用いて行った。

## C. 実験結果及び考察

### C-1 グルコース消費速度

赤血球のメタボローム解析の反応時間を検討するため、バッファーに suspend した赤血球を 37 度で incubate し、一定時間後のメディウム中のグルコース濃度を定量した。結果を図 1 に示す。本実験結果より、Glucose 濃度の変化が小さい反応後 5 min、10 min の点における赤血球メタボライトの解析を行った。

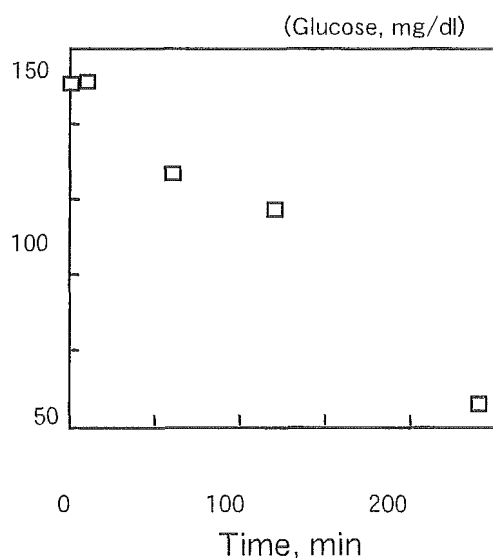


図 1 赤血球添加後のメディウム中グルコース減少速度

C-2. 空気下または Ar<sub>2</sub> 下における赤血球メタボライトの変動

Male Wistar Rat より抽出した赤血球を air 下または Ar<sub>2</sub> 下、37 度で 10 分間 incubate した後の赤血球メタボライトの網羅的解析結果の一例を table1 に示す。Ar<sub>2</sub> 下で incubate することにより、NAD、NADP、cAMP 量に増加傾向が認められた。又、一部のアミノ酸 (Gly, Ala) 量は低酸素

下で減少傾向が認められた。一方、GABA, Leu, Asp 等のアミノ酸は低酸素下で、その濃度に上昇傾向が認められた。解糖系の中間代謝物 ( Glycerophosphate 、 dihydroxyacetone phosphate, Ribulose 5-posphate) 量が減少傾向にあることから、Ar<sub>2</sub> 下では解糖系が亢進していることが示唆された。

表 1 air 下または Ar<sub>2</sub> 37 度で 10 min 反応した後の赤血球中各種メタボライト量、単位は uM

	in vitro							
	RBC				sup			
	Air		Ar2		Air		Ar2	
Anion								
Lactate	748.7	445.3	1061.3	855.1	635.0	601.8	705.8	935.7
Fumarate	9.1	-	-	12.8	-	-	-	-
Succinate	6.0	4.5	-	4.3	-	-	-	-
Malate	10.2	3.7	-	12.1	-	-	-	-
2-Oxoglutarate	17.3	-	-	-	-	-	-	-
Dihydroxyacetone phosphate	265.5	306.1	260.3	214.5	-	-	-	-
Glycerophosphate	29.8	32.2	24.7	19.8	-	-	-	-
3-Phosphoglycerate	44.9	33.9	40.4	35.5	-	-	-	-
2-Phosphoglycerate	22.2	24.5	24.7	19.6	-	-	-	-
Gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribulose 5-phosphate	33.8	32.2	19.4	16.4	-	-	-	-
Ribose 5-phosphate	14.0	13.5	19.9	13.8	-	-	-	-
Glucose 1-phosphate	26.0	-	-	-	-	-	-	-
Glucose 6-phosphate	-	16.9	17.0	14.9	-	-	-	-
Fructose 6-phosphate	8.4	-	-	-	-	-	-	-
2,3-Diphosphoglycerate	5033.5	5550.6	5902.7	-	-	-	-	-
6-Phosphogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose 1,6-diphosphate	590.2	418.6	604.2	437.0	-	-	-	-
Nucleotide								
cTMP	-	-	9.3	5.5	-	-	-	-
cCMP	-	-	9.5	6.6	-	-	-	-
cAMP	2.5	1.2	10.4	6.8	-	-	-	-
cGMP	-	-	9.3	6.4	-	-	-	-
AMP	120.4	74.3	126.0	85.7	-	-	-	-
GMP	10.7	6.9	16.1	9.8	-	-	-	-
ADP	36.0	31.0	32.2	32.6	-	-	-	-
GDP	5.3	4.5	9.5	6.2	-	-	-	-
ATP	70.7	51.6	63.1	62.1	-	-	-	-
GTP	8.0	-	11.0	10.2	-	-	-	-
NAD	43.3	37.1	144.0	75.5	-	-	-	-
NADH	23.8	13.1	25.4	14.3	-	-	-	-
NADP	5.1	4.1	22.1	13.4	-	-	-	-
Cation								
L-Glycine	85.5	106.9	85.1	75.1	-	-	46.3	54.3
L-β-Alanine	-	-	25.1	-	-	-	-	-
L-Alanine	94.2	100.4	93.8	76.8	49.8	56.7	60.7	87.2
Sarcosine	-	-	16.8	-	-	-	-	-
GABA	-	-	14.3	6.4	-	4.1	-	-
L-Serine	98.2	105.3	99.7	69.8	20.9	26.0	22.2	28.3
L-Proline	36.4	36.3	40.8	23.0	35.5	33.6	43.9	58.3
L-Valine	-	-	-	-	11.3	6.3	10.8	23.7
L-Threonine	43.1	44.5	47.2	26.8	36.3	39.1	49.4	59.9
L-Isoleucine	-	-	8.2	4.3	4.5	3.6	4.8	11.1
L-Leucine	-	-	12.1	7.0	7.3	4.1	8.3	15.2
L-Hydroxyproline	-	-	25.1	10.0	7.4	7.6	6.9	7.1
L-Ornithine	48.2	52.4	53.6	41.7	6.6	4.8	4.9	5.4
L-Asparagine	49.8	47.3	55.1	38.7	7.5	6.3	9.3	9.5
L-Aspartate	-	-	27.8	18.1	-	-	-	-
L-Lysine	250.4	245.5	250.6	190.6	12.4	10.6	12.9	17.4
L-Glutamate	257.3	251.8	288.1	226.8	10.4	11.3	9.1	12.3
L-Methionine	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Histidine	15.8	16.7	18.3	11.5	11.3	9.7	15.7	17.1
L-α-Aminoadipic acid	23.1	30.8	29.1	22.3	-	-	-	-
L-Phenylalanine	-	-	11.0	3.8	4.2	4.0	5.9	9.6
L-Arginine	180.0	181.6	201.6	157.0	14.3	15.3	13.3	19.7
L-Citrulline	30.7	26.3	40.1	29.4	6.0	6.5	6.5	7.0
L-Tyrosine	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Carnosine	-	-	5.3	-	-	-	-	-
L-Tryptophan	-	-	-	-	-	-	4.4	3.6

### C-3. $^{13}\text{C}$ ラベルグルコース投与による代謝実験

細胞外のバッファーに  $^{13}\text{C}$  グルコースを添加し、10 min 37 度で反応する代謝実験を試みた。 $^{13}\text{C}$  ラベルの Lactate の上昇等、解糖系の亢進が示唆された。 $^{12}\text{C}$  を用いた実験結果とあわせて考えると、低酸素刺激で解糖系の亢進が起きていると考えられる。

ミトコンドリアを持たない赤血球での主要な ATP 産生機構である解糖系の亢進を確認したにもかかわらず、細胞内 ATP 値には差が見られなかった (Table 1)。この一見、相反する結果から、低酸素刺激により細胞の外に ATP が放出されたとの仮説をたてて検証した。

### C-4. 細胞外 ATP の測定

Air 下または  $\text{Ar}_2$  下、37 度で赤血球を反応後、細胞外液に放出された ATP 量を定量した。図 2 に示すように、air 下よりも  $\text{N}_2$  下での ATP 放出量が多いことを確認した (図 2)。

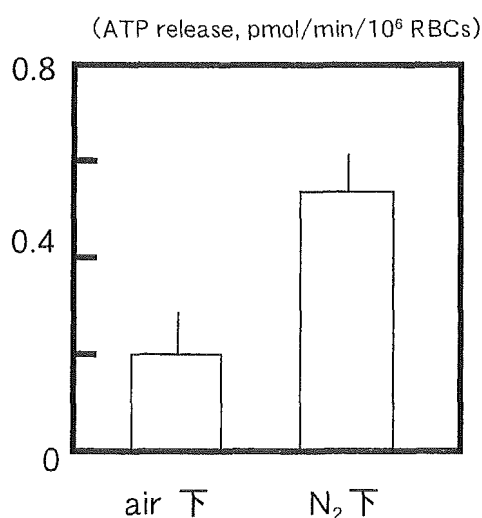


図 2 Air 下または  $\text{N}_2$  下における赤血球からの ATP 放出量

### D. 結論

酸素分圧の変動により、赤血球内外の様々なメタボライト値に変動がみられた。低酸素雰囲気下で赤血球内の主要な ATP 産生機構である解糖系の亢進が示唆されたにもかかわらず、赤血球内の ATP 量に変化がなかったことから、赤血球外に放出された ATP 量を解析したところ、低酸素下において、ATP の放出量が増加している事を認めた。

### E. 研究発表

#### E-1 和文総説

#### 1) 微小循環における一酸化窒素のレドックス制御と病態

加柴 美里、柏木 哲

医薬の門 43 (5)、2003、586-590.

#### 2) NO の生体リザーバー分子とリサイクル機構-化学的性質からの考察

加柴 美里、柏木 哲

Molecular Medicine 40 (2)、2003、172-177.

### Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Katagiri H, Ito Y, Ishii K, Hayashi I, Suematsu M, Yamashina S, Murata T, Narumiya S, Kakita A, Majima M.	Role of thromboxane derived from COX-1 and -2 in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia in mice.	Hepatology	39(1)	139-50	2004
Nagano S, Shimada H, Tarumi A, Hishiki T, Kimata-Arigo Y, Egawa T, Suematsu M, Park SY, Adachi S, Shiro Y, Ishimura Y.	Infrared spectroscopic and mutational studies on putidaredoxin-induced conformational changes in ferrous CO-P450cam.	Biochemistry	42(49)	14507-14	2003
Suematsu M, Suganuma K, Kashiwagi S.	Related Articles, Links Mechanistic probing of gaseous signal transduction in microcirculation.	Antioxid Redox Signal	5(4)	485-92	2003
Norimizu S, Kudo A, Kajimura M, Ishikawa K, Taniiai H, Yamaguchi T, Fujii K, Arai S, Nimura Y, Suematsu M.	Related Articles, Links Carbon monoxide stimulates mrp2-dependent excretion of bilirubin-IXalpha into bile in the perfused rat liver.	Antioxid Redox Signal	5(4)	449-56	2003
Suematsu M.	Quartet signal transducers in gas biology.	Antioxid Redox Signal	5(4)	435-7	2003
Egawa T, Yoshioka S, Takahashi S, Hori H, Nagano S, Shimada H, Ishimori K, Morishima I, Suematsu M, Ishimura Y.	Kinetic and spectroscopic characterization of a hydroperoxy compound in the reaction of native myoglobin with hydrogen peroxide.	J Biol Chem	278(43)	41597-606	2003
Kato Y, Shimazu M, Kondo M, Uchida K, Kumamoto Y, Wakabayashi G, Kitajima M, Suematsu M.	Bilirubin rinse: A simple protectant against the rat liver graft injury mimicking heme oxygenase-1 preconditioning.	Hepatology	38(2)	364-73	2003
Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, Yamamoto M, Ikeda E, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E.	Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats.	Crit Care Med	32(2)	539-45	2004



Sakai H, Hisamoto S, Fukutomi I, Sou K, Takeoka S, Tsuchida E.	Detection of Lipopolysaccharide in Hemoglobin-Vesicles by Limulus Amebocyte Lysate Test with Kinetic-Turbidimetric Gel Clotting Analysis and Pretreatment of Surfactant.	J. Pharmaceutical Sciences	93(2)	310-21	2004
Sakai H, Suzuki Y, Kinoshita M, Takeoka S, Maeda N, Tsuchida E.	O <sub>2</sub> release from Hb vesicles evaluated using an artificial, narrow O <sub>2</sub> -permeable tube: comparison with RBCs and acellular Hbs.	Am J Physiol Heart Circ Physiol	285	H2543-51	2003
Contaldo C, Schramm S, Wettstein R, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Leuning M, Banic A, Erni D.	Improved oxygenation in ischemic hamster flap tissue is correlated with increasing hemodilution with Hb vesicles and their O <sub>2</sub> affinity.	Am J Physiol Heart Circ Physiol	285	H1140-47	2003
Teramura Y, Kanazawa H, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E.	Prolonged Oxygen-Carrying Ability of Hemoglobin Vesicles by Coencapsulation of Catalase in Vivo.	Bioconjugate Chem	14	1171-76	2003
Sakai H, Horinouchi H, Masada Y, Takeoka S, Ikeda E, Takaori M, Kobayashi K, Tsuchida E.	Metabolism of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model.	Biomaterials	in press		
土田英俊、宗慶太郎、酒井宏水、小林晃之、武岡真司、堀之内宏久、末松誠、小林紘一	酸素輸液（人工赤血球）の安全度と体組織への酸素供給	麻酔	52	S55-66	2003

200300854A

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、P33の研究成果の刊行に関する一覧表をご参照ください。