

別添 2

厚生労働科学研究費補助金

医薬安全総合研究事業

## 救急災害医療に利用可能な人工赤血球 に関する研究

(研究課題番号：H15-医薬-014)

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 四津良平

(慶應義塾大学 医学部 外科)

平成 16 (2004) 年 4 月

## 目次

I. 総括研究報告書	1~4
四津良平（慶應義塾大学医学部 教授）	
II. 分担研究報告書	
1. 四津良平（慶應義塾大学医学部 教授）	5~ 9
2. 相川直樹（慶應義塾大学医学部 教授）	10~13
3. 小松晃之（早稲田大学 理工総研 助教授）	14~30
4. 堀之内宏久（慶應義塾大学医学部 講師）	31~34
5. 外須美夫（北里大学医学部麻酔科学 教授）	35~36
6. 小川 龍（日本医科大学麻酔科学教室 教授）	37~38
7. 佐久間一郎（北海道大学附属病院 講師）	39~41
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	42~47
IV. 研究成果の刊行物・別冊	48~

## 救急・災害医療に利用可能な人工赤血球の開発に関する研究

主任研究者 四津 良平 慶應義塾大学医学部 外科 教授

## 研究要旨

赤血球輸血の有用性は論を待たないが、保存制限や交叉試験の必要性などから緊急時に即応できない問題点がある。本研究は、人工赤血球を救急・災害医療に際して輸血を補完する目的で開発することを目的とする。対象とする人工赤血球は高純度/高濃度 Hb 溶液をリン脂質二分子膜で被覆した Hb 小胞体 (直径 250 nm) とリコンビナントアルブミンにヘム誘導体を包接したアルブミン-ヘムである。

平成 15 年度に得られた研究成果は ① 緊急・災害時の出血に対する蘇生液としての利用が可能であることを検証するために中型動物(ビーグル犬)を用いて条件を変えた出血性ショックモデルを作成し、人工赤血球の循環動態に与える変化の評価に適する蘇生モデルを作成した。② 中型動物を用い、出血性ショックにおける人工赤血球の酸素運搬効率の評価に適する動物モデルを作成した。③ ウサギ急性出血性ショックモデルを作成し、蘇生を行なった際の血管外への血漿成分の漏出と臓器循環障害の評価を行うモデルを作成した。対照とする乳酸リンゲル液による蘇生では一過性の循環改善効果が認められるものの、血漿成分の血管外漏出を認め、臓器循環障害の可能性が示唆された。④ 臓器虚血により生じる梗塞部位への酸素供給の可能性を、ラット局所脳虚血モデルを用いて検討した。脳梗塞領域は人工血液製剤にて血漿交換を行った群で有意に小さかった。⑤ Hb 小胞体の心筋低酸素・再灌流障害における影響・効果を検索するため、モルモットを用いたランゲンドルフ摘出心灌流系を確立し、基礎検討を行った。⑥ 完全合成系酸素運搬体(アルブミン-ヘム)について、適応に応じた最適酸素親和度を有する製剤を合成し、ヘム構造と酸素結合能の相関を定量的に解明した。⑦ Hb 小胞体のヘムのメト化を抑制する方法としてアスコルビン酸の投与につき検討し、血液中でメト化が抑制されることが明らかとなった。⑧ L-Tyr が Hb の自動参加を抑制する効果を有することをはじめで見出し、Hb 小胞体に内包させることにより生理的条件下で酸素錯体寿命を延長しえた。⑨ 微小血管モデル内を流動する Hb 小胞体の酸素放出挙動は赤血球のそれと同等であった。⑩ ハムスター有茎皮弁の虚血領域の酸素化を検討し、酸素親和度の低い Hb 小胞体により、側副血行を介して酸素運搬が行なわれることが解明された。⑪ 人工心肺(体外循環)が必要な手術への応用として回路充填液として輸血を補助するための動物モデルを作成し、基礎検討を行なった。

## 分担研究者

相川 直樹	慶應義塾大学医学部	教授	外 須美夫	北里大学医学部麻酔科	教授
小松 晃之	早稲田大学理工総研	助教授	小川 龍	日本医科大学医学部麻酔科	教授
堀之内 宏久	慶應義塾大学医学部	講師	佐久間 一郎	北海道大学医学部循環病態内科	講師

## A. 研究目的

救急災害医療における人工血液の用途としては、外傷における出血に対する輸血の代替、熱傷における消耗性の貧血に対する輸血の代替、虚血性疾患に対する虚血部位の機能不全を最小限にとどめる酸素治療への応用、人工心肺を用いた手術時のプライミング液としての利用、移植臓器の保存時間延長のための保存液としての使用など種々の用途が考えられている。人工赤血球の性質、効果、安全性については現在まで少量ずつを調製していたため、小動物を用いた研究が主体であったが、試料供給が安定したので、中・大動物による臨床応用に即した研究を行うことが可能となった。

平成 15 年度の研究目的は以下のごとくである。

① 救急災害医療における輸血の代替として出血性ショックの治療に用いた場合の循環動態の改善効果を検討する。② 出血性ショックの蘇生時の酸素代謝に与える影響を検討する。③ 出血性ショック時の蘇生時の効果を浸透圧と循環血液量、組織酸素分圧、血管透過性の変化の点から検討する。④ ラットを用いて脳の部分的な虚血状態を作成、人工赤血球あるいは代用血漿製剤を投与した際の脳梗塞領域の容積変化を検討する。⑤ モルモット心を用いて心筋低酸素・再灌流傷害に対する人工赤血球の影響および効果を検索する。⑥ 救急・災害医療に用いる場合、適応に応じて人工赤血球の酸素親和度 ( $P_{50}$ ) を変更することにより、優れた治療効果が得られる可能性を考え、アルブミンヘムの活性ヘム構造変換による機能調節を検討する。⑦ 血中でのヘムあるいは Hb の酸化(メト化)による酸素運搬能の喪失を防ぐために還元剤としてアスコルビン酸を同時投与して Hb のメト化の抑制を検討する。⑧ L-Tyr を Hb 小胞体に同時封入することによってメト化の抑制が可能かについて検討する。⑨ Hb 小胞体の微小循環での酸素放出および取り込みについての基礎的な解析を行う。⑩ Hb 小胞体の投与による有茎皮弁虚血領域の酸素化についてハムスターを用いて検討

する。⑪ 体外循環の回路充填液に人工赤血球を用いた際の高次脳機能の評価を行なうためラットを用いて体外循環の確立を行なう。

## B. 研究方法

①,② 出血性ショックの蘇生液としての効果を検証するため、中型動物としてビーグル犬(約 7kg)を用い、脾摘の有無、血液希釈の程度(50%希釈、70%希釈、80%希釈)、出血量の程度(30%、40%、50%)をそれぞれ変化させて代用血漿製剤での蘇生を行い、血圧、脈拍、動脈圧、肺動脈圧を連続測定し、経時的に心拍出量(熱希釈法)、肺動脈楔入圧、中心静脈圧測定を行ない、循環動態を評価した。また、同様の系を用いて混合静脈血血液ガスおよび酸素飽和度、動脈血液ガスを測定し、酸素運搬と酸素消費の変化を把握し評価した。

③ NZW ラビットを用い、麻酔後人工呼吸を施し、50%脱血、30 分の維持を行い、その後に乳酸リンゲル液を用いて蘇生を行なった。この際の循環血液量、臓器酸素分圧、晶質浸透圧、膠質浸透圧を測定した。

④ ラットを用い、全身麻酔後気管内挿管を行い人工呼吸を施し、代用血漿製剤を用いて 50%の血液交換を行った後、左中大脳動脈領域を一時的に閉塞して局所的な脳虚血を作成、2 時間後に再灌流を行い 30 分灌流後に犠牲死させ、梗塞巣を TTC 染色にて評価した。

⑤ Hartley モルモット心を用い、ランゲンドルフ灌流装置に設置し、冠灌流量、拍出圧、 $O_2$  extraction, 心室粗細動出現率および VF 持続時間を観察した。

⑥ ヘムの酸素親和性を変化させるためにプロトポルフィリン、メソポルフィリン、デューテロポルフィリン、ジアセチルデューテロポルフィリンを出発物質として 10 種類のヘム誘導体を合成し構造解析を  $^1H$ -NMR、UV-vis、IR、MS スペクトルを用いて行なった。さらにこれらの化合物の酸素結合反応、アルブミンプロトヘムの合成、アルブ

ミンプロトヘムの酸素結合能について検討した。

⑦ ラットに Hb 小胞体を 20mL/kg 投与し、直後に濃度を変えたアスコルビン酸溶液を投与した。経時的に採血を行い、Hb 小胞体内の Hb のメト化率を分光分析にて測定した。同様にシステイン溶液を経静脈的に連続投与して Hb 小胞体のメト化率を計測した。

⑧ L-Tyr を Hb 溶液に添加し、シアノメト Hb 法にて Hb の自動酸化率を検討した。同様にカタラーゼと L-Tyr を添加した Hb 溶液でも同様の検討を行なった。ついで L-Tyr を内包した Hb 小胞体を作成し、自動酸化抑制と保存安定性を検討した。

⑨ 血管モデルとして Ethylene propylene co-polymer 製チューブ(内径 28.1 $\mu$ m)を用い、Hb 小胞体分散液をチューブ内に流してチューブ内を流れる小胞体の酸素飽和度を分光計にて計測し酸素放出挙動を検討した。

⑩ ハムスターを用いて Hb 小胞体の投与による有茎皮弁虚血領域の酸素化についてクラーク型酸素電極を用いて組織酸素分圧を測定し、検討した。

⑪ ラットを用い、全身麻酔後気管内挿管を行い人工呼吸を施し、右内頸静脈から右房へ脱血カニューレを、尾動脈より送血カニューレを挿入し、小動物用に開発した人工心肺回路に接続した。充填量、送血量を変化させて 60 分の体外循環を行い、循環動態等を検討する。

### C. 結果および考察

① 40%脱血ショックモデルではショック作成後 30 分の経過で徐々に血圧が回復、蘇生液投与直前には平均血圧は 79mmHg まで回復した。蘇生液として 5%アルブミン生食を投与したところ平均血圧は 99mmHg まで回復し、容易にショック状態を脱し、その後も安定した経過をたどった。平均肺動脈圧は血圧と同様、脱血に伴い低下した(17→9.5mmHg)が、脱血終了直前には 13mmHg まで回復し、5%アルブミン投与により正常値に復した。肺動脈楔入圧、中心静脈圧も同様の経過をたどり、

蘇生液の投与とともに正常値に復した。体血管抵抗は 4913dynes $\cdot$ sec $\cdot$ cm<sup>5</sup>であったが、脱血直後には 4021 へ低下し、5%アルブミン生食にて蘇生した後は 3700 から 4000 程度で安定して推移した。肺血管抵抗も同様に脱血後に若干の低下を示したが、蘇生後は安定した経過を示した。さらに程度の厳しいモデルとして 50%脱血ショックモデルを作成した。この群では、平均血圧の回復に若干の時間がかかるものの、120 分後よりは安定した循環動態を示すようになり、人工赤血球の効果を検証するには不十分であった。脾臓は出血時に血管収縮をおこし、体内で血液のリザーバーとしての役割を果たしているため、出血後徐々に血圧が回復する要因となっていると考えられ、脱血を行なう前に脾摘を行なったモデルを作成することとした。脾摘後 50%脱血ショックモデルでは血圧の回復が緩和となったが、最終的にはショック状態を脱し、低い血圧ながら安定した循環動態を取った。酸素運搬を減少させてショック蘇生における人工血液の役割を検証するために交換輸血の方法を用いて血液希釈を行い、脾摘後 50% (70%、あるいは 80%) 血液希釈、30%脱血、60%脱血ショックのモデルを作成した。70%希釈を行うモデルではショック維持時間中に血圧の維持が困難となり、心停止をきたす動物があった。以上の検討から、人工赤血球による出血性ショックに置ける蘇生の有効性を検討するためには脾摘後 50%の脱血によるショックおよびその状態からの蘇生を行うモデルが適当と考えられた。

② 出血性ショックの蘇生に伴う酸素消費に関する検討では出血ショックに伴い酸素消費は著しく低下し、血液 pH、Base Excess も低下した。特に脾摘、70%希釈、30%脱血による出血性ショックの設定では、pH、BE は回復することは無かった。酸素消費も低値のままであった。これは、酸素運搬が抑えられたために臓器での嫌気解糖が進んだためと考えられ、人工赤血球による酸素運搬の効果を評価するためにふさわしい実験系であると考

えられた。

③ ラビットを用いた出血性ショックにおける循環血液量の検討では対象として設定した乳酸リンゲル液による蘇生ではショック蘇生後循環血液量は回復を示したが 120 分後には減少しており、血管外への漏出があったものと考えられた。晶質浸透圧はショックにより増加する傾向を示し、蘇生後も遷延した。膠質浸透圧はショックと蘇生により低下傾向を示したが、蘇生 2 時間後に回復傾向を示した。この事実もショック蘇生後の血管外への血漿成分の漏出によるものと考えられた。

④ ラットを用いた局所脳虚血に対する人工酸素運搬体による梗塞巣抑制の検討では TTC 染色による解析では、Hb 小胞体投与群で梗塞容積が減少する傾向が認められた。

⑤ モルモット心を用いたランゲンドルフ灌流の結果 Krebs-Henseleit 液中にアルブミンを添加して灌流停止、再灌流を行なったところ、再灌流直後は心室粗細動となったが、心拍再開後も拍出圧および O<sub>2</sub> extraction の低下が起り、心筋傷害が惹起されたことが確認され、人工赤血球の評価系として望ましいと考えられた。

⑥ 合成した 10 種類の近位塩基結合型プロトヘムについて検討した結果プロピオン酸側鎖がメチル基よりもエチル基、軸塩基としてはイミダゾリルアルキル基よりもヒスチジルグリシル基のほうが安定な酸素錯体を形成した。アルブミン-プロトヘム系は赤血球に比べ酸素親和度が高いことから、低酸素領域にある組織への酸素化に有効と考えられた。

⑦ Hb のメト化を抑制するために酸化を引き起こす過酸化水素を消去する目的で薬剤を血液中に投与する方法としてのアスコルビン酸の投与では、連続投与にて Hb 小胞体内の Hb のメト化が抑制された。還元剤としても作用するシステインの投与

によりメト化が促進するのが観察された。これは、膜を透過したシステインが小胞体内で Hb を還元するよりも早く自動酸化を受け、Hb をメト化したものと考えられた。アスコルビン酸の単独連続投与は Hb 小胞体のメト化を抑制する方法として有効である可能性が示唆された。

⑧ L-Tyr を Hb 小胞体内に包埋すると Hb の自動酸化を抑制することおよび、Hb 小胞体の安定性にも影響を及ぼさないことが明らかとなった。

⑨ 微小血管モデル内を流動する Hb 小胞体の酸素放出挙動は赤血球のそれとほぼ同等であり、赤血球と混合して流動させても変化は認めなかった。

⑩ ハムスターの有茎皮弁における虚血領域の酸素化については P<sub>50</sub> の異なる Hb 小胞体を用いたところ、血液希釈を行なって P<sub>50</sub> の低い Hb 小胞体を輸注したほうが虚血部位の組織酸素化に有効であった。

⑪ ラットを用いた人工心肺回路の充填液としての用途については動物モデルにおいて予定された流量を達成するために改良を行なった。

#### D. 結論

救急・災害医療に使用可能な人工赤血球の開発において、臨床に即したモデルに基づいた検討結果が今後の開発研究に重要な役割を果たすと考えられる。本年度は出血性ショック、心筋虚血、脳虚血、体外循環について基礎的検討を行い、今後人工赤血球を使用する際に評価を行なうに足るモデルが確立し、次年度の研究に継続する結果が得られた。また、研究の経過とともに、人工赤血球の性質(P<sub>50</sub>)を変化させて、救急・災害医療にふさわしい物性を持つ新たな人工赤血球を開発できる可能性も示唆され、今後、動物試験の結果により目的に一致した試料の選択、使用法、投与法を検討すべきである。

## 分担研究報告書

救急・災害医療に利用可能な人工赤血球の開発に関する研究

分担課題：人工心肺による体外循環モデル作成 と 人工赤血球による充填効果

主任研究者	四津 良平	慶應義塾大学医学部 外科 教授
分担研究者	饒庭 了	慶應義塾大学医学部 外科 講師
	山崎 真敬	慶應義塾大学医学部 外科 助手

## 研究要旨

近年、新生児乳児の開心術の成績は飛躍的に向上したが、一般的には人工心肺回路の充填液として依然として輸血が用いられている。これは低体重の患者で無輸血充填とした場合、近年の人工心肺回路の改良によりその充填量が限界まで小さくなくても、人工心肺の運転中に激しい血液希釈状態となり、臓器の適正な酸素供給が保証されないためである。特に脳は最も酸素需要の高い臓器であり、また酸素需要供給バランスの不均衡による脳障害は多くの場合、不可逆的である。一方で輸血には肝炎やエイズなど血液伝搬性ウイルスの混入、輸血後移植片対宿主病など多種の重篤な合併症のリスクを伴っている。上記のような臨床上的ジレンマの一解決手段として、我々は人工赤血球に注目した。本研究では、人工赤血球を人工心肺充填液として使用することにより、極度の血液希釈状態における高次脳機能障害の防止効果を検討することを目的とする。なお本研究により慢性人工心肺モデルでの効果が発見され、輸血に変わって人工赤血球が人工心肺中の血液希釈状態を解決する手段となれば、臨床での新生児乳児の安全な無輸血開心術への確実な展望が開けるものと考えられる。平成15年度はラットによる人工心肺モデルの確立に力を注ぎ、現在もなお予備実験が進行中である。

## A. 研究目的

現在、我々小児心臓外科の領域では体重10kg以下の患者に対し、体外循環を使用する場合、人工心肺の充填液として濃厚赤血球(ACDへパリン血)を使用している。人工心肺の回路の充填液は約 300～400mL 必要であり晶質液で満たした場合、体重 10kg以下の患者(循環血液量は約 800mL 程度)では、血液希釈(hemodilution)が起き、酸素運搬体である赤血球の相対的な減少の為、組織酸素代謝に破綻を来す。この為、現在、体重 10kg 以下の患者に体外循環を行う場合は、輸血は避けられない状況にある。しかし今日、同種血輸血による感染症、移植片対宿主反応、免疫抑制などの弊害が明らかにされており、我々は同種血輸血を可能な限り回避するように努めなければならない

い。この臨床上的ジレンマの一解決手段として、我々は人工赤血球に注目した。本研究では、人工赤血球を人工心肺充填液として使用することにより、極度の血液希釈状態における高次脳機能障害の防止効果を検討することを目的とする。

人工赤血球は出血性ショックなどへの臨床応用が期待されているが、現時点で半減期が赤血球に比し短いことが指摘されている。一方、人工心肺運転中に生じる血液希釈状態という特殊な環境はおおよそ数時間であり、その数時間だけ血液の役割を果たし、その後速やかに代謝されるタイプの人工赤血球を開発できれば、小児心臓外科の立場から考えると臨床上的ジレンマを解決に導く大きな利点となる。すなわち人工赤血球の特徴を活かした臨床適用であると考えられる。慢性人工心

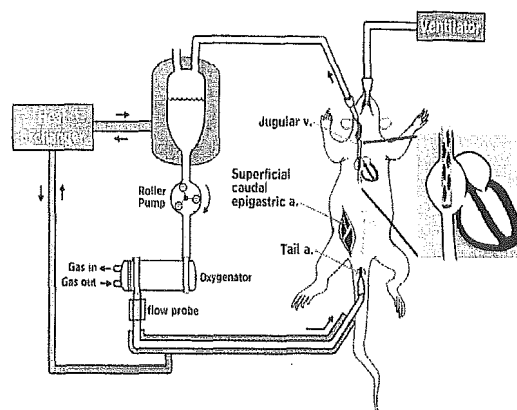
肺モデルを確立し、人工心肺充填液として人工赤血球を添加した時に得られる酸素運搬量の増大は、高次脳機能の障害を防止または軽減させる可能性があり、この関して一定の知見を得る。

## B. 研究方法

ローラーポンプと特製膜型肺を用いて人工心肺回路を作成し(図参照)、回路内に生食を充填した群、同種血を充填した群、そして人工赤血球を充填した群に分けて実験を行う。

体重 250g 前後のラットをセボフルレンにて全身麻酔し、16G 静脈留置針にて気管内挿管する。人工心肺のカニューレーションとして、脱血は経右内頸静脈的に右房から、送血は尾動脈を介して行う。人工心肺の運転は常温下、無拍動送血法で 100~150mL/kg の流量で 60 分間ないし 120 分間行う。人工赤血球充填液のヘモグロビン濃度は 10g/mL とする。ラットを 16 群(各N=10)に分け、以下のような充填量と組成の組み合わせとする。

- 1群 充填量 30mL, 生食充填
- 2群 充填量 35mL, 生食充填
- 3群 充填量 40mL, 生食充填
- 4群 充填量 45mL, 生食充填
- 5群 充填量 50mL, 生食充填
- 6群 充填量 30mL, 同種血充填
- 7群 充填量 35mL, 同種血充填
- 8群 充填量 40mL, 同種血充填
- 9群 充填量 45mL, 同種血充填
- 10群 充填量 50mL, 同種血充填
- 11群 充填量 30mL, 人工赤血球充填
- 12群 充填量 35mL, 人工赤血球充填
- 13群 充填量 40mL, 人工赤血球充填
- 14群 充填量 45mL, 人工赤血球充填
- 15群 充填量 50mL, 人工赤血球充填
- 16群 コントロール群



人工心肺運転終了後は全ての人工心肺回路内の残存血液を10分間かけて血管内に戻す。その後、カニューレを抜き、麻酔から覚醒させたのち、動物をゲージにて飼育する。

術後 1、3、7 日目に標準化神経学的認知試験及び迷路試験を行う。以上の試験はビデオ録画して、後に盲検となっている神経学者が一括して評価する。その後、動物は犠牲死させ、脳の組織を採取し、海馬部の病理学検査を行う。

平成15年度は人工心肺回路の確立に向け、予備実験を施行した。倫理面への配慮として、実験動物の胸骨正中切開は行わない。右内頸静脈にアプローチする際、ラットの右頸部に切開を加えるが、皮切線はわずかで動物への負担を最小にするように配慮した。

## C. 研究結果

平成15年度は人工心肺回路の確立に向け、予備実験を重ねた。緩徐にポンプを回すことは可能であったが、予定された流量(100~150mL/kg)でポンプを回すことは、脱血不良にて困難であった。

## D. 考察

現状では脱血効率が悪く、脱血不良となることが多い。閉鎖回路であるがゆえ一度脱血不良となると、空気が混入してしまい、さらに脱血不良となるという悪循環に陥るため、重大な問題である。脱血不良の原因としては、400g の大きさと血管の太さを考えれば脱血管の太さに関しては充分と考えられることから、問題は脱



血管先端の位置および側孔の大きさ、そして右房の容積であると考えている。送血管は 20G の太さでほぼ限界と考えられるので、多少の送血圧上昇はやむをえず、その結果、脱血不良が助長される。現在はポンプを開始する前に、脱血側からボリュームを加えることで、ポンプ開始直後の脱血不良に備えている。大腿動静脈からのアプローチも考えられるが、いずれも血管径が細く、まだポンプが回るまでには至っていない。

胸骨正中切開でのカニューレーションは極めて侵襲的で、ポンプ後の生存実験には不向きであることから、現在浮上している問題を解決することで、早期のポンプ回路の確立をめざす。

## E. 結論

平成 15 年度においては、人工心肺回路の確立に向け予備実験を施行した。予定された流量(100～150mL/kg)でポンプを回すことは、脱血不良にて困難であったが、低流量であれば、ラットの人工心肺モデルは確立可能であった。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 飯野与志美、饗庭 了、橋詰賢一、古泉潔、加藤木利行、四津良平. “Fontan 手術の成績は段階的戦略により向上したか?” *胸部外科* **56**, 276-9 (2003).
2. Aeba R, Katogi T, Hashizume K, Iino Y, Koizumi K, Hotoda K, Inoue S, Matayoshi H, Yoshitake A, Yozu R. The limitation of staged repair in the surgical management of congenital complex heart anomalies with aortic arch obstruction. *Jap J Thorac Cardiovasc Surg.* **51**, 302-7 (2003).
3. Aeba R, Katogi T, Hashizume K, Koizumi K, Iino Y, Mori M, Yozu R. Liberal use of tricuspid valve detachment for transatrial ventricular septal defect closure. *Ann Thorac Surg.* **76**, 1073-7 (2003).

4. Aeba R, Katogi T, Koizumi K, Iino Y, Mori M, Yozu R. Apico-pulmonary artery conduit repair of congenitally corrected transposition of the great arteries with ventricular septal defect and pulmonary outflow tract obstruction. *Ann Thorac Surg.* **76**, 1383-8 (2003).
5. Mitoh A, Yano T, Sekine K, Mitamura Y, Okamoto E, Kim D-W, Yozu R, Kawada S. 『Computational Fluid Dynamics Analysis of an Intra-Cardiac Axial Flow Pump』 *Artificial Organs* **27(1)**, 34-40 (2003).
6. Mitamura Y, Sekine K, Murabayashi S, Okamoto E, Yozu R. A SAFE, DURABLE, NON-POWER CONSUMPTIVE, SIMPLE SEAL FOR ROTARY BLOOD PUMPS. *ASAIO JOURNAL ABSTRACTS* **49(2)**, 159 (2003).
7. Sekine K, Mitamura Y, Murabayashi S, Nishimura I, Yozu R, Kim D-W. Development of a Magnetic Fluid Shaft Seal for an Axial-Flow Blood Pump, *Artificial Organs* **27(10)**, 892-896 (2003).
8. 飯野与志美、申 範圭、四津良平. “低侵襲心臓弁膜症手術の最前線 Port-Access MICS からロボット支援下心臓手術まで” *Mebio* **5** **20(5)**, 91-95 (2003) (メジカルビュー社)
9. 許 俊鋭、高本眞一、四津良平、坂本 徹、又吉 徹、見目恭一. “陰圧吸引補助脱血体外循環の有効性と問題点- 3 学会合同陰圧吸引補助脱血体外循環検討委員会報告書より-” *Clinical Engineering* **14(8)**, 857-865 (2003) (秀潤社)
10. 吉武明弘、四津良平. “心臓外科の新しい strategy - 低侵襲心臓手術 (MICS) -” *心臓 HEART* **35(11)**, 725-729 (2003) (丸善株式会社)
11. 森 光晴、四津良平. “低侵襲心臓手術における手術器具の発展と改良” *臨床外科* **58(13)**, 1597-1603 (2003) (医学書院)
12. 吉武明弘、四津良平. “低侵襲心臓手術 (MICS)” *ハートナーシング* **17(1)**, 35-39 (2004) (株式会社メディカ出版)
13. 四津良平 (プランナー). “特集 循環を補助する医療機器を理解しよう” *ハートナーシング* **17(3)**, 65 (2004) (株式会社メディカ出版)

### 2. 学会発表

1. Aeba R, Katogi T, Koizumi K, Iino Y, Mori M, Yozu R. Apico-pulmonary artery conduit repair of congenitally corrected transposition of the great arteries with ventricular septal defect and pulmonary outflow tract obstruction. The 39<sup>th</sup> annual meeting of the Society of Thoracic Surgeons. January 2003, San Diego, California, USA
2. 加藤木利行、饗庭 了、橋詰賢一、飯野与志美、古泉潔、森光晴、安西兼丈、又吉秀樹、吉武明弘、井上慎也、岡本一真、鈴木亮、四津良平／完全型心内膜床欠損症の外科治療—貫した術式による20年間の手術成績／第33回日本心臓血管外科学会学術総会／2003.5／札幌
3. 加藤木利行、饗庭 了、四津良平／パネルディスカッション.完全大血管転位症に対する動脈スイッチ手術／第40回日本小児外科学会総会／2003.5／京都
4. 饗庭 了、加藤木利行、飯野与志美、橋詰賢一、古泉潔、森光晴、安西兼丈、又吉秀樹、吉武明弘、岡本一真、鈴木亮、四津良平／シンポジウム.長期成績から見た先天性心疾患の治療展望. 長期成績から見た両心室修復術における右室流出路再建に残された課題、さらなる発展に向けて／第103回日本外科学会総会／2003.6／札幌
5. 饗庭 了、加藤木利行、飯野与志美、森 光晴、安西兼丈、井上慎也、吉武明弘、岡本一真、鈴木 亮、山崎真敬、武田尚一郎、木村成卓、四津良平、又吉 徹、森田雅教／シンポジウム.新生児乳児における開心術の成績向上に貢献した人工心肺技術：新生児乳児人工心肺の低侵襲化の工夫と課題／第56回日本胸部外科学会総会／2003.1／東京
6. 饗庭 了、加藤木利行、森 光晴、井上慎也、安西兼丈、吉武明弘、岡本一真、山崎真敬、武田尚一郎、木村成卓、四津良平／シンポジウム.修正大血管転位症の治療戦略. 機能的修復術後遠隔成績から見て Double Switch 手術の適応拡大は正当化されるか？／第34回日本心臓血管外科学会学術総会／2004.2／福岡
7. 森 光晴、加藤木 利行、饗庭 了、安西兼丈、井上慎也、吉武明弘、岡本一真、山崎真敬、武田尚一郎、木村成卓、四津良平／会長要望演題: ファロー四徴症遠隔成績からみた術式の選択自己組織を用いた右室流出路再建法 —右室-肺動脈直接吻合法の遠隔成績—／第34回日本心臓血管外科学会学術総会／2004.2／福岡
8. 饗庭 了、加藤木利行、森 光晴、井上慎也、安西兼丈、吉武明弘、岡本一真、山崎真敬、武田尚一郎、木村成卓、四津良平／パネルディスカッション.複雑先天性心疾患に対する右室流出路再建術 -40年間の単一施設における経験と遠隔成績-／第104回日本外科学会総会／2004.4／大阪
9. Yozu R／Port-Access Cardiac Surgery : Experience of 72 Cases in Keio University Hospital／第67回日本循環器学会総会 Plenary Session 6／2003.3.28～30／福岡
10. 四津良平／新しい心臓手術：Port-access法の経験と展望／第26回 日本医学会総会／2003.4.4／福岡
11. 四津良平（座長）／一般演題（口演）人工心臓・循環補助・周術期管理／第33回 日本心臓血管外科学会／2003.5.15／札幌
12. 申 範圭、古泉 潔、又吉 徹、四津良平／コンピュータ制御サーボコントロールによる active coronary perfusion 補助下の OPCAB／第33回 日本心臓血管外科学会／2003.5.16／札幌
13. 橋詰賢一、四津良平、申 範圭、飯野与志美、古泉 潔、森 光晴、安西兼丈、又吉秀樹、吉武明弘、岡本一真、鈴木 亮、又吉 徹、森田雅教／上・下大静脈テーピングなしの Port-Access MICS (右第4肋間小開胸) 左房粘液腫への応用／第33回 日本心臓血管外科学会／2003.5.15／札幌
14. 四津良平／人工心臓・循環補助・周術期管理／第33回 日本心臓血管外科学会／2003.5.15／札幌
15. 申 範圭、橋詰賢一、古泉 潔、又吉 徹、飯野与志美、森 光晴、吉武明弘、又吉秀樹、安西兼丈、岡本一真、鈴木 亮、森田雅教、四津良平／Active Coronary Perfusion 下の Off-Pump CABG—より安全・確実な OPCAB をめざして—／第33回 日本心臓血管外科学会／2003.5.15／札幌
16. 四津良平／陰圧吸引補助脱血体外循環の臨床的意義と操作方法 3学会合同陰圧吸引補助脱血体外循環検討委員会報告（シンポジウム）／第

- 33 回 日本心臓血管外科学会／2003.5.15／札幌
17. 四津良平／(特別講演)「新しい心臓手術：Port-Access 法の経験」／第 14 回 北海道胸部・心臓・血管外科学会／2003. 5.17／札幌
18. 高本眞一、四津良平／パネルディスカッション 17 「心大血管手術の低侵襲化の現状と将来展望」／第 103 回 日本外科学会定期学術集会／2003.6／札幌
19. 申 範圭、四津良平、飯野与志美、橋詰賢一、古泉 潔、森 光晴／Port-Access 心臓手術の現状と将来－慶應義塾大学病院の経験より－／第 103 回 日本外科学会定期学術集会／2003.6／札幌
20. 四津良平／Cardiac Surgery 1／第 16 回国際心臓胸部外科学会日本支部学術大会／2003. 7／熊本
21. Kokaji K, Yozu R, Shin H, Anzai K and Maehara T. / New approaches for Port-Access Cardiac Surgery-Experiences of Keio Univ Hospital／第 16 回国際心臓胸部外科学会日本支部学術大会／2003. 7
22. 四津良平／低侵襲心臓手術－Port－access 法による僧帽弁膜症手術－／第 19 回 日本人工臓器学会 教育セミナー「体外循環と補助循環」／2003. 7／東京
23. 又吉 徹、四津良平／陰圧吸引補助脱血法による人工心肺／第 19 回 日本人工臓器学会 教育セミナー 「体外循環と補助循環」／2003. 7／東京
24. 四津良平／体外循環と補助循環／第 19 回 日本人工臓器学会 教育セミナー／2003. 7／東京
25. 四津良平／(特別講演)「新しい心臓手術：Port-Access 心臓手術の現状と展望」／第 154 回 循環器研究会／2003.7.22／横浜
26. 四津良平／心内操作を伴うMICS：現状と将来／第 51 回 日本心臓病学会学術集会ファイアサイドシンポジウム／2003. 9／東京
27. 四津良平／(講演)「新しい心臓手術：Port access 心臓手術の経験」／第 14 回 循環器エキスパートカンファレンス／2003. 9／大阪
28. 四津良平／(講演)「Port-Access 低侵襲心臓手術」／第 95 回 ACCP(American College of Chest Physicians)日本部会定期教育講演会／2003. 9／東京
29. 四津良平、坂下恵一郎／臨床工学技士ワークショップ 3 「人工臓器チームにおける臨床工学技士の役割」／第 41 回日本人工臓器学会大会／2003. 10／仙台
30. 申 範圭、古梶清和、橋詰賢一、森 光晴、又吉 徹、吉武明弘、鈴木 亮、四津良平／大静脈遮断が困難な右房内腫瘍の切除術－空気吸引に対応した陰圧吸引脱血の応用－／第 56 回日本胸部外科学会総会／2003. 11／東京
31. 四津良平／(特別講演)新しい心臓手術 Port-Access 心臓手術の経験／心臓血管外科 up to date in 新潟／2004. 1／新潟
32. 四津良平／(特別講演)新しい心臓手術－Port-Access 法の経験と展望－／第 77 回山口県循環器談話会／2004. 1／山口
33. 四津良平／人工赤血球の臨床応用／厚生労働省科学研究 平成 15 年度 研究成果発表会 人工血液をつくる(4)／2004.2／東京
34. 古梶清和、四津良平、申 範圭、森 光晴、安西兼丈、吉武明弘、岡本一真、山崎真敬、武田尚一郎／Port-Access 法による成人先天性心疾患手術の経験／第 34 回日本心臓血管外科学会学術総会／2004. 2／福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

## 分担研究報告書

## 救急災害医療に利用可能な人工赤血球に関する研究

## 分担課題：出血性ショックにおける人工赤血球が循環動態に及ぼす影響

## - 中動物を用いた検討 -

分担研究者	相川直樹	慶應大学医学部 救急部	教授
研究協力者	山本 学	慶應大学医学部 外科	助手
	藤本博行	慶應大学医学部 外科	助手
	中川晶人	早稲田大学 理総研	研究員

## 研究要旨

救急災害医療における人工血液の使用法として外傷による出血に対する利用が考えられている。中型動物において出血性ショックを想定した動物モデルを作成するため、条件を変えて出血性ショックモデルを作成、循環動態、酸素運搬能について検討した。救急災害の場で行われる医療として有効性を検証するためには動物実験によって効果がどの程度まで保証されるか、また、害をなさないことの検証が必要であると同時に新しい物質である人工赤血球を用いて出血性ショックの病態の解明を行うことが必要不可欠である。以上の目的で出血性ショックに置ける人工赤血球が循環動態に及ぼす影響を評価する。平成 15 年度では、この推進のためのモデルの作成についてビーグル犬を用いて検討を行い、最終的に循環血液量の 70%の希釈後に 30%の脱血とそれに伴う 60 分のショック状態の維持を行なうモデルを作成し、ショック蘇生に対する人工赤血球の効果を検討するとともにその機能を解析することとした。今後、このモデルを用いて人工赤血球の酸素運搬、微小循環についての検討を行う予定である。

## A. 研究目的

救急災害医療における人工赤血球の用途としては、外傷における出血に対する輸血の代替、熱傷における消耗性の貧血に対する輸血の代替、虚血性疾患に対する虚血部位の機能不全を最小限にとどめる酸素治療への応用、人工心肺を用いた手術時のプライミング液としての利用、移植臓器の保存時間延長のための保存液としての使用など種々の用途が考えられている。人工赤血球の性質、効果、安全性については現在まで少量ずつを調製していたため、小動物を用いた研究が主体であったが、製造技術の進歩により、中、大動物による臨床応用に即した研究を行うことが可能となった。

救急災害医療における輸血の代替として出血性ショックの治療に用いた場合の循環動態の改善効果について検討することを目的とした。

## B. 研究方法

ビーグル犬(約 7kg)を用い、ケタミンによる静脈麻酔後に気管内挿管を行ない、セボフルレン 1～2%によって麻酔を維持した。呼吸器は酸素濃度 33%で、一回換気量 15mL/kg、15 回/分換気、PEEP4cm の条件で換気を維持した。筋弛緩剤は使用せず、自発呼吸が発現した場合はセボフルレンの吸入濃度を調節し、自発呼吸をなくした状態で実験を行なった。四肢に心電図記録用の電極を装

着、大腿動脈に動脈ライン(血圧のモニター及び脱血ライン)、大腿静脈より混合静脈血酸素飽和度連続測定可能な Swan-Ganz カテーテル(5Fr, Baxter Medical)を肺動脈内に挿入留置し、血圧、脈拍、動脈圧、肺動脈圧、混合静脈血酸素飽和度を連続測定し、経時的に心拍出量(熱希釈法)、肺動脈楔入圧、中心静脈圧、動脈血ガス分析、混合静脈血ガス分析を行ない、循環動態、酸素動態を把握することとした。

出血性ショックモデルとして ① 循環血液量の40%を15分で脱血し、ショックを作成、30分後に出血量と等量の蘇生液を用いて蘇生するモデル、② 循環血液量の50%を15分で脱血してショックを作成、30分後に出血量と等量の蘇生液を用いて蘇生するモデル、③ 脾摘後に循環血液量の40%を15分で脱血し、ショックを作成、60分後に出血量と等量の蘇生液を用いて蘇生するモデル、④ 脾摘後に循環血液量の50%を15分で脱血し、ショックを作成、60分後に出血量と等量の蘇生液を用いて蘇生するモデル、⑤ 脾摘後に交換輸血の方法を用いて循環血液量の50%を5%アルブミン生食にて希釈後に循環血液量の40%を15分で脱血し、ショックを作成、60分後に出血量と等量の蘇生液を用いて蘇生するモデル、⑥ 脾摘後に循環血液量の70%を5%アルブミン生食にて希釈後に60%の脱血ショックを作成、その後に5%アルブミン生食を用いて蘇生を行なうモデル、⑦ 脾摘後に循環血液量の70%を5%アルブミン生食にて交換後に脱血を行い、最大血圧を50mmHg以下とし、1時間維持した後に5%アルブミン生食を用いて蘇生を行なうモデル、⑧ 脾摘後に循環血液量の70%を5%アルブミン生食にて希釈後に30%の脱血ショックを作成、その後に5%アルブミン生食を用いて蘇生を行なうモデルを作成し、それぞれの循環動態を検討した。蘇生液としては、人工赤血球の5%アルブミン分散液(ヘモグロビン小胞体の場合)を使用する予定であるので、5%アルブミン生食とした。

## C. 研究結果

(ア) 40%脱血交換モデル：40%の脱血により平均血圧は49mmHgまで低下、ショック状態となったが、30分の経過で徐々に血圧が回復、蘇生液投与直前には平均血圧は79mmHgまで回復していた。蘇生液として5%アルブミン生食を投与したところ平均血圧は99mmHgまで回復し、容易にショック状態を脱し、その後も安定した経過をたどった。平均肺動脈圧は血圧と同様、脱血に伴い低下した(17→9.5mmHg)が、脱血終了直前には13mmHgまで回復し、5%アルブミン投与により正常値に復した。肺動脈楔入圧、中心静脈圧も同様の経過をたどり、蘇生液の投与とともに正常値に復した。体血管抵抗は4913dynes・sec・cm<sup>-5</sup>であったが、脱血直後には4021へ低下し、アルブミンにて蘇生した後は3700から4000程度で安定して推移した。肺血管抵抗は逆に脱血後に上昇を示したが、蘇生後は安定した経過を示した。

(イ) 40%出血によるショックモデルでは、対照とする5%アルブミン生食によって循環動態がほぼ正常に復することが明らかとなったので、さらに程度の厳しいモデルを作成することとし、50%脱血ショックモデルを作成した。この群では、平均血圧の回復に若干の時間がかかるものの、120分からは安定した循環動態を示すようになり、人工赤血球の効果を検証するには不十分であった。

(ウ) 脾摘後50%脱血ショックモデルでは血圧の回復が緩徐となったが、やはり最終的にショック状態を脱し、低い血圧ながら安定した経過を取った。

(エ) 酸素運搬を減少させてショック蘇生における人工血液の役割を検証するために交換輸血の方法を用いて血液希釈を行い、脾摘後50%(70%、あるいは80%)血液希釈、30%脱血、60%脱血ショックのモデルを作成した。70%血液希釈モデルではショック維持時間中に血圧の維持が困難となり、心停止をきたす動物があり、また、ショック維持

時間後に 5%アルブミン生食を用いて蘇生を開始できた動物も循環動態を正常化することができずに観察時間内に心停止した（循環動態については図 1 参照のこと）。

#### D. 考察

出血性ショックの研究では現在まで種々のモデルが開発されており、蘇生液、蘇生法、血管透過性の変化を中心にした研究が主体を占めていた。

今回、人工赤血球の出血性ショックに対する効果を検証するに当たり、臨床に即した形での出血性ショックモデルを作成することと、人工赤血球の特性である酸素運搬能が出血性ショックに与える役割を検討することを主眼とした。モデルとして考えられたのは、出血後 1 時間のショック状態を維持し、その後に蘇生液を用いて蘇生を行うことを基本とし、出血量、ショック維持時間、脾摘の有無を変更して検討を行った。

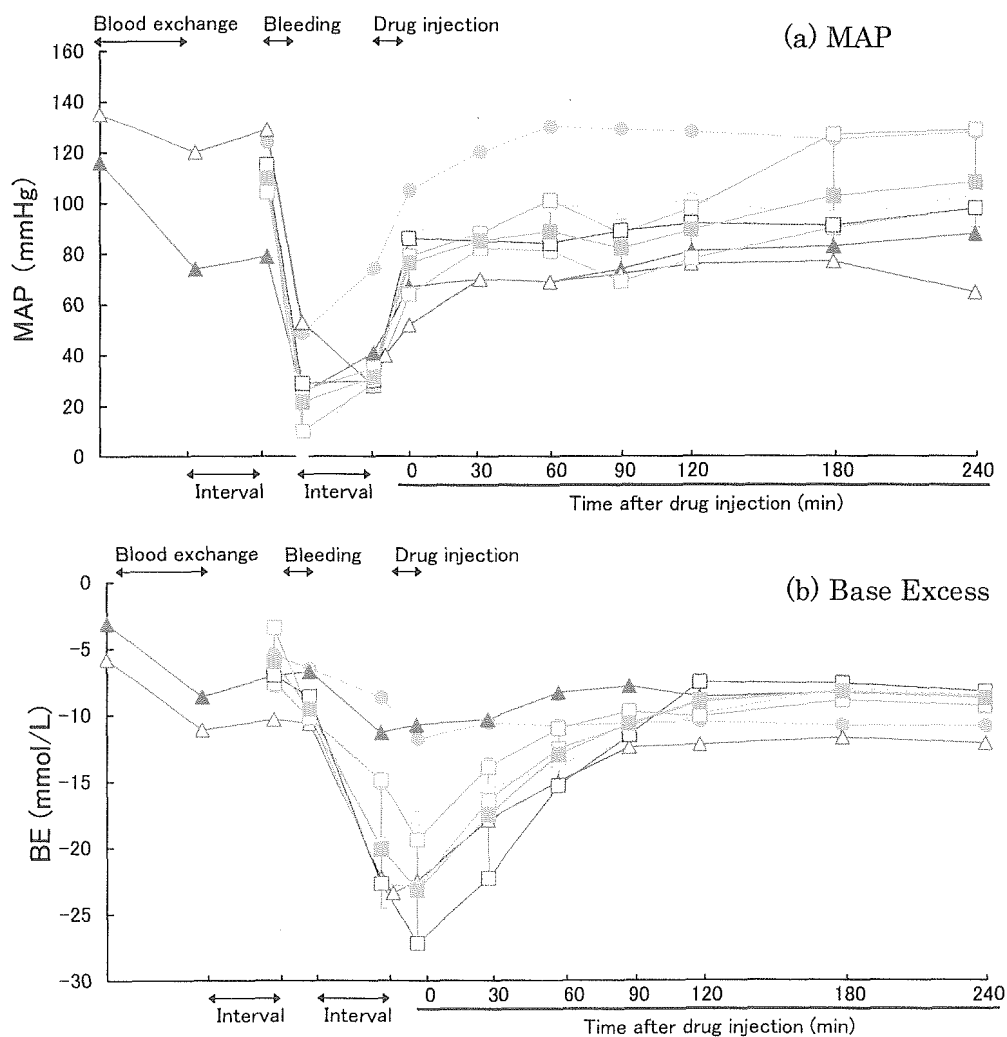


図 1 出血性ショックモデル（ビーグル犬）における (a) 平均血圧 と (b) Base Excess の推移。  
蘇生は 5%アルブミン生食で行い、出血量と等量を輸注している。  
● ; 40%脱血、○ ; 50%脱血、▲ ; 脾摘→50%交換→40%脱血、△ ; 脾摘→50%交換→40%脱血  
□, □, □ ; 脾摘→50%脱血、■ ; 脾摘→50%脱血 (平均)

出血量については 40%脱血、50%脱血、50%血液希釈後 50%脱血、70%希釈後 30%脱血、80%希釈後 30%出血のモデルを作成した。単純に 40%脱血、50%脱血を行った動物ではショック維持時間中に血圧の回復が観察され、体内での脾臓の収縮による循環血液量の増加に伴うものと考えられた。このため、脱血後の臓器間での血液のシフトを最小限に抑えるために脾臓をあらかじめ切除することとした。また、70%希釈後 50%脱血を行うモデルではショック状態を維持している間に心機能の低下が著しくなり、心停止をきたす動物もあった。蘇生後には血圧の回復は認めるが、脱血前値に比較すると低い値で推移していた。ショック時およびショック状態を維持している時間帯に肺動脈血管抵抗はいずれの動物でも上昇し、肺血管の収縮が起こっていたことが明らかとなった。5%アルブミン生食を用いて蘇生を行なうと肺血管抵抗はショック導入後に比較すると低下し安定した。肺循環においては、循環血液量が回復することにより血管抵抗も正常化すると考えられた。血液を希釈する動物では血液希釈後の循環動態は平均血圧、心拍数に大きな変化は無いが、心拍出量の増加と、体血管抵抗、肺血管抵抗の減少を認め、

Hyperdynamic な状態となっていた。この状態で Base Excess はショックにより低下し、その後は徐々に改善した(図 1, b)。

#### E. 結論

出血性ショックに対する人工赤血球の蘇生効果を評価するためにふさわしいモデルとして、脾摘後に 50%脱血ショック後 1 時間のショックの維持を行なうモデルが人工血液のショック蘇生の効果を評価するために適当なモデルと考えられた。

#### F. 研究発表

##### 論文

1. Fujishima S, Aiso S, Hori S, Aoki K, Aikawa N. Genetic polymorphisms in the promoter region of interleukin-8. *Internat Congress Series* **1255**, 95-97 (2003).
2. 相川直樹, 熱傷ショックの病態と治療法の変遷. *Shock* **18**, 15-20 (2003).
3. 相川直樹, 藤島清太郎, 田熊清継, SIRS; Systemic inflammatory response syndrome. *総合臨床* **52(5)**, 1651-1654 (2003).

## 分担研究報告書

## 救急災害医療に利用可能な人工赤血球に関する研究

- 分担課題： 1. アルブミン-プロトヘムの活性ヘム構造変換と機能調節  
 2. 還元剤投与によるヘモグロビン小胞体の metHb 生成抑制  
 3. チロシンを利用したヘモグロビン小胞体の自動酸化抑制  
 4. 微小血管モデル内を流動するヘモグロビン小胞体の酸素放出挙動の解析  
 5. ヘモグロビン小胞体の投与による有茎皮弁虚血領域の酸素化

分担研究者	小松 晃之	早稲田大学 理総研	助教授
研究協力者	土田 英俊	早稲田大学	名誉教授 / 理総研 顧問研究員
	武岡 真司	早稲田大学 理工学部	助教授
	酒井 宏水	早稲田大学 理総研	助教授
	宗 慶太郎	早稲田大学 理総研	講師
	黄 宇彬	早稲田大学 理総研	講師
	中川 晶人	早稲田大学 理総研	研究員
	王 榮民	早稲田大学 理総研	研究員
	寺村 裕治	早稲田大学大学院	日本学術振興会特別研究員

## 研究要旨

(1) 完全合成系酸素運搬体 (アルブミン-ヘム) については、適用に応じた酸素親和度を有する製剤の供給体制確立を想定し、異なる立体構造のヘム誘導体 10 種を合成、ヘム構造と酸素結合能の相関を定量的に解明した。(2) ヘモグロビン(Hb)小胞体を静脈内投与した後、アスコルビン酸を 8.4 mg/kg/hr の速度で輸注することにより、約 3 割のメト化抑制が認められた。(3) L-Tyr が Hb の自動酸化を抑制する効果を有することを初めて見出し、これを Hb 小胞体へ内包させると、生理条件下の酸素錯体寿命を 1.5 倍に延長できた。(4) 微小血管モデル(内径 25 $\mu$ m)を流動させた Hb 小胞体の酸素放出速度は赤血球と同等であり、混合比にも依存しなかったが、Hb 溶液では HbO<sub>2</sub> の促進輸送効果により酸素放出速度が増大した。(5) ハムスター有茎皮弁の虚血領域の酸素化を検討したところ、親和度の高い(P<sub>50</sub>の低い)Hb 小胞体で血液希釈することにより側副経路を経由して酸素が運搬され、酸素分圧が約二倍に増大した。

## 1. アルブミン-プロトヘムの活性ヘム構造変換と機能調節

## A. 研究目的

近位塩基を有するヘム誘導体を組換えヒト血清アルブミン (rHSA) に包接させたアルブミン-ヘム複合体は生理条件下で酸素を可逆的に結合解離

できる合成ヘム蛋白質である<sup>1,2)</sup>。ごく最近、我々はヘモグロビンの活性中心であるプロトヘム IX の誘導体でも rHSA に取り込ませることにより、酸素の吸脱着が可能となることを見出した<sup>3)</sup>。生体内におけるプロトヘム (またはその誘導体) の代謝過程は周知であり、ヘムオキシゲナーゼにより分



解された後、ビリルビンとして体外へ排泄される。つまり、アルブミン-プロトヘムは代謝が容易で、且つ低コストの人工酸素運搬体となる。他方、赤血球代替物を医療現場で利用する際、その適用に最も有効な酸素親和度の製剤を提供することが、最大限の治療効果を発現させる鍵となる。すなわち人工酸素運搬体の酸素親和度の調節は重要で、アルブミン-プロトヘム系の場合、ヘムの立体構造を変えることにより、酸素親和度を制御できる<sup>4)</sup>。そこで本年度は、計 10 種のプロトヘム誘導体を合成し、それらを包接させた rHSA-heme を対象

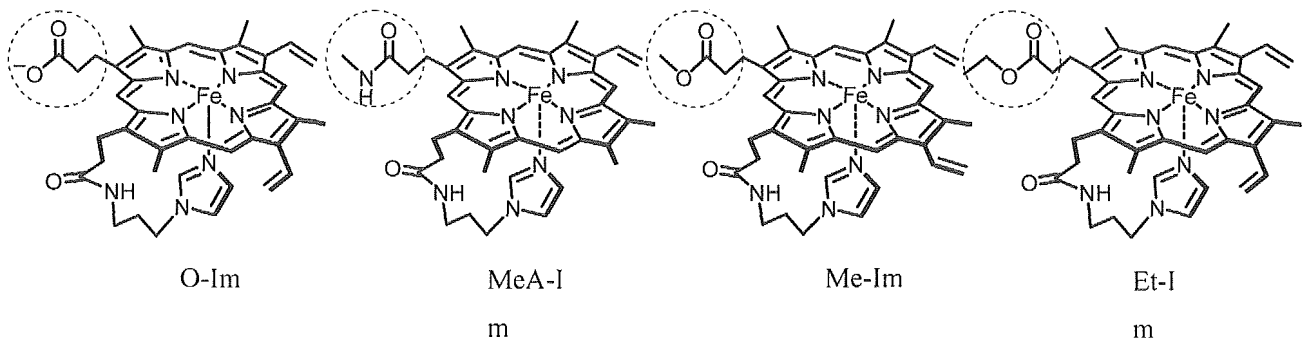
に、その酸素結合パラメーターを詳細に解析、ヘム構造と酸素結合能の相関について整理した。

## B. 研究方法

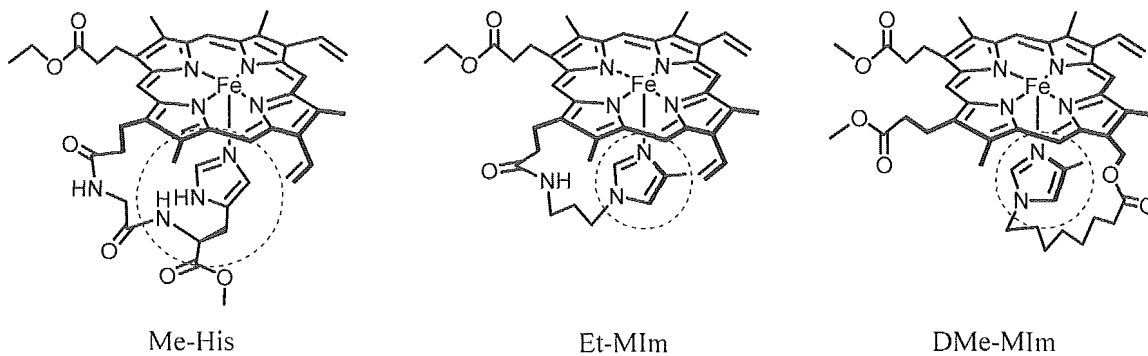
### 1. プロトヘム誘導体の合成

プロトポルフィリン、メソポルフィリン、デューテロポルフィリン、ジアセチルデューテロポルフィリンを出発物質として、計 10 種類のヘム誘導体を合成した。まず、軸塩基配位子となるイミダゾール誘導体をピリジンまたは DMF 溶液中で BOP を縮合剤としてプロピオン酸残基に結合させ

#### 【プロピオン酸残基修飾型】



#### 【軸塩基修飾型】



#### 【3,8-位修飾型】

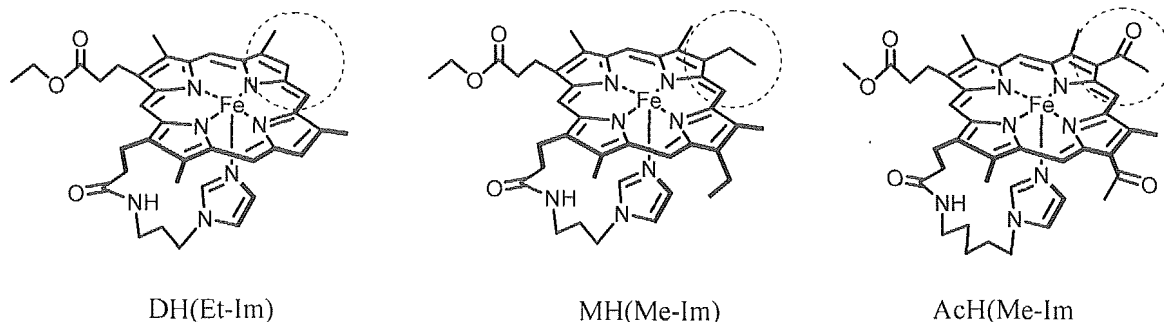


Fig. 1 Heme derivatives with a covalently bound axial base.

た後、他方のプロピオン酸残基へ疎水性置換基を導入した。得られたポルフィリン誘導体に  $\text{FeCl}_2$  を用いて中心鉄を挿入、各化合物を得た。構造解析は、 $^1\text{H-NMR}$ 、UV-vis.、IR、MS スペクトルにより行った。

## 2. DMF 中における酸素結合反応

Ar で脱気したプロトヘム誘導体(Fe(III)体)の DMF 溶液(20  $\mu\text{M}$ )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( $\text{O}_2$ )を吹き込むことにより oxy 体、さらに一酸化炭素( $\text{CO}$ )の通気により carbonyl 体を得た。

## 3. アルブミン-プロトヘムの調製

rHSA のリン酸緩衝水溶液([rHSA]=20  $\mu\text{M}$ 、pH7.3)に、Ar 雰囲気下で heme( $\text{CO}$ )錯体の EtOH 溶液を加え、rHSA-heme( $\text{CO}$ )錯体([FePP]=20  $\mu\text{M}$ )を得た。光照射(500W ハロゲンランプ)により  $\text{CO}$  を解離させた後、 $\text{O}_2$  を通気し oxy 体を得た。

## 4. アルブミン-プロトヘムの酸素結合能測定

得られた rHSA-heme アルブミン-プロトヘムのリン酸緩衝水溶液について、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。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 ( $\tau_{1/2}$ ) (25 $^\circ\text{C}$ ) を決定した。

## C. 結果および考察

合成した 10 種類の近位塩基結合型プロトヘム誘導体の構造式を Fig. 1 に示す。

### 1. DMF 溶液中の酸素結合反応

#### 1-1. deoxy 体

得られたプロトヘム誘導体を DMF 中、Ar 雰囲気下で還元し、Fe(II)錯体とした。いずれのヘムも Fe(II)5 配位高スピン錯体型の UV-vis.スペクトルパターンを示し、軸塩基が中心鉄に分子内配位していることが示唆された。

プロピオン酸残基修飾型 (O-Im, MeA-Im, Me-Im, Et-Im) では、側鎖末端構造 (カルボキシル基、メチルアミド、メチルエステル、エチルエステル) の違いによらず、UV-vis.スペクトルの  $\lambda_{\text{max}}$

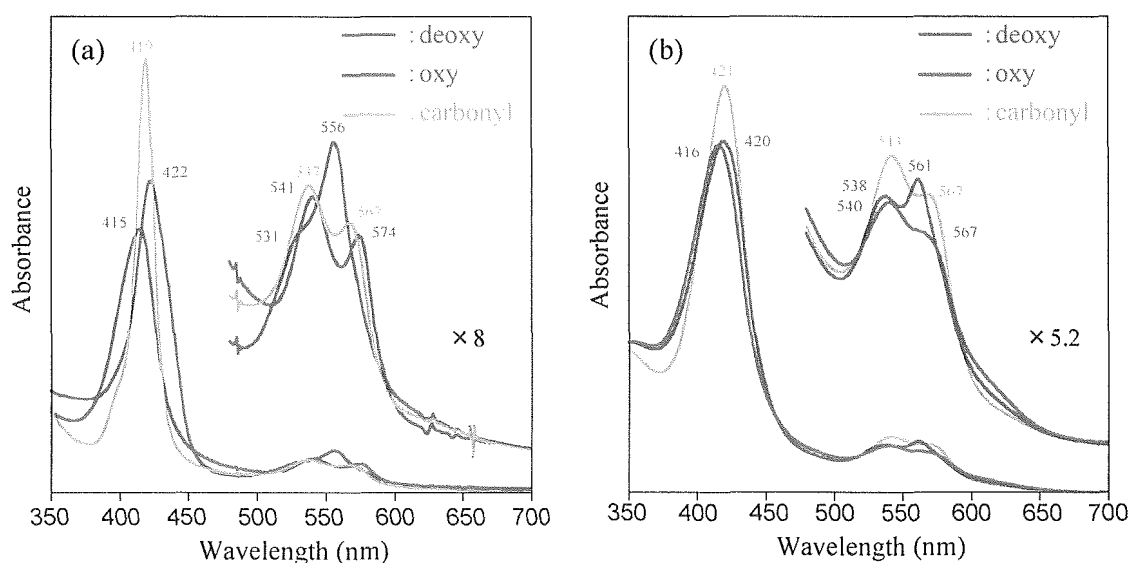


Fig. 2 UV-vis. Absorption spectral changes of EtO-Im (a) in DMF solution at 5 $^\circ\text{C}$  and (b) rHSA hybrid in p.b. solution at 25  $^\circ\text{C}$ .

**Table 1** Absorption maxima ( $\lambda_{\max}$ ) of heme derivatives in DMF.

Compounds	$\lambda_{\max}$ [nm]		
	deoxy	oxy	carbonyl
O-Im (5°C)	421, 527, 555	413, 540, 572	417, 536, 564
Me-Im (15°C)*	427, 530, 558	414, 543, 575	420, 540, 569
Me-Im (25°C)	424, 532, 559	412, 542, 575	420, 539, 567
MeAm-Im (25°C)	426, 537, 559	415, 543, 575	420, 539, 567
Et-Im (5°C)	422, 531, 556	415, 541, 574	419, 537, 567
Et-Im (25°C)	421, 533, 557	409, 539, 571	418, 537, 565
Et-His (5°C)	419, 529, 551	406, 537, 569	412, 534, 562
Et-His (25°C)	423, 533, 557	408, 539, 573	419, 538, 567
Et-MIm (5°C)	430, 555	413, 547, 576	418, 538, 561
DMe-MIm (5°C)	426, 554	-	413, 530, 564
MH(Et-Im) (25°C)	414, 523, 548	407, 531, 563	409, 529, 556
AcH(Me-Im) (5°C)	440, 541, 571	432, 552, 579	434, 549, 576
AcH(Me-Im) (25°C)	439, 545, 569	431, 552, 580	433, 548, 577

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

値に大きな差は見られなかった (Fig. 2a, Table 1)。また、ヒスチジルグリシル基を有する Et-His も、イミダゾリル型ヘムと類似の $\lambda_{\max}$  値を示した。

メソヘム(MH(Et-Im))の $\lambda_{\max}$  はプロトヘム系と比較して青方シフトしたが、そのスペクトルパターンは同様であった。一方、ジアセチルデューテロヘム(AcP(Me-Im))の $\lambda_{\max}$  はプロトヘム系に比べ赤方シフトし、さらに Q 帯高波長側ピークの吸光度が低下、2つのピークがほぼ等しい吸光度となった。 $\lambda_{\max}$  の値は MH(Et-Im) < プロトヘム系 < AcH(Me-Im)の順となる。これは、ポルフィリン環 3,8-位に導入した置換基の電子供与性と吸引力の相違により、環の電子密度が変化するためと考え

られる。

また、軸塩基として 2-メチルイミダゾリル基を導入した Et-MIm や DMe-MIm も Fe(II)5 配位高スピン錯体型の UV-vis. スペクトルを示し、塩基部位が中心鉄に分子内配位していることが確認された。

#### 1-2. oxy 体、carbonyl 体

DH(Et-Im)、DMe-MIm 以外の 8 種類のヘムは、O<sub>2</sub> の通気に伴い、速やかに酸素錯体を形成。また CO を通気すると、安定な CO 体を生成した。DH(Et-Im)、DMe-MIm は O<sub>2</sub> との接触により瞬時に酸化した。DH(Et-Im)はポルフィリン環 3,8-位

**Table 2** Absorption maxima ( $\lambda_{\max}$ ) of rHSA-heme in phosphate buffer (pH 7.3) at 25 °C.

Compounds	$\lambda_{\max}$ [nm]		
	deoxy	oxy	carbonyl
Me-Im	420, 536, 561	414, 540, 567	419, 541, 566
Et-Im	420, 538, 561	416, 540, 567	421, 543, 567
Et-His	422, 539, 561	418, 540, 571	422, 541, 569
MH(Et-Im)	406, 527, 549	-	409, 531, 558
AcH(Me-Im)	444, 549, 571	432, 551, 580	440, 555, 578

に置換基を持たないため、 $\mu$ -oxo 二量体を形成しやすいものと考えられる。5 °C、25 °C において、deoxy→oxy→carbonyl 体の UV-vis. スペクトル変化を測定した。5 °C では 25 °C と比較して酸素錯体の安定度は高い。 $\lambda_{\max}$  の値を Table 2 にまとめる。

## 2. rHSA 複合体の酸素結合反応

8 種類のヘム (DH (Et-Im)、DMe-MIm を除く) について、rHSA-heme 複合体を調製した。プロピオン酸側鎖の極性が高いカルボキシル基型 (O-Im)、メチルアミド型 (MeA-Im) を包接させた rHSA 複合体水溶液の UV-vis. スペクトルは、調製後に既に酸化体になっており、ヘムが rHSA に取り込まれる過程での酸化が示唆された。また、ゲル濾過により OIm や MeA-Im が rHSA に取り込まれ難いことも明らかにされた。rHSA に包接させるには、ヘムの極性が適度に低いことが必要と考えられる。

光照射により CO を脱離させ、deoxy 体を調製。2-メチルイミダゾールを有する Me-MIm carbonyl 体 ( $\lambda_{\max}$ : 419, 540, 566 nm) は、deoxy 体へ移行させる過程で中心鉄が酸化した。一般にプロトヘム誘導体の酸素親和性は高いので 2-メチルイミダゾールを導入してその低下を試みたが、中心鉄への配位力が弱いために脱離しやすく、酸化が進行したものと推測される。

その他のヘム (5 種類) の UV-vis. スペクトルパターンは、Fe(II)5 配位高スピン錯体型とイミダゾールが 2 つ軸配位した Fe(II)6 配位低スピン型の中間スペクトルパターンであった (Fig. 2b, Table 1)。アミノ酸残基などの配位子が第 6 配位座に弱く結合していることも考えられる。O<sub>2</sub> を通気すると、MH(Et-Im)、MH(Et-Im) 以外は酸素錯体を形成した。

得られた酸素錯体は時間とともに酸化劣化し、Q 帯の吸光度が徐々に減少する。UV-vis. スペクトルの連続測定により、酸素錯体が酸化していく様子を吸光度の経時変化から追跡、酸素錯体半減期 ( $\tau_{1/2}$ ) を 50 min と決定した。酸化過程は一次反応で

あり、プロトン酸化に支配されることが分かった。つまり、ヘムは rHSA に包接されているので、 $\mu$ -oxo 二量体形成は立体的に抑止されている。 $\tau_{1/2}$  は Me-Im (20 min) < Et-Im (50 min) < Et-His (90 min) となり、プロピオン酸側鎖がメチル基よりもエチル基、軸塩基としてはイミダゾリルアルキル基よりもヒスチジルグリシル基のほうが、安定な酸素錯体を与えることが明らかとなった。AcH(Me-Im) の  $\tau_{1/2}$  は 50 min で、Me-Im (20 min) よりも延長した。ポルフィリン環 3,8-位に電子吸引基を導入して環の電子密度を低下させることが、酸素錯体の安定度の向上に繋がったものと考えられる。

## 3. 酸素親和度

### 3-1. DMF 中

Me-Im の  $P_{1/2}$  は 0.3 Torr (25 °C) であり、これが T. G. Traylor の報告値と一致したことから、本実験の妥当性が確認された。 $P_{1/2}$  の値は、Et-His (0.2 Torr) < Et-Im (0.3 Torr) であった。軸塩基の  $pK_a$  を比較してみると、ヒスチジンは 6.0 で、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。一般に、強い塩基性軸配位子は高い酸素親和性を与えることが知られており、この結果は  $pK_a$  値から予測した関係と一致しない。分子シミュレーションによりイミダゾールとポルフィリン環の配位角度を見積もったところ、ヒスチジルグリシル基に比べ、イミダゾリルプロピルアミノ基はやや歪みが大きいことが明らかとなった。ヒスチジルグリシル基の歪みのない配位が高い酸素親和性に寄与していると考えられる。

### 3-2. rHSA-heme 複合体 (水中)

rHSA-heme 複合体の  $P_{1/2}$  は、Me-Im、Et-Im、Et-His と同じ値 (0.1 Torr) を示し、軸塩基の違いによる酸素親和度の変化は見られなかった。しかし、AcH(Me-Im) の  $P_{1/2}$  は 0.4 Torr で、プロトヘム系に比較すると高い (酸素親和性は低い)。ジア