

厚生労働科学研究費補助金

－ 平成 16 年度 医薬品・医療機器等
レギュラトリーサイエンス総合研究事業 －

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

(研究課題番号 : H16-医薬-066)

総括・分担研究報告書

主任研究者 末松 誠

慶應義塾大学医学部 教授

平成 17 (2005) 年 3 月

総括・分担研究報告書： 目次

I 総括研究報告

研究総括	末松 誠	慶應義塾大学医学部	7
------	------	-----------	---

II 分担研究報告

1	堀 進悟	慶應義塾大学医学部	助教授	13
2	塚田 孝祐	慶應義塾大学医学部	助手	17
3	酒井 宏水	早稲田大学理工総研	助教授	21
4	芹田 良平	慶應義塾大学医学部	助手	27

III 研究成果の刊行に関する一覧表

IV 研究成果の刊行物・別刷

I 総括研究報告

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

主任研究者 末松 誠 慶應義塾大学医学部 医化学教室 教授

研究要旨：ヘモグロビンのアロステリー（構造・機能相関）に修飾を加えた付加価値赤血球により局所の血流を人為的に制御できる可能性が示唆された。我々は細胞内の代謝物質を一斉解析するキャピラリー電気泳動/質量分析装置（CE-MS）を用いた網羅的定量分析（メタボローム解析法）の結果から、わずか1分間の低酸素暴露により赤血球内で解糖系が急速に加速するという現象を捉えた。その際、解糖系の加速に対して ATP の増加が量論的に少なかったことから、ATP が赤血球の外に放出されている可能性に着目した。実際、赤血球は酸素濃度の低下に応じてより多くの ATP を放出していた（低酸素性の ATP 放出反応）。また、ヘモグロビンの構造を人為的に一酸化炭素（CO）により R-state に固定した CO 赤血球ではこの反応は完全に抑制された。一方、一酸化窒素（NO）、二酸化炭素（CO₂）、ベザフィブラート（BZF）により T-state に固定した赤血球では、いずれも低酸素刺激がない状態で ATP の放出を認めた。さらに、ウサギの脳から取り出した微小血管（径 50-100 μm）を用いた赤血球の灌流実験では、低酸素刺激により血管は拡張した（低酸素性の血管拡張）。一方、CO 赤血球を灌流した場合、低酸素に曝してもこのような拡張は起こらなかった。α (NO) 赤血球の灌流では通常酸素分圧においても（低酸素刺激がないにも関わらず）有意な血管拡張を認めた。以上の結果から、赤血球が単なる酸素運搬体として働くばかりでなく、ヘモグロビンをセンサーとして微小循環局所の酸素分圧の低下を感知し ATP を放出することで積極的に血流を調節していることが考えられた。ヘモグロビンのアロステリーを修飾したこれらの付加価値赤血球は今後救急医療現場へ幅広い応用が期待される。

A. 研究目的

血液体積の 50%を占める赤血球が、単なる酸素運搬体として働くばかりでなく、微小循環局所の酸素需要を感知して積極的に血流を調節している可能性が注目されている。この現象のメカニズムに関して、米国 Duke 大学の Stamler らはヘモグロビンのシステイン残基に結合した一酸化窒素（NO）が、酸素分圧の低下により細胞内の glutathione を vehicle として細胞外に放出されるというメカニズムを提唱している（Science 1997）。しかしながら、NO が結合速度が数桁上のヘモグロビンに結合せず、システイン残基を標的として結合するというこの説は物理化学的に説明が不可能とする意見が多い。

一方、我々は細胞内の代謝物質を一斉解析するキャピラリー電気泳動/質量分析装置（CE-MS）を用いた網羅的定量分析（メタボローム解析法）の結果から、わずか1分間の低酸素暴露により赤血球内で解糖系が急速に加速するという現象を捉えた。その際、解糖系の加速に対して ATP の増加が量論的に少なかったことから、ATP が赤血球の外に放出されている可能性に着目した。ATP は細胞外では各種のシグナル伝達物質としての働き、特に血管内では内皮の特定受容体（purinergic receptor）に作用し、内皮からの NO の産生を促し血管拡張を起こすことが知られている。そこで、我々は低酸素に暴露した赤血球が細胞外に ATP を放出することにより、局所の血流を調節しているメ

カニズムを考えた。さらに、我々は赤血球内部のヘモグロビンの構造を NO、一酸化炭素 (CO)、二酸化炭素 (CO₂)、ベザフィブラート (BZF) などを用いて人為的に操作した場合に、赤血球からの ATP の放出や、これによる血管の反応がどのように変化するかを検討した。

B. 研究方法

B-1 酸素濃度と赤血球からの ATP 放出

分離したヒトの赤血球を *in vitro* で 1 分間の低酸素状態に曝した際に、赤血球から放出された ATP の量を luciferin-luciferase 反応を用いた chemiluminescence assay 法により測定した。

B-2 ヘモグロビンの構造と ATP 放出反応

赤血球はヘモグロビンの四次構造を変化させることで酸素に対する親和性を変えている。つまり、肺では酸素親和性の高い状態 (R-state) となり酸素を取り込み、末梢では酸素親和性の低い状態 (T-state) となり組織へ酸素の供給を行っている。そこで、ヘモグロビンの構造を人為的に CO により R-state に固定した場合、あるいはヘム濃度の半分量の NO (NO ドナーは藤沢薬品工業より供与)、ベザフィブラート (BZF)、CO₂ (60mmHg) により T-state に固定した場合に、赤血球からの ATP 放出がどのように変化するかを検討した。

B-3 アデノシン添加による ATP 放出反応の変化

ATP 合成の基質であるアデノシン (1 μM) を溶液中に添加した場合の ATP 放出反応の変化を検討した。

B-4 低酸素性の血管反応における赤血球の関与

低酸素を感知した赤血球がその部分の血管をどのように変化させるかを検討するため、ウサギの脳より摘出した細動脈 (径 50-100 μm) に赤血球を灌流させ、これを低酸素に曝した場合の血管径の変化を観察した (図 1)。

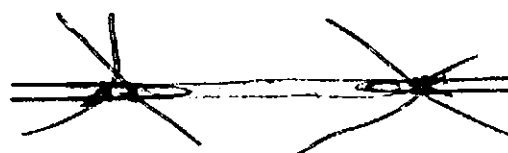


図 1 ウサギの脳から取り出した微小血管 (径 50-100 μm) を用いた赤血球の灌流実験

B-5 低酸素性血管拡張における ATP の関与

低酸素時に起こる血管の拡張が赤血球から放出された ATP によるものであることを証明するために、ATP の分解酵素 (apyrase や hexokinase) を同時に灌流した。さらに、ATP は内皮からの NO 産生を介して血管を拡張させることから、NO 合成酵素の阻害剤 (L-NAME) を用いた場合に低酸素性の血管拡張がどのように変化するかについて検討した。

B-6 ヘモグロビンの構造と低酸素性の血管反応

低酸素性の血管拡張がヘモグロビンの構造変化によることを検討するため、CO 赤血球あるいは α (NO) 赤血球を流した場合の血管の反応を調べた。

C. 研究結果および考察

C-1 酸素濃度と赤血球からの ATP 放出

赤血球は低酸素に応じて、より多くの ATP を放出していた (低酸素性の ATP 放出反応) (図 2、黒丸)。

C-2 ヘモグロビンの構造と ATP 放出反応

CO によりヘモグロビンの構造を R-state とした場合、低酸素性の ATP 放出反応は完全に抑制された (図 2、青)。一方、NO、CO₂ (60 mmHg)、BZF によりヘモグロビンの構造を T-state にした場合、いずれも低酸素刺激がない状態でも ATP の放出を認めた (図 2、赤、ピンク、紫)。よって、ヘモグロビンの構造変化が ATP 放出反応のスイッチとなっている可能性が示唆された。

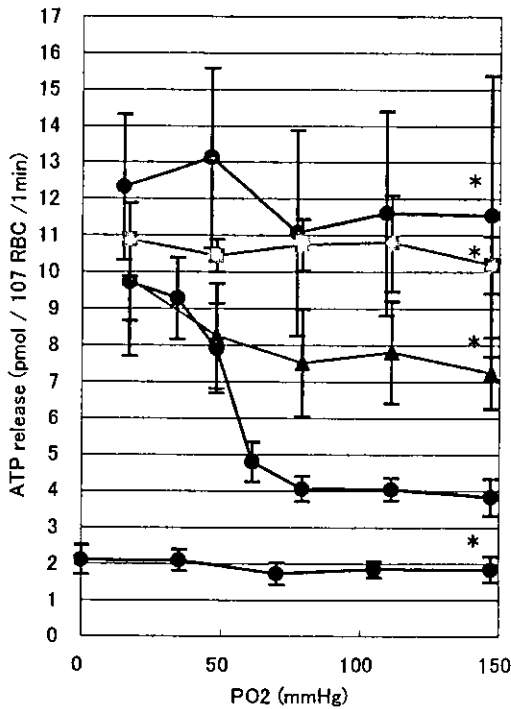


図 2 ヘモグロビンのアロステリーによる ATP 放出反応の変化 (黒：コントロール、青：CO、赤：NO、紫：CO₂、ピンク：BZF)

p < 0.05 vs. control.

C-3 アデノシン (1 μM) 添加による ATP 放出反応の変化

アデノシンの存在は ATP の放出を増幅させた (図 3)。ATP の放出と同時に、アデノシンの取り込みが起こっている可能性が示唆された。

C-4 低酸素性の血管反応における赤血球の

関与

赤血球を灌流させた状態で、血管を低酸素に曝すと血管は拡張した (低酸素性の血管拡張反応、図 4、図 5)。しかし、赤血球のない状態では血管を低酸素に曝しても拡張が起きなかった。

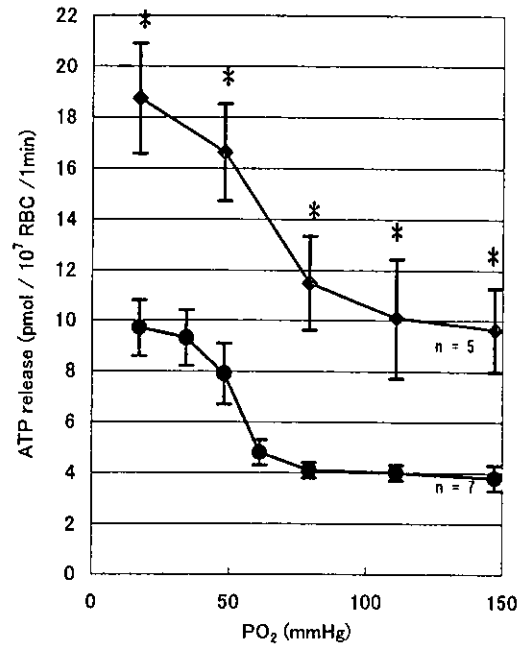
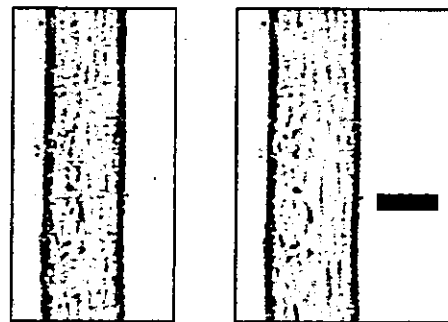


図 3 アデノシン (1 μM) 添加による ATP 放出反応の変化 (ピンク：アデノシンあり、黒：アデノシンなし) # p < 0.05 vs. adenosine (-).



正常酸素分圧 低酸素分圧 (20mmHg)

図 4 低酸素性の血管拡張 (bar = 50 μm)

C-4 低酸素性血管拡張における ATP の関与

ATP の分解酵素 (apyrase や hexokinase)、あるいは L-NAME により低酸素性の血管拡張は有意に抑制された (図 4)。

C-5 ヘモグロビンの構造と低酸素性血管反応

CO 赤血球では、低酸素性の血管拡張は起こらなかった。一方、 α (NO) 赤血球では、低酸素刺激がないにも関わらず有意な血管拡張を認めた。

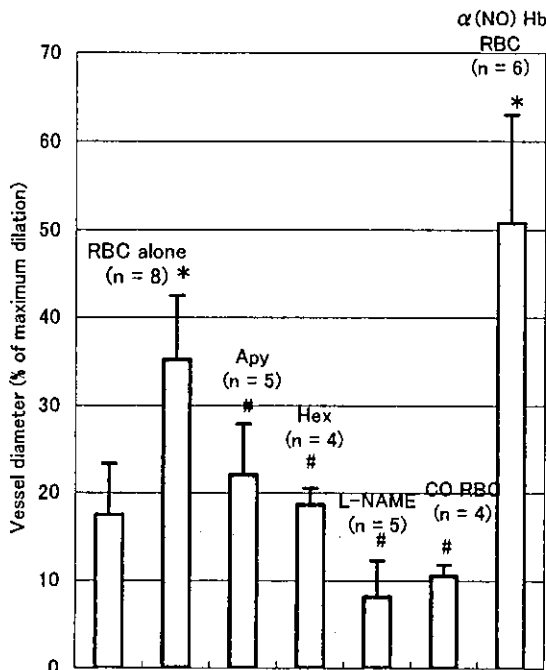


図 5 赤血球の灌流実験の結果 (ピンク: 通常酸素分圧、青: 低酸素分圧 PO₂ 約 20mmHg)

* $p < 0.05$ vs. RBC alone (normoxia)

$p < 0.05$ vs. RBC alone (hypoxia)

D. 結論

赤血球が、単なる酸素運搬体として働くばかりでなく、微小循環局所の酸素需要をヘモグロビンをセンサーとして感知し、ATP の放出を介して積極的に血流を調節していることが示唆された。ヘモグロビンのアロステリー (構造・機能相関) に修飾を加えた付加価値赤血球に関して以下の成果を得た。

(1) CO による R-state stabilization は低酸素性の ATP 放出反応を完全に抑制した。NO、CO₂、BZF による T-state ligation は通常酸素分圧でも (低酸素刺激がないにもかかわらず) ATP の放出を起こした。

(2) ウサギの微小血管を用いた灌流実験において CO 赤血球では低酸素性の血管拡張は起きなかった。一方、 α (NO) 赤血球では低酸素刺激がないにも関わらず有意な血管拡張を認めた。

これらの付加価値赤血球製剤は局所の血流を人工的に制御するものであり、今後救急医療への幅広い応用が期待される。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

F-1 論文発表

- Fujii, K., Sakuragawa, T., Kashiba, M., Sugiura, Y., Maruyama, K., Goda, N., Nimura, Y., Suematsu, M. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator of biliary bicarbonate excretion in the rat liver. *Antioxid Redox Signal.* 2005 in press
- Sugiura, Y., Kashiba, M., Hoshikawa, K., Sasaki, R., Saito, K., Kimura, H., Maruyama, K., Goda, N., Suematsu, M. Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. *Antioxid. Redox Signaling* 2005, in press.
- Katagiri, H., Ito, Y., Ishii, K., Hayashi, I., Suematsu, M., Yamashita, S., Murata, T., Narumiya, S., Kakita, A., Majima, M. Involvement of thromboxane derived from cyclooxygenase-1 and -2 in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia in mice. *Hepatology* 39, 139-150, 2004.
- Tomita, K., Azuma, T., Kitamura, N., Nishida, J., Inokuchi, S., Nishimura, T., Suematsu, M., Ishii, H. Pioglitazone preven

- ts alcohol-induced fatty liver in rats through upregulation of c-Met. *Gastroenterology* 126, 873-885, 2004.
- Kudo, A., Kashiwagi, S., Yoshimura, Y., Uchida, K., Arii, S., Suematsu, M. Kupffer cells alter organic anion transport via multidrug resistance protein 2 in the post-cold ischemic rat liver. *Hepatology* 39, 1099-1109, 2004
 - Tsuchida E, Komatsu T, Matsukawa Y, Nakagawa A, Sakai H, Kobayashi K, Suematsu M. Human serum albumin incorporating synthetic heme: Red blood cell substitute without hypertension by nitric oxide scavenging. *J Biomed Mater Res.* 64A, 257-261, 2003.
 - 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.
 - Mitani F, Mukai K, Miyamoto H, Suematsu M., Ishimura Y. The undifferentiated cell zone is a stem cell zone in adult rat adrenal cortex. *Biochim Biophys Acta.* 1619, 317-324, 2003.
 - Mukai, K., Mitani, F., Nagasawa, H., Suzuki, R., Suzuki, T., Suematsu, M., Ishimura, Y. An inverse correlation between expression of a preprocathepsin B-related protein with cysteine-rich sequences and steroid 11-hydroxylase in adrenocortical cells. *J. Biol. Chem.* 278, 17084-17092, 2003.
 - Ogishima T, Kinoshita JY, Mitani F, Suematsu M., Ito A. Identification of outer mitochondrial membrane cytochrome b5 as a modulator for androgen synthesis in Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 278, 21204-21211, 2003.
 - Kato, Y., Shimazu, M., Kondo, M., 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, 364-373, 2003.
 - Miyazawa, M., Suzuki, H., Masaoka, T., Kai, A., Suematsu, M., Nagata, H., Miura, S., Ishii, H. Suppressed apoptosis in the inflamed gastric mucosa of Helicobacter pylori-colonized iNOS-knockout mice. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 121-1630, 2003
 - Suematsu, M. Quartet signal transducers in gas biology. *Antioxid. Redox Signal.* 5, 435-437, 2003.
 - Suematsu, M., Sugauma, K., Kashiwagi, S. Mechanistic probing of gaseous signal transduction in microcirculation. *Antioxid. Redox Signal.* 5, 485-492, 2003.
 - Norimizu, S., Kudo, A., Ishikawa, K., Kajimura, M., Yamaguchi, T., Fujii, K., Tani, H., Nimura, Y., Suematsu, M. Carbon monoxide stimulates mrp2-dependent excretion of bilirubin-IX into bile in the perfused rat liver. *Antioxid. Redox Signal.* 5, 449-456, 2003.
 - Schaefer, S., Kajimura, M., Tsuyama, S., Uchida, K., Sato, E., Inoue, M., Suematsu, M., Watanabe, K. Aberrant utilization of nitric oxide and regulation of soluble guanylate cyclase in rat diabetic retinopathy. *Antioxid. Redox Signal.* 457-466, 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 hydroperoxy compound in the reaction of native myoglobin with hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 278, 41597-41606, 2003.
 - Nagano, S., Shimada, H., Tarumi, A., Hishiki, T., Kimata-Arigo, Y., Egawa, T., Suematsu, M., Park, S.Y., Adachi, S., Shiro, Y., Ishimura, Y. Infrared spectroscopic and mutational studies on putidaredoxin-induced conformational changes in ferrous CO-P450cam. *Biochemistry* 42, 14507-14514, 2003
 - Watanabe, T., Hasegawa, G., Yamamoto, T., Hatakeyama, K., Suematsu, M., Naito, M. Expression of heme oxygenase-1 in rat ontogeny. *Arch. Histol. Cytol.* 66, 155-162, 2003.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

II 分担研究報告

付加価値赤血球の救命領域への応用に関する実験的検討

（分担） 堀 進悟 慶應義塾大学医学部救急医学

研究要旨 付加価値赤血球・輸血療法の救急救命領域における有用性を検討するための基礎的検討を行なった。ラットの出血性ショックモデルに対する付加価値赤血球（ α NOヘモグロビン）輸血が血行動態に及ぼす影響を検討した。付加価値赤血球輸血では輸血後に発生する血管収縮を認めず、組織への血流が維持されることが示唆された。

A. 研究目的

本邦では、年間1万人を超える外傷死を認め、その多くは出血性ショックによる。これらの患者は短時間のうちに、数ℓから10ℓを越える大量輸血を受けるが、出血、あるいは多臓器障害のために死亡する。死亡の誘因として、侵襲にともなう全身の血管収縮のため、組織への酸素供与が改善しないことが関係している。付加価値赤血球（ α NOヘモグロビン）はヘモグロビンからの酸素放出を効率化するとともに、微小循環の改善作用が期待され、救急救命領域への応用が期待される。

本研究の目的は、ラット出血性ショックモデルにおいて、付加価値赤血球輸血が血行動態に及ぼす影響を検討することである。

B. 研究方法

1) α NOヘモグロビンの精製

ヒト洗浄赤血球を modified SAGM 溶液中でアルゴンガスを用いて脱酸素化し、①ヘモグロビンの1/2モル相当のNO donor (FK409) を投与し、生食で洗浄後にヘマトクリット50%に調整して37℃に保温した血液を付加価値赤血球、②NO donor (FK409) を投与せず、生食で洗浄後にヘマトクリット50%に調整して37℃に保温した洗浄赤血球をコントロールとした。

従来¹⁾の非細胞型人工ヘモグロビンの評価研究では、対照を細胞外液によるクリスタロイド輸液あるいは蛋白添加により膠質浸透圧を上昇させた輸液を用い、その効果を比較して人工赤血球の効果を示した。しかし、付加価値赤血球の検討では、対照は native の赤血球でなければならず、赤

血球（あるいは全血の）大量輸血に対して、付加価値赤血球の大量輸血の効果を評価する実験系を確立した。

3) 測定項目

①血行動態の評価

心拍出量測定と観血的動脈血圧測定を施行した。心拍出量測定法として本研究では熱希釈法を採用した。左総頸動脈内に温度センサーを挿入し、右内頸静脈に留置したカニューレから常温の生理的食塩水を投与して血液温度の変化を観察することによって心拍出量を算出した。しかし、熱希釈法における生理的食塩水投与が出血性ショックに対して輸液効果を生じるため、再現性を保ちつつも生理的食塩水投与量が少量でなければならない。本研究の準備段階における先行研究によって常温0.1mlの生理的食塩水投与で良好な心拍出量測定が可能であることを確認した。なお、文献検索では、ラット出血性ショックモデルで心拍出量の測定が行われた例は少ない。

本研究において測定した血行動態は、心拍出量(CO)と観血的動脈血圧(収縮期: SAP, 平均: MAP)であり、MAPとCOの商を全身血管抵抗とした。

②酸素運搬能の評価

α NOヘモグロビンはアロステリ効果により微小循環系において酸素を効率的に放出し、組織の酸素化を改善する可能性が指摘されているが、in vivoでは確認されていない。本研究では動脈血中の酸素容量(CaO_2)

とCOの積である組織への酸素運搬能($\dot{D}O_2$)を算出し、組織に対する酸素運搬能の変化を検討した。なお、 CaO_2 は以下から求めた。

$$CaO_2 = (1.39 \times SaO_2 \times Hb) + 0.0031 \times PaCO_2$$

4) 出血性ショックモデル

7週齢のWistar系雄性ラット計18匹にペントバルビタール腹腔内麻酔(50mg/kg)を行い、左総頸動脈に温度センサーを留置、左大腿動脈に脱血用カテーテルを挿入し同時に動脈血圧測定を行った。また、右内頸静脈に心拍出量測定で行う生理的食塩水投与用のカテーテルを留置した。

脱血用カテーテルより1.0ml/minの速度で脱血を行い、SAP<40mmHgを15分間維持した。その後、脱血量と同量の付加価値赤血球、または洗浄赤血球(コントロール)を1.0ml/minの速度で輸血した。

本研究ではすべての測定値の得られた8匹を対象に統計学的検定を行った(表1)。

5) 統計学的検定

統計はSPSS12.0Jを用い、repeated ANOVAを用い、 α レベルを0.05とした。本報告中の変数値は平均±標準誤差で表記する。

6) 倫理面への配慮

本研究は、ラットを対象とした急性実験であり、ペントバルビタール腹腔内麻酔を行ったうえで、動物愛護に配慮して実験操作を行った。

C. 研究結果

1) 血行動態の変化

コントロール群では、輸血直後から SAP の回復を認めたが、付加価値赤血球の輸血群では輸血直後の SAP はコントロール群と比較して低値であり、輸血から 15 分後に回復を認めた ($P=0.000$, 図 1)。心拍出量は、輸血 15 分以降に付加価値赤血球の輸血群がコントロール群より高値を維持した ($P=0.001$, 図 2)。全身血管抵抗は付加価値赤血球の輸血群がコントロール群と比較して輸血直後から低下した ($P=0.001$, 図 3)。

2) 酸素運搬能の変化

付加価値赤血球の輸血群の $\dot{D}O_2$ は輸血 15 分以降、コントロール群より高値であった ($P=0.03$, 図 4)。

D. 考察

本研究結果によって、付加価値赤血球が血管拡張作用を有し、心拍出量と組織血流の維持に有用であり、組織への高い酸素運搬能が期待されることが示された。

コントロール群、すなわち出血性ショックモデルに対する洗浄赤血球輸血における血行動態変化の観察では、SAP が輸血によって速やかに回復することが示されたが、全身血管抵抗は徐々に増大し、後負荷増大に伴って心拍出量が低下することが示された。出血性ショックの蘇生後の死亡原因である多臓器障害は輸血後の抵抗血管収縮によって組織への血流と酸素供与が改善しないことが関与していると考えられている。本研究結果では、コントロール群で輸血後の全身

血管抵抗の上昇が認められた。

輸血後の血管収縮が蘇生後の多臓器障害に関与すると考えられるため、輸血に伴う血管収縮が適切に制御されなければならない。 α NO 化されたヘモグロビンはアロステリー効果によって微小循環系において酸素を効率的に放出するほか、ATP を放出して血管拡張を来し、微小循環を改善する効果が期待されていた。本研究結果は、輸血直後から著明な血管拡張作用が出現し、後負荷の軽減に伴う心拍出量の維持と組織への酸素運搬能の増大が示された。したがって、付加価値赤血球輸血は微小循環の改善効果によって血管収縮に伴う多臓器障害を予防しうることが示唆された。

本研究では、脳をはじめとする重要臓器の血流変化を測定していない。実際に血流量が増加するか否かを明らかにする必要がある。今後、脳血流量の変化をレーザー・ドップラー法によって検討する必要がある。

E. 結論

付加価値赤血球の救急救命領域への応用を検討するため、ラット出血性ショックモデルに対する付加価値赤血球輸血による血行動態変化を観察した。 α NO 赤血球輸血は血管拡張作用を有し、出血性ショックに対する輸血蘇生後の血管収縮に伴う組織血流低下を防ぎ、組織への酸素運搬能を高めることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1. 論文発表
なし
- 2. 学会発表
なし

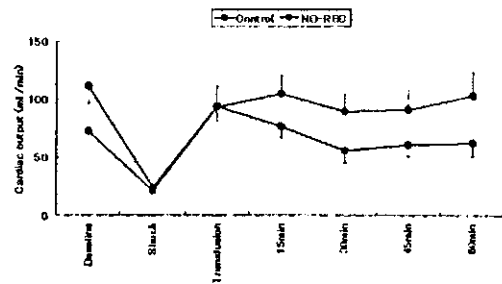
H. 知的財産の出願・登録状況

- 1. 特許取得
なし
- 2. 実用新案登録
なし

表1 実験対象ラット

	付加価値 赤血球 (N=4)	コント ロール (N=4)	P 値
体重 (g)	202.7 ± 9.1	201.5 ± 8.0	0.93
脱血量 (ml)	4.52 ± 0.30	5.24 ± 0.18	0.07

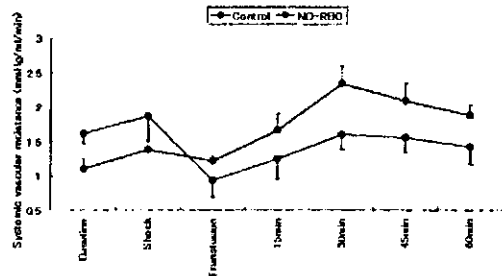
Cardiac output



Repeated ANOVA: $P < 0.001$

図2 心拍出量の変化

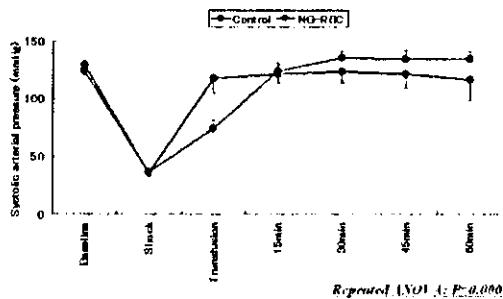
Systemic vascular resistance



Repeated ANOVA: $P < 0.001$

図3 全身血管抵抗の変化

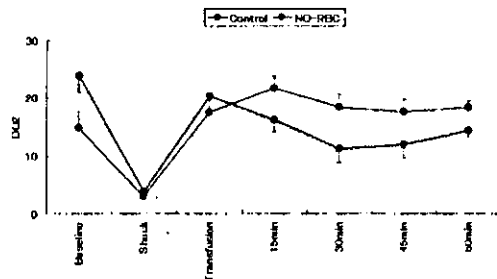
Systolic arterial pressure



Repeated ANOVA: $P < 0.000$

図1 収縮期血圧の変化

Oxygen delivery ($\dot{D}O_2$)



Repeated ANOVA: $P < 0.01$

図4 酸素運搬能の変化

ガス分子で修飾した新規赤血球機能の肝微小循環計測からのアプローチ

分担研究者 塚田 孝祐 慶應義塾大学医学部 医化学教室 助手

研究要旨：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理論基盤を構築することを目的とし、赤血球の微小循環における酸素運搬能と血流改善効果を出血性ショックモデルを用いて解析した。ヘモグロビン α 鎖にNOを結合させた α -NO赤血球は循環内半減期が約1時間であり、ショックに対する酸素供給、血流改善が十分であることが示された。また、胆汁流量の増大、Base excessの改善効果を有することが明らかになり、 α -NO赤血球から血流改善効果を有する代謝物質を放出していることを示唆する結果を得た。

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。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。

本研究で作製されたヘモグロビン α 鎖に特異的にNO分子を結合させた赤血球（以下 α -NO赤血球）は、血管作動物質のシンクリザーバーとして機能することが明らかになりつつある。また、 α -NO赤血球は、酸素解離曲線を右にシフトさせることがこれまでの研究から明らかになっており、それは組織への酸素輸送の観点から、低酸素領域に必要な十分な酸素を供給することが可能であることを示唆している。

以上の仮説を証明するために、本分担研究では肝臓微小循環を対象を絞り、出血性ショックモデルを用いて酸素運搬能および血流改善効果を生体計測から証明することを目的とする。

B. 研究方法

B-1 α -NO赤血球の作製

健常人からヘパリン採血後、bufferにて3回洗浄して採取した赤血球を実験に用いた。赤血球をヘマトクリット10%に調整し、ガスタイトバイアルにてArパージ後、NOドナーであるNOR3（藤沢薬品工業より供与）をHb濃度から計算して添加し、3時間4℃にて反応させた。輸血には3回bufferで洗浄して用いた。

B-2 出血性ショックモデルの作成

本研究課題における実験は慶應義塾大学動物実験委員会の承認を受け（No.1756）、実験指針に基づき実施された。

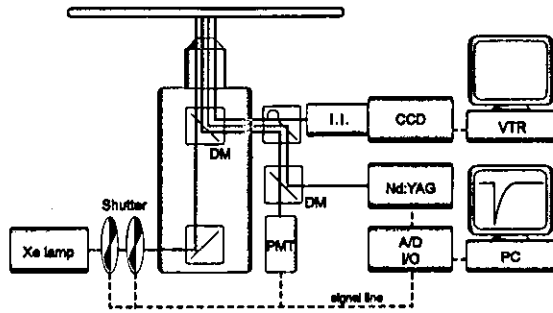


図1 局所血流・酸素分圧計測装置の概略

Wistar ラット (約 300-320 g) を気管切開後調節呼吸とし, Isoflurane 麻酔下でラットの大腿動静脈にカニューレーションを行い, それぞれ血圧測定および脱血・輸血に使用した. 腹部を正中切開し, さらに横切開を加え肝臓を露出し, アクリルステージに呼吸運動の肝臓への伝導を抑制しながら展開した. 肝臓表面は温度を 37℃ にコントロールしながら PBS を灌流した. 出血性ショックモデルは大腿動脈から 0.7ml/min で脱血を行い, 血圧 40 mmHg を 15 分間維持し, その後保存ヒト赤血球を Hct 50% に調整し大腿静脈から 1.2 ml/min の速度で輸血した.

B-3 実験装置

肝微小循環血流は赤血球を FITC で標識することで可視化した. また血流画像の解析にはパターンマッチングを応用した画像処理システムを利用した. FITC 蛍光標識赤血球を観察する一方で, 脳表微小血管内の酸素分圧は光励起されたポルフィリン分子から発光するリン光の酸素消光作用を利用することで計測を行った. 酸素プローブとして Pd-meso-tetra-(4-carboxyphenyl)-porphyrin (以下 Pd-TCPP) を用いた. 予め対象動物に Pd-TCPP を静脈内投与し, 落射光学顕微鏡の対物レンズを通して対象臓器の微小血管に励起光 (Q-switched Nd:YAG laser-SH, 波長 532 nm) を照射する. 血管内酸素濃度に依存して発光するリン光は

620 nm のロングパスフィルターを介して光電子増倍管を用いて光電変換した. 酸素分圧値への変換はリン光寿命を Stern-Volmer 式(1)に代入することで定量化した.

$$I_0/I = \tau_0/\tau = 1 + K_q \cdot \tau_0 \cdot pO_2 \dots\dots\dots (1)$$

ここで I_0 と I は酸素分圧が 0 mmHg および pO_2 mmHg の時のリン光強度, τ_0 と τ は同様に酸素分圧が 0 mmHg および pO_2 mmHg の時のリン光寿命, K_q は Stern-Volmer 定数である.

C. 研究結果および考察

C-1 α -NO 赤血球の循環内半減期

輸血された α -NO 赤血球が体内で代謝される速度を把握することは, その効果の持続時間を検討する上で極めて重要となる. α -NO 赤血球を輸血後, 5, 15, 30, 60, 120 分後にラット大腿動脈より微量採血し, 速やかに液体窒素で 77K まで冷却後, 電子スピン共鳴装置でヘモグ

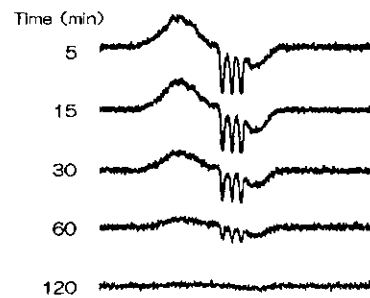


図2 α -NO ヘモグロビンの ESR シグナル

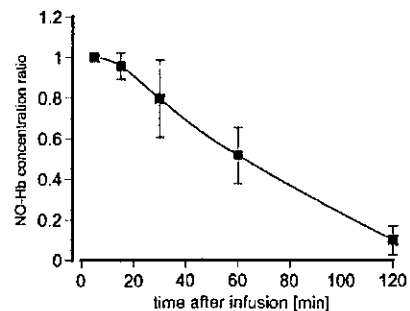


図3 α -NO 赤血球の体内代謝

ロビン α 鎖に特異的に結合している NO の量を計測した。図3の結果より、 α -NO 赤血球の体内半減期は約1時間であることが分かった。これは救命医療に利用するには妥当な数値であると考えられる。

C-2 肝臓微小循環計測

微小循環はエネルギーを得るための酸素やその他栄養物の運搬を行い、生命現象の恒常性維持に非常に重要な役割を担っている。40mmHg に達するまでの出血性ショックを惹

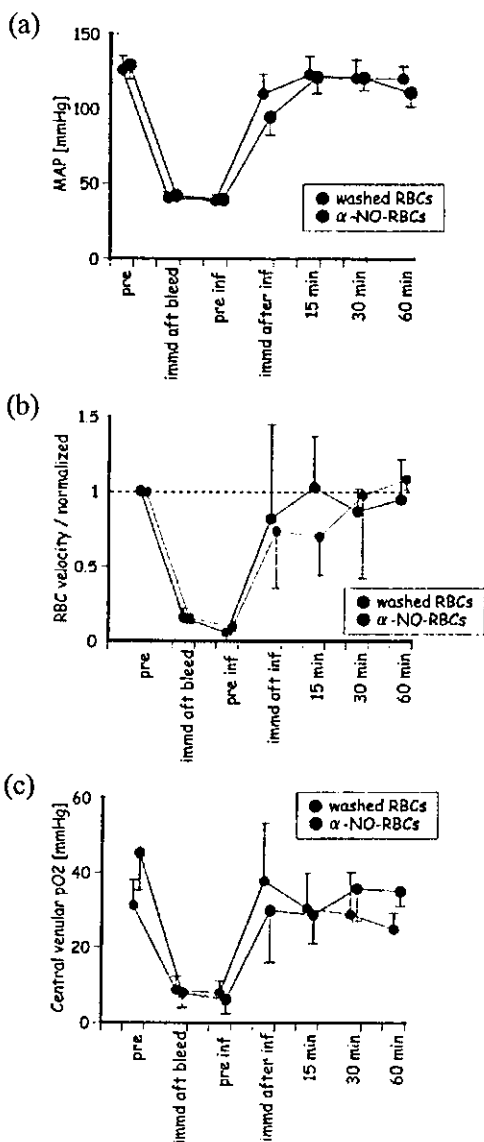


図4 正常(赤), α -NO 赤血球(青)輸血時の血圧(a), 血流速度(b), 酸素分圧変化(c)

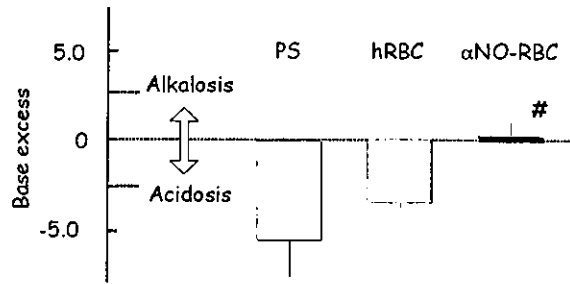


図5 輸血1時間後の Base excess 値

起し、 α -NO 赤血球を輸血した際の肝臓微小循環へ与える影響を血流速度および酸素分圧計測から検討した。図4に急性出血性ショックおよび輸血時の血圧、中心静脈血流速度と酸素分圧変化の変化を示した。血圧の変化はコントロール群、 α -NO 赤血球群でほぼ同様の变化を呈した。 α -NO 赤血球群で輸血時に血圧の快復がやや遅れる傾向が認められたが、これは血管拡張物質が輸液に含まれているか、或いは輸血直後に作用したものであると考えられた。また肝臓中心静脈血流速度は血圧とほぼ同様に低下し、輸血30分後にはベースラインまで回復した。同様にして酸素分圧は血圧の変化に対応して回復した。 α -NO 赤血球は正常赤血球と同等の酸素運搬能を有することが明らかになった。

図5に輸血1時間後の Base excess の値を示した。生理食塩水、正常赤血球投与群では代謝性アシドーシスを呈するのに対して、 α -NO 赤血球群ではそれが抑制される結果を得た。これは肝微小循環計測の結果からも明らかなように、血流の回復と肝細胞の機能維持に必要な酸素が供給されていることを表しており、さらに洗浄赤血球よりもアシドーシスを改善する事実から勘案すると、組織における代謝を促進するような代謝産物が赤血球から組織に供給されている可能性を示唆する結果であると考えられる。

D. 結論

ヘモグロビン α 鎖に特異的に NO ガス分子を修飾して得られる赤血球機能を救急医療用途に適したマテリアルとする可能性について検討した結果、以下の成果を得た。

- (1) α -NO 赤血球の循環内半減期は約 1 時間程度である。
- (2) 出血性ショックモデルに対する輸液として用いた結果、血圧・心拍数の回復は十分であった。
- (3) 肝臓微小循環を対象に酸素運搬能と血流動態について定量的解析を行った結果、正常赤血球と同等の回復を呈することが明らかになった。
- (4) 正常赤血球に対して α -NO 赤血球は代謝性アシドーシスを改善する効果を有することが明らかになり、これは α -NO 赤血球から組織の酸素代謝を促進する機能を有することを示唆する結果である。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

F-1 論文発表

- 1) Tsukada K., Sekizuka E., Oshio C., Tsujioka K., Minamitani H.: Red blood cell velocity and oxygen tension measurement in cerebral microvessels by double-wavelength photoexcitation, *Journal of Applied Physiology*, 96(4), 1561-8, 2004.
- 2) 南谷晴之, 塚田孝祐: 臓器血流と酸素代謝の光・イメージング解析, *医学のあゆみ*, vol. 210(3), pp. 200-204, 2004
- 3) 塚田孝祐: 低酸素のバイオイメージング, 別冊医学のあゆみ「レドックス」, 印刷中

F-2 学会発表

- 1) 塚田孝祐, 末松 誠, 南谷晴之: 脳局所微小循環レベルにおける酸素代謝の光学的解析法, 第 11 回日本血液代替物学会年次大会, 2004-7 (札幌)
- 2) 塚田孝祐, 菅沼和弘, 米谷 隆, 南谷晴之, 末松 誠: α -NO ヘモグロビン含有赤血球の出血性ショックに対する微小循環改善効, ナノメディシン公開シンポジウム, 2004-12 (東京)
- 3) Tsukada K., Sukanuma K., Yonetani T., Suematsu M.: T-state stabilization of hemoglobin allostery: A potential therapeutic stratagem for post-ischemic organ microvascular damages, *6th Asian Congress for Microcirculation*, 2005-2, (Tokyo)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

平成 16 年度 厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
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
分担研究報告書

- 分担課題: 1. 保存赤血球投与後のラット脾臓の状態
2. 出血ショック蘇生における血中サイトカインの定量
3. 赤血球モデルの NO, CO 結合速度の解析

分担研究者 酒井 宏水 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

研究要旨

(1) CPDA-1 液を用いてラット赤血球を 1 週間保存し、これを用いて 40%血液交換を実施したところ、一過性の脾臓肥大が認められた。老化赤血球が捕捉されることが要因と考えられ、付加価値赤血球を検討する上では、酸素運搬機能のみならず、血中半減期を延長させるために赤血球膜の脆弱性についても検討する必要があると考えられた。(2) ラット出血ショックモデルに対し、脱血液の投与による蘇生試験を実施し、サイトカイン計 9 種の産生挙動を、ビーズ固相サンドイッチ ELISA 法 (Bio-Plex Protein Array System) により測定した。循環血液量の 50%の脱血のあと 15 分後に返血するモデルでは、血中サイトカインの顕著な増大は認められなかった。(3) モデル赤血球(HbV, 粒径 250 nm)を用い、ガス状分子 mediator である NO および CO の結合速度定数をストップフロー法により測定した。裸の Hb 溶液に比べ、脂質二分子膜で被覆されて赤血球と類似の細胞構造をとることにより、NO の結合速度は 1/6 に、CO 結合速度は、1/5 に低下することが明らかになった。結合速度は更に粒径が大きくなるに従い、遅くなると考えられる。

1. 保存赤血球投与後のラット脾臓の状態

A. 研究目的

保存ラット赤血球を投与した後のラット脾臓の状態を検討する実験において、H15 年度に既に、脾臓の一過性肥大とヘモジデリンの沈着が生じる傾向を得ていた。H16 年度には更に、各測定ポイントでの実験例数を $n=5$ とし、統計的処理によりその傾向が有意な変化であることを確認することを目的とした。

B. 方法

保存赤血球の調製法、および 40%交換輸血の方法は、既報の通りである。

保存赤血球分散液の調製法:

Sevoflurene 麻酔下、Wistar 系ラット(♂, 400-500g)の右頸動脈にカテーテルを挿管。血液保存液(CPDA-1, 川澄化学社製 カーミ CA) 2 mL を 10mL シリンジに入れカテーテルに繋ぎ、急速脱血した。約 10mL 採血し密封して 4℃

にて 1 週間冷蔵保存した。保存血液は遠心分離 (3000g, 10 min)して血清とバッフィーコートを除去、沈降赤血球に生理食塩水を添加し再分散-遠心分離する操作を更に二回繰返した。5% rHSA に再分散させ、Hb 濃度を 8.6 g/dL に調節した。

40%交換輸血試験:

Wistar系ラット(180-200g, ♂, 20 匹)に対し、ネプタール腹腔内投与麻酔下、右頸動脈に挿管。1mLの脱血と1mLの試料溶液の投与を繰返し、40%の血液を交換した。縫合して覚醒させ最長14日間生存させた。血液交換後1, 3, 7, 14 日後に犠牲死させ、血液学的、血液生化学的検査、脾臓重量の測定、組織病理学的検討(H/E 染色、Berlin Blue染色)を行った。動物実験は学内倫理規定に従って実施した。

C. 結果および考察

脾臓重量の変化を図 1 a に、また、洗浄赤血

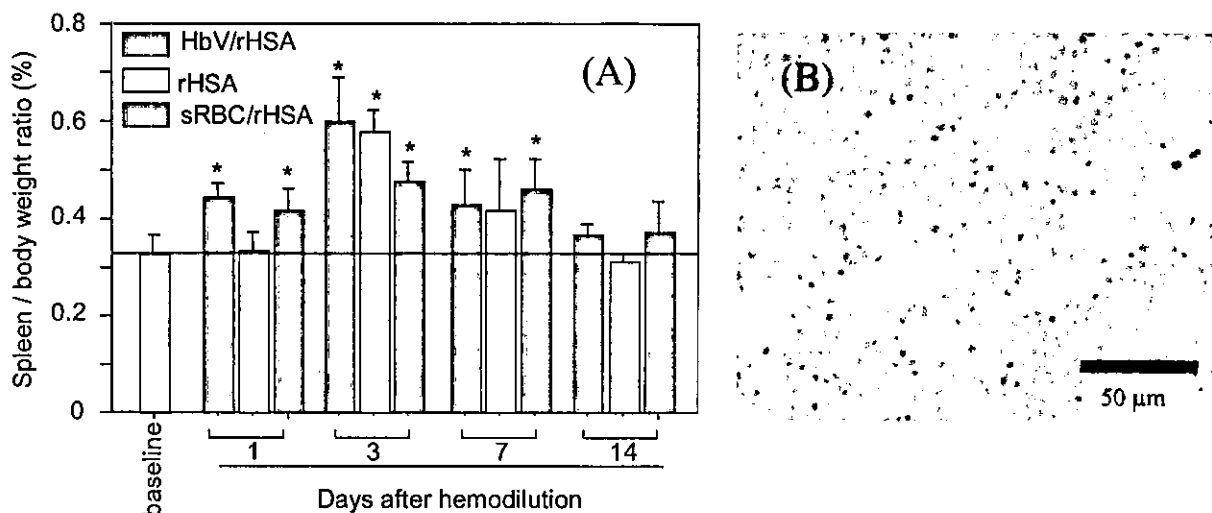


Figure 1 (A) Changes in spleen weight after 40% exchange transfusion in male Wistar rats either with sRBC/rHSA, HbV/rHSA or rHSA alone (n = 5). (* p < 0.05 vs. baseline). **(B)** Hemosiderin deposition in a Wistar rat 14 days after exchange transfusion with sRBC/rHSA. Berlin blue staining.

球投与 14 日後の脾臓組織顕微鏡写真(Berlin blue 染色)を図 1b に示す。洗浄赤血球投与群は、1, 3, 7 日後に有意に(p<0.05)脾臓重量が増大することが明らかになった。また、14 日後の脾臓には、ヘモジリン沈着が認められた。肝臓には認められなかった。血中の鉄イオンやビリルビン値の亢進は認められなかった。この一過性の脾臓肥大は、アルブミン溶液単独で血液交換した場合、或は人工赤血球(HbV)で交換した場合にも認められた。保存赤血球は血中滞留時間が短くなり、脾臓に捕捉されることが要因と考えられるが、エリスロポエチンが増大していること、また、Hct が血液交換後に 35%であったものが 14 日後には 43%にまで増大していることから、げっ歯類特有の脾臓における活発な造血作用も脾臓肥大に多少は影響していることも考えられた。

D. 結論

CPDA-1 液を用いてラット赤血球を 1 週間保存し、これを用いて 40%血液交換を実施したところ、一過性の脾臓肥大が認められた。老化赤血球が捕捉されることが要因と考えられ、付加価値赤血球を検討する上では、酸素運搬機能のみならず、血中半減期を延長させるために赤血球膜の脆弱性についても検討する必要があると考えられる。

2. 出血ショック蘇生における血中サイトカインの定量

A. 研究目的

保存赤血球パック(PRBCs)の投与が、発熱、アナフィラキシー、MOF の原因になりうること、および、PRBCs 保存中に混入白血球から炎症性サイトカイン、その他の生理活性物質が産生されること等が知られている。また、出血性ショックでは、全身の血流が再分配(blood redistribution)されることにより、例えば腸管では顕著な血流の低下により虚血障害を受け、サイトカインなど様々なメディエータを産生することが知られている。そこで、本研究では、出血ショック後に脱血液で蘇生する試験を行い、この間のサイトカインの産生挙動をピーズ固相サンドイッチ ELISA 法により解析することを目的とした。

B. 実験方法

Wistar系ラット(♂、体重240-310g)を吸入麻酔下(1.5% Sevoflurane)、左大腿動静脈に挿管、循環血液量の50%を脱血し、15分後に脱血液を投与した。脱血前、脱血後、投与直前、投与直後、投与後1, 3, 6時間後に採血し、Hct測定後の硝子キャピラリー管上部の血清を採取し、サイトカイン測定する時まで冷凍保存した。解凍後、20 μLを遠心分離し、Bio-Plex Protein Array System(Bio-Rad社製)により合計9種類の血漿中サイトカインを測定した(IL-1α, IL-1β, IL-2,