

Fig. 1. (a) Microscopic image of an occluded arteriole in the hamster window chamber. The glass fiber lies across the arteriole. Scale bar, 100 μm . (b) Schematic representation of occlusion of (a) showing the different tissue layers of the skin (Not to scale).

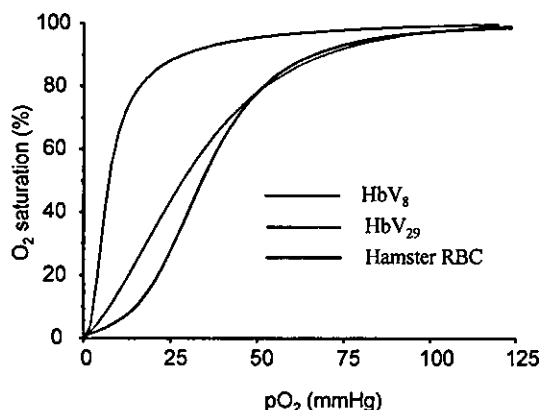


Fig. 2. Oxygen equilibrium curves (OECs) of HbV₈ and HbV₂₉ measured with a Hemox Analyzer (TCS Medical Products) at 37 °C in comparison with hamster blood.

の測定には、Pd-coproporphyrin/アルブミン複合体を予め投与し、その燐光寿命から算出した。Hb 小胞体を 7 mL/kg 投与した。顕微鏡下に細動脈(直径約 50 μm)を硝子製の微細ピペットで 30 秒間経皮的に圧迫して血流を停止させ、その 100 μm 下流域の血

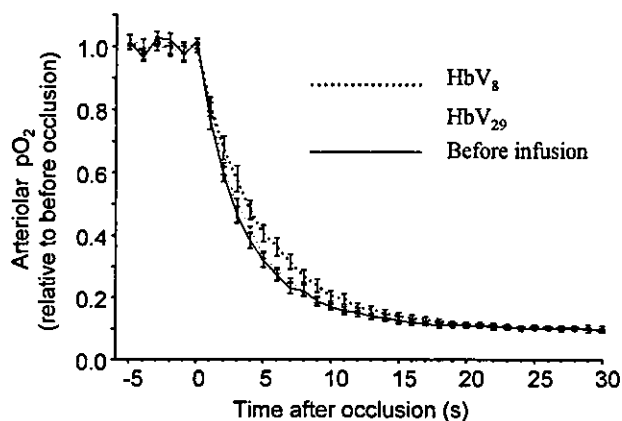


Fig. 3. Time course of the pO₂ (relative to the baseline values) in the blood of an occluded arteriole (diameter, 53.0 \pm 6.6 μm) before and after infusion of 7 mL/kg HbV₈ or HbV₂₉ into hamsters. Measurements were made in blood at a distance of 50 μm from the point of occlusion. There was a significant difference between the HbV₈ infusion and before infusion groups only at 7 sec ($p = 0.035$).

管内酸素分圧の変化を追跡した(Fig. 1)。Hb 小胞体の酸素結合平衡曲線より酸素飽和度の推移を算出した。Hb 小胞体は、高酸素親和度($P_{50} = 8$ mmHg, HbV₈)、および低酸素親和度($P_{50} = 29$ mmHg, HbV₂₉)の二種類について検討した(Fig. 2)。

C. 結果および考察

細動脈内の酸素分圧は平常 50 – 52 mmHg であるが、血流停止させると直ちに酸素分圧は低下し、最終的に 5 mmHg に到達した。Fig. 3 には、血流停止する前の値を 1.0 とした時の変化率を示した。HbV₈ を投与した場合は、HbV₂₉ の投与に比較して僅かに遅延された。また、酸素飽和度の推移から算出した血中酸素含量の変化を Fig. 4a に、更にその Hb 小胞体が寄与している酸素含量を Fig. 4b に示した。また酸素放出速度を Fig. 4c に示した。血流停止後 10 秒経過すると血管内酸素分圧は 10 mmHg 以下になる。HbV₂₉ は血流停止後、直ぐに酸素を放出し、酸素飽和度は 10%以下に低下するのに対し、HbV₈ の酸素飽和度は 60%近い値を維持し、より多くの酸素を保持しながら酸素を徐放した(Fig. 4b)。投与量が全血液量の 10%と僅かであるにも拘らず、血中酸素含量の HbV₈ の寄与は、全体の

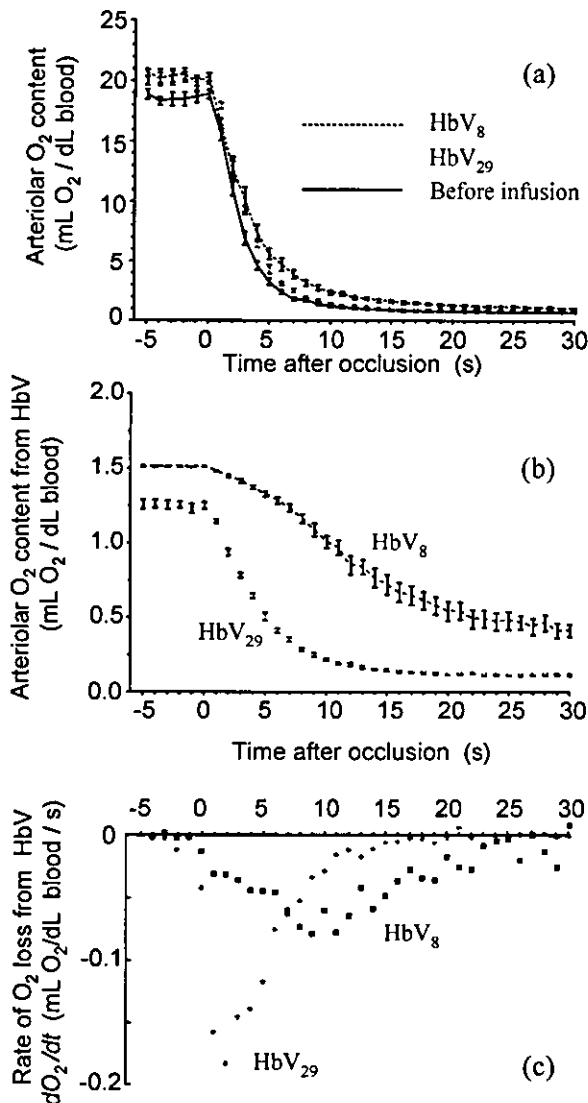


Fig. 4. (a) Time course of the arteriolar O₂ content in the whole blood of an occluded arteriole before and after infusion of 7 mL/kg HbV₈ or HbV₂₉ into hamsters. The O₂ contents are calculated using the equation (II) and the data of OECs and pO₂ changes. (b) Time course of the O₂ content derived from HbV in the blood. The contributions of HbV are derived from the data in Fig. 5(a) and magnified in scale. (c) Rate of O₂ loss from HbV. The graphs in (b) were differentiated and plotted.

6割に達し(Fig. 5)、低酸素領域では赤血球上回る酸素供給源として作用していることが明らかとなった。

D. 結論

高酸素親和度(低 P₅₀)の Hb 小胞体が、低酸素領域において主要な酸素供給源であることが明らかに

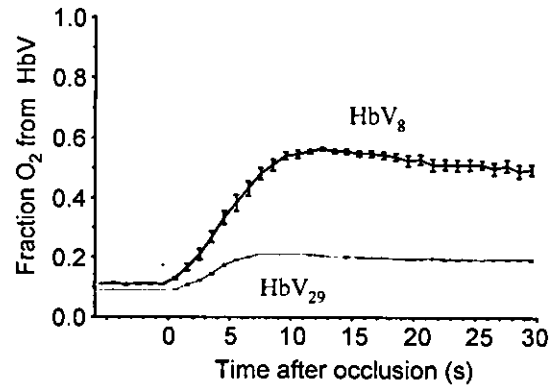


Fig. 5. Time course of the fraction of O₂ content from HbV in the whole blood. The extended time of occlusion induced hypoxic condition and the fraction of O₂ content from HbV₈ increased significantly in comparison with HbV₂₉.

なった。Erni らの有茎皮弁における虚血領域の酸素化の向上は、血流が極めて緩やかな側副経路においても酸素を保持し、虚血領域に酸素を効率良く運搬したと考えられる。

2. メトヘモグロビン/L-Tyrosine による過酸化水素消去系を利用した Hb 小胞体のメト化抑制

A. 研究目的

Hb は中心鉄が 2 価の状態では酸素と可逆的に結合するが、自動酸化あるいは過酸化水素(H₂O₂)との反応により中心鉄が 3 価のメト Hb(metHb)となると酸素運搬能を失う。赤血球中では H₂O₂ 消去酵素系、metHb 還元酵素系により met 化は抑制されているが、高純度 Hb をリン脂質二分子膜にて内包した人工酸素運搬体である Hb 小胞体はこれらの系を持たないため、メト化抑制系の導入が必要となる。本研究では、L-チロシン(L-Tyr)の共存により発現する metHb のペルオキシターゼ活性を利用した H₂O₂ 消去系を Hb 小胞体に導入し、H₂O₂ 消去による Hb 小胞体内 oxyHb の met 化抑制系の構築を目的とした。

B. 研究方法

1. L-Tyr 添加 metHb による H₂O₂ 消去

metHb 溶液([heme] = 20 μ M, PBS(pH7.4))に、deferoxamine mesylate(DFO, 1.6 mM)と L-Tyr(0, 1 mM)を添加した。この溶液に 200 μ M H₂O₂([heme]/[H₂O₂] = 1/10)を 37 $^{\circ}$ C にて添加し、溶液を経時的に採取後、残存 H₂O₂濃度を horseradish peroxidase 法により定量した。

2. 反応系における L-Tyr の変化

1 mM の L-Tyr を添加した metHb ([heme] = 20 μ M, PBS(pH7.4))と 200 μ M H₂O₂を 37 $^{\circ}$ C にて反応させ、経時的に採取したサンプルにカタラーゼを 20 μ L 添加し(5000 unit, from bovine liver)、H₂O₂を消去した。この溶液からフィルター付き遠心チューブ(cutoff 5 kDa)にて分離した分散媒を HPLC(カラム:TSK-GEL ODS-80Ts、溶媒:PBS:acetonitrile = 4:1(0.3 % TFA)、流速:0.5 mL/min)により分析した。

3. metHb/L-Tyr 内包 Hb 小胞体への H₂O₂ 連続添加

L-Tyr(0, 1, 8.5 mM)、及び metHb(0, 4 wt%)を内包した oxyHb 小胞体(内水相 oxyHb: 36 wt%, metHb: 0 or 4 wt%)の 5 wt%分散液を調製した。これらのサンプルを 37 $^{\circ}$ C、攪拌条件下、終濃度で 310 μ M の H₂O₂を 10 分間隔で添加した。それぞれの H₂O₂添加直前にサンプルを 50 μ L 採取し、カタラーゼを 20 μ L 添加し(5000 unit)、H₂O₂を消去後、UV-vis スペクトルにおける 405 nm(metHb)と 430 nm(deoxyHb)の吸光度比から小胞体内 Hb の met 化率を算出した。

4. metHb/L-Tyr 内包 Hb 小胞体の自動酸化

3 と同様の Hb 小胞体分散液(5 wt%分散液)を用い、振とう(120 times/min)条件下、37 $^{\circ}$ C、酸素分圧 40 Torr にて自動酸化させた。それぞれのサンプルを経時的に溶液を採取後、UV-vis スペクトルにおける 405 nm(metHb)と 430 nm(deoxyHb)の吸光度比から小胞体内 Hb の met 化率を算出した。

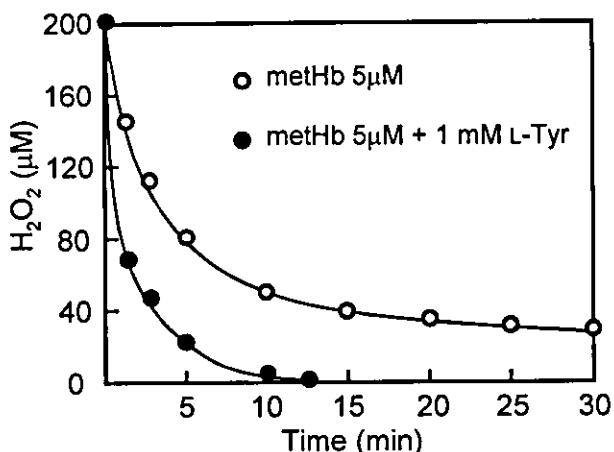


Fig. 6 Time course of H₂O₂ elimination by metHb solution dissolving L-Tyr.

5. metHb/L-Tyr 内包 Hb 小胞体の *in vivo* 試験

L-Tyr(8.5 mM)と、metHb(4 wt%)を内包させた 10 wt% Hb 小胞体分散液(内水相: 36 wt% oxyHb + 4 wt% metHb)を Wistar 系ラット(雄性、体重約 250 g、n=5)に尾静脈より投与した(20 mL/kg body weight)。経時的に採血後、遠心分離(12000 rpm、5 min)にて血漿中の Hb 小胞体を採取し、UV-vis スペクトルにおける 405 nm(metHb)と 430 nm(deoxyHb)の吸光度比から小胞体内 Hb の met 化率を算出した。

C. 結果及び考察

1. L-Tyr 添加 metHb による H₂O₂ 消去速度

Fig. 6 に L-Tyr 添加 metHb 溶液と H₂O₂ の反応系における時間と残存 H₂O₂ の関係を示す。metHb 溶液では 30 分後に約 30 μ M の H₂O₂ が残存していたのに対し、L-Tyr 添加 metHb 溶液では 5 分後には残存 H₂O₂ の濃度が 15 μ M となり、15 分後には完全に H₂O₂ が分解された。この metHb による H₂O₂ 消去速度定数を擬 1 次反応速度則より算出すると、metHb 溶液、L-Tyr 添加 metHb 溶液でそれぞれ 3.0×10^3 , 3.2×10^4 M⁻¹s⁻¹ であり、L-Tyr 添加系のほうが約 10 倍大きな値であった。更に、metHb のみの溶液では時間経過に伴う Hb の変性が確認されたが、L-Tyr 添加系では変性は確認されなかった。

2. 反応系における L-Tyr の変化

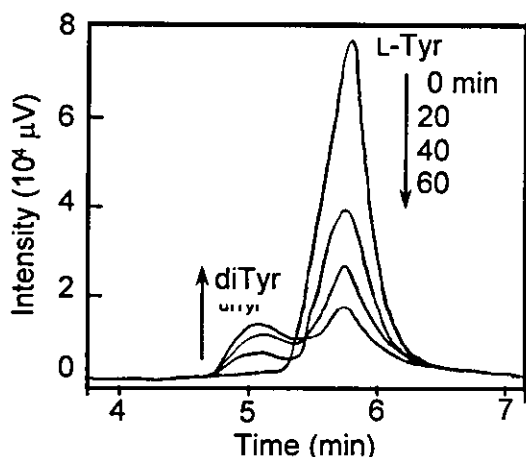


Fig. 7 Time course of HPLC spectrum of L-Tyr during the reaction of metHb/L-Tyr with H₂O₂.

1 mM の L-Tyr を添加した metHb ([heme] = 20 μM, (PBS, pH7.4)) と 200 μM H₂O₂ を 37 °C にて反応させ、経時的に採取したサンプルから分離した分散媒の HPLC スペクトルを Fig. 7 に示す。L-Tyr は、metHb と H₂O₂ の反応時間とともに次第に減少し、溶出時間約 5 分のピークは最初は無かったが、L-Tyr のピークの減少とともに次第に上昇した。この新たに現れたピークは、Malencik DA. らの方法 (*Anal. Biochem.*, 242, 202-213, (1996)) により、horseradish peroxidase を用いて合成した L-Tyr 二量体である diTyrosine (DiTyr, Tyr-Tyr) の溶出時間と一致したことから、この反応系からの diTyr の生成が確認された。この結果より、H₂O₂ と反応した metHb は中間体であるフェリル Hb ラジカルとなり、その後、L-Tyr から電子を受け取ることによって metHb へと還元されていることが明らかとなった。よって、この系における H₂O₂ 消去は、L-Tyr を添加することで発現する metHb のペルオキシターゼ活性に起因する H₂O₂ 消去であり、この活性により metHb は変性せず、H₂O₂ を安定に消去し続けていると考えられる (Fig. 8)。

3. metHb/L-Tyr 内包 Hb 小胞体への H₂O₂ 連続添加

5 wt% oxyHb 小胞体分散液に 310 μM H₂O₂ を 10 分間隔で添加していくと、時間経過とともに met 化率は上昇し、60 分で 90 % に達した (Fig. 9)。他方、

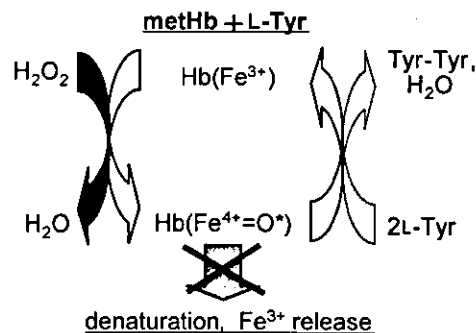


Fig. 8 Mechanism of H₂O₂ elimination by peroxidase activity of metHb and L-Tyr.

metHb と L-Tyr を終濃度でそれぞれ 4 wt%、1 mM となるように内包した 5 wt% Hb 小胞体分散液では、60 分で約 50 % であり、metHb/L-Tyr 未内包系と比較し、添加した H₂O₂ による met 化が抑制された。更に、L-Tyr を 8.5 mM まで内包したこの系においては、met 化率が 60 分で 14 %、420 分 (42 回 injections) で約 40 % であった。この結果より、metHb/L-Tyr による H₂O₂ 消去系は Hb 小胞体へ内包しても効果を有し、Hb 小胞体の H₂O₂ 消去系へ応用できることが示された。

4. metHb/L-Tyr 内包 Hb 小胞体の自動酸化

L-Tyr (0, 1, 8.5 mM)、及び metHb 0, 2, 4 wt% を共封入した 5 wt% Hb 小胞体分散液を酸素分圧 40 Torr、37 °C にて振とう (120 times/min) し、自動酸化させたときの met 化率の推移を Fig. 10 に示す。

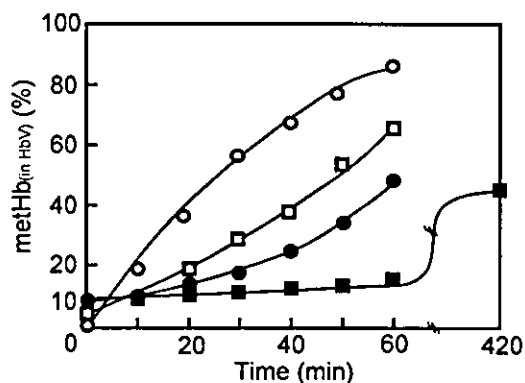


Fig. 9 Stepwise addition of H₂O₂ to 5wt% Hb vesicle dispersion coencapsulating ○ no metHb and L-Tyr, ● 4wt% metHb and 1 mM L-Tyr, □ 2wt% metHb and 1 mM L-Tyr, ■ 4wt% metHb and 8.5 mM L-Tyr.

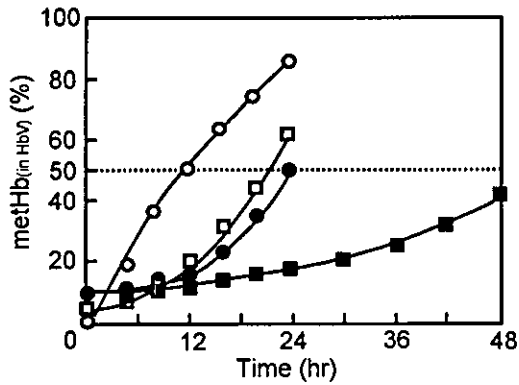


Fig. 10 Suppression of Hb autoxidation in Hb vesicles by coencapsulating ○no metHb and L-Tyr, ●4wt% metHb and 1 mM L-Tyr, □ 2wt% metHb and 1 mM L-Tyr, ■ 4wt% metHb and 8.5 mM L-Tyr under partial oxygen pressure of 40 Torr at 37 °C.

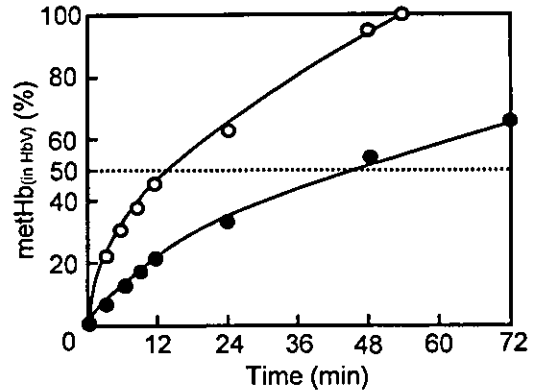


Fig. 11 Suppression of methHb formation in Hb vesicles by coencapsulating metHb and L-Tyr *in vivo*

metHb/L-Tyr 未内包 Hb 小胞体では、時間経過とともに自動酸化により小胞体内 oxyHb の met 化率が上昇し、50%の Hb が metHb となる時間である T_{50} の値は約 13 時間となり、24 時間後には約 90%に達した。他方、metHb/L-Tyr を終濃度でそれぞれ 2 wt%/1 mM、あるいは 4 wt%/1 mM となるように内包した Hb 小胞体では、metHb/L-Tyr 未内包系と比較し、大幅に met 化が抑制され、 T_{50} はそれぞれ約 20 時間、24 時間であった。更に、metHb/L-Tyr を 4 wt%/8.5 mM まで内包させた Hb 小胞体では劇的な met 化の抑制が認められた。met 化率は 24 時間で 20%以下、48 時間でも約 40%であり、met 化率は 50%に達しなかった。

5. metHb/L-Tyr 内包 Hb 小胞体の *in vivo* 試験

4 時間後のコントロールと metHb/L-Tyr の met 化率は、それぞれ 22%、8%となり、 T_{50} はそれぞれ約 13 時間、約 43 時間であった(Fig. 11)。metHb/L-Tyr 内包系の T_{50} は、 1.5×10^5 unit/mL のカタラーゼを内包した Hb 小胞体の *in vivo* における T_{50} の値と一致した。このカタラーゼ量は *in vivo* における H_2O_2 分解による met 化抑制の限界量であり(Y. Teramura *et al.*, *Bioconjugate Chem*, 1171-1176 (2003))、今回の metHb/L-Tyr の効果は H_2O_2 分解によるメト化抑制の限界値であると考えられる。したがって、この

metHb/L-Tyr 内包 Hb 小胞体の met 化率上昇は、 H_2O_2 以外の因子(自動酸化、NO 等)によるものであると考えられる。また、metHb/L-Tyr 内包 Hb 小胞体投与群において、血小板数、白血球数、血中 Hb 濃度、ヘマトクリット値等の血液生化学的な値は、コントロール群と比較して相違は認められず、ラットは 72 時間の測定終了時まですべて生存した。この結果より、metHb/L-Tyr 内包 Hb 小胞体は *in vivo* でも H_2O_2 分解に起因する met 化抑制効果を有することが明らかとなった。

E. 結論

metHb 溶液に L-Tyr を添加することで発現するペルオキシターゼ活性を利用した H_2O_2 消去系を導入した Hb 小胞体を構築した。更に metHb/L-Tyr 内包 Hb 小胞体は *in vivo* でも H_2O_2 分解に起因する met 化抑制効果を有することを明らかにし、安定で安全な L-Tyr と Hb のみを用いた Hb 小胞体の met 化抑制系を構築することができた。

3. $\alpha^3\beta$ 置換型ヘムの合成とアルブミン-ヘム複合体の酸素結合反応

A. 研究目的

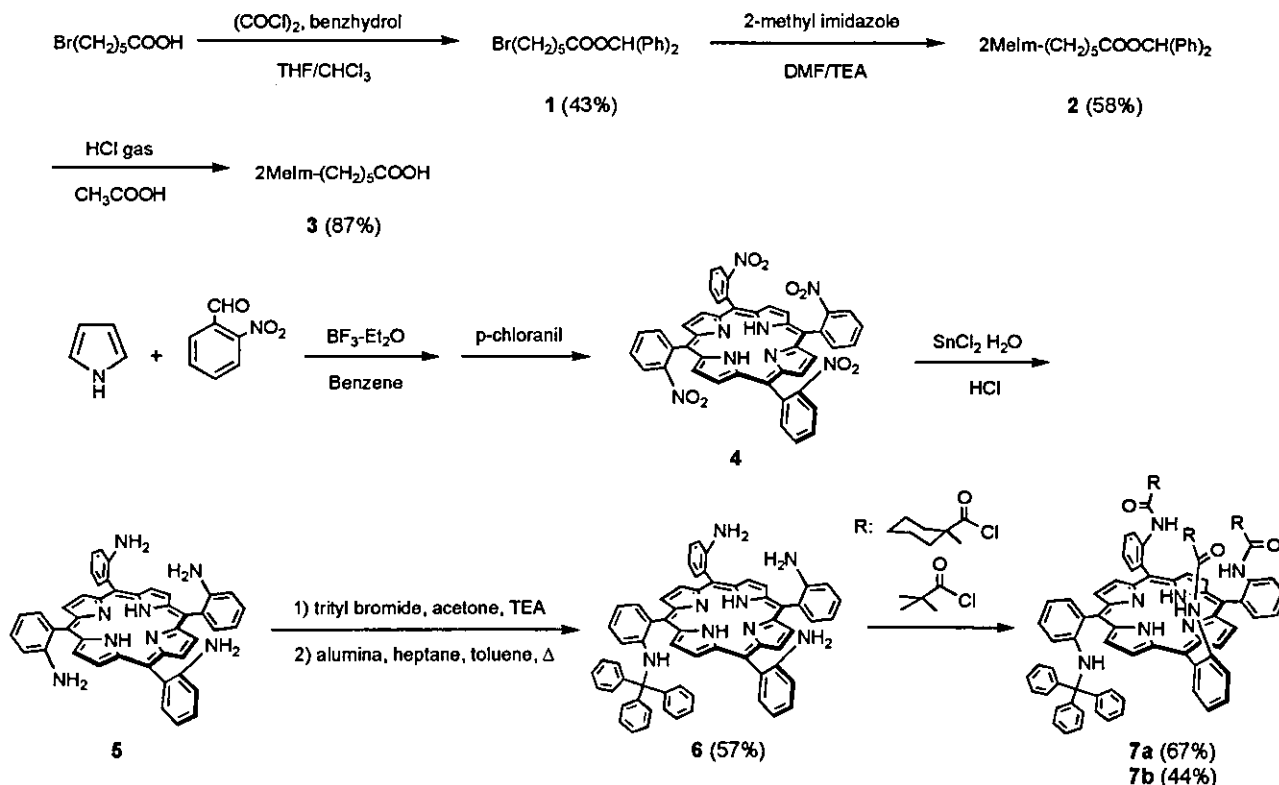
4つのシクロヘキサノイル基をポルフィリン面上に有する軸塩基結合型テトラフェニルポルフィリン鉄(α^4 FecycP) (ヘム) をヒト血清アルブミン(rHSA)に包接させたアルブミン-ヘム複合体は、生理条件下で酸素を可逆的に吸脱着できる人工酸素運搬体である。酸素親和度はヒト赤血球と同等、2年間の室温保存が保証され、血液適合性も高く、出血ショックラットモデルを用いた蘇生実験から生体内酸素輸送効果が実証されている¹⁻³⁾。

本年度は、 α^4 FecycP よりも簡便に合成できる $\alpha^3\beta$ 置換型ヘム錯体(Fig. 12)を設計・合成し、その酸素結合パラメータを測定するとともに、従来系と酸素輸送能を比較・検討した。

B. 実験方法

1. $\alpha^3\beta$ 置換型ヘムの合成

$\alpha^3\beta$ 置換型ヘムの合成は、Scheme 1 に従って行った。



まず Lindsey 法によるポルフィリン 4 の最適

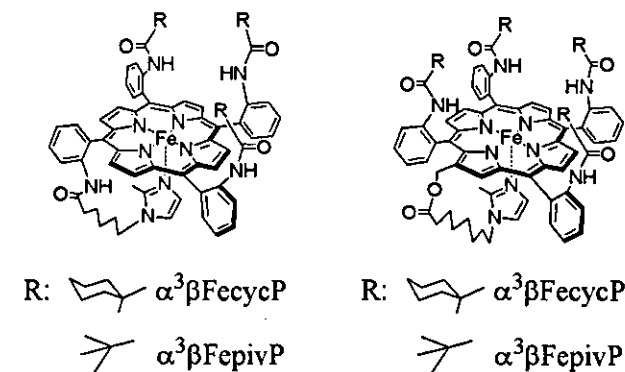
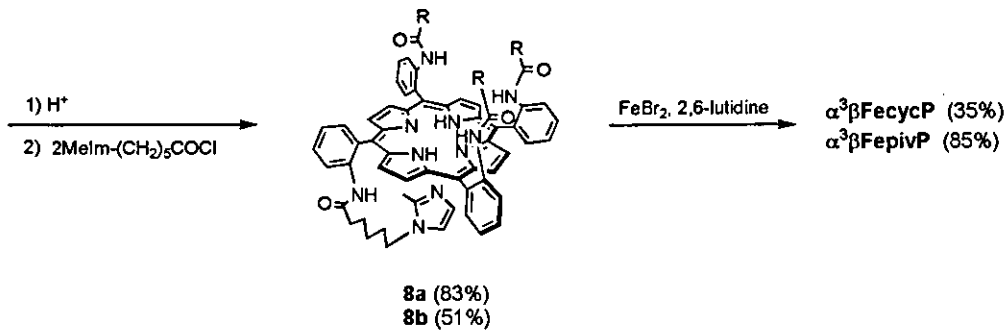


Fig. 12 $\alpha^3\beta$ -substituted hemes and α^4 -substituted hemes. 合成条件を探索した。2-ニトロベンズアルデヒドとピロールの濃度: 200 mM, 反応時間: 14 時間の時、収率は 16 % と最も高かった (酢酸溶液中、118°C で反応させる従来の Adler 法では収率 13 %)。黒色不溶物をアセトンで除去後、メタノール洗浄だけで容易に粗精製できる方法も見出した。

テトラアミノフェニルポルフィリン (5) の atrop 異性体混合物とトリチルプロマイドを 1:1.05 (モル比) で反応させた後、混合物をヘプタン/トルエンに溶解、遮光下で活性アルミナに吸着 (70 °C, 15 時間) させ、 $\alpha^3\beta$ 体であるポルフィリン 6 を収率 57% で得た。6 の Rf 値 (0.75)

は、5 の $\alpha^3\beta$ 体と同一であるため、両者の分離



Scheme 1 Synthesis of $\alpha^3\beta$ -substituted hemes.

は難しい。しかし、アルミナ吸着後の主成分分画 (Rf 値: 0.75) を集めると、**6** のみが単離でき、未反応の **5** は全て α^4 体 (Rf 値: 0.15) として回収された。**5** ($\alpha^3\beta$ 体) はアルミナ吸着操作により α^4 体へ変換され、容易に除去できることがわかった。化合物 **6** のトリチル基を HCl により除去した後、別途合成した化合物 **3** を反応させ、臭化鉄により鉄を導入し、最終目的化合物 $\alpha^3\beta\text{FecycP}$ 、 $\alpha^3\beta\text{FepivP}$ を得た。

2. トルエン溶液中での酸素結合能解析

ポルフィリン鉄 (III) 錯体のトルエン溶液 (4 mL) と亜ジチオン酸ナトリウム水溶液 (4 mL) を窒素雰囲気下で攪拌し、中心鉄を還元、deoxy 体を得た。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_{50}) を算出した。またレーザーフラッシュホトリシス法により、一酸化炭素・酸素の結合解離速度定数 (k_{on} , k_{off}) を決定した。

3. アルブミン-ヘム溶液の調製と酸素結合能解析

rHSA のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液 (6.25 μM , 6 mL) とヘム (CO) 錯体のエタノール溶液 (0.1 mM, 1.5 mL) を混合した後、透析によりエタノールを除去して、アルブミン-ヘム (CO) 錯体水溶液を調製した。窒素雰囲気下で照射すると、deoxy 体が得られた。上記 2 と同じ方法で、酸素親和性 (P_{50})、一酸化炭素・酸素の結合解離速度定数 (k_{on} , k_{off}) を決定した。

C. 結果および考察

1. $\alpha^3\beta$ 置換型ヘムの酸素結合反応 (トルエン中)

$\alpha^3\beta\text{Fe(II)cycP}$ トルエン溶液の UV-vis. スペ

クトルは、 λ_{max} : 438, 537, 560 nm を示し、イミダゾリル基が分子内配位した Fe (II) 5 配位高スピン錯体の形成を示唆した (**Fig. 13**)。そこへ酸素を吹き込むと、スペクトルパターンは酸素錯体型 (λ_{max} : 425, 550 nm) へと移行し、その酸素結合解離は酸素分圧に応答して可逆的に変化した。 $\alpha^3\beta\text{Fe(II)pivP}$ も酸素を通気すると、全く同様に酸素錯体 (λ_{max} : 422, 546 nm) を生成した。

$\alpha^3\beta$ 置換型ヘムの $k_{on}(\text{O}_2)$ は、 α^4 置換型ヘムの値に比べて低かった (**Table 1**)。これは疎水性置換基の数が 4 つから 3 つに減少すると、置換基どうしが互いに接近し合えるようになるため、ポルフィリンの面上空間は狭まることを示唆している。 $k_{on}(\text{O}_2)$ の減少により、 $\alpha^3\beta$ 置換型ヘムの酸素親和性は α^4 置換型ヘムの値に比べ低下した (P_{50} は増大した)。

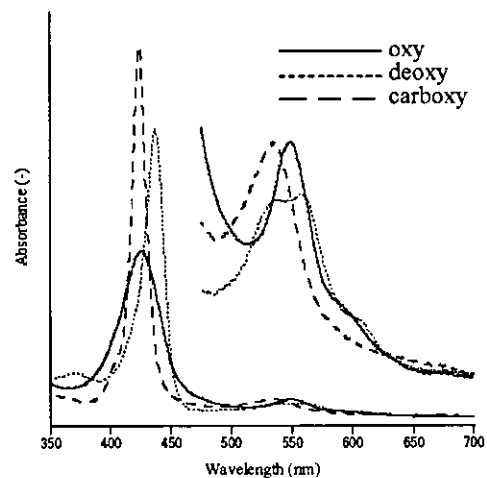


Fig. 13 UV-vis. spectral changes of $\alpha^3\beta\text{FecycP}$ in toluene.

Table 1 O₂ and CO binding parameters of α³β FeP and α⁴FeP in toluene at

Heme	O ₂			CO
	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	P_{50} (Torr)	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)
α ³ βFecycP	5.8 × 10 ⁷	5.1 × 10 ⁴	67	1.2 × 10 ⁶
α ³ βFepivP	8.6 × 10 ⁷	5.6 × 10 ⁴	50	2.5 × 10 ⁶
α ⁴ FecycP	1.8 × 10 ⁸	4.7 × 10 ⁴	20	1.2 × 10 ⁶
α ⁴ FepivP	1.6 × 10 ⁸	7.9 × 10 ⁴	38	2.9 × 10 ⁶

Table 2 O₂ binding parameters of rHSA-α³βFeP and rHSA-α⁴FeP in phosphate buffer solution. ^aAt 25°C. The value of fast phase.

Heme	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹) ^a	k_{off} (s ⁻¹) ^a	P_{50} (Torr) at 37°C	OTE (%)
α ³ βFecycP	2.9 × 10 ⁷	1.1 × 10 ³	45	23
α ⁴ FecycP	4.6 × 10 ⁷	9.8 × 10 ²	35	22
α ⁴ FepivP	3.4 × 10 ⁷	7.5 × 10 ²	33	22

2. rHSA-α³βFecycP の酸素結合反応

rHSA-α³βFecycP も窒素雰囲気下では Fe(II) 5 配位高スピン錯体を形成し (λ_{max} : 440, 559 nm)、酸素通気により速やかに酸素錯体 (λ_{max} : 427, 550 nm) を生成した (Fig. 14)。 P_{50} は 45 Torr (37°C) で、rHSA-α⁴FecycP の値 (35 Torr) に比べ高い (酸素親和性は低い) (Table 2)。しかし、例えば肺 (110 Torr) - 末梢組織 (40 Torr) 間における酸素輸送効率は 23% を示し、rHSA-α⁴FecycP やヒト赤血球の値 (いずれも 22%) と同等であった。これに対し、rHSA-α³βFepivP に酸素を通気すると、瞬時に中心鉄が不可逆酸化した。α³β置換型ヘムが、水中で安定な酸素錯体を形成するための必要構造条件は、シクロヘキサノイル基のようなかさ高い置換基を有することと考えられる。

D. 結論

α⁴FecycP はポルフィリン 5 から 8 工程で合成されるが、α³βFecycP 及び α³βFepivP は 4 工程で合成できる。α³βFecycP、α³βFepivP はトルエン溶液中でイミダゾリル基が分子内配位した Fe(II) 5 配位高スピン錯体を形成し、そこへ酸素を通気すると速やかに酸素錯体を得られた。疎水性置換基の数が 4 つから 3 つに減少すると、置換基どうしが互いに接近し合えるようになるため、ポルフィリン面上の空間

は狭まり、 $k_{on}(O_2)$ が減少、酸素親和性は低下す

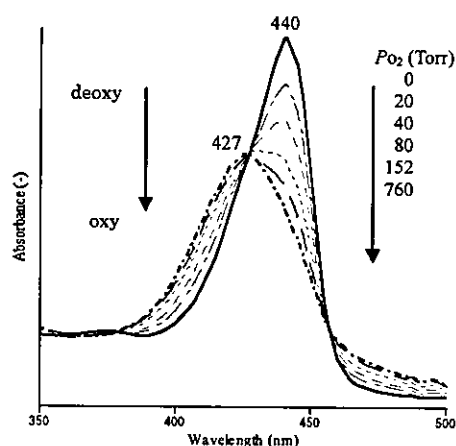


Fig. 14 UV-vis. spectral changes of rHSA-α³βFecycP dependent of O₂-partial pressure at 37 °C

る (P_{50} は増大する)。rHSA-α³βFecycP は水中で酸素を吸脱着でき、その P_{50} は 45 Torr (37°C)、rHSA-α⁴FecycP と同等の酸素結合能を有する。α³β置換型ヘムが、水中で安定な酸素錯体を形成するための構造的な必要条件は、シクロヘキサノイル基のようなかさ高い官能基を有することである。

(参考文献)

- 1) Komatsu, T. et al., *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 397-402.
- 2) Huang, Y. et al., *J. Biomed. Mater. Res.* **2004**,

71A, 63-69.

- 3) Komatsu, T. et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 2004, 71A, 644-651.

4. 人工赤血球用バッグの開発に関する検討

A. 研究目的

現在、本研究班で検討している人工赤血球は、窒素雰囲気下で2年間の室温保存が可能である。現行の保存法は、ガラスバイアル瓶に充填した形態であるが、緊急/災害時の使用を想定した場合、備蓄、輸送が容易なプラスチック製容器に封入した形での提供が望まれる。本研究では、人工赤血球製剤に最適なプラスチック製ソフトバッグの開発を目的とし、高分子科学の基礎知見に基づいた先端材料の選定と、実際の医療現場で最も使用し易い形状と容器構造の設計を行う。

B. 方法

既存製剤の保存形態、バッグ仕様や法律規制、指針等の調査を実施した。また、本研究班の定例会議において討論し、救急医療現場のニーズを整理した。

C. 結果および考察

1. ガラス容器とプラスチック容器の特徴

先ず、現行の輸液容器は、その多くがポリプロピレン製であるが、例えばヒト血清アルブミンのようにガラスバイアル瓶に充填され広く市販されているものもある。ガラス製容器とプラスチック製容器の一般的な特徴は次の通りである。

■ガラス製容器

【長所】硬い/耐滅菌性/高透明性/高ガスバリア性/無毒性

【短所】重い・嵩張る(輸送、備蓄難)/破損・破壊/要エア芯

■プラスチック製容器

【長所】軽い(輸送、備蓄容易)/耐滅菌性/高透明性/ガスバリア性調節可能/高成形加工性/柔軟性(触感)/自己排出性(エア芯不要)

【短所】可塑剤(例:ジエチルヘキシルフタレート)の溶出/破棄

本研究班内での討論では、実際に使用する医療側研究者の共通の見解として、人工赤血球用容器に最も適当な材質・形態は、プラスチック製ソフトバッグであることが強調された。その理由は、(1)プラスチック製ソフトバッグは空気圧により自然にしぼむ自己排出性を持ち、ガラス瓶のようにエア芯を挿入する必要がないため、内容液と外気が接触せず、感染の心配がない、緊急時には強制的に押し出すことによって投与を速めることもできる。(2)陸路での輸送が不可能な被災地や戦地へ供給する場合、ヘリコプターから落下させても破損しないプラスチックバッグがよい、の2点が挙げられた。

2. 血液バッグの要求性能

人工赤血球の容器開発に先立ち、血液バッグ(赤血球保存バッグ)の現状をまとめた。我国では1985年頃から軟質塩化ビニル(PVC)製の血液バッグが急速に普及、2002年度の血液バッグ年間生産量は約146万個。柔軟性と携帯性ではガラス瓶より優れている。採血液の入ったPVC製血液バッグをそのまま遠心分離機にかけ、分離した成分のうち必要なものだけを取り出し口から別のバッグに移すことが可能であり、簡便かつ衛生的に成分単離が行える。一般に血液バッグの要求性能は次の通り。

- ・ 機械物性(遠心分離に耐えられること)
- ・ 透明性(内容物の状況が判断できること)
- ・ 耐蒸気滅菌性(121℃、20分)
- ・ ガスバリア性
- ・ 成形加工性
- ・ 柔軟性
- ・ 低温特性
- ・ 低コスト

しかし、これらの要求性能を人工赤血球用バッグに当てはめてみた場合、必ずしも必要でない特性、またはそれ以上に性能が要求されるものもある。

- ・ 機械物性：遠心分離をする必要はない。一方、長期保存に耐えられる耐久性が不可欠。
- ・ ガスバリア性：特に必要（室温で2年以上の保存に耐えられること）
- ・ 低温特性：冷凍する必要はない。

また、血液バッグのみならず、医療用具の素材として広く使用されている軟質 PVC の可塑剤：ジエチルヘキシルフタレート（DEHP）に関する問題も慎重に考慮しなければならない点である。その最新動向を次項で簡単にまとめた。

3. PVC 製医療用具の使用と DEHP について

軟質 PVC 製の医療用具は素材が化学的に安定であること、また、柔軟性・耐久性等に優れていることから、内外において医療現場で広く使用されており、その卓越した物性については現在も高く評価されている。しかし、軟質 PVC には可塑剤として DEHP が添加されており、これが溶媒中に溶出してくることも知られている。DEHP は一時期内分泌攪乱物質の候補化合物として議論されていたが、現在は主として精巣毒性を有する一般毒性物質として、耐容一日摂取量 (TDI) 40~140 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ が設定されている (TDI は食品等から毎日摂取し続けても影響が出ないであろうという推測値)。この件に関し、厚生労働省は通達を出し、医療器具のうち一部高リスクが想定される条件・用途での DEHP の使用について安全上の喚起を行っている。

厚生労働省の推奨事項（医薬品・医療用具等安全情報より要約）

現時点で軟質 PVC 製の医療用具の使用により直接健康被害が発生したという報告はない。PVC は

柔軟・耐久性かつ操作性に優れているため、非常に有用な製品として使用されており、欧米においても使用禁止の例はない。

一方、げっ歯類での精巣毒性及び発生毒性が確認されていることから（ヒトでは観測されていない）、我国は不確実係数を 100 とし、TDI : 40~140 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を設定している。医療行為に伴う DEHP の曝露量は通常の生活曝露量よりも多量（TDI を超える場合もある）ではあるが、医療において当該医療用具を使用する治療によって享受される利益は、DEHP の曝露による健康への影響よりもより大きい旨の医療従事者からの指摘に留意して、DEHP 曝露を回避しようとする目的で、必要な治療の妨げになることのないように注意することが必要である。

しかし、可能であれば異物である DEHP の曝露量を低減するよう配慮することが適当であると考えられ、特に代替品が存在する医療用具については、DEHP への感受性が高いと考えられる新生児、乳児、幼児から優先的に代替品への移行を図ることが望まれる。現時点では軟質 PVC 製の医療用具が安価であり、代替品との価格差があるが、その価格差も少なくなったものもあり、今後代替品の普及により経済的にも使用しやすい環境が整ってくることも期待される。

つまり、代替品の存在やヘパリンコートによる曝露量低減の可能性が示されている製品については、その使用を促進するとともに、臨床の現場に対し、未知の健康被害の可能性の低減が可能となるよう情報提供を行うことが重要であると考えられる。このため、臨床上的他のリスク等も勘案の上、以下の対策について検討することが適当である。なお、DEHP が溶出しない代替製品に係る情報については、医療機関において選択時に参考にできるよう、調査の上周知することが適当である。

【医療関係者等への情報提供】

(中 略)

血液バッグについては、DEHP による赤血球保護作用があることが報告されており、現時点で代替品に切り替えなくてはならないものとは考えられないが、低温で保存することにより、DEHP の溶出

を押さえることができるとの報告もあることから、保管温度を下げできるだけ短期間の保存にするように配慮する。

【医療用具メーカー等への指示】

- ① 医薬品との組合せ使用の際の選択が可能となるよう、DEHPを可塑剤として使用している医療用具であって、溶出したDEHPが体内に移行する可能性がある医療用具については、可塑剤としてDEHPを使用している旨の記載を徹底する。
- ② DEHPを可塑剤として使用している医療用具の機能を完全に代替できる優れた代替品の開発を促進するよう周知する。

(以上)

現在、PVCが使用されている各種医療用具について、PVC以外の実績素材は次の通りである。

ディスポジション用カテーテル：天然ラテックスゴム、シリコンゴム、PETFE(エチレン・テトラフルオロエチレン共重合体)

排液バッグ：EVA(エチレン・酢酸ビニル共重合体)

各種チューブ：ポリレフィン系

輸液バッグ：EVA、LDPE(低密度ポリエチレン)、PP(ポリプロピレン)

血液バッグ：なし

4. 人工赤血球用バッグの要求性能

人工赤血球用バッグに求められる高いガスバリア性は、製剤をデオキシ(脱酸素)状態で安定に保存するために、最も重要な項目である。二重包装の輸液バッグも市販されており、酸素透過を阻止するためにアルミバッグを使用する手法や、アルミ薄膜被覆の方法も確立されている。さらに、内装と外装の間に酸素吸着剤(例：エージレス(三菱瓦斯化学))を入れ、低酸素濃度を保持する工夫も一般化されてきている。この際、内包装材料にあえて酸素透過性の高い材料を使用し、酸素吸着剤により内容液の

酸素濃度状態をさらに低減させる技術もある。今後の検討項目は、内包装材料、外包装材料、酸素吸着剤の選択・組合せとなる。

上記の詳細検討項目に基づき、人工赤血球用バッグの要求性能をまとめてみた。

- ・ ガス(O₂, CO, NO, CN)バリア性が高い(deoxy体で保存するため)
- ・ 可塑剤を必要としないポリオレフィン系材質(軟質PVCは使用しない)
- ・ 内装材は透明(内容物の状況、残量が判定できる)
- ・ 外装はアルミバック(アルミ薄膜被覆)でもよい
- ・ 耐滅菌性(EO、放射線)
- ・ 成形加工性
- ・ 低コスト
- ・ 柔軟性や触感
- ・ その他

D. 結論

今回の詳細検討で、人工赤血球用バッグの設計概要が明確となった。今後、具体的なプラスチック材料の厳密な選定を行い、試作品を製造、実際に人工赤血球製剤を封入し、その保存安定性試験を開始する。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 論文発表

1. H. Sakai, H. Horinouchi, Y. Masada, S. Takeoka, M. Takaori, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Metabolism of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model." *Biomaterials* **25**, 4317-4325 (2004).

2. A. Yoshizu, Y. Izumi, S. Park, H. Sakai, S. Takeoka, H. Horinouchi, E. Ikeda, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier Hemoglobin Vesicle (HbV) maintains intestinal perfusion and suppresses the increase in plasma tumor necrosis factor alpha (TNF α). *ASAIO J.*

50, 458-463 (2004).

3. H. Sakai, Y. Masada, H. Onuma, S. Takeoka, E. Tsuchida. Reduction of Methemoglobin via Electron Transfer from Photoreduced Flavin: Restoration of O₂-Binding of Concentrated Hemoglobin Solution Coencapsulated in Phospholipid Vesicles. *Bioconjugate Chem.* **15**, 1037-1045 (2004).

4. H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, E. Ikeda, K. Sou, S. Takeoka, M. Suematsu, M. Takaori, K. Kobayashi, E. Tsuchida "Physiologic capacity of reticuloendothelial system for degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311**, 874-884 (2004)

5. K. Sou, R. Klipper, B. Goins, E. Tsuchida, WT Phillips. Circulation kinetics and organ distribution of hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 702-709 (2005).

6. P. Cabrales, H. Sakai, A.G. Tsai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Intaglietta. Oxygen transport by low and normal P₅₀ Hb-vesicles in extreme hemodilution. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2005) in press.

7. C. Contaldo, J. Plock, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Leuing, A. Banic, and D. Erni. Hemodilution with polymerized and encapsulated hemoglobins improves oxidative energy metabolism in collateralized hamster flap tissue. *Crit. Care Med.* (2005) in press.

8. H. Sakai, P. Cabrales, A.G. Tsai, M. Intaglietta, E. Tsuchida. Oxygen releasing of Hb-vesicles with different P₅₀s from transiently occluded arteriole in hamster window model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2005) in press.

9. Y. Hunag, T. Komatsu, H. Yamamoto, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Exchange transfusion with entirely synthetic red-cell substitute albumin-heme into rats: Physiological responses and blood biochemical rests. *J. Biomed. Mater. Res.* **71A**, 63-69 (2004).

10. A. Nakagawa, N. Ohmichi, T. Komatsu, E. Tsuchida. Synthesis of protoheme derivatives with a covalently

linked proximal-base and their human serum albumin hybrids as artificial hemoprotein. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 3108-3112 (2004).

11. T. Komatsu, N. Ohmichi, P. A. Zunszain, S. Curry, E. Tsuchida. Dioxygenation of human serum albumin having a prosthetic heme group in a tailor-made heme pocket. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14304-14305 (2004)

12. T. Komatsu, Y. Oguro, Y. Teramura, S. Takeoka, J. Okai, M. Anraku, M. Otagiri, E. Tsuchida. Physicochemical characterization of cross-linked human serum albumin dimer and its synthetic heme hybrid as an oxygen carrier. *Biochim. Biophys. Acta* **1675**, 21-31 (2004)

13. T. Komatsu, H. Yamamoto, Y. Huang, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, Exchange transfusion with synthetic oxygen-carrying plasma protein "Albumin-Heme" into an acute anemic rat model after seventy-percent hemodilution.. *J. Biomed. Mater. Res.* **71A**, 644-651 (2004).

14. Y. Hunag, T. Komatsu, H. Yamamoto, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Safety evaluation of artificial O₂-Carrier as red cell substitute "Albumin-Heme" by blood biochemical Tests and histopathology observations. *ASAIO J.* **50**, 525-529 (2004).

15. R.-M. Wang, T. Komatsu, A. Nakagawa, E. Tsuchida. Human serum albumin bearing covalently attached iron (II) porphyrins as O₂-binding sites. *Bioconjugate Chem.* **16**, 23-26 (2005).

(総説、著書など)

1. 土田英俊、武岡真司、小松晃之、酒井宏水。"人工赤血球"「新訂版・表面科学の基礎と応用」第5章第12節 pp. 1333-1336、編者：日本表面科学会、エヌ・ティー・エス社 (2004)。

2. 小松晃之、土田英俊。酸素輸送合成ヘム蛋白質"アルブミン-ヘム"の創製と酸素輸液の展開", *体液・代謝管理* **20**, 3-6 (2004)。

3. 武岡真司。人工血液(人工赤血球)の開発動向。 *日本医師会雑誌* **131**, 907-910 (2004)

4. 武岡真司. “酸素輸液の展望”「周術期輸液の最前線」pp.162-168、編者: 宮尾秀樹、真興交易(株)医書出版部 (2004)
 5. 武岡真司. 人工赤血球・人工血小板の開発の現状. *臨床麻酔* 29, (2005) (印刷中)
 6. S. Takeoka. “Design and Modification of Nanoparticles for Blood Substitutes”. In: *Organ Micocirculation: A Gateway to Diagnostic and Therapeutic Investigation*. pp. 35-41, Eds. by H. Ishii, M. Suematsu, K. Tanishita, H. Suzuki. Springer-Verlag Tokyo (2005)
 7. K. Kobayashi, H. Horinouchi, M. Watanabe, Y. Izumi, Y. Teramura, A. Nakagawa, Y. Huang, K. Sou, H. Sakai, T. Komatsu, S. Takeoka, E. Tsuchida. “Safety and Efficacy of Hemoglobin-Vesicles and Albumin-Hemes”. In: *Artificial Oxygen Carrier: Its Front Line*, Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine Vol.12, pp. 1-21, Eds. by K. Kobayashi, E. Tsuchida, and H. Horinouchi. Springer-Verlag Tokyo (2005).
 8. H. Sakai, K. Sou, S. Takeoka, K. Kobayashi, E. Tsuchida. “Hemoglobin-vesicles (HbV) as artificial oxygen carriers”. In: *Artificial Oxygen Carrier: Its Front Line*, Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine Vol.12, pp. 135-168, Eds. by K. Kobayashi, E. Tsuchida, and H. Horinouchi. Springer-Verlag Tokyo (2005).
 9. T. Komatsu, E. Tsuchida. “Oxygen-carrying plasma hemoprotein including synthetic heme” In: *Artificial Oxygen Carrier: Its Front Line*, Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine Vol.12, pp. 193-204, Eds. by K. Kobayashi, E. Tsuchida, and H. Horinouchi. Springer-Verlag Tokyo (2005).
 10. E. Tsuchida, H. Sakai, T. Komatsu, S. Takeoka, Y. Huang, K. Sou, A. Nakagawa, Y. Teramura, and K. Kobayashi. Oxygen infusions (Hemoglobin-vesicles and Albumin-hemes) based on nano-molecular sciences. *Polymers Adv. Technol.* 16, 73-83 (2005).
 11. S. Takeoka. Developmental trend of artificial blood (artificial red blood cells). *JMAJ* 48, (2005) in press.
 12. H. Sakai, K. Sou, S. Takeoka, K. Kobayashi, and Eishun Tsuchida, “Hemoglobin-vesicles as a molecular assembly: Characteristics of preparation process and performances as artificial oxygen carriers.” In “*Blood Substitutes*” (Ed. By Robert M. Winslow, Elsevier), (2005) in press.
 13. T. Komatsu, Y. Huang, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. “Albumin-Heme: A Synthetic Heme-Based Oxygen Carrier” In “*Blood Substitutes*” (Ed. By Robert M. Winslow, Elsevier), (2005) in press.
2. 学会発表
1. 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 9th Liposome Research Days Conference / May 11-15, 2004 / Hsinchu, Taiwan
 2. E. Tsuchida, H. Sakai, S. Hisamoto, I. Fukutomi, K. Sou, S. Takeoka / Detection of lipopolysaccharide in hemoglobin-vesicles by Limulus Amebocyte lysate test with kinetic-turbidimetric gel clotting analysis and pretreatment of surfactant. / The 9th Liposome Research Days Conference / May 11-15, 2004 / Hsinchu, Taiwan
 3. H. Sakai, Y. Suzuki, M. Kinoshita, S. Takeoka, N. Maeda, E. Tsuchida. / O₂ release from Hb vesicles evaluated using an artificial, narrow O₂-permeable tube (comparison with RBCs and acellular Hb)/ The 9th Liposome Research Days Conference / May 11-15, 2004 / Hsinchu, Taiwan
 4. E. Tsuchida, H. Sakai, H. Horinouchi, S. Takeoka, K. Kobayashi. / Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. / The 9th Liposome Research Days Conference / May 11-15, 2004 / Hsinchu, Taiwan
 5. K. Sou, R. Klipper, B. Goins, H. Sakai, S. Takeoka, W.T. Phillips, E. Tsuchida. / Circulation Kinetics and biodistribution of Hemoglobin-vesicles. / The 9th Liposome Research Days Conference / May 11-15, 2004 / Hsinchu, Taiwan.

6. E. Tsuchida, T. Komatsu, Y. Huang, A. Nakagawa / Albumin, Instead of Liposome, as a Carrier of Oxygenated Heme (Albumin-heme)", / The 9th Liposome Research Days Conference / May 11-15, 2004 / Hsinchu, Taiwan.
7. E. Tsuchida / Safety and Efficacy of Hb-vesicles as the O₂ infusion system / The 23rd Symposium of the Korean Society of Transfusion (Invited Lecture) / 2004.5.21-22 / Muju, Korea
8. 小幡洋輔、武岡真司、西出宏之、酒井宏水、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体(人工赤血球)投与後のサイトカイン放出挙動 / 第 53 回高分子学会年次大会 / 2004.5.25-27 / 神戸国際会議場
9. 大道直美、中川晶人、小松晃之、西出宏之、Stephen Curry、土田英俊 / アルブミン-ヘム錯体の構造と物理化学的特徴 / 第 53 回高分子学会年次大会 / 2004.5.25-27 / 神戸国際会議場
10. 小黒有希子、中川晶人、小松晃之、武岡真司、土田英俊 / アルブミン-ヘム複合体の酸素、一酸化炭素結合反応 / 第 53 回高分子学会年次大会 / 2004.5.25-27 / 神戸国際会議場
11. 鈴木洋司、酒井宏水、木下めぐ美、武岡真司、土田英俊、前田信治 / 酸素透過性微小流路を流れるヘモグロビン小胞体からの酸素放出：赤血球浮遊液およびヘモグロビン溶液との比較 / 日本生理学会 / 2004. 6.2-4 / 札幌市
12. 堀之内宏久、小林絃一、渡辺真純、泉陽太郎、山本学、藤本博行、土田英俊、武岡真司、酒井宏水、小松晃之、山本尚志 / 人工酸素運搬体の開発 / 第 52 回日本輸血学会総会 / 2004. 6.23-25 / 札幌コンベンションセンター
13. 酒井宏水、堀之内宏久、武岡真司、小林絃一、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体による 40%血液交換後の回復過程 / 第 11 回日本血液代替物学会 / 2004.7.13-14 / 札幌市
14. 宗慶太郎、Robert Klipper、Beth Goins、William T. Phillips、武岡真司、土田英俊 / ^{99m}Tc ラベル化ヘモグロビン小胞体の体内動態評価 / 第 11 回日本血液代替物学会 / 2004.7.13-14 / 札幌市
15. 安楽誠、浦田由紀乃、宗慶太郎、酒井宏水、土田英俊、小田切優樹 / 125I ラベル化ヘモグロビン小胞体の体内動態について / 第 11 回日本血液代替物学会 / 2004.7.13-14 / 札幌市
16. 阿部英樹、山口美樹、藤原満博、酒井宏水、武岡真司、土田英俊、東寛、池田久實 / Hb 小胞体 (HbV) 投与がラット免疫系に及ぼす影響 / 第 11 回日本血液代替物学会 / 2004.7.13-14 / 札幌市
17. 酒井宏水、Pedro Cabrales、Amy G. Tsai、武岡真司、Marcos Intaglietta、土田英俊 / 血流停止させた細動脈内の Hb 小胞体からの酸素放出挙動 / 第 11 回日本血液代替物学会 / 2004.7.13-14 / 札幌市
18. M. Kajimura, M. Ichikawa, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Suematsu. / Real-time imaging of anionic liposomes during thrombus formation and acute inflammation in rats. / Japan-United Kingdom Platelet Conference / 2004. 9
19. 大道直美、小松晃之、西出宏之、土田英俊 / ヘムポケットを有する組換えアルブミンに結合させたヘム錯体の酸素結合 / 第 53 回高分子討論会 / 2004. 9 / 札幌
20. 王榮民、小松晃之、土田英俊 / 酸素結合サイトとして鉄(II)ポルフィリンを共有結合したヒト血清アルブミン / 第 53 回高分子討論会 / 2004. 9 / 札幌
21. 中川晶人、小松晃之、小黒有希子、土田英俊 / $\alpha^3\beta$ 置換ヘム誘導体を包接したアルブミン-ヘム複合体の合成と酸素結合 / 第 53 回高分子討論会 / 2004. 9 / 札幌
22. 小松晃之、大道直美、土田英俊 / ヘムポケットを有する組換えアルブミンの合成とヘム錯体の酸素結合 / 第 53 回高分子討論会 / 2004. 9 / 札幌
23. 酒井宏水、山本学、堀之内宏久、武岡真司、小林絃一、土田英俊 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)による 40%血液交換後の回復過程 / 第 42 回日本人工臓器学会大会 / 2004.10.5-7 / 東京
24. 武岡真司、阿閉友保、酒井宏水、土田英俊 / Hb 小胞体のメトヘモグロビン消去系の構築 / 第 42 回日本人工臓器学会大会 / 2004.10.5-7 / 東京

25. H. Sakai, E. Tsuchida. Performances of PEG-modified Hb-vesicles as artificial oxygen carriers in Microcirculation / The 6th Asian Congress for Microcirculation (ACM'05) / 2005. 2.24-26 / Tokyo.
26. M. Kajimura, H. Sakai, T. Atoji, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Ichikawa, M. Suematsu. Anionic liposome protects murine brain against plasma leaking after ischemia reperfusion / The 6th Asian Congress for Microcirculation (ACM'05) / 2005. 2.24-26 / Tokyo.
27. 小松晃之、土田英俊／酸素輸送アルブミン-完全合成系人工酸素運搬体”アルブミン-ヘム”の創製と利用(招待講演)／第32回日本集中治療医学会学術集会／2005. 2／東京
28. 土田英俊／酸素輸液の医療展開／第1回技術セミナー(早稲田大学理工学総合研究センター主催)／2005.3.11／東京
29. 宗慶太郎／ヘモグロビン小胞体の分子集合体としての特徴と体内動態／第1回技術セミナー(早稲田大学理工学総合研究センター主催)／2005.3.11／東京
30. 酒井宏水／ヘモグロビン小胞体の体内酸素運搬機能と安全度／第1回技術セミナー(早稲田大学理工学総合研究センター主催)／2005.3.11／東京
31. 小松晃之／酸素輸送合成ヘム蛋白質(アルブミン-ヘム)の創製／第1回技術セミナー(早稲田大学理工学総合研究センター主催)／2005.3.11／東京
32. 飯塚 誠、中川晶人、小松晃之、武岡真司、土田英俊／ $\alpha^3\beta$ 置換テトラフェニルポルフィリン鉄錯体の合成と酸素結合に及ぼす置換基構造の効果／第85日本化学会春季年会／2005.3／横浜
33. 黄 宇彬、中川晶人、小松晃之、土田英俊／ポリオキシエチレン修飾アルブミン-ヘムの構造・物性と酸素結合能／第85日本化学会春季年会／2005.3／横浜
- (新聞報道ほか)
日本経済新聞「先端技術 21世紀の気鋭、人工赤血球臨床へ、一つ一つ積み上げ成果」(H16.4.22)
- 日本経済新聞 朝刊「血液型不適合で副作用、輸血の安全道半ば、普及する自己血、人工血液の開発も」(H16.11.28)
- Medical Tribune「人工血液がもたらす未来の救急医療像を模索」(H16.8.19)
- ニュートン誌「驚異の未来テクノロジー、人工赤血球で慢性的な輸血用血液の不足を補う」(H17.2月号)

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：ビーグル犬を用いたアルブミンヘムの出血性ショックに対する
蘇生効果の評価(循環動態の変化)

分担研究者 堀之内 宏久 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 講師
山本 学 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 助手
山本 尚志 ニプロ(株)医薬品研究所
黄 宇彬 早稲田大学理工学総合研究センター 講師
中川 晶人 早稲田大学理工学総合研究センター 助手

研究要旨

アルブミンヘムは遺伝子組み換え技術を用いて製造された血漿タンパク成分に人工合成のヘムを包接させた人工酸素運搬体である。アルブミンヘムが生体内で酸素運搬を行なっていることを小動物では明らかにしてきた。しかし、小動物は循環血液量が少ないため、動物実験でのショック蘇生の結果から臨床上的効果を予測するためには中・大動物での効果、安全性を明らかとする必要がある。中動物としてビーグル犬を選択し、ショックモデルとして 75%交換輸血をおこなったうえで 30%の脱血を行い、出血性ショックとした後にアルブミンヘムにて蘇生を行ない、その効果と安全性について検討した。対照群として 5%リコンビナントヒトアルブミン生食溶液、Lactate Ringer 液を用いて検討した。

その結果、アルブミンヘムは急性貧血モデルにおける出血性ショックの蘇生にアルブミンや Lactate Ringer 溶液と比較して安全で有効であることが明らかとなった。しかし、アルブミンヘムの血中半減期が短いため、長期にわたって効果を持続させることに限界があることが予測された。

A. 研究目的

アルブミンヘムは早稲田大学理工学総合研究センターにおいて開発された遺伝子組み換え技術を用いて製造された血漿タンパク成分に人工合成のヘムを包接させた人工酸素運搬体である。アルブミンヘムが生体内で酸素運搬を行い、循環動態に大きな影響を与えずに機能することは小動物で確認されてきた。人工赤血球の大きな目標である出血性ショックの蘇生におけるアルブミンヘムの有効性を小動物を用いて検証することを目的

とした。

B. 研究方法

雄性ビーグル犬（6.1～7.4 kg 月齢 5～10 ヶ月）を用い、ケタラルルの基礎麻酔後に気管内挿管を行い、セボフルレン 2 %の吸入麻酔により全身麻酔とした。呼吸は自発換気とした。右前肢に薬剤投与用の静脈ラインを、右大腿静脈より Swan Ganz カテーテルを肺動脈まで挿入し、右大腿動脈に血圧監視用の動脈ラインを、左大腿動脈に脱血用お

よび採血の動脈ラインを挿入した。実験に先立ってまず腹部正中切開を行ない、脾摘を施行した。犬では、出血性ショック時に脾臓が収縮することにより出血性ショックの状況を緩和する体内貯蔵庫として機能することが知られており、脾臓の影響を取り除くために前もって脾摘を行なった。脾摘後状態が安定した後に推定循環血液量の75%を5%リコンビナントヒトアルブミン生食溶液にて置換し急性貧血モデルを作成した。血液希釈30分後に推定循環血液量の30%を脱血し、30分間ショック状態を保持した後蘇生液を用いて組成を行った。蘇生液としてはLactate Ringer 溶液(LR 群)、5%リコンビナントヒトアルブミン生食(5% rHSA 群)、アルブミン-ヘム生食溶液(rHSA-heme 群)を用い、蘇生液の投与量は脱血した血液量と等量とした。

蘇生後、経時的に(直後、30,60,90,120,180,240分後)に循環動態を表す諸標について計測した。また、経時的に採血を行い末梢血検査を行なった。

また、投与終了4時間後、血液生化学的検査用に採血を行った。全身麻酔下に脱血犠牲死させ、臓器を摘出、病理組織学的検査を行った。なお、本実験に用いたアルブミン-ヘム生食溶液は、酸素運搬能としては6g/dlの濃度のHbを含む血液と同等と考えられている。

倫理的配慮：実験プロトコールは慶應義塾大学医学部実験動物センターおよび動物実験委員会の承認を得て行なわれ、実験動物に関しては、十分な麻酔下にて実験を試行し必要以上の苦痛を与えないように十分な配慮を行った。

C. 結果および考察

生存 (Fig. 1)

Lactate Ringer 溶液で蘇生をした動物は蘇生液投与中は血圧の上昇が認められたが、蘇生液投与終了後速やかに血圧と心拍の低下を認め、20分以内に死亡した。5%rHSAで蘇生した群ではショック

状態から回復するものの血圧は徐々に低下し、3頭中2頭は30分以内に死亡した。これに比し、rHSA-heme 群では3頭共に血圧が回復し、ショック状態を脱し、観察期間中、循環動態は安定していた。

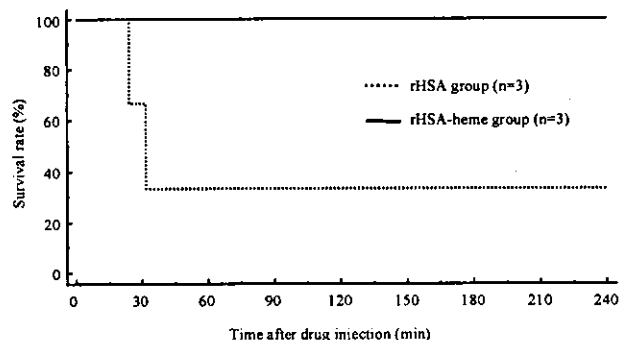


Fig. 1. Effects of recombinant human serum albumin (rHSA) and rHSA-heme on survival rate in anesthetized dogs subjected to 75% hemodilution and 30% hemorrhage.

血圧、肺動脈圧、CVP、PCWPの変化 (Fig. 2)

蘇生液投与直前までの血圧の変化は rHSA 群、rHSA-heme 群ともに有意差なく、安定したモデルが形成されていた。30分を超えて生存した rHSA 群の1例では血圧の変化は rHSA-heme 群と同様な経過を取った。

一方、肺動脈圧はショック、蘇生過程まで rHSA 群、rHSA-heme 群ともにほぼ同様な推移を示し、有意差を認めなかった。蘇生後 rHSA-heme 群では肺動脈圧の変化も著しくなく、平均肺動脈圧の回復を認めた。

中心静脈圧 (CVP) も脱血に伴ってほぼ 0 mmHg まで低下したが、蘇生液の投与と共に上昇し生理的な範囲にまで回復した。しかし、rHSA 群の2頭では速やかな血圧の低下に伴い、CVP も低下し、死亡した。rHSA 群の生存した1頭では蘇生液投与後一時的に CVP の上昇を認めたが、その後は低い値を推移した。rHSA-heme 群では投与直後に一時的な上昇を認めたが、その後は若干の低下傾向を認めるものの生理的な範囲内で推移した。

肺動脈楔入圧 (PCWP) も肺動脈圧と同様な経過

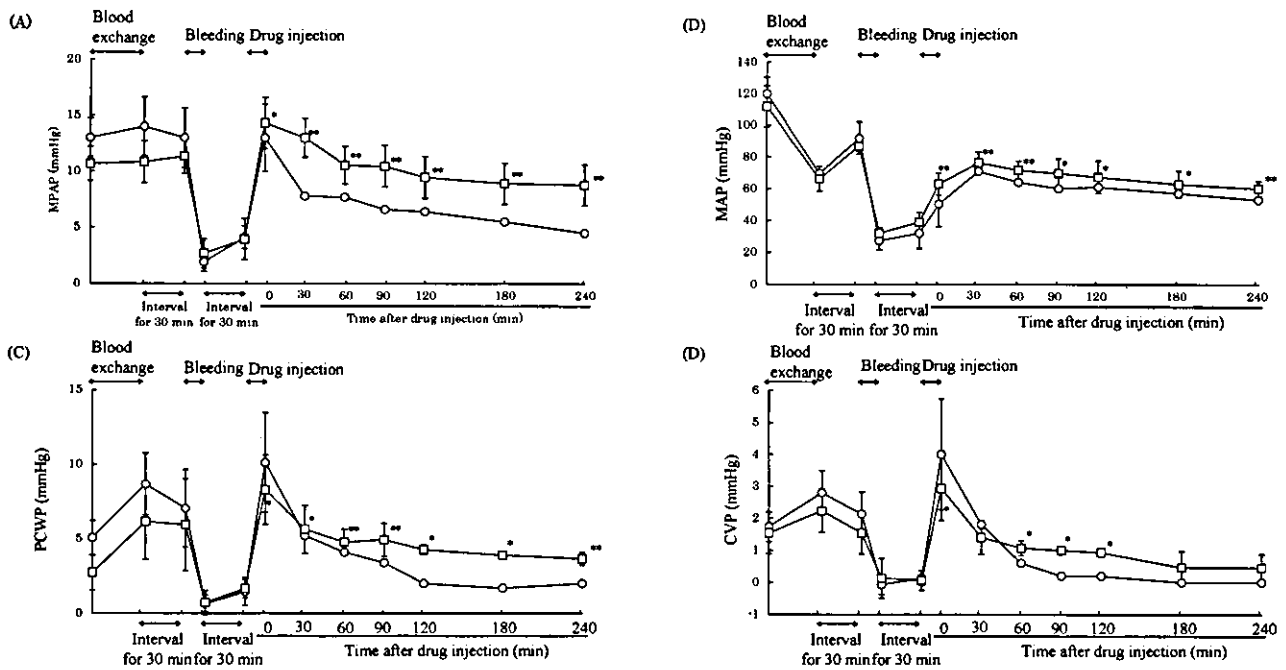


Fig. 2. Effects of recombinant human serum albumin (rHSA) and rHSA-heme on mean pulmonary arterial pressure (MPAP) (A), mean arterial pressure (MAP) (B), pulmonary capillary wedge pressure (PCWP) (C) and central venous pressure (CVP) (D) in anesthetized dogs subjected to 75% hemodilution and 30% hemorrhage. Each value represents the mean \pm S.D. of 3 dogs (\circ ; rHSA group and \square ; rHSA-heme group). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. before drug injection of rHSA-heme group (Paired t-test).

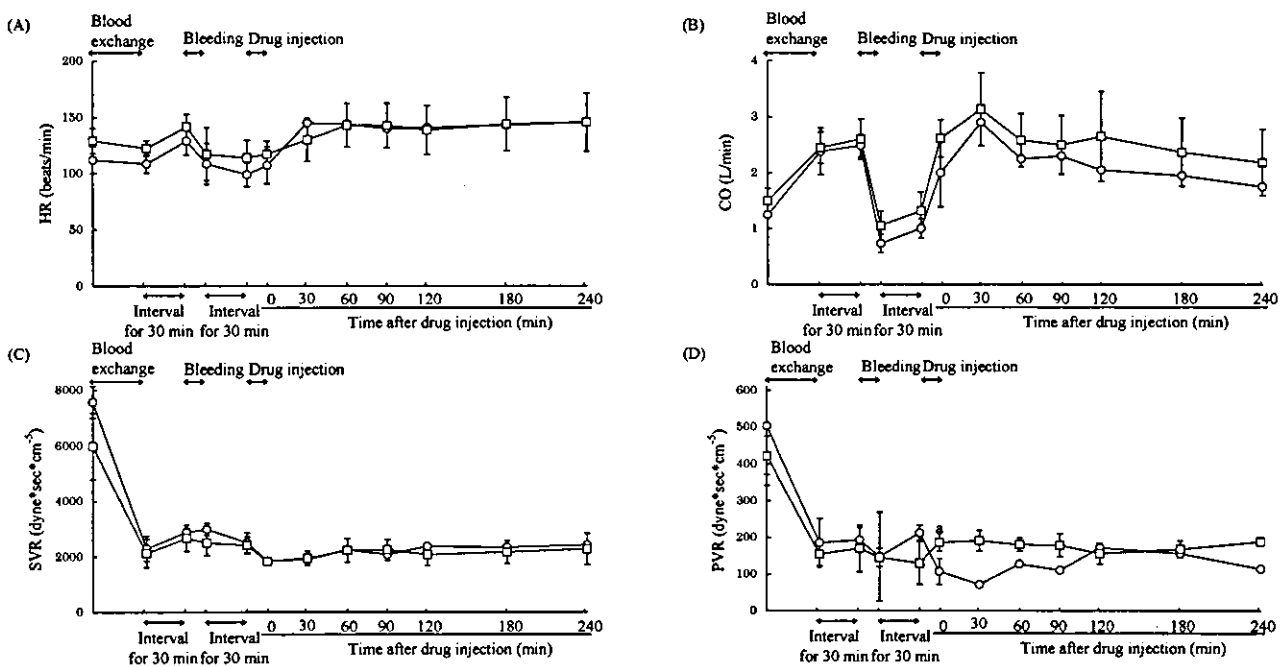


Fig. 3. Effects of recombinant human serum albumin (rHSA) and rHSA-heme on heart rate (HR) (A), cardiac output (CO) (B), systemic vascular resistance (SVR) (C) and pulmonary vascular resistance (PVR) (D) in anesthetized dogs subjected to 75% hemodilution and 30% hemorrhage. Each value represents the mean \pm S.D. of 3 dogs (\circ ; rHSA group and \square ; rHSA-heme group). a $P < 0.05$ vs. rHSA group (Student's t-test).

を示し、rHSA 群の中で生存した動物では蘇生直後に一時的な高値を取るものの漸次低下し、低い値で推移した。rHSA-heme 群では蘇生直後の一時的な上昇を認めるのは rHSA 群と変わりがなかったがその後は生理的な範囲内で推移した。

心拍数、心拍出量、体血管抵抗、肺血管抵抗 (Fig. 3)

rHSA 群の生存した 1 例では心拍数の変化は交換輸血により若干上昇し、脱血ショックによって低下、蘇生後心拍数の上昇を認め、観察期間中心拍数は高値のまま安定して推移していた。一方、rHSA-heme 群でも蘇生後心拍数は徐々に上昇し、ショック蘇生 60 分後に 144 /min に達しその後は安定して推移した。

心拍出量は血液希釈の伴い上昇し、脱血ショック後、著しく低下した。rHSA 群では蘇生液投与によって心拍出量の増加を認めたが、脱血前値には復さなかった。その後、生存した 1 頭では生理的な範囲内で安定して経過した。一方、rHSA-heme 群では蘇生液として投与した直後より脱血前値に回復し、安定した経過をたどった。

体血管抵抗 (Systemic Vascular Resistance, SVR) は血液希釈とともに低下し、ショック、蘇生にあまり関係なく、安定して経過した。

肺血管抵抗 (Pulmonary Vascular Resistance, PVR) は SVR と同様血液希釈により著しく低下した。ショック蘇生後 rHSA 群では低下する傾向にあった。rHSA-heme 群ではショック蘇生後若干上昇したが、観察期間中安定した経過をたどった。

Hb 濃度、血液生化学検査、アルブミン-ヘム由来鉄濃度の変化 (Fig. 4-7)

血中の Hb 濃度は当初の予測どおり血液希釈後約 3.2 g/dl に低下し、さらに 30 %脱血ショック蘇生を行った後 2.8 g/dl 程度で推移していた。

血液生化学検査では Albumin 濃度が血液希釈前値と比し増加しており、それに伴い A/G 比も上昇していた。また、AST,ALT の軽度の上昇、LDH の上昇が認められた。このうち LDH は血液希釈前は 54.6 IU/L であった。蘇生液投与後 rHSA 群で実験中生存した一例では 52 IU/L と安定していたが、rHSA-heme 群では 121 IU/L と上昇していた。

血清鉄濃度では、術前 123 mg/dl であったが血液希釈により低下し、実験終了後 rHSA 群では 36 mg/dl であったが、rHSA-heme 群では 50.3 mg/dl であった。一方、血漿中の鉄濃度を計測するとアルブミン-ヘム投与直後には 604 μ M であったが、経時的に減少し、投与 120 分後には 179 μ M となり、一相性に血中より減少した。また、血漿中のアルブミン-ヘムのメト化率を吸光度法により計測したところ、アルブミン-ヘム投与直後では 5.4 % であったメト化率は 12 分後には 9.9 % まで上昇していた。

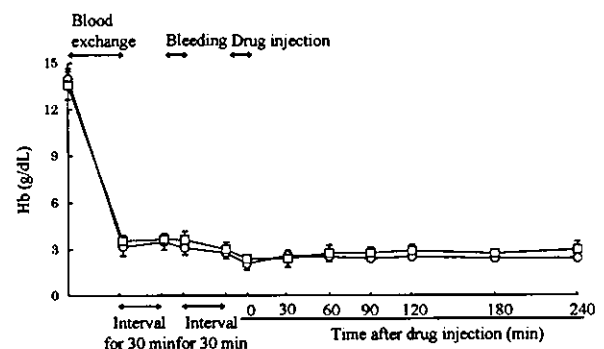


Fig. 4. Effects of recombinant human serum albumin (rHSA) and rHSA-heme on hemoglobin (Hb) concentration in whole blood of anesthetized dogs subjected to 75% hemodilution and 30% hemorrhage. Each value represents the mean \pm S.D. of 3 dogs (\circ ; rHSA group and \square ; rHSA-heme group).

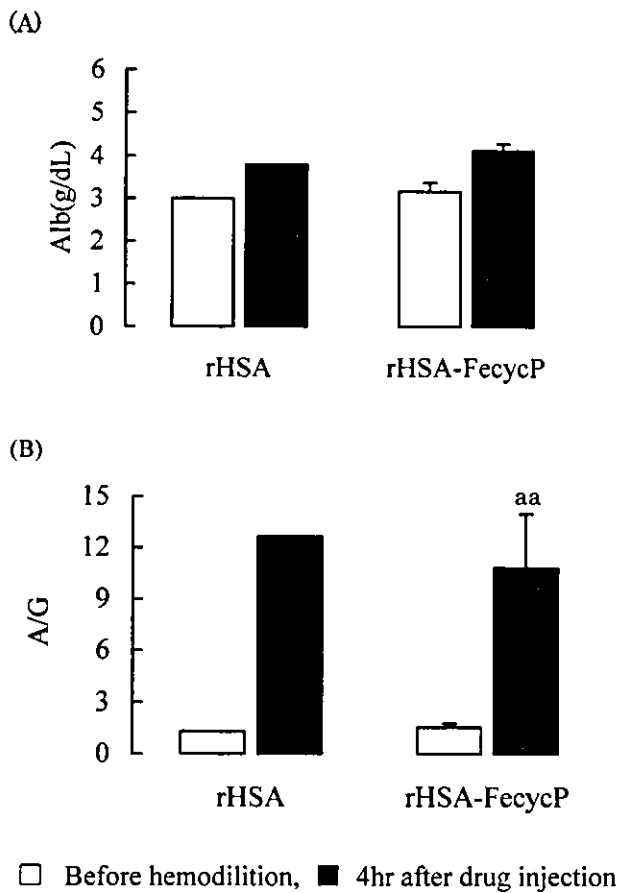


Fig. 5-1. Plasma biochemical values of dogs subjected to 75% hemodilution and 30% hemorrhage followed by injection of recombinant human serum albumin (rHSA) or rHSA-heme. A: albumin (Alb) and B: albumin/globulin ratio (A/G). In rHSA group, each value represents the row data of 1 dog. In rHSA-heme group, each value represents the mean \pm S.D. of 3 dogs. aa $P < 0.01$ vs. before bleeding of rHSA-heme group (Paired t-test).

病理組織学的変化

急性実験であったが、実験終了直後に摘出した臓器のうち肝臓は色調が濃い褐色調に変化していた。これはアルブミン-ヘムの色調と考えられた。アルブミン-ヘムに包接されていたヘムが蓄積している可能性が唆され、病理組織学的検索を行なう予定である。

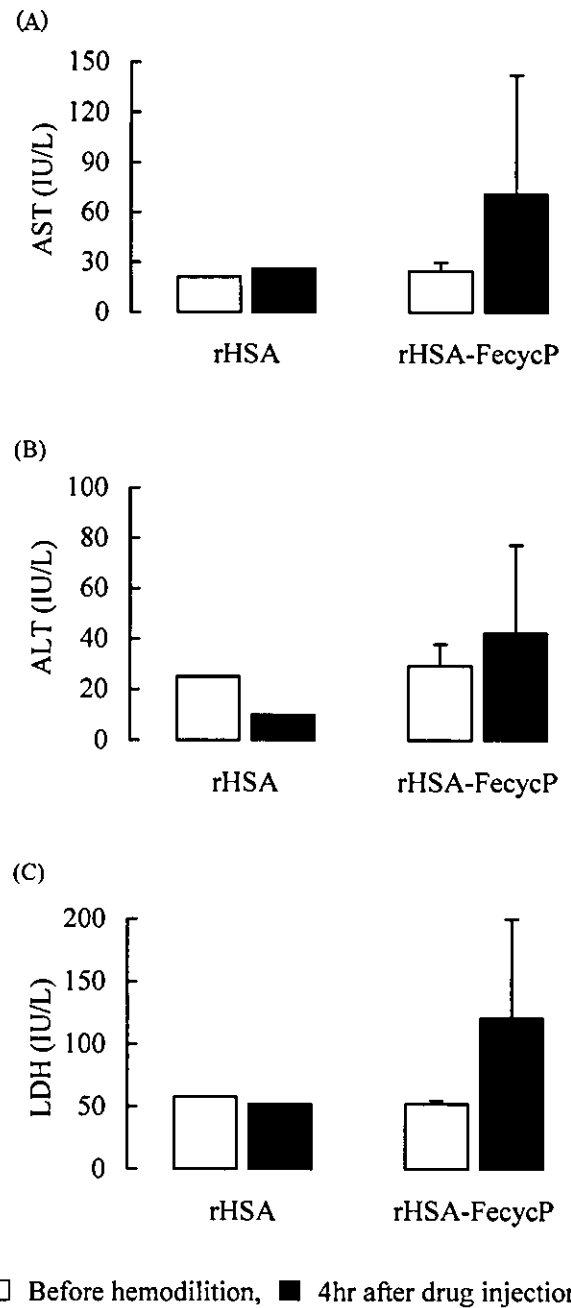


Fig. 5-2. Plasma biochemical values of dogs subjected to 75% hemodilution and 30% hemorrhage followed by injection of recombinant human serum albumin (rHSA) or rHSA-heme. A: aspartate aminotransferase (AST), B: alanine aminotransferase (ALT), C: lactate dehydrogenase (LDH). In rHSA group, each value represents the row data of 1 dog. In rHSA-heme group, each value represents the mean \pm S.D. of 3 dogs. a $P < 0.05$ vs. before bleeding of rHSA-heme group (Paired t-test).