

過程 / 第 54 回 高分子学会年次大会 /
2005.5.25-27 / パシフィコ横浜

酸素運搬能評価 / 第12回日本血液代替物学会年
次大会 / 2005.6.6-7 / 東京 早稲田大学

7. 酒井宏水、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
よる血液希釈後の回復過程 / 第53回日本輸血学
会総会 / 2005.5.26-28 / 東京ベイホテル東急
8. 酒井宏水、勢司泰久、佐藤夏枝、堀之内宏久、
武岡真司、土田英俊、小林絃一 / ヘモグロビン
小胞体による50%出血ショック蘇生後の回復過
程 / 第12回日本血液代替物学会年次大会 /
2005.6.6-7 / 東京 早稲田大学
9. 泉陽太郎、山本 学、竹内 健、渡辺真純、堀
之内宏久、寺村裕治、酒井宏水、武岡真司、土
田英俊、小林絃一 / 人工酸素運搬体ヘモグロビ
ン小胞体による固形腫瘍の酸素化の試み / 第12
回日本血液代替物学会年次大会 / 2005.6.6-7 /
東京 早稲田大学
10. 酒井宏水、勢司泰久、堀之内宏久、池田栄二、
武岡真司、土田英俊、小林絃一 / ヘモグロビン
小胞体の単回投与1年後の血液生化学、組織病理
学的検討 / 第12回日本血液代替物学会年次大会
/ 2005.6.6-7 / 東京 早稲田大学
11. 山本 学、堀之内宏久、渡辺真純、酒井宏水、
武岡真司、勢司泰久、佐藤夏枝、須賀裕子、小
林絃一、土田英俊 / ビーグル犬50%脱血ショッ
クモデルにおけるHb小胞体の蘇生効果と安全
性評価 / 第12回日本血液代替物学会年次大会 /
2005.6.6-7 / 東京 早稲田大学
12. 山本尚志、堀之内宏久、山本 学、小林絃一、
小松晃之、中川晶人、黄 宇彬、弘津一郎、甲
斐俊哉、土田英俊 / 麻酔下イヌ出血ショックモ
デルを用いた人工酸素輸液アルブミン-ヘムの
13. 堀之内宏久、神山育男、川村雅文、矢部啓夫、
小林絃一 / 胸壁欠損の再建手術
Reconstruction plate を用いた胸壁再建の4例 /
第30回日本外科系連合学会総会 / 2005. 6. / 東
京
14. K. Kobayashi, H. Sakai, M. Yamazaki, M.
Yamamoto, H. Horinouchi, S. Takeoka, R. Yozu, E.
Tsuchida. / The efficacy of hemoglobin-vesicle, an
artificial oxygen carrier, in hemorrhagic shock
resuscitation, and cardiopulmonary bypass. / The
51st Annual Conference of American Society for
Artificial Internal Organs (ASAIO). / 2005.6.9-11 /
Washington DC
15. H. Sakai, Y. Seishi, N. Satoh, H. Horinouchi, S.
Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Fourteen
days observation after resuscitation from
hemorrhagic shock using Hb-vesicles suspended in
recombinant albumin in a rat model. / 10th
International Symposium on Blood Substitutes/
2005.6.12-15/ Providence, RI/
16. H. Sakai, H. Horinouchi, M. Yamamoto, K. Sou, S.
Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Recovery
after 40% exchange transfusion with Hb-vesicles
suspended in recombinant albumin: physiological
capacities for degradation of Hb-vesicles and
hematopoiesis. / 10th International Symposium on
Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
17. H. Sakai, Y. Seishi, K. Ohta, H. Horinouchi, E.
Ikeda, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi /
Histopathological and plasma biochemical analyses
one year after bolus infusion of Hb-vesicles in

- Wistar rats. / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
18. M. Yamamoto, K. Kobayashi, H. Horinouchi, H. Yamamoto, H. Sakai, S. Takeoka, Y. Suka, E. Tsuchida. / Safety and effectiveness of hemoglobin vesicles in 50% hemorrhage shock model in dog / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
19. K. Kobayashi, H. Horinouchi, Y. Izumi, M. Watanabe, H. Yamamoto, R. Yozu, H. Sakai, T. Komatsu, Y. Huang, A. Nakagawa, S. Takeoka, and E. Tsuchida. / Preclinical studies of Hb-vesicles and albumin-hemes. / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
20. Y. Izumi, M. Yamamoto, K. Takeuchi, M. Watanabe, H. Horinouchi, Y. Teramura, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Systemic administration of hemoglobin vesicle augments radiation response in lewis lung carcinoma. / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
21. H. Yamamoto, H. Horinouchi, M. Yamamoto, K. Kobayashi, T. Komatsu, A. Nakagawa, Y. Huang, I. Hirotsu, T. Kai, E. Tsuchida. / Exchange transfusion with entirely synthetic red-cell substitute albumin-heme into anesthetized dogs: physiological responses and oxygen delivery / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
22. H. Horinouchi, H. Yamamoto, T. Oba, M. Haraguchi, K. Kobayashi, T. Komatsu, E. Tsuchida. / Enhanced radiation response by using artificial oxygen carrier: albumin-heme (rHSA-FecycP). / 10th International Symposium on Blood Substitutes/ 2005.6.12-15/ Providence, RI/
23. 堀之内宏久, 山本尚志, 小林紘一, 小松晃之, 土田英俊 / 人工酸素運搬体による腫瘍酸素加による放射線感受性の増強 / 第 43 回日本癌治療学会総会 / 2005.9. / 名古屋
24. 堀之内宏久, 塚田紀理, 神谷一徳, 川久保正祥, 黒田浩章, 朝倉啓介, 池田達彦, 泉陽太郎, 江口圭介, 渡辺真純, 川村雅文, 小林紘一 / 肺癌気管支形成症例の再発様式についての臨床的検討 / 第 46 回日本肺癌学会総会 / 2005.11.25 / 千葉
25. 酒井宏水, 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)の代謝過程における脾臓微小循環の動的解析 / 第43回 日本人工臓器学会大会 / 2005.11.30 - 12.2 / 東京・日本都市センター
26. 小林紘一, 堀之内宏久, 酒井宏水, 土田英俊 / 人工赤血球製剤(ヘモグロビン小胞体)の臨床試験に向けて / 第43回 日本人工臓器学会大会 / 2005.11.30 - 12.2 / 東京・日本都市センター
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
「血中微粒子製剤の除去装置」(特願 2005-152284)

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. 循環血液から Hb 小胞体を分離除去する方法の検討
2. Hb 小胞体の投与による有茎皮弁虚血領域の酸素化
3. 極度な血液希釈における高酸素親和度 Hb 小胞体の効果
4. L-Tyrosine を基質としたメトヘモグロビンによる H₂O₂ 消去機構の解析
5. ポリエチレングリコール修飾アルブミン-ヘムの合成、物性と酸素結合

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
研究協力者	武岡 真司	早稲田大学 理工学術院 教授
研究協力者	酒井 宏水	早稲田大学 理総研 助教授
研究協力者	宗 慶太郎	早稲田大学 理総研 助教授
研究協力者	中川 晶人	早稲田大学 理総研 助手

研究要旨

(1) Hb 小胞体(HbV)投与後の血液から HbV の選択分離が、遠心分離と限外濾過膜操作により可能となった。HbV の投与効果が得られた時点で速やかに循環血液中から除去することにより、HbV を捕捉分解する細網内皮系の負担が軽減できる。(2) 高酸素親和度・高粘度 HbV 分散液の投与により、ハムスター有茎皮弁内の虚血組織内の微小循環動態(血行動態、血管壁透過性、酸素分圧)の改善を確認した。(3) 極度な血液希釈モデルにおいて、高酸素親和度 HbV が血行動態の維持と組織酸素分圧の向上に有効であることがハムスター皮下微小循環動態の観測から示唆された。また、HbV が血管収縮を生起しないことを再確認した。(4) metHb/L-Tyr 添加系は安定に H₂O₂ を消去でき、HbV の met 化抑制に寄与する。H₂O₂ との反応過程で生成する FerrylHb ラジカルが L-Tyr の共存により、自動還元とは異なる機構で安定に、且つ速やかに metHb へと還元する機構を明らかにした。(5) 完全合成系人工酸素運搬体(アルブミン-ヘム)の分子表面をポリエチレングリコール(PEG)鎖で化学修飾する方法を確立、得られた複合体の構造と溶液物性を明らかにした。PEG 修飾により、ヘム血中滞留時間を大幅に延長できることを見出した。

1. 循環血液から Hb 小胞体を分離除去する方法の検討

A. 研究目的

輸血の代替として使用される Hb 小胞体(HbV)

は、一般の薬剤よりも大量の投与を前提としている。これまでにラットを用いた投与試験(単回投与: 20 mL、反復投与:10 mL/kg/day x 14 days)では、HbV は細網内皮系(主に肝臓、脾臓)に捕捉されて、速やかに代謝、排泄されることを、血液生化学的、組

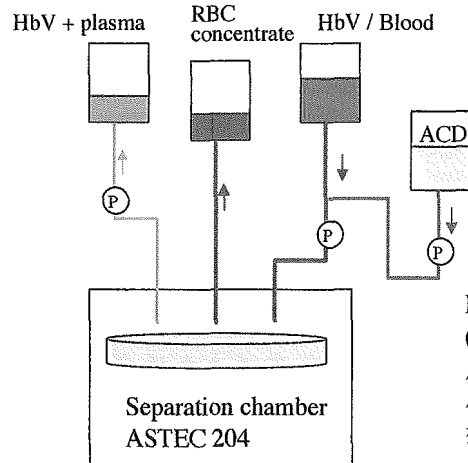
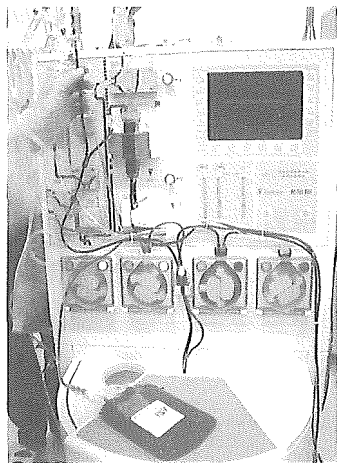


Fig. 1. 血液成分分離装置 (Fresenius AS.TEC204) を使用した、血球成分分画と Hb 小胞体(HbV) を含有する血漿分画に分離する方法。

織病理学的に明らかにしている。投与後に十分な酸素輸送効果が得られ、適切な医療行為(輸血や外科的措置など)の後、HbV がなくなってきた時点で血中から除去することが出来れば、細網内皮系への負担を軽減が可能と成る。本研究では、赤血球とは異なる HbV の物理的特徴を活用し、HbV のみを分離除去する方法を検討することを目的とした。

本研究は、慶應義塾大学の堀之内 宏久 博士との共同で実施した。

B. 研究方法

ビーグル犬を用いた出血性ショックモデルに対し、HbV を投与し蘇生効果を評価する実験(分担研究者: 相川直樹, 堀之内宏久)が終了した後、直ちに血液を採取して ACD 液を加え、これを血液と HbV の混合液として使用した。

1. 血球成分との分離

HbV は赤血球よりも比重が小さいので、通常の遠心分離(10,000g 以下)では沈降しない。この性質を利用し、臨床現場で使用されている遠心分離式血液成分分離装置(AS.TEC204, Fresenius 社製, 回転数 300 ~ 2000 rpm)を利用して血球成分と分離した (Fig. 1, Fig. 2)。今回は検体液量が 280 mL なので、必要に応じて ACD 液を補給し、遠心分離操作を行い、赤血球分画と HbV を含む血漿分画に分離した。

2. 血漿蛋白質との分離

HbV の粒径 250 nm は、赤血球の粒径(8 μ m)の約 1/30 であり、また血漿蛋白質よりも極めて大きい。そこで上述の遠心分離操作により血球を除去した後の HbV を含有する血漿分画について、プラズマフェレシス用の限外濾過膜システムを用い、血漿蛋白質との分離を検討した。膜型血漿分離器(プラ

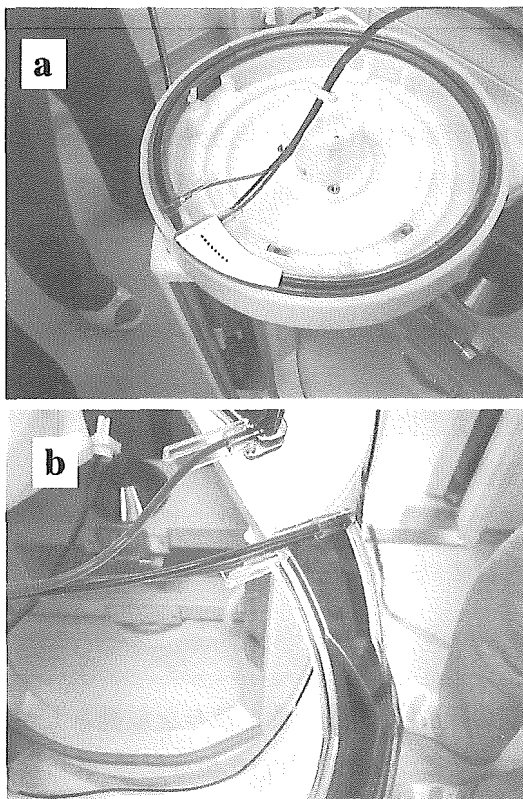


Fig. 2. (a) 血液成分分離装置(Fresenius AS.TEC204)の輪投げ式ローターの写真、(b)血球分画と HbV を含有する血漿分画が分離された状況。

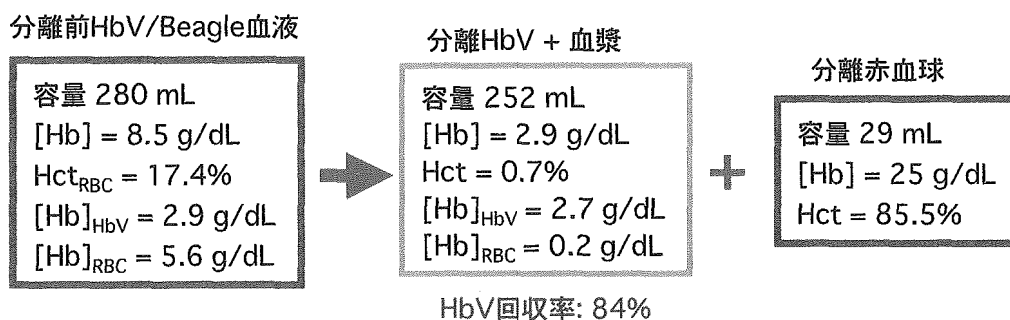


Fig. 3. 遠心分離法による HbV と赤血球の分離操作の結果

ズマフローOP-02W, 旭化成メディカル社製, 孔径 0.3 μ m, 膜面積 0.2 m²)を使用した。

C. 結果および考察

1. 血球成分との分離

Fig. 2 の写真に示すように、輪投げ式ローター内部では、赤血球の層と HbV を含有する層に完全に分離ができた。Fig. 3 に分離の結果をまとめた。今回は検体の量が 280 mL に制限されていたため、随時 ACD 液を補給して分離をしたが、回路内 Dead volume (200 mL 程度)の影響により、HbV の回収率は 84%に留まった。しかし、HbV 分画の Hct は僅か 0.7%であり、ほぼ完全に赤血球と分離できた。

本機器に装備されている血球分画検出器は、流路内透過光の変化を基に血球層の有無を判断しているが、HbV が血漿中に存在していると十分な透過光が得られないため、血球があるものと誤認した。今回は目視によるマニュアル操作で対応したが、今後は検出器の改良を要する。

2. 血漿成分との分離

研究方法(1)により分離した HbV を含有する血漿分画について更に、膜型血漿分離器(プラズマフローOP-02W)を用い HbV と血漿成分との分離を試みた。除去すべき HbV が大量にあること、また目詰まりが予想されたので、今回はホローファイバーの外側に血漿分画を流入させ、Deadend 型の濾過を行い、ホローファイバーの内側に濾液を得た。ホローファイバーの公称孔径は 0.3 μ m であるが、濾液として得た血漿成分には Hb が検出されず、血漿

分画から HbV をほぼ完全に分離できたことを確認した(Fig. 4)。今回は Deadend 式として処理したため、目詰まりが顕著であり、灌流式にして tangential flow により目詰まりを改善、効率向上が期待できる。

D. 結論

臨床現場で実際に使用されている医療機器を用いることにより、血液から HbV のみを分離除去できるように成った。まだ最適処理条件を決定する為の詳細検討が必要であるが、HbV を投与した後に本操作を実施することにより、HbV を代謝する役割を担う細網内皮系への負担軽減が期待できる。

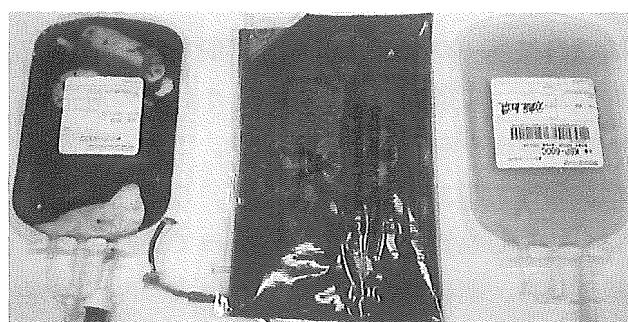


Fig. 4. 血液成分分離装置(Fresenius AS.TEC204)および膜型血漿分離器(プラズマフローOP-02W)により分離した後の赤血球分画(左)、HbV 分画(中央)、および血漿蛋白質分画(右)。

2. Hb 小胞体の投与による有茎皮弁虚血領域の酸素化

A. 研究目的

脳硬塞や心筋梗塞など、血管障害により血流量が低下し低酸素状態に陥った組織細胞を壊死させないためには、酸素供給の回復が先ず必要である。虚血領域への酸素供給は側副経路からの血流に依存せざるを得ないが、血流中に赤血球よりも小粒径の人工赤血球が溶存すれば、酸素供給の向上から虚血の解除が期待できる。H15 年度には、側副経路を有する虚血性低酸素状態にある有茎皮弁モデルをハムスターで作成し、Hb 小胞体(HbV)分散液で血液希釈することにより、酸素化の改善を試みた。その結果、酸素親和度の高い(P_{50} 値の低い)HbV が虚血領域の酸素化に優れていることが明らかになった(Erni et al., 2003)。そこで H17 年度は、Hb を含有しない空の小胞体の比較試験を行い、溶液物性と内包 Hb の効果を明らかにすることを目的とした。本研究は、Dr. Dominique Erni (Inselspital University Hospital, Bern Univ., Switzerland)との共同研究として推進された。

B. 研究方法

Syrian Golden Hamster (65 – 85g, ♂)をネンブタール腹腔内投与(100 mg/kg)により麻酔し、頸動静脈に挿管した。背部皮膚に小動脈と小静脈の対で繋がった有茎皮弁を作成した(Fig. 5)。この小動静脈対は皮弁内で二方向に分岐するが、このうち片方を完全結紮し血流を遮断した。従って遮断した側の組織には、側副経路を経由した血流のみが到達することになる。結紮しない側の血流のある部分を(Anatomically perfused tissue, 血流存在組織)、結紮した側を(Ischemic Part, 虚血組織)とした。

顕微鏡下、有茎皮弁内の微小血管内血流像を観測した。毛細管の血流速度および管径は、モニター上で計測した(CapImage; Zeintl Software)。毛細管壁の透過性は、FITC-Dextran を投与したときの漏

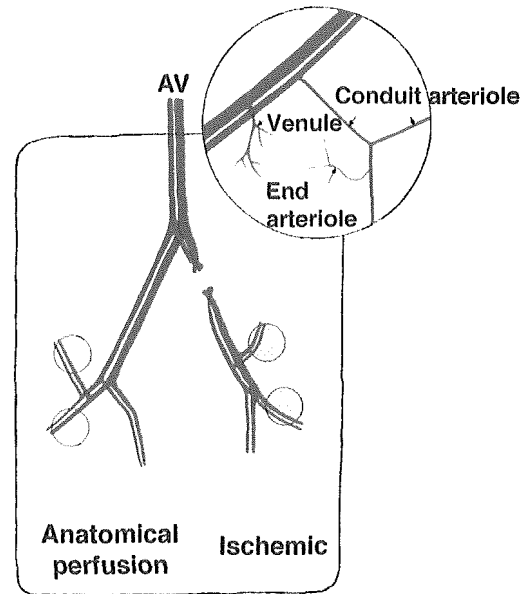


Fig. 5. Schematic representation of the hamster dorsal skin flap model. One branch of the small artery was ligated to prepare ischemic part.

出から判断した。組織酸素分圧は、蛍光色素が先端に付着してある光ファイバー(450 μ m 径, Oxylite probes; Oxford Optronix)を組織内に刺して測定した(蛍光色素: ruthenium-III-(Tris)-chloride; 蛍光寿命を基に、Stern-Volmer 式より算出)。組織細胞の生死判別には、TUNEL 法(transferase-mediated dUTP nick end-labeling)を用いた。

今回は、HbV($P_{50} = 9$ mmHg)について検討した。これを 6%ヒドロキシエチルスターチ溶液(200-0.5, Fresenius 社製; 平均分子量 20 万)に分散させ、Hb 濃度を 7.5 g/dL とした(HbV-HES)。膠質浸透圧は 36 mmHg, 粘度は 11.5cP であった。また、Hb を内包しない空の小胞体の分散液も同様に調節した(V-HES, 膠質浸透圧、36 mmHg, 粘度: 11.5 cP)。HES 単独での膠質浸透圧は 36 mmHg, 粘度は 1.9 cP であった。

ハムスターにはネンブタールを継続的に投与(0.5 mg/min/kg)し、実験中の麻酔を維持した。頸動脈からの脱血と、頸静脈からの投与を同時に 15 分かけて行い、循環血液量の約 33%を HbV-HES (n = 11), V-HES (n = 9), 或は HES (n = 11)で交換した。血液交換後 4 時間まで観察した。また、血液交換せ

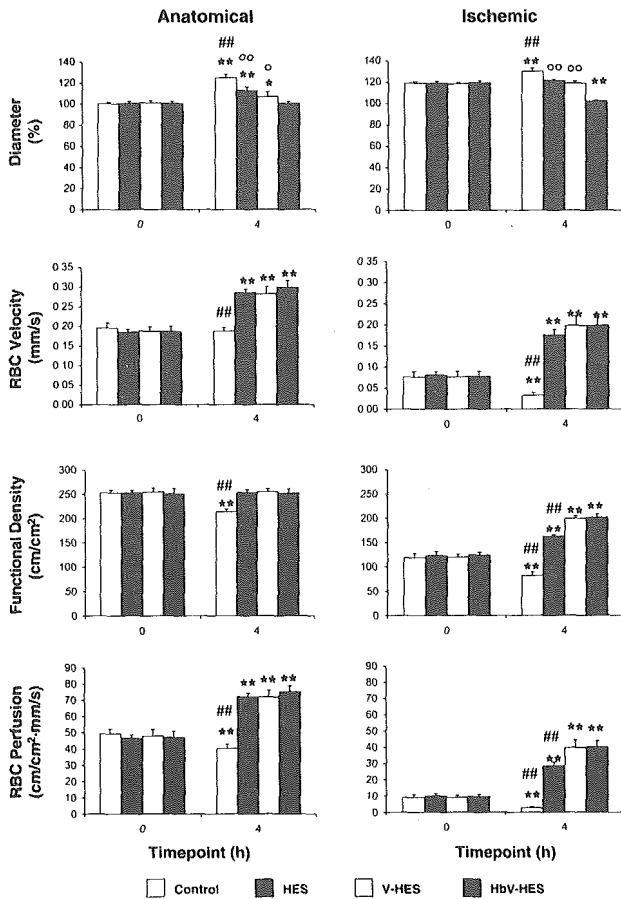


Fig. 6. Capillary hemodynamics in anatomically perfused and ischemic tissues at baseline and 4 h after hemodilution with 6% HES, HbV-HES, and V-HES. Data represent means \pm SD. Values for capillary diameter were expressed in percentages of mean in anatomically perfused tissue of control animals at baseline. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. baseline; ## $P < 0.01$ vs. other groups; ° $P < 0.05$, °° $P < 0.01$ vs. HbV-HES.

ずにもそのまま放置する場合(Control, $n = 11$)についても観察した。

C. 結果

まず、全身動態については、血液希釈による Hct の低下、Hb 濃度の低下およびそれに伴う PaO₂ 値の上昇と PaCO₂ 値の低下が見られる他は、群間で大きな差は認められなかった。また、pH 値には大きな変化が見られなかった。動脈血中酸素含量は、交換前に約 18 mL/dL であったが、HES 群では 12.8 \pm 1.5 mL/dL に低下、V-HES 群も 12.6 \pm 1.3 mL/dL に低下したが、HbV-HES 群では 15.7 \pm 1.2 mL/dL の低下に留まった。

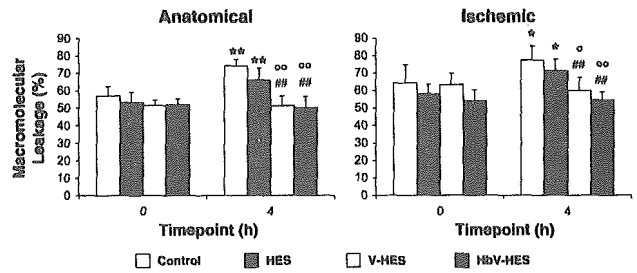


Fig. 7. Macromolecular leakage in anatomically perfused and ischemic tissues at baseline and 4 h after hemodilution with 6% HES, HbV-HES, and V-HES. Data represent means \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. baseline; ## $P < 0.01$ vs. control; ° $P < 0.05$, °° $P < 0.01$ vs. HES.

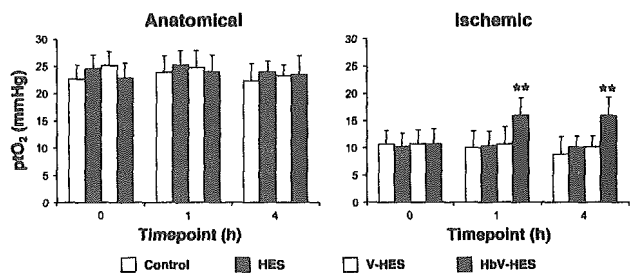


Fig. 8. Partial tissue oxygen tension (P_tO₂) in anatomically perfused and ischemic tissues at baseline and 1 and 4 h after hemodilution with 6% hydroxyethyl starch (HES), HbV-HES, and V-HES. Data represent means \pm SD. ** $P < 0.01$ vs. baseline and other groups.

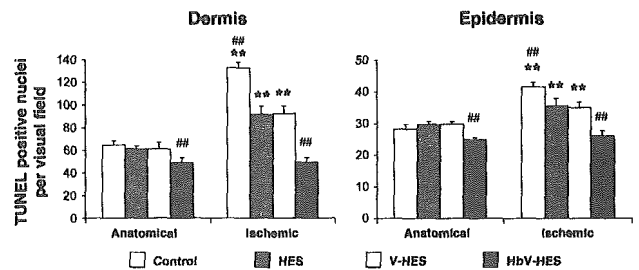


Fig. 9. Density of apoptotic cells in dermis and epidermis of anatomically perfused and ischemic tissues 5 h after completion of surgery and 4 h after hemodilution with 6% HES, HbV-HES, and V-HES. Data represent means \pm SD. ** $P < 0.01$ vs. anatomically perfused tissue; ## $P < 0.01$ vs. other groups.

Fig. 6に毛細管径、赤血球速度、有効毛細管密度 (Functional Capillary Density, FCD)、赤血球流量 (RBC perfusion)の4時間後の変化を記す。血液交換をしない場合、4時間後に炎症反応の生起により毛細管径が増大したが、その程度は血液交換をすることによって低減した。特にHbV-HES群で顕著であった。赤血球流速は、全群の血流存在部位で増

大した。虚血組織では、血液交換をしないと著しい低下を示すが、血液交換により交換前の約3倍に増大した。FCDも血液交換をしないと4時間後に低下傾向にあるが、血液交換により改善された。特に虚血組織において、V-HES群、HbV-HES群で最も高い値を示した。これに伴い、赤血球流量(RBC-perfusion)も虚血組織内でV-HES群、HbV-HES群で最も高い値を示した。

毛細血管壁の透過性の結果をFig. 7に記す。血液交換をしないと、血流存在組織、虚血組織ともに4時間後に顕著な透過性の亢進を示した。V-HES群、HbV-HES群で有意な透過性亢進を抑制する効果が認められた。組織酸素分圧をFig. 8に記す。血流存在組織では変化が無いが、虚血組織では、HbV-HES群のみ有意な酸素分圧の上昇を示した。

Fig. 9に、TUNEL法により検出した壊死細胞数の変化を示した。皮弁作製の時点で、真皮および表皮にある程度の壊死細胞が存在するが、4時間放置すると虚血組織で著しい増大を示した。しかし、血液交換によってこれが低減され、HbV-HES群で壊死細胞数が最も少なかった。血液交換4時間後の血漿層の粘度は、HbV-HES群で 1.67 ± 0.12 cP、V-HES群で 1.74 ± 0.13 cPと高いのに対し、HES群で 1.31 cPであった(血液交換前: 1.34 ± 0.03 cP)。

D. 考察

これまでの研究で、酸素親和度の高い(P_{50} 値の低い)HbVが虚血領域の酸素化に適していることが示唆されたので(Erni et al., 2003)、本研究では、アロステリック因子を含有しないHbV($P_{50} = 9$ mmHg)について検討を行った。Fresenius社のHESは平均分子量が20万と国内のHES(平均分子量7万)に比べ高いので、これにHbV或は空の小胞体を分散させることにより高粘度流体が調製出できた。一般的に血液希釈により血液粘度が低下するので、これ

が血管壁の剪断応力を低減させ、血管生理に悪影響を与えることが知られているので、高粘度流体の投与効果が期待されていた。

今回の実験では、HbVの投与により、有茎皮弁内の虚血組織において、微小循環動態を改善する効果が明確に得られた。HbV、および空の小胞体の存在は、血漿層の粘度の増大を招来し、これが血管壁での剪断応力を生じ、血管機能の恒常性に寄与し、皮弁組織内の血行動態の改善、血管壁透過性亢進の抑制をもたらしたと考えられる。しかし虚血組織酸素分圧の回復および壊死細胞数の低減は空の小胞体では不十分であり、高酸素親和度Hbが内包されたHbVが不可欠であった。

D. 結論

酸素親和度が高く、且つ粘度の高いHbV分散液で血液交換をすることにより、ハムスター皮弁組織内の虚血領域の微小循環動態を改善する効果が得られた。心筋梗塞や脳硬塞モデルでもその有効性が明らかになるものと期待される。

(参考文献) Erni et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H1140-7 (2003).

3. 極度な血液希釈における高酸素親和度Hb小胞体の効果

A. 研究目的

ヒト赤血球の酸素親和度は約28 mmHgである。全身の酸素消費量は、動脈血酸素分圧(110 mmHg)と静脈血酸素分圧(40 mmHg)の間の酸素飽和度較差(A-V較差, ヒト赤血球の場合は25%程度)とHb濃度、それに心拍出量の積として算出される。

Table 1. Laboratory parameters during exchange protocol.

	Baseline	Level 1 HD		Level 2 HD		Level 3 HD	
		rHSA	rHSA	rHSA	rHSA	HbV ₈	HbV ₂₉
<i>n</i>	24	24	24	6	6	6	6
Hct, %	48.8±1.2	28.8±0.8*	18.1±0.7*	11.1±0.8*	11.0±0.5*	11.4±0.6*	11.4±0.6*
Hb, g/dl							
Whole blood	14.8±0.4	9.0±0.5*	5.7±0.3*	3.7±0.4*	5.7±0.2*	5.7±0.3*	5.7±0.3*
Plasma					2.1±0.1	2.1±0.1	2.1±0.1
PaO ₂ , mmHg	59.2±4.6	68.7±5.2	73.5±3.7*	87.5±7.0	77.1±4.3*	76.4±4.4	76.4±4.4
PaCO ₂ , mmHg	49.2±3.6	52.4±6.7	49.0±3.5	42.0±3.2*	53.0±3.9	46.8±4.3	46.8±4.3
Arterial pH	7.35±0.02	7.35±0.03	7.37±0.03	7.38±0.04	7.35±0.03	7.36±0.03	7.36±0.03
HCO ₃ ⁻ , mM	27.9±2.3	28.5±3.5	27.6±2.2	24.8±2.5	28.2±2.6	25.8±2.1	25.8±2.1
BE, mM	3.2±2.0	3.4±2.4	2.9±2.1	-0.2±1.9*	3.1±1.7	1.0±2.0	1.0±2.0

Values are means ±SD. Baseline values include all animals in the study. No significant differences were detected between the baseline values of each group or between the values after level 1 and level 2 exchange before the exchange with test solutions.

さて、赤血球から精製単離した Hb の P₅₀ は、8 mmHg 程度と低く、静脈血酸素分圧(40 mmHg)では到底酸素を放出しないので、Hb を利用する人工赤血球の P₅₀ も、赤血球と同等あるいはそれ以上に調節すべき、と考えられてきた。しかし粒子径は赤血球(8 μm)に比べ極めて小さいので、酸素結合-解離が赤血球より極めて速いこと、また、赤血球は微小血管の中心側を流れ、管壁近傍に形成される血漿層が酸素拡散の障壁となるのとは対照的に、人工赤血球は血漿層に均一分散し血管壁近傍を流れるので、酸素を組織に放出し易い状態にある。酸素供給過多は微小循環悪化の原因ともなるので、Hb を利用する人工赤血球の酸素放出速度と流動様式が赤血球と異なるのであれば、その最適 P₅₀ は必ずしも赤血球と同じが良いとは言えないかも知れない。そこで、極度の血液希釈をした貧血状態におけるハムスターの末梢組織内血流動態に対する P₅₀ 値の異なる Hb 小胞体(HbV)の投与効果について、ハムスター背部皮下微小循環動態観測モデルを用いて実験的に明らかにすることを目的とした。本研究は、Prof. Marcos Intaglietta (Dept. Bioengineering, University of California, San Diego) との共同研究として実施された。

B. 方法

微小循環動態を非侵襲・無麻酔により直接観測する方法(Conscious hamster dorsal skinfold window

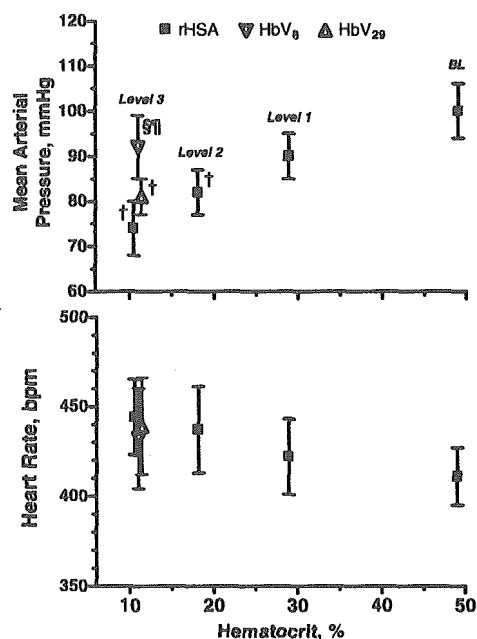


Fig. 10. Mean arterial blood pressure and heart rate [in beats/min (bpm)] at baseline (BL) (Hct 49%) and level 1 (Hct 29%), level 2 (Hct 18%), and level 3 (Hct, 11%) hemodilutions. Level 1 and level 2 exchanges were performed with 5% rHSA as diluent. Level 3 exchange was used to evaluate the oxygen transport of HbV₈ vs. HbV₂₉ and rHSA. *P* < 0.05 relative to baseline; *P* < 0.05 relative to level 3 rHSA; ¶ *P* < 0.05, level 3 with HbV₈ vs. level 3 with HbV₂₉.

model)を使用した。Syrian Golden Hamster (雄、体重 55-65g)の背中 of 皮膚に直径 1cm の硝子窓を取り付け、外科的侵襲の影響を無くす為に3日以上経過後、頸動脈、頸静脈に挿管し、これを頸部皮下経由で背部より取り出して固定した。実験は1日経

過後に実施した。頸動脈より脱血と採血、血圧測定、頸静脈より投与を行った。CCDカメラ搭載倒立顕微鏡にて得られた画像を基に、管径を画像剪断法にて、また血管中央の赤血球流速はフォトダイオード相関法にて測定した。また、血管内および組織酸素分圧の測定は、燐光色素(bovine albumin/Pd-meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphyrin 複合体)を投与し、組織内を局所的に励起した際の燐光寿命の酸素分圧依存性を利用した。燐光はフォトマルにて検出し、消光曲線を一次指数関数として外挿し、Stern-Volmer式から pO_2 を算出した。

HbV は、酸素親和度の異なる 2 種類について検討した。P₅₀ 値が 29 mmHg の HbV (HbV₂₉) には、アロステリック因子として pyridoxal 5'-phosphate が Hb に対し 2.5 倍モル内包されている。他方、P₅₀ 値が 8 mmHg の HbV (HbV₈) には、アロステリック因子を添加していない。両者ともに生理食塩水に分散させてあり ([Hb] = 10 g/dL)、膠質浸透圧を調節する為に 25%-リコンビナントアルブミン溶液(rHSA) を添加し、膠質浸透圧を約 20 mmHg に調節した。結果として分散液の Hb 濃度は、8.6 g/dL になった。

先ず 5%-rHSA を用いてハムスターの循環血液量

の 40%の血液希釈(Level 1)および 35%の血液希釈 (Level 2)の二段階を行い、Hct 値を約 49%から約 18%に低下させた。その後、HbV を rHSA に分散させた溶液或は rHSA 単独で 35%の血液希釈を行い (Level 3)、Hct 値を約 11%にまで低下させた (n = 6)。この過程での血液ガス組成、微小循環動態の観測を行った。更に、および酸素結合解離曲線から、細動脈、細静脈内中の赤血球および HbV の酸素飽和度を得て、Hb 濃度、血流速度から酸素運搬量および酸素消費量を算出した。

C. 結果

Table 1 に Hct, Hb 濃度、血液ガス組成を示す。Hct は最終的に約 11%にまで低下したが、HbV₈, HbV₂₉ 群は、Hb 濃度が約 5.7 g/dL となり、rHSA 群の 3.7g/dL よりも高い状態にある。血液ガス組成では、rHSA 群が顕著な過呼吸状態となり、PaO₂ の上昇、PaCO₂ の低下、そして BE の低下が顕著であるが、HbV₈, HbV₂₉ 群ともに rHSA 群に比較してこれらの変化が軽減されていた。Fig. 10 に血圧と心拍数の変化を示す。Level 3 の血液希釈後、rHSA 群、HbV₂₉ 群では血圧の低下が見られたが、HbV₈ 群で

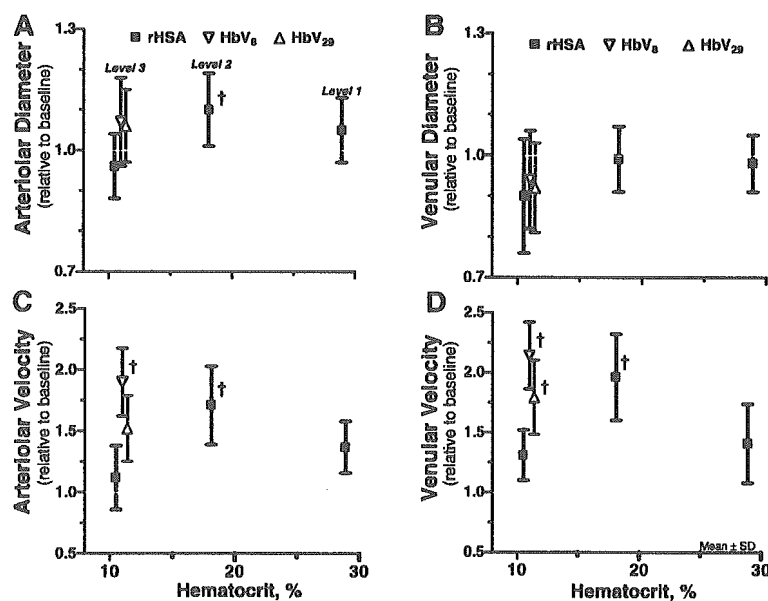


Fig. 11. Changes relative to baseline in arteriolar and venular hemodynamics at the level 1, level 2, and level 3 exchanges. Dashed lines represent baseline level. $P < 0.05$ relative to baseline. Arteriolar (A) and venular (B) diameters (μm , means \pm SD, $n =$ no. of vessels studied) in each animal group were as follows. Baseline: arterioles (A), 61.2 ± 10.2 , $n = 80$; venules (V), 62.0 ± 12.3 , $n = 80$. Arteriolar (C) and venular (D) RBC velocities (mm/s, means \pm SD) in each animal group were as follows. Baseline: A, 4.9 ± 1.3 ; V, 1.7 ± 0.5 .

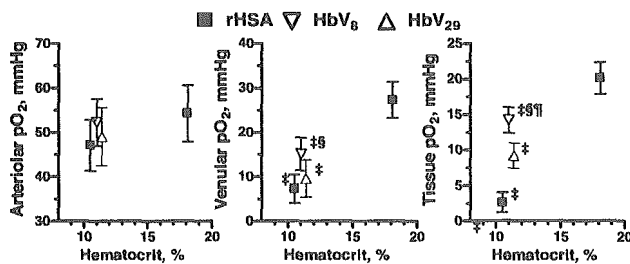


Fig. 12. Intravascular PO_2 after the level 2 and level 3 hemodilutions. Values are presented as means \pm SD. $P < 0.05$ compared with level 2 with rHSA; $P < 0.05$ compared with level 3 with rHSA; $\ddagger P < 0.05$, level 3 with HbV₈ vs. level 3 with HbV₂₉.

は維持される傾向を示した。微小循環動態(Fig. 11)では、血管径の変動は僅かで群間に相違は無かった。Level 2 までの血液希釈により心拍出量の増大に呼応して微小血管内の赤血球の流速が増大しているが、その後 Level 3 の血液希釈では rHSA 群、HbV₂₉ 群で顕著な低下が認められた。しかし、HbV₈ 群では維持される傾向が認められた。局所酸素分圧(Fig. 12)では、細動脈、細静脈内の酸素分圧は全群ともに低下傾向にあった。細動脈内酸素分圧は群間に有意差は無かったが、細静脈内酸素分圧では、HbV₈ 群が最も高い酸素分圧を示した。また、組織内酸素分圧では、HbV₈ (14.0 ± 2.2 mmHg) > HbV₂₉ (9.2 ± 2.7 mmHg) > rHSA (2.6 ± 1.4 mmHg) の順であった。Fig. 13 に Level 3 の血液希釈後の微小循

環系への酸素運搬量と酸素消費量の変化を示した。rHSA による血液希釈では赤血球量が低下するので、酸素運搬量は低下するが、HbV₈, HbV₂₉ 群ともに維持する傾向が認められた。特に HbV₈ 群では、細動脈内酸素分圧における酸素飽和度が高いので、Level 2 と同等の酸素運搬量を維持した。酸素消費量については、rHSA 群では顕著な落ち込みが見られたが、HbV₈, HbV₂₉ 群ともに Level 2 と同等の値を維持していた。

D. 考察

本研究で得られた最も重要な知見は、HbV₈ で血液希釈した方が HbV₂₉ の場合よりも皮下組織酸素分圧が高いとの結果にある。この第一の要因は、極度の血液希釈に対しても血圧が高く維持され、そして今回は測定をしていないが恐らく心拍出量も高い値を維持し、それによって皮下組織血流が増大したと考えられる。末梢血流速度の増大は酸素供給量の増大と代謝産物の washing out 促進に寄与し、事実 BE も高く維持されている。極度な血液希釈において、酸素消費量の多い心臓のような臓器では、組織酸素分圧が著しく低下していると推定されるが、このような状態でも HbV₈ は HbV₂₉ よりも酸素を途中で放出せずにより確実に必要と

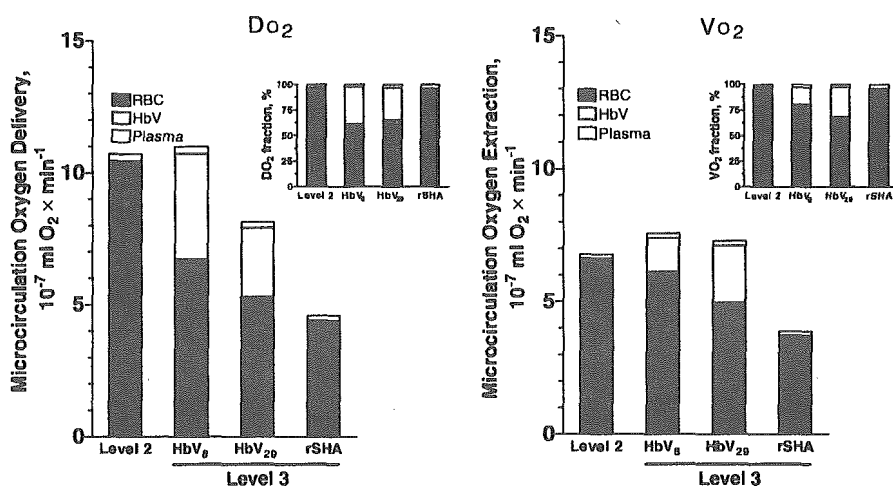


Fig. 13. Arterial oxygen delivery (DO_2) and extraction (VO_2) before and after the level 3 hemodilution. Calculations of global oxygen transport are not directly measurable in our model; however, the changes relative to baseline can be calculated using the measured parameters. These calculations can be identified as those presented without standard deviations to focus on their tendencies rather than on the variability of the measurement.

される場所にまで酸素を運搬し、また小粒子径のため血漿層に均一に分散しているので酸素を組織に均等に供給でき、心機能(血圧と心拍出量)が保持されているものと考えられる。

Hbを用いる人工赤血球に求められる機能は、酸素運搬することだけでなく、血行動態を正常に維持させることである。この点でHbV₈はHbV₂₉に比較して優れていると言える。但し、今回の実験は臨床的にはあり得ない、極度の血液希釈における結果であり、全身的な虚血状態に陥っているためにHbV₈が酸素を運搬、放出するために十分なA-V較差があったことが寄与したとも言える。従って、適応によってHbVの最適P₅₀値が存在するものと考えられた。

また、細動脈、細静脈ともに管径に変化が無いことから、細胞型のHbVには血管収縮作用が無いこと、そしてこれがP₅₀とは関係が無いことが再確認できた。

E. 結論

極度な血液希釈において、酸素親和度の高い(P₅₀値が低い)HbVが血行動態の維持と組織酸素分圧の向上に有効であることがハムスター皮下微小循環動態の観測から明らかになった。また、HbVが血管収縮を生起しないことを再確認できた。

4. L-Tyrosineを基質としたメトヘモグロビンによるH₂O₂消去機構の解析

A. 研究目的

中心鉄が3価であるメトヘモグロビン(metHb, Hb(Fe³⁺))は、酸素を可逆的に結合する機能が失活した酸化状態であるが、H₂O₂と反応すると中心鉄が4価のラジカル状態であるferrylHbラジカルとなる。本研究では、ferrylHbラジカルのL-チロシン(L-Tyr)に対するペルオキシターゼ活性を利用したmetHb

への還元機構について詳細解析を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1. L-Tyr添加metHbによるH₂O₂消去とL-Tyrの変化

5 μM metHb溶液([heme] = 20 μM, PBS(pH7.4))にL-Tyr(0, 500 μM)を添加した。この溶液に500 μM H₂O₂([heme]/[H₂O₂] = 1/10)を37 °Cにて添加し、溶液を経時的に採取後、horseradish peroxidase法により残存H₂O₂濃度を定量し、また同時にL-Tyrを定量した。

2. ferrylHbラジカルの調製

metHb溶液にH₂O₂を添加し([metHb] = 50 μM, [H₂O₂] = 500 μM, PBS (pH7.4))、120秒間攪拌し即座に氷冷後、GPC(SephadexG-25)にて4 °CでferrylHbラジカルを単離した。この溶出液をUV-visスペクトルにて測定した。また、単離したferrylHbラジカルを25 Kにて、ESR測定から検出した。

3. ferrylHbラジカルとL-Tyr、或はH₂O₂との反応

単離したferrylHbラジカル(2 μM)を4, 37 °Cにて2分間隔でUV-visスペクトルの連続測定を行った。またL-Tyr(500 μM)、あるいはH₂O₂(8 μM)共存系のferrylHbラジカルについても同様に測定した。更に、単離したferrylHbラジカル(250 μM)にL-Tyr(4 mM)、あるいはH₂O₂(1 mM)を添加し、4 °Cにて反応させた反応液を経時的に採取し、液体窒素にて即座に凍結後、25 Kの条件にてESR測定を行った。H₂O₂添加系はあらかじめferrylHbラジカル溶液にシアン化カリウムを添加した系で測定を行った。

C. 結果及び考察

1. L-Tyr / metHbによるH₂O₂消去とL-Tyrの変化

1 mM L-Tyrを添加したmetHb溶液は約15分で完全にH₂O₂を消去した。更に、添加したL-Tyrは、

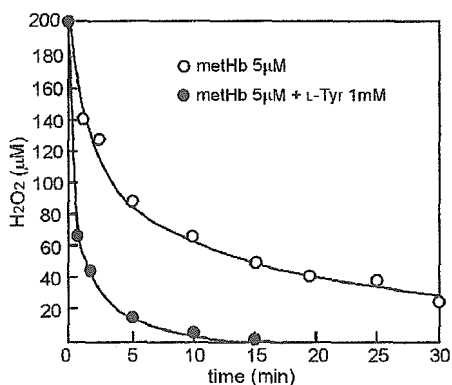


Fig. 14. H_2O_2 elimination activity of metHb (5 mM) in the presence of L-Tyr.

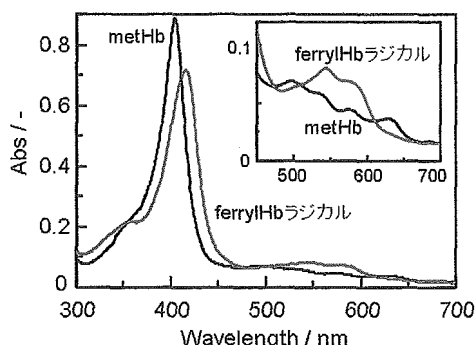


Fig. 15. UV-vis spectrum of (—) metHb and (---) ferrylHb radical after isolation.

HPLC 測定により時間とともに消費されることが確認された(Fig. 14)。また、反応系から L-Tyr の 2 量体の生成が確認されたことから、この H_2O_2 消去は L-Tyr を基質とした ferrylHb ラジカルのペルオキシターゼ活性によって metHb へと還元されたことが明らかとなった。

2. ferrylHb ラジカルの調製と安定性

metHb に H_2O_2 を添加して GPC にて溶出した液では、metHb の Soret 帯の λ_{max} である 405 nm のピークが 417 nm にシフトした。また、metHb に特有

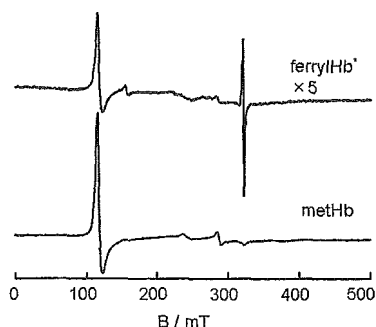


Fig. 16. ESR spectrum of isolated metHb and ferrylHb radicals.

の 630 nm のピークが完全に消失した。これより、ferrylHb ラジカルの単離が確認された(Fig. 15)。また、ESR においても ferrylHb ラジカル特有の 320 mT のシグナルが確認されたことから、ferrylHb ラジカルの生成が確認された(Fig. 16)。しかし、metHb 由来の 110 mT のピークも残っており、自動還元により僅かに metHb が共存していた。

次に、単離した ferrylHb ラジカルを 4, 37°C にて 2 分間隔で UV-vis スペクトルの連続測定を行った。417 nm (ferrylHb ラジカル) のピークは 4, 37°C いずれにおいても自動還元により 405 nm (metHb) にシフトした。変換速度は 4°C よりも 37°C の方が速かった(Fig. 17)。

3. ferrylHb ラジカルと L-Tyr 或は H_2O_2 との反応

単離した ferrylHb ラジカルに PBS を添加した系では、攪拌時間に関係なくほぼ同様のスペクトルが得られた(Fig. 18a)。他方、単離した ferrylHb ラジカルに L-Tyr を添加した系の ESR スペクトルでは時間の経過とともに ferrylHb ラジカルのラジカルに由来する 320 mT のシグナルが弱くなり、3 価の metHb に由来する 110 mT のシグナルが強くなった(Fig. 18b)。これらの結果より、ferrylHb ラジカルから metHb への還元反応が L-Tyr の添加により生起するペルオキシターゼ活性により速やかに進行していることが明らかとなった。また、単離した ferrylHb ラジカルは安定であった。

ferrylHb ラジカルにヘムと等量の H_2O_2 を添加した系(Fig. 18c)においては、320 mT の ferrylHb ラジカルの変化は、PBS を添加した系(Fig. 18a)と比較

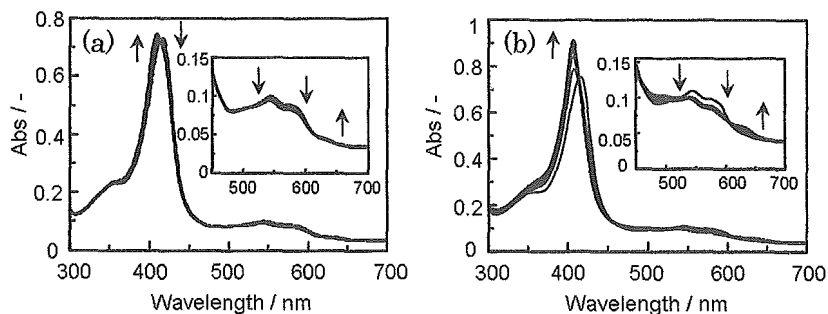


Fig. 17. UV-vis spectrum of isolated ferrylHb radicals at (a) 4°C (b) 37°C.

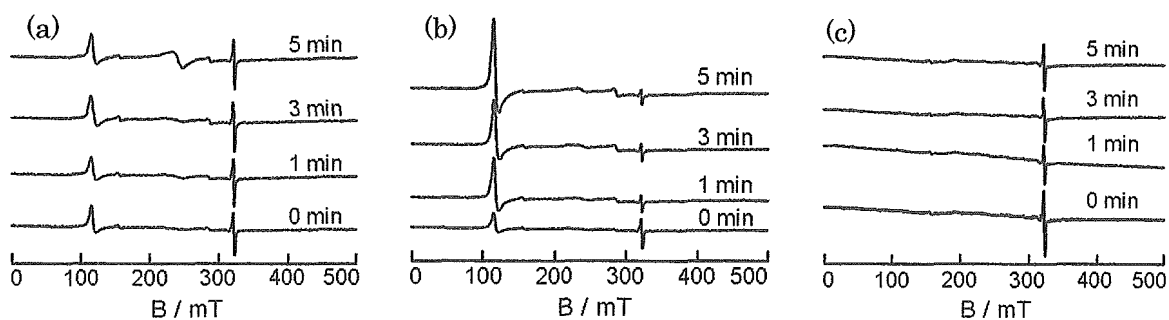


Fig. 18. ESR spectrum of isolated ferrylHb radical mixed with (a) PBS (control) (b) L-Tyr, and (c) H₂O₂.

して、僅かな減少が確認された。また、metHb の 110 mT が消失しており、優先的に metHb が ferrylHb ラジカルへと変換されていた。この結果より、H₂O₂ による ferrylHb ラジカルの metHb への還元は、本実験では観測されなかった。

この結果を受けて、ferrylHb ラジカルにヘムと等量の H₂O₂ を添加した UV-vis スペクトルの連続測

動還元を示すが、H₂O₂ 存在下では変性の方向に進むことが明らかとなった。この結果より、Fig. 18c におけるラジカルの減少は、自動還元および、ferrylHb ラジカルの変性によるものと推測される。他方、ferrylHb ラジカルに L-Tyr を添加した系 (Fig. 19b) では、ペルオキシターゼ活性による metHb への速やかな還元を示した。

よって、H₂O₂ 存在下では ferrylHb ラジカルは非常に不安定であり、L-Tyr などの適当な基質が存在することによって 3 価へと安定に還元されることが示された。生体内で常時 H₂O₂ に曝露され、ferrylHb ラジカルが存在する HbV 内への L-Tyr の内包は、met 化抑制効果のみならず、H₂O₂ の消去や、小胞体内における Hb 変性における様々な悪影響を回避する手段となり得る可能性が高いことも同時に示唆された。

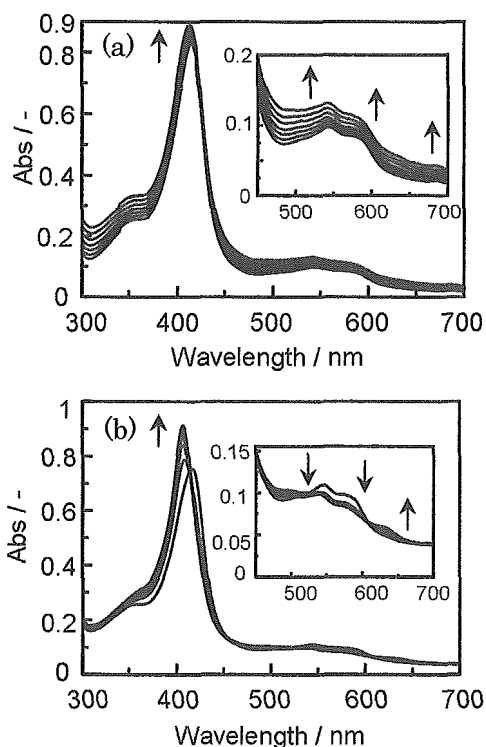


Fig. 19. UV-vis spectrum of isolated ferrylHb radical mixed with (a) H₂O₂ (b) L-Tyr.

定結果を示す (Fig. 19a)。この結果と Fig. 16a に示した PBS 添加のコントロール系を比較すると、H₂O₂ 添加系における 700 nm の吸光度上昇から、Hb の変性が確認された。これらの結果から、ferrylHb ラジカルは単離した状態では、緩やかな 3 価への自

D. 結論

metHb に L-Tyr を添加することで、安定に H₂O₂ が消去されることが確認できた。この機序を明らかにするため、ferrylHb ラジカルの単離法を確立、ESR 測定と UV-vis スペクトル測定より、ferrylHb ラジカルは H₂O₂ 存在下では変性の方向に進行するが、L-Tyr を共存させることにより、自動還元とは異なる機構で安定に、かつ速やかに metHb へと還元できることが明らかとなった。この metHb/L-Tyr 系を HbV に内在させることにより、H₂O₂ を効率的に消去し、Hb のメト化を大幅に抑制できることが明らかとなった。

5. ポリエチレングリコール(PEG)修飾アルブミン-ヘムの合成、物性と酸素結合

A. 研究目的

合成ヘム(FecycP)をヒト血清アルブミン(HSA)に包接させたアルブミン-ヘム複合体(HSA-FecycP)は、生理条件下で酸素を可逆的に結合解離できる人工酸素運搬体である。酸素親和性はヒト赤血球と同等、2年間の室温保存が可能で、血液適合性も高く、出血ショックモデル(ラット、ビーグル犬)を用いた蘇生試験から生体内酸素輸送効果が実証されている¹⁻³⁾。他方、アルブミン-ヘムの機能改善としては、ヘム血中滞留時間の延長があった。合成ヘムはアルブミンに疎水性相互作用で結合しているため、血流中へ投与した場合、他のリガンドとの交換、血清アルブミンへの移行などにより、ヘムが徐々にアルブミンから脱離する。

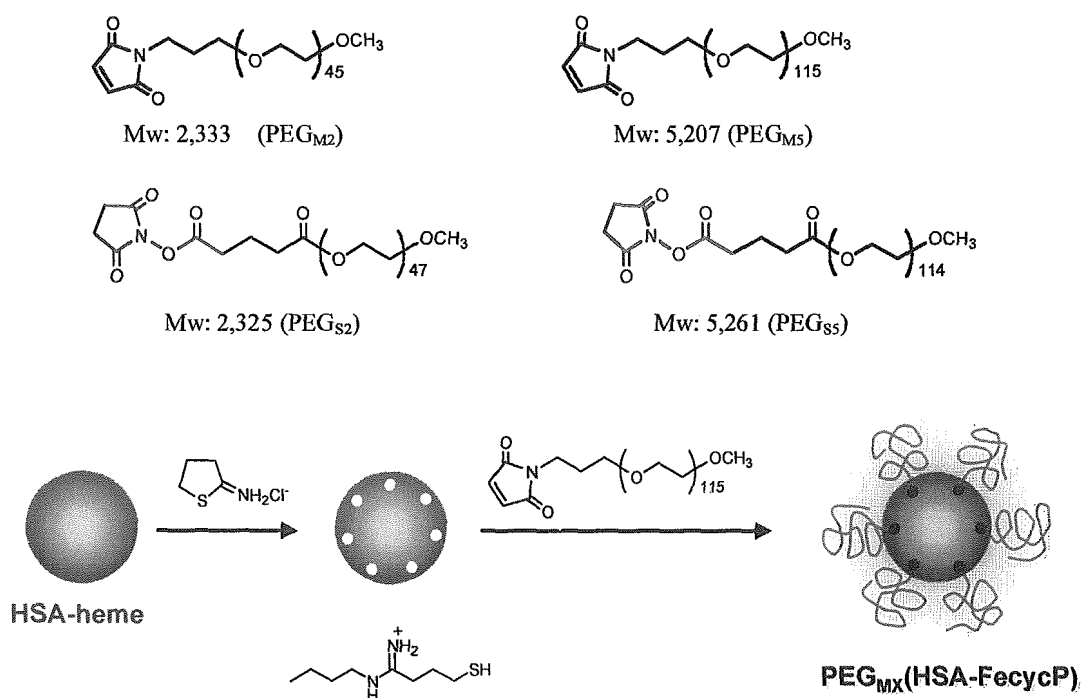
そこで本年度は、アルブミン-ヘム投与後のヘム血中滞留時間の延長を目指して、ポリエチレングリコール(PEG)誘導体による表面修飾効果を検討

した。従来法により調製したアルブミン-ヘムの分子表面にできるだけ簡便な方法でPEG鎖を導入し、その構造と溶液物性を明らかにするとともに、酸素結合能(酸素親和性、酸素結合解離速度定数)を測定、PEGの分子量、結合様式との関連を解明した。また、ラットへ投与した後のヘム血中消失半減期を測定し、PEGの分子量、結合様式との相関を明確にした。

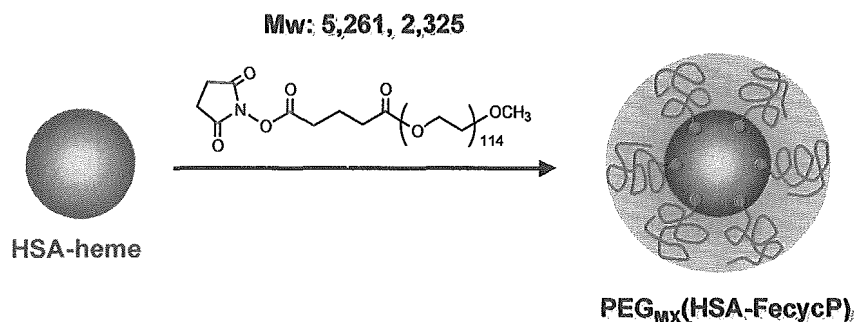
B. 実験方法

1. PEG鎖の導入方法

PEG誘導体をアルブミン表面に導入するには、Lys残基への結合が一般的である。その場合、二通りの方法があり、一つはイミノチオランでLys残基にチオール基を構築後、片末端マレイミドメトキシPEG(以下PEG_{MX}と略す)を結合させる方法、もう一つはLys残基へ直接片末端スクシンイミドメトキシPEG(以下PEG_{SX}と略す)を結合させる方法である。そこで、本研究では次の4つのPEG誘導体を選定し、HSA-FecycPへの結合を検討した。



Scheme 1 Modification procedure of HSA-FecycP by maleimido-PEG with IMT.



Scheme 2 Modification procedure of HSA-FecycP by succinimido-PEG.

片末端マレイミドメトキシ PEG の導入は、**Scheme 1** に従って行った。48 mL の HSA-FecycP 水溶液 ([rHSA]: 5 wt%, [FecycP]: 3 mM, pH 7.3) に 72 mg の Iminothiolane hydrochloride (IMT、Toronto Research Chemicals Inc.) ([HSA]/iminothiolane = 1/15, mol/mol) を添加し、室温、遮光下で 3 時間ゆつくりと攪拌した。続いて 1.44 g の PEG_{M2} (日本油脂、分子量 2,000) ([HSA]/[PEG_{M2}]=1/20, mol/mol) を加え、さらに 2 時間攪拌した。反応終了後、溶液を限外ろ過装置 (ADVANTEC UHP-76K with a Q0500 076E membrane (cut-off MW 50 kDa)) を用いて、600 mL 以上の PBS (pH 7.3, 窒素下) で洗浄した。最終的に溶液量を 48 mL に調整、フィルター濾過 (0.45 μM, DISMIC 25CS045AS) 濾過して、PEG_{M2}(HSA-FecycP) 水溶液を得た。PEG_{M5}(HSA-FecycP) も同様な方法により調製した。

末端スクシンイミドメトキシ PEG の導入は、**Scheme 2** に従って行った。48 mL の HSA-FecycP 水溶液 ([rHSA]: 5 wt%, [FecycP]: 3 mM, pH 7.3) に 0.72 g の PEG_{S2} を加え、2 時間攪拌した。反応終了後、上記と同様な処理を行い、PEG_{S2}(HSA-FecycP) 水溶液を得た。PEG_{S5}(HSA-FecycP) も同様な方法により調製した。

2. ヘム濃度、アルブミン濃度の定量

PEG(HSA-FecycP) 水溶液中のヘム濃度は、ICP 測定 (inductively coupled plasma spectrometry (ICP)、Seiko Instruments SPS 7000A Spectrometer) により定量した鉄イオン濃度を用いて算出した。

一方、PEG(HSA-FecycP) のアルブミン濃度は、CD スペクトル測定 (JASCO J-725 spectropolarimeter) により楕円率度を決定、208 nm における HSA のモル楕円率 ($[\theta]$: -18.9×10^3 (deg cm² dmol⁻¹)) を用いて算出した。

3. PEG 修飾アルブミン-ヘムの分子量測定

MALDI-TOFMS 質量分析測定 (Matrix Associated Laser Desorption Ionization (MALDI)-Time of Flight Mass Spectrometry (TOFMS)、SHIMADZU/KRATOS AXIMA-CFR、S/W Version 2、Shimadzu Co.) により、分子量を測定した。

4. 酸素結合能測定

得られた PEG 修飾アルブミン-ヘム(CO)錯体水溶液を酸素雰囲気下で照射すると、CO が O₂ に置換され、oxy 体が得られた。さらに窒素を通気して deoxy 体変換した。異なる酸素分圧に対する可視吸収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。また、酸素結合解離速度定数 (k_{on} 、 k_{off}) はレーザーフラッシュホトリシス法により決定した。

5. ヘム血中滞留時間の測定

ジエチルエーテル麻酔下のラット (Wistar、雄) に尾静脈から PEG(HSA-FecycP) 水溶液 ([HSA]=5 wt% (0.75 mM)、[FecycP]=3 mM、pH 7.4) を投与した。投与量は全血量 (64 mL/kg) の 20% 相当 (ラット 300 g の場合、3.84 mL、1 mL/min)。各群 n=4。

投与後 3、30 分、1、2、4、8、16、24、48、72 時間(計 10 時点)に、ジエチルエーテル麻酔下、尾静脈より採血を行った。採取した静脈血は、ヘパリンリチウムコーティング微量採血管に入れ、遠心分離 (3000 rpm, 10 分, 4°C) 後、血漿相の FecycP 濃度を ICP により測定した。

C. 結果および考察

1. チオール基の定量による PEG 結合本数の算出

HSA-FecycP 一分子に結合した PEG 鎖の本数を算出する方法としては、次項で述べる質量分析が確実であるが、片末端マレイミドメトキシ PEG の場合には、蛋白質表面に存在するチオール基の定量によって簡便に見積もることができる。

PEG 修飾の前後における分子表面 SH 基の数を 2,2'-dithiopyridine (2,2'-DTP) を用いて定量すると、両者の差分が PEG 鎖の結合本数に相当する。HSA-FecycP に対する IMT 仕込み比を変化させることにより (HSA-FecycP に対する PEG_{Mx} 量は一定 (20 倍モル))、一分子当りの表面 PEG 本数を調節できることが明らかとなった (Table 2)。PEG_{M2} が分子表面に平均 6 本結合したものを PEG_{M2-6} と表示する。

2. MALDI TOFMS による分子量測定

PEG 修飾アルブミン-ヘムの分子量は、MALDI TOFMS により決定することができる。HSA のみの測定値と理論分子量(66451.2)の誤差が、0.1%以内

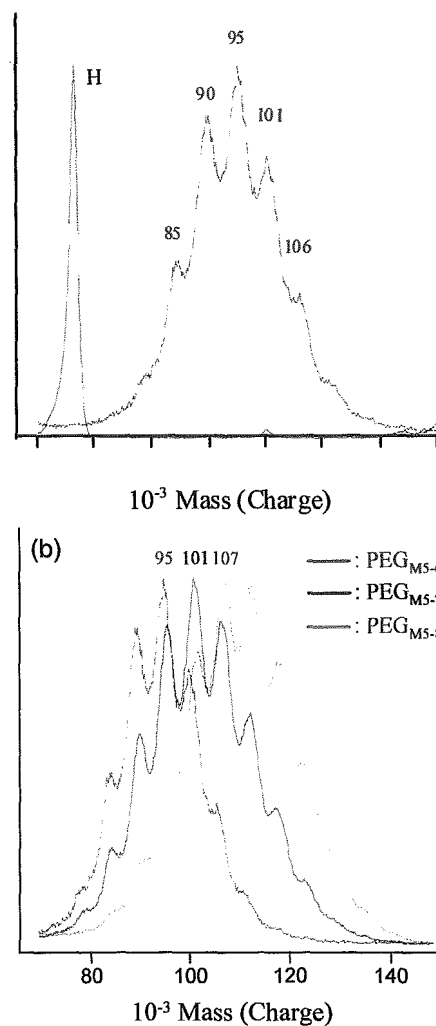


Fig. 20 MALDI TOFMS spectra of PEG_{M5} (HSA-FecycP). (a) PEG_{M5-6}(HSA-FecycP), (b) PEG_{M5-6}(HSA-Fecyc P), PEG_{M5-7}(HSA-Fecyc P) and PEG_{M5-8}(HSA-FecycP).

Table 2. A mean of thiol groups per HAS-FecycP molecule and binding number of the PEG chains.

PEG	[IMT]/[HSA-FeP]	SH groups per HSA			Averaged PEG number from MS
		After IMT (A)	After PEG binding (B)	A-B	
PEG _{M2}	10	5.6	0.5	5.1	4.6
	15	6.6	0.9	5.7	5.7
	20	8.3	1.1	7.2	6.6
PEG _{M5}	15	6.7	0.6	6.1	5.9
	20	8.0	0.9	7.1	7.2
	30	9.3	1.1	8.2	8.3

であることから、本測定による分子量算出の妥当性を確認した。分子量 5,000 の PEG を結合させた場合、各ピークの幅が 5,000 づつ等間隔に観測され、間違いなく PEG 鎖がアルブミン-ヘムに結合していることがわかった (Fig. 20)。

MALDI TOMS のピーク分子量に FecycP の分子量が含まれているかどうかは重要である。SH 基の定量により PEG 鎖結合本数を決定した試料について、MS スペクトル測定を行い、PEG 鎖の結合本数を算出したところ、そのピーク分子量には FecycP の分子量が含まれないことがわかった。つまり、イオン化過程において、FecycP は HSA から脱離するものと推測される。これは従来、HSA-FecycP の MS スペクトル測定においても、観測されていた。PEG 鎖の平均結合本数 N は式 (1) により算出できる (Table 2)。

$$N = (\text{最大ピークの質量数} - 66,500) / \text{PEG 分子量} \quad \text{式 (1)}$$

前述のように PEG_{MX} の場合、HSA に対する IMT の量を 10~20 (mol/mol) で変化させると、PEG_{M2} の分子量 (2,000 or 5,000) によらず、IMT 量に依存して結合本数が増大することがわかった (Table 2)。PEG_{SX} の場合、HSA に対する PEG_{SX} の量を 10~30 (mol/mol) と変化させると、PEG_{S2} の場合は PEG 量に依存せず結合本数は常に 6 本、PEG_{S5} では PEG

量に依存し結合本数が増大した。

3. 比重・粘度測定、コロイド浸透圧 (COP)

得られた PEG(HSA-FecycP)水溶液 ([rHSA]= 5 wt%、[FecycP]=3 mM) について、溶液の比重及び粘度測定を行った (Table 3)。分子量 5,000 の PEG 鎖を結合した場合、粘度は 2.30~2.34 まで上昇した。

PEG 修飾ヘモグロビン (Hb) の特徴は COP の上昇にある。Hb の場合、分子径を大きくする必要があり、PEG_{M5} を使用せねばならない。アルブミン-ヘムの場合、血管からの逸脱はなく、分子量の大きな PEG を使用する必要はないので、できるだけ低い分子量の PEG でヘム血中滞留時間の延長ができれば、それで充分と考えられる。

PEG(HSA-FecycP)溶液 ([rHSA]= 5 wt%、[FecycP]=3 mM) の COP 測定の結果を Table 3 に示す。分子量 5,000 の PEG_{M5} や PEG_{S5} を 6 本結合した HSA-FecycP の COP は 45~65 mmHg まで上昇した。これに対し、分子量 2,000 の PEG_{M2} や PEG_{S2} を 6 本結合した HSA-FecycP の COP は 22~27 mmHg に留まり、未修飾 HSA-FecycP の 21 mmHg に近い値を示した。

溶液物性値から判断すると、生体内へ投与した際、PEG_{M2} や PEG_{S2} による表面修飾でヘムの解離が抑制できるのであれば、分子量 5,000 の PEG を用いるよりも適当であると思われる。

Table 3. Solution properties of PEG(HSA-FecycP) solutions. [rHSA]: 5 wt%.

PEG(HSA-FecycP)	Density (g/cm ³)	Viscosity (cP)	COP (mmHg)
PEG _{M2-5} (HSA-FecycP)	1.01	1.08	22
PEG _{M2-6} (HSA-FecycP)	1.01	1.14	27
PEG _{M2-7} (HSA-FecycP)	1.01	1.17	28
PEG _{M5-6} (HSA-FecycP)	1.01	2.34	65
PEG _{S2-6} (HSA-FecycP)	1.01	1.14	22
PEG _{S5-6} (HSA-FecycP)	1.01	2.30	45
HSA-FecycP	1.01	1.05	21
HSA	1.01	1.00	21

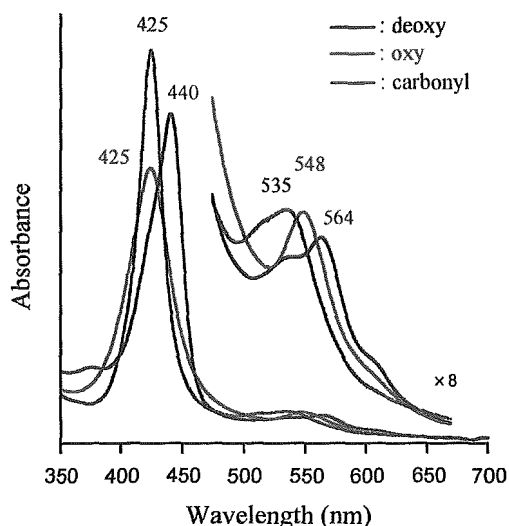


Fig. 21 UV-vis. absorption spectral changes of PEG_{M2-6}(HSA-FecycP) in phosphate buffer (pH 7.3) at 25 °C.

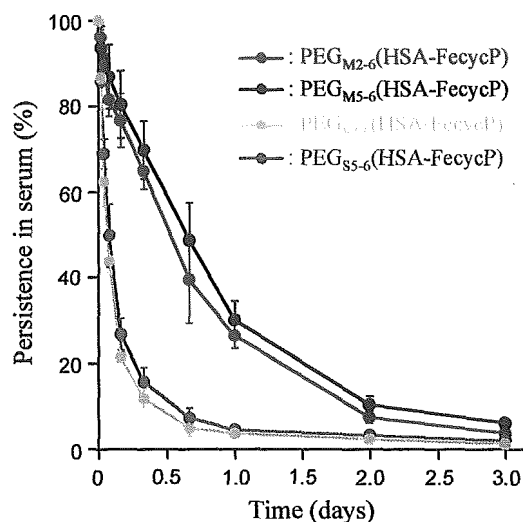


Fig. 22 Circulation persistence of heme after infusion of PEG(HSA-FecycP) to rats (20% of the whole blood volume, top-load). Each value represents the mean \pm S.D. of 4 rats.

4. 酸素結合能

PEG_{M2-6}(HSA-FecycP)溶液のUV-visスペクトル変化を **Fig. 21** に示す。PEG 修飾アルブミン-ヘムのスペクトルパターンや最大吸収波長は、未修飾体と変わらず、PEG 鎖で分子表面を被覆しても、活性中心であるヘムの電子状態に変化はないことがわかった。

得られた PEG(HSA-FecycP)の P_{50} 、 k_{on} 、 k_{off} を **Table 4** にまとめた。PEG の分子量、結合様式によらず、酸素親和性に大きな違いは見られなかったが、 k_{on} 、 k_{off} 値は若干低下する傾向にあった。

5. 血中消失半減期 ($\tau_{1/2}$)

PEG(HSA-FecycP)を、ラットに静脈内投与した後の血漿中 FecycP の濃度推移を **Fig. 22** に示す。興味あることに、 $\tau_{1/2}$ は PEG の分子量に関係なく、結合様式に依存して変化した。つまり PEG_{M2} や PEG_{M5} で修飾した場合、FecycP の $\tau_{1/2}$ が 12.9~15.9 hr と大きく延長したのに対し、PEG_{S2} や PEG_{S5} で修飾した場合には、1.5~2.1 hr となり、マレイミド型に比較すると延長効果は低かった。

スクシンイミド型 PEG は直接アルブミンの Lys 残基と反応してアミド結合を形成するため、結合

Table 4. O₂-binding parameters of PEG(HSA-FecycP) solutions at 25°C (pH 7.3).

PEG(HSA-FecycP)	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	P_{50} (mmHg) at 37°C
PEG _{M2-5} (HSA-FecycP)	1.1×10^7	1.6×10^2	38
PEG _{M2-6} (HSA-FecycP)	1.2×10^7	1.7×10^2	32
PEG _{M2-7} (HSA-FecycP)	9.3×10^6	1.6×10^2	35
PEG _{M5-6} (HSA-FecycP)	1.2×10^7	1.7×10^2	31
PEG _{S2-6} (HSA-FecycP)	1.0×10^7	1.4×10^2	36
PEG _{S5-6} (HSA-FecycP)	1.2×10^7	2.5×10^2	32
HSA-FecycP	3.1×10^7	5.3×10^2	34

部の加水分解が進行する可能性もある。そこで、PEG_{S2-6}(HSA-FecycP)溶液を 37°C で 12 hr 振とうし、MALDI TOFMS 測定を行った。しかし、分子量の低下は見られず、PEG 鎖を結合するアミド結合が容易に切断される可能性は低いことが示唆された。

マレイミド型 PEG とスクシンイミド型 PEG の FecycP 血中滞留時間に対する延長効果の相異は、アルブミン表面における PEG 結合位置の違い、スクシンイミドの場合、結合に伴い Lys の正電荷が消失するためアルブミン自身の表面電荷が変化すること、などによるものと推測される。

D. 結 論

アルブミン-ヘムの分子表面に PEG 鎖を簡便かつ効率高く導入する方法を確立し、ヘムの血中半減期を延長させることに成功した。PEG の結合本数は、反応条件を制御することにより調節可能、PEG の分子量が 2,000 の場合、得られた PEG 修飾アルブミン-ヘム水溶液の溶液物性（粘度、COP）に大きな変化はない。ヘムの血中半減期は PEG 鎖の結合様式に依存し、マレイミド型 PEG が高い延長効果を示すことが明らかとなった。PEG 修飾アルブミン-ヘムは、次世代人工酸素運搬体として期待される製剤である。

(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.

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.* **288**, H1885-H1892 (2005).
2. C. Contaldo, J. Plock, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Leuing, A. Banic, and D. Erni. New generation of hemoglobin-based oxygen carriers evaluated for oxygenation of critically ischemic hamster flap tissue. *Crit. Care Med.* **33**, 806-812 (2005).
3. H. Sakai, P. Cabrales, A.G. Tsai, M. Intaglietta, E. Tsuchida. Oxygen Release from low and normal P₅₀ Hb-vesicles from Transiently Occluded Arteriole in the Hamster Window Model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288**, H2897-H2903 (2005).
4. J.A. Plock, C. Contaldo, H. Sakai, E. Tsuchida, M. Leuning, A. Banic, M.D. Menger, D. Erni. Is the Hb in Hb-vesicles infused for isovolemic hemodilution necessary to improve oxygenation in critically ischemic hamster skin? *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289**, H2624-H2631 (2005).
5. S. Wakamoto, M. Fujihara, H. Abe, M. Yamaguchi, H. Azuma, H. Ikeda, S. Takeoka, E. Tsuchida. Effects of hemoglobin vesicles on resting and agonist-stimulated human platelets in vitro. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **33**, 101-111 (2005)
6. 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).
7. T. Komatsu, N. Ohmichi, A. Nakagawa, P. A. Zunszain, S. Curry, E. Tsuchida. O₂ and CO binding properties of artificial hemoproteins formed by complexing iron protoporphyrin IX with human serum albumin mutants. *J. Am. Chem. Soc.* **127**,