

Table 1. Laboratory parameters during exchange protocol.

	Baseline	Level 1 HD		Level 2 HD		Level 3 HD	
		rHSA	rHSA	rHSA	rHSA	HbV <sub>8</sub>	HbV <sub>29</sub>
<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*	
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*	
Plasma					2.1±0.1	2.1±0.1	
PaO <sub>2</sub> , 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	
PaCO <sub>2</sub> , 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	
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	
HCO <sub>3</sub> , 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	
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	

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.

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状態が赤血球と異なるのであれば、その最適 P<sub>50</sub> 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、極度の血液希釈を実施した貧血状態におけるハムスター末梢組織内血流動態に対する P<sub>50</sub> 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推進された。

## 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 model)を使用した。Syrian Golden Hamster (雄、体重 55-65g)の背中の皮膚に直径 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

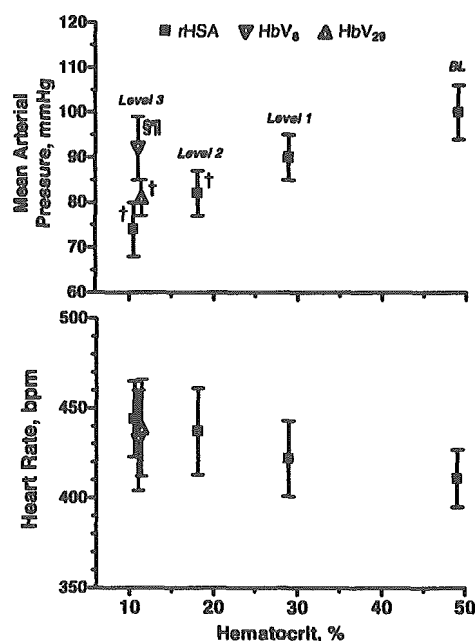


Fig. 11. Mean arterial blood pressure and heart rate [in beats/min (bpm)] at baseline (BL) (Hct 49%) and level 1 (Hct 29%), level 2 (Hct 18%), and level 3 (Hct, 11%) hemodilutions. Level 1 and level 2 exchanges were performed with 5% rHSA as diluent. Level 3 exchange was used to evaluate the oxygen transport of HbV<sub>8</sub> vs. HbV<sub>29</sub> and rHSA.  $P < 0.05$  relative to baseline;  $P < 0.05$  relative to level 3 rHSA;  $\ddagger P < 0.05$ , level 3 with HbV<sub>8</sub> vs. level 3 with HbV<sub>29</sub>.

/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。P<sub>50</sub> 値が 29 mmHg の HbV (HbV<sub>29</sub>)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、P<sub>50</sub> 値が 8 mmHg の HbV (HbV<sub>8</sub>)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、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、HbV<sub>8</sub>, HbV<sub>29</sub> 群は、Hb 濃度が約 5.7 g/dL となり、rHSA 群の 3.7g/dL よりも高い状態であった。血液ガス組成では、rHSA 群が顕著な過呼吸状態となり、PaO<sub>2</sub> の上昇、PaCO<sub>2</sub> の低下、そして BE の低下が顕著であったが、HbV<sub>8</sub>, HbV<sub>29</sub> 群では rHSA 群に比較してこれらの変化が軽減されていた。Fig. 11 に血圧と心拍数の変化を示す。Level 3 の血液希釈後、rHSA 群、HbV<sub>29</sub> 群では血圧の低下が見られたが、HbV<sub>8</sub> 群では維持される傾向を示した。微小循環動態(Fig. 12)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

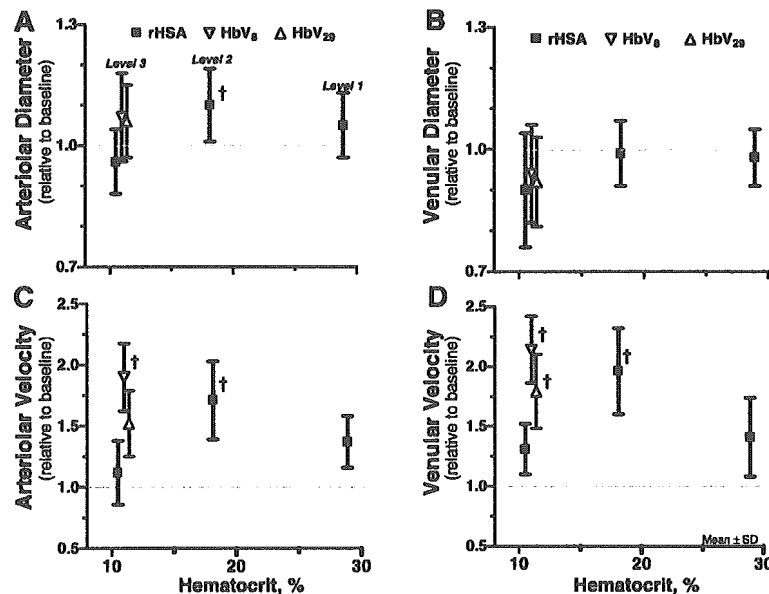


Fig. 12. Changes relative to baseline in arteriolar and venular hemodynamics at the level 1, level 2, and level 3 exchanges. Dashed lines represent baseline level.  $P < 0.05$  relative to baseline. Arteriolar (A) and venular (B) diameters ( $\mu m$ , means  $\pm$  SD,  $n =$  no. of vessels studied) in each animal group were as follows. Baseline: arterioles (A),  $61.2 \pm 10.2$ ,  $n = 80$ ; venules (V),  $62.0 \pm 12.3$ ,  $n = 80$ . Arteriolar (C) and venular (D) RBC velocities (mm/s, means  $\pm$  SD) in each animal group were as follows. Baseline: A,  $4.9 \pm 1.3$ ; V,  $1.7 \pm 0.5$ .

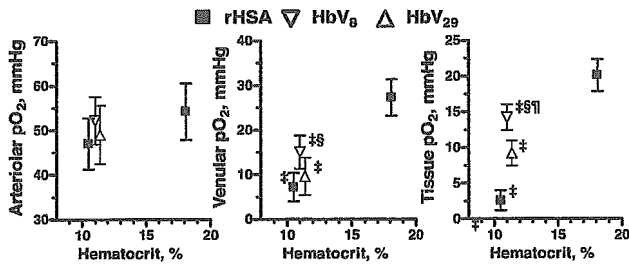


Fig. 13. Intravascular PO<sub>2</sub> after the level 2 and level 3 hemodilutions. Values are presented as means ± SD. *P* < 0.05 compared with level 2 with rHSA; *P* < 0.05 compared with level 3 with rHSA; † *P* < 0.05, level 3 with HbV<sub>8</sub> vs. level 3 with HbV<sub>29</sub>.

ているが、その後 Level 3 の血液希釈では rHSA 群、HbV<sub>29</sub> 群で顕著な低下が認められた。しかし、HbV<sub>8</sub> 群では維持される傾向が認められた。局所酸素分圧(Fig. 13)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、HbV<sub>8</sub> 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、HbV<sub>8</sub> (14.0±2.2 mmHg) > HbV<sub>29</sub> (9.2±2.7 mmHg) > rHSA (2.6±1.4 mmHg) の順であった。Fig. 14 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、HbV<sub>8</sub>, HbV<sub>29</sub> 群ともにに維

持する傾向が認められた。特に HbV<sub>8</sub> 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、HbV<sub>8</sub>, HbV<sub>29</sub> 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、HbV<sub>8</sub> で血液希釈した方が HbV<sub>29</sub> で希釈した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、酸素消費量の高い臓器のような臓器では、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 HbV<sub>8</sub> は HbV<sub>29</sub> よりも酸素を途中で放出せずに、より確実に酸素分圧の低い皮下組織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

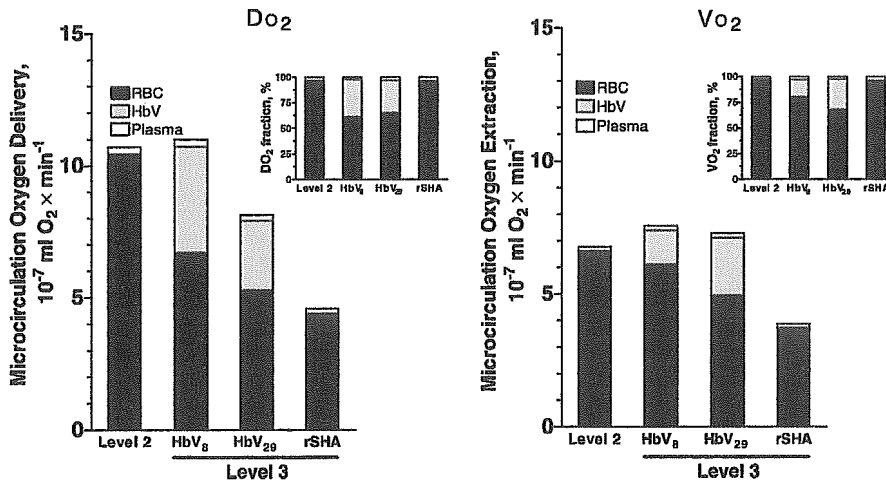


Fig. 14. Arterial oxygen delivery (DO<sub>2</sub>) and extraction (VO<sub>2</sub>) before and after the level 3 hemodilution. Calculations of global oxygen transport are not directly measurable in our model; however, the changes relative to baseline can be calculated using the measured parameters. These calculations can be identified as those presented without standard deviations to focus on their tendencies rather than on the variability of the measurement.

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を用いる人工酸素運搬体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HbV<sub>8</sub>はHbV<sub>29</sub>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HbV<sub>8</sub>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、HbVの適応によってP<sub>50</sub>値の最適な値が存在するものと考えられる。

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P<sub>50</sub>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(P<sub>50</sub>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が再確認できた。

## 11. 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

脳梗塞や心筋梗塞など、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可成り粒径の小さい人工赤血球が溶存すれば、酸素供給の向上と虚血解除が期待できる。ここでは、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)分散液での血液希釈により、酸素化の改善を試みた。本研究は、Dr. Dominique Erni (Inselspital University Hospital, Bern Univ., Switzerland)の共同で実施された。

## B. 研究方法

### a. 有茎皮弁内の虚血領域の作成

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. 15)。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側を(Anatomically perfused tissue, 血流存在組織)、結紮した側を(Ischismic Part, 虚血組織)とした。

### b. Hb小胞体の酸素親和度の影響

顕微鏡下、有茎皮弁内の微小血管内血流像を観

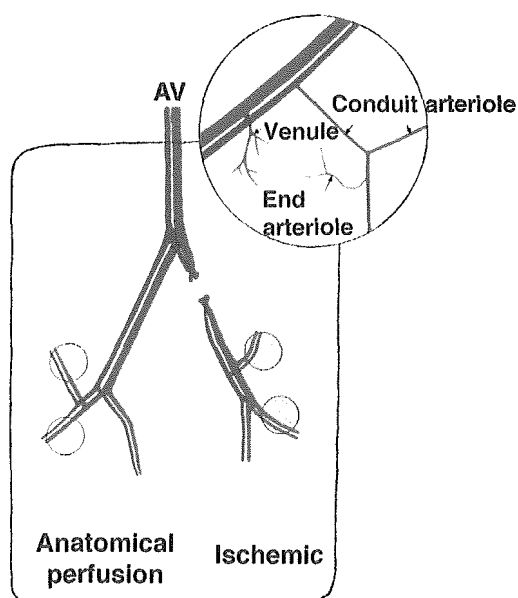
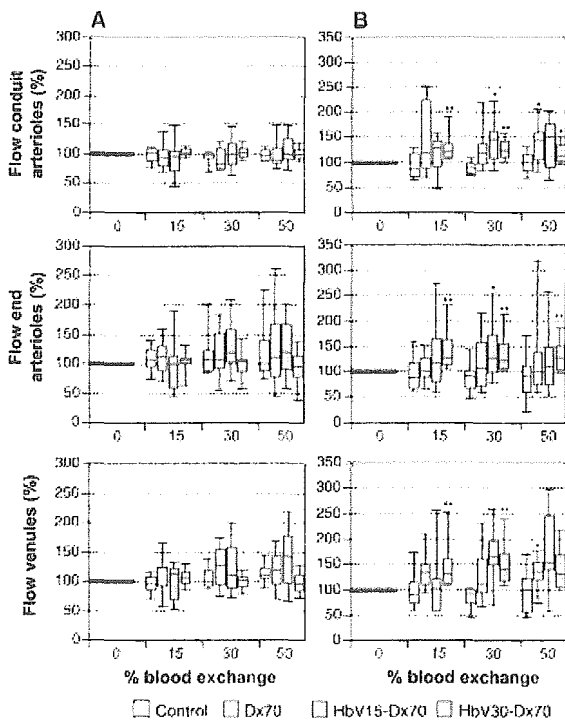


Fig. 15. Schematic representation of the hamster dorsal skin flap model. One branch of the small artery was ligated to prepare ischemic part.

測した。血管径はモニター上で計測した。血管内中央の血流速度は、Rhodamine G ラベルした白血球の流動を追尾して測定した。組織酸素分圧は、クランク型酸素電極(Revoxode CC1, GMS; Keil, Germany)により測定した。血流存在組織の小動脈内の血流速度は7-8 mm/secであったが、虚血組織の血流速度は0.4-0.8 mm/secにまで低下していた。

酸素親和度の異なる二種類の HbV を調製した ( $P_{50} = 15, 30 \text{ mmHg}$ )。これを6%デキストラン溶液 (Dx70, B. Braun Medical, Emmenbrucke, Switzerland) に分散させ、Hb 濃度を7.5 g/dLとした。膠質浸透圧は50 mmHg, 粘度は8.7 cPであった。Dx70 単独での膠質浸透圧は50 mmHg, 粘度は2.8 cPであった。

ハムスターはネンブタールを継続投与(0.5 mg/min/kg)して実験中の麻酔を維持した。10分かけて頸動脈からの脱血と頸静脈からの投与を同時



**Fig. 16.** Microvascular blood flow in the anatomically perfused (A) and ischemic (B) tissues at baseline and after stepwise exchange of 15%, 30%, and 50% total blood volume with 6% Dx70, HbV15-Dx70, and HbV30-Dx70. Data are given as a percentage of baseline and are presented in box plots reflecting 10th percentile, 25th percentile, median, 75th percentile, and 90th percentile. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  vs. baseline.

に行った。Dx70 (n=10), HbV15-Dx70 (n=9), HbV30-Dx70 (n=9)を投与し、血液交換率が15%, 30%, 50%に到達した時点で測定を行った。間隔は1時間とした。

### c. Hb 小胞体分散液の粘度の影響

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 $\mu\text{m}$ 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。

ここでは、酸素親和度の高い HbV9 ( $P_{50} = 9 \text{ mmHg}$ )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11.5cP)。HES単独での膠質浸透圧は36 mmHg, 粘度は1.9 cPであった。

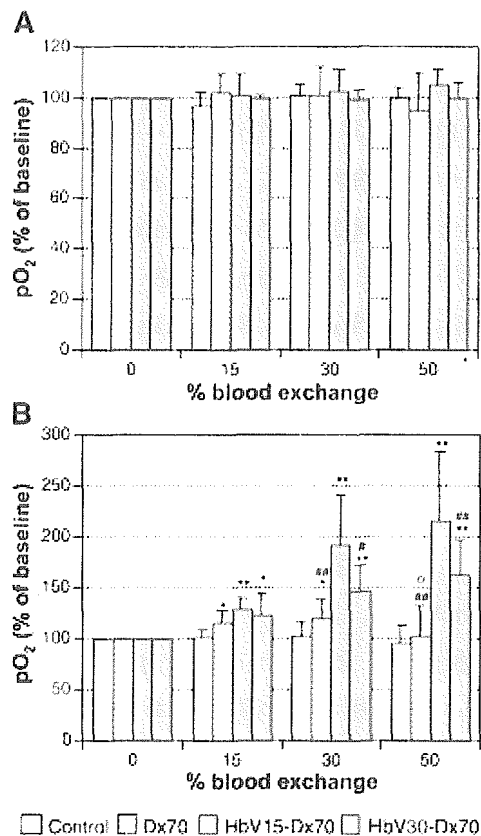
ハムスターにはネンブタールを継続的に投与(0.5 mg/min/kg)し、実験中の麻酔を維持した。頸動脈からの脱血と、頸静脈からの投与を同時に15分かけて行い、循環血液量の約33%をHbV9-HES (n=11), V-HES (n=9), 或はHES (n=11)で交換した。血液交換後4時間まで観察した。また、血液交換せずにそのまま放置する場合(Control, n=11)についても観察した。

## C. 結果および考察

### a. Hb 小胞体の酸素親和度と虚血領域の回復

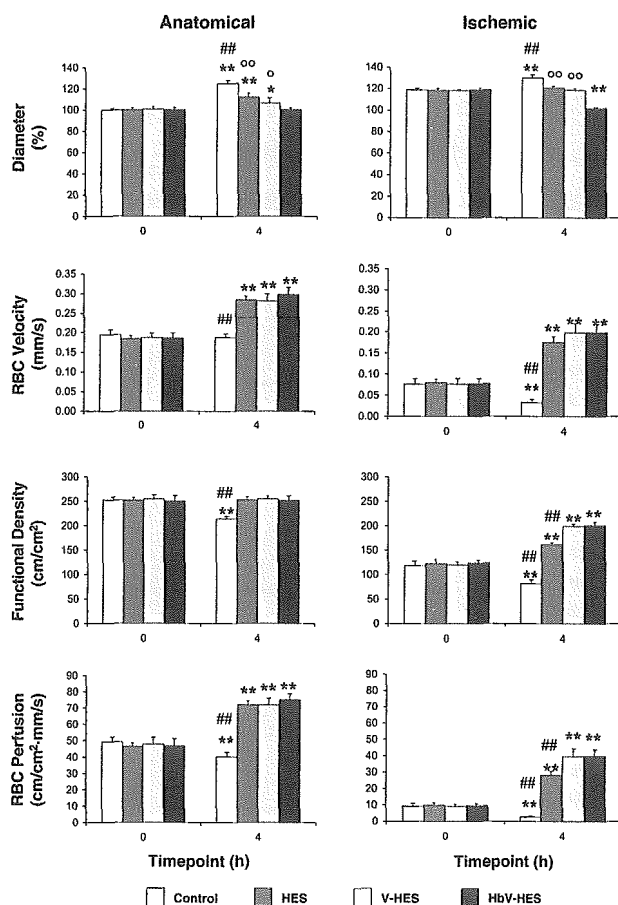
全身動態については、血圧は全群有意な変化な

かった。Dx70 群では血液希釈率が高くなるに連れ酸素供給量が低下するので、動脈血酸素分圧の有意な上昇と二酸化炭素分圧の有意な低下が認められたが、他は安定していた。皮弁内の血管径の変動は殆ど無かった。血流速度の変化を Fig. 16 に示した。血流存在組織では血流に殆ど変化は無かったが、虚血組織では血流の増大が見られた。特に血液交換率が 30%、50% のとき、Dx70 群で 144%、HbV15-Dx70 群で 166%、HbV30-Dx70 群で 141% への上昇が見られた。これは Dx70 の粘度 2.8cP は血漿の粘度(1 cP 程度)よりも高いため、上流側で血管壁で高いずり応力を生起し、これが血管拡張を引起こして血流を増加させたこと、或いは粘度増大により末梢血管により均一に血流が分布されるためと考えられる。



**Fig. 17.** PO<sub>2</sub> in the anatomically perfused (A) and ischemic (B) tissues at baseline and after stepwise exchange of 15%, 30%, and 50% total blood volume with 6% Dx70, HbV15-Dx70, and HbV30-Dx70. Data are given as a percentage of baseline and represent means  $\pm$  SD. \**P* < 0.05 and \*\**P* < 0.01 vs. baseline; #*P* < 0.05 and ##*P* < 0.01 vs. HbV15-Dx70; °*P* < 0.01 vs. HbV30-Dx70.

血液希釈前の組織酸素分圧は、血流存在組織では 23–27 mmHg に対し、虚血組織では 7–11 mmHg にまで低下していた。血液希釈後、血流存在組織の酸素分圧には殆ど変化は見られなかったが (Fig. 17)、虚血組織では、血液交換率が高くなるにつれて上昇し、HbV15-Dex70 群で 217 $\pm$ 67% にまで、HbV30-Dex70 群では 164 $\pm$ 33% にまで上昇した。血流の増大に加え、HbV の存在による酸素運搬量の増大が組織酸素分圧を増大させた主要因と考えられる。また、酸素を放し難い HbV15 の方が HbV30 に比べてより末梢側で酸素を放出する作用が強いことも要因として考えられた。



**Fig. 18.** Capillary hemodynamics in anatomically perfused and ischemic tissues at baseline and 4 h after hemodilution with 6% HES, HbV9-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.

## b. Hb 小胞体分散液の粘度の影響

先ず、HbV9-HES, V-HES で血液希釈した場合の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、PaO<sub>2</sub> 値の上昇と PaCO<sub>2</sub> 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±1.5 mL/dL に低下、V-HES 群も 12.6±1.3 mL/dL に低下したが、HbV9-HES 群では 15.7±1.2 mL/dL の低下に留まった。

Fig. 18 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 HbV9-HES 群で顕著

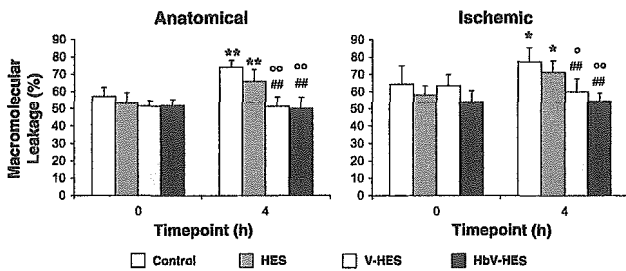


Fig. 19. Macromolecular leakage in anatomically perfused and ischemic tissues at baseline and 4 h after hemodilution with 6% HES, HbV9-HES, and V-HES. Data represent means  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. baseline; ## $P < 0.01$  vs. control; °  $P < 0.05$ , °°  $P < 0.01$  vs. HES.

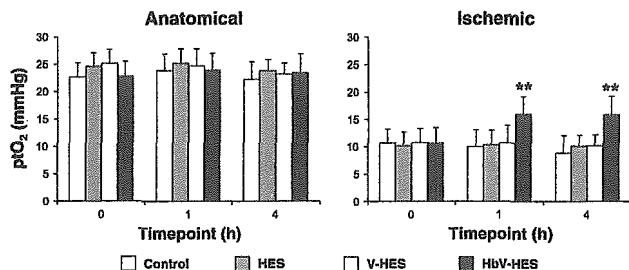


Fig. 20. Partial tissue oxygen tension (PtO<sub>2</sub>) in anatomically perfused and ischemic tissues at baseline and 1 and 4 h after hemodilution with 6% hydroxyethyl starch (HES), HbV9-HES, and V-HES. Data represent means  $\pm$  SD. \*\* $P < 0.01$  vs. baseline and other groups.

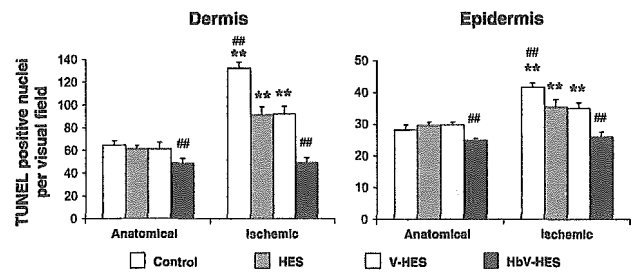


Fig. 21. Density of apoptotic cells in dermis and epidermis of anatomically perfused and ischemic tissues 5 h after completion of surgery and 4 h after hemodilution with 6% HES, HbV9-HES, and V-HES. Data represent means  $\pm$  SD. \*\* $P < 0.01$  vs. anatomically perfused tissue; ## $P < 0.01$  vs. other groups.

であった。赤血球流速は、全群で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、HbV9-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、HbV9-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. 19 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、HbV9-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. 20 に記す。血流存在組織では変化が無いが、虚血組織では、HbV9-HES 群のみ有意な酸素分圧の上昇を示した。

Fig. 21 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、HbV9-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、HbV9-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)。

これまでの研究で、酸素親和度の高い(P<sub>50</sub> 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、本研究では、アロステリック因子を含有しないHbV9(P<sub>50</sub> =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。しかし虚血組織の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、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。

### 1 2. 還元剤投与によるHb小胞体のmetHb生成抑制

#### A. 研究目的

Hb小胞体(HbV)の生体内でのメト化促進の主要

原因として、二分子膜透過性のある過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)が考えられている。本研究ではH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>消去能をもつアスコルビン酸(AsA)を用いて*in vivo*におけるメト化抑制を目的とした。さらに、二分子膜透過性還元剤であるシステイン(Cys)によるメトヘモグロビンの還元も検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. AsAを用いたHbVの*in vivo*メト化抑制

1.5%セボフレン麻酔下、Wistar系ラット(体重約250g, n=4)の大腿静脈に挿管した。HbV([Hb]=10g/dL, 20mL/kg)を投与した後、AsA溶液(0.1、0.25、0.5、1.0wt%)を連続投与(投与速度2.1mL/hr)した。経時的に採血した血液を6hrまで測定した後、遠心分離(12,000rpm, 5min)、超遠心分離(40,000rpm, 30min)にてHbVを沈殿させ、メト化率をmetHb(405nm)、deoxyHb(430nm)の吸光度比から算出した。また、同条件にてAsA溶液を連続投与したラットの血液を採血し、AsA濃度を定量した(BML社に依頼)。

##### 2. システインによるメトヘモグロビンの還元

HbV([Hb]=10g/dL, 20mL/kg、メト化率約30%)を投与後、大腿静脈よりAsA(投与速度8.4mg/kg/hr)とシステイン(Cys, 投与速度0.14、7.2mg/kg/hr)を連続投与した。経時的に採血後、ヨードアセトアミド添加によりCysを失活させ、metHb(405nm)、deoxyHb(430nm)の吸光度比からメト化率を算出した。

#### C. 結果および考察

##### 1. AsAを用いたHb小胞体の*in vivo*メト化抑制

ラット大腿静脈より生食(コントロール群)および0.25wt%AsA溶液(AsA群)を投与した際のHbVのメト化速度は各々4.9と3.6[%/hr]であり、外挿により見積もったT<sub>1/2</sub>は各々10と18[hr]であった。ラット体内(AsA溶液投与前約3.9mg/mL)のAsA濃度は静注開始後徐々に増加し、約1時間



後からはほぼ一定値 (36 mg/mL) を示した (Fig.22)。このことから、ラットの血中 AsA 濃度の増加に伴って、AsA により血中の  $H_2O_2$  が消去されたために HbV のメト化が抑制されたと考えられる。

次に、AsA 投与速度の変化によるメト化速度の影響を検討した。生食 (コントロール) 群及び AsA 投与群 (8.4、21、42、84 mg/kg/hr, それぞれ投与濃度 0.1、0.25、0.5、1.0 wt% に対応) を静注した。ラット体内の AsA 濃度は各投与速度に依存せず、投与開始後徐々に増加し、約 1 時間後からはほぼ一定値を示した。Fig. 23 に示すように、各投与速度における定常時の AsA 濃度は投与速度に比例していた。メト化速度は AsA 投与速度 8.4、21 mg/kg/hr では共に 3.6 %/hr と、コントロール群 (4.9 %/hr) に対して 30%程度メト化速度が抑制された。他方、AsA 投与速度 42、84 mg/kg/hr では、コントロール群とメト化速度が近い値を示した。

これは、AsA による血漿中の  $H_2O_2$  の消去によるメト化抑制効果と自動酸化による促進効果により極小値が現れたものと考えられる。また、AsA 投与によるラット体内 pH、血圧等に異常は認められなかった。

## 2. Cys によるメトヘモグロビンの還元

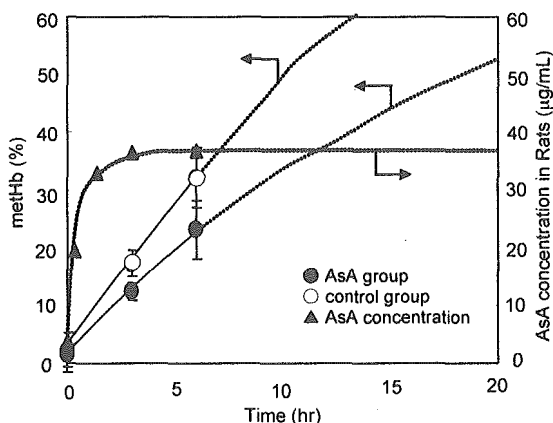


Fig. 22 Changes in the metHb percentage in Hb-vesicles with or without continuous AsA administration. The plasma AsA concentration became plateau after 5 hrs.

AsA 溶液の連続投与(投与速度 8.4 mg/kg/hr) にてラット体内 AsA 濃度を定常値に保ったまま、ラット大腿静脈より Cys の連続投与 (投与速度 0.14、7.2 mg/kg/hr) を行ったところ、Cys 投与開始後急激

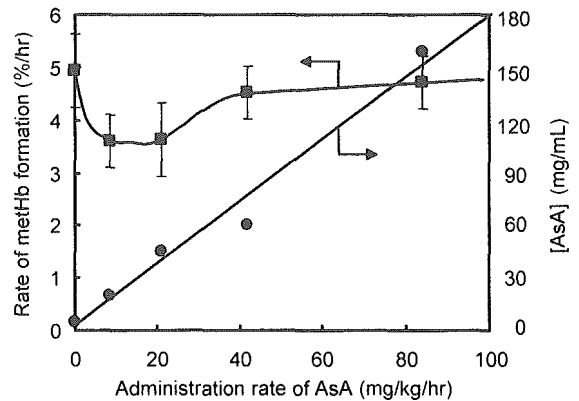


Fig. 23 Changes in the rate of metHb formation in Hb-vesicles in relation to the administration rate of AsA.

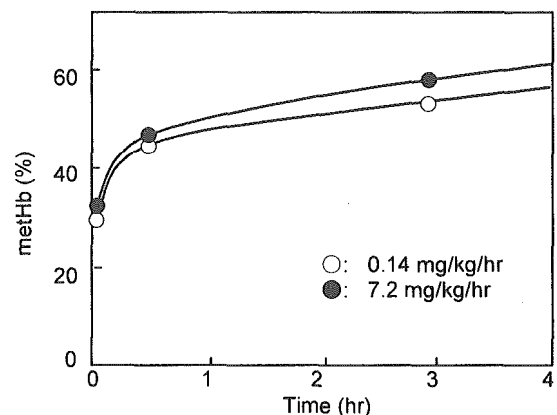


Fig. 24 Changes in the metHb percentage in Hb-vesicles by continuous administration of AsA (8.4 mg/kg/hr) with Cys (○:0.14 or ●:7.2 mg/kg/hr).

に HbV のメト化率が上昇することが確認された (Fig. 24)。

投与 30 min 後のメト化率が約 45% (初期メト化速度 30 %/hr) と逆にメト化が促進した。これは、膜透過したシステインが小胞体内でメト Hb を還元するよりも速く自動酸化して生じた  $H_2O_2$  が、Hb をメト化したためと考えられる。

## D. 結論

HbV を投与した後、アスコルビン酸を 8.4 mg/kg/hr の速度で投与することにより、約 30% のメト化速度抑制が認められた。これはアスコルビン酸により血中の  $\text{H}_2\text{O}_2$  が消去されたためと考えられる。また、二分子膜透過性還元剤の Cys の連続投与では、逆にメト化の促進になることが明らかになった。

### 1 3. L-Tyrosine を基質とした metHb による $\text{H}_2\text{O}_2$ 消去機構の解析と Hb 小胞体への応用

#### A. 研究目的

中心鉄が 3 価であるメトヘモグロビン(metHb,  $\text{Hb}(\text{Fe}^{3+})$ )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、 $\text{H}_2\text{O}_2$  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、ferryl 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も奥的とした。また、人工酸素運搬体である Hb 小胞体(HbV)に metHb/L-Tyr を内包し、 $\text{H}_2\text{O}_2$  消去系導入による小胞体内 oxyHb の met 化抑制を試みた。

#### B. 研究方法

##### 1. L-Tyr 添加 metHb による $\text{H}_2\text{O}_2$ 消去と L-Tyr の変化

metHb 溶液 ( $5 \mu\text{M}$ , [heme] =  $20 \mu\text{M}$ , PBS(pH7.4))に L-Tyr( $0, 500 \mu\text{M}$ )を添加した。この溶液に  $500 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ([heme]/ $[\text{H}_2\text{O}_2]$  = 1/10)を  $37^\circ\text{C}$  にて添加し、溶液を経時的に採取後、horseradish peroxidase 法により残存  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加し([metHb] =  $50 \mu\text{M}$ ,  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  =  $500 \mu\text{M}$ , PBS (pH7.4)), 120 秒間攪拌し即座に氷冷後、GPC(SephadexG-25)にて  $4^\circ\text{C}$  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 ラジカルのラジカルを 25 K にて、ESR 測定から検出した。

##### 3. ferrylHb ラジカルと L-Tyr、或は $\text{H}_2\text{O}_2$ との反応

単離した ferrylHb ラジカル( $2 \mu\text{M}$ )を  $4, 37^\circ\text{C}$  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( $500 \mu\text{M}$ )、あるいは  $\text{H}_2\text{O}_2$ ( $8 \mu\text{M}$ ) 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( $250 \mu\text{M}$ )に L-Tyr( $4 \text{mM}$ )、あるいは  $\text{H}_2\text{O}_2$ ( $1 \text{mM}$ )を添加し、 $4^\circ\text{C}$  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。 $\text{H}_2\text{O}_2$  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。

##### 4. metHb/L-Tyr 内包 Hb 小胞体の動物投与試験

metHb(4 wt%)及び L-Tyr( $8.5 \text{mM}$ )を内包した HbV を無菌雰囲気下にて調製し、Wistar 系ラット(雄性、250g、n=6)に尾静脈より投与後( $20 \text{mL/kg body weight}$ )、経時的に採血し met 化率の推移を測定した。

## C. 結果及び考察

### 1. L-Tyr 添加 metHb による $\text{H}_2\text{O}_2$ 消去と L-Tyr の変化

$1 \text{mM}$  L-Tyr を添加した metHb 溶液は約 15 分で完全に  $\text{H}_2\text{O}_2$  を消去した。更に、添加した L-Tyr は、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. 25)。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  $\text{H}_2\text{O}_2$  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  $\lambda_{max}$  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. 26)。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. 27)。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. 28)。

## 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. 29a)。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

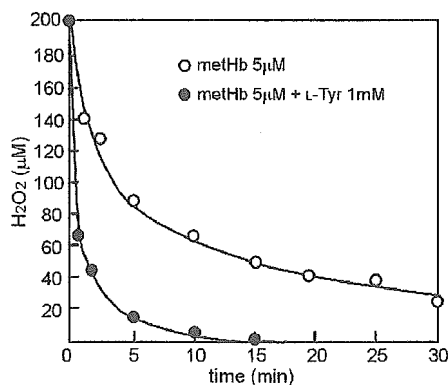


Fig. 25.  $H_2O_2$  elimination activity of metHb (5 mM) in the presence of L-Tyr.

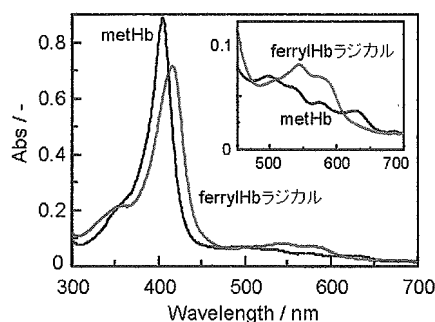


Fig. 26. UV-vis spectrum of (—) metHb and (---) ferrylHb radical after isolation.

た (Fig. 29b)。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、本実験条件において安定であった。

ferrylHb ラジカルにヘムと等量の  $H_2O_2$  を添加した系 (Fig. 29c) 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. 29a) と比較

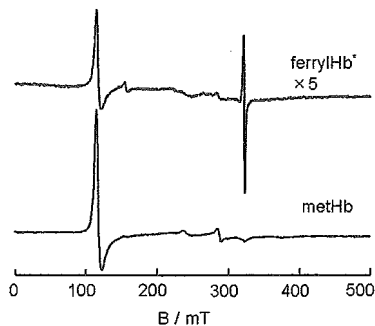


Fig. 25. ESR spectrum of isolated metHb and ferrylHb radicals.

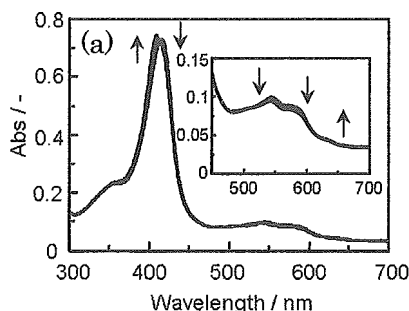
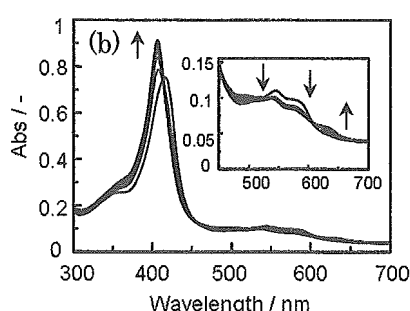


Fig. 28. UV-vis spectrum of isolated ferrylHb radicals at (a) 4 °C (b) 37 °C.



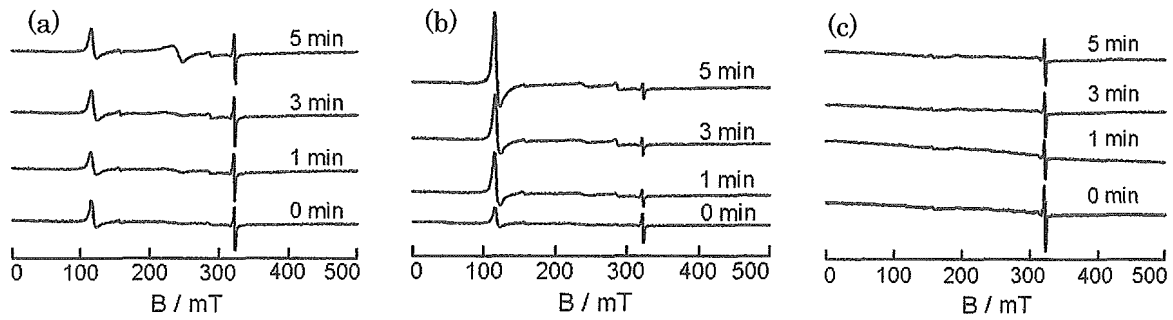


Fig. 29. ESR spectrum of isolated ferrylHb radical mixed with (a) PBS (control) (b) L-Tyr, and (c) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

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 ferryl ラジカルへと変換されていた。この結果より、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加した UV-vis スペクトルの連続測定結果を示す (Fig. 30a)。この結果と Fig. 28a に示した PBS 添加のコントロール系を比較すると、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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

動還元を示すが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 29c 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. 30b) 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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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。

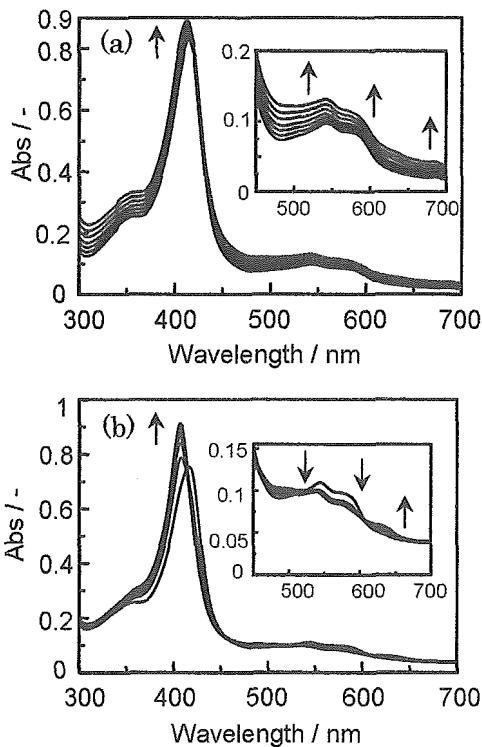


Fig. 30. UV-vis spectrum of isolated ferrylHb radical mixed with (a) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (b) L-Tyr.

#### 4. metHb/L-Tyr 内包 Hb 小胞体の動物投与試験

metHb/L-Tyr 内包 HbV (metHb, 4 wt%; L-Tyr, 8.5 mM) を用いた *in vivo* 試験の met 化率変化の結果を

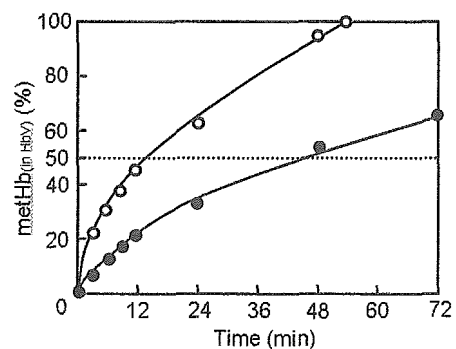


Fig. 31 Time course of metHb formation in Hb vesicles *in vivo* (20 mL/kg). Hb vesicles were co-encapsulating ○ no metHb and L-Tyr, ● 4wt% metHb and 8.5 mM L-Tyr.

Fig. 31 に示す。通常の HbV では約 14 hr で 50 % の oxyHb が met 化したのに対し、metHb/L-Tyr 内包 HbV では 44 hr まで延長された。更に、投与した HbV の殆どが代謝される 72 hr においても met 化率は 70 % であった。これは、生体内で生成し、小胞体膜を透過した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を metHb/L-Tyr 系が消去し、oxyHb を保護した結果であり、血液生化学検査においても問題点は認められなかった。

#### D. 結論

- 1) metHb に L-Tyr を添加することで、安定に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が消去されることが確認された。
- 2) ferrylHb ラジカルの単離法を確立し、単離された ferrylHb ラジカルは安定であることが確認された。
- 3) ESR 測定、及び UV-vis スペクトル測定より、ferrylHb ラジカルは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下では変性へと反応が進行するが、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。
- 4) metHb/L-Tyr を HbV に内包することで、ラットへの投与試験において大幅な met 化の抑制に成功した。

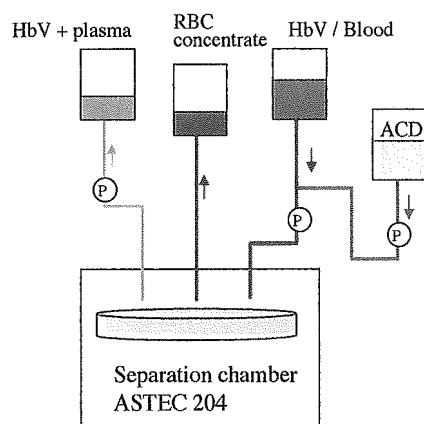
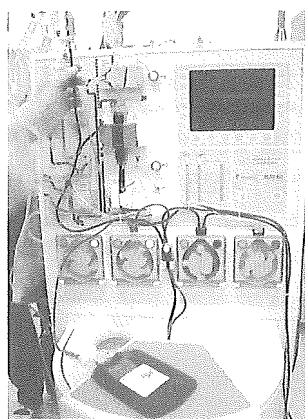


Fig. 32. 血液成分分離装置 (Fresenius AS.TEC204) を使用した、血球成分分画と Hb 小胞体(HbV) を含有する血漿分画に分離する方法。

### 1 4. 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

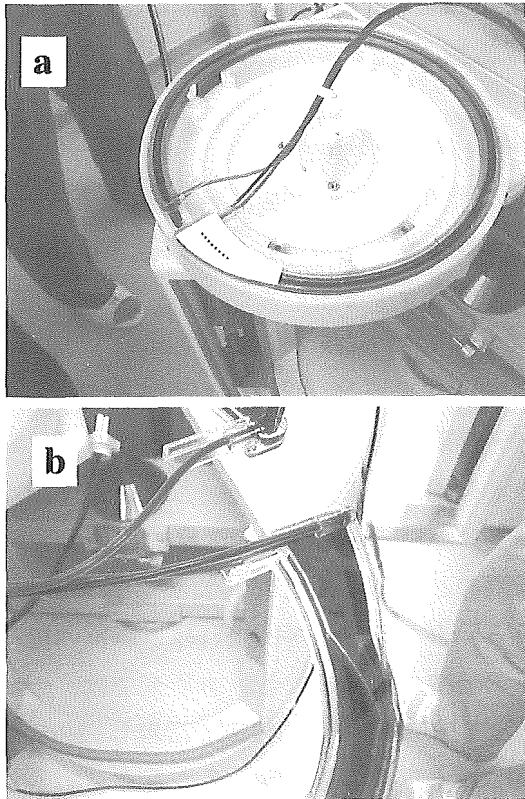
輸血の代替として使用される Hb 小胞体(HbV)は、一般の薬剤よりも大量の投与を前提としている。これまでにラットを用いた投与試験(単回投与: 20 mL、反復投与:10 mL/kg/day x 14 days)では、HbV は細網内皮系(主に肝臓、脾臓)に捕捉されて、速やかに代謝・排泄されることを、血液生化学的、組織病理学的に明らかにしている。投与後に十分な酸素輸送効果が得られ、適切な医療行為(輸血や外科的の措置など)の後、HbV が必要なくなった時点で血中から除去することが出来れば、細網内皮系への負担の軽減が可能と成る。本研究では、赤血球とは異なる HbV の物理的特徴を活用し、HbV のみを分離除去する方法を検討することを目的とした。

#### 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



**Fig. 33.** (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 Hb 小胞体を含む血漿分画が分離された状況。

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. 32, Fig. 33)。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

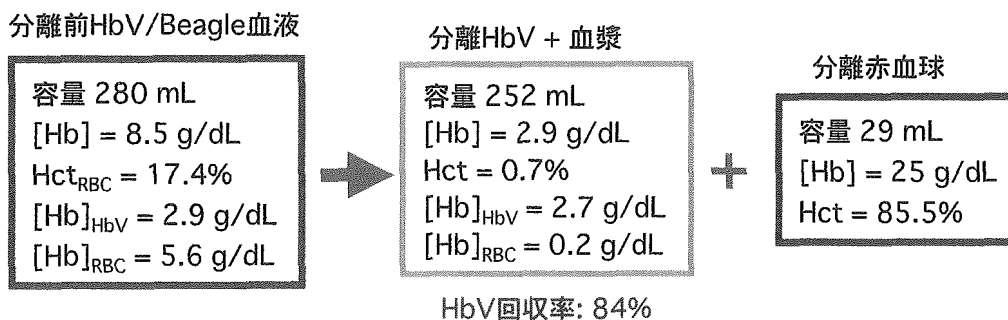
HbV の粒径 250 nm は、赤血球の粒径(8 $\mu$ m)の約 1/30 であり、また血漿蛋白質よりも極めて大きい。そこで上述の遠心分離操作により血球を除去した後の HbV を含有する血漿分画について、プラズマフェレシス用の限外濾過膜システムを用い、血漿蛋白質との分離を検討した。膜型血漿分離器(プラズマフロー OP-02W, 旭化成メディカル社製, 孔径 0.3 $\mu$ m, 膜面積 0.2 m<sup>2</sup>)を使用した。

## C. 結果および考察

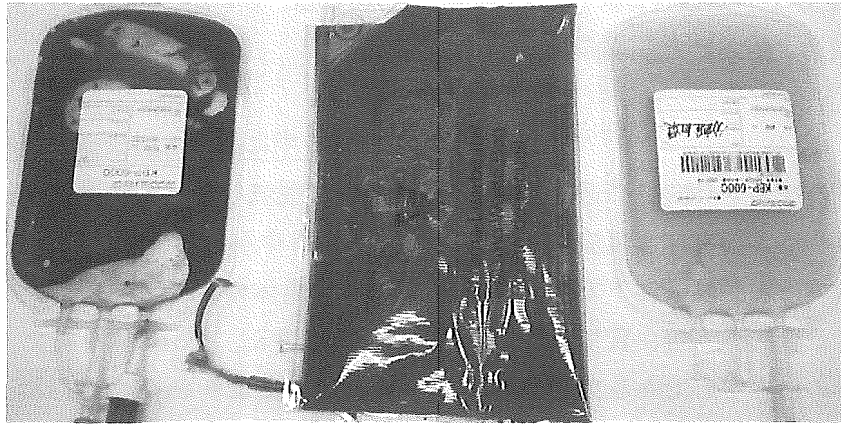
### 1. 血球成分との分離

Fig. 33 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. 34 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



**Fig. 34.** Hb 小胞体(HbV)と赤血球の分離操作の結果



**Fig. 35.** 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), Hb 小胞体分画(中央), および血漿蛋白質分画(右)。

が、今後は検出器の改良を要する。

## 2. 血漿成分との分離

実験方法(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、今回は先ず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  $0.3\mu\text{m}$  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 をほぼ完全に分離に成功したこと

を確認した(**Fig. 35**)。今回は Deadend 式として処理したため、目詰まりが顕著であったが、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。

## 15. アルブミン-プロトヘム複合体における活性ヘムサイトの構造変換と酸素結合能調節

### A. 研究目的

組換えヒト血清アルブミン(HSA)に近位塩基を有するテトラフェニルヘム誘導体を包接させたアルブミン-ヘム複合体は、生理条件下で酸素を可逆的に結合解離できる合成ヘム蛋白質である<sup>1,2)</sup>。我々はヘモグロビンの活性中心であるプロトヘムIXの誘導体でもHSAに取り込ませることにより、酸素の吸脱着が可能となることを見出した<sup>3)</sup>。生体内におけるプロトヘム(またはその誘導体)の代謝過程は周知であり、ヘムオキシゲナーゼにより分解された後、ビリルビンとして体外へ排泄されるので、アルブミン-プロトヘムは生分解性の高い人工酸素運搬体である。一方、赤血球代替物を医療現場で利用する際、適用に最も有効な酸素親和度の製剤を選択することが、最大限の治療効果を得る鍵となる。すなわち人工酸素運搬体の酸素親和度調節は重要で、テトラフェニルヘム系の場合、活性ヘムサイトの立体構造を変えることにより酸素親和度を制御することができる<sup>4)</sup>。本研究では、計10種のプロトヘム誘導体を合成し、それらを包接させたHSA-hemeを対象に、その酸素結合パラメーターを詳細に解析、ヘム構造と酸素結合能の相関について整理した。

### B. 実験方法

#### 1. プロトヘム誘導体の合成

プロトポルフィリン、メソポルフィリン、デューテロポルフィリン、ジアセチルデューテロポルフィリンを出発物質として、計10種類のヘム誘導体を合成した。まず、軸塩基配位子となるイミダゾール誘導体をピリジンまたはDMF溶液中でBOPを縮合剤としてプロピオン酸残基に結合させた後、もう一方のプロピオン酸残基へ疎水性置換基を導入した。得られたポルフィリン誘導体にFeCl<sub>2</sub>を用いて中心鉄を挿入、各化合物を得た。構造解析は、

<sup>1</sup>H-NMR、UV-vis、IR、MSスペクトルにより行った。

#### 2. DMF中における酸素結合反応

Arで脱気したヘム誘導体(Fe(III)体)のDMF溶液(20 μM)中へ亜二チオン酸ナトリウム-クラウンエーテル錯体のメタノール溶液を添加し、中心鉄をFe(II)に還元、deoxy体を得た。そこへ酸素を吹き込むことによりoxy体、さらに一酸化炭素を通気することによりcarbonyl体を得た。

#### 3. HSA-heme複合体の調製

HSAのリン酸緩衝水溶液([HSA]=20 μM、pH7.3)に、Ar雰囲気下でheme(CO)錯体のEtOH溶液を加え、HSA-heme(CO)錯体([FePP]=20 μM)を得た。光照射(500Wハロゲンランプ)によりCOを解離させた後、O<sub>2</sub>を通気し酸素錯体を得た。

#### 4. HSA-heme複合体の酸素結合能測定

得られたHSA-hemeリン酸緩衝水溶液の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( $P_{50}$ )を決定した。またUV-vis.スペクトルにおける酸素錯体吸収の経時変化から、酸素錯体半減期( $\tau_{1/2}$ )(25°C)を決定した。

### C. 結果および考察

合成した10種類の近位塩基結合型ヘム誘導体の構造をFig. 36に示す。

#### 1. DMF溶液中の酸素結合反応

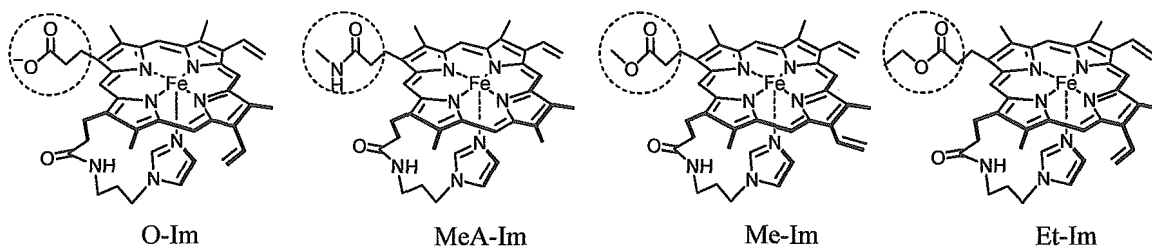
##### 1-1. deoxy体

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

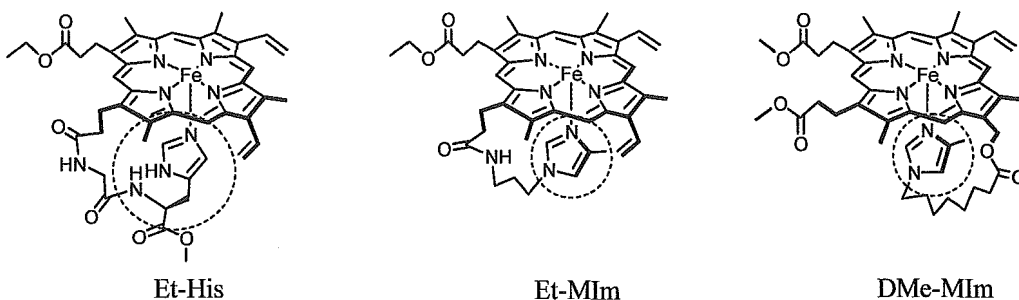
プロピオン酸残基修飾型(O-Im, MeA-Im, Me-Im, Et-Im)では、側鎖末端構造(カルボキシル基、メチ



【プロピオン酸残基修飾型】



【軸塩基修飾型】



【3,8-位修飾型】

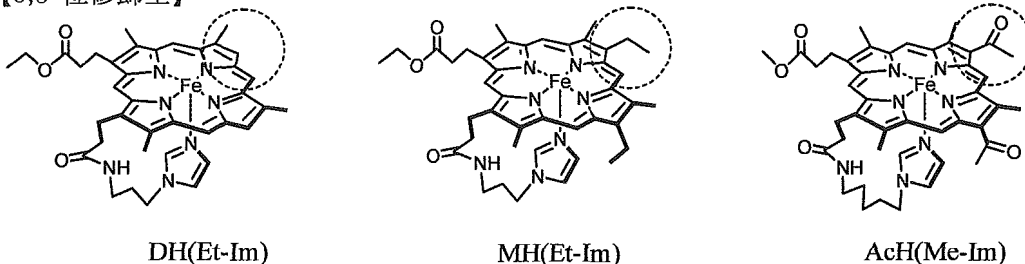


Fig. 36 Heme derivatives with a covalently bound axial base.

ルアミド、メチルエステル、エチルエステル)の違いによらず、UV-vis.スペクトルの $\lambda_{\max}$ 値に大きな差は見られなかった (Fig. 37a, Table 2)。また、ヒスチジルグリシル基を有する Et-His も、イミダゾリル型ヘムと類似した $\lambda_{\max}$ 値を示した。

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

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

1-2. oxy、carbonyl 体

DH(Et-Im)、DMe-MIm 以外の 8 種類のヘムは、 $O_2$  の通気に伴い、速やかに酸素錯体を形成。また CO を通気すると、安定な一酸化炭素錯体を生成した。DH(Et-Im)、DMe-MIm は  $O_2$  との接触により瞬時に酸化。DH(Et-Im) はポルフィリン環 3,8-位に置換基を持たないため、 $\mu$ -oxo 二量体を形成しやすいものと考えられる。5 °C、25 °C における、deoxy 体、oxy 体、carbonyl 体の $\lambda_{\max}$ 値を Table 2 にまとめた。

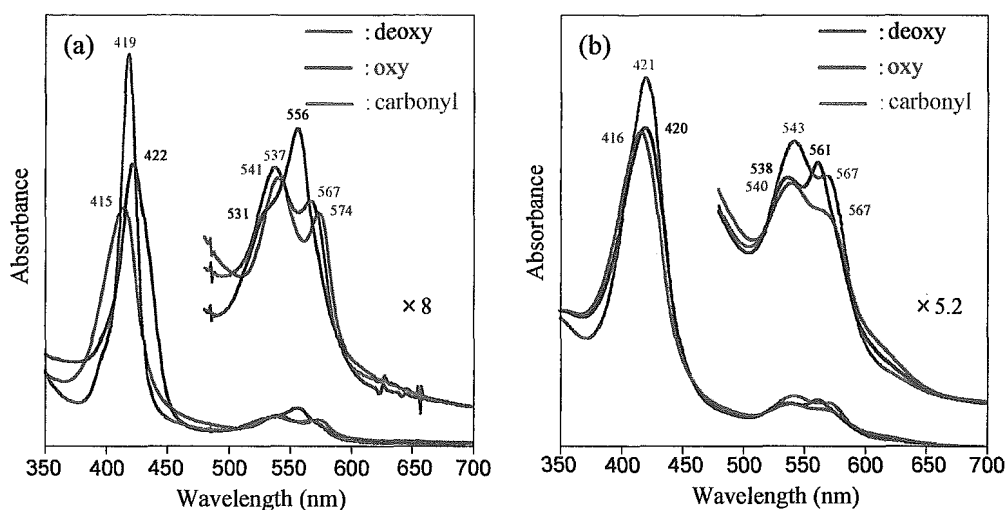


Fig. 37 UV-vis. absorption spectral changes of EtO-Im (a) in DMF solution at 5°C and (b) rHSA hybrid in p.b. solution at 25°C.

Table 2 Absorption maxima ( $\lambda_{\max}$ ) of heme derivatives in DMF.

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

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

## 2. HSA 複合体の酸素結合反応

8種類のヘム (DH(Et-Im)、DMe-MImを除く) について、HSA-heme複合体を調製した。プロピオン酸側鎖の極性が高いカルボキシル基型 (O-Im)、メチルアミド型 (MeA-Im) を包接させた HSA 複合体水溶液の UV-vis. スペクトルは、調製後、既に酸化体の生成を示しており、ヘムが HSA に取り込まれる過程で酸化、或いは HSA に取り込まれにくい

可能性が示唆された。ヘムを HSA に包接させるには、ヘムの極性が低いほうが有利と考えられる。

照射により CO を脱離させ、deoxy 体を調製した。2-メチルイミダゾールを有する DMe-MIm carbonyl 体 ( $\lambda_{\max}$ : 419, 540, 566 nm) は、deoxy 体へ移行させる過程で中心鉄が酸化した。一般にプロトヘム誘導体の酸素親和性は高いので 2-メチルイミダゾールを導入してその低下を試みたが、中心

鉄への配位力が弱いために脱離しやすく、酸化が進行したと推測される。

その他のヘム(5種類)のUV-vis.スペクトルパターンは、Fe(II)5配位高スピン錯体型とイミダゾールが2つ軸配位したFe(II)6配位低スピン型の間中間スペクトルパターンであった(Fig. 37b, Table 3)。アミノ酸残基などの配位子が第6配位座に弱く結合していることも考えられる。O<sub>2</sub>を通気すると、MH(Et-Im)以外は酸素錯体を形成した。

**Table 3** Absorption maxima ( $\lambda_{\max}$ ) of rHSA-heme in p.b. (pH 7.3) at 25 °C.

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

得られた酸素錯体は時間とともに酸化劣化し、Q帯の吸光度が徐々に減少する。UV-vis.スペクトルの連続測定により、酸素錯体が酸化していく様子を吸光度の経時変化から追跡した。例えば、HSA-AcH(Me-Im)oxy体の場合、 $\lambda_{\max}$  (427 nm)における $\Delta A$ から、 $-\ln[(\Delta A_{\infty}-\Delta A)/\Delta A_{\infty}]$ を算出、酸素錯体半減期( $\tau_{1/2}$ ): 50 min が得られる。酸化過程は一次反応であり、プロトン酸化に支配されていた。つまり、ヘムはHSAに包接されているので、 $\mu$ -oxo二量体形成は立体的に抑止される。 $\tau_{1/2}$ はMe-Im (20 min) < Et-Im (50 min) < Et-His (90 min)となり、プロピオン酸側鎖がメチル基よりもエチル基、軸塩基としてはイミダゾリルアルキル基よりもヒスチジルグリシル基のほうが、安定な酸素錯体を与えることが明らかとなった。AcH(Me-Im)の $\tau_{1/2}$ は50 minで、Me-Im (20 min)よりも延長した。ポルフィリン環3,8-位に電子吸引基を導入して環の電子密度を低下させることが、酸素錯体の安定度を向上させたと考えられる。

### 3. 酸素親和性

#### 3-1. DMF 中

Me-Imの $P_{50}$ は0.3 mmHg (25 °C)であり、これがT. G. Traylorの報告値と一致したことから、本実験の妥当性が確認された。 $P_{50}$ の値は、Et-His (0.2 mmHg) < Et-Im (0.3 mmHg)であった。軸塩基の $pK_a$ を比較してみると、ヒスチジンは6.0で、アセトアミドプロピルイミダゾールの値(6.6)に比べて低い。一般に、強い塩基性軸配位子は高い酸素親和性を与えることが知られており、この結果は $pK_a$ 値から予測した関係と一致しない。分子シミュレーションによりイミダゾールとポルフィリン環の配位角度を見積もったところ、ヒスチジルグリシル基に比べ、イミダゾリルプロピルアミノ基はやや歪みが大きいことが明らかとなった。ヒスチジルグリシル基の歪みのない配位が高い酸素親和性に寄与しているものと考えられる。

#### 3-2. HSA-heme 複合体 (水中)

HSA-heme複合体の $P_{50}$ は、Me-Im、Et-Im、Et-Hisとも同じ値(0.1 mmHg)を示し、軸塩基の違いによる酸素親和度の変化は見られなかった。しかし、AcH(Me-Im)の $P_{50}$ は0.4 mmHgで、プロトヘム系に比較すると高い(酸素親和性は低い)。ジアセチルデューテロポルフィリンの $pK_3$  (3.3)はプロトポルフィリンの値(4.8)に比べて小さく、ビニル基からアセチル基への変換が酸素親和性を低下させたものと考えられる。

### D. 結論

プロピオン酸側鎖がメチル基よりもエチル基、軸塩基としてはイミダゾリルアルキル基よりもヒスチジルグリシル基のほうが、安定な酸素錯体を与えることが明らかとなった。酸素親和度については、プロトヘム系の場合、置換基の変換による大きな差は認められなかったが、3,8-位側鎖をビニル基からアセチル基に変換すると、1/4に低下することがわかった。アルブミン-プロトヘム系は赤

血球に比べ酸素親和度が高いことから、腫瘍低酸素領域の酸素化などに有効であると考えられる。

(参考文献)

- 1) E. Tsuchida, et al., *Bioconjugate Chem.* 1999, 10, 82.
- 2) T. Komatsu, et al., *Bioconjugate Chem.* 2001, 12, 71.
- 3) A. Nakagawa, et al., *Chem. Lett.* 2003, 32, 504.
- 4) T. Komatsu, et al., *Bioconjugate Chem.* 2002, 13, 397.

## 1.6. 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

前節に示したように、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。こ

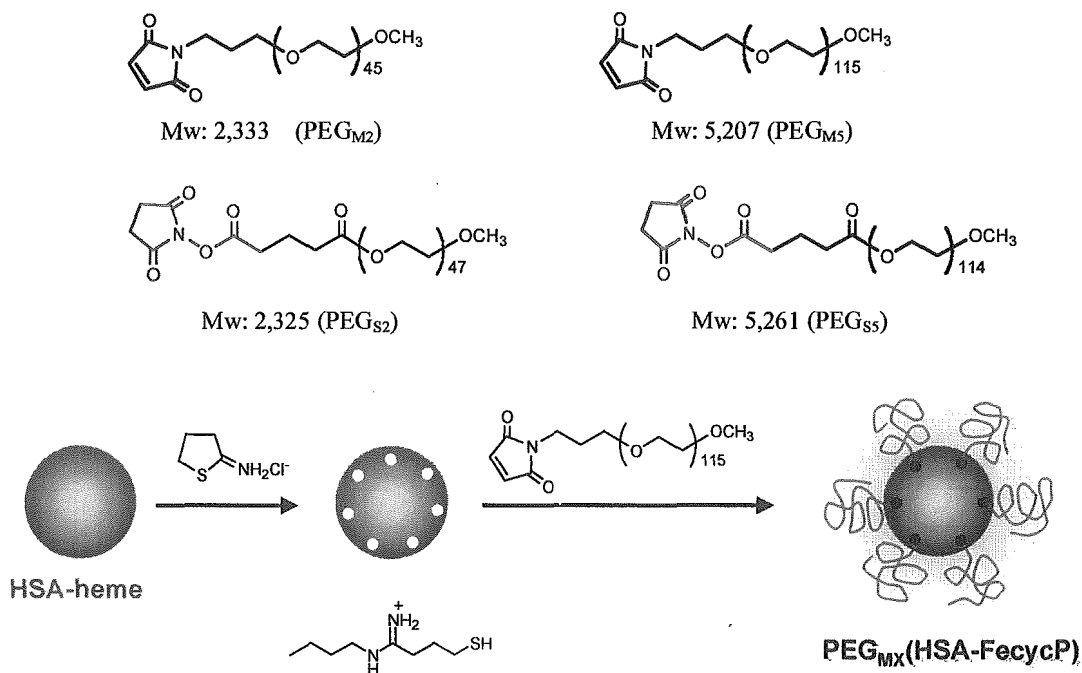
の系に残された課題には、ヘム血中滞留時間の改善がある。合成ヘムはアルブミンに疎水性相互作用で結合しているため、血流中へ投与した場合、他のリガンドとの交換、血清アルブミンへの移行などにより、ヘムが徐々にアルブミンから脱離する。

そこで本研究では、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



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