

フィブリノゲン、VWF がフィルターを通過する際に減少する、すなわちフィルター上にトラップされることが推測できる。以上のことから凝固検査においては超遠心分画処理が望ましいと考える。

#### E. 結論

今年度の検討より、HbV が影響を及ぼす検査項目が明らかとなった。これらの検査は全てフィルター処理または超遠心分画処理で HbV 除去後、コントロール値と同様な値に戻った。このことから HbV の光吸収および光散乱が検査時の吸光度測定に影響を与えていることが考えられた。また、今回採用したフィルター法では中性脂肪や血漿成分である凝固因子などをフィルター上でトラップしてしまうこと、超遠心分画除去法では小胞体除去が不十分であったことが明らかとなったため、今後最適な HbV 除去法について考慮すべきである。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. S. Oguchi, K. Ishii, T. Moriki, E. Takeshita, M. Murata, Y. Ikeda, K. Watanabe. Factor XII Shizuoka, a novel mutation (Ala392Thr) identified and characterized in a patient with congenital coagulation factor XII deficiency. *Thromb. Res.* **115**, 191-197, (2005)
2. H. Hattori, D. Ito, N. Tanahashi, M. Murata, I. Saito, K. Watanabe, N. Suzuki. T280M and V249I polymorphisms of fractalkine receptor CX3CR1 and ischemic cerebrovascular disease. *Neurosci. Lett.* **374**, 132-135 (2005)
3. Y. Matsubara, M. Murata, T. Hayashi, K. Suzuki, Y. Okamura, M. Handa, H. Ishihara, T. Shibano, Y.

Ikeda. Platelet glycoprotein Ib alpha polymorphisms affect the interaction with von Willebrand factor under flow conditions. *Brit. J. Haematol.* **128**, 533-539 (2005)

4. I. Isshiki, R. Favier, T. Moriki, T. Uchida, H. Ishihara, P. Van Dreden, M. Murata, Y. Ikeda. Genetic analysis of hereditary factor X deficiency in a French patient of Sri Lankan ancestry: *in vitro* expression study identified Gly366Ser substitution as the molecular basis of the dysfunctional factor X. *Blood Coagulation Fibrinolysis* **16**, 9-16 (2005)
5. K. Miyaki, S. Sutani, H. Kikuchi, I. Takei, M. Murata, K. Watanabe, K. Omae, Increased risk of obesity resulting from the interaction between high energy intake and the Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene in healthy Japanese men. *J. Epidemiol.* **5**, 203-10 (2005)
6. K. Miyaki, M. Murata, H. Kikuchi, I. Takei, T. Nakayama, K. Watanabe, K. Omae. Assessment of tailor-made prevention of atherosclerosis with folic acid supplementation: randomized, double-blind, placebo-controlled trials in each MTHFR C677T genotype. *J. Hum. Genet.* **50**, 241-8 (2005)
7. 高橋信一、村田 満：PFA-100 による血小板凝集能測定. *Thromb. Circ.* **13**, 90-94 (2005)
8. 村田 満：血小板機能と遺伝子多型（分子疫学の立場）*Thromb. Circ.* **13**, 1320-24 (2005)

(総説、著書など)

9. 鈴木美佐子、村田 満：血栓性血小板減少性紫斑病 わかりやすい免疫疾患. *日本医師会雑誌*. **134**(特別号), S316 - S319 (2005)

10. 松原由美子、村田 満. アテローム破綻に血小板はどこまで関与しているのか? *Vascular Medicine* **1**, 58-64 (2005)

11. 矢富 裕、村田 満、須貝真司: 座談会「日常診療における DIC」 *臨床医* **31**, 1748-1759 (2005)

12. 村田 満. 血栓症と SNPs 図説 血栓・止血・血管学 血栓症制圧のために 一瀬白帝 編 中外医学社 (2005)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)  
該当なし

分担研究報告書

人工赤血球の安全性向上に関する研究

分担課題： CE-MS を用いた Hb 小胞体投与後の組織内代謝動態の解析

分担研究者 合田 亘人 慶應義塾大学医学部 医化学教室 講師

研究要旨

Hb 小胞体(HbV)の投与が組織代謝動態に与える影響についてマウスを用いて、検討を行った。9~11 週齢の雄性 C57BL/6 の尾静脈よりマウスの循環血液量の 20%に相当する HbV あるいは空小胞体 (0.3ml/mice) を投与し、1、3、7 日後に肝臓をはじめとする各臓器を採取した。メタノール・クロロホルム抽出により肝臓から分子量 5kDa 以下の分画を採取し、キャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)にかけ全代謝物質(メタボローム)を測定した。その結果、HbV 投与後 1 日目に肝臓内 ATP 含量が約 36%まで急激に低下すること、またそれに伴い NAD/NADH が遅れて増加することが明らかになった。しかし、この ATP 低下は持続せず 7 日目には完全に元の状態まで回復した。一方、空小胞体投与では ATP 量の低下が遅延して認められ、投与後 7 日まで持続することが明らかになった。また、アミノ酸代謝については HbV 投与によりグルタチオン、タウリン、ヒポタウリンの低下など抗酸化作用を有する含硫アミノ酸代謝変動が認められた。さらに、空小胞体投与では、解糖系代謝産物の軽度の低下が投与後 7 日目に認められた。以上の結果より、HbV 投与後には肝臓内エネルギーの一過性の急激な消費と抗酸化作用を有する含硫アミノ酸代謝産物の低下が惹起されるものの、それ以外では肝臓内代謝機能にあまり大きな影響は与えないものと思われた。

A. 研究目的

人工赤血球である Hb 小胞体(HbV)は、末梢臓器の隅々まで酸素を効率よく運搬することを主眼におき開発され、これまでにその生体投与に関する有効性と安全性について様々な角度より検討がなされてきた。しかし、これまでの検討は主に予測される変化をもとに測定パラメーターを事前に決め解析しており、得られる情報には限界があった。HbV 投与による臓器の機能変化を包括的に理解するためには、DNA 塩基配列の網羅的解析(ゲノム解析)やタンパク質の網羅的解析(プロテオーム解析)のみならず、時々刻々と劇的に変化する細胞内代謝物質の網羅的解析(メタボローム解析)を行い理

解することが重要である。そこで平成 17 年度は、HbV 投与後の臓器代謝変動を近年開発されたキャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)を用いて解析すること目的とした。特に本研究では生体内の代謝の中心臓器である肝臓に絞って測定を行った。

B. 実験方法

9~11 週齢の C57/BL6 雄性マウスを使用した。実験当日まで食事および飲水は自由に行わせ、全ての処置を午前中に行った。まず、無麻酔下にマウスを保定器に固定後、尾静脈よりマウスの循環血液量の 20%に相当する HbV あるいは空小胞体

(0.3ml/mice) を投与した。小胞体投与前および投与後 1、3、7 日目に、頸椎脱臼により屠殺後速やかに脳、肺臓、心臓、肝臓、脾臓および腎臓を採取し-80°C に保存した。まず肝臓凍結組織 300mg を、内部標準物質として終濃度 300  $\mu$ M の L-methionine sulfone および 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)を含む 1ml のメタノール中でホモジナイズした。そこに 0.5ml の滅菌蒸留水を加えた後、激しく混和した。この懸濁溶液 0.3ml を新しいチューブに分け、0.2ml のクロロホルムを加えさらに激しく混和した。次に 4°C 下で 15,000 回転 15 分間遠心後上清を採取し、これをさらに分子量 5kDa 以下を分離できるフィルター付き遠心管 (Ultrafree-CL; Amicon)を用いて遠心を行い、5kDa 以下の分画を採取した。採取した検体は測定まで -80°C に保存した。測定前に採取した 5kDa 以下の分画 50  $\mu$ l を冷却機能付き真空遠心機にて液相を蒸発させた後ペレットを再度蒸留水 50  $\mu$ l に懸濁した。これを Agilent Technologies 社の CE-MSD システムにかけ測定を行った。本システムでは、陽イオンおよびヌクレオチドはフューズドシリカキャピラリーを用いて、陰イオンは SMILE(+)キャピラリーを用いて測定を行った。測定結果を Agilent Technologies 社のケミステーションを用いて解析した。

倫理的配慮：実験動物に関しては、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. 研究結果および考察

本実験では CE-MSD システムを用いて、34 種の陰イオン、56 種の陽イオンおよび 31 種のヌクレオチドを一つの検体から一挙に測定を試みた。陰イオン低分子化合物は主に、解糖系、TCA 回路およびペントースリン酸回路の代謝産物を、陽イオン化合物はアミノ酸代謝産物を、ヌクレオチドは ATP、CoA 体をはじめとする代謝産物が含まれて

いる。しかし、親水性の低い脂質代謝産物は本方法ではほとんどイオン化されないため測定が不可能である。また、測定感度は解析上 nM オーダーまで可能と考えられた。

この方法を用いて、HbV あるいは空小胞体投与後のマウス肝臓における代謝変動を経時的に解析した。その結果を **Table 1** に示す。HbV 投与により惹起される陰イオン代謝産物の動態変化については、TCA 回路のフマル酸、リンゴ酸が投与後 1 日目より 7 日目まで持続的に上昇する傾向が認められた。一方、尿素回路のアロステリック因子である N-アセチルグルタミン酸は投与後より持続的に低値を示すことが明らかになった。空小胞体投与では、TCA 回路のフマル酸、リンゴ酸の上昇は一過性で、グルコース 6 リン酸以下乳酸に至るほぼ全ての解糖系代謝産物の低下が投与後 7 日目に認められた。

陽イオン代謝産物への影響については、グリシン、タウリン、ヒポタウリンの持続性の低下と投与後 7 日目の還元型グルタチオンの低下が認められた。一方、空小胞体投与ではグリシンとグルタチオンの挙動は共通して認められたが、タウリンとヒポタウリンの低下は投与後 7 日目のみ認められた。

最後に、HbV 投与によるヌクレオチド・CoA 体代謝物への影響については、AMP、GMP の投与後 1 日目の一過性上昇、UDP、GDP の投与後 1 日目の一過性減少、ATP、GTP、UTP および CTP の投与後 1 日目から 3 日目に掛けての減少が認められた。また、アセチル CoA の 3 日目の減少とマロニル CoA の 1~3 日目の減少も認められた。さらに、ADP/ATP の投与後 1 日目の急激な増加と NAD/NADH の時間依存性の緩徐な増加が明らかになった。一方、空小胞体投与では CoA 体の変動は HbV 投与時とほぼ同様な変動を示したが、ヌクレオチド類の変動は遅延して認められた。また、ADP/ATP と NAD/NADH は投与後 7 日目に向かい増加することが明らかになった。

以上の結果より、HbV 投与後には肝臓内エネルギーの一過性の急激な消費と抗酸化作用を有する含硫アミノ酸代謝産物の低下が惹起されるものの、それ以外では肝臓内代謝機能にあまり大きな影響は与えないものと思われた。この現象は、HbV 投与により肝臓内で一過性の酸化ストレス生じることでエネルギー産生系の傷害が起きたものと考えられる。また、タウリンやヒポタウリンの低下が持続した原因は小胞体の脂質成分の負荷が一時的に起き、その結果余分な脂質を胆汁中に排泄するために生じたものと考えられる。しかし、詳細な分子メカニズムについては別の角度からの検索が必要であり今後の課題として残された。

#### D. 結語

今回利用した網羅的メタボローム解析技術は、時々刻々に劇的に変化する組織内代謝動態を正確に理解するツールとして非常に有用であることが明らかになった。今回行った HbV の生体への投与方法では何らかの負担を生体に強いることになるが、排泄経路の活性化と一過性のエネルギー消費の増加以外に大きな影響をもたらすことが無いことが明らかになった。しかし、一方で空小胞体単独投与ではエネルギー産生系の異常に繋がる代謝変動が遅延して認められることが明らかになってきた。この点については、長期間の代謝変動の追跡と小胞体制剤投与量との相関について詳細な検討を行う必要があると考えられる。また、今後肝臓以外の臓器に対する影響を詳細に解析し、生体機能全体に及ぼす変化を検討する必要がある。

**Table 1-1** CE-MS による肝臓代謝動態の解析結果 (陰イオン・陽イオン)

陰イオン	Pre	Hb小胞体	空小胞体	Hb小胞体	空小胞体	Hb小胞体	空小胞体
		day 1	day 1	day 3	day 3	day 7	day 7
Pyruvate ( $\mu$ M)	6.584±1.576	9.985±3.957	9.402±20.65	11.31±3.221	9.575±3.582	8.988±4.823	6.850±0.793
Lactate	1902±37.47	1610±77.59	1972±304.2	1574±379.1	1791±242.4	1866±43.14	1349±68.44
$\alpha$ -ketobutyrate	7.101±0.065	5.027±0.381	5.666±2.747	<4.077	4.049±0.824	<8.437	<2.718
$\beta$ -Hydroxybutyrate	5.415±3.119	6.489±2.974	3.726±2.437	<4.996	4.369±1.274	6.015±7.058	<13.70
Fumarate	15.90±2.303	34.39±13.34	22.18±3.898	32.36±11.57	42.80±5.725	30.18±10.45	24.93±4.007
Succinate	214.5±18.79	215.4±10.23	217.5±23.14	233.2±8.716	223.3±23.37	224.4±33.26	176.2±8.394
Malate	49.22±9.710	98.09±30.79	55.61±31.41	109.7±22.46	126.6±48.58	84.78±55.33	55.82±13.27
2-Oxoglutarate	0.872±0.082	0.641±0.258	<0.626	<0.746	<0.552	ND	ND
Dihydroornotate	ND	ND	ND	ND	<0.463	ND	ND
Phosphoenolpyruvate	8.992±1.489	8.240±1.643	9.822±1.142	7.926±2.394	10.03±1.353	7.058±0.070	5.661±0.670
Dihydroxyacetonephosphate	<0.500	<0.526	<0.510	<0.569	<0.687	<0.427	<0.567
Glycerophosphate	386.1±20.16	377.2±48.07	317.1±26.64	335.3±35.90	340.3±39.98	451.4±22.85	396.5±6.835
cis-Aconitate	0.466±0.205	0.462±0.164	0.842±0.288	0.891±0.259	0.392±0.333	<0.298	0.305±0.037
Carbamoyl aspartate	0.524±0.021	<0.423	0.488±0.248	<0.289	0.364±0.052	ND	<0.461
3-Phosphoglycerate	13.47±1.529	13.47±1.501	15.25±1.210	11.19±5.680	15.63±2.508	10.14±3.212	7.963±2.299
2-Phosphoglycerate	1.014±0.078	1.208±0.306	1.796±0.962	<0.834	1.408±0.217	1.328±0.309	<0.799
N-Acetylglutamate	13.41±1.173	6.785±0.439	9.757±2.156	8.236±2.004	<9.395	7.344±1.989	6.252±0.793
Erythrose 4-phosphate	1.198±0.080	<0.994	<2.968	ND	<0.740	ND	<2.1025
Porphobilinogen	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ribulose 5-phosphate	7.494±4.322	3.923±0.727	2.159±1.676	2.637±1.103	3.079±1.051	4.206±3.309	<10.68
Ribose 5-phosphate	ND	ND	ND	ND	ND	<0.619	ND
Pyridoxal 5'-phosphate	3.664±0.159	3.339±0.305	3.831±1.090	2.529±1.968	3.627±0.768	5.642±1.478	2.384±0.621
Galactose-1-phosphate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
D-Glucosamine 6-phosphate	2.397±0.425	2.929±0.557	<2.420	ND	2.236±0.737	<4.472	<1.165
Glucose 1-phosphate	12.30±1.097	13.43±1.769	12.36±2.277	11.21±0.964	12.76±2.863	13.94±3.502	11.05±0.972
Fructose 6-phosphate	45.30±0.004	48.15±2.325	41.75±3.453	44.60±5.899	48.67±6.212	47.42±5.838	36.07±1.510
Glucose 6-phosphate	104.8±6.141	97.16±2.866	94.47±15.76	97.56±17.86	102.2±9.951	103.7±12.22	85.66±4.099
2,3-Diphosphoglycerate	32.14±5.057	36.92±14.48	37.36±6.125	22.41±14.59	38.27±6.438	20.22±6.925	13.81±4.799
6-Phosphogluconate	5.274±1.058	6.963±0.546	6.144±1.091	5.653±0.272	7.276±1.186	5.854±0.748	5.702±0.502
Arginosuccinate	ND	ND	ND	ND	ND	<1.424	ND
Fructose 1,6-diphosphate	1.161±0.193	1.205±0.170	1.320±0.266	1.086±0.090	1.134±0.247	0.902±0.246	0.653±0.096
Fructose 2,6-diphosphate	20.92±4.347	14.67±1.540	18.45±4.084	11.65±4.630	12.74±1.678	14.79±2.945	13.06±1.571
5-Phosphoribosyl-pyrophosphate	13.72±0.625	9.190±1.926	<11.65	<13.64	11.80±3.418	<16.69	<18.85
Adenylosuccinate	1.279±0.088	6.419±3.925	1.741±0.837	4.178±1.035	5.227±0.864	2.960±2.351	3.145±0.107

陽イオン	Pre	Hb小胞体	空小胞体	Hb小胞体	空小胞体	Hb小胞体	空小胞体
		day 1	day 1	day 3	day 3	day 7	day 7
Urea ( $\mu$ M)	793.6±83.65	697.9±66.46	973.1±281.8	1203±418.7	894.5±50.15	1022±327.0	836.7±186.3
Gly	656.9±27.83	397.1±39.42	474.2±19.60	465.0±56.44	454.8±14.23	545.2±72.07	423.7±22.98
Pyridine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pyrimidine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L-Ala	485.1±46.57	431.1±75.28	449.5±39.38	491.0±79.44	463.8±20.12	541.6±87.77	406.5±30.26
GABA	12.05±2.041	11.99±2.552	11.85±1.565	12.41±0.475	11.18±0.802	13.91±1.370	10.83±0.560
Ser	67.08±5.260	54.75±9.848	49.44±3.504	68.40±7.083	64.61±10.31	64.37±5.522	60.81±3.404
Hypotaurine	283.3±24.69	137.3±55.26	193.9±59.36	177.3±40.05	228.2±52.16	157.8±19.03	107.1±9.756
Uracil	76.49±2.436	60.29±4.337	95.16±33.69	83.77±17.16	54.88±2.550	91.43±23.33	63.30±15.58
Creatinine	1.717±0.013	1.753±0.025	2.131±0.258	2.190±0.268	2.055±0.295	1.899±0.273	1.700±0.019
Dihydrouracil	1544±165.4	1699±422.6	2620±1591	4789±4334	1428±243.8	3383±1747	3104±2085
Pro	29.77±0.626	20.79±6.639	24.82±5.846	22.92±2.299	25.84±3.725	26.47±7.789	24.23±1.784
Val	65.59±0.513	53.56±10.70	51.14±6.226	53.05±2.351	67.21±2.002	42.79±6.166	56.49±2.344
Thr	50.52±3.411	45.30±11.15	42.13±4.789	49.82±1.196	53.76±4.850	38.94±5.242	42.74±2.092
Cys	<1.300	1.559±0.415	<2.218	<6.140	3.702±0.283	ND	<1.417
Taurine	932.1±15.15	670.6±237.2	1025±206.6	310.6±100.0	771.0±227.0	438.7±224.6	553.6±68.20
Oxoproline	4.737±0.453	5.536±0.540	7.179±1.581	7.454±1.988	5.179±0.633	9.250±2.192	7.363±0.695
5-Aminolevulinata	9.211±0.592	10.91±2.570	11.15±1.891	9.174±0.702	8.182±0.796	10.53±2.578	10.24±0.661
Creatine	28.03±6.119	35.72±3.991	49.53±14.27	66.42±21.39	57.69±22.41	63.13±23.55	50.28±4.436
Ile	34.44±0.816	24.36±4.828	24.29±2.680	22.16±1.561	29.99±3.391	20.70±2.286	28.69±0.923
Leu	62.71±2.632	52.86±13.16	48.38±8.138	51.37±2.210	60.70±8.245	50.58±8.086	59.84±3.454
Omithine	49.13±0.557	42.38±8.286	41.42±9.845	46.80±3.035	48.38±4.366	39.28±10.11	39.17±3.609
Asn	17.05±1.840	17.30±4.018	15.16±3.343	15.84±0.916	15.21±2.795	20.16±1.552	20.36±1.273
Asp	61.17±1.167	65.31±10.79	54.73±6.519	73.30±8.711	60.71±13.20	89.70±10.40	80.73±3.406
Adenine	2.450±0.086	2.471±0.049	2.656±0.353	4.023±0.657	3.203±0.072	2.999±0.477	3.253±0.293
Homocysteine	ND	ND	<3.862	ND	ND	ND	<2.952

Table 1-2 CE-MS による肝臓代謝動態の解析結果 (陰イオン・ヌクレオチド)

陽イオン	Pre	Hb小胞体	空小胞体	Hb小胞体	空小胞体	Hb小胞体	空小胞体
		day 1	day 1	day 3	day 3	day 7	day 7
Hypoxanthine	5.095±0.831	6.468±1.810	2.984±1.671	6.527±4.062	6.872±5.395	8.080±5.184	11.14±1.887
Spermidine	8.030±0.361	7.98±0.657	9.925±2.149	7.888±1.168	7.758±0.588	8.813±1.351	7.198±0.789
Lys	68.05±2.722	60.26±19.56	46.88±8.603	47.97±11.15	63.77±21.02	42.35±5.428	51.39±6.559
Gln	523.7±11.52	491.8±53.20	438.1±68.28	622.2±218.4	434.3±42.46	672.4±72.29	623.1±95.02
Glu	434.1±69.37	553.6±71.22	565.6±180.5	659.8±25.90	455.5±166.6	697.8±83.61	477.2±85.52
Met	5.329±1.042	5.141±1.762	4.992±0.778	4.395±0.418	6.399±1.091	5.577±1.334	5.787±0.337
Guanine	ND	<0.71	<1.19	<1.960	1.127±0.970	<1.564	<1.970
His	66.99±1.532	60.00±6.355	61.40±5.555	73.98±16.66	64.82±11.27	70.03±17.25	63.77±5.552
Allantoin	13.45±0.514	20.18±6.729	19.32±4.880	25.74±4.197	23.98±2.851	34.33±14.71	26.78±1.033
L-Carnitine	30.59±1.928	22.28±2.513	29.73±6.300	34.19±4.176	26.97±3.048	28.92±7.699	23.82±1.651
Phe	20.86±0.091	17.80±4.660	18.32±2.195	17.24±1.304	18.70±3.655	18.20±3.618	19.37±1.187
Pyridoxine	0.151±0.001	0.1473±0.010	0.264±0.174	0.307±0.134	0.094±0.063	0.346±0.182	0.236±0.056
Arg	1.400±0.123	1.722±0.600	1.562±0.251	2.523±0.382	2.150±0.562	2.606±1.163	2.032±0.156
Citrulline	8.299±0.403	5.245±0.464	9.150±3.848	10.94±3.926	9.992±2.231	10.47±4.154	8.904±0.957
Tyr	19.34±1.739	21.20±5.097	21.73±1.088	25.30±0.885	30.06±4.653	22.03±0.942	21.89±2.120
DOPA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Spermine	2.508±0.083	2.028±0.415	2.447±0.550	1.287±0.556	2.003±0.059	2.292±0.112	1.579±0.285
Trp	7.020±0.027	6.472±13.99	6.268±0.754	5.779±0.859	6.832±0.437	5.487±0.459	6.147±0.220
Cystathionine	2.489±0.185	1.580±1.154	1.689±0.814	3.234±1.424	3.638±1.004	<1.709	<2.046
5,6,7,8-tetrahydrobiopterin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Thymidine	0.772±0.230	<0.504	1.392±0.993	<1.999	1.624±0.232	2.790±1.329	2.247±0.383
Cytidine	1.518±0.086	1.101±0.151	1.150±0.382	1.337±0.280	1.291±0.113	1.735±0.357	1.847±0.136
Uridine	9.405±0.680	14.54±4.084	14.64±3.406	16.79±7.881	10.16±2.159	15.74±3.150	15.05±3.009
Adenosine	29.39±1.287	29.22±2.700	40.43±11.79	51.80±22.24	30.66±1.857	55.38±22.89	50.74±10.19
Inosine	29.77±4.422	26.76±7.144	20.59±11.65	21.71±3.289	38.26±25.97	54.92±2.716	47.13±11.47
Guanosine	6.177±0.264	8.144±0.772	7.490±1.687	8.376±0.825	6.980±0.977	8.658±0.875	9.110±0.460
Glutathione, reduced form	1481±46.76	1387±276.5	1395±153.9	1136±114.5	915.7±112.1	920.4±125.0	830.2±23.45
S-Adenosyl-L-homocysteine	14.06±2.414	9.723±19.41	11.55±1.497	11.59±0.833	12.40±1.501	9.698±2.652	8.062±0.385
S-Adenosyl-L-methionine	30.99±3.087	24.05±4.618	27.85±11.05	26.80±5.749	19.96±3.833	30.72±6.859	29.50±3.737
Glutathione, oxidized form	529.8±101.5	377.0±12.20	409.3±12.54	534.1±80.82	598.8±103.4	370.7±5.487	458.3±47.31

ヌクレオチド 類	Pre	Hb小胞体	空小胞体	Hb小胞体	空小胞体	Hb小胞体	空小胞体
		day 1	day 1	day 3	day 3	day 7	day 7
Citrate (μM)	11.23±0.144	14.08±7.439	19.93±8.630	18.19±3.210	17.48±11.16	17.87±0.697	14.58±4.060
Isocitrate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
dUMP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TMP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
UMP	70.90±7.918	106.4±28.80	85.32±8.746	72.08±11.70	75.71±20.06	87.24±8.407	86.88±5.869
cAMP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
cGMP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AMP	281.7±13.43	442.9±102.8	324.1±39.32	385.0±124.2	335.3±85.90	357.2±5.416	420.7±42.52
IMP	118.2±4.851	124.2±23.87	100.8±17.06	104.4±17.25	121.0±30.47	155.7±1.818	157.0±7.691
GMP	41.35±5.407	79.51±10.77	60.87±18.55	62.12±15.03	61.83±14.14	57.53±12.59	72.71±2.333
Xanthosine 5-monophosphate	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NADPH	5.916±0.272	3.517±1.927	3.699±0.907	3.687±0.361	1.951±2.318	3.880±0.958	<2.934
CoA	19.39±0.986	13.41±1.216	12.72±2.236	8.661±1.079	5.407±2.982	14.29±3.909	9.423±0.959
UDP	37.51±0.278	18.90±5.581	35.45±7.536	20.15±4.281	23.57±5.045	33.37±13.14	24.43±1.702
Acetyl CoA	11.20±1.537	8.790±1.857	5.801±0.730	3.865±0.808	3.031±0.189	8.432±2.626	5.893±0.337
n-Propionyl CoA	0.193±0.192	0.307±0.091	0.165±0.094	<0.158	0.140±0.052	0.276±0.114	0.1737±0.034
ADP	303.5±17.38	208.4±43.37	293.3±63.56	213.6±27.54	204.6±60.79	282.7±46.36	224.7±20.05
Malonyl CoA	12.95±1.095	4.827±1.392	<8.103	6.955±0.882	6.251±3.193	8.660±4.703	<6.044
Succinyl CoA	0.313±0.009	<0.168	ND	<0.122	<0.122	<0.136	<0.099
GDP	40.97±4.016	22.39±4.606	35.65±12.02	26.27±7.584	28.28±8.280	37.79±12.38	29.74±2.386
Flavin mononucleotide	0.757±0.138	0.698±0.113	<0.592	<0.552	0.558±0.055	0.749±0.181	<0.840
CTP	6.052±1.943	1.228±0.556	3.308±1.901	1.816±0.820	2.278±1.355	3.813±1.593	2.040±0.540
UTP	45.09±13.69	7.994±2.966	23.13±14.51	11.88±4.613	14.52±5.970	24.54±15.81	15.31±5.366
ATP	264.5±44.27	94.73±27.47	210.8±87.76	122.7±37.14	127.3±56.62	208.9±98.37	137.3±25.52
GTP	34.97±7.608	10.77±2.501	25.06±16.79	15.02±3.811	16.80±6.875	25.68±15.18	18.14±6.783
UDP-glucose	98.69±8.760	123.3±8.996	110.0±26.46	112.3±7.957	111.2±2.920	123.2±15.88	134.0±12.40
UDP-N-acetylglucosamine	81.14±5.595	95.28±8.616	91.90±6.695	84.85±6.835	70.75±3.276	92.67±0.471	98.20±2.016
NAD	164.2±5.593	102.2±20.26	127.5±15.18	121.2±8.140	85.46±29.72	141.9±30.20	114.9±11.00
NADH	160.5±6.553	104.3±9.579	83.61±10.38	95.08±11.41	63.80±27.30	93.78±5.525	74.65±9.488
NADP	43.95±0.512	39.01±3.179	40.96±6.229	38.76±1.555	33.59±6.015	43.35±9.559	40.98±2.639
FAD	16.12±1.085	13.27±0.723	14.34±2.355	10.91±0.462	10.89±0.369	14.17±1.146	14.49±1.121

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. M. Ishikawa, M. Kajimura, T. Adachi, K. Maruyama, N. Makino, N. Goda, T. Yamaguchi, E. Sekizuka, M. Suematsu. Carbon monoxide from heme oxygenase-2 is a tonic regulator against NO-dependent vasodilatation in the adult rat cerebral microcirculation. *Circ. Res.*, 97, e104-14 (2005)

2. K. Fujii, T. Sakuragawa, M. Kashiba, Y. Sugiura, M. Kondo, K. Maruyama, N. Goda, Y. Nimura, M.

Suematsu. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator of biliary bicarbonate excretion in the rat liver. *Antioxid Redox Signal.*, 7, 788-794 (2005).

3. Y. Sugiura, M. Kashiba, K. Maruyama, K. Hoshikawa, R. Sasaki, K. Saito, H. Kimura, N. Goda, M. Suematsu. Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. *Antioxid. Redox Signal.*, 7, 781-787 (2005).

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

特になし



分担研究報告書

人工赤血球の安全性向上に関する研究

分担課題：人工赤血球の安全性評価、治験計画作成に関する研究

分担研究者 高折 益彦 東宝塚さとう病院 名誉教授

研究要旨

救急医学学会評議員を対象に人工酸素運搬体（人工赤血球）の臨床応用に関するアンケート調査を行った。その結果から、臨床使用を期待するものなお人工酸素運搬体についての認識が希薄であることが明らかになった。また人工酸素運搬体の製造が確立されてきたことをふまえてその製造に関する基本的留意事項の作成を行った。

A. 研究目的

- 1) 救急医学学会の評議員の所属する施設を対象として人工酸素運搬体 (Hb 小胞体 : HbV) の使用を視野に入れた緊急輸血の実体、および人工酸素運搬体の開発に関する見解を調査した。
- 2) 日本血液代替物学会会員の賛同が得られる HbV の物理・化学・生物学的性格の基本となる条件、製造上の必要事項、特にその製造物の安定性、均一性、無菌性、ならびに製造過程における倫理上遵守すべき基本的留意事項を作成することを目的とした。

B. 研究方法

- 1) わが国 186 救急医療施設を対象としてアンケートを送付し、緊急輸血の実体、および HbV の開発に関する見解を調査した。
- 2) 日本血液代替物学会の理事会を 3 回にわたり開催し、原案を作成、これを同学会総会、ならびにパネルディスカッションにおいて討論した。さらにこの結果をふまえて最終案を作成、これを理事会に再び上程した。

C. 研究結果

- 1) アンケートに対して 74 施設から回答が得られた。

その結果、緊急医療では血液型検査をせずに直に使用できる、また血液型の取り違い、感染症などの事故がないことで HbV への期待が大きいことが明らかになった。また現在の緊急輸血症例の 51.5% の輸血量が 1,000ml 以内であることから、その多くは HbV を用いて対応できることが認められた。さらに HbV 投与後の機能維持時間についても要望の 77.1% に対応できることも認められた。

2) 日本血液代替物学会総会、ならびにパネルディスカッションにおいて討議された結果、HbV の製造に関する基本的留意事項については会員からその大筋での同意を得ることができた。ただ単位体積あたりの酸素含有量に関して、一部の会員から規定してしまうことは不必要ではないかとの意見もあった。すなわち実際に人工酸素運搬体を生体に投与して、生体末梢組織での酸素代謝が十分行われるならばそれで十分ではないかとの意見も提案された。しかし生体血液中の赤血球の代謝をするものとして、生体の代償機構を解することなく物理・化学的な条件として備えるべき機能として HbV の酸素含有量は必要であり、この留意事項に挿入することとした。

D. 考察

- 1) 救急部診療で HbV に期待されるところが大きい

ことが明らかになった。しかしなお啓蒙が十分でないことも認められた。投与後の血液中機能維持時間は 24 時間で十分とするものが 77.1%であったことから現在開発されている HbV が臨床の要望に十分対応することが認められた。また凝固因子を含まない HbV の使用量の制限範囲内で十分に実地臨床に対応できることが認められた。

2) HbV の作製・製造に関する基本的留意事項はあくまで“留意事項”であり、これに示した諸条件は望ましい事項であって、これに一致しないものは HbV として認められないというものではない。実際に生理的赤血球の代替機能を末梢織酸素代謝面で機能することが重要であることに注意したい。

#### E. 結論

現在開発中の人工酸素運搬体は十分救急医療に有効であることが認められる。また今回提示された人工酸素運搬体の製造に関する基本的留意事項はほぼ医療界、工業界での承諾が得られた。

#### F. 研究発表

1. 論文発表
  1. M. Takaori. Approach to clinical trial considering medical ethics and efficacy for HbV, Liposome encapsulated hemoglobin vesicle. *Artif. Cell, Blood Substit. Biotechnol.* **33**, 65-73, (2005).
  2. 高折益彦. “人工血液運搬体政策に関する基本的留意事項(案)”を解説する. *人工血液* **13**. 12-18 (2005)
  3. H. Sakai, H. Horinouchi, M. Yamamoto, E. Ikeda, S. Takeoka, M. Takaori, E. Tsuchida, K. Kobyashi. Acute 40% exchange transfusion with Hb-vesicles (HbV) suspended in recombinant human serum albumin solution: Degradation of HbV and erythropoieses in rat spleen for 2 Weeks. *Transfusion* **46**, 339-347 (2006).

分担研究報告書

人工赤血球の安全性向上に関する研究

- 分担課題： 1. Hb小胞体の脳神経組織への影響  
2. 各種血漿増量剤に分散希釈させたときのHb小胞体の溶液粘度  
3. Hb小胞体と修飾Hb(非細胞型)溶液の配位子結合反応の相違  
4. 脾臓微小循環動態の計測

分担研究者 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 酒井 宏水 早稲田大学 理総研 助教授

研究要旨

(1) Hb小胞体(HbV)投与の脳神経組織への影響を検討した。脳虚血により血液脳関門の透過性亢進が生起しても、HbVはこれを透過しないことが明確になった。更に、血液脳関門の破綻(脳内出血)による脳組織とHbVの接触がどう影響するかを検討するため、側脳室内へHbVを直接注入(20 $\mu$ L)した。行動学的変化、Hb分解速度は、何れも赤血球注入の場合と同等で、問題所見は認められなかった。(2) HbV分散液はゼロに近い膠質浸透圧なので、大量投与に際しては、代用血漿剤併用が想定され得る。従来、アルブミン(HSA)、あるいは遺伝子組換えアルブミン(rHSA)を用いて、投与試験を実施して来た。しかし、臨床現場では様々な代用血漿剤の使用例もあるので、HbVに混合した溶液の粘弾性の挙動を解析した。HbVのデキストラン、高分子量ヒドロキシエチルスターチ(Mw. 200 kDa)、修正ゼラチンに分散させた場合は、粘度上昇が確認された。(3) HbVおよび非細胞型Hb溶液(SFHb, PolyHb)について、NOとCOの結合速度をストップフロー法により測定したところ、NO結合速度は顕著に遅くなるが、CO結合速度は大きな相違が観測されなかった。(4) HbVは最終的に細網内皮系にて捕捉代謝される。HbV投与後(20 mL/kg)の脾臓の微小循環動態は、血流速度は投与1日後に低下する。しかし、3日後には完全に回復した。組織病理学的観察から、捕捉されたHbVの像が見られる以外は微小血管系に障害は認められなかった。

1. Hb小胞体(HbV)の脳神経組織への影響

A. 研究目的

Hb小胞体(HbV)は、赤血球と同等の酸素運搬機能を有し、更に主要臓器（肝臓、脾臓、腎臓、呼吸器系、循環器系など）への顕著な副作用が無いことが、これまでの齧歯類への投与試験により確認されてきた。しかし脳神経系への影響に関する解

析は報告例が無い。臨床試験開始に当たり、安全性の確認作業は重要であるので、医薬安全総合研究推進事業(外国の研究機関等への委託事業)の一環として、猫での脳実験に慣れておられるProf. M. Okamoto (Dept. Pharmacology, Weill Medical College of Cornell Univ.)との共同研究を計画し、今年次が3年目であるが引き続き詳細所見を獲得するための検討を実施した。

最初に、出血ショック状態のラットに対し、HbV 投与による蘇生試験を実施、ショック状態からの回復を観察すると共に、脳組織の病理学的検討から、血液脳関門(Blood Brain Barrier, BBB)の透過性の確認を目的とした。特に頸動静脈の結紮により生起する梗塞巣における、HbV の分布について観察を試みた。

更に、脳の外傷や梗塞などにより BBB が破壊されると、ミクログリア細胞が誘導され、肝臓 Kupffer 細胞よりも強い貪食作用の生起が観測される。この場合 HbV 由来の Hb および鉄の毒性が出現すると考えられるが、その程度は赤血球と同等であると予想される。しかし HbV の脂質膜には赤血球膜と相違する成分が含まれるので、異なる作用を示す可能性もある。これらを解明するため、BBB が破壊されて HbV が直接的に脳神経細胞に接触した状態のモデルとして、HbV をラット側脳室に直接注入した。その後の行動学および組織病理学的変化を長期間観察し、脳神経細胞への影響と HbV の代謝過程の解明を目的とした。

## B. 方法

### a. 血液脳関門の透過性について

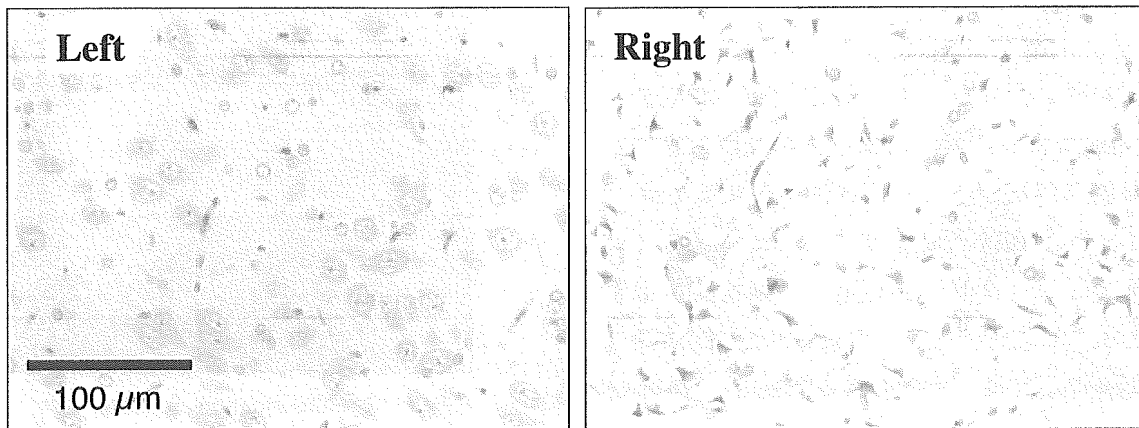
雄性 Wistar 系 rat(体重約 250 g)を、1.5%-Sevoflurene 麻酔下、自発呼吸とし、右頸動静脈にカテーテルを挿管した。頸動脈より全血液量(56mL/kg)の 50%を脱血し、15 分経過後に試料溶液を投与した。試料溶液は、ヘモグロビン小胞体(HbV)を 5%リコンビナントアルブミン(rHSA)に分散させた溶液: HbV/rHSA ([Hb] = 8.6 g/dL, n = 8)、脱血液(n = 8)、5%rHSA 溶液とした(n = 8)。測定時間は、脱血前、脱血後、投与直後、1hr、3hrs、6 hrs 後とし、測定項目は、血液ガス組成、乳酸値、Hct 値、血圧、心拍数、呼吸数、HbV の濃度、メト化率、血球数とした。測定が終了(6 時間後)した時点で血液を約 6 mL 採取し、採血管に入れて遠心分離し、血球成分を除去した。血清を超遠心分離にかけて HbV を除去し、血液生化学的検査を実施。摘

出脳をホルマリン固定、H/E 染色と抗ヒト Hb 抗体を用いた免疫染色 (Sakai et al., *Am. J. Pathol.* **159**, 1079-1088, 2001)を行い、組織病理学的検討を実施した。

### b. 脳組織への直接注入

Sevoflurene 麻酔下のラットを stereotaxic frame に固定し、頭部の毛剃後、皮膚に 70% ethanol 及びイソジンを塗布し殺菌処理した。頭骸骨上 bregma を確認、caudate nucleus に値する位置(4 mm lateral to midline) をマーク、1mm 径の孔を開け、注射針を右尾状核固定位置まで挿入させた(coordinates: 2mm anterior, 4 mm lateral to bregma and 5 mm venta from the surface)。試料溶液(HbV/rHSA, rRBC/rHSA, rHSA) 20  $\mu$ l を、マイクロシリンジを用い注入速度 4  $\mu$ L/min で注入投与した。3 分間放置後、針を除去し Gelform を孔に入れて孔膜を閉じ、脳脊髄液の漏出を抑えた。ドリル孔は歯科用セメント(トクヤマ イオノタイト)で封鎖した。筋肉、皮膚組織を縫合、抗生物質セフメタゾン及び鎮痛剤レペタンを投与した。1, 3, 7 日後に麻酔安楽死後、脳を摘出し、直ちに 10%ホルマリンで固定した。これを 2 mm 毎の 4 枚のスライスとし、パラフィン固定。組織は H/E 染色、Berlin blue 染色などを実施し、観察した。回復後の行動観察を行い、次の項目の運動機能疾患について検討した。

- ・ 驚愕反応(顔面に空気を吹付けた際の反応)
- ・ 立毛
- ・ 旋回行動
- ・ 後足の収縮力(足を引張った際の抵抗力)
- ・ 運動失調, 足取り (床面での不安定な歩行)
- ・ 歩行能力 (1.5cm 幅の角材上の歩行)
- ・ 後足虚弱 (1.5cm 幅の角材上の歩行の際に足を踏み外すか否か)
- ・ 前足での吊下り能力 (4mm 幅の棒に吊り下



**Fig. 1.** Immunohistochemical analysis with anti-human Hb antibody to confirm whether HbV penetrates through BBB. (Left) Normal brain. (Right) Ischemic damaged brain. HbV was only seen within the blood vessels and none was found penetrated into the both normal and ischemic brain tissues. Therefore, the permeability of HbV through BBB seemed negligible even after the BBB would be damaged. The particle size of HbV would be important.

がる時間)

### C. 結果および考察

#### a. 血液脳関門の透過性について

rHSA の単独投与群は 8 匹中 2 匹が 6 時間を待たずに死亡した。HbV/rHSA 投与群では全例が 6 時間生存した。平均動脈血圧は脱血前約 100 mmHg であったが、脱血後に約 30 mmHg 程度まで低下。HbV/rHSA 投与により 98 mmHg にまで回復、そのまま 6 時間安定値を推移した。これは rHSA 単独投与群(74 mmHg)に比較して有意に高い値で、脱血液投与群と同等(92 mmHg)であった。血液ガス組成については、脱血後に PaO<sub>2</sub> の上昇と PaCO<sub>2</sub> の低下、pH と Base excess の低下を認めたが、HbV/rHSA 投与 1 時間後には、ほぼ脱血前の値に回復、優れた蘇生効果を認めた。

脳の組織病理学的検討の結果、先ず H/E 染色では、左大脳半球には異常は全く認められなかったが、右大脳半球のみ顕著な浮腫(edema)および核濃縮(pyknosis)が認められた。これは、右頸動静脈の結紮のために、右脳にのみ虚血性病態が見られたと考えられる。出血ショックにした後、蘇生液投

与なしで放置すると 3 時間以内に全例が死亡したが、この場合の脳組織に虚血性の明確な病態を認めないことから、蘇生後に一定時間経過によって形態的に確認が出来る病態に達したものと考えられる。しかし最も重要な観点は、HbV 投与によりこの病理的反応が rHSA 群に比べて著しく減少されたと考えられることである。rHSA 投与の蘇生では、虚血性障害領域が総断面積の 34 ± 3%であり、HbV で蘇生した場合(13 ± 5%)に比較して有意に拡大した状態になっていることから、二つの蘇生液の酸素輸送効果の差が顕著に現れたものではないかと考えられる。このように、本実験モデルで、正常な脳組織の領域と虚血性状態に陥り血管透過性の亢進している領域の両方を一度に観察できることが特長である。

抗ヒト Hb 抗体を用いる免疫染色を実施し、光学顕微鏡下に観察した限りでは、右脳、左脳ともに、HbV は血管内腔に留まっており、脳実質内には分布が認めなかった(Fig.1)。従って、梗塞領域が拡大した状態になって BBB の透過性が亢進している場合でも、BBB を HbV が透過する可能性は低いと考えられた。これは、HbV の平均粒径が 250 nm であり、血漿蛋白質よりも極めて大きいことに起因し

ていると考えられる。

修飾 Hb(非細胞型)の溶液(分子内架橋型、重合型、水溶性高分子結合型)は、粒子径が大きくてもせいぜい 20 nm であるので、肝臓などの類洞血管では容易に血管外漏出することが予想される。正常な脳組織であれば BBB を透過することは考えにくいですが、今回のように透過性の亢進した領域では血管外に漏出する可能性が高い。今後、修飾 Hb 溶液の入手が可能であれば、比較試験を実施し、HbV との相違を明らかにしたい。HbV は輸血代替としての利用だけでなく、物性値を改良することにより虚血梗塞領域へ効率的に酸素運搬体することによる治療(Oxygen Therapeutics)が期待されているので、今回、脳実質細胞に HbV が到達しない事実が明らかになったことは、極めて重要であると言える。

#### b. 脳組織への直接注入

予備的試験としてカーボンインク(20  $\mu$ L)を注入し、直ちに犠牲死させ脳の切片を観察し、針の先端が右側脳室内に確実に挿入されたことを確認した(Fig. 2)。この挿入条件のもと、HbV 或は赤血球、血液を直接的に右側の側脳室内に注入し、その後の行動学的変化について観察した。その結果、全群において、驚愕反応、旋回反応、後足の収縮力の変化、運動失調、足取りの変化、立毛は認められなかった。しかし、1.5 cm 幅の梁の上の歩行では、左足不安定或は歩行困難となる場合があり、特に赤血球および血液を注入した場合が HbV を注入した場合に比較して顕著に出現する傾向が認められた。また、4 mm 幅の棒に前足で吊下がる時間を計測したところ、処置前は 12 秒程度であるが赤血球および血液注入群では翌日に 6 秒程度に短くなり、その後回復した。しかし HbV 注入群では顕著な時間短縮は認められなかった。これらの行動学的検討から、HbV の方が赤血球および血液に比較して脳組織に与える影響が小さい可能性があることが明らかになった。

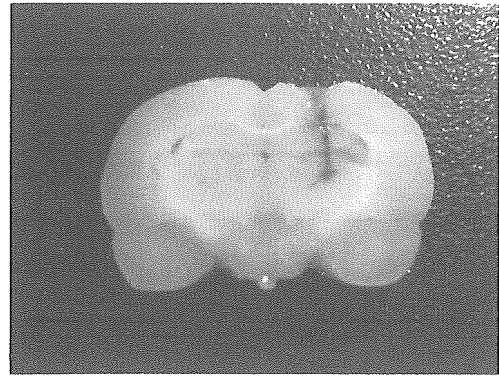
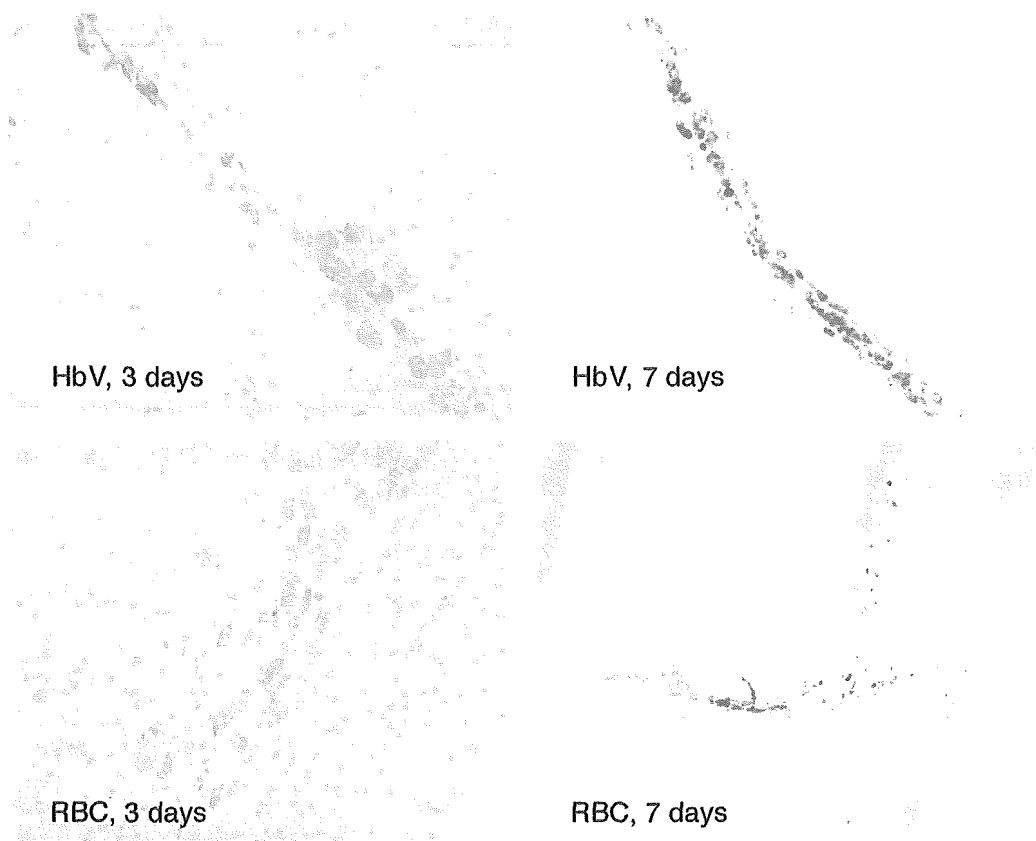


Figure 2 Confirmation injected site in right caudate of a rat brain by injecting carbon ink.

組織病理学的検討では、HbV や赤血球を注入した両群ともに、1 日後には注入の痕が認められるのみで特に変化は認められなかったが、3 日後には既にヘモジデリン沈着が認められ、7 日後にはそれが顕著となった(Fig. 3)。HbV を静脈内投与した場合(Sakai *et al.*, 2006)、肝脾のヘモジデリン沈着は 3 日後では認めず、7 日後から確認できるようになることから、脳組織内のミクログリア細胞による Hb の分解が肝 Kupffer 細胞、脾臓マクロファージに比較して迅速であることが考えられた。

#### E. 結論

虚血性障害により血液脳関門の透過性が亢進しても、HbV はこれを透過しない。側脳室内への直接注入の影響による著明な行動学的変化は、今回の投与量 20 $\mu$ L では何れの群でも認められなかったが、より詳細な検討として Hanging-time を計測したところ、赤血球よりも HbV の注入の方が影響の軽減される傾向が認められた。HbV は側脳室内で速やかに分解され、ヘモジデリンの沈着が 3 日後に観察された。静注した後の肝脾マクロファージでの分解(Sakai *et al.*, 2006)よりも極めて速い分解であった。現在は免疫染色を検討し、炎症反応の程度を解析中である。



**Fig. 3.** Histology of rat right brains after injection of HbV or RBC, stained with Berlin blue method. Hemosiderin deposition was confirmed in both groups 3 and 7 days after injection.

(文献) Sakai *et al.*, *Transfusion* 46, 339-347 (2006)

## 2. 各種血漿増量剤に分散希釈させたときの Hb 小胞体の溶液粘度

### A. 研究目的

Hb小胞体(HbV)分散液の膠質浸透圧は殆どゼロである。従って、大量投与に際しては代用血漿剤の併用が循環血液量の維持に重要となる。従来、HbVを5%アルブミン(HSA)溶液或はリコンビナントアルブミン(rHSA)溶液に分散させ膠質浸透圧を

20mmHgに調節し、この分散液を用いた出血ショック蘇生試験や、循環血液量の40~90%を置換する試験から、HbVが血液と同等の酸素運搬効果を有することが明らかになっている。HbVをアルブミンに分散させてHb濃度を8.6 - 10 g/dLとした場合の粘度は血液と同等であり、剪断速度依存性からNewtonianに近い挙動を示している。しかし、実際の臨床現場ではアルブミン以外に代用血漿剤として、デキストランやヒドロキシエチルスターチが使用されており、海外では更に、高分子量体や修正ゼラチン溶液なども使用されている。また、HbVをこれらの血漿増量剤に分散させて投与することで、虚血領域の酸素化の改善効果も得られている(Erni *et al.*, 2003; Plock *et al.*, 2005)。そこで、本研究では、各種代用血漿剤にHbVを分散させ、その粘弾性を検討することを目的とした。

## B. 研究方法

生理塩水に分散している HbV を超遠心分離 (75000 g, 60 min) して生理塩水を除去後、Table 1 に示す各種代用血漿剤中に分散させた ([Hb] = 10 g/dL)。代用血漿剤としては、組換えアルブミン (rHSA, Bipla)、デキストラン (小林製薬, Mw.40kDa)、低分子量ヒドロキシエチルスターチ (杏林製薬, サリンヘス, Mw.70kDa)、高分子量ヒドロキシエチルスターチ (Fresenius 社, Mw. 200 kDa)、修正ゼラチン (Modified gelatin, B.Braun, Mw. 30 kDa) を用いた。各 HbV 分散液の粘弾性挙動をキャピラリーレオメータ (Anton Paar 社) を用いて測定した (37 °C, 周波数 2 Hz, 剪断速度 4.5-320 s<sup>-1</sup>)。

次に、HbV/代用血漿剤分散系 ([Hb] = 10 g/dL) とヘパリン添加ヒト新鮮血を 1 : 1 の容量比で混合し、キャピラリーレオメータによる粘弾性計測を実施した。さらに、凝集生起の確認として各混合液の光学顕微鏡観測も実施した。

## C. 結果および考察

HbV/代用血漿剤の粘弾性計測結果を弾性項 (実部)、粘性項 (虚部) に分け Fig. 4 に示した。アルブミン分散系 (HbV/rHSA) では、剪断速度

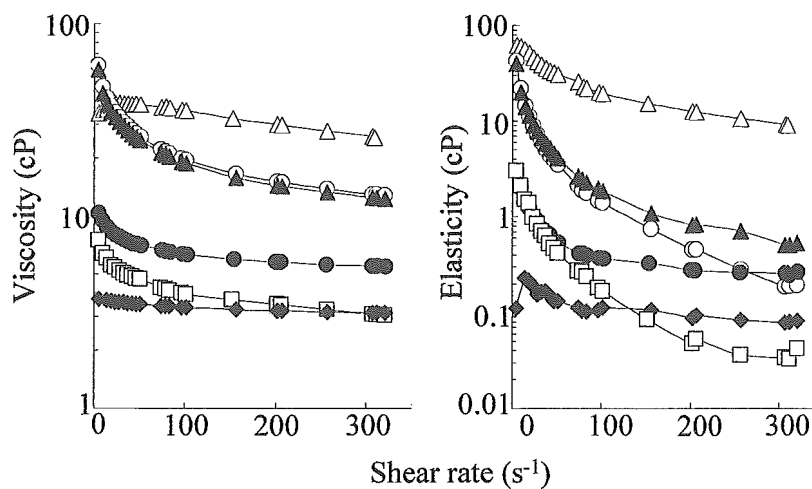
**Table 1** Characteristics of domestic and foreign plasma expanders evaluated in this study.

Plasma expander	Mw / Da	Concentration / g/dL	COP / mmHg
Dextran40	40,000	10	22
HES200	200,000	6	28
HES70	70,000	6	26
Gelofusine	30,000	4	52
rHSA	69,000	5	19

HES = hydroxyethyl starch, rHSA = recombinant human serum albumin, COP = colloid osmotic pressure

の変化に対する粘弾性値はほぼ一定で、ニュートン流体に近いので、HbV の凝集は殆ど生起しない。また、弾性項 (0.1 cP) は粘性項 (3 cP) に比較して極めて小さい。これは HbV 粒子表面の PEG 修飾が凝集抑制に働いているためである。

一方、Dex40、HES200、Gelofusine 分散系の粘性項および弾性項は血液に比較して高い値を示し、また弾性項の寄与が低剪断速度で大きくなっている。これは HbV と代用血漿剤の水溶性高分子との相互作用により凝集するものの、剪断力による可逆的解離が生起するためと考えてよい。更に Dex40 分散系では、光学顕微鏡



**Fig. 4.** Shear rate dependence of the viscosity and elasticity of HbV suspended in plasma expanders ([Hb]=10 g/dL) measured with a capillary rheometer at 37°C. ( $\Delta$ ) HbV / Dex40, ( $\circ$ ) HbV / HES200, ( $\blacktriangle$ ) HbV / Gelofusine, ( $\bullet$ ) HbV / HES70, ( $\blacklozenge$ ) HbV / rHSA, ( $\square$ ) blood.



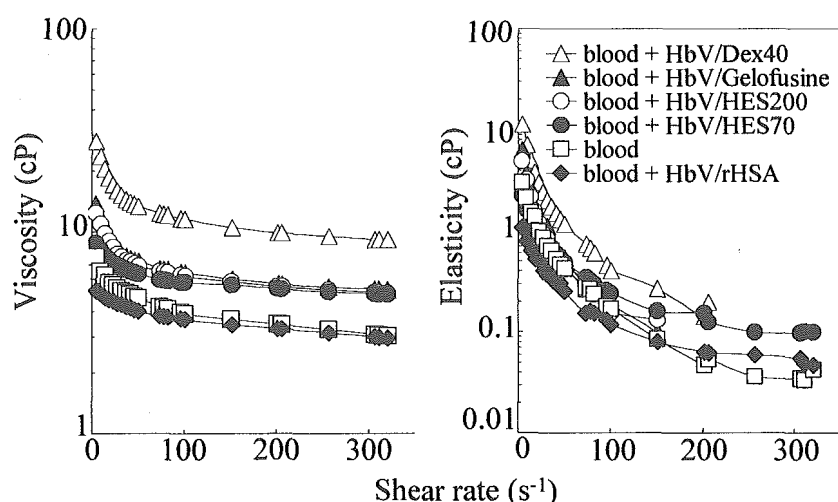


Fig. 5. Shear rate dependence of the viscosity and elasticity of the mixtures of blood and HbV suspended in plasma expanders at a volume ratio of 1/1 measured with a capillary rheometer at 37 °C.

(静止状態)観測では最も著しい凝集体の存在が確認でき、低剪断速度で弾性項が粘性項を上回っていた。これは、水溶性高分子がHbV粒子間を架橋することによって凝集体が形成され、その高分子鎖による架橋構造が弾性として観測されたと考えられる。

HbV/代用血漿剤分散系と血液を混合した場合の粘弾性挙動を Fig. 5 に示す。Dex40、HES200、Gelofusine の粘弾性は高い値を示すが、血液と混和して希釈したことにより、Fig.4 に比べかなり低下している。光学顕微鏡観察(静止状態)では、代用血漿剤に Dex40、HES200、Gelofusine の夫々を使用した場合に HbV の凝集を確認した。他方、粘弾性値が血液と同程度であった HES70、rHSA 混合系の観察では凝集体を殆ど確認せず、HbV の分散安定度が高いことが認められた。

#### D. 結論

数種類ある代用血漿剤のうちで、アルブミン溶液と HES(Mw. 70 kDa)で、HbV と混合しても顕著な粘度増大は見られなかったが、Dextran および欧州や米国で使用されている、高分子量 HES、或は修正ゼラチン溶液では凝集生起を認め、粘度上昇が顕著であった。本実験では、各 HbV 分散液調製

には超遠心分離を利用して各血漿増量剤溶液に再分散させ、Hb 濃度を 10 g/dL に設定した。しかし、実際に投与を行う場合には、① 市販の血漿増量剤溶液を投与した後に生理食塩水に分散された HbV を投与、② 或は濃厚な血漿増量剤溶液(例: 25%アルブミン溶液)があればこれを HbV 分散液に添加して同時に投与([Hb] = 8.6 g/dL)、などが想定される。血液交換率はせいぜい 50%程度が想定され、HbV、血漿増量剤ともに更に希釈され、凝集は低減され则认为られる。事実、当班の共同研究者 Dr. Erni ら(Inselspital University Hospital, Bern)は、高分子量の Dex 溶液、或は HES を組み合わせ 50% 近い血液交換を実施し、皮下微小循環では障害を認めず、逆に高粘性溶液の投与により血流が改善される効果を得ている(Erni *et al.*, 2003; Plock *et al.*, 2005)。しかし、凝集体の生起の影響については、HbV と代用血漿剤とを組合わせた投与試験と血液粘弾性試験から、今後詳細を検討する必要がある。(文献)

Erni *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*

284, H1702-9 (2003).

Contaldo *et al.*, *Crit Care Med.* 33, 806-12

(2005).

### 3. Hb 小胞体と修飾 Hb(非細胞型)溶液の配位子結合反応の相違

#### A. 研究目的

Hb 小胞体(HbV)は高濃度ヒト Hb 溶液をリン脂質二分子膜で被覆した人工赤血球であり、急性期の投与において赤血球と同等の酸素運搬機能が得られ、安全性についても明らかになってきている。修飾 Hb は投与直後に血圧亢進が認められるのに対し、HbV ではこれが生起しないことは重要な特徴の一つである。血圧亢進の機序の一つとして、内因性血管弛緩因子である NO や CO が Hb に捕捉されることによる様々な影響が指摘されている。そこで本研究では、HbV 分散液について、CO や NO との結合反応について、HbV の構造に起因する特徴的な反応様式を明らかにするため、非細胞型 Hb 溶液系との比較を検討した。そして、HbV が血管収縮を生起しない実験事実との関連性を検証した。

#### B. 研究方法

測定試料は HbV、及び HbV の比較として Hb、Hb に対しアロステリック因子である pyridoxal 5'-phosphate (PLP)を Hb 濃度の 2.5 倍量添加した Hb-PLP、PolyHb (glutaraldehyde 重合ウシ Hb, Oxyglobin, Biopure 社製)を用意し、ストップフロー・ラピッドスキュン分光測定装置(ユニソク社製 RSP-1000 型)による CO、NO 結合速度の解析を行った。A 液: N<sub>2</sub> ガスで脱酸素化した試料 ([heme]=3 μM) と、B 液: 14.14 % CO/N<sub>2</sub> 混合ガス、或は 0.2004 % NO/N<sub>2</sub> 混合ガスで飽和した PBS を 25 °C にて瞬間混合し、430 nm (deoxyHb の Soret 帯 λ<sub>max</sub>)における吸光度の時間変化を観測し、擬一次反応と仮定し見かけの CO、NO 結合速度定数( $k_{on}(\text{CO})$ ,  $k_{on}(\text{NO})$ )を算出した。

#### C. 結果および考察

4つの試料の測定結果を Table 1 に示す。P<sub>50</sub> の低

い Hb を除いた 3 つの試料の  $k_{on}(\text{CO})$  は、ほぼ同じ値を示した。一方、 $k_{on}(\text{NO})$  では Hb と PolyHb に違いは無いが、HbV の値は約 1/4 であった。HbV 内の Hb は修飾等を一切施していないので、Hb 溶液系と HbV の最も大きな違いは非細胞型と細胞型の相違にあり、高濃度 Hb 溶液がリン脂質小胞体に内包された構造が NO 結合速度の減少因子であると思われる。NO の結合速度定数は CO よりも約 2 桁大きく、粒子外表面および内部濃厚 Hb 溶液内の拡散律速の影響をより大きく受けたため、NO で顕著な差が認められたものと考えられる。

非細胞型 Hb 溶液の投与により血圧亢進や、肝臓の類洞血管の収縮などが生起するのに対し、HbV ではこれが認められないことが報告されている。これらの現象は、血管内皮弛緩因子である NO や CO が Hb により捕捉される反応が深く関わっていると考えられるが、今回観測された結合速度の相違だけでは説明できない。修飾 Hb は粒径が 20nm 程度であるのに対し、HbV の粒径が 250 nm と大きいため、NO が作用する血管平滑筋近傍にまで到達出来ないこと、また肝類洞血管においては Fenestration 径が 100nm 程度なので、CO が産生される肝実施細胞近傍にまで到達できず、CO の結合が抑制されること、等が考えられる(Sakai *et al.*, 2000; Goda *et al.*, 1998)。

#### D. 結論

HbV の NO 結合速度は非細胞型 Hb の約 1/4 と顕

**Table 1.** CO and NO binding rates of acellular and cellular Hb solutions measured by a stopped flow method at 25 °C.

Parameters	Hb	Hb-PLP	PolyHb	HbV
$k_{on}(\text{CO}) / 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	3.4	2.1	2.7	2.1
$k_{on}(\text{NO}) / 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	2.6	2.4	2.4	0.6
P <sub>50</sub> / mmHg	14	23	38*	25

\*Buchler *et al.*, *Anal Chem.* 77, 3466-3478 (2005)

著に遅く、細胞型の効果が確認された。他方、CO結合速度では大きな違いは認められなかった。NO結合がCO結合に比較して二桁も速く、HbV粒子表面の非攪拌層の存在がNOガスの拡散律速になっているためと考えられる。

(参考文献)

Sakai *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **279**, H908-15 (2000).

Goda *et al.*, *J. Clin. Invest.* **101**, 604-12 (1998).

#### 4. 脾臓微小循環動態の計測

##### A. 研究目的

HbVに関する動物投与試験(ラット)では、血液希釈液、出血ショック蘇生液、体外循環回路の補填液としての利用を検討し、赤血球と同等の酸素運搬機能を実証してきた。また、HbVは最終的には異物として細網内皮系に捕捉されることが体内動態分析から解っている(Sou *et al.*, 2005)。実際に剖検では脾臓肥大が最も顕著な変化であった(Sakai *et al.*, 2001; 2004)。そこで本研究では、血液の濾過器とも言われる脾臓に大量のHbVが捕捉された後に、HbVが分解される過程を解析するとともに、脾臓の微小循環動態の変動に関する情報を得ることを目的とした。

##### B. 方法

エーテル麻酔下、雄性 Wistar 系ラットに対し HbV([Hb] = 10 g/dL) 或は比較として生理食塩水を尾静脈より投与した(20 mL/kg, n = 9)。その後 1, 2, 3 日後に、1.5%-Sevoflurane 麻酔下、臓側腹膜を切開し脾臓を露出させた。脾臓表面にレーザー血流計(FLO-C1)のプロープを装着し、組織血流量(mL/min/100g に相当: Flow)、組織血液量(Mass)、血流速度(Velocity)に関するパラ

メータを得た( $\text{Flow} = \text{Mass} \times \text{Velocity}$  の関係)。また、摘出脾臓をホルマリン固定、H/E 染色し(株)パナファーム)、脾臓微小循環系について病理学的に検討した。

##### C. 結果および考察

Fig. 6にレーザー血流計の結果を示す。HbVの投与により、Mass, Velocity, Flowともに顕著に低下した。これは、HbVを貪食して肥大化したマクロファージが血流の障害になっていると考えられる。しかし、徐々に回復し、投与3日後には投与前の値にまで戻った。HbVの投与により脾臓の肥大が3日後に顕著であるが(Sakai *et al.*, 2004)、脾臓内血流速度は維持されていた。組織病理学的な検討では、マクロファージへのHbV取り込みと分解、髄外造血が認められた。しかし、脾臓循環系に関する異常は認

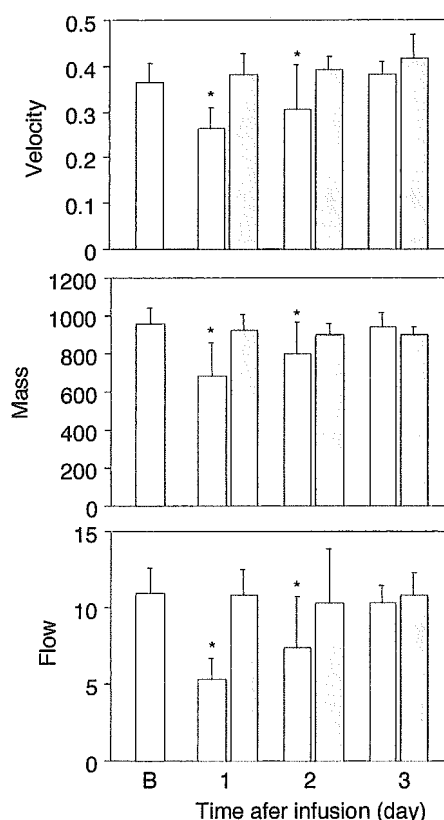


Fig. 6. Splenic microcirculation monitored by a Laser flowmeter (FLO-C1) after infusion of 20 mL/kg HbV (pink bars) or saline (blue bars). The values for velocity, mass and flow are in arbitrary units.

められなかった[(株)パナファームの所見: 脾臓循環系(脾動静脈/脾柱動静脈/中心動脈/筆毛動脈/脾洞)における血管壁構成成分(内皮/中膜/外膜)の変性・壊死や同部への沈着物、炎症細胞浸潤、血管腔の拡張あるいは収縮・狭窄、鬱血、出血、塞栓(血栓形成)といった形態学的変化、異常は無し]。従って、今回のHbVの投与量では、組織病理学的にはHbVが脾臓に対し炎症や壊死を生起しないこと、血流を停止させるような重篤な障害を生起しないこと、が明らかになった。

#### D. 結論

HbVは最終的に細網内皮系にて捕捉代謝される。脾臓の微小循環動態を検討したところ、血流に関する情報(Mass, Velocity, Flow)は投与1日後には低下するが、3日後には完全に回復した。組織病理学的には捕捉されたHbVの像が見られる以外は微小血管系に障害は認められなかった。

#### (文献)

Sakai *et al.*, *Am. J. Pathol.* **159**, 1079-88 (2001).

Sakai *et al.*, *Biomaterials* **25**, 4317-25 (2004).

Sou *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 702-9 (2005).

(謝辞) 本研究の推進にあたり、武岡 真司 早大理工学術院 教授、および宗 慶太郎 早大理工総研 助教授の協力を得た。

#### 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 P<sub>50</sub> 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 P<sub>50</sub> 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**, 101-11 (2005)

6. R.-M. Wang, T. Komatsu, A. Nakagawa, E. Tsuchida. Human serum albumin bearing covalently attached iron(II) porphyrins as O<sub>2</sub>-binding sites. *Bioconjugate Chem.* **16**, 23-26 (2005).

7. T. Komatsu, N. Ohmichi, A. Nakagawa, P. A. Zunszain, S. Curry, E. Tsuchida. O<sub>2</sub> and CO binding properties of artificial hemoproteins formed by complexing iron protoporphyrin IX with human serum albumin mutants. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 15933-15942 (2005).

8. T. Komatsu, Y. Oguro, A. Nakagawa, E. Tsuchida. Albumin clusters: structurally defined protein tetramer and oxygen carrier including thirty-two iron(II) porphyrins. *Biomacromolecules* **6**,