

厚生労働科学研究費補助金

— 平成 17年度 医薬品・医療機器等
レギュラトリーサイエンス総合研究事業 —

ヘモグロビンアロステリーを利用した付加価値
赤血球製剤の創製と救急医療への応用

(研究課題番号:H17-医薬—069)

総括・分担研究報告書

主任研究者 末松 誠

慶應義塾大学医学部 教授

平成 18(2006)年 3 月

総括・分担研究報告書： 目次

I 総括研究報告

末松 誠 慶應義塾大学医学部 教授 5

II 分担研究報告

1 堀 進悟 慶應義塾大学医学部 助教授 13

2 酒井 宏水 早稲田大学理工総研 助教授 23

3 塚田 孝祐 慶應義塾大学医学部 助手 31

4 芹田 良平 慶應義塾大学医学部 助手 35

III 研究成果の刊行に関する一覧表 39

IV 研究成果の刊行物・別刷 45

Ⅰ 総括研究報告

ヘモグロビンアロステリーを利用した付加価値赤血球製剤の創製と 救急医療への応用

主任研究者 末松 誠 慶應義塾大学医学部 医化学教室 教授

研究要旨：赤血球が酸素運搬や酸塩基平衡の調節に関与するだけでなく、積極的に微小循環血流維持作用を発揮している可能性が示唆されてきている。具体的には赤血球が血管内の酸素濃度を感知してNOなどの低分子のガスや有機酸を活発に放出・回収を行い、その一部が血管拡張や血小板活性化制御に関与する可能性が示されつつある。Hbは一般にT-R transitionと呼ばれる構造変化を酸素の乖離・結合に伴って示すことが知られているが、そのような可塑性は病態や赤血球がおかれた環境によって大きく変化する。平成15年度からの本プロジェクトの研究によりT-state Hbを有する赤血球は低酸素に伴う細胞外へのATP放出が増強するため、ATPを介した血管拡張を通じて組織の酸素供給を増加させる作用を持つ可能性があることが明らかになった。このようなT-state Hbの作用が虚血臓器における酸素代謝の改善をもたらすかどうかを肝臓微小循環の虚血モデルを用いて検証を試みた結果、 α -NO赤血球はショックに対する酸素供給、血流改善が十分であることが昨年度までの研究で明らかになった。今年度はこれまでの結果を示すメカニズムを細胞レベルで探求する意味から、キャピラリー電気泳動/質量分析装置（CE-MS）を用いて赤血球細胞内の代謝産物を網羅的に解析することにより、T-R transitionによる赤血球内糖代謝のリモデリングを明確化し、ガス分子によるHbアロステリーの人為的制御法の妥当性を示すに至った。

A. 研究目的

救急救命に必要な酸素輸液の開発研究はこれまで期限切れ残余献血からヘモグロビンを精製し、これを生体適合性材料を用いて修飾あるいは封入した製剤の開発が主体であった。国民の篤志で得られた限られた量の血液をできる限り多くの患者に供給するためには、少量でも有効に酸素運搬をできる付加価値赤血球製剤の開発が不可欠であり、厚生労働行政上極めて重要な課題の解決が可能である。近年赤血球が血管内の酸素濃度を感知してNOなどの低分子ガスや有機酸を活発に放出、回収を行い、その一部が血管拡張や血小板活性化制御に関与する可能性が示されつつある。これは赤血球が単に酸素運搬や酸塩基平衡の調節に関与す

るだけでなく、積極的に微小循環血流維持作用を発揮して有効に酸素を末梢に伝達する未知の機構を有している可能性を示唆している。換言すれば、精製ヘモグロビン修飾体による人工酸素運搬体では赤血球が本来保持しているこのような付加価値機能を完全に補完することはできないことを意味している。このような血管作動物質のシンクリザーバーとしての赤血球の血管機能制御の分子機構解明は、特にショックの救急救命への応用を考える上で極めて重要である。本研究は膜透過性の高い低分子ガス（NO, CO）による蛋白質機能修飾技術を利用した赤血球保存技術の向上と付加価値添加技術により、篤志で得られた献血血液の有効利用を目的とした。

B. 研究方法

B-1 α -NO 赤血球の作製

本実験は慶應義塾大学動物実験委員会の承認を受け (No.1756), 実験指針に基づき実施された。健常ボランティアからヘパリン採血し, buffer にて3回洗浄後, ヘマトクリット 50%に調整した。対照に用いた洗浄赤血球はそれを用いることとし, CO 赤血球は Ar パージ処理により脱酸素化後, CO ガスをバブリングすることで作製した。 α -NO 赤血球に関しては同様に脱酸素化後, NO ドナーとして NOR3 (藤沢薬品工業より供与) を用いて作製した。NOR3 の添加量に関しては, 作製した赤血球 suspension の Hb 量から分子量換算して Hb の α 鎖に特異的に NO ガスが結合するように調整した。その妥当性に関しては昨年度の報告書に記載した。

B-2 赤血球内代謝産物の網羅的解析

慶應義塾大学先端生命科学研究所の曾我朋義先生により開発されたキャピラリー電気泳動/質量分析装置 (CE-MS) による細胞内代謝産物の一斉解析 (メタボローム解析) 法を用いた。CO, NO などのガスリガンドが結合した赤血球サンプルを通常酸素環境下, および低酸素下において1分間 37°C に incubation し, 赤血球内の代謝を促進させた。サンプルは速やかに 4°C に冷却し, buffer にて洗浄後, 除タンパク処理して細胞内代謝産物を抽出し, メタボロームサンプルとした。

C. 研究結果および考察

C-1 赤血球サンプルの特性

図 1 に NO, CO をヘモグロビンに結合させた赤血球サンプルの図を示した。 α -NO 赤血球はヘモグロビン α 鎖に NO が結合し, その立体構造を T-state に安定化され, deoxy 型の conformation であるので静脈血に近い色を呈し

ている。また図 1 (右) はメタボローム解析に用いた α -NO 赤血球のサンプルを示した。遠心分離後のサンプル上清は無色透明を示しており, 溶血もなく viability は保たれていることを示している。

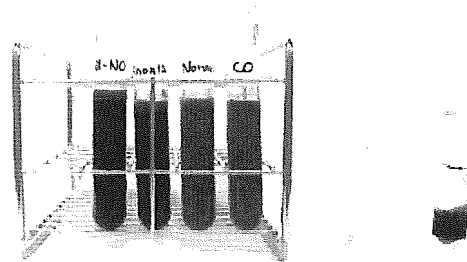


図 1 ガス分子修飾した赤血球 (左図: 左から α -NO 赤血球, 低酸素下の赤血球, 通常酸素下の赤血球, CO 赤血球, 右図: 遠心分離後の α -NO 赤血球)

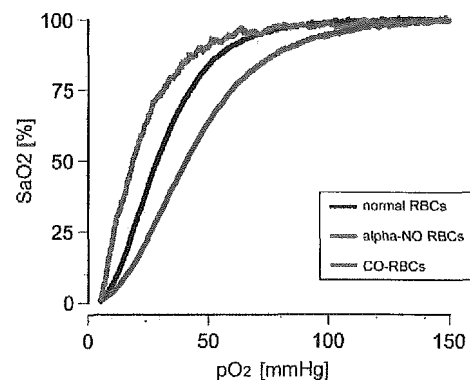


図 2 ガス分子修飾赤血球の酸素解離曲線

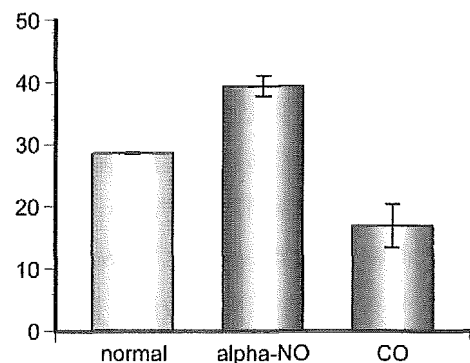


図 3 酸素解離曲線から算定した p50 値

図2にHbをガス分子で修飾した各サンプルの酸素解離曲線を示した. 正常赤血球に対してCO処理した赤血球はシグモイドカーブが左方シフトし, 反対に α -NO赤血球では右方シフトしており, それぞれR-state, T-stateに安定化されていることを確認した. 酸素解離曲線から算出したp50値は正常赤血球が 28.6 ± 0.1 mmHg, CO赤血球が 16.9 ± 3.5 mmHg, α -NO赤血球では 39.3 ± 1.7 mmHgであった.

C-2 メタボローム解析結果

本研究課題の初年度に遂行した正常赤血球の低酸素環境下における代謝のリモデリングを検討した結果, 1分, 3分の低酸素刺激に伴い解糖系の上流の代謝物の濃度が低下し, 下流の代謝物の濃度が増加しておりATPの増加, adenosineの低下などが同時に起きていることを明らかにした. このメタボロームパターン

の変化はあらかじめ赤血球をCOで処理しHbをR-stateに安定化させると消失することが明らかになったことから, 細胞内グルコース酸化速度が低酸素で加速する機構にHbの構造変化が関与することが示唆された. また低酸素暴露でpentose monophosphate shunt (PMS)の生成物であるribose 5-Pの低下, rate-limiting enzymeであるG6P dehydrogenaseの基質であるNADPが使われずに上昇することも認められ, glucose利用の大部分が解糖系に投入されている可能性が示唆された.

図4に α -NO赤血球を含めたメタボローム解析結果を示した. α -NO赤血球内部のATP量はCO赤血球, 正常赤血球に比べて低値を示したが, この現象は赤血球外部にATPが放出された結果とも考えられる. これはGlucose 6-phosphateの著しい減少が示すことから, 解糖系の加速によるATPの生成が促進された

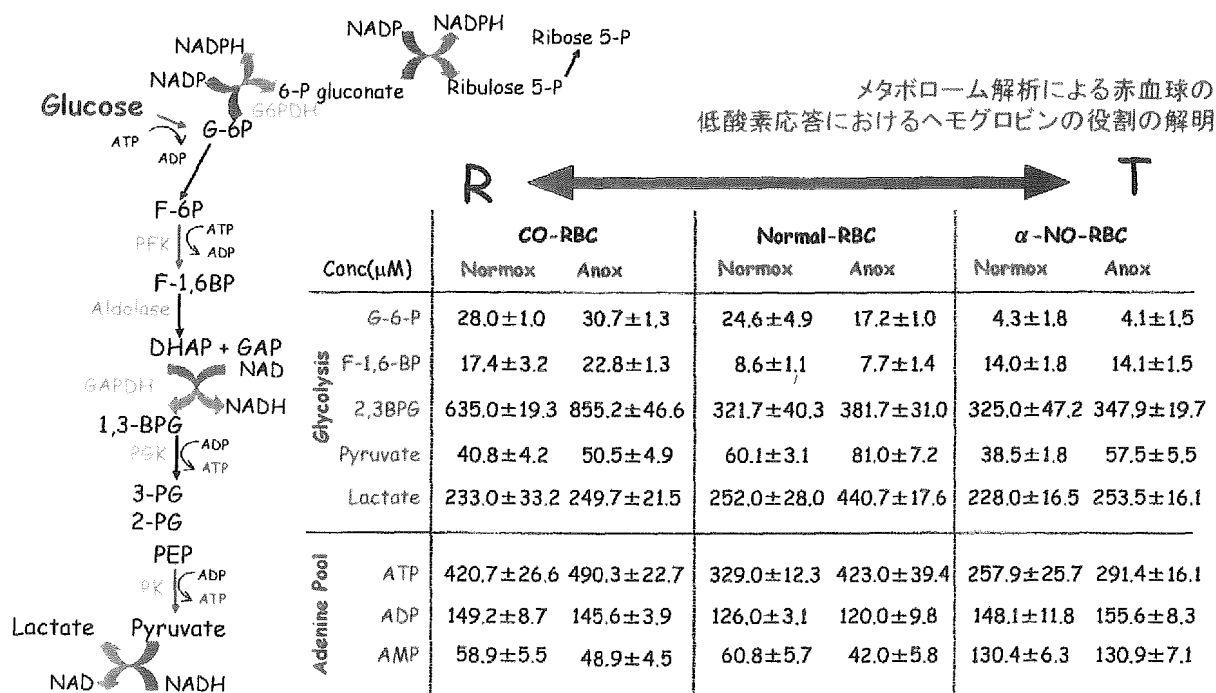


図4 ガス分子修飾ヘモグロビン含有赤血球における網羅的代謝解析結果

と考えられる。昨年度までの研究で赤血球が低酸素領域を通過する際に極めて早い反応として ATP を放出し、微小循環領域の抵抗血管の拡張を起こす可能性が示唆されている。ウサギの脳細動脈の灌流標本を作製し、一方向性に赤血球を流し血管径の変化を定量的に解析した結果、低酸素性血管拡張は赤血球の存在に依存し、perfusate に ATP の分解酵素 (apirase) を添加すると消失し、あらかじめ赤血球を CO 処理しておくで消失した。また血管内皮細胞の NOS を阻害すると拡張反応が消去できること、NO で処理した α -NO 赤血球では低酸素にしないでも血管拡張が起こることを明らかにした。更に、 α -NO 赤血球内部 AMP 量は軒並み増加しており、解糖系律速酵素である PFK はアロステリックに活性していると推測された。

D. 結論

ヘモグロビン α 鎖に特異的に NO ガス分子を修飾して得られる赤血球機能を救急医療用途に適したマテリアルとする可能性について、生体内における機能を in vitro で検証するためにメタボローム解析を行い、以下の成果を得た。

- (1) 作製した α -NO 赤血球は電子スピン共鳴による検証の結果、ヘモグロビン α 鎖に特異的に結合していることが明らかとなり、酸素解離曲線からも立体構造を T-state に安定化されていることが明らかになった。また溶血も認められないことから輸血の際に生体内で正常な viability を有することが推測される。
- (2) 赤血球内の代謝産物をメタボローム解析により網羅的に定量した結果、赤血球外への ATP 放出の可能性が示唆された。これは昨年度までに報告してきたウサギ脳微小単離血管による実験で α -NO 赤血球の灌流による有意な拡張や、ラットによる出血性ショックモデルにおける胆汁流量の増大など、

これまでに行われてきた実験結果を支持するものである。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

F-1 論文発表

- 1) Suganuma, K., Tsukada, K., Tsuneshige, A., Kashiba, M., Yonetani, T., Suematsu, M. T-state stabilization of hemoglobin allostery by nitric oxide: a protection against post-ischemic hepatobiliary dysfunction. *Antioxid. Redox Signaling* 2005 in press.
- 2) Fujii, K., Sakuragawa, T., Kashiba, M., Sugiura, Y., Maruyama, K., Goda, N., Nimura, Y., Suematsu, M. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator of biliary bicarbonate excretion in the rat liver. *Antioxid Redox Signal.* 7(5-6), 788-794, 2005.
- 3) Sugiura, Y., Kashiba, M., Hoshikawa, K., Sasaki, R., Saito, K., Kimura, H., Maruyama, K., Goda, N., Suematsu, M. Cadmium exposure alters metabolomics of sulfur-containing amino acids in rat testes. *Antioxid. Redox Signaling* 7(5-6), 781-787, 2005.
- 4) Tian, J., Bryk, R., Itoh, M., Suematsu, M., Nathan, C. Variant tricarboxylic acid cycle in *Mycobacterium tuberculosis*: Identification of a-ketoglutarate decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 10670-10675, 2005.
- 5) Ishikawa, M., Kajimura, M., Adachi, T., Maruyama K., Makino, N., Goda, N. Yamaguchi T., Sekizuka E., Suematsu M., Carbon monoxide from heme oxygenase-2 is a tonic regulator against nitric oxide-dependent vasodilation in the adult rat cerebral microcirculation *Circ Res*, in press, 2005.
- 6) Katagiri, H., Ito, Y., Ishii, K., Hayashi, I., Suematsu, M., Yamashita, S., Murata, T., Narumiya, S., Kakita, A., Majima, M. Involvement of thromboxane derived from cyclooxygenase-1 and -2 in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia in mice. *Hepatology* 39, 139-150, 2004.

- 7) Tomita, K., Azuma, T., Kitamura, N., Nishida, J., Inokuchi, S., Nishimura, T., Suematsu, M., Ishii, H. Pioglitazone prevents alcohol-induced fatty liver in rats through upregulation of c-Met. *Gastroenterology* 126, 873-885, 2004.
- 8) Kudo, A., Kashiwagi, S., Yoshimura, Y., Uchida, K., Arii, S., Suematsu, M. Kupffer cells alter organic anion transport via multidrug resistance protein 2 in the post-cold ischemic rat liver. *Hepatology* 39, 1099-1109, 2004
- 9) Sakai, H., Masada, Y., Horinouchi, H., Ikeda, E., Sou, K., Takeoka, S., Suematsu, M., Takatori, M., Kobayashi, K., Tsuchida, E. Physiologic capacity of reticuloendothelial system for degradation of hemoglobin-vesicles (Artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by dialy repeated infusions for 14 days. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311 (3): 874-884, 2004
- 10) Mitani, F., Ogishima, T., Mukai, K., Hoshino, R., Watanabe, K., Suematsu, M. Possible participation of outer mitochondrial membrane cytochrome B5 in steroidogenesis in zona glomerulosa of rat adrenal cortex. *Endocr. Res.* 30(4), 639-644, 2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし.

H. 他の研究との関連

本研究におけるメタボローム解析法の確立および設備の導入に関しては文部科学省リーディングプロジェクト細胞・生体機能シミュレーションプロジェクト (H15~H17) によって行われた。

II 分担研究報告

付加価値赤血球の救命領域への応用に関する実験的検討

分担研究者 堀 進悟 慶應義塾大学医学部 救急医学

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

A. 研究目的

本邦では、年間1万人を超える外傷死を認め、その多くは出血性ショックによる。これらは短時間のうちに、数ℓから10ℓを越える大量輸血を受けるが、出血、あるいは多臓器障害のために死亡する。死亡の誘因として、侵襲にともなう全身の血管収縮のため、組織への酸素供与が改善しないことが関係している。

出血性ショックにおける組織への酸素供与を目的として、近年、ヘモグロビン修飾体を用いた人工酸素運搬体の臨床応用が検討されている。しかし、赤血球が一酸化窒素（NO）等のガス状分子を介して、血管径や血小板機能の制御に関与している可能性が示唆されることから、赤血球機能を人工酸素運搬体によって補完することはできないと考えられる。

そこで、出血性ショックに対する赤血球輸血では酸素運搬能を向上させた付加価値赤血球の応用が期待される。ヘモグロビン

(Hb) α 鎖に特異的にNO分子を結合させ、ヘムの構造をT-stateで安定化させた α -NO Hbを含む α -NO赤血球は酸素解離曲線を右にシフトさせると同時に血管拡張を来し、組織への酸素運搬能を向上させる可能性が示されている。すなわち、 α -NO赤血球はヘモグロビンからの酸素放出を効率化するとともに、微小循環の改善作用が期待されるため、出血性ショックの予後を改善する可能性がある。

本研究では、ラット出血性ショックモデルにおいて、 α -NO赤血球の輸血が血行動態と代謝指標に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、一酸化窒素 Hb (CO-Hb) を含むCO赤血球と、これらの処理を行なわなかった洗浄赤血球との比較を行なった。なお、CO-HbはT-stateに安定化した α -NO Hbと異なり、COによってヘムの構造がR-stateに安定化されていることに着目し、比較を行なった。

B. 研究方法

1) α -NO および CO-Hb の精製

従来の非細胞型人工ヘモグロビンの評価研究では、対照を細胞外液によるクリスタロイド輸液あるいは蛋白添加により膠質浸透圧を上昇させた輸液を用い、その効果を比較してきた。しかし、付加価値赤血球の検討では、対照は native の赤血球でなければならない。本研究では洗浄赤血球の大量輸血と付加価値赤血球の大量輸血との比較を行なう実験系を用いた。

ヒト洗浄赤血球を modified SAGM 溶液で希釈した後、アルゴンガスをパージして脱酸素化し、①ヘモグロビンの 1/2 モル相当の NO donor (NOR-3) を投与して、生食で洗浄後にヘマトクリットを 50% に調整して 37°C に保温した α -NO 赤血球液、②NO donor を投与せず、生食で洗浄後にヘマトクリットを 50% に調整して 37°C に保温した洗浄赤血球液、③CO ガスでパージして CO-Hb 化し、生食で洗浄後にヘマトクリットを 50% に調整して 37°C に保温した CO 赤血球液を作成した。

作成した①～③の赤血球液の酸素分圧は電極法で、また Hb 濃度と Hb の分画を分光光度計で測定した (ABL725, Radiometer Analytical SAS, Lyon, France)。

2) プロトコル

① 手術と測定機器

第7週齢の Wistar 系雄性ラットにペントバルビタール腹腔内麻酔 (50mg/kg) を行い、左大腿動脈に脱血用カテーテルを挿入し同時に動脈血圧測定を行った。左総頸動脈には温度センサーを留置し、右内頸静脈には生理的食塩水投与用のカテーテルを留置して、熱希釈法による心拍出量測定を行なった。また、脳血流量測定のためレーザー血流計 (Advance Co., Ltd., Tokyo, Japan) を頭蓋骨上の皮下に埋め込んだ。背部には圧センサー

を敷き、胸郭の運動を呼吸運動として記録した (Sukinos Co., Ltd., Nagoya, Japan)。これらのデータは連続的にパーソナルコンピュータに記録し解析を行なった (PowerLab, AD Instruments Japan Inc., Nagoya, Japan)。体温はヒートランプで 37°C 以上に維持した。

② 出血性ショック

脱血用カテーテルから 1.0ml/min の速度で脱血を行い、収縮期血圧 (SAP) <45mmHg を 15 分間維持した。その後、脱血量と同量の α -NO 赤血球液、洗浄赤血球液または CO 赤血球液を 1.0ml/min の速度で輸血した。

③ 検討対象

第7週齢の Wistar 系雄性ラット 42 匹 (209 \pm 2 g) を用いて SAP<45mmHg の出血性ショックモデルを作成した。総脱血量は 4.9 \pm 0.1ml (全血の 38% に相当) であったが、図 1 に示すごとく、個体差が大きく、ショック 15 分経過後の Base Excess (BE) に大きなばらつきが認められたため、総脱血量が 4.0ml 以上 6.0ml 未満であった 30 匹 (210 \pm 3 g) を本検討の対象とした。

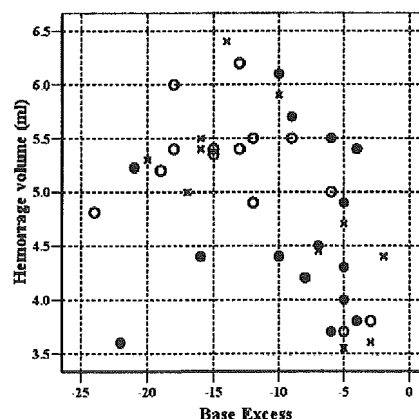


図 1 総脱血量とショック 15 分後の Base Excess の関係

Closed circle は α -NO 赤血球、cross は CO 赤血球、そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。収縮期血圧を 45mmHg 以下に 15 分間維持したが、個体によって総脱血量が異なり、ショックによる代謝負荷がばらついた。

3) 測定項目

①血行動態の評価

心拍出量測定と観血的動脈血圧測定を施行した。本研究では心拍出量測定法として熱希釈法を採用した。左総頸動脈内に留置した温度センサーと右内頸静脈に留置したカニューレを用い、常温の生理的食塩水を投与して血液温度の変化を観察した。熱希釈法における生理的食塩水の投与が出血性ショックに対して輸液効果を持つため、再現性を保ちつつも生理的食塩水の投与量を最少量に設定する必要がある。本研究の準備段階における先行研究によって常温 0.1ml の生理的食塩水投与で良好な心拍出量測定が可能であることを確認した。なお、文献検索では、ラット出血性ショックモデルで心拍出量の測定が行われた例は少ない。

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

②血液指標の評価

動脈血を採取し、pH, PaCO₂, HCO₃⁻, Base Excess (BE), SaO₂, Hb 濃度を iSTAT (i-STAT Co., Ltd., USA) を用いて計測した。

③酸素運搬能の評価

動脈血中の酸素容量 (CaO₂) と CO の積である組織への酸素運搬能(DO₂)を算出し、組織に対する酸素運搬能の変化を検討した。なお、CaO₂ は以下から求めた。

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

4) 統計学的検定

各測定項目を脱血前、ショック 15 分後、輸血直後、15 分後、30 分後、60 分後の 6 点で観察した。統計は SPSS12.0J を用い、対応のある平均値の比較には repeated ANOVA を用い、対応のない平均値の比較には one-way ANOVA を用いた。α レベルは 0.05 とした。

本報告中の変数値は平均±標準誤差で示す。

5) 倫理面への配慮

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

C. 研究結果

1) Hb の修飾と検証 (表 1)

脱気目的で行うアルゴン(Ar)ガスのパーズによって酸素化 Hb (oxy-Hb) は減少し、脱酸素化 Hb (deoxy-Hb) が増加した。Nor-3 添加によってメト Hb (Met-Hb) が増加し、輸血用の α-NO 赤血球液では 30% を超えていた。CO ガスによるパーズでは Hb 中の一酸化炭素 Hb (CO-Hb) が 90% 以上となった。Oxy-Hb はほぼ消失していたにも関わらず、輸血直前の酸素分圧は 100torr を超えていることが示された。この酸素は検体処理中に室内気が接触し、溶存したと考えられる。

表 1 輸血用血液中のガス分圧とヘモグロビン濃度

	pH	PaO2 torr	PaCO2 torr	Hb g/dl	Oxy-Hb (%)	Deoxy-Hb (%)	CO-Hb (%)	Met-Hb (%)
α-NORBC								
Arパーズ前	5.66	95	23	2.7	84	17	0	0
Arパーズ後	7.13	54	6	2.7	90	45	0	1
Nor-3添加後	5.77	84	8	2.7	54	17	2	27
輸血直前	5.90	34	8	14.6	19	41	4	37
CO RBC								
Arパーズ前	5.66	95	23	2.7	84	17	0	0
Arパーズ後	5.74	83	7	2.7	99	40	0	1
COパーズ後	5.73	10	5	2.5	0	4	93	4
輸血直前	5.89	145	8	13.2	1	4	91	4
洗浄RBC								
Arパーズ前	5.66	95	23	2.7	84	17	0	0
Arパーズ後	5.73	43	4	2.7	33	65	1	1
輸血直前	5.88	63	7	13.8	55	30	0	15

2) 出血性ショック

本研究における検討対象のラットは 30 匹である (表 2)。体重と総脱血量に有意差を認めなかった。

表 2 検討対象のラットの体重と総脱血量

Animal's	α-NO RBC N=11	CO RBC N=8	Washed RBC N=11	ANOVA P-value
Body weight Mean (SE) g	214 (4)	215 (5)	203 (4)	0.10
Hemorrhage volume Mean (SE) ml	4.8 (0.2)	5.1 (0.2)	5.2 (0.1)	0.11

①血行動態の比較

収縮期血圧の経過は図2に示すように、3群間で差が認められた (repeated ANOVA: $P<0.001$)。α-NO 赤血球の輸血直後は洗浄赤血球やCO 赤血球の輸血群と比較して収縮期血圧が低値であった (ANOVA: $P<0.001$)。心拍数と呼吸数の経過には3群間で有意差は認められなかった (図3、4)。

心拍出量と全身血管抵抗の経過は、3群間で異なることが示された (図5、6、repeated ANOVA: $P<0.001$)。輸血直後、輸血30分後、および60分後では、α-NO 赤血球輸血群が洗浄赤血球輸血群と比較して有意に心拍出量が大きく (ANOVA: $P<0.01$)。全身血管抵抗も、α-NO 赤血球輸血群が洗浄赤血球輸血群と比較して有意に低いことが示された (ANOVA: $P<0.05$)。

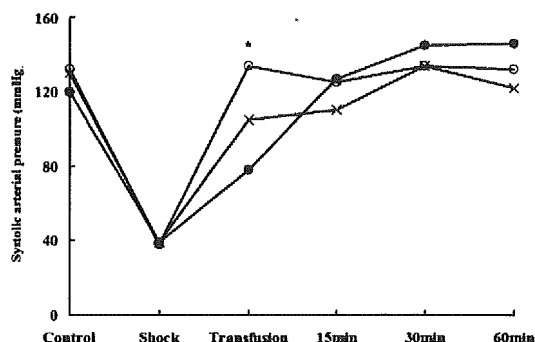


図2 収縮期血圧の経過

Closed circle は α-NO 赤血球、cross は CO 赤血球、そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control、収縮期血圧 $<45\text{mmHg}$ の維持開始15分後を shock、輸血直後を transfusion とし、輸血15分後、30分後、60分後の経過を示す。Repeated ANOVA: $P<0.001$, *: ANOVA: $P<0.001$ 。

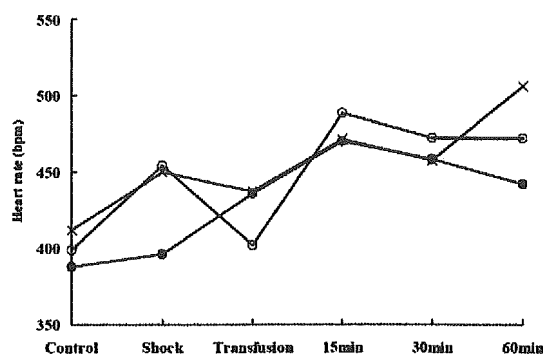


図3 心拍数の経過

Closed circle は α-NO 赤血球、cross は CO 赤血球、そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control、収縮期血圧 $<45\text{mmHg}$ の維持開始15分後を shock、輸血直後を transfusion とし、輸血15分後、30分後、60分後の経過を示す。Repeated ANOVA: $P=0.70$ 。

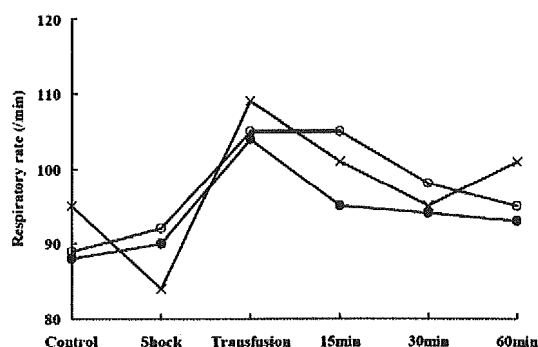


図4 呼吸数の経過

Closed circle は α-NO 赤血球、cross は CO 赤血球、そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control、収縮期血圧 $<45\text{mmHg}$ の維持開始15分後を shock、輸血直後を transfusion とし、輸血15分後、30分後、60分後の経過を示す。Repeated ANOVA: $P=0.86$ 。

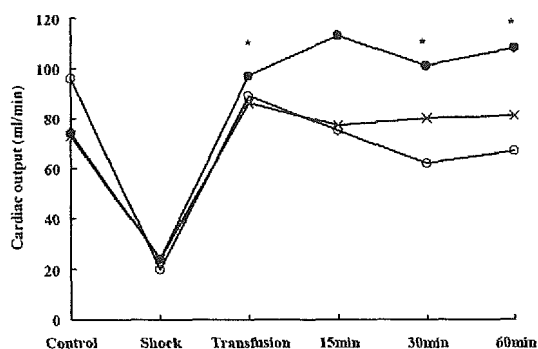


図5 心拍出量の経過

Closed circle は α -NO 赤血球、cross は CO 赤血球、そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control、収縮期血圧 $<45\text{mmHg}$ の維持開始 15 分後を shock、輸血直後を transfusion とし、輸血 15 分後、30 分後、60 分後の経過を示す。Repeated ANOVA: $P < 0.001$, *: $P < 0.01$ 。

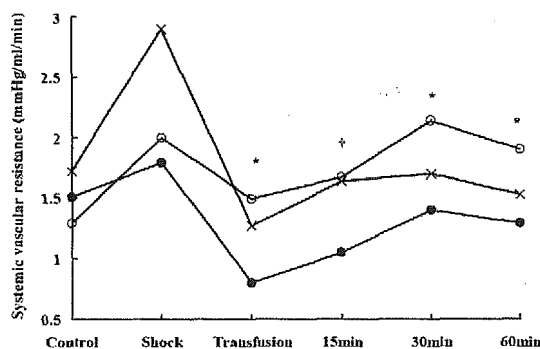


図6 全身血管抵抗の経過

Closed circle は α -NO 赤血球、cross は CO 赤血球、そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control、収縮期血圧 $<45\text{mmHg}$ の維持開始 15 分後を shock、輸血直後を transfusion とし、輸血 15 分後、30 分後、60 分後の経過を示す。Repeated ANOVA: $P < 0.001$, *: $P < 0.01$, †: $P < 0.05$ 。

②血液指標

動脈血ガス分析では pH の経過に有意差を認めなかった (repeated ANOVA: $P = 0.22$ 、図 7)。 PaCO_2 では、3 群の経過に有意差を認めないものの (repeated ANOVA: $P = 0.11$)、

輸血 15 分後以降は α -NO 赤血球輸血群が高値であることが示された (ANOVA: $P < 0.05$ 、図 8)。また、動脈血の HCO_3^- の経過には 3 群間で有意差が認められ (repeated ANOVA: $P = 0.04$)、輸血 15 分後以降は α -NO 赤血球輸血群が高値であった (ANOVA: $P < 0.05$ 、図 9)。Base Excess の経過においても、3 群間には有意差を認め (repeated ANOVA: $P = 0.04$)、輸血 15 分後と 60 分後では α -NO 赤血球輸血群が高値であった (ANOVA: $P < 0.05$ 、図 10)。

動脈血中酸素飽和度とヘモグロビン濃度の経過においても 3 群間に有意差が認められ (repeated ANOVA: $P < 0.01$)、動脈血酸素飽和度は輸血直後に CO 赤血球輸血群が他の 2 群と比較して有意に低値であること (ANOVA: $P < 0.001$ 、図 11)、ヘモグロビン濃度では、 α -NO 赤血球輸血群において輸血直後から、他の 2 群より低値であることが示された (ANOVA: $P < 0.05$ 、図 12)。

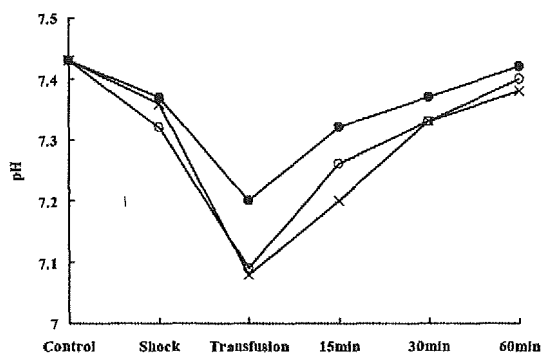


図7 動脈血 pH の経過

Closed circle は α -NO 赤血球、cross は CO 赤血球、そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control、収縮期血圧 $<45\text{mmHg}$ の維持開始 15 分後を shock、輸血直後を transfusion とし、輸血 15 分後、30 分後、60 分後の経過を示す。Repeated ANOVA: $P = 0.22$ 。

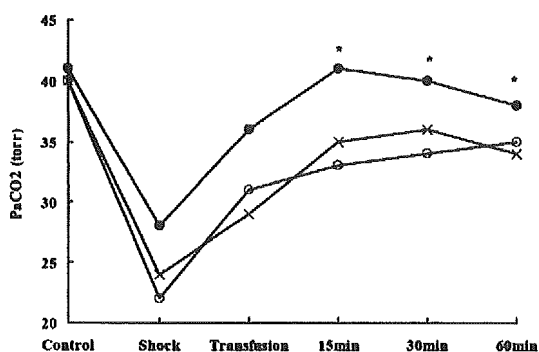


図8 PaCO₂の経過

Closed circle は α-NO 赤血球、cross は CO 赤血球、そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control、収縮期血圧<45mmHg の維持開始 15 分後を shock、輸血直後を transfusion とし、輸血 15 分後、30 分後、60 分後の経過を示す。Repeated ANOVA: P=0.11, *: P<0.05。

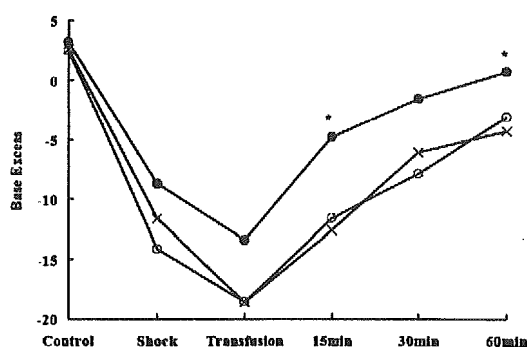


図10 Base Excess の経過

Closed circle は α-NO 赤血球、cross は CO 赤血球、そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control、収縮期血圧<45mmHg の維持開始 15 分後を shock、輸血直後を transfusion とし、輸血 15 分後、30 分後、60 分後の経過を示す。Repeated ANOVA: P=0.02, *: P<0.05。

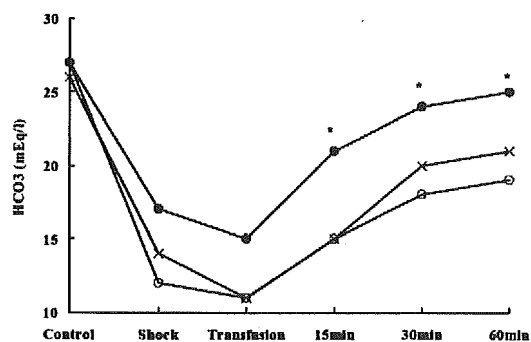


図9 動脈血 HCO₃⁻の経過

Closed circle は α-NO 赤血球、cross は CO 赤血球、そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control、収縮期血圧<45mmHg の維持開始 15 分後を shock、輸血直後を transfusion とし、輸血 15 分後、30 分後、60 分後の経過を示す。Repeated ANOVA: P=0.04, *: P<0.05。

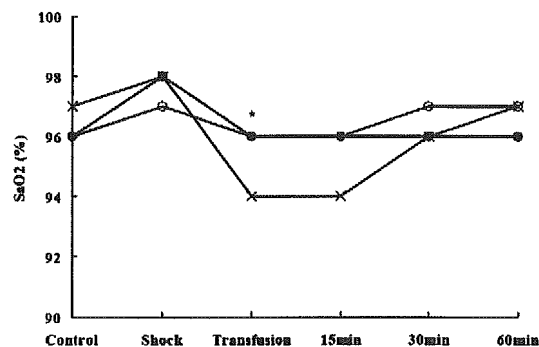


図11 動脈血酸素飽和度の経過

Closed circle は α-NO 赤血球、cross は CO 赤血球、そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control、収縮期血圧<45mmHg の維持開始 15 分後を shock、輸血直後を transfusion とし、輸血 15 分後、30 分後、60 分後の経過を示す。Repeated ANOVA: P=0.003, *: P<0.01。

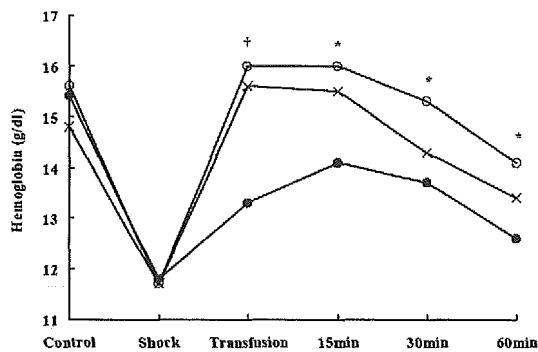


図 12 ヘモグロビン濃度の経過

Closed circle は α -NO 赤血球、cross は CO 赤血球、そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control、収縮期血圧 < 45mmHg の維持開始 15 分後を shock、輸血直後を transfusion とし、輸血 15 分後、30 分後、60 分後の経過を示す。Repeated ANOVA: $P=0.001$, *: $P<0.05$, †: $P<0.01$ 。

③酸素運搬能の評価

動脈血中の酸素容量(CaO_2)と酸素運搬能($\dot{D}O_2$)の経過は 3 群間で異なっていた (repeated ANOVA: $P<0.05$)。 CaO_2 では、輸血直後から α -NO 赤血球輸血群が他の 2 群より有意に低値であった (ANOVA: $P<0.05$ 、図 13) が、 $\dot{D}O_2$ は輸血 15 分後から α -NO 赤血球輸血群が他の 2 群より有意に高値であった (ANOVA: $P<0.05$ 、図 14)。

④脳血流量の評価

血行動態変化と重要臓器灌流との関係を検討するため、 α -NO 赤血球輸血群と CO 赤血球輸血群の各 5 匹と洗浄赤血球輸血群の 3 匹において脳血流量の測定を行なった。3 群間に有意差は認めなかった (repeated ANOVA: $P=0.77$) が、多重比較検定 (Bonferroni 検定) において、 α -NO 赤血球輸血群と洗浄赤血球輸血群の 2 群間に脳血流量の経過の差が認められた ($P<0.05$ 、図 15)。

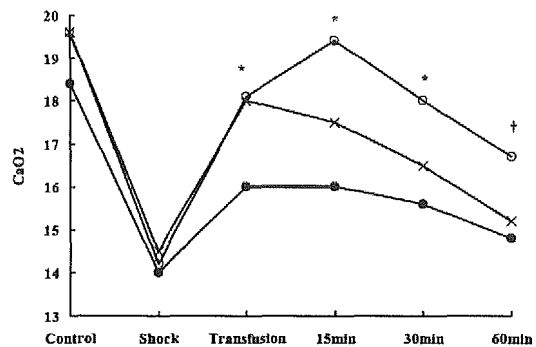


図 13 動脈血中酸素容量の経過

Closed circle は α -NO 赤血球、cross は CO 赤血球、そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control、収縮期血圧 < 45mmHg の維持開始 15 分後を shock、輸血直後を transfusion とし、輸血 15 分後、30 分後、60 分後の経過を示す。Repeated ANOVA: $P=0.001$, *: $P<0.01$, †: $P<0.05$ 。

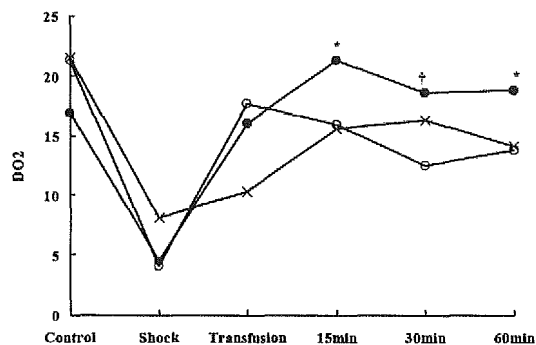


図 14 酸素運搬能の経過

Closed circle は α -NO 赤血球、cross は CO 赤血球、そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control、収縮期血圧 < 45mmHg の維持開始 15 分後を shock、輸血直後を transfusion とし、輸血 15 分後、30 分後、60 分後の経過を示す。Repeated ANOVA: $P=0.01$, *: $P<0.05$, †: $P<0.01$ 。

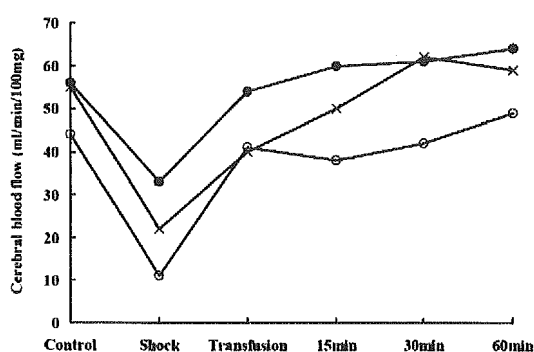


図 15 脳血流量の経過

Closed circle は α -NO 赤血球、cross は CO 赤血球、そして open circle は洗浄赤血球輸血を示す。脱血開始前を control、収縮期血圧 $<45\text{mmHg}$ の維持開始 15 分後を shock、輸血直後を transfusion とし、輸血 15 分後、30 分後、60 分後の経過を示す。Repeated ANOVA: $P=0.77$ 。

D. 考 察

本研究結果から、出血性ショックに対する α -NO 赤血球輸血が代謝性アシドーシスを早期に改善しうることを示された。この機序として、 α -NO 赤血球が血管拡張作用を有し、心拍出量と組織血流が確保されること、および T-state の Hb が低酸素下において酸素分子を放出しやすい特徴を有することが組織への酸素供給を高めていると考えられた。一方、CO 赤血球では弱い血管拡張作用を有することが示唆されたが、R-state で安定化しており、酸素分子の組織への放出が限られるため、出血性ショックの蘇生に対しては代謝性アシドーシスの改善が遅延すると考えられた。

出血性ショックにおける組織の酸素負債は急性代謝性アシドーシスの指標である HCO_3^- と BE によって示される。本研究では、出血性ショックによって誘導された代謝性アシドーシスの改善が CO 赤血球や洗浄赤血球の輸血より α -NO 赤血球の輸血で優れていることが示された (図 9、10)。 α -NO 赤血球の $\dot{\text{D}}\text{O}_2$ は 3 群のうちで最も高いこと (図

14) が代謝性アシドーシスに対する改善効果を発揮していると考えられた。

$\dot{\text{D}}\text{O}_2$ は CaO_2 と心拍出量の積である。 α -NO 赤血球の CaO_2 は 3 群のうちで最も低値を示したにもかかわらず (図 13)、高い $\dot{\text{D}}\text{O}_2$ を示した理由は α -NO 赤血球の輸血によって心拍出量が増大したためと解される。本研究では心機能を測定していないため、心筋収縮能の増大の有無は不明であるが、全身血管抵抗が α -NO 赤血球の輸血によって有意に低下していることから、心拍出量の増大が血管拡張によって説明可能である。一方、洗浄赤血球の輸血後においては、全身血管抵抗が上昇し心拍出量が低下傾向を示していたため、 $\dot{\text{D}}\text{O}_2$ が α -NO 赤血球より劣っていたと考えられる。

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

CO 赤血球と洗浄赤血球の輸血では、代謝性アシドーシスの改善に差を認めなかった。CO 赤血球は α -NO 赤血球よりも弱い血管拡張作用を有し、心拍出量を増加させる可能性が考えられた (図 5、6)。CO 赤血球では、輸血中の Hb が酸素運搬能を有さないが、血管拡張によって洗浄赤血球輸血と同等程度まで代謝性アシドーシスを改善させることができたと考えられた (図 9、10)。本研

究では約 40%の血液が CO 赤血球によって置換されたが、少量の CO 赤血球輸血であれば、酸素運搬能を有さない CO-Hb が存在しても血管拡張作用によって出血性ショックの蘇生に有用な可能性が考えられた。

本研究では、脳血流測定を試みた。すべての動物において測定することができなかつたため、本検討結果では統計学的有意差を証明することはできなかった。しかし、輸血後の脳血流量は、 α -NO 赤血球輸血で最も高く、洗浄赤血球輸血で最も低いことが示唆された(図 15)。重要臓器である脳の血流が α -NO 赤血球輸血による血管拡張によって維持される可能性があり、今後の検討が期待される。

表 2 に示されるように α -NO 赤血球を含んだ輸血液では met-Hb が 1/3 以上を占めていた。met-Hb は NO ドナーの添加に伴う nitrite の生成が関与したと考えられる。met-Hb は酸素運搬能がないと考えられるため、代謝性アシドーシスに対する α -NO 赤血球輸血の治療効果を減弱させている可能性がある。メチレンブルー添加によって met-Hb を減少させれば、 α -NO 赤血球輸血の効果をさらに高められる可能性が考えられるので、この点についても今後の検討が期待される。

Hb 濃度が α -NO 赤血球の輸血群で有意に低値を示した(図 12)。輸血前までの Hb 濃度に差を認めないこと、準備した輸血用血液に Hb 濃度の差を認めないことを確認(表 2)していたことから、その原因は、輸血後の変化に起因すると考えられる。 α -NO 赤血球が溶血を来たした可能性や間質から血管内に水の移動を来たした可能性が考えられるが、本研究において明らかにすることはできなかった。

E. 結 論

α -NO 赤血球の救急救命領域への応用を検討するため、ラット出血性ショックモデルに対する輸血を行い血行動態変化を観察した。 α -NO 赤血球輸血は血管拡張作用を有し、出血性ショックに対する輸血蘇生後の組織血流が改善し、組織への酸素運搬能が高まることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし(準備中)
2. 学会発表
なし

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

平成17年度 厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等ペグテラサイエンス給研究事業）
ヘモグロビンアロステリーを利用した 付加価値赤血球製剤の創製と救急医療への応用
分担研究報告書

- 分担課題： 1. CO結合-赤血球製剤の可能性：出血性ショック蘇生液としての効果
2. 赤血球モデルのNO, CO結合速度の解析

分担研究者 酒井 宏水 早稲田大学 理総研 助教授
研究協力者 土田 英俊 早稲田大学 名誉教授 / 理総研 顧問研究員

研究要旨

(1) 出血性ショック状態のラットに対し、COを結合した赤血球をアルブミンに分散させて投与した。血行動態、血液ガス組成は速やかに回復して6時間安定に推移し、酸素を結合した赤血球の投与と同等の反応であった。血中HbCOレベルは投与直後39%であったが、徐々に低下し6時間後には投与前と同等にまで低下した。酸素を結合した赤血球の投与では血清AST, ALT値は著明に増大したが、CO結合赤血球の投与では低下傾向を示し、虚血再灌流障害を低減する効果が示唆された。最近、CO結合赤血球の保存安定度が高いことも報告されており、今回の投与効果も併せ、付加価値赤血球製剤として極めて有望であると考えられた。当然のこと乍ら、CO毒性の観点から投与量の安全域を知るための実験も今後必要である。

(2) ガス状分子メディエータ: NOが赤血球に結合する速度は裸のHb溶液に比較して極めて遅いことが知られており、その機序も幾つか提案はされている。しかし、赤血球内部の濃厚Hb溶液の影響について、詳細検討された例は無い。そこでモデル赤血球(HbV, 粒径270 nm)を用い、ストップフロー法により、内水相のHb濃度の効果を検討した。モデル赤血球内Hb濃度1g/dLのときは、裸のHb溶液と同等の結合速度であったが、35g/dLに増大させることにより、結合速度は約1/4にまで低下した。一方、CO結合速度は、大きな変化を示さなかった。これは、NO結合速度が $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ オーダーと極めて速いのにに対し、COの結合速度は $10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ オーダーと遅く、内包Hb溶液の粘性による拡散律速の影響をNO結合の方がより強く受けやすいためと考えられた。

1. CO結合-赤血球の出血性ショック蘇生液としての投与効果

A. 研究目的

NOが血管内皮細胞から産生され、血管弛緩因子として作動することが報告されて以来、生体内NOの情報伝達分子として様々な機能を果たすことが明らかにされている。またCOもヘム代謝の過程で微量に産生され、これが血管生理に極めて重要な役割を果たしていることが解ってきた。例えば肝臓では、肝実質細胞に存在する酵素：ヘムオキシゲナーゼ-2 (HO-2)がヘム分解酵素として存在し、ヘム1分子の分解に対してCOガスを1分子放出する。これが肝臓洞血管内皮の伊東細胞に対し、血管弛緩因子として作動することが明らかになっている(Goda et al., 1996)。内因性のCOガスは更に、抗炎症作

用を示すことも明らかになっている(Otterbein et al., 2000)。これらの事実から、COの薬効を積極的に活用するため、静脈内投与可能な化合物としてルテニウムのCO錯体などを合成、CO放出薬としての効果を見る研究も行われるようになってきた(Johnson et al., 2003)。また、一酸化炭素中毒で知られるように、不完全燃焼等で生じるCOガスの吸入は極めて危険であるが、出血性ショック状態のラットに低濃度で吸入させることにより、多臓器不全の改善が見られることが明らかになっている(Zuckerbraun et al., 2005)。

赤血球に濃度高く含有するHbはCOを結合し、その結合力は酸素の約200倍と強く、保存安定度が高いことも報告されている(US patent 5476764)。しかし、結合は可逆的で分圧に依存し、大気に曝せば次第にCOを放出し酸素錯体

になる。そこで本研究では、COを結合した赤血球の投与効果を検討することを目的とし、出血性ショック状態のラットに対する投与試験を実施した。

(文献)

Goda et al., J. Clin. Invest. 1998;101(3):604-12.

Otterbein et al., Nat. Med. 2000;6(4):422-8.

Johnson et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2003;42:3722-9

B. 方法

CO結合ラット洗浄赤血球の調製

Wistar系ラットの赤血球を得るため、ラット(雄、体重250-300g)をエーテル麻酔下、開腹し、ヘパリン加シリンジを用い下大静脈より採

血した。これを遠心分離(2000g, 15 min)して赤血球層を得て、更に5%アルブミン(HSA)溶液を添加して遠心分離、再分散する操作を2回繰り返した。この洗浄赤血球分散液10 mLを50 mL硝子容器に入れ、プチルゴム製の蓋で封入した。金属製の導入針を刺し、COガスを通気し、Hbの配位子を全てCOに置換し、HbCOとした。自動血液ガス分析装置(ABL700, Radiometer)では、COHb含量は90%以上を示した。最終的にHb濃度を8.6 g/dLに調節し、これを蘇生液(RBC-HbCO)とした。また、CO化処理を行わず酸素を結合したままのRBC-HbO₂も同様に調製した。採血から投与試験に用いるまでの所要時間は、3時間以内とした。

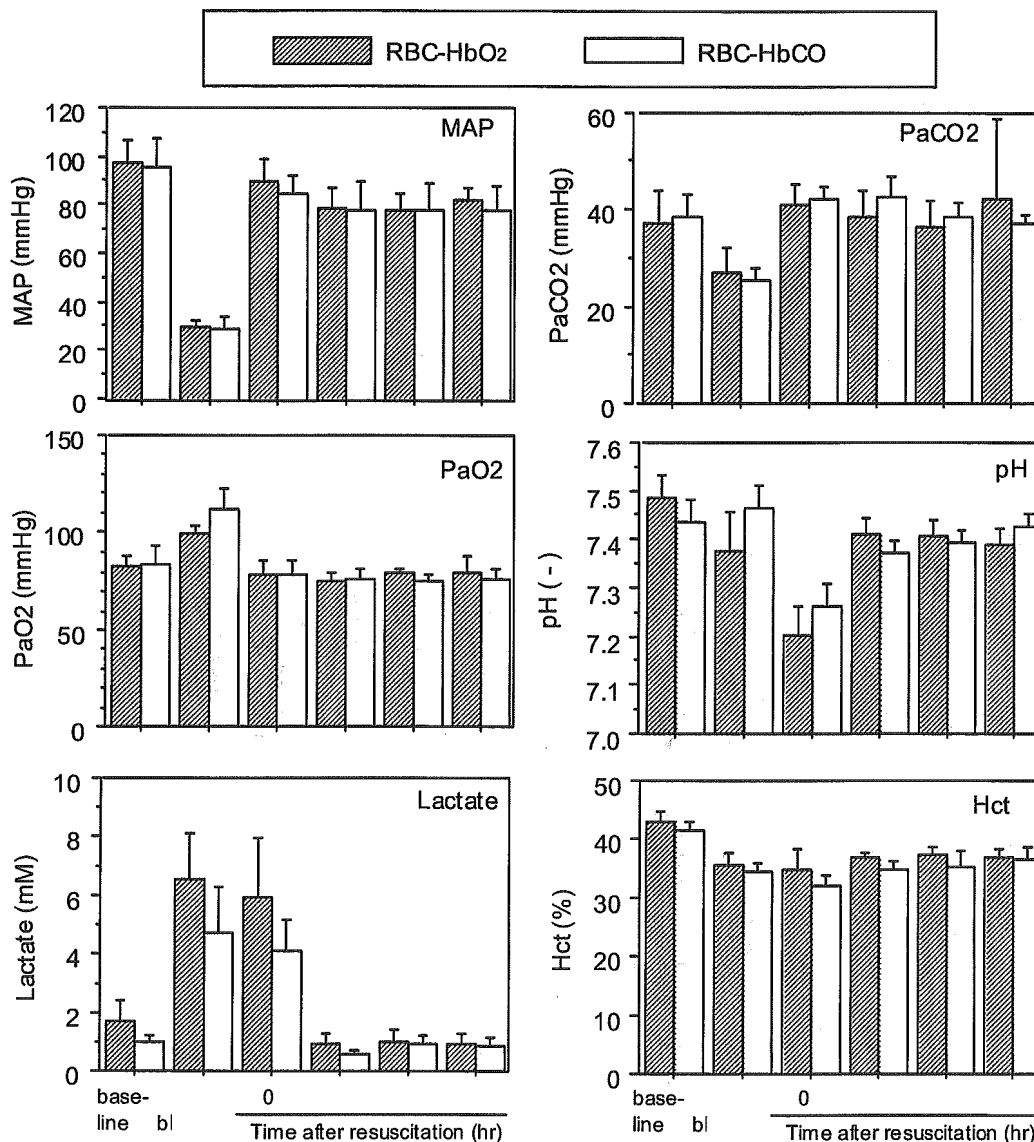


Figure 1. Changes in systemic parameters of RBC-HbO₂ and RBC-HbCO groups during the hemorrhagic shock and resuscitation experiment (n = 8).