

第5章 人工赤血球

酒井宏水^{*1}, 宗 慶太郎^{*2}, 武岡真司^{*3}, 小林紘一^{*4}, 土田英俊^{*5}

1 輸血代替の必要性

我が国の献血輸血システムは、世界的に見ても最高水準にあるといえる。安全な輸血用血液が医療機関に常備され、国民の健康福祉に大きく貢献していることは言うまでもない。肝炎やエイズなど輸血に伴う感染も大きな社会問題となったが、献血血液の厳重な検査と管理が強調され、常に被害を最小限に留めるために尽力している。特に核酸増幅法（NAT 検査）の採用の効果は多大である。しかし、検査項目から外れる病原体の存在、狂牛病や西ナイル熱、それに未知の感染源の存在の脅威に常に曝され、献血者の問診の徹底や献血の規制などゼロリスクを目指した新たな試みもなされている。その他の課題として、赤血球の保存期限は採血後わずか3週間、それに過誤を含め血液型不適合の医療事故もある。輸血回避のため、術中輸血開始目安のHb濃度10g/dlの低減、低温無輸血手術、自己血輸血の推奨と血液希釈、赤血球造血因子（EPO）投与による術前貯血も普及してきてはいるが、症例によっては適用できない。他方、献血1回当りの採血量は400 mlになったが、人口の高齢化に伴い健康献血者の総数は低下しつづけている。我が国のように地震などの自然災害が危惧される場合、緊急需要に対応した大量供給ができることは重要な国家的施策でもあり、感染の可能性を危惧することなく、血液型に関係なく、要請に即応していつでもどこでも必要量を直ちに供与できる、赤血球の機能を代替する酸素輸液の出現が強く期待されているところである。

* 1 Hiromi Sakai 早稲田大学 理工学総合研究センター 助教授

* 2 Keitaro Sou 早稲田大学 理工学総合研究センター 講師

* 3 Shinji Takeoka 早稲田大学 理工学術院 教授

* 4 Koichi Kobayashi 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 教授

* 5 Eishun Tsuchida 早稲田大学 理工学総合研究センター 名誉教授；顧問研究員

2 赤血球構造（膜）の重要性

赤血球は直径約 $8\mu\text{m}$ の中窪み円盤状粒子であり、酸素を結合できる蛋白質ヘモグロビン（Hb, 分子量 64,500）の高濃度溶液（約 35%）を赤血球膜に内包した構造を持つ。人工赤血球の歴史を紐解くと、最初は Hb が酸素結合部位であるのなら、血液型抗原が存在する赤血球膜を除去し Hb を精製単離して用いればよいのでは、という安易な発想から研究開発が始まったことが解る¹⁾。特に、戦後に精製ヒト Hb の投与試験が盛んに実施されたが、血圧亢進、腎毒性、出血、それに極めて短い滞留時間が問題となり当然成功しなかった。1990 年代から欧米で Hb 分子を加工した Hb 修飾体（分子内架橋型、重合型、高分子結合型）などを対象にした臨床試験が推進されたが、全般としては投与の修飾 Hb が血管内皮細胞由来の弛緩因子 NO を吸着するために生起する血管収縮（血圧亢進）²⁾、Hb との直接接触による血管内皮の障害³⁾、また、代謝異常や軽度の神経性副作用の指摘もあり、いずれもが全て赤血球とかけ離れた構造が原因となることが明らかにされた。

Hb 溶液が赤血球膜で覆われている理由は、①35%濃厚 Hb 溶液の高い粘度と膠質浸透圧の抑制、②本来毒性のある Hb 逸脱の抑制、③Hb 機能維持のための各種リン酸などエネルギー分子、解糖-ならびに還元-酵素系の保持の役割もある。また、④血液（血球分散系）は非 Newton 流体で、体内循環とくに末梢血管内における特色ある流動形式と生理作用（ホメオスタシス）が特性である。これら赤血球本来の構造と機能の関係が初めからわかっていれば、小胞体（細胞型）構造なら無害で投与妥当との結論が容易に想像できたはずである。

1950~1960 年代に Chang や豊田らはすでに、高分子薄膜でできた球の中に Hb を内包する方式を検討していた^{4,5)}。使用された高分子材質はナイロン、コロジオン、ゼラチン、アラビアゴム、シリコンなどであった。また、エマルション粒子の中にヘモグロビンを封入し、カプセル化する方法も検討された。しかし、いずれも粒径制御や分散性に問題があり、具体的な成果を得ていない。1960 年代後半に両親媒性分子であるリン脂質が水中で二分子膜を形成しこれが小胞構造（liposome）に成ることが Bangham によって報告され⁶⁾、1970 年代初めに Djordjevic (Univ. Illinois, Rush Presbyterian Med. Center) らは、リン脂質小胞体に Hb を内包した “Synthetic Erythrocyte” の研究を開始した⁷⁾。しかし、粒径制御など調製の困難さ、血漿蛋白質との相互作用に起因する凝集阻止に十分な手段を得なかったため具体化しなかった。

3 ヘモグロビン小胞体の構成

リン脂質二分子膜で高濃度 Hb 溶液を被覆する技術と、特に毛細血管を容易に通過できる粒径

第5章 人工赤血球

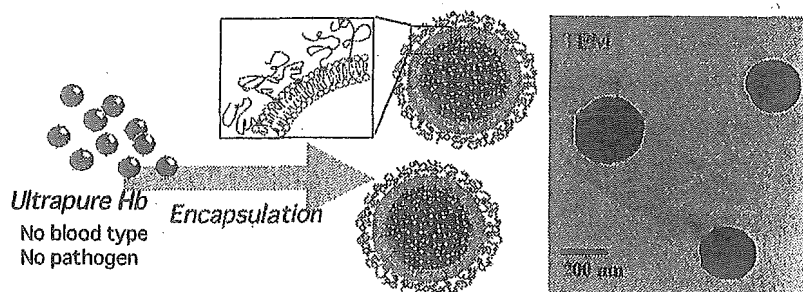


図1 ヘモグロビン小胞体

期限切れ赤血球より精製単離した高純度Hbをリン脂質二分子膜で被覆する。さらに粒子表面にはPEG鎖で修飾する。右側の透過型電子顕微鏡写真から、制御された粒子径(250 nm)と、内水相にHbが濃度高く内包されている様子がわかる¹¹⁾。

の制御、また血中分散安定度向上は、高分子と分子集合の科学に立脚した工夫(1990年代)を組み込んでようやく完成できた¹¹⁾(図1)。高純度(99.9%以上)高濃度の精製Hb溶液、extrusion法の採用により、Hb溶液(濃度35%以上)を包んだ小胞体として得られ^{8~12)}、Synthetic erythrocyteの問題点を解決した。検査済み献血由来の期限切れ赤血球から精製した濃縮Hb利用で感染源はない建前であるが、精製に際してHbに一酸化炭素(CO)を結合させ安定化を計り、60℃の加熱処理(pasteurization)とウイルス除去膜処理(ultrafiltration)の組合せで安全性を確保する^{13~15)}。最終段階で光照射励起により酸素を結合したHbO₂に変換。アロステリック因子を添加して酸素親和度の制御($P_{50} = 27 \sim 32$ Torr)ができる¹⁶⁾。ポリエチレングリコール(PEG)結合脂質を粒子表面に配置して小胞体粒子間の凝集抑制と分散安定度向上の効果を観測¹⁷⁾、この表面修飾過程を動力学的に明らかにし、溶液のまま室温にて2年以上保存できる系が構築できた¹⁸⁾。開発当初、リン脂質小胞体は極めて不安定な構造であるというのが一般常識であり、リン脂質分子内の脂肪酸に重合性基(ジエン基など)を導入することが検討され¹⁹⁾、 γ 線照射重合により極めて安定な小胞体構造を得ることに成功したものの²⁰⁾、細網内皮系における代謝分解に問題があった²¹⁾。しかしその後、通常の飽和型脂質(ジパルミトイルホスファチジルコリン)でも所定の比率でコレステロールや負電荷脂質と混合し、さらに小胞体粒子表面をPEGで修飾すれば、支障のない分散安定度と保存安定度および血液適合性が得られることが明らかとなったのである。

人工赤血球は当然医薬品であるのでGMP(Good Manufacturing Practice)基準の無菌的製造が前提となるが、製造工程および製品の無菌性を保証するためいわゆるエンドトキシン(グラム陰性菌体の細胞外膜成分であるリポポリサッカライド:LPS)が基準以下であることを実証することが極めて重要となる。LPSは約8本のアルキル鎖が高分子糖鎖に結合した両親媒性分子で

医療用マテリアルと機能膜

あるため、リン脂質小胞体の二分子膜に容易に挿入され、常法 (Limulus Amebocyte Lysate Test) による定量測定を阻害することが問題とされていた。しかし、これを克服することに成功し²²⁾、製造工程の無菌性をモニタリングし、常に 0.2EU/mL 以下であることを保証している。

これら新しい観点からのプロセスエンジニアリングによる製造工程の効率化を課題として研究を重ね、パイロットプラントの基本設計を完了している。

4 ヘモグロビン小胞体による酸素輸送効果

医療現場とくに救急医療や外科的手術において、血液型不一致や感染の心配をせずに、いつでも要求に応じて投与できる、輸血代替としての酸素輸液が求められている。この場合、酸素輸液の必須条件は、投与後の全身管理の主な項目：循環動態やガス交換、それに末梢組織の酸素化が輸血をした場合と同等に正常値に保たれることである。

4.1 血液希釈

Hb 小胞体の動物投与試験 (ラット) では、交換輸血法で循環血液量の実に 90% 超過の交換でも血圧が維持され、また血液ガス組成も腎皮質の酸素分圧も正常値を推移することが確認された^{23~26)}。また、臨床現場で想定される最大の交換率 40% の交換輸血においても全例が生存し、ヘマトクリット (赤血球体積分率) が 1 週間で完全に回復する²⁷⁾。したがって、術前血液希釈、術中出血分の補給、さらに人工心肺 (ECMO) 体外循環回路の補充液としての利用が期待できる²⁸⁾。特に小児患者の体外循環では、無輸血充填とした場合 (血漿増量剤の充填)、術中の短時間の Hb 濃度の低下が脳に障害を与え、術後の知能発達に影響をおよぼすとされており、Hb 小胞体を充填液として用いることの利点が期待されている。

Hb 小胞体生理塩溶液の膠質浸透圧はゼロなので、血液交換率が高い場合には循環血液量を正常に維持するために当然、血漿増量剤の添加が必要となる。例えば、5% アルブミン (生理条件) に分散させた場合の膠質浸透圧は 20 Torr (血液は 20~25 Torr)²⁹⁾、粘度と浸透圧はほぼ血液と同等になり、循環動態の恒常性に寄与する。Hb 小胞体の粒径は赤血球の約 1/30 と小さく、血漿中に均一に分散する。赤血球と混合して微小血管モデル (内径 28 μm) を流動させたときの顕微鏡観察の結果、赤血球のような大粒子は管の中央部を流れるが、Hb 小胞体は結果として管壁の近くに偏る傾向 (Near-Wall Excess) が認められた³⁰⁾ (図 2)。無麻酔下ハムスターの 80% 交換輸血における皮下微小循環動態の検討から、微小血管内を流動する PEG 修飾 Hb 小胞体に凝集は認められず、血漿相に均一分散しているが^{31, 32)}、表面未修飾の Hb 小胞体では細静脈や毛細管内など、流速が比較的遅い部位で凝集体が観測されている (図 3)。血流速度、有効毛細管

第5章 人工赤血球

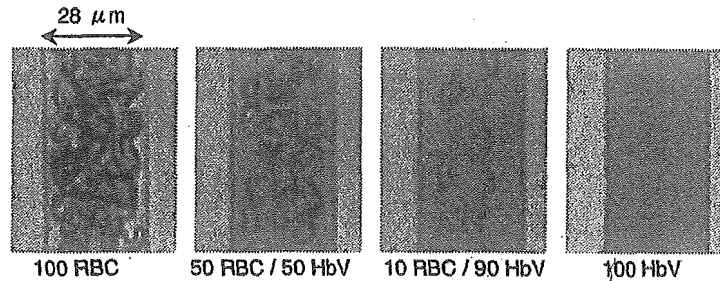


図2 微小モデル血管 (内径 $28\mu\text{m}$) を流動する Hb 小胞体と赤血球の混合液

赤血球のみの場合、管壁近傍に透明な血漿層が存在する。Hb 小胞体の分量を多くすると、次第に血漿層が濁ってくる。この倍率では Hb 小胞体の粒子は確認できないが、濁度変化から Hb 小胞体が血漿中に均一に分散している状態がわかる³⁰⁾。

密度、組織酸素分圧ともに表面修飾系が未修飾系に比べて極めて高い数値として推移することからも、表面 PEG 修飾が不可欠であることが明示された。

4.2 出血ショック蘇生液

さらに、出血ショック時の蘇生液としても検討され^{33~35)}、赤血球と同等の酸素運搬機能が実証された。例えば、Sevoflurane 麻酔下、ラットの循環血液量の 50% を脱血して 15 分後に Hb 小胞体をリコンビナントアルブミンに分散させて投与し 6 時間観察した。リコンビナントアルブミン単独の投与では 8 匹中 2 匹が死亡したのに対し、Hb 小胞体投与群では循環動態も血液ガス組成も脱血液の投与と同等に推移し全例生存した (図 4)。これらの結果は、室温で備蓄可能な Hb 小胞体を、緊急時に投与して出血ショックの患者を蘇生させることができる可能性を意味している。

4.3 低酸素領域への酸素輸送

ヒト赤血球の酸素親和度 (P_{50} : 酸素が 50% 結合飽和するときの酸素分圧) は、 37°C で約 28 Torr である。全身の酸素消費量は、動脈血酸素分圧 (110 Torr) と静脈血酸素分圧 (40 Torr) の間の酸素飽和度較差 (A-V 較差、ヒト赤血球の場合は 25% 程度) と Hb 濃度、それに心拍出量の積として算出される。赤血球から精製単離した Hb の P_{50} は 8 Torr 程度と低く、静脈血酸素分圧 (40 Torr) では到底酸素を放出しないので、Hb を利用する人工酸素運搬体の P_{50} も、赤血球と同等あるいはそれ以上に調節すべきと極めて明快地考えられてきた。

正常の組織であればこの理論が成り立つであろう。しかし、血管性障害により十分な血流が行

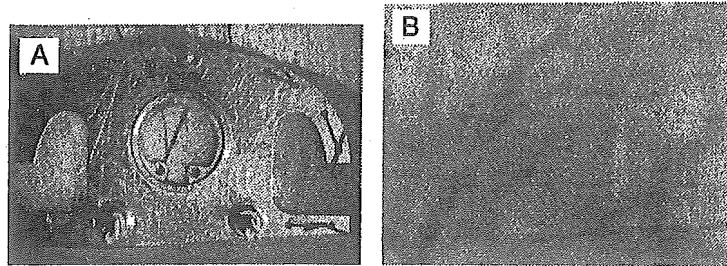


図3 ハムスター皮下微小循環観察モデルと、Hb小胞体投与後の微小循環動態
 (A) 体重約60gのハムスター背部皮膚に硝子製の窓枠を装填することにより、顕微鏡下、細動静脈、毛細血管内の赤血球の流動状態や血管径、組織酸素分圧の観察が可能と成る。
 (B) この動物実験モデルを用い、覚醒下PEG鎖で修飾したHb小胞体で循環血液量の80%を交換すると、Hb小胞体が血漿中に均一分散しているため、毛細管の形状が見える。PEGで修飾しないと、凝集体が多数観測された³¹⁾。

き届かない組織（虚血性領域）の場合、血流速度も組織酸素分圧も極度に低下しているため、動脈血はこの領域に到達する前にすでに酸素をほとんど放出してしまう。したがって、酸素親和度を赤血球よりも大きく（ P_{50} 値を小さく）すれば、虚血性領域に到達してから酸素を放出できると考えた^{36, 37)}。このとき、赤血球よりも小粒径の人工赤血球（250 nm 径）は、血漿中に均一分散しているため、赤血球が行き届かない狭窄部を経由して到達できる。このような仮説の下、これまでにハムスター有茎皮弁虚血モデルにおいて、高酸素親和度 Hb 小胞体（ $P_{50}=15$ Torr）で血液希釈することにより虚血領域の酸素分圧が有意に上昇できることを明らかにした^{38, 39)}。したがって、輸血代替としての利用以外の酸素治療剤として、例えば脳や心筋など虚血領域の酸素化、腫瘍組織の酸素化など、低酸素領域へ選択的な酸素ターゲティングとしての利用が期待できる。Hb 小胞体の酸素親和度はアロステリック因子により自在に調節できるので¹⁶⁾、各々の症例に相応しい P_{50} を有するテイラーメイド人工赤血球が可能になる。

5 ヘモグロビン小胞体の安全度

5.1 血液適合性

臨床試験開始前にヒトを対象としてできる試験は唯一、採血液との相互作用の検討である。Hb 小胞体の粒子表面は PEG 修飾してあるので、血漿蛋白質との相互作用が低減され、凝集は生起せず、血液と同等の溶液粘度を示す。血小板の活性化の有無を、RANTES とセロトニンの放出量、PAC-1 の発現量の変動から検討し、活性化しないことを確認した⁴⁰⁾。カリクレイン-ニキシン系の活性化も、粒子表面の陰性荷電への接触が引金となるが、負電荷脂質成分をホスファチ

第5章 人工赤血球

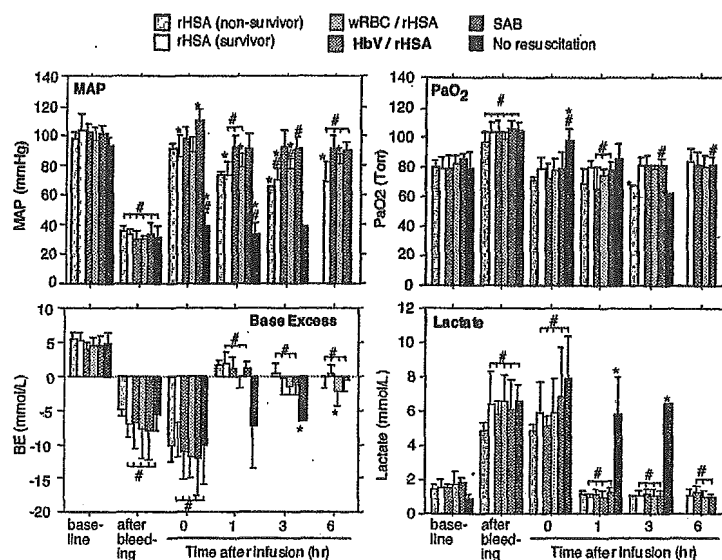


図4 Hb小胞体による出血ショック蘇生試験

Sevoflurane 吸入麻酔下、ラット循環血液量の50%を脱血し15分経過後、Hb小胞体をリコンビナントアルブミン (rHSA) に分散させた HbV/rHSA, rHSA 単独, 脱血液 (SAB), または洗浄赤血球を rHSA に分散させた溶液 (wRBC/rHSA) を投与した。ショック状態では血圧の低下, 代償機能により過呼吸となり, 動脈血酸素分圧 (PaO₂) の上昇, pH と塩基余剰 (Base Excess) の低下がみられる。HbV/rHSA 投与後では血圧, 血液ガス組成ともに脱血液 (SAB) の投与と同等である。総てのパラメータで rHSA 単独投与群と比較して有意に優れている。蘇生液を投与しないと全例が3時間以内に死亡する。rHSA 群は8匹中2匹が死亡したが, HbV/rHSA 群は全例が生存した。[#]p < 0.05 vs. baseline, ^{*}p < 0.05 vs. HbV/rHSA

ジルグリセロールからカルボン酸型の合成脂質に換えることにより, この活性化を回避することに成功。また, 多核球の走化能への影響もないことを確認している⁴¹⁾。

5.2 循環動態の恒常性

修飾 Hb 投与に際し血圧の異常亢進や, 血管床への血小板沈着などの副作用が認められているが, これは NO との高い親和度に起因すると考えている¹⁾。ハムスター皮下微小循環系の抵抗血管径と血圧の変動を追跡した実験では, 修飾 Hb (特に分子内架橋 Hb, 粒径 7 nm) で最も抵抗血管径が収縮し, 同時に顕著な血圧亢進を示した。血管収縮は末梢循環を阻害し, 組織へ十分量の酸素が供給されなくなる。粒子径が大きくなるにつれこれらの変動の程度は弱くなり, 直径 250 nm の Hb 小胞体では, 血管収縮も血圧亢進も起こらないことが確認されている⁴²⁾。Hb 小胞体の NO の結合速度定数をストップフロー法で測定したところ $4.8 \times 10^6 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と判明し, こ

医療用マテリアルと機能膜

これは分子状 Hb 溶液の結合速度定数 ($3.0 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) よりも一桁遅いので、小胞体に濃度高く内包することで NO の結合はある程度抑制されている⁴³⁾。しかし赤血球の NO 結合速度 ($5.2 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) に比較すると二桁もまだ速いことになり、NO 結合速度の違いだけでは説明できない。現在のところ、分子状の修飾 Hb は、血管内皮細胞層を透過して血管内平滑筋近傍に到達し、内皮細胞が産生する NO を捕捉し血管弛緩機能を低下させるが、粒径 250 nm の Hb 小胞体では赤血球と同様に平滑筋までは到達できず、血管内腔に留まるため、血管収縮も血圧亢進も起こらないと考えている (図 5)。

肝臓中では肝実質細胞にある hemeoxygenase がヘムを分解する。実はこの際に産生する一酸化炭素 (CO) が、血管弛緩因子として血管内壁の Ito 細胞に作用することが初めて明確に示された。摘出肝灌流中の微小循環動態の検討では、類洞血管の孔 (穿孔節: fenestration, 孔径約 100 nm) よりも小さい修飾 Hb (7 nm) は、これを容易に通過して Disse 腔に侵入し、肝実質細胞で代謝され、bilirubin 排泄の亢進と同時に CO を放出するが、CO 親和性の高い血中 Hb に捕捉され、結果として 20% の血管抵抗増大と同時に、類洞の不連続的狭窄と流動停止領域の存在を確認している (図 6)。他方、Hb 小胞体では粒径が 250 nm と大きいため、類洞血管の孔を透過できず肝実質細胞に到達しないので、この現象は生起しない。この間灌流圧は一定値に保たれている^{44, 45)}。この結果は、臓器移植の際に Hb 小胞体を灌流液として安全に使用できることも意味しており、摘出してから移植までの所要時間を延長できるので、移植臓器をこれまでよりも遠隔地に運搬することが可能になると考えられる。

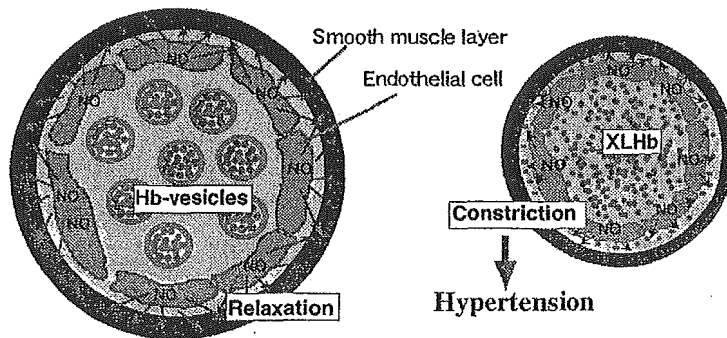


図 5 修飾ヘモグロビン投与による血管収縮の機序

血管内皮層を透過した粒径の小さい Hb は内皮細胞由来弛緩因子 (NO) が平滑筋に到達する前に捕捉しやすく、これが血管収縮につながるものと考えられる。他方、Hb 小胞体では血管内に留まるため、NO 捕捉反応は抑制され、血管収縮は起こらない⁴²⁾。

第5章 人工赤血球

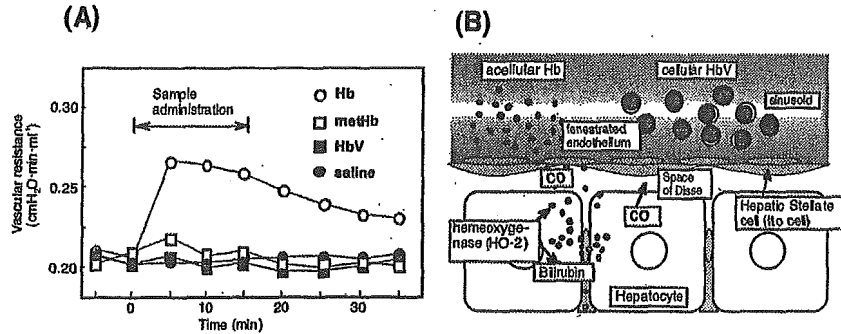


図6 肝の微小循環動態とHb代謝

(A)精製Hb溶液で摘出肝を灌流すると灌流圧が上昇するが、Hb小胞体とmetHbの場合は灌流圧は上昇しない。このことは(B)のように説明できる。Hb分子は類洞血管の孔(fenestration)を通してDisse腔に容易に拡散し、hemeは肝実質細胞のhemeoxygenase-2により代謝され、ビリルビンとCOを排泄する。本来COは類洞血管を覆うIto細胞に血管弛緩因子として作用するが、Disse腔でHbに捕捉され弛緩作用低下のため、灌流圧増大につながると理解される。他方、Hb小胞体は篩孔より大きいので通過せず、代謝に入らずまたCOを結合しないため肝臓の微小循環はほとんど低下しない。またmetHbはDisse腔に拡散するがCOを結合しないため変化なし⁴⁴⁾。

5.3 代謝過程

酸素輸液の投与は必然的に血液の大半を置換するくらいの大量投与が前提となるので、成分の体内動態と代謝過程を詳細に検討する必要がある。これまでの検討の結果、投与されたHb小胞体は最終的に、貪食細胞が多く存在する脾、肝、骨髄など、いわゆる細網内皮系(RES)に移行することが同位元素(^{99m}Tc)修飾したHb小胞体の体内動態の観測から解明され⁴⁶⁾、RES機能への影響とHb小胞体の構成成分の代謝確認も実施された。これらの詳細検討は、貪食細胞に捕捉されたHb小胞体が7日以内に分解消失⁴⁷⁾(図7)、また脾臓重量も一過性増大を示すが7日後には正常値に戻り、血液生化学検査でも異常値は認められていないので^{48, 49)}、老化赤血球の代謝経路と同様と考えている。また、40%の血液を急速交換した後の生存試験(ラット)では、約1週間後には赤血球量は正常値にまで回復していることから²⁷⁾、Hb小胞体の成分が造血に有効利用されていることも考えられ、現在詳細を検討している。

5.4 反復投与試験

新薬の非臨床試験において安全度確認のための項目の一つに、GMP基準で製造された試料について齧歯類およびその他の動物を対象とした反復投与試験がある。予備的にラットに対してHb小胞体の反復投与試験(投与量10ml/kg/日を14日間投与)を実施し、循環血液量の実に2.5倍もの分散液を投与したが、体重は増加し続け、血液生化学的、組織病理学的検討でも顕著な副

医療用マテリアルと機能膜

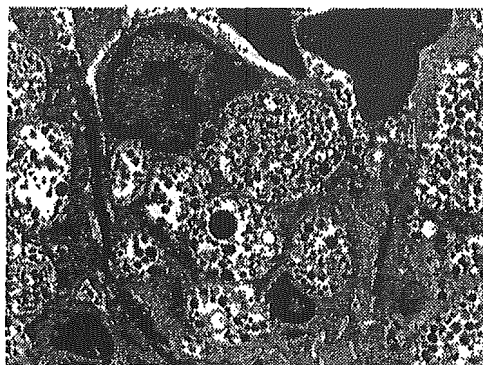


図7 ヘモグロビン小胞体の代謝過程

Hb 小胞体投与 1 日後のラット脾臓 macrophage の透過型電子顕微鏡写真。食胞 (phagosome) 中に Hb 小胞体の粒子が多数認められる。7 日後には消失。蓄積は全く認めない⁴⁷⁾。

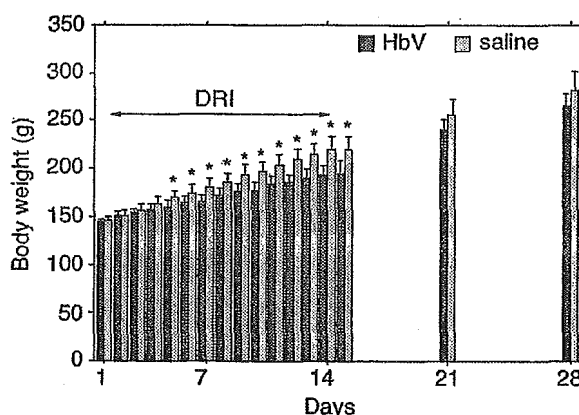


図8 ヘモグロビン小胞体の反復投与試験

ラットに Hb 小胞体を 14 日間連続投与 (DRI, 10 ml/kg/day × 14 days) 後, 2 週間全例生存した。体重は略々直線的に増加し続けた。ラットの循環血液量は 56 mL/kg なので, 総投与量 (140 mL/kg) はその 2.5 倍に匹敵する。5 日以降, 生理食塩水投与群と比較して有意差が認められるが (*印), 21, 28 日では有意差はない。15 日目の剖検では肝脾重量と血中脂質濃度の一過性増大が認められたが, 血中ビリルビンや鉄の放出もなく, 細網内皮系のヘム代謝も許容範囲内であることが明らかとなった⁵⁰⁾。

作用がなく, Hb 小胞体の成分が速やかに代謝される過程が結果として得られ, 安全度が極めて高い製剤であることが証明されている⁵⁰⁾ (図 8)。

第5章 人工赤血球

6 おわりに

酸素輸液の研究は、この30年間に具体的対象物についての物性と動的機能の相関が解明できるようになってきている。修飾 Hb を用いる酸素輸液の研究は臨床試験の最終段階にきてはいるが、各種副作用が問題提起となっている。結局は赤血球と同様な被覆膜を持つ構造 (Hb 小胞体) が理想であるとの結論に至ろうとしている。また、今回は割愛させていただいたが、別途の展開としてヘム-リン脂質誘導体を利用した、小胞体構造の自己集合体、さらにそのアルブミン担持体 (アルブミン-ヘム) についても同様の成功を確かめており、酸素運搬機能が実証されている⁵¹⁾。人工赤血球は赤血球と比べて体内寿命が短いので短期間の利用 (3日程度) に限られるが、血液型や感染源がなく、長期間保存できる点は赤血球の性能をしのいでいると言える。健常動物 (ラット) の場合には投与のみで存命し得ること、また早い時間にショック状態から回復が可能であるなど、輸血代替としての利用はもちろん、さらに赤血球よりも小粒径である利点を生かした新しい適応 (梗塞部位の酸素化、抗腫瘍効果増強など) も提案されており、医療に著しい変革をもたらすことが期待されている。

謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金により推進された。ここに記して謝意を表します。

文 献

- 1) E. Tsuchida (ed.), *Blood substitutes, present and future perspective*, Elsevier, Amsterdam (1998)
- 2) E. P. Sloan *et al.*, *JAMA*, **282**, 1857 (1999)
- 3) K. Burhop *et al.*, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, **32**, 353 (2004)
- 4) T. M. S. Chang, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **10**, 5 (1984)
- 5) 豊田忠之, *科学*, **35**, No. 1, 7 (1965)
- 6) A. D. Bangham *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **8**, 660 (1964)
- 7) L. Djordjevich *et al.*, *FASEB Proc.*, **36**, 567 (1977)
- 8) S. Takeoka *et al.*, *Artif. Organs Today*, **3**, 129 (1993)
- 9) H. Sakai *et al.*, *Protein Expression Purif.*, **4**, 563 (1993)
- 10) S. Takeoka *et al.*, *Langmuir*, **12**, 1755 (1996)
- 11) H. Sakai *et al.*, *Biotechnol. Progress*, **12**, 119 (1996)

医療用マテリアルと機能膜

- 12) K. Sou *et al.*, *Biotechnol Progress*, **19**, 1547 (2003)
- 13) Y. Naito *et al.*, *J. Artif. Organs*, **5**, 141 (2002)
- 14) I. Fukutomi *et al.*, *J. Artif. Organs*, **5**, 102 (2002)
- 15) H. Sakai *et al.*, *J. Biochem.*, **131**, 611 (2002)
- 16) L. Wang *et al.*, *Polymer Adv. Technol.*, **4**, 8 (1993)
- 17) K. Sou *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **11**, 372 (2000)
- 18) H. Sakai *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **11**, 425 (2000)
- 19) E. Tsuchida *et al.*, *Macromolecules*, **25**, 207 (1992)
- 20) T. Satoh *et al.*, *ASAIO J.*, **38**, 580 (1992)
- 21) K. Akama *et al.*, *Polymer Adv. Technol.*, **11**, 280 (2000)
- 22) H. Sakai *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **93**, 310 (2004)
- 23) Y. Izumi *et al.*, *Crit. Care Med.*, **24**, 1869 (1996)
- 24) H. Sakai *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 23 (1997)
- 25) K. Kobayashi *et al.*, *Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotechnol.*, **25**, 357 (1997)
- 26) Y. Izumi *et al.*, *ASAIO J.*, **43**, 289 (1997)
- 27) 酒井宏水ほか, *人工血液*, **12**, 44 (2004)
- 28) 山崎真敬ほか, *人工臓器*, **33**, S206 (2004)
- 29) H. Sakai *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **11**, 56 (2000)
- 30) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**, H2543 (2003)
- 31) H. Sakai *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **40**, 66 (1998)
- 32) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **276**, H553 (1999)
- 33) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283**, H1191 (2002)
- 34) A. Yoshizu *et al.*, *ASAIO J.*, **50**, 458 (2004)
- 35) H. Sakai *et al.*, *Crit. Care Med.*, **32**, 539 (2004)
- 36) P. Cabrales *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **288** H1885 (2005)
- 37) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **288** (2005), 印刷中
- 38) D. Erni *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **284**, H1702 (2003)
- 39) C. Contaldo *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**, H1140 (2003)
- 40) S. Wakamoto *et al.*, *Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotechnol.*, **29**, 191 (2001)
- 41) T. Ito *et al.*, *Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotechnol.*, **29**, 427 (2001)
- 42) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **279**, H908 (2000)
- 43) H. Sakai *et al.*, *Polymer Adv. Technol.*, **7**, 639 (1996)
- 44) N. Goda *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **101**, 604 (1998)
- 45) T. Kyokane *et al.*, *Gastroenterology*, **120**, 1227 (2001)
- 46) K. Sou *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **312**, 702 (2005)
- 47) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Pathol.*, **159**, 1079 (2001)
- 48) H. Sakai *et al.*, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **41**, 222 (2003)
- 49) H. Sakai *et al.*, *Biomaterials*, **25**, 4317 (2004)
- 50) H. Sakai *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311**, 874 (2004)
- 51) Y. Huang *et al.*, *ASAIO J.*, **50**, 525 (2004)

医療用マテリアルと機能膜

2005年5月31日 第1刷発行

監修 樋口亜紺 (T0445)
発行者 島 健太郎
発行所 株式会社シーエムシー出版
東京都千代田区内神田1-13-1 豊島屋ビル
電話 03(3293)2061
大阪府中央区釣鐘町1-1-1 大宗ビル
電話 06(4794)8234
<http://www.cmcbooks.co.jp/>

[印刷 倉敷印刷株式会社]

© A. Higuchi, 2005

落丁・乱丁本はお取替えいたします。

本書の内容の一部あるいは全部を無断で複製(コピー)することは、
法律で認められた場合を除き、著者および出版社の権利の侵害
となりますので、その場合には予め小社宛許諾を求めて下さい。

ISBN4-88231-503-3 C3043 ¥65000E

**Erythrocytes with T-state-stabilized hemoglobin as a therapeutic tool for
post-ischemic liver dysfunction**

Kazuhiro Suganuma, Kosuke Tsukada, Misato Kashiba, Antonio Tsuneshige,
Toshiharu Furukawa, Toshiro Kubota, Nobuhito Goda, Masaki Kitajima,
Takashi Yonetani, Makoto Suematsu

Department of Biochemistry and Integrative Medical Biology and Department of
Surgery, School of Medicine, Keio University, Tokyo 160-8582, Japan
Department of Biochemistry and Biophysics, School of Medicine,
University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

KS and KT equally contributed to this work as the first author.

Running Title: T-state stabilized hemoglobin and organ dysfunction

Address for Correspondence and Reprints:

Makoto Suematsu, MD, PhD

Professor and Chair

Department of Biochemistry and Integrative Medical Biology

School of Medicine, Keio University

35 Shinanomachi, Shinjuku-ku

Tokyo 160-8582, Japan

Phone: +81-3-5363-3753

Fax: +81-3-3358-8138

E-mail: msuem@sc.itc.keio.ac.jp

ABSTRACT

T-state stabilization of hemoglobin (Hb) has been thought to stimulate the ability of erythrocytes to release NO under hypoxic regions. This study aimed to examine if the stabilization could protect against post-ischemic organ injury. Washed human erythrocytes containing three different states of the Hb allostery were suspended in physiological saline at 10 g/dl in Hb concentration: control Hb (hRBC), CO-Hb that is stabilized under R-state with the 6-coordinated prosthetic heme (CO-hRBC), and α -NO-deoxyHb stabilized under T-state (α NO-hRBC). To prepare α NO-RBC, fully deoxygenated RBC was prepared with FK409, a thiol-free NO donor, at its half molar concentration to that of Hb; this procedure resulted in the 5-coordinated NO binding on the α -subunit heme as judged by electron spin resonance spectrometry. Rats were subject to 20-min systemic hemorrhage to maintain systemic blood pressure at 40 mmHg, and were reperfused with one of hRBCs. This protocol for ischemia followed by 60-min reperfusion with the physiological saline alone caused modest metabolic acidosis and cholestasis. Administration of hRBC or CO-hRBC significantly attenuated cholestasis and improved the acidosis. Rats treated with α NO-hRBC further exhibited greater recovery of visceral blood supply, metabolic acidosis and bile excretion than those treated with hRBC or CO-hRBC, and displayed the best outcome of local oxygen utilization in the hepatic lobules. Half-life time of α -NO-RBC administered in vivo was approximately 60 min. These results suggest that T-state Hb stabilization by NO serves as a stratagem to treat post-ischemic organ dysfunction.

Key Words: hemoglobin allostery, hemorrhagic shock, liver microcirculation, nitric oxide, oxygen

INTRODUCTION

There are several lines of evidence that allostery of hemoglobin (Hb) does not only determine oxygen-carrying capacity of red blood cells (RBC) but also dictates an oxygen-sensing ability to regulate microvascular function. RBC can sense a reduction of PO₂ and an increase in PCO₂ by utilizing Hb: such alterations in local gas tension have been shown to cause conformational stabilization of T-state Hb, which is characterized by 5-coordinated structure of the prosthetic heme, and thereby facilitate the release of molecular oxygen from Hb in the peripheral tissue, known as Bohr's effect (31). On the other hand, an elevation of PO₂ or partial binding of carbon monoxide (CO) stabilizes R-state Hb, which is characterized by the 6-coordinated heme structure. The latter mechanism renders Hb ineffective in its delivery of O₂ to peripheral tissues, which is the primary cause of CO poisoning. The Hb allostery of this kind has been reported to regulate microvascular function through multiple mechanisms: First, alterations in the Hb allostery play a key role in regulation of the delivery of NO released from the cells (19)(24). Under the low oxygen tension where T-state Hb is stabilized, the release of RBC-derived NO has been thought to be brought to microvascular endothelium and helps vasorelaxation to guarantee ample blood supply in hypoxic regions (10). RBC also has the ability to release ATP in response to hypoxia (3). As previously shown, extracellularly released ATP activates purinergic receptors on endothelial cells to trigger intracellular calcium ion and NO generation (6)(7). Such hypoxic responses of RBC appears to result from allosteric changes in Hb, so far as judged from observation that CO, the R-state stabilizer, significantly diminished hypoxia-induced ATP release from the cells (6)(9).

Although neither mechanisms *in vivo* by which NO is degraded in and around RBC nor those resulting in hypoxia-triggered conductance of NO or ATP across RBC membrane have well been uncovered yet (5)(14), these results tempted us to investigate if stationary stabilization of the T-state Hb allostery could serve as a therapeutic tool for improving hypoxic organ damages, since RBC with T-state stabilized Hb might have the greater ability to release oxygen and to trigger vasorelaxation for maintenance of ample blood supply than normal RBC. Recent studies revealed that T-state Hb can be stabilized without destroying RBC by treating the cells with membrane-diffusible NO under deoxygenated conditions (30)(31). In these studies, α -nitrosyl Hb,

$\alpha(\text{Fe-NO})_2\beta(\text{Fe})_2$ has been synthetically prepared; despite the halved O_2 -carrying capacity, α -nitrosyl Hb could represent a versatile low affinity O_2 carrier with improved features that might deliver O_2 to tissues effectively even after NO is sequestered at the heme site of Hb. However, solid evidence for effectiveness of RBC with α -nitrosyl Hb to treat hypoxic organ dysfunction in vivo and its pathophysiologic link to local O_2 metabolism have not fully been investigated in vivo. This study was designed to examine protective effects of RBC with α -nitrosyl Hb on microvascular function, O_2 delivery and organ function in the post-ischemic rat liver where the O_2 delivery is limited even under physiologic conditions.

MATERIALS AND METHODS

Preparation and characterization of α -nitrosyl Hb in human erythrocytes

Human erythrocytes (RBC) were isolated from heparinized peripheral blood samples collected from healthy male volunteers given informed consents. The blood samples were centrifuged at 2000 g for 10 min and washed twice with modified SAGM buffer solution. Hb in the RBCs was fully deoxygenated by gentle purge for 30 min with highly purified argon gas under acidic pH conditions as described previously (30). A portion of the RBC-suspended solution was sampled and hemolyzed to determine Hb concentrations by measuring visible absorption spectra at 540 nm. Under maintenance of the temperature at 4°C, an NO donor, FK409 (a generous gift from Fujisama Pharmaceutical Inc., Osaka) was added to the RBC suspension at a half concentration of Hb in the suspension (30). This NO-donating reagent has the ability to release equimolar amounts of NO in the aqueous solution. Distinct from other NO donors such as S-nitroso glutathione, FK409 does not contain sulfhydryl group in its chemical structure; such an advantage allowed us to avoid a possible contamination of exogenous S-nitrosothiols in experiments. Structural characterization of the prosthetic heme of Hb by binding of NO was carried out by electron spin resonance (EPR) spectrometry according to the previous method (31). To this end, a portion of the NO-treated RBC were frozen at 77K with liquid nitrogen to serve as a sample to detect triplet peaks indicating 5-coordinated structure of the heme of two α -subunits of Hb in the whole cell suspension (30). The 5-coordinated structure of the prosthetic heme of Hb was demonstrated by an EPR spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan) as described elsewhere

with minor modifications (30)(31). Briefly, the power and frequency of microwave were 1.0 mW and 9.1 GHz, respectively. Time duration and a range for scanning the EPR signal were 0.5 min and 326 +/- 25 mT, respectively. Unless mentioned, the NO-treated RBC sample was designated as α -NO-hRBC, unless mentioned otherwise. Separately, the control and CO-saturated RBC samples were prepared at 4°C and designated as hRBC and CO-hRBC, respectively. The Hb concentration of these RBC samples was prepared at 10 g/dl by adding the physiological saline and stored at 4°C until the animal experiments. The RBC samples were incubated at 37°C at 30 min prior to the start of the experiments *in vivo*.

In vivo experimental protocols for hemorrhage-induced liver dysfunction.

The experimental protocols herein described were approved by our institutional guidelines provided by the Animal Care Committee of Keio University School of Medicine. Male Wistar rats weighing 240-280 g (CLEA Japan, Tokyo) were allowed free access to laboratory chow and tap water, and were fasted for 24 hrs prior to experiments. As described elsewhere (21)(23), rats were anesthetized with an intramuscular injection of pentobarbital sodium at 50 mg/kg, and their common bile duct and carotid and femoral arteries were cannulated to collect bile and blood samples, respectively. Bile output was monitored *in vivo* according to our previous method (4)(13). The femoral arterial cannulation was used to monitor systemic blood pressure and heart rate (HR). The carotid cannulation was to withdraw blood from circulation and to collect blood samples for blood-gas analyses. The arterial PO₂, pH and concentrations of HCO₃⁻ and Hb were determined in the arterial blood samples using the gas analyzer as described elsewhere (8)(18)(25). Based on determination of these parameters, base excess (BE) was also calculated as an index of metabolic acidosis. When necessary, pulse-doppler flowmetry was conducted to measure visceral blood flow in the abdominal aorta.

Rats were exposed to acute hemorrhage by letting them bleed from a carotid arterial catheter according to the protocol described previously (29). The mean arterial pressure (MAP) was maintained at 40 mmHg for 20 min. The shed blood was collected in heparinized syringes and the volume was measured. The blood was kept at 37°C to be reinfused as autologous blood samples, when necessary. After completing the 20-min hypovolemic ischemia, one of hRBC was infused at 1 ml/min at

a total volume equivalent to that of shed blood.

In vivo monitoring of hepatic microcirculation and local oxygen tension

In separate sets of experiments, rats used to observe hepatic microcirculation were prepared with tracheotomy to establish the airway for inhalational anesthesia with sevoflurane as described in our previous method (16). The anesthetized rats underwent midline and pericostal incisions to expose the left lobe of the liver. The current choice of anesthesia allowed us to guarantee stability of systemic blood pressure during 4-hr observation of the left lobular portion of the liver surface. The exteriorized portion of the liver was set on the cover glass mounted in the plastic stage and observed through an inverted-type fluorescence microscope equipped with a high-speed video analyzing device combined with a photomultiplier to measure partial oxygen tension (PO_2) in microvessels by analyzing phosphorescence decay (20). When necessary, erythrocytes suspended in physiological saline were prepared by whole blood samples taken from donor rats and labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) according to our previous method (8)(29). Each rat received 100 μ l of FITC-labelled RBC suspension through an intravenous injection. For microvascular PO_2 measurements, Pd-meso-tetra-(4-carboxyphenyl)-porphyrin (Pd-TCPP, Porphyrin Products, Eugene, OR) was used as a phosphorescence probe indicating O_2 -dependent quenching of the light emission (20)(29). The reagent was dissolved at 20 mg/ml in physiological saline containing bovine serum albumin and buffered at pH 7.4 with phosphate buffer. Rats received a slow bolus of Pd-TCPP at 30 mg/kg through an intravenous injection. Pd-TCPP circulating in hepatic central venules was excited by using the second harmonic of a Q-switched Nd/YAG pulse laser at 532 nm with 6-nsec pulse width, according to the previous method (29). Phosphorescence passing through a long-pass filter (>620 nm) was detected with a photomultiplier tube (R1894, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Shizuoka). The voltage signal was fed into a computer via an analog-to-digital converter (NR-2000, Keyence, Tokyo) with a sampling frequency of 200 kHz and sampling number of 500 points. PO_2 values were calculated based on the Stern-Volmer equation as described elsewhere (20)(29). To measure the RBC velocity and PO_2 at 1 Hz, we used mechanical shutter to control the output of a mercury lamp and used the signal from a limit switch to trigger the Nd/YAG laser when the shutter was closed. The irradiation times of the laser and mercury lamp were 6

nsec and 300 msec, respectively. PO₂ values in central venules were measured as a function of time before and after exposure to the 20-min hypovolemic ischemia. Alterations in sinusoidal diameter, functional sinusoidal density, and RBC velocity and local intravascular PO₂ in central venules were compared between post-ischemic livers treated with hRBC and those treated with α -NO-hRBC. These measurements were performed before and 5, 10, 15, 30 and 60 min after the start of reperfusion.

Determination of half lifetime of exogenously administered α NOHb in circulation.

In order to determine half-life time of α -NO-hRBC, 2 ml of the peripheral blood samples were collected from carotid artery of rats which were exposed to the 20-min hypovolemic ischemia followed by desired duration of time for reperfusion of one of the hRBC samples. The collected blood samples were immediately frozen by liquid nitrogen at 77K to serve as samples for EPR spectrometry. As described later in Results, α -nitrosyl heme was undetectable in peripheral blood samples collected from the control and the post-ischemic rats reperfused with autologous blood samples, indicating that the amount of endogenous α NOHb-containing rat erythrocytes is little in circulation, if any. In these experiments, the putative concentrations of circulating α NOHb were calculated as a function of time for reperfusion. To this end, the circulating concentration of the Hb derived from hRBC administered exogenously was calculated, assuming that the total blood volume of the rat is 7% of the body weight. The α NO-Hb concentrations were thus estimated by multiplying the concentrations of hRBC-derived Hb in the circulation and the percentage magnitude of the EPR triplet signal versus the initial magnitude measured at 5 min after reperfusion. This value of the nitrosyl Hb in circulation was designated as estimated nitrosyl-Hb concentrations, assuming that NO initially bound to α -heme of hRBC Hb does not move to rat RBC-derived Hb in circulation.

Statistical analyses

Differences in mean values among groups were analyzed by ANOVA with Fisher's multiple comparison test. P values less than 0.05 were considered statistically significant.