

2. 実験方法

ベースラインの測定後、28 ml/kgの血液を20分以上かけて脱血し、出血性ショックモデルを作成した。その後15分間安定させた。動物を無作為に輸液蘇生液（乳酸加リンゲル液、または、HbV小胞体分散液）と犠牲死させるまでの時間（2、24、72、168時間後）により8群に分けた。脱血量に対して等量のHbV小胞体分散液（[Hb] = 10 g/dL、生理食塩水に分散、オキシジェニクス社製）、または、脱血量に対して3倍量の乳酸加リンゲル液で輸液蘇生を行った（HbV-2H, HbV-24H, HbV-72H, HbV-168H群、または、3XLR-2H, 3XLR-24H, 3XLR-72H, 3XLR-168H群）。採血（0.2mL）は、ベースライン、脱血直後、輸液蘇生1時間後、2時間後に行い、乳酸値を測定した（Radiometer社製、ABL 700）。2時間後の各群（HbV-2Hおよび3XLR-2H）は、2時間後の測定終了後直ちに犠牲死させ、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓を摘出した。24、72、168時間後に犠牲死させる群は、止血と創縫合後から犠牲死まで日本医科大学動物管理室で飼育した。臓器摘出はすべて、セボフルレン吸入麻酔（2-4%）下に行われた。

摘出された臓器は、直ちに液体窒素に投与された後、mRNAの抽出まで-80℃で保存された。プライマーエクスプレスソフトウェア（Applied Biosystems社製）でデザインされたPCRプライマーとTaqMan蛍光プローブを用いてABI PRISM 5700 Sequence Detector（Applied Biosystems社製）で測定し、比較CT法にて相対値を求めた。

3. 統計

データは平均±標準偏差で示した。血圧、乳酸値、mRNAの発現率の群間の差は、two-factor factorial ANOVAで検定し、群内の経時的変化はone-factor ANOVAで検定した。危険率0.05未満を有意差ありとした。

4. 倫理的配慮

この研究は、日本医科大学動物実験倫理委員会に承認された。実験動物に関しては、十分な麻酔下にて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. 結果

1. 動脈血圧、中心静脈圧、乳酸値の変化(Table 1)

輸液蘇生の違いでは、脱血から輸液蘇生後2時間までは動脈血圧、中心静脈圧、血中乳酸値において有意差はみられなかった。脱血によりいずれの群もベースラインに比べ動脈血圧は有意に低下した。蘇生後2時間では、乳酸加リンゲル液による蘇生群でのみ、動脈血圧の再度低下がみられた。両群とも、血中乳酸値は脱血によって増加した。蘇生後1時間では、HbV小胞体分散液を用いた群で低下したが、乳酸加リンゲル液を用いた群では、蘇生後もしばらく高い乳酸値を示した。

Table 1. Hemodynamics and blood lactate concentration.

Measure	time point			
	baseline	T1	T2	T3
mean arterial blood pressure (mmHg)				
3XRL	83.3 ± 9.2	32.5 ± 4.0 [§]	80.0 ± 13.7	56.0 ± 20.4 [§]
HbV	80.5 ± 13.7	30.2 ± 3.1 [§]	87.8 ± 14.8	68.7 ± 5.3
central venous pressure (mmHg)				
3XRL	4.0 ± 0.6	3.3 ± 1.9	4.5 ± 1.4	3.7 ± 0.5
HbV	4.2 ± 1.2	4.0 ± 0.9	5.2 ± 2.1	4.7 ± 2.0
blood Lactate concentration (mmol/L)				
3XRL	2.1 ± 0.9	6.7 ± 2.6 [§]	6.3 ± 2.6 [§]	4.6 ± 2.7
HbV	3.2 ± 1.1	5.8 ± 1.0 [§]	2.6 ± 0.5	2.6 ± 0.3

T1, immediately after fluid resuscitation; T2, 1h after resuscitation; T3, 2h after resuscitation

[§] significantly different than baseline ($p < 0.05$)

*significantly different than RL group ($p < 0.05$)

2. HIF-1 α のmRNAの発現 (Fig. 1)

HIF-1 α mRNAの発現について、測定されたどの臓器においても、輸液蘇生に用いられた輸液の違

いによって差はなかった。臓器間の発現の違いでは、HIF-1 α の発現は、心臓で少なく肺が多かった。蘇生後24時間でピークを取る傾向があった。

2. TNF- α のmRNAの発現 (Fig.2)

TNF- α mRNAの発現も、測定されたどの臓器においても、輸液蘇生に用いられた輸液の違いによって差はなかった。臓器間の発現の違いでは、肺が多かった。研究期間中168時間までは、TNF- α mRNAの発現は、経時的に増加する傾向が見られた。

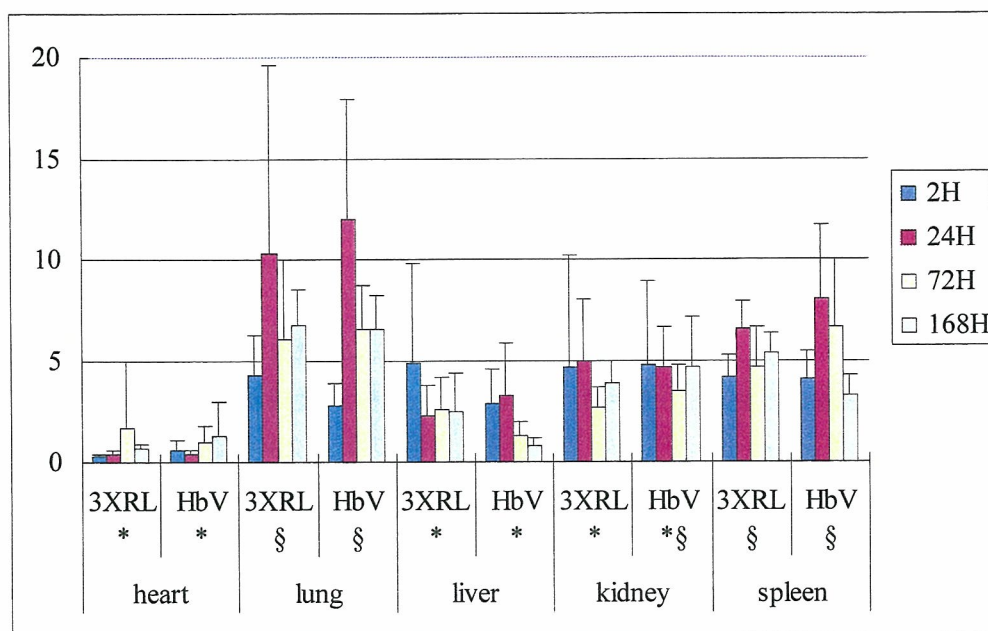


Fig.1. HIF-1 α mRNA expression. *significantly different from lung ($p<0.05$), § significantly different from heart ($p<0.05$)

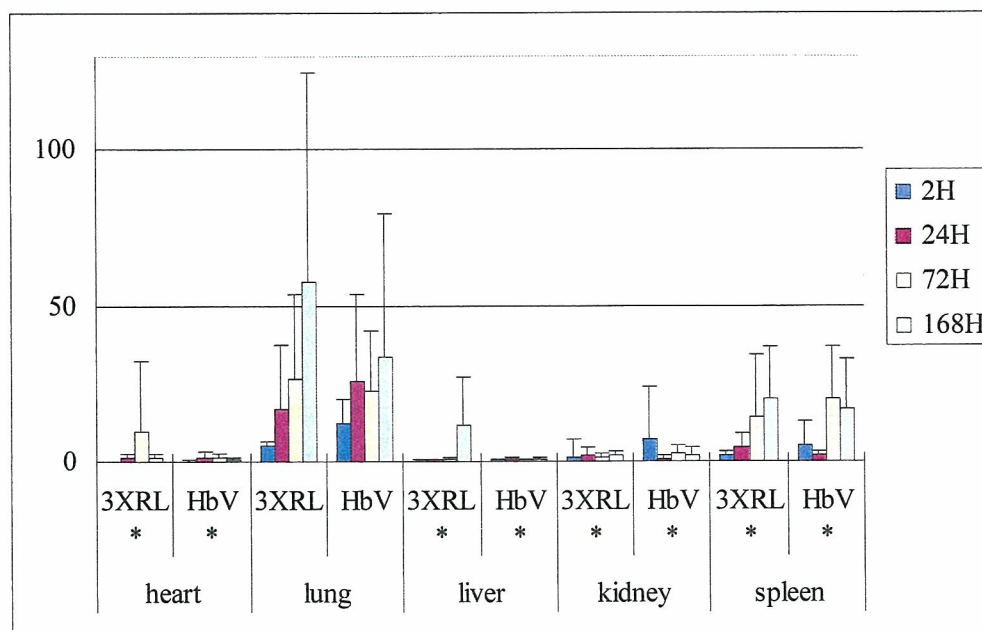


Fig. 2. TNF- α mRNA expression. *significantly different from lung ($p<0.05$)

D. 考察

救急／災害時や周術期の貧血に対して赤血球輸血で治療されている。しかし、投与前の患者の血液型検査やクロスマッチングテストによる時間的制約や遠隔地での輸血用血液供給の問題による迅速な対応が遅れる、供給血液量の不足の可能性などの制限を受ける。このような、特殊な状況下での人工酸素運搬体の利用は、上記の問題を緩和させる可能性が高い。

保存赤血球は受血者体内での免疫反応に基づく副作用が問題となる。近年の報告では、外傷後12時間以内の6単位（わが国では12単位に相当）以上の赤血球輸血は、ARDSや多臓器不全の発生率を増加させ、さらに、その保存血の保存期間が長いほど多臓器不全の発生率が高いことが知られている。この原因には、保存血に混入する白血球や補体の影響が考えられている。今回我々が使用した人工酸素運搬体は、高度に精製されたヒトHbを原料とするものであり、投与動物に対する免疫学的反応に基づく炎症反応が生じる可能性が低いと推測された。また、一方でその人工酸素運搬体自体の大量投与による臓器炎症反応を調査する必要性があった。対象とした輸液剤である乳酸加リンゲル液は、大量投与による炎症反応を生じる可能性が極めて低いことが知られている。前炎症反応としてTNF- α のmRNAを測定した今回の我々の結果では、ショックモデル小動物に対するHbV分散液の大量投与は、その後の炎症反応を増悪しないことを示した。また、臓器間比較では、ショックと引き続く輸液蘇生後の炎症は、肺で強く現れる可能性を示唆する。これは、ショック後の肺の呼吸機能低下の機序を部分的に説明するものである。

Hbを原料とする人工酸素運搬体の問題点として、血管収縮や無変形能による局所低酸素反応が挙げられる。そこで、摘出された臓器全体の低酸素による反応を調査した。意外にも、乳酸加リンゲル液と同等のHIF-1 α のmRNA発現反応を示した。これは、3つの原因が考えられる。第一に、今回の

実験モデルのHb濃度が、脱血と輸液蘇生により十分に低下していなかったことである。乳酸加リンゲル液の群のベースライン、脱血後、輸液蘇生1、2時間後のHb濃度は、それぞれ、 11.1 ± 2.2 , 8.5 ± 2.4 , 7.4 ± 0.7 , 8.0 ± 1.3 g/dLであり、急性出血として主要な臓器の機能障害をきたすレベルに達していない。そのため、乳酸加リンゲル液を用いた群でも人工酸素運搬体を用いた群に比べHIF-1 α のmRNA発現は大きくならなかったと考えられる。第二に、HbVは変形能を持たなくとも、微小循環を障害しない十分小さい直径であることである。第三に、Hb自体の血管収縮反応は、臓器微小循環に影響を与えないほど軽微であるということである。

今回の脱血モデルは、以前我々が作成したウサギ出血性ショックモデルとほぼ同等であることが血行動態や血中乳酸値の推移から推測された。他の研究報告から、我々が用いた脱血量はおよそ循環血液量の40–50%相当である。

今後の研究として、同種血輸血との炎症反応の比較、受血者好中球に対する影響を調査し、大量出血後のHbV大量投与が生じる主要臓器障害の程度を調査する。

E. 結論

出血性ショックモデルに対するHbV小胞体分散液を用いた輸液蘇生後の炎症反応は、乳酸加リンゲル液を用いた輸液蘇生と同等の炎症反応であり、極めて軽微である。また、低酸素反応も同等であり、HbVによる微小循環障害や血管収縮反応はほとんどないと示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

1. Goto Y, Terajima K, Tsueshita T, Miyashita M, Horinouchi H, Sakai H, Tsuchida E, Sakamoto A.

Fluid resuscitation with hemoglobin-vesicle solution does not increase hypoxia or inflammatory responses in moderate hemorrhagic shock. *Biomed. Res.* 27, 283-288 (2006).

2. Terajima K, Tsueshita T, Sakamoto A, Ogawa R. Fluid resuscitation with hemoglobin vesicles in a rabbit model of acute hemorrhagic shock. *Shock* 25,184-189 (2006).

3. 寺嶋克幸、杖下隆哉、坂本篤裕。周術期／救急領域の赤血球輸血と人工酸素運搬体の展望：Hemoglobin Vesicle の可能性。人工血液 14, 71-78 (2006).

2. 学会発表

1. 寺嶋克幸、杖下隆哉、坂本篤裕／ウサギ出血性モデルに対する人工酸素運搬体-HbV-の影響／日本麻酔科学会第53回大会／2006.6.1／神戸

2. 寺嶋克幸、杖下隆哉、坂本篤裕／Hemoglobin-vesicle溶液の出血性ショックに対する効果と安全性／第13回外科侵襲とサイトカイ

ン研究会／2006.12.16／宇部

3. 杖下隆哉、寺嶋克幸、坂本篤裕／人工赤血球による生体反応はどこまで許容できるか？／第21回日本ショック学会／2006.5.19／札幌

4. 杖下隆哉、寺嶋克幸、坂本篤裕／人工赤血球による生体反応はどこまで許容できるか？／日本麻酔科学会第53回大会／2006.6.1／神戸

5. 杖下隆哉、寺嶋克幸、酒井宏水、土田英俊、坂本篤裕／HbVによる輸液蘇生：肺への影響／第13回血液代替物学会／2006.8.24／東京

6. 杖下隆哉、寺嶋克幸、坂本篤裕／人工赤血球HbVと酸素運搬機能および組織酸素代謝／第22回体液代謝管理研究会／2007.1.27／東京

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

血液製剤安定確保のための人工酸素運搬体を用いた救急医療への応用に関する研究

分担課題： 1. Hb 小胞体による出血性ショック蘇生における

再灌流障害の低減に関する検討

2. Hb 小胞体による有茎皮弁虚血性領域の酸素化に関する検討

3. 適応症例に対応したアルブミン-ヘムの酸素結合能調節に関する検討

分担研究者 小松 晃之 早稲田大学 理工学研究所 助教授

土田 英俊 早稲田大学 理工学研究所 顧問研究員・早大 名誉教授

酒井 宏水 早稲田大学 理工学研究所 助教授

中川 晶人 早稲田大学 理工学研究所 助手

研究要旨

（１）出血性ショックからの蘇生は、全身的な虚血再灌流障害を生じ、更には多臓器不全に繋がる可能性もある。Hb小胞体(HbV)に一酸化炭素を結合したCO-HbVを出血性ショック蘇生液として投与したところ、酸素を結合したO₂-HbVと同等の蘇生効果が得られるのみならず、再灌流障害が低減される傾向が認められた。（２）高酸素親和度・高粘度HbV分散液の単回投与により、有茎皮弁内の虚血組織内の微小循環動態(血行動態、血管壁透過性、酸素分圧)の改善を確認した。また、炎症性サイトカインの産生が低減され、虚血性炎症を抑制する効果も明らかになった。（３）完全合成系人工酸素運搬体（アルブミン-ヘム）の酸素結合能は、活性中心であるヘム構造の精密制御により任意に調節することができるため、各適応症に最も適した酸素親和度を有する製剤の選択が可能である。従来型ヘムより簡便に合成できる $\alpha^3\beta$ 型ヘムにおいても、置換基変化により酸素親和度の調整可能を明らかにした。

1. Hb小胞体による出血性ショック蘇生における再灌流障害の低減に関する検討

A. 研究目的

出血性ショックからの蘇生は、全身的な虚血再灌流を伴う。一般的に虚血状態では細胞内ATPが代謝されてヒポキサンチンになり、これが組織内に高濃度で蓄積する。この状態に対し再灌流により酸素が供給されると、キサンチンオキシダーゼの作用により活性酸素が発生する。また、マクロフ

ァージが活性化されて炎症性サイトカインを産生し、これに反応して好中球などが遊走される。各種接着因子も誘導され、好中球は血管内皮細胞に接着し、更に血管外組織にまで浸潤する。ここに再灌流による酸素供給があると、好中球細胞膜にあるNADPH-オキシダーゼが大量の活性酸素を産生する。従って、人工赤血球を用いる出血性ショックからの蘇生については、単なる酸素供給の観点のみならず、後続する障害についても考慮した対応が求められる。

内因性のNOとCOが情報伝達分子として極めて重要な役割を果たすことも理解されてきたが、COの抗炎症作用も最近明らかにされた。この機序は完全解明されたとは言えないが、COの効果の積極的活用のため、静脈内投与可能な化合物としてルテニウムのカルボニル錯体などをCO放出薬として利用する研究も試みられている。また、出血性ショック状態のラットに低濃度COガスを吸入させることにより、多臓器不全の改善が見られる。HbはCOを結合し、その結合力は酸素の約200倍と強いが、結合は可逆的でガス分圧に依存し、大気に曝せば次第にCOを放出し酸素錯体となる。そこで本研究では、COを結合したHb小胞体(CO-HbV)について初めての投与試験として、出血性ショック状態のラットに対する投与を検討してみた。

B. 研究方法

1. CO結合HbV (CO-HbV)の調製

HbV分散液中に、100%-COガスを通気してCO-HbVとした。可視光吸収スペクトルから、ほぼ完全にCOが結合した事を確認した。これを25g/dLリコンビナントアルブミン溶液(rHSA)と混合し、Hb濃度を8.6g/dLに調節、外水相のrHSA濃度は5 g/dLとした。また、酸素を結合したO₂-HbVについても同様に調製した。

2. CO結合ラット洗浄赤血球(CO-RBC)の調製

Wistar系ラット(雄、体重250-300g)より、エーテル麻酔下、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(rHSA)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にCOガスを通気した。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(CO-RBC)とした。酸素を結合したO₂-RBC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。

3. 出血性ショック蘇生試験

実験法は既報(Sakai et al., Crit. Care Med. 2004;33:

806-12)に従った。Wistar rat (約250g, ♂)にsevoflurane(1.5%)を吸入させ麻酔状態とし、自発呼吸を維持した。頸動脈、頸静脈にカテーテルを留置した。ラットの全血液量を56 mL/kgと仮定し、28mL/kg(約8.4 mL/匹)を1ml/minの速度で頸動脈より脱血した。脱血後15分間放置してから同量の試料を頸静脈から投与した。投与試料は、CO-HbV, CO-RBC, O₂-HbV, O₂-RBCである(n=8)。投与後6時間まで血行動態、血液ガス組成、HbCOレベルの推移を観察。測定ポイントは、脱血前、脱血後、投与直後、0.5, 1, 3, 6 時間後とした。計測終了後直ちに開腹し下大静脈から血液6mLを採取、採血管に取り遠心分離または超遠心分離により透明血漿を得、血液生化学的検査を実施(BML社依頼)。本研究では、肝機能の反映項目としてALTおよびASTについて注目した。

C. 結果

血圧、血液ガス組成については、全群ともに同等の推移を示し、COの毒性に起因する異変は観察されなかった。平均血圧は脱血前には100 torr程度であったのが、脱血後に30 torr程度にまで低下した。投与直後に85-90 torrにまで回復、その6時間後80 torr付近を推移した。血液ガス組成については、脱血後に代償機能によりPaO₂の上昇、PaCO₂の低下、またpHの低下と乳酸値の上昇が見られた。蘇生液の投与直後に、両群共にPaO₂、PaCO₂が初期値にまで回復した。pHは投与直後に最低値を示した。また乳酸値も投与直後の回復はなかったが、1時間後には初期値まで回復し、6時間まで推移した。pH、乳酸値の回復の遅れは、投与直後に末梢微小循環が回復に向い、蓄積していた代謝産物がwash out されたために見られた現象と判定した。

CO-RBC群の血中HbCOレベルの推移の測定は、投与前は約1.6%であったのが、投与直後に39%を示した。その後経時的に低下、1時間後には15%、6時間後には1.3%となり、投与前レベルに低下し、ほぼ完全にCOが放出されていた。CO-HbV群では、投与直後の値は25%、30分後に14%、1時間後に6%、3時間後には1%にまで低下しており、HbVの殆どが酸素運搬体として機能していた。

6時間経過後のAST、ALT値をTable 1に記す。O₂-HbV群、O₂-HbV群のAST、ALT値はcontrol値に比較して顕著な増大を示したが、CO-HbV群、CO-RBC群では増大が抑制されていた。

Table 1. AST and ALT values 6 hrs after resuscitation from hemorrhagic shock.

	O ₂ -HbV	O ₂ -RBC	CO-HbV	CO-RBC	control
AST (U/mL)	249±104	211±109	185±82	126±54	64±13
ALT (U/mL)	97±54	95±73	50±16	33±9	32±8

D. 考察

COを結合したHbVおよびRBCを投与したところ、血中HbCO濃度は投与直後25-39%であったが、6時間以内にほぼ完全に放出されることが確認された。一般にCOガス中毒とは、COガスに長時間曝された場合に生体内にCOが蓄積されていく過程で生じ、やがて生命が危険な状態に至る。例えば、気中CO濃度が僅か0.05%でも4時間曝されると血中HbCOは40%に到達し、昏睡状態に陥る。本動物実験の場合、ラットはCOを含まない空気を吸入しているので、投与された血中COは体内で薬理効果を示した後、最終定期には肺を経由して呼気として体外に速やかに排出される。HbCO錯体の錯体安定度平衡定数はHbO₂の約200倍であるが配位子の結合は濃度に依存した平衡反応であり、血中ではO₂濃度が圧倒的に高いため、HbCOは次第にHbO₂に変換されたものと考えられる。投与後6時間までの間、両群に血行動態、血液ガス組成には顕著な差は無く、COガスの毒性を表す変化は確認されなかった。

出血性ショックからの蘇生は、全身的な虚血再灌流を意味し、活性酸素の産生による様々な障害、いわゆる虚血再灌流障害、更には多臓器不全に繋がる可能性がある。一般的に虚血状態では細胞内ATPが代謝されてヒポキサンチンになり、これが組織内に高濃度で蓄積する。ここに再灌流により酸素が供給されるとキサンチンオキシダーゼの作用により活性酸素(スーパーオキシド)が多量に発生する。また、マクロファージが活性化されて炎症性サイトカインを産生し、これに反応して好中

球などが遊走される。各種接着因子も誘導され、好中球は血管内皮細胞に接着し、更に血管外組織にまで浸潤する。ここに再灌流により酸素が供給されると、好中球細胞膜にあるNADPH-オキシダーゼが大量の活性酸素を産生する。従って、出血性ショックに対する蘇生として輸血することは、初期の状態においては生体に対し酸素を過剰に供給して活性酸素産生を促し、虚血再灌流障害を助長させる可能性がある。従って、CO結合体を投与することは、酸素運搬機能が初期は抑制され循環血液量の回復と血液粘弾性の維持にのみ寄与し、次第に酸素運搬機能が増大するので、理想的な蘇生液なのかも知れない。

さらに、COの放出により血管拡張効果が期待出来る。その機序としては、① COが血管壁平滑筋にあるグアニル酸シクラーゼ(GC)に直接結合して血管拡張し、末梢血流を改善する、また、② 正常組織では血管弛緩因子であるNOがミオグロビン(Mb)と反応して失活する経路が存在するが、このとき投与COがMbに結合することにより、NOの失活が抑制される。GCに対する作用はCOよりもNOの方が数千倍強力であり、血管拡張により末梢血流を改善する。そして、③ 末梢血流の改善は、代謝産物の除去と酸素供給を促進することになる。

NADPH-オキシダーゼはヘム蛋白質なので、これにCOが結合することにより活性酸素の産生量が低減する説、また、炎症反応で誘導されるiNOSもヘム蛋白質なので、過剰量のNO産生を抑制しているという説も知られている。機序については、今後詳細を検討する必要がある。

一般的にASTは、心筋、肝、脳に高濃度に存在し、ついで骨格筋、腎などに多く含まれる。また、ALTは肝臓に最も多く含まれ、以下は腎、心筋、骨格筋の順番である。臨床的には、AST、ALTの上昇は主に肝疾患の時に見られる。従って、AST値およびALT値が著明に増大した事実から、出血性ショックによる虚血と酸素を結合したHbV、RBCの投与による再灌流の結果、肝臓に虚血再灌流障害が生じた可能性がある。一方でCOを結合したHbV、RBCの投与ではこれが低減されたとも考えられる。

E. 結論

CO 結合 HbV、および赤血球を出血ショック蘇生液として投与することが、虚血再灌流障害を低減する効果が得られることが明らかになって来た。今後は、毒性の視点からも総合的に至適 CO 投与量を決定すること、および CO の薬理効果の機序を特定する必要がある。

2. Hb 小胞体による有茎皮弁虚血性領域の酸素化に関する検討

A. 研究目的

脳硬塞や心筋梗塞など、血管障害により血流量が低下し低酸素状態に陥った組織細胞を壊死させないためには、酸素供給の回復が先ず必要である。虚血領域への酸素供給は側副経路からの血流に依存せざるを得ないが、赤血球よりも小さいHb小胞体(HbV)が溶存すれば、酸素供給の向上により虚血の解除が期待できる。従来、有茎皮弁モデルで側副経路を有する虚血性低酸素状態にある組織を作成し、HbV分散液で血液希釈することにより、酸素化の改善を試みた。その結果、酸素親和度が高く(P_{50} 値が低く)、且つ粘度の高いHbV分散液が虚血領域の酸素化に優れていることが明らかになってきた。これまで、血液希釈によって効果を得てきたが、今回は高酸素親和度のHbV分散液をBolus

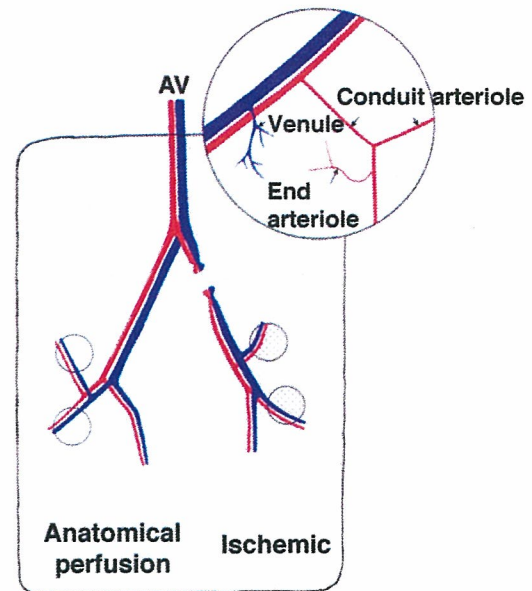


Fig. 1. Schematic representation of the hamster dorsal skin flap model. One branch of the small artery was ligated to prepare ischemic part.

injectionすることによって効果が得られるか否かについての検討と共に、虚血性炎症反応の抑制効果についても検討を実施した。本研究は、Prof. Dominique Erni (Inselspital Hospital, Univ. of Bern, Switzerland)との共同研究である。

B. 研究方法

24匹の Syrian Golden Hamster (Charles River, 78 – 85g, ♂)をネンブタール腹腔内投与(100 mg/kg)により麻酔し、頸動静脈にカテーテルを挿入した。背部皮膚に小動脈と小静脈の対で繋がった有茎皮弁を作成した(**Fig. 1**)。この小動静脈対は皮弁内で二

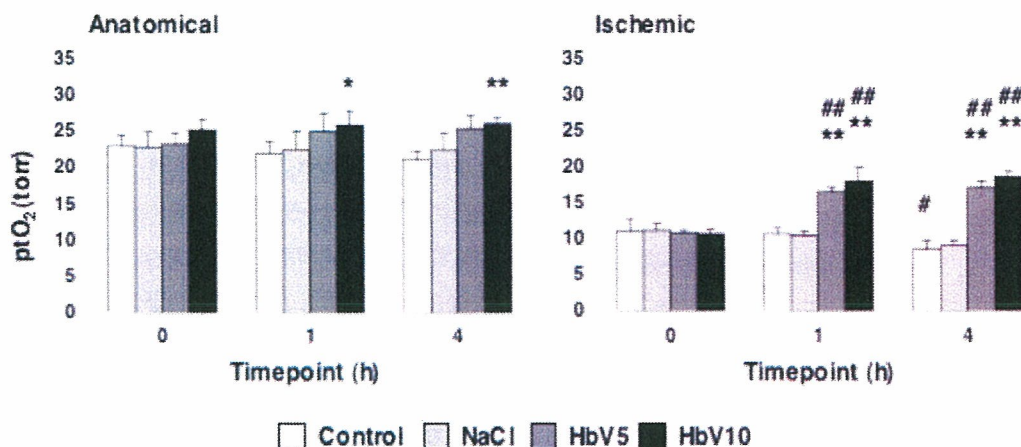


Fig. 2. Partial oxygen tension in the anatomically perfused and ischemic tissues at baseline and after top-load infusion of 0.9% NaCl, and hemoglobin vesicles suspended in NaCl at Hb concentrations of 5 g/dl (HbV5) and 10 g/dl (HbV10). Data represent mean values and SD. # $p < .05$, ## $p < .01$ vs. baseline; * $p < .05$, ** $p < .01$ vs. control.

方向に分岐するが、このうち片方を完全結紮し血流を遮断した。従って遮断した側の組織には、側副経路を経由した血流のみが到達することになる。結紮しない側の血流のある部分を (Anatomically perfused tissue, 血流存在組織)、結紮した側を (Ischimic Part, 虚血組織) とした。

顕微鏡下、有茎皮弁内の微小血管内血流像を観測した。毛細管の血流速度および管径は、モニター上で計測した (CapImage; Zeintl Software)。毛細管壁の透過性は、FITC-Dextran を投与したときの漏出から判断した。組織酸素分圧は、Clark 式酸素電極 (Revoxode CC1, GMS) により測定した。

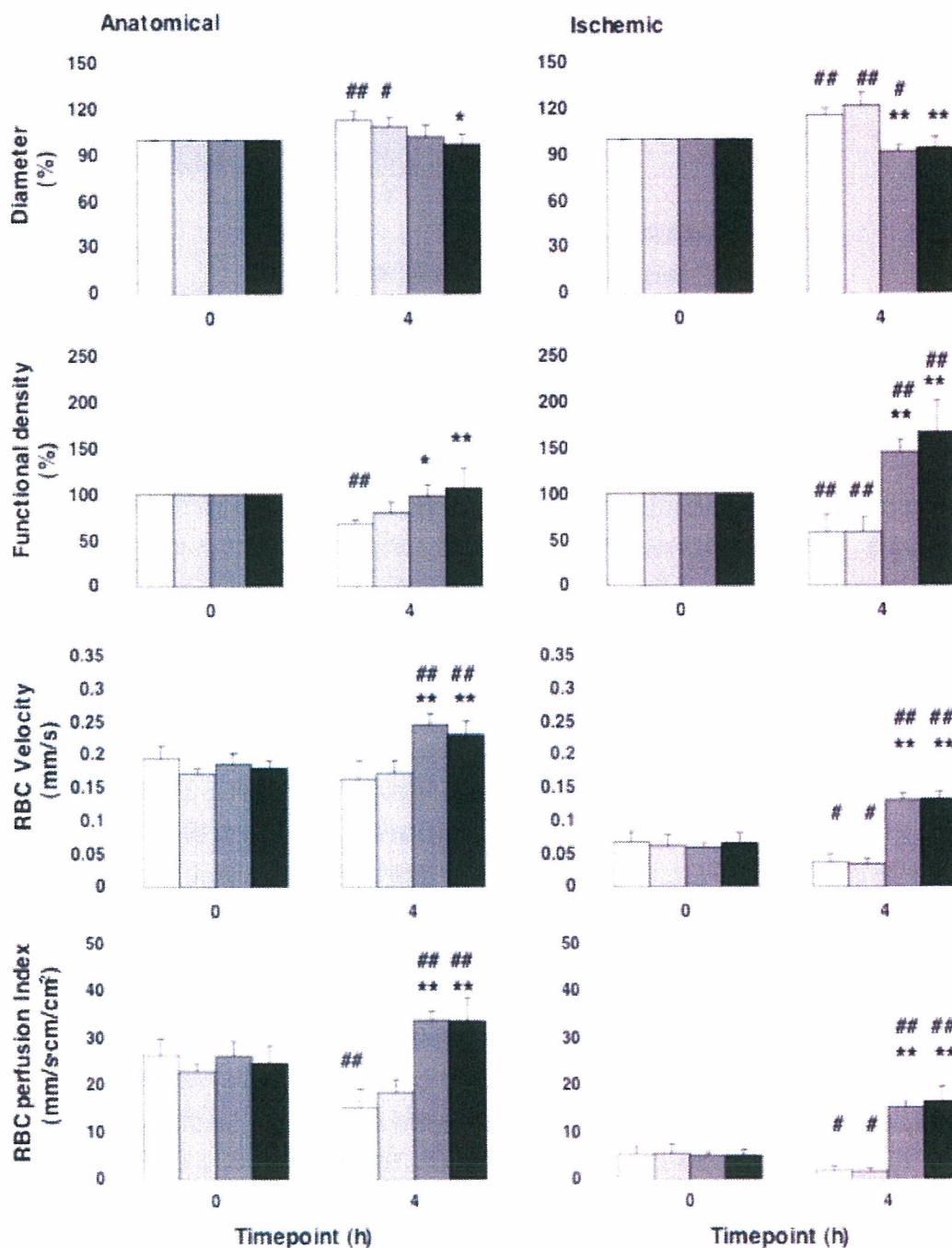


Fig. 3. Capillary hemodynamics in the anatomically perfused and ischemic tissues at baseline and after top-load infusion of 0.9% NaCl, and hemoglobin vesicles suspended in NaCl at Hb concentrations of 5 g/dl (HbV5) and 10 g/dl (HbV10). Data represent mean values and SD. The values for capillary diameter and functional capillary density were expressed in percentage of baseline. [#] $p < .05$, ^{##} $p < .01$ vs. baseline; ^{*} $p < .05$, ^{**} $p < .01$ vs. control.

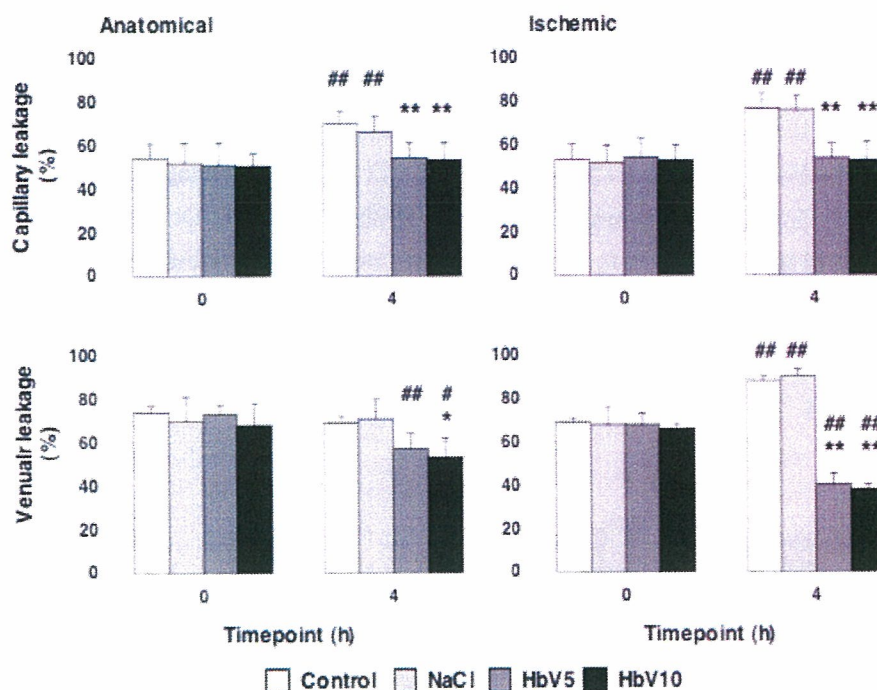


Fig. 4. Macromolecular leakage in the anatomically perfused and ischemic tissues at baseline and after top-load infusion of 0.9% NaCl, and hemoglobin vesicles suspended in NaCl at Hb concentrations of 5 g/dl (HbV5) and 10 g/dl (HbV10). Data represent mean values and SD. # $p < .05$, ## $p < .01$ vs. baseline; * $p < .05$, ** $p < .01$ vs. control.

ハムスターにネンブタール(50mg/mL)を継続的に投与(〜0.5 mg/min/kg)し、実験中の麻酔を維持した。全身動態が 1 時間安定に推移することを確認した後、循環血液量の 25%に相当する試料溶液を 15 分かけて投与した。試料溶液は、生理食塩水溶液(NaCl, 0.9%)、HbV5 ($P_{50} = 9$ torr, [Hb] = 5 g/dL)、HbV10 ($P_{50} = 9$ torr, [Hb] = 10 g/dL)とした。また、投与せずにそのまま放置する場合(Control)についても観察した。組織病理学的検討としては、白血球を染色するためギムザ染色、また炎症性マーカーとして抗 TNF- α および抗 IL-6 免疫染色を行った。

C. 結果

1. 血行動態、血液ガス組成

血圧は全群において変化は無かった。NaCl群、HbV5群でHb濃度は4時間で10%程度、HbV10群で5%程度低下した。PaO₂は44 - 50 torrが56 - 60 torrに上昇し、PaCO₂は53-58 torrから43-49 torrに低下する傾向が認められた。pHには著変は無かった。Controlの血漿粘度(1.32 cP)に対し、処置群は粘度上昇を認め、HbV5群は1.61 cP、HbV10群は2.14 cPになった。NaCl群では変化を認めなかった。

組織酸素分圧は、血流存在組織に比較して虚血組織は有意に低下した($p < 0.01$)。HbVの投与により改善され、HbV5群では11 torrから17.1 torrに、またHbV10群では18.7 torrにまで増大した(**Fig. 2**)。細動脈と細静脈の直径に著変は無かった。

毛細血管の血流状態(**Fig. 3**)については、虚血領域の毛細管は径が大きくなる傾向が認められた。また無処置群では時間とともに更に拡張を認めた。この毛細管拡張はHbVの投与によって低減された。有効毛細管密度(Functional Capillary Density, FCD)は、虚血組織では40%低下した。無処置群では、血流存在組織で68%に、虚血領域では58%に低下した。しかしHbVの投与では、FCDは血流存在状態のベースラインと同等の値を維持した。HbV5群、HbV10群でそれぞれ45%, 66%の増大となった。虚血領域の毛細管RBC速度は、血流存在組織の約1/3程度であった。HbVの投与によってRBC速度は血流存在組織で30%程度の増大、虚血領域では120%近い増大を観測した。しかし、無処置群の虚血領域のRBC速度は時間とともに低下した。RBC perfusion Index(計算値)は、血流存在組織に比較して虚血領域では約20%に低下しており、両組織とも時間とも

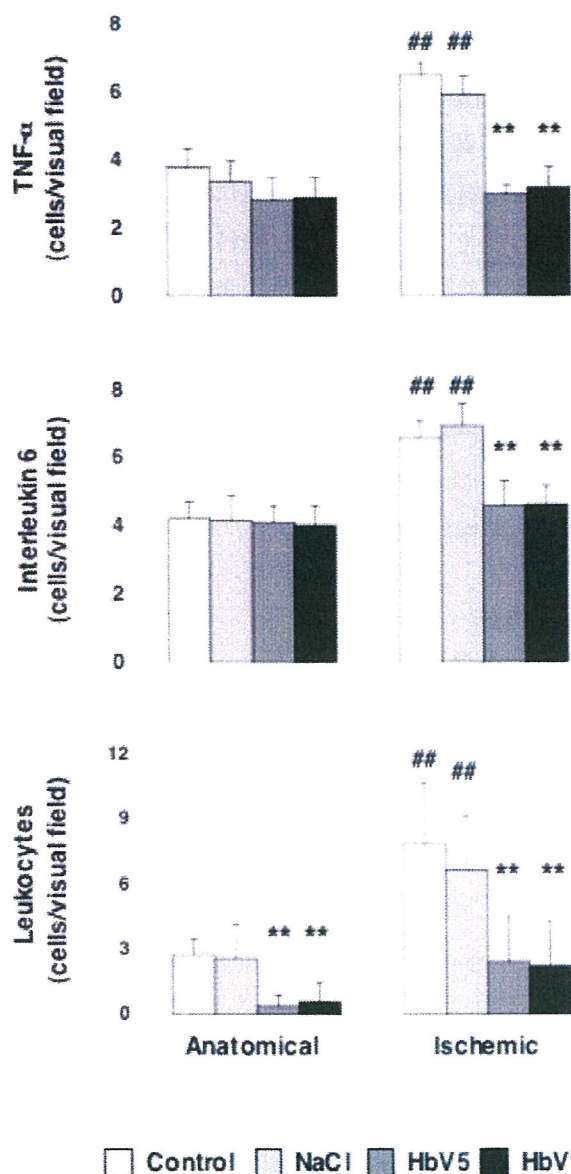


Fig. 5. Density of cells stained for TNF- α , IL-6 and of leukocytes in the anatomically perfused and ischemic tissues 5 hrs after surgery and 4 hrs after top-load infusion of 0.9% NaCl, and hemoglobin vesicles suspended in NaCl at Hb concentrations of 5 g/dl (HbV5) and 10 g/dl (HbV10). # p < .05, ## p < .01 vs. baseline; * p < .05, ** p < .01 vs. control.

に低下した。HbVの投与によってRBC perfusion Indexは改善され、血流存在組織では約30%の増大、虚血領域では200%の増大となった。NaCl群では著変は無かった。

投与前の血管壁透過性は群間に有意な差は無かった(**Fig. 4**)。無処置群の血管壁透過性は、4時間後に血流存在部位では29%の増大、虚血領域では44%の増大を示した。しかし、HbV投与群では変化は無

かった。NaCl群では細静脈側で透過性が増大していたが、全体として著変は無かった。

炎症性TNF- α , IL-6は、血流存在組織に比較して虚血組織では約2倍の増大が確認されたが、HbVの投与では完全に抑制された(**Fig. 5**)。しかしNaCl群では変化が無かった。血流存在組織では炎症性サイトカインの量はどの試料溶液の投与でも効果は得られなかったが、HbVの投与によって白血球数は25%程度低下した(p < 0.01)。

D. 考察

今回の実験で最も重要な点は、HbVの単回投与によって、虚血性炎症に起因するTNF- α とIL-6の産生、および白血球数が著しく低下したことである。またこの効果は、酸素分圧の改善を伴っている。従って、HbVの投与によって虚血領域に酸素が供給されることによって炎症が低減されたと考えられる。これまでの研究で、酸素親和度の高い(P_{50} 値の低い)HbVが虚血領域の酸素化に適していることが示唆されたので、本研究でもアロステリック因子を含有しないHbV(P_{50} = 9 torr)について検討を行った。また、一般的に血液希釈により血液粘度が低下すると、これが血管壁の剪断応力を低減させ、血管生理に悪影響を与えるので、今回投与後の血漿粘度がHbVの投与によって増大していることは血流改善の一因とも考えられる。HbVの存在は、血漿層の粘度の増大を招来し、これが血管壁での剪断応力を生じ、血管機能の恒常性に寄与し、皮弁組織内の血行動態の改善、血管壁透過性亢進の抑制をもたらしたと考えられる。また高酸素親和度により低酸素領域に効率よく酸素を運搬し、虚血性炎症の低減をもたらしたと考えられる。

E. 結論

酸素親和度が高いHbV分散液の投与により、ハムスター皮弁組織内の虚血領域の微小循環動態を改善するとともに、虚血性炎症を抑制する効果が得られた。心筋梗塞や脳硬塞モデルなど、他の虚血性疾患にもでもその有効性が明らかになると期待される。

3. 適応症例に対応したアルブミン-ヘムの酸素結合能調節に関する検討

A. 研究目的

ポルフィリン面上に4つの1-メチルシクロヘキサンアミド基を有する α^4 型ヘム($\alpha^4\text{FeCP}$)をヒト血清アルブミン(HSA)に包接させたアルブミン-ヘム複合体(HSA- $\alpha^4\text{FeCP}$)は、生体内で酸素輸送のできる完全合成系人工酸素運搬体である。アルブミン-ヘムの酸素結合能は、活性中心であるヘム誘導体の分子構造調節により制御できるので、血液代替物として臨床利用する場合、適応症例に最も有効な酸素親和度を有する製剤の選択が可能となる。これはアルブミン-ヘムの大きな利点の一つといってよい。最近、我々は $\alpha^4\text{FeCP}$ に比べ合成工程数が4段階少ない $\alpha^3\beta$ 型ヘム(**Fig. 6**)の開発に成功し、これを包接したアルブミン-ヘム HSA- $\alpha^3\beta\text{FeCP}$ が、HSA- $\alpha^4\text{FeCP}$

と同様に生理条件下で酸素を可逆的に吸脱着できることを見出した¹⁾。さらに $\alpha^3\beta$ 型ヘムでは、ヘム構造の相異が酸素結合能に強く反映されるため、微細な置換基構造の調整により酸素親和度を大きく変化させることも期待できる。そこで本年度は、1-メチルシクロヘキサンアミド基に加え、アダマンタンアミドを導入した新型 $\alpha^3\beta$ 型ヘム($\alpha^3\beta\text{FeAP}$ 、**Fig. 6**)を合成し、その酸素結合パラメーターを測定、ポルフィリン置換基構造がアルブミン-ヘムの酸素結合能に及ぼす影響について詳細検討を実施した。

B. 実験方法

1. $\alpha^3\beta$ 型ヘムの合成

$\alpha^3\beta$ 型ヘムの合成は、**Scheme 1**に従い行った。

既報¹⁾に従い、テトラアミノフェニルポルフィリンのatrop異性体混合物とトリチルブロマイドを1:1.05 (モル比)で反応させた後、生成物をへ

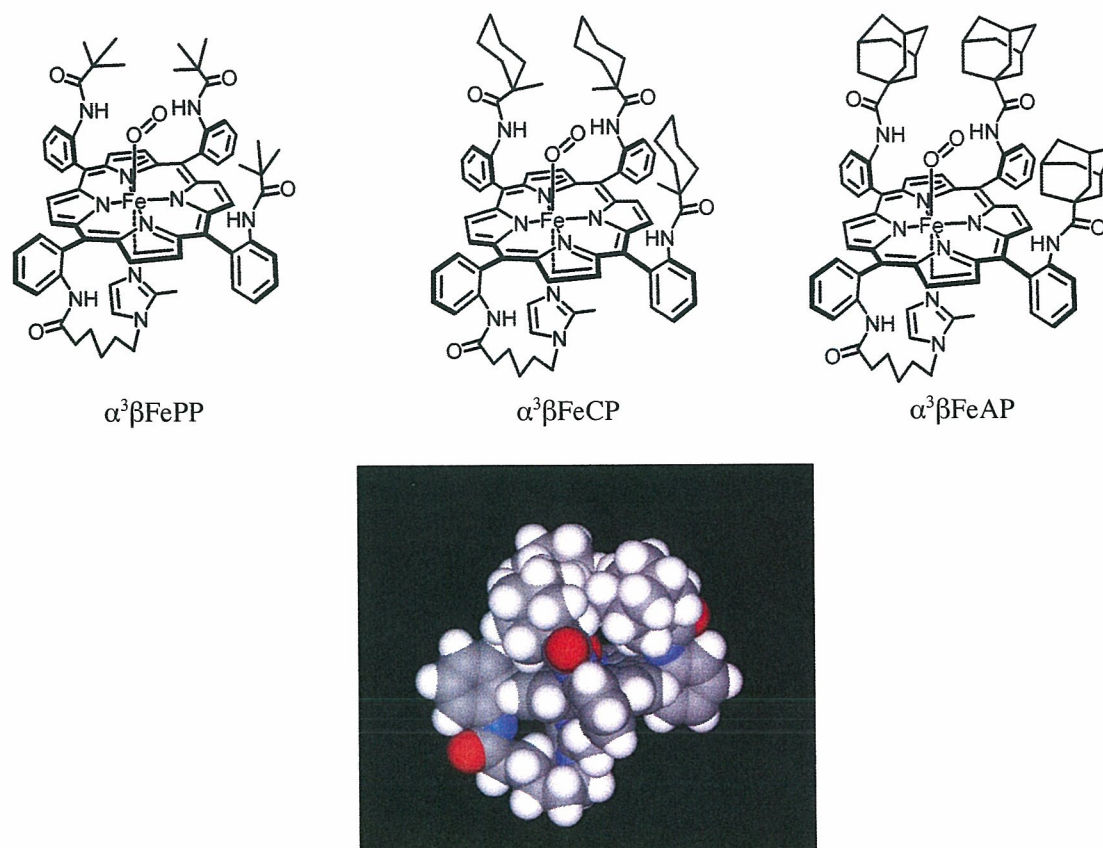
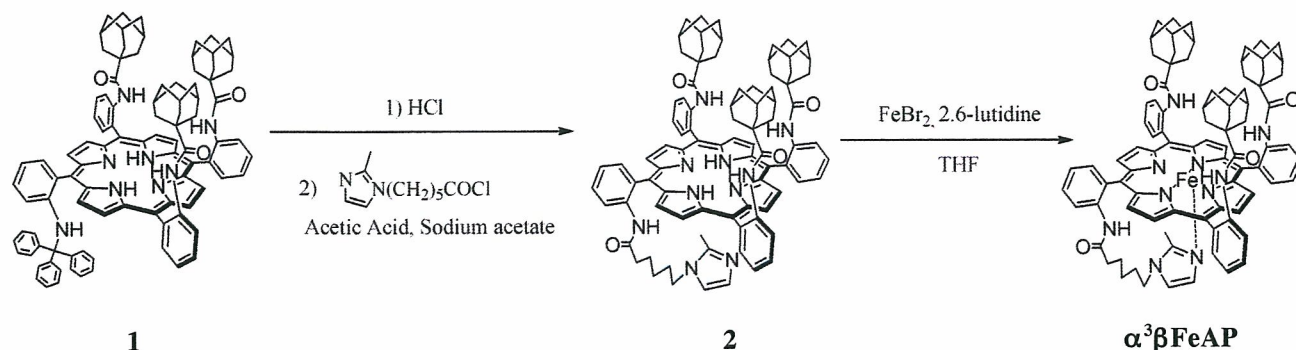


Fig. 6 $\alpha^3\beta$ -substituted hemes and space-filling model of oxygenated FeAP.



Scheme 1 Synthesis of $\alpha^3\beta$ -substituted heme.

プタン中、遮光下で活性アルミナに吸着させ (70°C, 15時間)、 α^3 -トリスアミノフェニル- β -モノトリチルフェニルポルフィリンを合成した。続いて、3つのアミノ基にアダマンタン酸塩化物を用いてアダマンタンアミド基を導入、ポルフィリン**1**を得た。トリチル基を酸性下で除去した後、THF/アセトニトリル (1/1) 混合溶媒中で6-(2-メチルイミダゾリル)ヘキサン酸クロライドを反応させたが、アミド結合は生成しなかった。これはポルフィリンの低い溶解性に加え、イミダゾール環と酸塩化物が反応したためと考えられる。そこで、反応溶媒を酢酸に変えたところ、副生物としてアセトキシ基の入ったポルフィリンが生成するものの、収率18%で目的化合物**2**を得ることができた。最後に臭化鉄により中心鉄を挿入、 $\alpha^3\beta\text{FeAP}$ を得た。化合物の同定は、赤外吸収スペクトル、UV-vis.スペクトル、質量分析、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定により行った。

2. アルブミン-ヘム水溶液の調製と酸素結合能

HSAのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 溶液 (6.25 μM , 6 mL) と $\alpha^3\beta\text{FeXP}(\text{CO})$ (X: P, C, A) 錯体のエタノール溶液 (0.1 mM, 1.5 mL) を混合した後、透析によりエタノールを除去して、アルブミン-ヘム (CO) 水溶液 (HSA/ $\alpha^3\beta\text{FeXP}$ =1/4, mol/mol) を調製した。窒素雰囲気下で光照射すると deoxy 体を得られた。異なる酸素分圧に対する UV-vis. スペクトル変化から、Drago式を用いて、酸素親和度 (P_{50}) を算出。また、レーザーフラッシュホトリシス法により、酸素結合解離速度定数 (k_{on} , k_{off})

を決定した。

2. トルエン溶液中における酸素結合能測定

ポルフィリン鉄 (III) 錯体のトルエン溶液 (4 mL) と亜二チオン酸ナトリウム水溶液 (4 mL) を窒素雰囲気下で攪拌し、中心鉄を還元、deoxy 体を得た。上記 PBS 水溶液中と同様な方法で、酸素親和度 (P_{50})、酸素結合解離速度定数 (k_{on} , k_{off}) を算出した。

C. 結果および考察

1. アルブミン-ヘムの酸素結合能

窒素雰囲気下における HSA- $\alpha^3\beta\text{FeAP}$ 水溶液の UV-vis. スペクトルは λ_{max} : 441, 541, 565 nm を示し、イミダゾリル基が分子内配位した $\text{Fe}(\text{II})5$ 配位高スピン錯体の形成を示唆した (Fig. 7)。そ

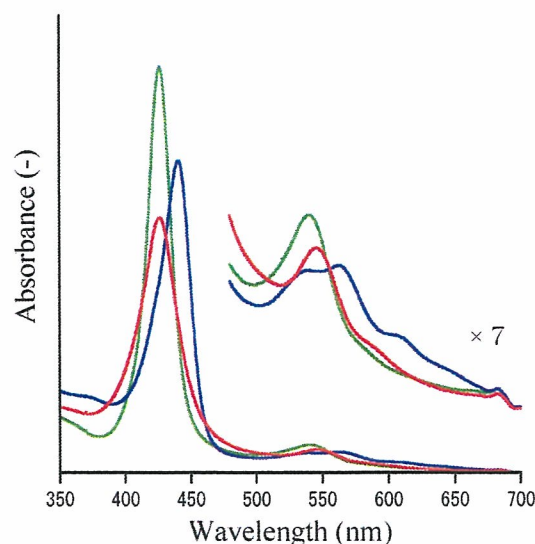


Fig. 7 UV-vis. absorption spectral changes of HSA- $\alpha^3\beta\text{FeAP}$ at 25°C. Blue line: deoxy, red line: oxy, green line: carbonyl.

こへ酸素を吹き込むと、スペクトルパターンは速やかに酸素錯体型(λ_{max} : 427, 547 nm)へと移行し、その酸素結合解離は酸素分圧に応答して可逆的に生起した。HSA- $\alpha^3\beta$ FeAP や HSA- $\alpha^3\beta$ FeCP が酸素錯体を形成するのに対し、HSA- $\alpha^3\beta$ FePP は酸素通気により酸化し、安定な酸素錯体は得られなかった¹⁾。HSA- $\alpha^3\beta$ FeAP の酸素親和性 (P_{50} : 11 torr, 37°C) は、HSA- $\alpha^3\beta$ FeCP

に比べ 2.3 倍高く (P_{50} は小さい)、これは大きな k_{on} (9.7 倍) に起因する (Table 2)。

2. $\alpha^3\beta$ 型ヘムの酸素結合能 (トルエン溶液中)

置換基構造と酸素結合能の相関をより明確にするため、各 $\alpha^3\beta$ 型ヘムのトルエン溶液中における酸素結合パラメーターを測定した。 $\alpha^3\beta$ FeAP トルエン溶液の窒素雰囲気下における UV-vis.

Table 2 O₂ binding parameters of HSA- $\alpha^3\beta$ FeXP in phosphate buffer saline solution at 25°C.

Heme	$10^{-7} k_{\text{on}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})^{\text{a}}$	$10^{-3} k_{\text{off}} (\text{s}^{-1})^{\text{a}}$	P_{50} (torr) [at 37°C]
$\alpha^3\beta$ FeAP	28	5.1	11 [33]
$\alpha^3\beta$ FeCP	2.9	1.1	25 [45]

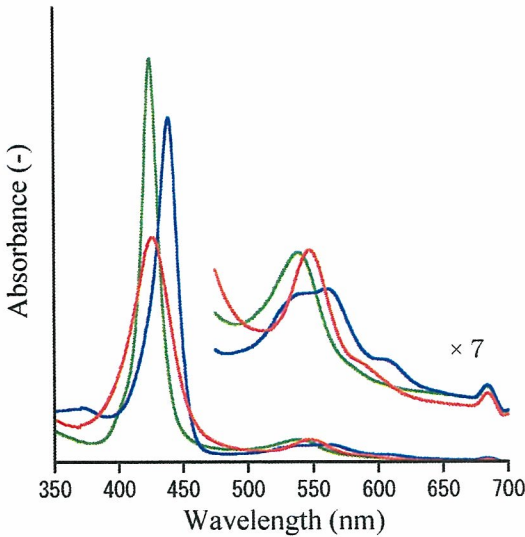


Fig. 8 UV-vis. absorption spectral changes of $\alpha^3\beta$ FeAP in toluene. Blue line: deoxy, red line: oxy, green line: carbonyl.

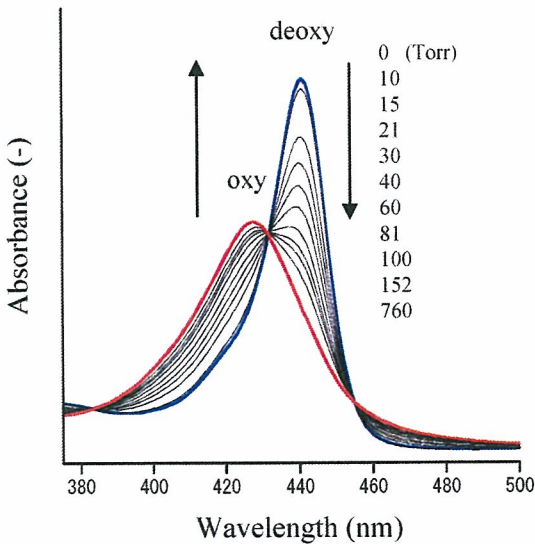


Fig. 9 UV-vis. absorption spectral changes of $\alpha^3\beta$ FeAP at various O₂ partial pressure in toluene.

Table 3 O₂ binding parameters of $\alpha^3\beta$ FeXP in toluene at 25°C.

Heme	O ₂		
	$10^{-7} k_{\text{on}} (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$10^{-4} k_{\text{off}} (\text{s}^{-1})$	P_{50} (Torr)
$\alpha^3\beta$ FeAP	24	11	36
$\alpha^3\beta$ FeCP	5.8	5.1	67
$\alpha^3\beta$ FePP	8.6	5.6	50

スペクトルは、 λ_{max} : 439, 520, 561 nm を示し、アルブミン中と同様にイミダゾリル基が分子内配位した Fe(II)5 配位高スピン錯体の形成を示唆する (Fig. 8)。そこへ酸素を通気すると、酸素錯体 (λ_{max} : 427, 548 nm) が得られ、酸素滴定におけるスペクトル変化は、等吸収点を示しながら可逆的に変化した (Fig. 9)。

$\alpha^3\beta\text{FeAP}$ の酸素親和度 (P_{50} : 36 torr, 25°C) は、 $\alpha^3\beta\text{FeCP}$ や $\alpha^3\beta\text{FePP}$ に比べ 1.4~1.9 倍高い (P_{50} 値は低い) (Table 3)。横軸に k_{on} 、縦軸に P_{50} の逆数である平衡定数 (K) のプロットは、正の相関が得られるので、 $\alpha^3\beta$ 型ヘムの酸素親和性は、置換基構造の違いにより変化し、その値は k_{on} 値と相関することが明らかと成った (Fig. 10)。

当初、酸素親和性は置換基の大きさに依存して低くなると (k_{on} が減少するため) と予想していたが、実際にはアダマンタンアミド基を有する $\alpha^3\beta\text{FeAP}$ が最も高い酸素親和性を示した。そこで、分子シミュレーションにより 各ヘムの最適構造を構築してみると、 $\alpha^3\beta\text{FeCP}$ 、 $\alpha^3\beta\text{FePP}$ では 3 つの置換基が非対称に傾くため、ポルフィリン環が歪んでいることが明らかになった (Fig. 11)。そのため k_{on} が低下し、酸素親和性が減少したとも考えられる。一方、 $\alpha^3\beta\text{FeAP}$ ではかさ高い置換基の立体反発が、ちょうどポルフィリン環の平面性維持に役立っている。 $\alpha^3\beta\text{FeAP}$ の高い酸素親和性は、3 つのアダマンタンアミド基がポル

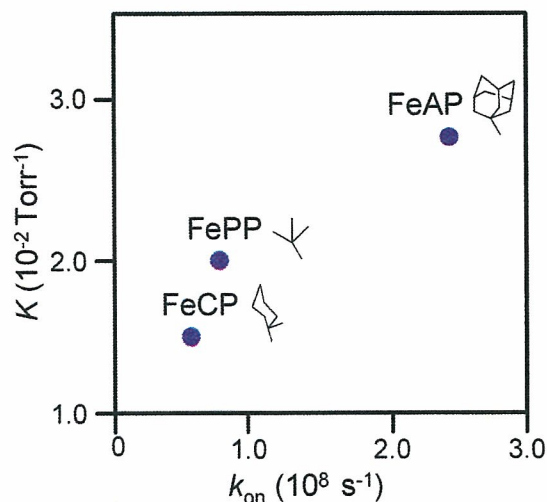


Fig. 10 The relationship between K and k_{on} of $\alpha^3\beta\text{FeXP}$ in toluene.

フィリン環の平面性を保つことに起因すると推測される。

D. 結論

HSA- $\alpha^3\beta\text{FeAP}$ の P_{50} 値は 11 torr (37°C) であり、従来の HSA- $\alpha^3\beta\text{FeCP}$ より高酸素親和性のアルブミン-ヘム製剤として提供できる。 $\alpha^3\beta$ 型ヘムを活性中心とするアルブミン-ヘムにおいても、ヘムの置換基構造の調節により、酸素親和度を変化させることが可能となる。

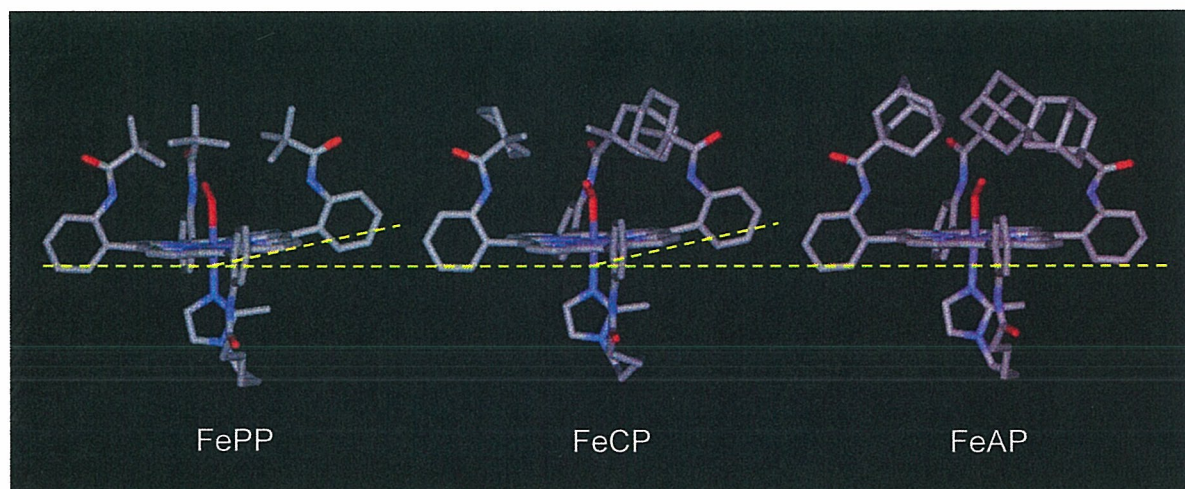


Fig. 11 The esff forcefield simulation of $\alpha^3\beta\text{FeXP}$. Alternative minimizations and annealing dynamic calculations using Insight II.

参考文献

- 1) Nakagawa, A. et al., *Bioconjugate Chem.*, **2005**, *17*, 146–151.

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. T. Atoji, M. Aihara, H. Sakai, E. Tsuchida, S. Takeoka. Hemoglobin vesicles containing methemoglobin and L-tyrosine to suppress methemoglobin formation *in vitro* and *in vivo*. *Bioconjugate Chem.* *17*, 1241-1245 (2006).
2. Y. Goto, K. Terajima, T. Tsueshita, M. Miyashita, H. Horinouchi, H. Sakai, E. Tsuchida, A. Sakamoto. Fluid resuscitation with hemoglobin-vesicle solution does not increase hypoxia or inflammatory responses in moderate hemorrhagic shock. *Biomed. Res.* *27*, 283-288 (2006).
3. Y. Huang, T. Komatsu, R.-M. Wang, A. Nakagawa, E. Tsuchida. Poly(ethylene glycol)-conjugated human serum albumin including iron porphyrins: Surface modification improves the O₂-transporting ability. *Bioconjugate Chem.* *16*, 393–398 (2006).
4. Y. Huang, T. Komatsu, H. Yamamoto, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. PEGylated albumin-heme as an oxygen-carrying plasma expander: exchange transfusion into acute anemia rat model. *Biomaterials* *27*, 4477–4483 (2006).
5. T. Satoh, H. Sakai, K. Sou, E. Tsuchida. Molecular to cooperative dynamics and static structures of PEG-conjugated phospholipid in aqueous micellar solutions: dielectric spectroscopy and SAXS study. *J. Phys. Chem. B.* *11*, 1393-1401 (2007).
6. J. Plock, A. E. Tromp, C. Contaldo, T. Spanholtz, D. Sinovic, H. Sakai, E. Tsuchida, M. Leunig, A. Banic, D. Ermi, Hemoglobin vesicles reduce hypoxia-related inflammation in critically ischemic hamster flap tissue. *Crit Care Med.* *35*, 899-905 (2007).
7. H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. One-year observation of Wistar rats after infusion of Hb-vesicles (Artificial oxygen carriers). *Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.* *35*, 81-91 (2007).
8. T. Komatsu, Y. Huang, S. Wakamoto, H. Abe, M. Fujihara, H. Azuma, H. Ikeda, H. Yamamoto, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Influence of O₂-carrying plasma hemoprotein “albumin-heme” on complement system and platelet activation *in vitro* and physiological responses to exchange transfusion. *J. Biomed. Mater. Res. A* *80A*, in press (2007).
9. H. Abe, H. Azuma, M. Yamaguchi, M. Fujihara, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, H. Ikeda. Effects of hemoglobin vesicles, a liposomal artificial oxygen carrier, on hematological responses, complement and anaphylactic reactions in rats. *Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.* (2007) in press.

(総説、著書など)

1. H. Sakai, E. Tsuchida. “Blood Substitutes”, In: Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering. M. Akay (Ed.), pp. 613-621, 2006, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.
2. H. Sakai, E. Tsuchida. Performances of PEG-modified hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers in microcirculation. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* *34*, 335-340 (2006).
3. E. Tsuchida, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi. Hemoglobin-vesicles as a transfusion alternative. *Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.* *34*, 581-588 (2006)
4. 小松晃之, 黄 宇彬, 王 榮民, 中川晶人, 山本尚志, 堀之内宏久, 小林絃一, 土田英俊. ポリ(エチレングリコール)修飾アルブミン-ヘム: 酸素輸送血漿増量剤としての溶液物性と機能. *人工血液* *14*, 47–54 (2006).
5. 酒井宏水, 堀之内宏久, 山本学, 池田 栄二, 武

- 岡真司、高折益彦、土田英俊、小林紘一 / ヘモグロビン小胞体(HbV)-リコンビナントアルブミン分散溶液による40%交換輸血:ラット脾臓内HbV代謝と造血に関する2週間の観察 (論文記事、Secondary Publication). 日本輸血細胞治療学会誌 53, 47-55 (2007)
6. 酒井宏水、ペドロ カブラレス、エミ G. ツアイ、土田英俊、マルコス インタリエッタ、ハムスター皮下の細動脈血流を一過性に遮断するモデルを用いたP₅₀値が異なるHb小胞体の酸素放出挙動 (二次掲載)人工血液 (in press).
7. D. Erni, R. Wettstein, C. Contaldo, J. Plock, N. Rafatmehr, H. Sakai, E. Tsuchida. Hemoglobin vesicles to treat hypoxia in critically ischemic tissue. *Artif. Blood* (in press).
- ## 2. 学会発表
1. 佐藤 敦、酒井宏水、武岡真司、土田英俊 / 人工赤血球/代用血漿剤(水溶性高分子)分散系のレオロジー解析 / 第55回高分子学会年次大会 / 2006年5月 / 名古屋
2. 小松晃之、中川晶人、土田英俊 / 組換えアルブミン-プロトヘムにおけるヘムポケット構造と酸素結合能の相関 / 第55回高分子学会年次大会 / 2006年5月 / 名古屋
3. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hemoglobin-vesicles (HbV) as artificial oxygen carriers: Recovery after acute hemodilution with HbV suspended in recombinant human serum albumin for 14 days / 52nd Annual Conference of ASAIO / 2006. 6. 8-10 / Chicago, USA.
4. Y. Izumi, M. Yamamoto, K. Takeuchi, M. Watanabe, H. Horinouchi, Y. Teramura, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Modification of radiation response in Lewis lung carcinoma by administration of hemoglobin vesicle / 52nd Annual Conference of ASAIO / 2006. 6. 8-10 / Chicago, USA.
5. E. Tsuchida, H. Sakai, T. Komatsu. / Oxygen Infusions (Artificial oxygen carriers): Hb-vesicles and albumin hemes. / World Polymer Conference, Macro 2006 / 2006. 7. / Rio de Janeiro / Brazil
6. E. Tsuchida, T. Komatsu. / PEG Conjugated Albumin-Heme as a Blood Substitute and Its Medical Applications (Invited Lecture) / 4th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines / 2-7 July 2006 / Rome, Italy.
7. T. Komatsu, A. Nakagawa, E. Tsuchida. Oxygen Binding Properties of Artificial Hemoproteins formed by Complexing Iron Protoporphyrin IX with Human Serum Albumin. / 4th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines / 2-7 July 2006 / Rome, Italy.
8. A. Nakagawa, T. Komatsu, E. Tsuchida. / Human Serum Albumin Hybrid Incorporating Tailed Porphyrinatoiron(II) in the $\alpha, \alpha, \alpha, \beta$ -Conformer as an O₂-Binding Site / 4th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines / 2-7 July 2006 / Rome, Italy.
9. 酒井宏水、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体の配位子反応 / 第13回日本血液代替物学会 / 2006.8.24-25 / 慶大医, 東京
10. 藤原満博, 山口美樹, 若本志乃舞, 東寛, 酒井宏水, 武岡真司, 土田英俊, 池田久實 / In vivo におけるヘモグロビン小胞体の造血前駆細胞への影響 / 第13回日本血液代替物学会 / 2006.8.24-25 / 慶大医, 東京
11. 高橋大輔, 阿部英樹, 藤原満博, 東寛, 酒井宏水, 武岡真司, 土田英俊, 池田久實 / ヘモグロビン小胞体(HbV)が免疫系に及ぼす影響 / 第13回日本血液代替物学会 / 2006.8.24-25 / 慶大医, 東京
12. 池田達彦, 堀之内宏久, 井澤奈緒子, 泉陽太郎, 河野光智, 渡辺真純, 川村雅文, 酒井宏水, 土田英俊, 小林紘一 / Beagle犬を用いた50%脱血ショックにおけるHb小胞体の蘇生効果および酸素運搬能の評価 / 第13回日本血液代替物学会 / 2006.8.24-25 / 慶大医, 東京

13. 泉陽太郎, 山本学, 竹内健, 渡辺真純, 堀之内宏久, 寺村裕治, 酒井宏水, 武岡真司, 土田英俊, 小林絃一／人工酸素運搬体ヘモグロビン小胞体による固形腫瘍の酸素化／第13回日本血液代替物学会／2006.8.24-25／慶大医, 東京
14. 小松晃之, 中川晶人, 土田英俊／遺伝子組換えアルブミン-プロトヘム錯体からなる新しい酸素輸送ヘム蛋白質の創製／第13回日本血液代替物学会／2006.8.24-25／慶大医, 東京
15. 中川晶人, 黄 宇彬, 王 榮民, 小松晃之, 土田英俊／ポリ（エチレングリコール）修飾アルブミン-ヘムの酸素結合能と新しい特徴／第13回日本血液代替物学会／2006.8.24-25／慶大医, 東京
16. E. Tsuchida, H. Sakai, K. Sou, H. Horinouichi, K. Kobayashi / Hemoglobin-Vesicles as Artificial Oxygen Carriers: Present Situation and Future Visions. (INVITED LECTURE) / International Visions on Blood Substitutes / 2006.9.17-20 / Parma, Italy.
17. H. Sakai, H. Horinouichi, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Blood Exchange with Hemoglobin-Vesicles Suspended in Recombinant Albumin: Profiles of hematopoiesis and metabolism of HbV. (INVITED LECTURE) / International Visions on Blood Substitutes / 2006.9.17-20 / Parma, Italy.
18. P. Bercik, H. Sakai, J. Lu, E. Tsuchida, S.M. Collins / Intestinal barrier function is preserved using hemoglobin vesicles (HbV) as an oxygen carrier in a model of isolated arterially perfused murine intestine. / International Visions on Blood Substitutes / 2006.9.17-20 / Parma, Italy.
19. 中川晶人, 飯塚 誠, 小松晃之, 武岡真司, 土田英俊／ヒスチジン誘導体結合ヘムを包接したアルブミン複合体の酸素結合反応／第55回高分子討論会／2006年9月／富山
20. 酒井宏水, 堀之内宏久, 土田英俊, 小林絃一／人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)による50%出血ショック蘇生後の回復過程／第44回日本人工臓器学会大会／2006.10.31-11.2／パシフィコ横浜
21. 佐藤敦, 酒井宏水, 武岡真司, 土田英俊／人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)／代用血漿剤分散系のレオロジー特性／第44回日本人工臓器学会大会／2006.10.31-11.2／パシフィコ横浜
22. 泉陽太郎, 山本学, 竹内健, 渡辺真純, 堀之内宏久, 寺村裕治, 酒井宏水, 武岡真司, 土田英俊, 小林絃一／人工酸素運搬体ヘモグロビン小胞体による固形腫瘍の酸素化／第44回日本人工臓器学会大会／2006.10.31-11.2／パシフィコ横浜
23. 佐藤高彰, 小松晃之, 中川晶人, 土田英俊／人工酸素運搬体として機能するヒト血清アルブミン-ヘム複合体溶液中の蛋白質相互作用ポテンシャル／第29回溶液化学シンポジウム／2006.11.22-24／山形遊学館
24. H. Sakai, D. Erni, M. Intaglietta, E. Tsuchida / Targeted Oxygen Delivery by Hb-vesicles. / International Liposome Society Annual Meeting 2006 / Dec. 8-12/ London, UK.
25. H. Sakai, H. Horinouichi, E. Ikeda, K. Sou, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Physiological Capacity of RES for the Degradation of Hb-vesicles (Artificial O₂ Carriers) after Massive Intravenous Doses by Daily Repeated Infusions for 14 Days. / International Liposome Society Annual Meeting 2006 / Dec. 8-12/ London, UK.
26. H. Sakai, H. Horinouichi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Hb-vesicles suspended in recombinant human serum albumin (rHSA) for fluid resuscitation from hemorrhagic shock./ International Liposome Society Annual Meeting 2006 / Dec. 8-12/ London, UK.
27. H. Sakai, H. Horinouichi, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Exchange-transfusion with Hb-vesicles

(HbV) suspended in recombinant human serum albumin (rHSA) solution: degradation of HbV and erythropoiesis in a rat spleen for 2 weeks../ International Liposome Society Annual Meeting 2006 / Dec. 8-12/ London, UK.

3. その他の刊行物

スーパーテクノロジー・ビジュアル報告、明日を一新する「値千金」の技術32.「人工赤血球が体の全細胞の呼吸に必要な充分量の酸素を運搬する」p.23, 2006.5. (株)ニュートンプレス

G. 知的財産権の出願・登録状況
新規出願なし

分担研究報告書

血液製剤安定確保のための人工酸素運搬体を用いた救急医療への応用に関する研究

分担課題：Hb小胞体の心筋虚血 - 再灌流障害に対する保護効果

作用機序の解明-1：心筋組織中のglucose, glycogen濃度と解糖系酵素活性への影響

分担研究者	大鈴 文孝	防衛医科大学校	内科学教室	教授
	楠原 正俊	防衛医科大学校	内科学教室	助教授
	柳田 茂樹	防衛医科大学校	内科学教室	研究員
	山岸 正	防衛医科大学校	内科学教室	研究員
	加藤 隆一	防衛医科大学校	内科学教室	研究員
	別所 基明	防衛医科大学校	内科学教室	研究員
	濱 御幸	防衛医科大学校	内科学教室	技官

研究要旨

ラット摘出心臓のランゲンドルフ灌流モデルにおいて、Hb小胞体(HbV)が虚血再灌流時の心機能を有意に回復する。この機序を明らかにするため、本年度はHbVを虚血の直前に10分間灌流し、その後虚血(30分)-再灌流(30分)処置を施した心臓の、組織中glucose、glycogen濃度と心筋細胞のsubcellular fractionの解糖系酵素活性を測定した。HbV原液(Hbとして10 g/dL相当)をKrebs-Henseleit bufferで30倍および100倍希釈した懸濁液(Hbとして0.33 g/dLおよび0.10 g/dL)を灌流した実験群では、心筋組織中のglucose濃度がcontrol群に比較して有意に高値となった。その他の項目では、HbVの効果は見られなかった。これらの結果は、昨年報告した結果と合わせて、HbVが心筋細胞の解糖系に抑制的な作用を示す可能性があることを示唆した。

A. 研究目的

我々は、ラットの摘出心臓をランゲンドルフ灌流する方法を用いて、Hb小胞体(HbV)が虚血-再灌流時の心機能を有意に回復させることを明らかにし、昨年報告した(参考文献1)。本研究では、HbVの虚血-再灌流時の心機能回復効果のメカニズムを解明するための実験の一環として、HbVで灌流した心筋組織中のglucose、glycogen濃度と解糖系の酵素活性を測定し、対照群あるいは空球小胞体で灌流した心筋組織での結果と比較した。

B. 研究方法

1. 用いた試薬類：

本研究では、昨年度の報告書(1)で述べた灌流心臓からの心筋組織を用いた。それゆえ、実験に用いたHbVはSN20041217、lot 6、対照として用いた空球小胞体は、SN20041201、lot 2であった。灌流液の作製、glucose、glycogen濃度と解糖系の酵素活性の測定には、和光純薬の試薬特級あるいはSigma (St Louis, MO)の試薬を用いた。水は比抵抗18.2 MΩ以下の超純水を用いた。

2. 用いた動物、心臓灌流法および心機能の測定：

昨年の報告書(1)に述べた通りであるが、以下に