

のPEGがHb分子一つに結合)に比較して僅かといえる。しかし、我々はこれまでにPEG鎖がどのように細網内皮系から消失していくか、何ら検討をしていなかった。そこで、今回、ウサギ抗methoxy-PEG抗体を用い、免疫染色を行った。肝臓クッパー細胞では1日後に染色部位が認められたが、脾臓には染色部位は無かった。脾臓では7日後にマクロファージに最も強く染色部位が認められた。これらの結果から、HbVの表面に結合しているPEGは抗体に認識され難いが、HbVが分解されてPEG鎖が遊離すると、抗体に認識されるようになったものと考えられた。投与14日後には染色部位は全く認められず、PEGは臓器から消失し、腎臓を經由して排泄されたと考えられるが、これを結論付けるにはPEG鎖の体内動態を詳細に検討することが将来的には必要である。

HbV群のHctは7日後には完全に正常値に復した。これは造血機能の亢進の結果であり、事実、赤脾随に赤芽球巣が大量に確認された。HbVのmetHb生成速度が速いことと、血中滞留時間が短いために、HbV群は蘇生後、次第に貧血気味となり、これに反応して血中エリスロポエチンが上昇、造血機能を亢進したと考えられる。ラットでは貧血状態になると、造血は主に脾臓において髄外造血として行われることが知られている。出血性ショック状態の蘇生にHbVを用いることは急性期の対処には有効であるが、機能半減期は赤血球に比較して短いのので、HbVの追加投与や輸血を行うことにより、蘇生後しばらくしてから発生する貧血状態を回避することが必要になる。

E. 結 論

リコンビナントアルブミンに分散させたHbVを出血性ショック蘇生液として投与したところ、血行動態や血液ガス組成は急速な回復を示し、14日間安定に推移し、脱血液の投与と同等であった。Hctは7日で完全に回復し、体重の増加も認められた。HbVの捕捉による脾臓肥大が3日目に顕著であった

が、14日後にはHbVは消失し、特に顕著な毒性は確認されなかった。これらの結果を受け、現在は慶應義塾大学医学部呼吸器外科にて、中型動物(ビーグル犬)を用い出血性ショック蘇生後1年間生存させる評価試験に移行しており、概ね良好な結果が得られている。

2. 完全合成型人工酸素運搬体 (アルブミン-プロトヘム) の開発

A. 研究目的

ヒト Hb を利用しない完全合成型人工酸素運搬体の開発も進めている。特に、ヒト血清アルブミン (HSA) の多分子結合能を利用して、その内部に合成鉄ポルフィリン誘導体 (FeP) を包接させた HSA-FeP 複合体は、生理条件下はもちろん、生体内でも酸素輸送のできる完全合成系製剤として、その安全性と効果が各種動物実験モデルから実証されている。唯一この製剤に残された課題は、多段の合成工程を要する FeP の製造、さらに FeP の体内における代謝過程の解明にあった。前者は合成ルートの改善、大量生産によるコスト低下で解決できると考えられ、後者は最新の質量分析技術を駆使して現在解析を進めている段階にある。その一方で、Hb の酸素結合席であるプロトヘム (heme) を活性中心として用いれば、上記課題は解決できると考えられる。しかし実際に、アルブミン-プロトヘム (HSA-heme) を調製し酸素を通気してみても、酸素錯体は得られない。Hb のプロトヘムはグロビンが形成する特殊な分子環境 (いわゆる“ヘムポケット”) の中に固定されているため、中心鉄を酸化させることなく酸素分子を可逆的に結合解離できるのである。そこで、我々は HSA-heme におけるプロトヘム結合サイトの空間構造を詳細に把握し、遺伝子組換え技術を用いて Hb のヘムポケット類似環境をアルブミンの中に構

築してしまえば、HSA-heme も酸素錯体を形成できるのではないかと考えた。幸いなことに HSA-heme の単結晶 X 線構造解析に成功し、プロトヘムが HSA の Subdomain IB 内の疎水ポケットに結合していることを解明した。続いて、部位特異的のアミノ酸置換によりヘム鉄に軸配位しているチロシン (Tyr-161) を非配位性ロイシン (Leu) に、イソロイシン-142 を近位塩基として作用するヒスチジン (His) に変換した rHSA(I142H/ Y161L) 変異体を合成し、それにヘムを包接させたところ、得られた rHSA(I142H/ Y161L)-heme は Hb と同じように酸素分子を吸脱着することができたのである。これは、プロトヘムが水中、室温で酸素錯体を形成した初めての例となった。その後の系統的な実験から、配位酸素側にある Leu-185 やアルギニン (Arg)-186 に変異を加えると、酸素親和性が調節できることも明らかとなった。さらに我々は、rHSA-heme 酸素結合過程の速度論的解析の中で、この系には酸素親和性が常に二種類観測されることも明らかにした。例えば、rHSA(I142H/Y161L)-heme の酸素親和性 (P_{50}) は 18 Torr および 134 Torr である。これは酸素解離速度定数が二つ存在することに起因しており、プロトヘムがポケット内で二種類の配向構造をとっている可能性を強く示唆している。プロトヘムは 3, 18-位にビニル基を持つ非対称分子で、アルブミン内部に二種類の異なる向きで結合することができる。rHSA-heme を人工酸素運搬体として利用する場合、二種類の酸素親和性を持つことはあまり好ましくなく、特に酸素を解離しやすい低酸素親和性成分の存在は、酸素運搬効率低下の原因ともなり得る。

そこで本年度は、低酸素親和性成分を持たない人工酸素運搬体 rHSA-heme の設計および合成について検討した。

B. 研究方法

QuikChange (Stratagene) を用いて、プラスミド (pHIL D2-HSA) の Leu-185 を His に、Tyr-161 を Leu

に、さらに His-146 および Lys-190 を Arg に置換した。変異の挿入をシーケンス解析から確認後、エレクトロポレーションにより各プラスミドを酵母 (*Pichia pastoris*) に導入、BMGY (4 L) 中で培養し、BMMY (1 L) 中で rHSA を発現した。精製は塩析、透析、Blue Sepharose カラム処理、FPLC により行い、所望の rHSA を単離した。得られた rHSA は SDS-PAGE で単一バンドであることを確認後、凍結乾燥し、使用直前まで -20 °C で保存した。既法¹⁾に従い、各 rHSA(mutant)-hemin [1/1 (mol)] 錯体のリン酸緩衝水溶液 (pH 7.0) を調製、窒素雰囲気下で中心鉄を還元し deoxy 体を得た。

軸配位構造は可視吸収スペクトル (Agilent 8453 UV-visible spectrophotometer) 測定により解析、酸素親和性 (P_{50})、酸素結合解離速度定数 (k_{on} , k_{off}) はレーザーフラッシュホトリシス法 (Unisoku TSP-100WK time-resolved spectrophotometer with a Spectron Laser System SL803G-10、Q-switched Nd:YAG laser SHG; $\lambda = 532$ nm) を用いて決定した。

C. 結果および考察

1. HSA-heme の分子設計

rHSA と heme が 1:1 の錯体であるにもかかわらず、rHSA-heme の酸素親和性は常に二種類観測される。これはプロトヘムがアルブミンのポケット開口部からその内部に侵入する際、表向き／裏向きどちらの面も軸塩基であるイミダゾール側を向けて入ることができることによる。プロトヘムの配向構造が二通り存在すれば、中心鉄に対するヒスチジンの配位角度や鉄-ヒスチジン間距離はそれぞれ異なるため、結果として二つの酸素親和性が常に観測される。実はこのような現象は、プロトヘムをアポ蛋白質に挿入して調製した再構成蛋白質にも広く見られる。例えばヒトミオグロビンでは、再構成直後に二種類のヘム配向構造が等量で存在する。しかし、面白いことに徐々にポルフィリン面の反転が起こり、13 時間後にはほぼ一方向に収束する。rHSA(I142H/Y161L)-heme における

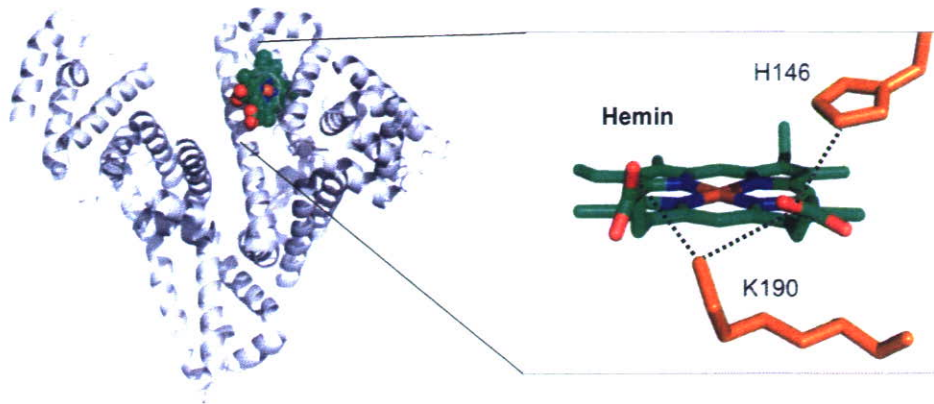


Fig. 7 Structure of HSA-heme (PDB ID: 1O9X).

高・低酸素親和性成分の割合は3:2で、この比率は数日後でも変わらない。つまり rHSA-heme の場合、プロトヘム分子の配向は、ポケット内部に侵入した時点で決定され、一度入ると表裏の反転が起こらないため、常に二つの酸素親和性が観測されるものと推測される。

そこで我々は、ヘムポケット入口の立体構造に着目した。ヘムは疎水結合によりHSAのSubdomain IB 内に包接されるが、プロトヘムのプロピオン酸残基とアルブミンの Arg-114、His-146、Lys-190 間

に作用するイオン結合もプロトヘムの固定に大きく寄与している (Fig. 7)。もしポケット開口部を立体的に狭め、プロトヘムが入る際にポルフィリン面の向きを制御することができれば、プロトヘムの配向構造を一種類とし、酸素親和性を一つにすることができるはずである。この仮説にもとづき、我々は近位塩基である His を L185 位置に導入、Tyr-161 を疎水性の Leu に変換するとともに、His-146 および Lys-190 をかさ高い強塩基性の Arg に置換した新しい rHSA-heme を計 4 種類

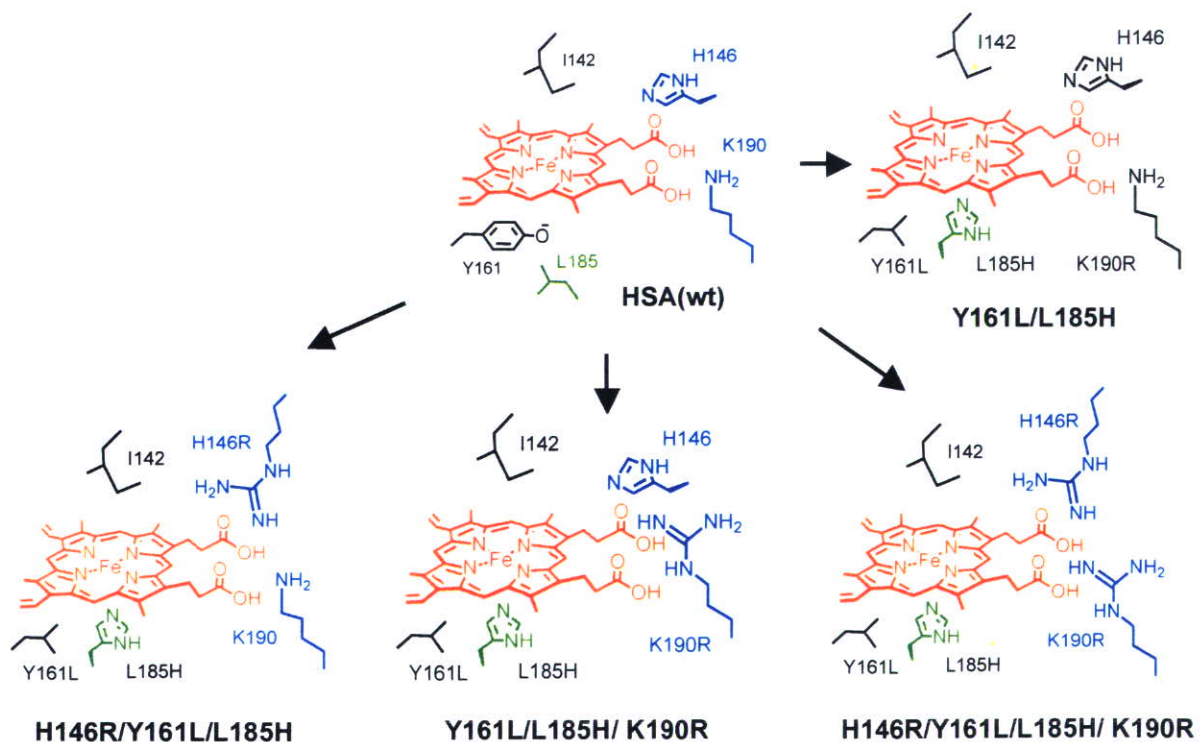


Fig. 8 Structure of new rHSA-heme.

(rHSA(Y161L/L185H) 、 rHSA(H146R/Y161L/L185H)、rHSA(Y161L/L185H/K190R)、rHSA(H146R/Y161L/L185H/K190R)) 設計・合成した (Fig. 8)。

2) rHSA-heme の酸素結合能

窒素雰囲気下における rHSA(H146R/Y161L/L185H/K190R) の UV-Vis. スペクトルは λ_{\max} : 427, 559 nm を示し、His-185 が軸配位した Fe(II)5 配位高スピン錯体の形成を示した (Fig. 9)。この事実は、変異導入した H146R および K190R がヘム鉄に配位しえないことを意味している。そこへ酸素を通気すると、スペクトルパターンは速やかに酸素錯体型 (λ_{\max} : 408, 539, 571 nm) へと移行した。他の rHSA-heme も全て酸素錯体を形成し、その λ_{\max} 値は

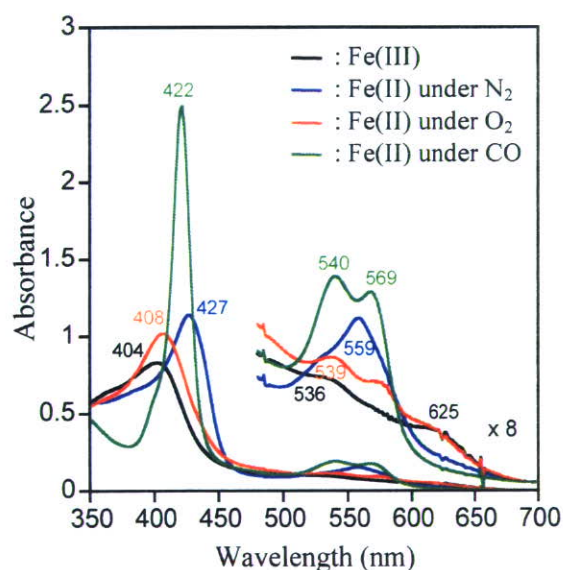


Fig. 9 UV-vis. absorption spectral changes of rHSA(H146R/Y161L/L185H/K190R)-heme (pH 7.0, 22°C).

Arg の導入位置や数によらずほぼ同じであった。以上の結果から、146 および 190 位置へ導入した Arg は、プロトヘムの電子状態に影響を及ぼさないと結論できる。

3) rHSA-heme の酸素結合パラメータ

P_{50} 値は酸素結合解離速度定数 (k_{on} , k_{off}) に依存し ($P_{50} = k_{off}/k_{on}$)、 k_{on} , k_{off} は配位酸素近傍のアミノ酸側鎖により調節できる。例えば、配位酸素近傍にかさ高いアミノ酸が存在すると、酸素結合過程の立体障害として働き k_{on} は低下する。また、配位酸素近傍に高極性アミノ酸が位置すると、酸素錯体の電荷分極構造が安定化されるため k_{off} が減少する。逆に低極性アミノ酸は k_{off} を上昇させる。今回合成した rHSA-heme では、ポケット開口部の修飾/非修飾にかかわらず k_{on} の値はほぼ一定であった。His-146 および Lys-190 位置に導入した Arg は、酸素結合に対する立体障害にならないことがわかった (Table 1)。

Arg を導入していない rHSA(Y161L/L185H)-heme の k_{off} が二種類観測されたのに対し、Arg を導入した rHSA(H146R/Y161L/L185H) 、 rHSA(Y161L/L185H/K190R)、rHSA(H146R/Y161L/L185H/K190R) の k_{off} は一つしか観測されなかった。結果として P_{50} の値は一つとなり、その値 (6~9 Torr) はヒト赤血球 ($P_{50} = 8$ Torr) に近い。かさ高い Arg によりポケット開口部を狭めると、プロトヘムの配向が規制され、酸素親和性を一つにできることが実証

Table 1 O₂-binding parameters of rHSA-heme in phosphate buffer solution (pH 7.0, 22°C).

rHSA-heme (pH 7.0, 22°C)	k_{on} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{off} (ms^{-1})		$P_{1/2}$ (Torr)	
		I	II	I	II
Y161L/L185H	31	0.2	2.1	4	41
H146R/Y161L/L185H	43	0.37		5.7	
Y161L/L185H/K190R	24	0.35		8.9	
H146R/Y161L/L185H/K190R	42	0.41		5.9	

された。しかも、必ず低酸素親和性成分が消失し、赤血球に近い高酸素親和性成分が残ることは興味深い。 k_{off} の値が同程度の値を示したことから、His-146 または Lys-190 位置に導入した Arg は、酸素配位座近傍の極性にも影響を与えないことがわかった。

D. 結 論

プロトヘムのプロピオン酸残基とイオン結合しているアルブミンの His-146 または Lys-190 をかさ高い強塩基性の Arg に置換した rHSA 変異体を合成し、それにヘムを結合させた新しい rHSA-heme を調製した。全ての rHSA-heme が窒素雰囲気下で Fe(II)S 配位高スピン錯体 (deoxy 体) を形成したことから、導入した Arg は中心鉄には軸配位しないことがわかった。各 rHSA-heme の deoxy 体に酸素を通気すると、速やかに酸素錯体が得られた。ヘムポケット開口部に Arg を導入した rHSA(H146R/Y161L/L185H)、rHSA(Y161L/L185H/K190R)、rHSA(H146R/Y161L/L185H/K190R) の酸素結合解離過程は一相系となり、低酸素親和性成分は消失した。 P_{50} 値は 6~9 Torr で、ヒト赤血球の値 (8 Torr) に近い。本研究成果により、酸素運搬効率のより高い rHSA-heme を供給できるようになった。

Ref. 1) T. Komatsu, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 127, 15933 (2005).

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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).

2. J. Plock, A. E. Tromp, C. Contaldo, T. Spanholtz, D.

Sinovic, H. Sakai, E. Tsuchida, M. Leunig, A. Banic, D. Erni, Hemoglobin vesicles reduce hypoxia-related inflammation in critically ischemic hamster flap tissue. *Crit Care Med.* 35, 899-905 (2007).

3. 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).

4. K. Sou, B. Goins, S. Takeoka, E. Tsuchida, W.T. Phillips. Selective uptake of surface-modified phospholipid vesicles by bone marrow macrophages in vivo. *Biomaterials* 28, 2655-66 (2007).

5. 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.* 35, 157-172 (2007).

6. H. Sakai, A. Sato, S. Takeoka, E. Tsuchida. Rheological properties of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) suspended in a series of plasma substitute solutions. *Langmuir* 23, 8121-8128 (2007).

7. H. Sakai, A. Sato, K. Masuda, S. Takeoka, E. Tsuchida. Encapsulation of concentrated hemoglobin solution in phospholipid vesicles retards the reaction with NO, but not CO, by intracellular diffusion barrier. *J. Biol. Chem.* 283, 1508-1517 (2008)

8. M. Yamamoto, Y. Izumi, H. Horinouchi, Y. Teramura, H. Sakai, M. Kohno, M. Watanabe, T. Adachi, E. Ikeda, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Systemic administration of hemoglobin vesicles elevates tumor tissue oxygen tension and modifies tumor response to irradiation. *J. Surg. Res.* (in press).

9. M. Yamaguchi, M. Fujihara, S. Wakamoto, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, H. Hamada, H. Azuma, H.

- Ikeda. Effects of hemoglobin vesicles, a cellular-type artificial oxygen carrier, on human hematopoietic stem/progenitor cells in vitro. *J. Biomed. Materials Res. A.* (in press).
10. K. Sou, E. Tsuchida. Electrostatic interactions and complement activation on the surface of phospholipid vesicle containing acidic lipids: Effect of the structure of acidic groups. *Biochim Biophys Acta.* (in press).
11. 佐藤 敦、酒井 宏水、武岡 真司、土田 英俊. 各種代用血漿剤に分散させたヘモグロビン小胞体 (人工赤血球) とその血液混合系のレオロジー特性. *日本ヘモレオロジー学会誌* (in press)
12. H. Sakai, A. Sato, P. Sobolewski, S. Takeoka, J.A. Frangos, K. Kobayashi, M. Intaglietta, E. Tsuchida. NO and CO binding profiles of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers. *Biochim. Biophys. Acta (Proteins & Proteomics)* (in press).
13. H. Sakai, M. Okamoto, E. Ikeda, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Histopathological changes of rat brain after direct injection of hemoglobin-vesicles (oxygen carriers) and neurological impact in an intracerebral hemorrhage model. *J. Biomed. Materials Res. Part A* (in press).
14. H. Sakai, Y. Seishi, Y. Obata, S. Takeoka, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Fluid Resuscitation with Artificial Oxygen Carriers in Hemorrhaged Rats: Profiles of Hb-vesicles Degradation and Hematopoiesis for 14 days. *Shock.* (submitted, Jan. 23, 2008)
15. J. A. Plock, N. Rafatmehr, D. Sinovic, Y. Harder, H. Sakai, E. Tsuchida, A. Banic, D. Erni. Hemoglobin vesicles improve wound healing and tissue survival in critically ischemic murine skin. *Biomaterials* (submitted, Jan.).
16. P. Bercik, H. Sakai, J. Lu, E. Tsuchida, S.M. Collins. Intestinal motor and barrier functions are preserved using hemoglobin vesicles (HbV) as an oxygen carrier in a model of isolated arterially perfused murine intestine. (to be submitted).
17. A. Nakagawa, T. Komatsu, E. Tsuchida. *meso*-Tetrakis($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -*o*-amidophenyl)porphinatoiron(II) bearing a proximal histidyl group at the β -pyrrolic position via an acyl bond: synthesis and O₂ coordination in aqueous media. *Chem. Lett.* 36. 640–641 (2007).
18. 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.* 81A, 821–826 (2007).
19. T. Sato, T. Komatsu, A. Nakagawa, E. Tsuchida. Induced long-range attractive potentials of human serum albumin by ligand binding. *Phys. Rev. Lett.* 98, 208101-1–4 (2007).
20. A. Nakagawa, T. Komatsu, Y. Huang, G. Lu, E. Tsuchida. O₂-binding albumin thin films: solid membranes of poly(ethylene glycol)-conjugated human serum albumin incorporating iron porphyrin. *Bioconjugate Chem.* 18, 1673–1677 (2007).
21. T. Komatsu, A. Nakagawa, P. A. Zunszain, S. Curry, E. Tsuchida. Genetic engineering of the heme pocket in human serum albumin: modulation of O₂ binding of iron protoporphyrin IX by variation of distal amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 11286–11295 (2007).
22. T. Komatsu, A. Nakagawa, E. Tsuchida. Heme pocket architecture in human serum albumin: regulation of O₂ binding affinity of a prosthetic heme group by site-directed mutagenesis. *Macromol. Symp.* (in press).
23. A. Nakagawa, T. Komatsu, M. Iizuka, E. Tsuchida. O₂ binding to human serum albumin incorporating iron porphyrin with a covalently linked

methyl-L-histidine isomer. *Bioconjugate Chem.* (in press).

(総説、著書など)

1. 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、小林絃一 / 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)
2. 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* 15, 58-64 (2007).
3. 酒井宏水、土田英俊. 輸血の代替が可能な酸素輸液の実現と 組織再生技術. *環境と健康* 20, 464-472 (2007)
4. H. Sakai, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicles for a Transfusion Alternative and Targeted Oxygen Delivery. *J. Liposome Res.* 17, 227- 235 (2007).
5. H. Sakai, K. Sou, E. Tsuchida. Solution to the problems of acellular Hbs by encapsulation, and the intrinsic issues of Hb-vesicles as a molecular assembly. *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine* 9, 226-236 (2007).
6. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers: Present situation and future vision. *J. Intern. Med.* 263, 4-15 (2008).
7. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers (Review paper). *Artif. Organs* (submitted)

2. 学会発表

1. 宮川賀仁、酒井宏水、佐藤 敦、堀之内宏久、武岡真司、高折益彦、小林絃一、土田英俊 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)と各種代用血漿剤の併用によるラット血液交換試験 / 第56回高

分子学会年次大会 / 2007.5.29-31 / 京都国際会議場

2. 酒井宏水、堀之内宏久、小林絃一、土田英俊 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)による50%出血性ショック蘇生後の回復過程 / 第56回高分子学会年次大会 / 2007.5.29-31 / 京都国際会議場
3. 佐藤敦、酒井宏水、武岡真司、土田英俊 / 各種代用血漿剤(水溶性高分子)に分散させた人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)とその血液混合系のレオロジー特性 / 第56回高分子学会年次大会 / 2007.5.29-31 / 京都国際会議場
4. H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Fluid resuscitation with Hemoglobin-vesicles (Artificial Red Cells) in hemorrhaged rats and profiles of recovery for 14 days. / 53rd Annual Conference of ASAIO / 2007. 6.7-9 / Chicago, USA.
5. 酒井宏水、佐藤敦、宮川賀仁、武岡真司、堀之内宏久、高折益彦、小林絃一、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体と各種代用血漿剤の併用に関する検討 / 第14回日本血液代替物学会 年次大会 / 2007.6.14-15 / 慶應義塾大学 三田キャンパス
6. 須崎裕典、酒井宏水、小林直樹、池田達彦、堀之内宏久、小林絃一、武田朴、戸川達男、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体に対応できる多波長パルス分光法を用いたパルスオキシメータ / 第14回日本血液代替物学会 年次大会 / 2007.6.14-15 / 慶應義塾大学 三田キャンパス
7. 池田達彦、堀之内宏久、井澤菜緒子、河野光智、泉陽太郎、渡辺真純、川村雅文、宗慶太郎、酒井宏水、土田英俊、小林絃一 / Beagle犬を用いた40%脱血ショックにおけるHb小胞体の蘇生効果および中長期生存の評価 / 第14回日本血液代替物学会 年次大会 / 2007.6.14-15 / 慶應義塾大学 三田キャンパス
8. 河野光智、堀之内宏久、泉陽太郎、酒井宏水、土田英俊、小林絃一 / ヘモグロビン小胞体の炎症性腸疾患治療への応用 / 第14回日本血液代替物学会 年次大会 / 2007.6.14-15 / 慶應義塾大学 三田キャンパス

- Fukuoka International Congress Center.
9. T. Sato, H. Sakai, K. Sou, O. Glatter, E. Tsuchida. / Statistically valid structural information on hemoglobin vesicle (HbV) by means of small-angle X-ray scattering (SAXS) and dynamic light scattering (DLS). / 第14回日本血液代替物学会 年次大会 / 2007.6.14-15 / 慶應義塾大学 三田キャンパス
 10. 藤原満博、高橋大輔、東寛、酒井宏水、宗慶太郎、武岡真司、土田英俊、池田久實 / In vitroにおけるヘモグロビン小胞体のヒトTリンパ球増殖反応に対する影響 / 第14回日本血液代替物学会 年次大会 / 2007.6.14-15 / 慶應義塾大学 三田キャンパス
 11. 高橋大輔、藤原満博、東寛、宗慶太郎、酒井宏水、武岡真司、土田英俊、池田久實 / リポソームがラット免疫系に及ぼす影響 / 第14回日本血液代替物学会 年次大会 / 2007.6.14-15 / 慶應義塾大学 三田キャンパス
 12. 酒井宏水、土田英俊 / (招待講演)人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)の配位子反応 / 第4回Heme Oxygenase研究フォーラム / 2007.8.24 / 京都府立医科大学, 青蓮会館
 13. H. Sakai, E. Tsuchida. / Targeted oxygen delivery by Hb-vesicles. (poster) / 12th IUPAC International Symposium on Macromolecular Complexes / 2007. Aug. 27-31 / Fukuoka International Congress Center.
 14. H. Sakai, A. Sato, S. Takeoka, E. Tsuchida. / Rheology control of hemoglobin- vesicles (artificial oxygen carriers) suspended in a series of plasma substitute solutions (water-soluble polymers). (poster) / 12th IUPAC International Symposium on Macromolecular Complexes / 2007. Aug. 27-31 / Fukuoka International Congress Center.
 15. T. Sato, H. Sakai, K. Sou, O. Glatter, E. Tsuchida. / Static and Dynamic Structures of Hemoglobin Vesicle (HbV) and Related Bio-Inspired Systems. (poster) / 12th IUPAC International Symposium on Macromolecular Complexes / 2007. Aug. 27-31 /
 16. Y. Ebihara, S. Hanada, H. Sakai, E. Tsuchida, T. Nakahata, H. Nakauchi, K. Tsuji / Generation of human embryonic stem cell-derived erythroid cells with functional maturity. / International Society of Experimental Hematology, 36th Annual Scientific Meeting / Sept. 28-30, 2007 / Hamburg Convention Center, Germany
 17. T. Sato, H. Sakai, K. Sou, O. Glatter, E. Tsuchida. / Accurate and quantitative determination of the structural profiles of hemoglobin-vesicle by means of X-ray and light scattering techniques. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
 18. H. Sakai, A. Sato, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Hemoglobin vesicles as artificial oxygen carriers: Interactions with ligand molecules in the production process and in blood circulation. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
 19. H. Horinouchi, N. Aikawa, M. Kohno, Y. Izumi, H. Sakai, K. Sou, T. Komatsu, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Change of cytokine production in intra-abdominal hemorrhage model. -Effect of hemoglobin-vesicles. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
 20. T. Ikeda, H. Horinouchi, M. Kohno, Y. Izumi, M. Watanabe, H. Sakai, K. Sou, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Resuscitation effect and long term effect of Hb vesicles on organ function in beagle dog. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
 21. M. Kohno, H. Horinouchi, Y. Izumi, T. Ikeda, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Application of hemoglobin vesicles to anemia due to inflammatory bowel disease in a mouse model. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes /

2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
22. Y. Izumi, T. Yamada, E.N. Ogawa, H. Morisaki, H. Sakai, H. Horinouchi, J. Takeda, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Administration of hemoglobin vesicle under mechanical ventilation does not affect lung function. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
23. A. Sato, H. Sakai, M. Takaori, S. Takeoka, E. Tsuchida. / Rheological properties of Hb-vesicles suspended in a series of plasma substitute solutions. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
24. H. Suzaki, H. Sakai, N. Kobayashi, T. Ikeda, H. Horinouchi, K. Kobayashi, S. Takeda, T. Togawa, E. Tsuchida. / Multiwavelength pulse spectrophotometry applicable for hemoglobin-vesicles. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
25. H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Fluid resuscitation with Hb-vesicles in hemorrhaged rats and profiles of recovery for 14 days. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
26. P. Bercik, H. Sakai, J. Lu, K. Kobayashi, E. Tsuchida, S.M. Collins. / Intestinal barrier function is preserved using Hb vesicle (HbV) in a model of isolated arterially perfused murine intestine. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
27. K. Sou, H. Sakai, E. Tsuchida. / Surface characteristics of hemoglobin-vesicles: electrostatic properties and interaction with blood components. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.
28. H. Sakai, K. Sou, E. Tsuchida. / Ligand reactions of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers. / 9th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies / 2007. Oct. 22-25 / Beijing, China.
29. T. Sato, H. Sakai, K. Sou, O. Glatter, E. Tsuchida. / Static structure and dynamics of hemoglobin vesicle (artificial blood substitute) and its related systems. / 9th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies / 2007. Oct. 22-25 / Beijing, China.
30. 富田裕、鳥海春樹、長田高志、富田稔、畝川美悠紀、酒井宏水、土田英俊、堀之内宏之、小林紘一、鈴木則宏 / マウス脳梗塞モデルへの人工赤血球投与の試み / 第19回 日本脳循環代謝学会総会 / 2007. 10.25-26 / 盛岡
31. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Hb-vesicles as artificial oxygen carriers: Interactions with ligand molecules in the production process and in blood circulation. / 2007 Joint Congress of the 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs (JSAO) and The 2nd Meeting of the International Federation for Artificial Organs (IFAO) / October 28-31, 2007 / Osaka
32. H. Horinouchi, T. Ikeda, N. Izawa, H. Sakai, K. Sou, E. Tsuchida, K. Kobayashi, E. / Long term survival study after resuscitation of hemorrhagic shock model in beagle dog: Hb-vesicles has an equal potentiality for resuscitation compared to the autologous blood. / 2007 Joint Congress of the 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs (JSAO) and The 2nd Meeting of the International Federation for Artificial Organs (IFAO) / October 28-31, 2007 / Osaka
33. 土田英俊 / 酸素輸液の意義と開発 / 第20回工学部プロジェクトX講演会 / 2007.12.13 / 熊本大学工学部
34. P. Bercik, E.F. Verdu, J. Lu, H. Sakai, T. Tompkins, E. Tsuchida, M. Perdue, and S.M. Collins. / Effect of bacterial eradication and probiotic treatment on H. Pylori-induced intestinal barrier dysfunction /

- Canadian gastroenterology congress / February, 2008.
35. 酒井宏水、土田英俊／物質としての人工赤血球の特徴／平成19年度研究成果発表会「人工血液をつくる(8)」／2008.2.11／慶應義塾大学医学部北里講堂
36. H. Sakai, A. Sato, S. Takeoka, E. Tsuchida / Hb encapsulation in vesicles retards the reaction with NO by intracellular diffusion barrier, and the relevance to the vasoinactive properties of RBCs and Hb-vesicles / 第33回日本微小循環学会 総会 / 慶應義塾大学三田キャンパス / 2.21-22. 2008
37. 中川晶人、小松晃之、土田英俊／組換えヒト血清アルブミン-プロトヘム複合体のヘムポケット構造と酸素結合能／第56回高分子学会年次大会／2007.5／京都
38. 小松晃之、土田英俊／アルブミンを用いた全合成系人工酸素運搬体の創製（依頼講演）／第14回日本血液代替物学会年次大会／2007.6／東京
39. 中川晶人、小松晃之、土田英俊／組換えヒト血清アルブミン-プロトヘム錯体におけるヘムポケット構造と酸素結合能の相関／第14回日本血液代替物学会年次大会／2007.6／東京
40. T. Komatsu, A. Nakagawa, E. Tsuchida. / Genetically engineered hemepocket in human serum albumin: modulation of O₂ binding to iron protoporphyrin IX / 12th International Symposium on Macromolecular Complexes / 27-31 August 2007. (Invited Lecture) / Fukuoka.
41. A. Nakagawa, T. Komatsu, E. Tsuchida. / Synthesis of tetraphenylporphyrinatoiron(II) derivative bearing a proximal histidyl group via acyl bond and its O₂-binding properties in aqueous media / 12th International Symposium on Macromolecular Complexes / 27-31 August 2007 / Fukuoka.
42. 小松晃之／アルブミンを用いた機能蛋白質の創製とバイオナノチューブの構築（招待講演）／第56回高分子討論会／2007.9／名古屋
43. 中川晶人、小松晃之、盧 剛、土田英俊／PEG修飾アルブミン-ヘム薄膜の酸素結合能／第56回高分子討論会／2007.9／名古屋
44. X. Qu, T. Komatsu, E. Tsuchida. / Characterization of human serum albumin complex with carboxyfullerene / 11th International Symposium on Blood Substitutes / 18-21 October 2007 / Beijing
45. T. Komatsu, A. Nakagawa, E. Tsuchida. / Genetic engineering of the heme pocket in human serum albumin: modulation of O₂ binding of iron protoporphyrin IX / 11th International Symposium on Blood Substitutes / 18-21 October 2007 / Beijing
46. A. Nakagawa, T. Komatsu, G. Lu, E. Tsuchida / O₂-binding ability of membrane of PEG-modified albumin-heme / 11th International Symposium on Blood Substitutes / 18-21 October 2007 / Beijing
47. Y. Huang, T. Komatsu, E. Tsuchida. / Polyoxyethylene-godified albumin-heme hybrid -synthesis, property and oxygen-binding ability / 11th International Symposium on Blood Substitutes / 18-21 October 2007 / Beijing
48. T. Komatsu, A. Nakagawa, E. Tsuchida. / Genetic engineering of the heme pocket in human serum albumin: modulation of O₂ binding of iron protoporphyrin IX / 9th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies / 22-25 October 2007 / Shanghai

3. 報道

1. 血液由来のヘモグロビンを使わない次世代人工酸素運搬体を提案、日経バイオテク、7-2, 25 (2007).

G. 知的財産権の出願・登録状況

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：ヘモグロビン小胞体の心筋虚血 - 再灌流障害に対する保護効果
作用メカニズムの解明-2：mitochondria K_{ATP} -channel 活性を経由する可能性について

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	准教授
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
中島 淳	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
瀨 御幸	防衛医科大学校	内科学教室	技官

研究要旨

ラット摘出心臓をランゲンドルフ灌流し、Hb小胞体(HbV) 30倍希釈懸濁液(Hbとして0.33 g/dL)あるいはdiazoxide 100 μ M溶液を虚血直前に灌流するか、虚血直前に ischemic preconditioning (虚血5分を3回繰り返す)処置を施すと、25分虚血後の再灌流時に心機能の回復が見られる。これらの機能回復がmitochondria K_{ATP} -channel活性を経由するか否かを明らかにするため、mitochondria K_{ATP} -channel活性を選択的に抑制する5-hydroxydecanoate (5-HD)による抑制効果を検討した。diazoxide と ischemic preconditioningによる虚血-再灌流後の心機能回復効果は5-HDで抑制されたが、HbVによる効果は5-HDで抑制されなかった。これらの実験結果は、HbVの心筋虚血-再灌流傷害に対する保護効果がmitochondria K_{ATP} -channel活性を介さないことを示唆した。

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た(参考文献1)。昨年、こ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が、いずれの項目においてもHbVで灌流した心筋組織と対照群あるいは空球小胞体で灌流した心筋組織の間に大きな差がないと報告した(参考文献2)。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、この効果がmitochondria K_{ATP} -channel活性を経由する否かを検討するため、mitochondria K_{ATP} -channel活性を選択的に抑制する5-hydroxydecanoate (5-HD)を用いて以下の実験を行った。比較対照としては、mitochondria K_{ATP} -channel活性を介して虚血-再灌流後の心機能を回復させることが知られているmitochondria K_{ATP} -channel openerのdiazoxideとischemic preconditioningを用いた。

B. 研究方法

1. 試薬類

実験に用いたHbVはSN20061024、lot 14である。灌流液の作製には、和光純薬の特級試薬と比抵抗18.2 MΩ以下の超純水を用いた。Diazoxide (Dia)と5-hydroxydecanoate (5-HD)はBiomol (Plymouth Meeting, PA)から、DMSOはSigma (St Louis, MO)からそれぞれ購入した。

2. 実験動物、心臓灌流法および心機能の測定：

麻酔剤を変えたことを除けば、これまでの報告書(1, 2)に述べた通りであるが、以下に概略を記載する。

生後9-10週齢のWistar系雄性ラット(Charles River Japan Inc.)を用いた。ヘパリン(ノボ・ヘパリン注1000、持田製薬) 1000 Uを腹腔内投与し、7分後に、ネブタール60 mg/kg (ネブタール注射液、大日本住友製薬、Na-pentobarbital 50 mg/mL溶液)を腹腔内投与して麻酔した。開腹・開胸して心臓を取り出し、直ちに氷冷したKrebs-Henseleit buffer (NaCl 116 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.5 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 11.0 mM)(以下KH-bufferと省略する)に投入して心臓の拍動を停止させた。大動脈にカニューレを挿入し、KH-bufferを用いて静水圧100 cmH₂O、37°Cでランゲンドルフ灌流した。KH-bufferをはじめとする灌流液は、実験開始前から終了するまで95% O₂ + 5% CO₂の混合ガスを通気し、pHを7.4に調整した。

左心室に生理食塩水を満たしたラテックス・バルーンを挿入し、圧トランスデューサー(P-50, Gould Inc.)を介して多チャンネル記録計(WS-641G, Nihon Kohden)に接続し、左室発生圧(LVDP)、左室拡張末期圧(LVEDP)、心拍数(HR)などを実験開始から終了まで連続的に記録した。バルーンの内容積は、control灌流時の左室拡張末期圧(LVEDP)が0-5 mmHgになるようにした。control灌流開始時から実験終了まで、心臓を灌流して出てきた灌流液を5分毎に採取して冠灌流量(coronary flow, CF)を測定した。

3. Hb小胞体と各種化合物のKH-bufferへの懸濁あるいは溶解

(1) HbV 30倍希釈懸濁液：Hb濃度0.33 g/dL HbV懸濁液の作製法については最初の報告書(1)で詳しく述べた。概略は以下の通りであるが、実験の必要に応じて作製する総volumeは変更した。

純水約260 mLに、832 mgのD-glucoseを溶解させた。これにKH-bufferの構成イオン成分を個別に溶解させた溶液を加え、次にHbV原液14 mLを加え、最後に純水で420 mLにメスアップした。但し、NaCl溶液のvolumeは、HbV原液14 mLが含有するNaCl (0.9%)を差し引いたものとした。

こうして作製したHbV懸濁液のHb濃度は0.33 g/dL相当となる(30倍希釈懸濁液)。

以下の溶液についても必要に応じて作製するvolumeを変更した。

(2) 5-HD 100 μM/mLを含有するHbV 30倍希釈懸濁液：5-HD 4.2 mgを秤量し、200 mLのHbV 30倍希釈懸濁液に溶解させた。

(3) 5-HD 100 μM/mL KH-buffer溶液：5-HD 14.7 mgを秤量し、700 mLのKH-bufferに溶解させた。

(4) Dia 100 μM/mL KH-buffer溶液：Diazoxide 11.5 mgを秤量し、0.25 mLのDMSOに溶解させた。このDMSO溶液0.2 mLを400 mLのKH-bufferに加え、よく攪拌した。DMSOの含有率は0.05%とした。

(5) 5-HD 100 μM/mLを含有するDia 100 μM/mL KH-buffer溶液：5-HD 4.2 mgを秤量し、200 mLのDia 100 μg/mL KH-buffer溶液に溶解させた。

こうして作製したすべての溶液あるいは懸濁液は37°Cに加温し、95% O₂ + 5% CO₂の混合ガスを1時間以上通気した後実験に用いた。

4. 実験のプロトコール

すべてのプロトコールをFig. 1に示した。各実験群の実験内容は以下の通りとした。

(1) control群 (n = 3) : control灌流を30分間行った後に、灌流を停止させて虚血(ischemia)を惹起し、虚血を25分間継続した後再灌流を30分間行った。

(2) HbV 0.33 g/dL群 (n = 3) : 以下HbV群
20分間のcontrol灌流直後に灌流液をHbV希釈懸濁液に切り換え、同じ灌流圧で10分間灌流した。その後直ちに虚血を惹起し、対照群と同様に虚血25分-再灌流30分の処置を行った。

(3) 5-HD 100 μ M + HbV 0.33 g/dL群 (n = 3) : 以下5-HD + HbV群
10分間のcontrol灌流直後に灌流液を5-HD 100 μ M/mL KH-buffer溶液に切り換え、同じ灌流圧で10分間灌流した。その後灌流液を5-HD 100 μ M/mLを含有するHb小胞体30倍希釈懸濁液に切り換えてさらに10分間灌流した後、直ちに虚血を惹起し、対照群と同様に虚血25分-再灌流30分の処置を行った。

(4) Dia 100 μ M/mL群 (n = 3) : 以下Dia群
15分間のcontrol灌流直後に灌流液をDia 100 μ g/mL KH-buffer溶液に切り換え、同じ灌流圧で15分間灌流した。その後直ちに虚血を惹起し、対照群と同様に虚血25分-再灌流30分の処置を行った。

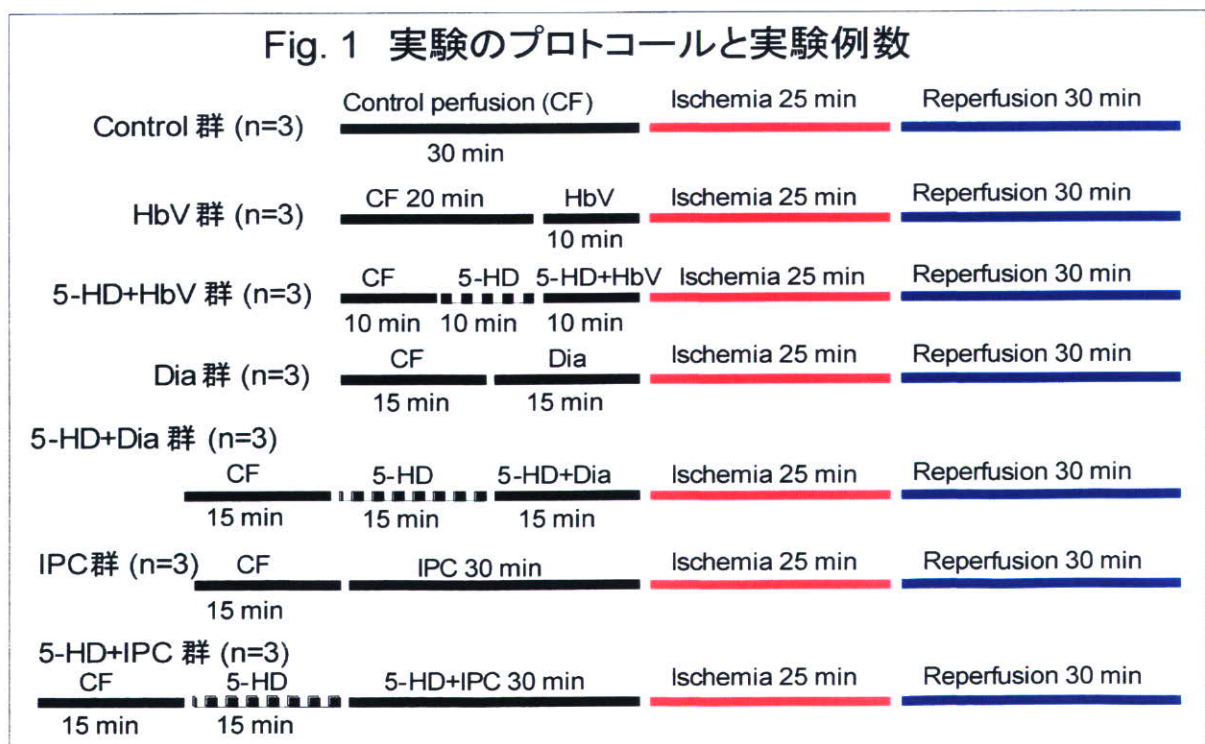
様に虚血25分-再灌流30分の処置を行った。

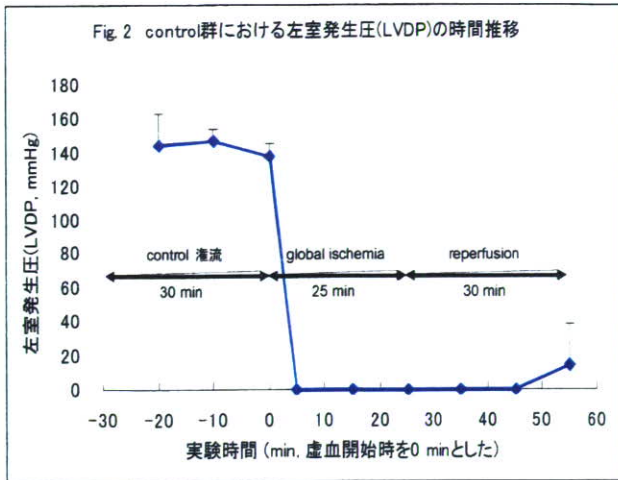
(5) 5-HD 100 μ M + Dia 100 μ M/mL群 (n = 3) : 以下5-HD + Dia群
15分間のcontrol灌流直後に灌流液を5-HD 100 μ M/mL KH-buffer溶液に切り換え、同じ灌流圧で15分間灌流した。その後灌流液を5-HD 100 μ M/mLを含有するDia 100 μ M/mL KH-buffer溶液に切り換えてさらに15分間灌流した後、直ちに虚血を惹起し、対照群と同様に虚血25分-再灌流30分の処置を行った。

(6) ischemic preconditioning群 (n = 3) : 以下IPC群
15分間のcontrol灌流直後に虚血(ischemia) 5分-再灌流(reperfusion) 5分を3回繰り返した。その後直ちに虚血を惹起し、対照群と同様に虚血25分-再灌流30分の処置を行った。

(7) 5-HD 100 μ M + IPC群 (n = 3) : 以下5-HD + IPC群
15分間のcontrol灌流直後に灌流液を5-HD 100 μ M/mL KH-buffer溶液に切り換え、同じ灌流圧で15分間灌流した。その後虚血(ischemia) 5分-再灌流

Fig. 1 実験のプロトコールと実験例数





(reperfusion) 5分を3回繰り返した後、直ちに虚血を惹起し、対照群と同様に虚血25分-再灌流30分の処置を行った。IPCの間の再灌流時には5-HD 100 μ M/mL KH-buffer溶液を灌流した。

5. 灌流実験終了後の心臓の処理

上のプロトコールに従って灌流実験を行った心臓は、別の実験を行うまで -80°C に保管した。

6. データの計算と統計処理

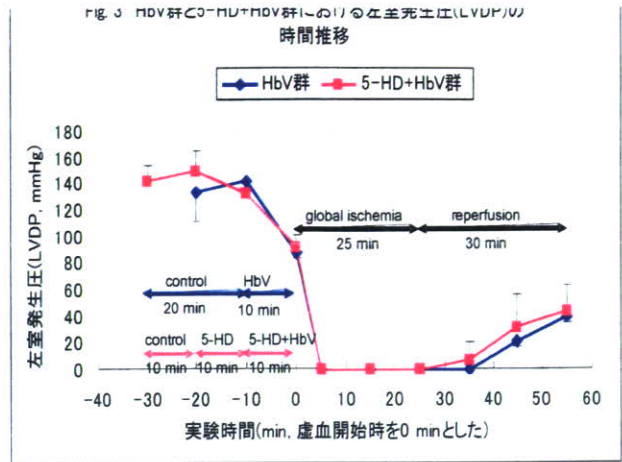
各実験群で測定した心機能のうち左室発生圧(LVDP)の平均値(mean)と標準偏差(SD)を径時的に計算した。例数が十分ではなかったため、統計処理は行わなかった。

C. 研究結果

各実験群で冠灌流量と心機能(心拍数、左室発生圧、左室拡張末期圧、 $-dp/dT$ など)を測定したが、ここでは左室発生圧(LVDP)のみの結果を示すこととした。

(1) control群でのLVDPの時間推移 (Fig. 2)

control群の左室発生圧(LVDP)は、30分間のcontrol灌流時には平均約140 mmHgで安定的に推移した。灌流を停止して虚血を開始すると心臓の拍動は停止し、それ以降虚血時間を通じて全例で、LVDPは0 mmHgとなった。再灌流時には、再灌流開始後の30分に1例でわずかな左室発生圧の発生が見られたが、それ以外の時間には全例で左室発生圧の発



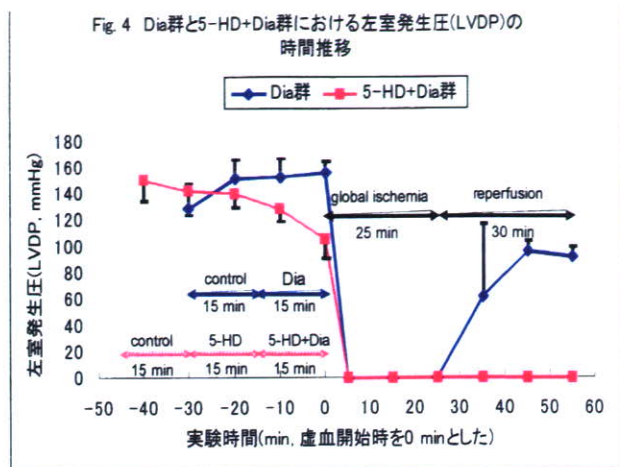
生は観察されなかった。

(2) HbV群と5-HD+HbV群でのLVDPの時間推移 (Fig. 3)

HbV群のcontrol灌流時の左室発生圧(LVDP)は、平均約140 mmHgであったが、HbVの灌流を開始すると急速に低下し、HbV灌流10分後には約90 mmHgとなった。再灌流開始後には全例で左室発生圧の回復が見られたが、その程度は以前の実験結果(1)と比較して弱かった。5-HD+HbV群でもcontrol灌流時の左室発生圧(LVDP)は、平均約140 mmHgであった。5-HDを単独で10分間灌流するとLVDPのわずかな低下が見られ、5-HD+HbVの10分間の灌流でさらに低下したが、HbV群の低下より大きくなることはなかった。再灌流開始後には全例でHbV群のそれと同程度の左室発生圧の回復が見られた。

(3) Dia群と5-HD+Dia群でのLVDPの時間推移 (Fig. 4)

Dia群のcontrol灌流時の左室発生圧(LVDP)は、平均約150 mmHgであり、Diaを灌流しても影響は見られなかった。再灌流開始後には全例で左室発生圧の回復が見られ、その程度は虚血開始直前の値の約60%に達した。5-HD+Dia群ではcontrol灌流時の左室発生圧(LVDP)は、平均約140 mmHgであった。5-HDを単独で15分間灌流するとLVDPのわずかな低下が見られ、5-HD+Diaの灌流でさらに低下し、



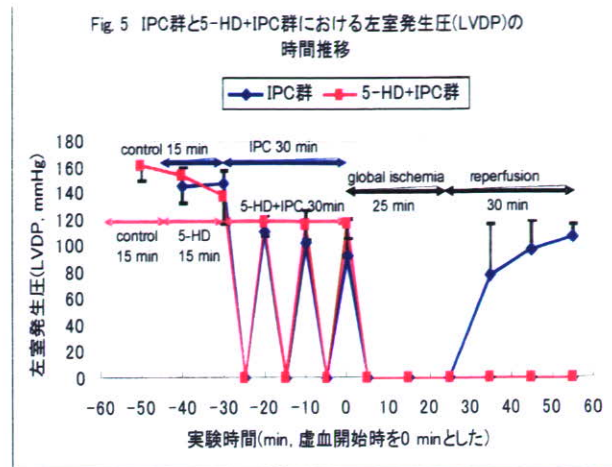
5-HD+Dia灌流15分後には約100 mmHgとなった。5-HD+Dia群では、再灌流を開始しても左室発生圧の回復は全例でまったく見られなかった。

(4) IPC群と5-HD+IPC群でのLVDPの時間推移 (Fig. 5)

IPC群のcontrol灌流時の左室発生圧(LVDP)は、平均約150 mmHgであり、IPC処置の間はわずかに低下した。再灌流開始後には全例で左室発生圧の回復が見られ、その程度は虚血開始直前の値の60%を越えた。5-HD+IPC群ではcontrol灌流時の左室発生圧(LVDP)は、平均約150 mmHgであった。5-HDを単独で15分間灌流するとLVDPのわずかな低下が見られ、5-HD+IPCの処置でさらに低下したが、その程度はIPC群と比較して軽度であった。5-HD+IPC群でも、再灌流開始後の左室発生圧の回復は全例でまったく見られなかった。

D. 考察

今回の実験で、HbVの心筋虚血-再灌流傷害に対する保護効果がmitochondria K_{ATP} -channel活性を介する可能性を検討した。同じような効果を持つ比較対照として用いた diazoxide と ischemic preconditioningでは、5-hydroxydecanoateを前および同時灌流することで、それらが持つ虚血-再灌流後の心機能回復効果は完全に抑制された。これらの結果は、diazoxideと ischemic preconditioningの虚血-



再灌流後の心機能回復効果が mitochondria K_{ATP} -channel活性を介することを明確に示すものである。これに対して、HbVの心筋虚血-再灌流後の機能回復効果は5-hydroxydecanoateの前および同時灌流で抑制されなかった。ただし、今回の実験では、最初の報告(1)と比較して、HbVの心筋虚血-再灌流後の機能回復効果がきわめて弱かったので、HbVの心筋保護効果がmitochondria K_{ATP} -channel活性を介しないと結論付けることは早計であろう。今後は、最初の報告(1)と同程度の機能回復が得られるようなHbVの灌流条件を探し出し、再度5-hydroxydecanoateで抑制されないかどうかを検討したいと考えている。また、虚血-再灌流後の心機能回復に関係があると考えられているsarcolemmal K_{ATP} -channelやmitochondria K_{Ca} -channelの関与についても検討を進める予定である。

E. 結論

ラット摘出心臓をランゲンドルフ灌流し、ヘモグロビン小胞体(HbV) 30倍希釈懸濁液(Hbとして0.33 g/dL)あるいはdiazoxide 100 μ M溶液を虚血直前に灌流するか、虚血直前に ischemic preconditioning (虚血5分を3回繰り返す)処置を施すと、25分虚血後の再灌流時に心機能の回復が見られた。これらの機能回復が mitochondria K_{ATP} -channel活性を経由するか否かを明らかにするため、mitochondria K_{ATP} -channel活性を選択的に抑制する5-hydroxydecanoate (5-HD)による抑制効果を

検討した。diazoxide と ischemic preconditioning による虚血-再灌流後の心機能回復効果は5-HDで完全に抑制されたが、HbVによる効果は5-HDで抑制されなかった。これらの実験結果は、HbVの心筋虚血-再灌流傷害に対する保護効果が mitochondria K_{ATP}-channel活性を介さない可能性があることを示唆した。

(参考文献)

1. 大鈴文孝、楠原正俊、柳田茂樹、山岸正、加藤隆一、別所基明、浜御幸. Hb 小胞体の心筋虚血-再灌流障害に対する保護効果. 「救急・災害医療に利用可能な人工赤血球の開発に関する研究」平成 17 年度 総括・分担研究報告書、pp.29-34 (2006).
2. 大鈴文孝、楠原正俊、柳田茂樹、山岸正、加藤隆一、別所基明、浜御幸. 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「救急・災害医療に利用可能な人工赤血球の開発に関する研究」平成 18 年度 総括・分担研究報告書、pp. 38-43 (2007).

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究業績

1. 論文発表

1. Y. Okamoto, K. Satomura, K. Nakaya, N. Tanaka, F. Ohsuzu, J. Imaki, M. Yoshioka, H. Nakamura. A Matrix Metalloproteinase Inhibitor, ONO-4817, Suppresses the Development of Aortic Intimal Hyperplasia in Experimental Hyperlipidemic Rabbit. *Int. Heart J.* 48,369-378 (2007)
2. K. Nakaya, M. Ayaori, T. Hisada, S. Sawada, N. Tanaka, N. Iwamoto, M. Ogura, E. Yakushiji, M. Kusuhara, H. Nakamura, F. Ohsuzu. Telmisartan

Enhances Cholesterol Efflux from THP-1 Macrophages by Activating PPARgamma. *J. Atheroscler. Thromb.* 14, 133-141 (2007).

3. N. Tanaka, K. Isoda, M. Hara, K. Hayashi, K. Miyazaki, K. Kimura, K. Arakawa, M. Kusuhara, F. Ohsuzu. Large Right Coronary Artery to Left Ventricle Fistula. *J. Echocardiography* 5, 58-60 (2007)
4. K. Ashida, Y. Momiyama, Zahi A. Fayad, N. Tanaka, R. Kato, H. Taniguchi, R. Ohmori, T. Kihara, A. Kameyama, M. Nagata, H. Nakamura, F. Ohsuzu. Magnetic Resonance Evaluation of the Associations of Thoracic and Abdominal Aortic Plaques with the Presence and Extent of Coronary Artery Stenosis. *J. Cardiovasc. Magnetic Resonance* 9, 855-861 (2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
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の救急医療への応用に関する研究

分担課題：マウス脳虚血モデルに対する人工赤血球投与による影響の検討

分担研究者	富田 裕	慶應義塾大学医学部 神経内科・ 脳血管障害予防医学講座 助教
	長田 高志	慶應義塾大学医学部 神経内科 助教
	富田 稔	慶應義塾大学医学部 神経内科 客員教授
	畝川美悠紀	慶應義塾大学医学部 神経内科 私人補手
	鳥海 春樹	慶應義塾大学医学部 神経内科 修士課程学生
	Tatarishvili Jemal	慶應義塾大学医学部 神経内科 留学生
	鈴木 則宏	慶應義塾大学医学部 神経内科 教授

研究要旨

ヒト天然赤血球よりも小粒径で粘度が低い人工赤血球(Hb小胞体)をマウス脳梗塞モデルに投与し、その影響を検討した。C57BL/6Jマウスの頭部を麻酔下、定位固定装置に固定し、左頭頂側頭葉上に頭窓を作成、脳表に酸素電極を固定した。尾静脈にカテーテルを挿入し、田村の変法による左中大脳動脈梗塞群と、Shamマウス群とを比較した。関心領域の脳実質内単一の毛細血管内の個々の蛍光赤血球の動きをビデオカメラあるいは高速度共焦点顕微鏡を用いて観察、連続記録した。その後、人工赤血球を全身投与し、脳表の状態、血圧および酸素分圧変化を検討した。脳梗塞により末梢領域血管内の赤血球の停滞、逆流などの所見を得たが、人工赤血球の全身投与後、微小血管内の通過が確認された。脳表の酸素分圧は、脳梗塞後統計学的に有意に減少し、人工赤血球投与にて有意に回復、6-7分間持続後下降した。Sham手術群にても人工赤血球投与にて脳表の酸素分圧は有意に上昇し、6-7分間後下降した。両群とも血圧値に変動はなかった。脳虚血病巣に対する人工赤血球投与の影響を検討する上で、本実験系の有用性が示唆された。

A. 研究目的

日本において脳血管障害による死亡率は、癌、心疾患に続いて現在第3位であるが、疾患の罹患率としては第1位であり、特に脳梗塞による麻痺、失語症などの後遺症を有する患者のケアには膨大な経費を要し、患者の家族、社会全体に多大な負担を強いるなど、さまざまな社会問題を惹起している。しかし、発症3時間以内の投与に限られ、患

者年齢、施設など実施にあたりさまざまな制約がある血栓溶解療法 (tPA) を除くと脳梗塞に対する完全に有効な治療法はいまだ存在せず、更なる基礎研究の進歩が期待されている。人工赤血球(Hb小胞体)¹⁾はヒト赤血球よりも1/30の小粒径で粘度も低く、脳梗塞部位への酸素供給に応用できる可能性がある。本研究では、これまでに我々が確立したマウスin vivo実験系²⁾において、人工赤血球投与

の影響を検討した。

B. 研究方法

8-12週齢、体重22-25gのC57BL/6Jマウスを用いた。投与量を微調整することができる小動物用麻酔器（バイオリサーチ）を用いて、イソフルレン麻酔下、C57BL/6Jマウス(n=7)の頭部を定位固定装置に固定、左頭頂側頭葉にて頭蓋骨を開け³⁾、硬膜を慎重に除去した。脳表左中大脳動脈分岐部に酸素電極（栄光科学）を固定（Fig. 1）し、組織酸素分圧測定器およびPower Lab® (AD Instruments)を用いて、脳表の酸素分圧変化を連続的にモニタ-した。また、小動物用血圧計（室町機械）にて、全身血圧を持続的にモニタ-した。FITCラベル赤血球、および人

工赤血球注入のため、尾静脈にカテーテルを挿入した。4例のマウスでは左中大脳動脈起始部を電気凝固（田村の変法）にて完全閉塞モデルを作成^{4,5)}、3例のshamマウス群と比較した。脳皮質の約50 μm の深さにおける関心領域(ROI)の実質内単一の毛細血管内の個々のFITCラベル赤血球の動きをビデオカメラ（30 frames/s）あるいは高速（500 frames/s）カメラレーザー光（488 nm）スキャン共焦点顕微鏡（Fig. 2）を用いて観察、連続記録した⁶⁾。その後、人工赤血球を投与、脳表の変化、酸素分圧変化を観察・記録した。

C. 結果および考察

脳梗塞群では、左中大脳動脈末梢領域にて、血

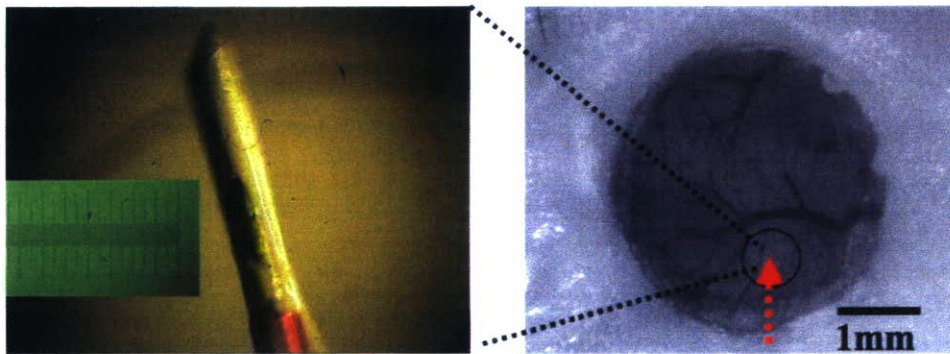


Fig. 1. 脳表左中大脳動脈分岐部に直径 0.2mm の被膜 needle タイプの酸素電極（栄光科学）を固定。Power Lab® (AD Instruments) に接続し連続記録。

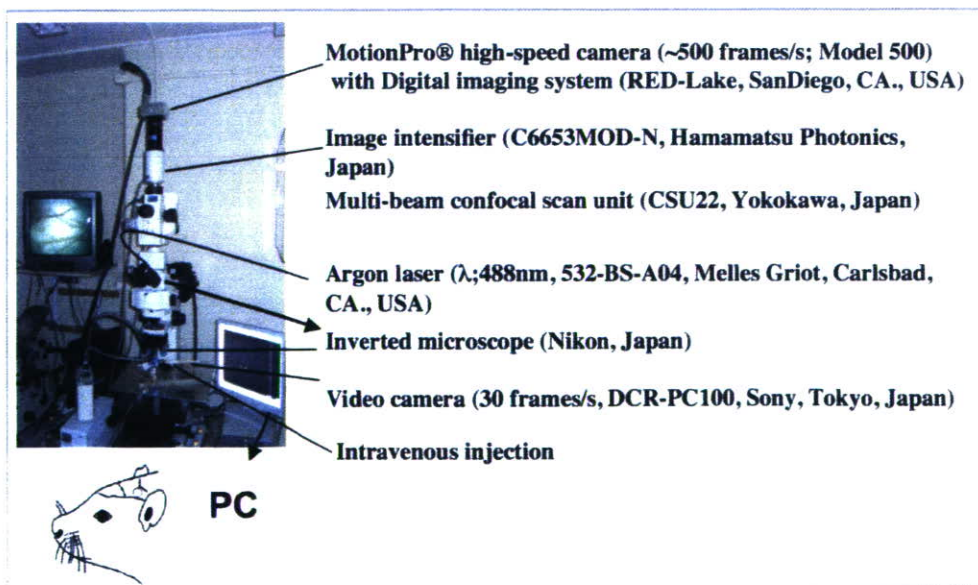


Fig. 2. High-speed camera laser-scanning confocal fluorescence microscope.

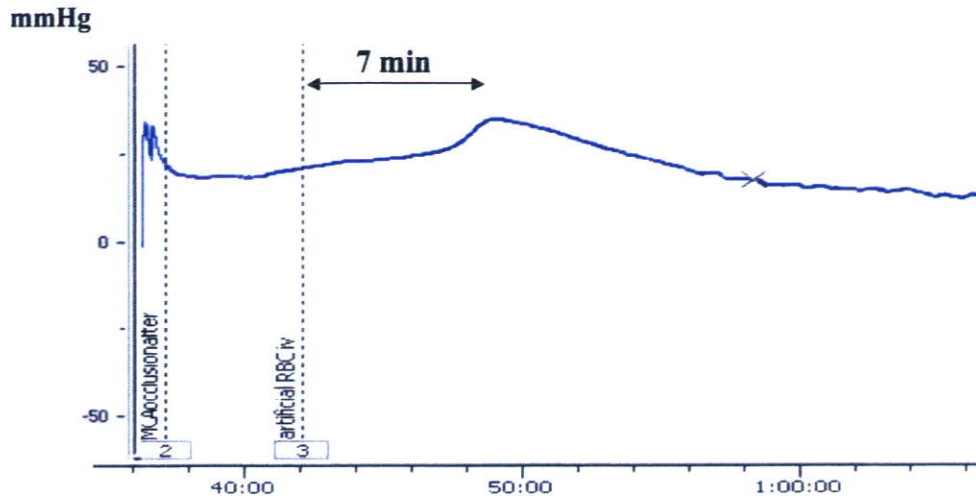


Fig.3 虚血群における酸素分圧変化の一例

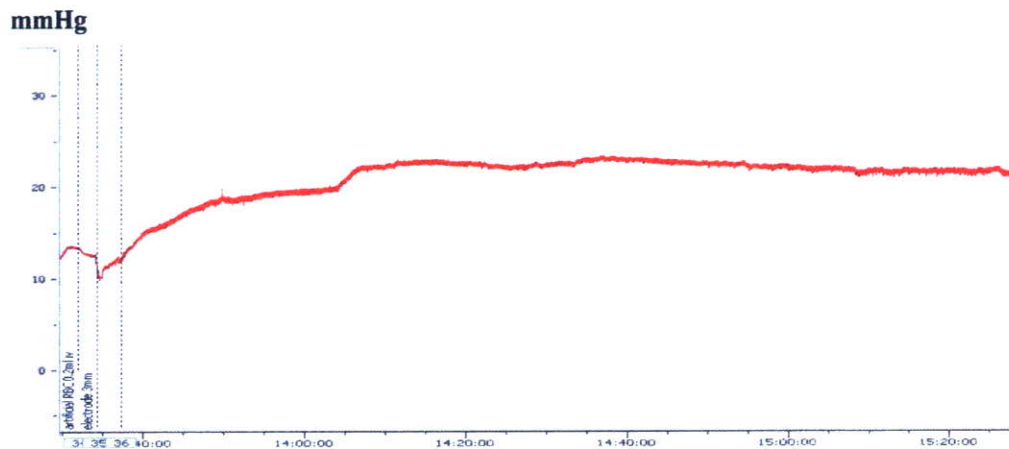


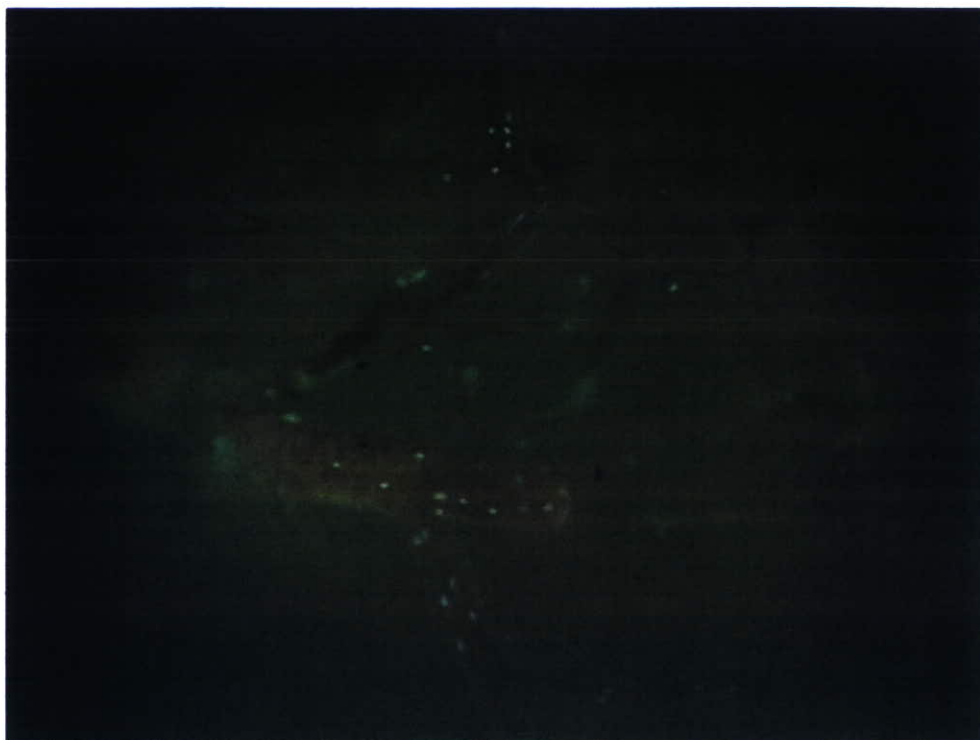
Fig.4 Sham 群における酸素分圧変化の一例

管内の赤血球の停滞、逆流などの*in vivo*画像所見を得た。脳表の酸素分圧のコントロール値は 64.9 ± 63.1 mmHgであり、脳梗塞後 $55.2 \pm 22.8\%$ へと有意に減少 ($P < 0.05$) し、人工赤血球投与にて $80.9 \pm 45.5\%$ へと有意に回復 ($P < 0.05$)、6-7分間持続後下降した (Fig. 3)。Sham手術群では、Sham手術直後の酸素分圧は有意な変化無く、その後の人工赤血球投与にて $172.2 \pm 62.9\%$ へと有意に上昇 ($P < 0.05$)、6-7分間後下降した (Fig. 4)。両群ともに血圧値に有意な変動はなかった。Rhodamineラベルした人工赤血球を投与した場合、モニター画面上で軟膜動脈、毛細血管内の赤色調が増強し、人工赤血球の微小血管内の通過が確認された (Fig. 5)。Rhodamineラベルされた人工赤血球は小粒径であ

るため、梗塞によって赤血球が停滞し、プラズマしか流れていない毛細血管内でも通過したことが示唆された。次年度以降、各群における赤血球密度/速度のMatlab応用ソフト (KEIO-IS1, 2) を用いた解析、MRI・組織切片の解析などによる梗塞体積の比較などを実施し、人工赤血球投与により脳虚血後の微小循環が改善したのか否か明らかにしていく必要があると考えられた。

D. 結論

人工赤血球投与により脳虚血部での一過性の酸素分圧の上昇が観察された。本実験系は脳虚血病巣に対する人工赤血球投与の影響を検討する上で有用であると考えられた。



30μm

Fig. 5. Rhodamine ラベルした人工赤血球を投与した場合、モニター画面上で軟膜動脈、毛細血管内の赤色調が増強し、人工赤血球の微小血管内の通過が確認された。

(参考文献)

- 1- Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K. One-year observation of Wistar rats after intravenous infusion of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers). *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. 35: 81-91, 2007.
- 2- Tomita Y, Kubis N, Calando Y, Tran Dinh A, Meric P, Seylaz J, Pinard E. Long-term in vivo investigation of mouse cerebral microcirculation by fluorescence confocal microscopy in the area of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 25: 858-867, 2005.
- 3- Rivière C, Martina MS, Tomita Y, Wilhelm C, Tran Dinh A, Ménager C, Pinard E, Lesieur S, Gazeau F, Seylaz J. Magnetic targeting of nanometric magnetic fluid loaded liposomes to specific brain intravascular areas: a dynamic imaging study in mice. *Radiology*. 244: 439-448, 2007.
- 4- Tran Dinh A, Kubis N, Tomita Y, Karaszewski B, Calando Y, Oudina K, Petite H, Seylaz J, Pinard E. In vivo imaging with cellular resolution of bone marrow cells transplanted into the ischemic brain of a mouse. *Neuro Image*. 31: 958-968, 2006.
- 5- Kubis N, Tomita Y, Planat V, Tran Dinh A, Planat-Bernard V, André M, Karaszewski B, Waekel L, Pénicaud L, Silvestre J-S, Casteilla L, Seylaz J, Pinard E. Vascular fate of adipose tissue-derived adult stem cells in the ischemic murine brain : an in vivo imaging study. *Neuro Image*. 34: 1-11, 2007.