

## 分担研究報告書

## 人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究

- 分担課題： 1. Hb小胞体／代用血漿剤分散系とその血液混合系の粘弾性計測  
 2. Hb小胞体の粒子サイズの精密評価、静的構造と拡散ダイナミクス  
 3. Hb小胞体表面の陰性荷電と補体活性回避の関連  
 4. Hb小胞体によるマウス摘出腸灌流試験

分担研究者	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 准教授
	宗 慶太郎	早稲田大学 理工学研究所 准教授
	佐藤 高彰	早稲田大学 理工学研究所 講師

## 研究要旨

(1) Hb小胞体(HbV)を各種代用血漿剤に分散させ、更に血液と混合した系のレオロジー特性を検討した。アルブミン、低分子量HESに分散させたHbVと血液の混合系は血液と同等あるいはそれ以下の粘度を示した。一方、デキストラン、高分子量HES、修正ゼラチン溶液の場合は血液よりも高粘度を示したが、血液の混合比の増大に伴い、粘度および貯蔵弾性率の減少を示した。マイクロチャネル流動で塞栓形成は無く、通過時間は単純に粘度に比例した。HbVは可逆的な凝集性を示し、血液の微小流路の塞栓因子に影響を及ぼさないと考えられた。(2) 動的光散乱法と小角散乱法を用いた精密解析により、HbVの厳密に制御された粒子径(238±20nm)、被覆総数1枚(unilamellar)、内包Hbの構造と溶存状態(変性・集合なし)、アルブミンに分散させたHbV濃厚系の粒子拡散ダイナミクスと分散安定性を再確認できた。(3) 優れた血液適合性を有するHbV表面の陰性荷電基が関与する静電作用と負電荷脂質分子構造の相関を詳細に検討した。補体活性化の回避に重要な因子は、HbVの表面電位ではなく、陰性荷電基の構造であることが明らかとなった。(4) マウス摘出小腸をHbVで動脈内灌流すると、蠕動運動と閥門機能を維持でき、将来的に臓器保存が可能である事を示唆する。更に、腸管の生理をビトロ観察する実験手法にも利用できる。一例として、細菌感染と腸管機能との相関について検討し、基礎知見を得ることができた。

## 1. Hb小胞体／代用血漿剤分散系とその血液混合系の粘弾性計測

### A. 研究目的

ヘモグロビン小胞体(HbV)は、高純度・高濃度Hbをリン脂質小胞体（粒子径280 nm）に内包した人

工酸素運搬体である。これまでの動物投与試験から、HbVが血液と同等の酸素運搬能と十分な安全性を有することが明らかになっている。輸血代替としての投与量は非常に多く、循環血液量の40 %以上になることも想定される。赤血球と同等の酸素運搬機能を持たせるため、HbV分散液の固形分濃度

は他の所謂リポソーム製剤と比較して非常に高い(Hb濃度10 g/dL; 脂質濃度5~6 g/dL)。従ってHbVの安全性を評価する上で、ヘモレオロジーに対比させてHbV分散液のレオロジー特性を検討することは重要である。

血漿中に5 g/dL程存在するアルブミンは血液と間質液の膠質浸透圧(COP)を平衡に保ち、循環血液量を維持する機能を有する血漿蛋白質である。この機能を維持する為に、COPは血液代替物が備えるべき必須条件の一つである。HbVは1粒子あたり約3万個のHbを内包しており、分散液のCOPは殆どゼロである。従って、HbVの大量投与に際しては代用血漿剤の併用が循環血液量の維持に重要となる。従来、HbVを5%アルブミン(HSA)溶液或いはリコンビナントアルブミン(rHSA)溶液に分散させCOPを20 Torrに調節し、この分散液を用いた出血ショック蘇生試験や、循環血液量の40~90%を置換する試験から、rHSAに分散させたHbVが血液と同等の酸素運搬効果を有することを明らかにしてきた。HbVをrHSAに分散させてHb濃度を8.6~10 g/dLとした場合の粘度は血液と同等であり、剪断速度依存性からニュートン流体に近い挙動を示している。しかし、実際の臨床現場ではHSA以外に代用血漿剤として、デキストラン(DEX)やヒドロキシエチルスターチ(HES)が使用されており、海外ではそれ以外に、HESの高分子量体や修正ゼラチン溶液(MFG)なども使用されている。また、HbVをこれらの代用血漿剤に分散させて投与することで、虚血領域の酸素化の改善効果も報告されている。このような背景のもと、我々は各種代用血漿剤に分散させたHbVのレオロジー特性の詳細な解析を進めている。rHSAと低分子量HESではHbVと混合しても顕著な粘度増大は見られないが、DEXおよび欧州や米国で使用されている高分子量HESやMFGではHbVの凝集生起を認め、粘度上昇が顕著となる。しかし凝集の形成と解離は極めて可逆的で迅速であり、血液流動性測定装置(Microchannel array flow analyzer, MC-FAN)のマイ

クロチャンネルには一切の塞栓が無いことを確認している。

代用血漿剤を静脈内投与した場合、血液と代用血漿剤の両方が希釈されるので、ここにHbV分散液が投与された場合、凝集形成は低減されると考えられる。また、HbVの凝集生起が血液の流動性に与える影響を*in vitro*で検討する必要がある。そこで本研究では、各種代用血漿剤に分散させたHbVと血液の混合系のレオロジー特性を観測すると共に、MC-FANを用いてHbVの凝集体が血液の流動性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## B. 実験方法

### 1. HbV分散液の調製

HbV分散液は無菌条件下、既報に従って調製した。Hb溶液は日本赤十字社(東京)から提供を受けた期限切れ非使用赤血球から精製した。HbVの内水相には高濃度のHb(38 g/dL)と共に、アロステリック因子としてピリドキサル5'-リン酸(PLP、14.7 mM)がモル比でPLP/Hb = 2.5になるように添加した。HbVの膜成分である脂質は、日本精化社製のPresome PPG-1(1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン)、コレステロール、1,5-bis-O-ヘキサデシル-N-スクシニル-L-グルタマート = 5/5/1(モル比)に0.3 mol%の1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン-N-ポリ(エチレングリコール)(日本油脂社製)を混合して用いた。HbVは生理食塩水に分散、フィルター滅菌し(Dismic、東洋濾紙社製: 0.45  $\mu$ m)、窒素通気により酸素を除去して保存した。HbVの粒子径は279  $\pm$  95 nmであった。

### 2. 各種代用血漿剤

遺伝子組み換えヒト血清アルブミン(rHSA, Bipla, Mw. 67 kDa, 25 wt%溶液)は生理食塩水で5 wt%に希釈して用いた。デキストラン(DEX, 小林製薬工業 デキストラン40注「小林」<sup>TM</sup>, Mw. 40 kDa, 10 wt%溶液)、低分子量ヒドロキシエチルスターチ

**Table 1.** plasma-substitute solutions and their physicochemical properties. The viscosities at 10 and 1000 s<sup>-1</sup> are almost identical, indicating that these polymer solutions are Newtonian fluids.

Plasma Substitutes	Mw. (kDa)	Concentration (g/dL) in saline	COP (Torr)	Viscosity (mPa · s)	
				at 10 s <sup>-1</sup>	at 1000 s <sup>-1</sup>
DEX	40	10	44	4.5	4.5
MFG	30	4	44	2.2	2.3
HES <sub>670</sub>	670	6	27	4.5	4.4
HES <sub>200</sub>	200	6	29	2.5	2.5
HES <sub>130</sub>	130	6	35	2.3	2.3
HES <sub>70</sub>	70	6	34	2.0	2.0
rHSA	66.5	5	19	1.3	1.2

DEX, dextran; HES, hydroxyethyl starch; MFG, modified fluid gelatin; rHSA, recombinant human serum albumin; COP, colloid osmotic pressure.

(HES<sub>70</sub>, 杏林製薬 サリンヘス<sup>TM</sup>, Mw. 70 kDa, 6 wt%溶液)、中分子量ヒドロキシエチルスターチ (HES<sub>130</sub>, HES<sub>200</sub>, Fresenius社 Voluven<sup>TM</sup>, Mw. 130 kDa, 200 kDa, 6 wt%溶液)、高分子量ヒドロキシエチルスターチ (HES<sub>670</sub>, Hospira社 Hextend<sup>TM</sup>, Mw. 670 kDa, 6 wt%溶液)、修正ゼラチン (MFG, B. Braun社 Gelofusine<sup>TM</sup>, Mw. 30 kDa, 4 wt%溶液) を用いた。各種代用血漿剤の膠質浸透圧 (COP) は浸透圧計 (model 4420, Wescor社製、Cut-off Mw. = 10,000) を用いて測定した。物理化学的特徴はTable 1にまとめた。

### 3. 各種代用血漿剤に分散させたHbV及び血液試料の調製

生理食塩水に分散させたHbVを超遠心分離 (20 000 g, 30 min) で沈降させて上澄みの生理食塩水を除去後、代用血漿剤中に分散させ ([Hb] = 10 g/dL)、フィルター処理した (Dismic, 東洋濾紙社製: 0.45 μm)。血液試料は5 %ヘパリン加ヒト新鮮血を用い、採血後6時間以内に測定を行った。

### 4. 各種代用血漿剤に分散させたHbVとその血液混合系のレオロジー測定

粘度の剪断速度依存性はモジュラーコンパクトレオメータ (Physica MCR301: Anton Paar社製) を用いて測定した。測定治具はコーンプレート (コ

ーン径: 50 mm、ギャップ角度: 1°) を用い、25 °C で剪断速度を10<sup>3</sup>から10<sup>4</sup> s<sup>-1</sup>に低下させた。貯蔵弾性率G' の剪断速度依存性はキャピラリーレオメータ (DCR: Anton Paar社製) を用いて測定した (剪断速度 5 ~ 320 s<sup>-1</sup>、周波数2 Hz、37 °C)。

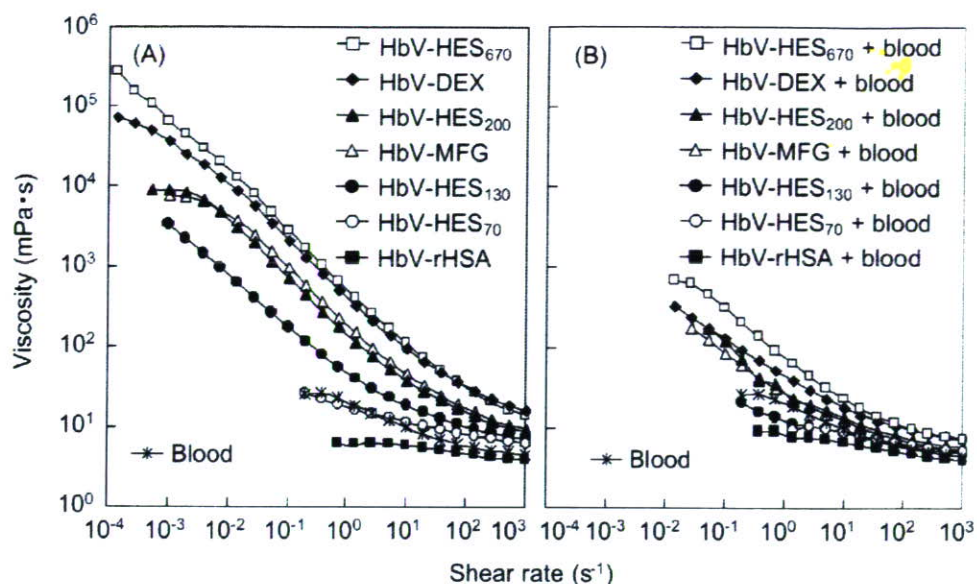
### 5. 各種代用血漿剤に分散させたHbVとその血液混合系のマイクロチャンネル流動性試験

各種代用血漿剤に分散させたHbV ([Hb] = 10 g/dL) とヘパリン加ヒト新鮮血の混合液を測定試料とした。マイクロチャンネルアレイBloody6-7 (幅7 μm, 長さ30 μm, 深さ4.5 μm, 流路数8,736本: 日立原町電子工業社製) にMC-FAN (KH-3: 日立原町電子工業社製) を用いて20 cm水柱差で流し、試料100 μLの通過時間を測定した。通過時間は試料測定の前直前に測定された生理食塩水100 μLの通過時間を用いて (通過時間) × 12秒 / (生理食塩水通過時間) により生理食塩水通過時間が12秒の場合に換算した。また、流動中と停止後の試料の顕微鏡写真を撮影した。

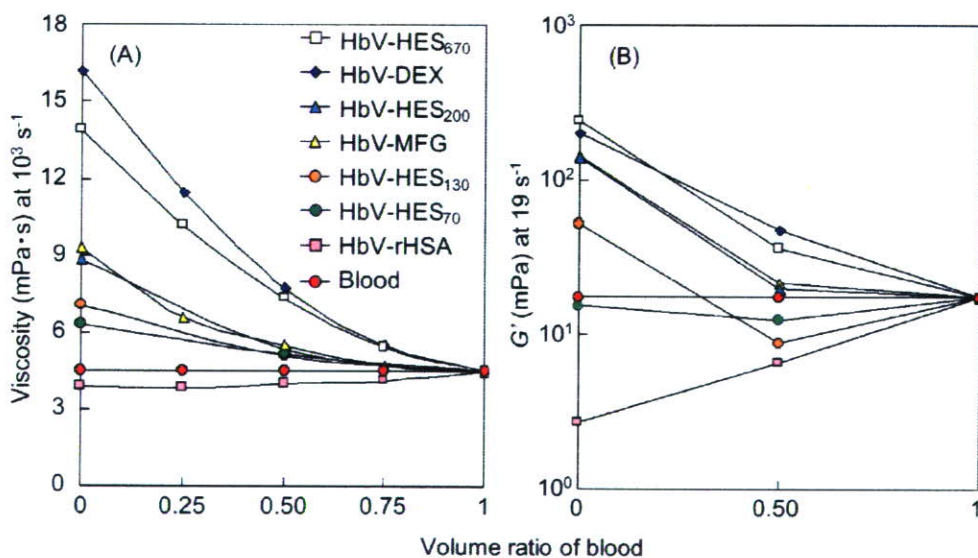
## C. 実験結果

### 1. 各種代用血漿剤に分散させたHbVとその血液混合系のレオロジー特性

Fig. 1Aに、各種代用血漿剤に分散させたHbVについて、剪断速度を10<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>から10<sup>4</sup> s<sup>-1</sup>に低下させたときの粘度変化を示した。rHSAに分散させた場合 (HbV-rHSA) は、粘度の変化は殆ど無く、ほぼニュートン流体を示した。HbV-rHSAおよびHbV-HES<sub>70</sub>の粘度は、ヒト血液とほぼ同じであった。使用したレオメータの検出感度では、低粘度試料は0.5 s<sup>-1</sup>が限界であった。一方、HbV-HES<sub>130</sub>、HbV-HES<sub>200</sub>、HbV-HES<sub>670</sub>、HbV-DEX、HbV-MFGはヒト血液よりも高い粘度を示し、高剪断速度になるほど粘度が低下するShear-thinning流動が観測された。この非ニュートン流体の性質はHbVの凝集体の生起に起因する。これらはより低剪断速度までの測定が可能であった。HESの分子量が大きくな



**Fig. 1.** Shear rate dependence of the viscosity of (A) the HbV suspended in various plasma-substitute solutions, and (B) the mixtures of blood and HbV suspended in various plasma-substitute solutions at a volume ratio of 1/1. The shear rate decreased from  $10^3$  to  $10^{-4}$   $s^{-1}$ .  $[Hb] = 10$  g/dL,  $25^\circ C$ . The blood data are inserted for comparison.



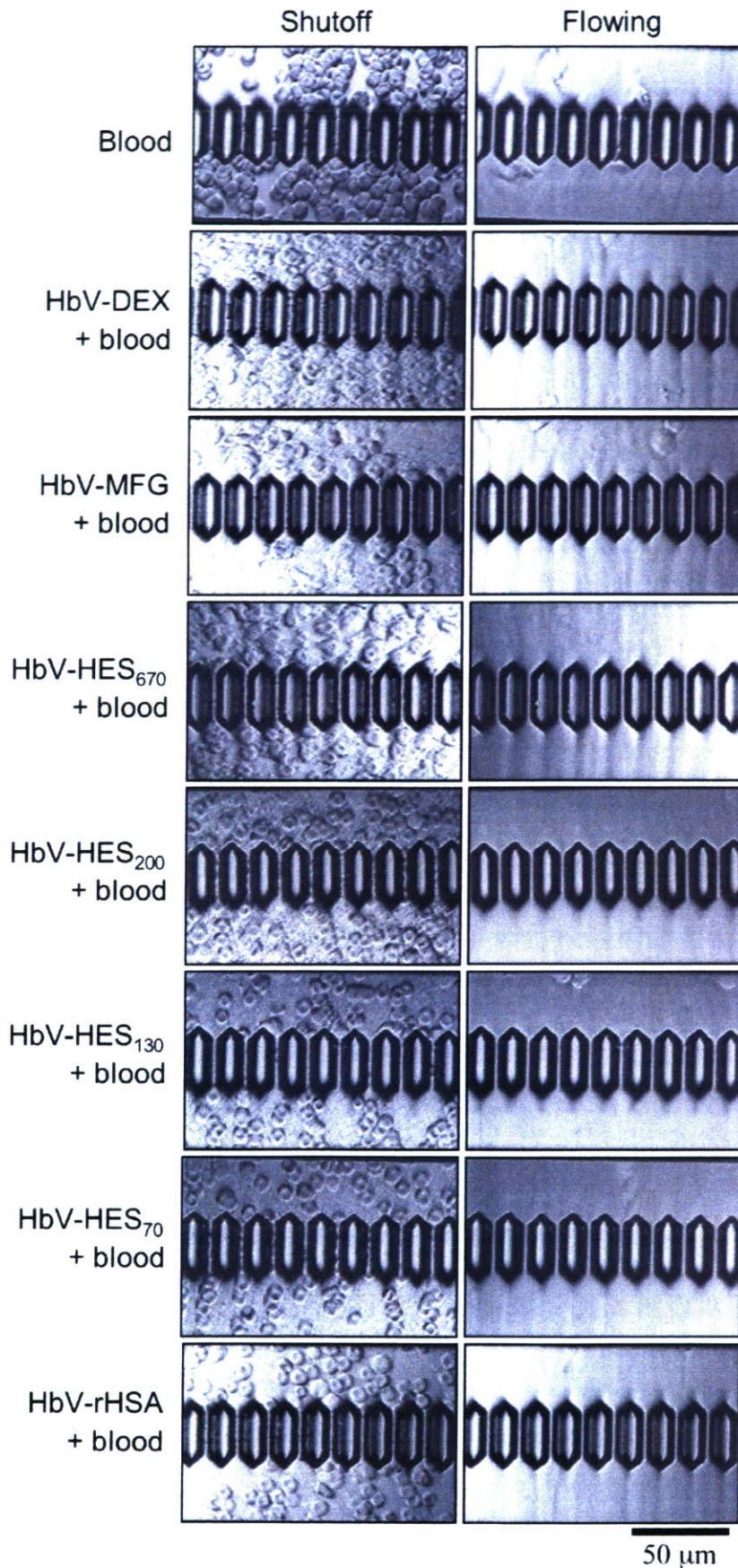
**Fig. 2.** Viscoelasticity of the mixtures of blood and HbV suspended in various plasma-substitute solutions at a volume ratio of 0/1, 1/3, 1/1, 3/1, and 1/0. (A) The viscosity at a shear rate of  $10^3$   $s^{-1}$  measured with an MCR 301 rheometer at  $25^\circ C$ . (B) The storage modulus ( $G'$ ) at a shear rate of  $1.9$   $s^{-1}$  measured with a capillary rheometer at  $37^\circ C$ .

るにつれ粘度が高くなる傾向が認められ、高分子量であるほどHbVは凝集し易くなることが明確に示された。

**Fig. 1B**に、各種代用血漿剤に分散させたHbVと血液を体積比1 : 1で混合した溶液について、**Fig. 1A**と同様に測定した結果を示した(剪断速度 $10^3 - 10^{-4}$

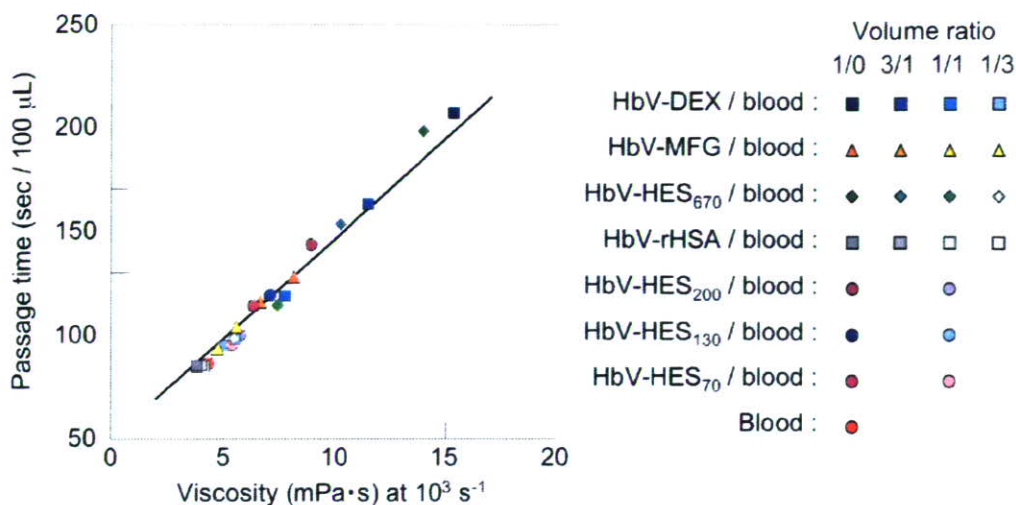
$s^{-1}$ 、 $25^\circ C$ )。HbV-rHSAの血液混合液は血液よりも低い粘度を示した。HbV-HES<sub>70</sub>、HbV-HES<sub>130</sub>の血液混合液は血液とほぼ同じ粘度を示した。一方、HbV-DEX、HbV-HES<sub>670</sub>、HbV-HES<sub>200</sub>、HbV-MFGの血液混合液は、混合前と比較して全域で粘度の減少を示したが、血液よりも高い粘度であった。





**Fig. 3.** Images of microchannels during the flowing condition and the cessation of flow. The flocculate formation is apparent in the plasma phase at the cessation for HbV-DEX + blood, HbV-HES + blood, and HbV-MFG + blood. However, no flocculation was apparent for HbV-rHSA + blood. In the flowing condition, partial plugging of channels occurred due to platelets or white blood cells in blood samples (top).





**Fig. 4.** Microchannel flow measurements of the mixtures of blood and HbV suspended in various plasma-substitute solutions at a volume ratio of 1/0, 3/1, 1/1, 1/3, and 0/1. The time required for the passage of 100  $\mu\text{L}$  of each suspension was plotted against the viscosity at  $10^3 \text{ s}^{-1}$ . The straight line indicates a linear approximation :  $Y = 12.1X$  ( $R^2 = 0.9728$ ).

Fig. 2には血液とHbV分散液の混合比を変化させたときの(A) 粘度、(B) 貯蔵弾性率 $G'$ の変化を示す。HbV-rHSAを除くHbV分散液に関して、血液混合比の増大に伴い粘度と $G'$ が減少する傾向が観測された。一方、HbV-rHSAの粘度と $G'$ は血液よりも小さいため、血液混合比の増大に伴ってこれらが増大し、血液の値に収束していく傾向が観測された。

## 2. 各種代用血漿剤に分散させたHbVとその血液混合系のマイクロチャネル流動性試験

各種代用血漿剤に分散させたHbVとその血液混合系の流動性試験を、体積混合比を変化させて行った。全血の通過時間(46秒)は他の文献の報告値とほぼ一致した。HbV-DEXの通過時間は196秒であったが、血液混合比の増大に伴い通過時間は短縮し、HbV-DEXと血液の混合比1:3においては59秒であった。Fig. 3には、各種代用血漿剤に分散させたHbVと血液を体積比1:1で混合した分散液の静止状態と流動状態の顕微鏡観察写真を示した。HbVの粒子径は $279 \pm 95 \text{ nm}$ と小さい為、均一分散系においてはその存在を光学顕微鏡で確認できないが、静止状態で形成される凝集体はみかけのサイズが大きい為に血漿相中に確認できた。血液と同等の粘度を示したHbV-rHSA、HbV-HES<sub>70</sub>は

HbVの凝集体が殆ど観測されなかった。一方、高粘度を示したHbV-HES<sub>670</sub>、HbV-DEX、HbV-MFGはHbVの凝集体が観測された。しかし、流動中の凝集体は解離して流路を殆ど閉塞せずに流動した。剪断速度 $1000 \text{ s}^{-1}$ における試料の粘度とマイクロチャネルの通過時間の相関を検討したところ(Fig. 4)、HbV分散液の粘度と通過時間(流量の逆数)に比例関係が成立した。直線の式を最小二乗法で求めると $Y = 12.1X$ ( $Y$ :通過時間(sec/100  $\mu\text{L}$ )、 $X$ :粘度( $\text{mPa} \cdot \text{s}$ )、 $R^2 = 0.9728$ )であり、Poiseuilleの法則に従った。

## D. 考察

リン脂質小胞体(リポソーム)が水溶性高分子と相互作用して凝集体を形成する現象については多くの報告例があるが、その殆どが希薄溶液の濁度または光散乱の計測で観察しているに過ぎない。HbVは、表面に修飾されたポリエチレングリコール(PEG)鎖の立体反発効果によって、血漿中においても均一な分散系を形成する。しかし、HbVは極めて高濃度の分散系であるため(固形分濃度:16 g/dL、占有体積:40 vol%)、これが凝集した場合は、凝集体が溶液全体に三次元ネットワークを形成し、これが固体的性質を与え、粘度及び貯蔵弾性率 $G'$ の

増大として観察されると考えられる。赤血球も可逆的な凝集体を形成し、40~45 vol%の体積を占有するので、これが血液を非ニュートン流体とする主要な因子であり、また血液に水溶性高分子が混合されると赤血球が凝集し、血液粘度、血行動態、組織酸素化に影響を及ぼすことが知られている。従って、HbV分散液についても同様のレオロジー特性の解析を行った。

HbV-rHSA分散液はほぼニュートン流体の特性を示し、高剪断速度における粘度は血液とほぼ同等であった(Fig. 1A)。HbVの表面に修飾されたPEG鎖がアルブミン中の分散安定度に寄与していると考えられる<sup>3)</sup>。対照的にHES、DEX、MFGに分散させたHbVは、低剪断速度で高い粘度を示し剪断速度が高くなるに従い粘度が低下するShear-thinningを示した(Fig. 1A)。これは凝集分散系に特徴的な粘度挙動である。またHES(Mw. 70, 130, 200, 670 kDa)について、凝集体形成には分子量依存性が存在し、高分子量になるほど高粘度を示した。分子量が最も小さいHES<sub>70</sub>に分散させた場合には血液と同等であった。現行のPEG修飾の条件は、血漿中での分散安定度を維持するには十分と思われる。しかし、本研究で代用血漿剤によってはPEG修飾が施されてもHbVの凝集体が形成してしまうことが明らかとなった。

リポソーム凝集の機序については、幾つかの理論が提唱されている。(i) 水溶性高分子鎖が粒子表面に吸着することにより粒子間を架橋する、(ii) 水溶性高分子がリポソーム表面から水和水を奪い、リポソームが溶液から排除される、また、(iii) リポソームの水和領域から高分子が排除されるため、リポソーム粒子間に形成される空間からも高分子が排除されることになり、バルク溶液とリポソーム粒子間の溶液との間に浸透圧差が生じ、この浸透圧差を小さくするために凝集が促進されて粒子間距離が短くなると言われている。特に(iii)の場合、粒子間に形成される空間の大きさと高分子の大きさの相対的寸法差が重要と成る。HES、DEX、MFG

には分岐構造があるので、球状蛋白質のrHSAに比較してより低密度で排除体積の大きい構造をしていると考えられる。DEXは水中でコイル状の分子構造をとることが報告されている。MFGは、修飾されたコハク酸の静電反発によって拡大した分子構造をとる。この様な高分子はリポソーム表面から排除され易く、リポソーム凝集が促進されると考えられる。また、(i)の機序でも、直鎖状構造の高分子が粒子間を架橋し易いと考えられる。一方、HESの分子構造は分岐状であり、その形は球状に近いので、排除体積はDEX、MFGと比較して小さいと考えられる。しかし、高分子量体になるに従い、排除体積も大きくなるので、リポソーム凝集が促進される。我々は各種代用血漿剤に含まれる水溶性高分子の慣性半径の違いから凝集度を説明できると考えており、現在その解析を進めている。また、水溶性高分子による凝集を抑制する為に、現行よりも鎖長の長いPEG鎖をHbV表面に修飾し、粒子間の立体反発力を高めることも可能と考えられる。事実、我々はリポソームの表面に修飾するPEG鎖の分子量を大きくさせると、リポソームの分散安定性が増加することを報告している。

実際にHbVの投与を行う場合には、①代用血漿剤を投与した後に生理食塩水に分散されたHbVを投与、或いは②濃厚な代用血漿剤(例:25%アルブミン溶液)があればこれをHbV分散液に添加して同時に投与([Hb]=8.6 g/dL)するなどが想定される。血液交換率は50%程度と想定され、HbV、代用血漿剤ともに更に希釈されるので凝集は低減されると考えられる。事実、DEX、HES<sub>670</sub>、MFGに分散させたHbVは血液よりも高い粘度を示したが、血液と体積比1:1で混合すると全ての剪断速度で粘度が減少した(Fig. 1B)。更に血液の混合比の増大に伴い、粘度およびG'が減少する傾向が観測された(Fig. 2)。HbVと代用血漿剤の双方が血液で希釈され、凝集の低減が起きることが明らかとなった。

次に、各種代用血漿剤に分散させたHbVと血液の混合系がマイクロチャネルを流動する挙動を

MC-FANを用いて検討した。血液のマイクロチャネルの通過時間は、赤血球の変形能、白血球による流路の塞栓および血栓による塞栓などが影響すると考えられる。このうち、赤血球の変形能はレオメータでの粘度測定にも影響を及ぼすが、流路の塞栓はマイクロチャネルを持つMC-FANでしか測定できない項目である。我々は各種代用血漿剤に分散させたHbVがマイクロチャネルを一切塞栓することなく流動し、100  $\mu$ Lの通過時間と粘度に比例関係が得られ、これがPoiseuillesの法則に従っていることを報告してきた。この関係が成り立つのは流路の塞栓が無い場合に限られる。仮に流路の塞栓が顕著であれば、通過時間は大きく延長して、粘度との比例関係は成立しない筈である。結果より、各種代用血漿剤に分散させたHbVと血液の混合液の通過時間は、全例が粘度に比例した (Fig. 4)。よって各種代用血漿剤に分散させたHbVは血液の流路塞栓因子に影響を及ぼさないと考えられる。事実、我々はラットを用いた60%血液交換試験において、各種代用血漿剤を投与後、HbVによる蘇生を行ったが、凝集体による影響は全く見られず、全例が生存した。この理由として、代用血漿剤、血液、HbVが互いに希釈され、凝集が低減したこと、凝集体が血液の剪断速度に応じて可逆的に形成・解離したこと、そして血液中の塞栓因子に影響が無かったことなどが考えられる。

最近、幾つかの研究グループが、高粘性流体が血管壁に対し、より高い剪断応力を与えるため血管拡張分子を誘導させ結果的に末梢血流が改善されると主張している。ErmiらはHbVをHES<sub>200</sub>あるいはDEX (Mw. 70 kDa)に分散させ、ハムスターの循環血液量の40%を交換し、毛細血管の塞栓が無いことを確認し、むしろ有茎皮弁の虚血領域の微小循環を改善する効果があることを見出した。高粘性流体では末梢毛細管により均一に圧力が伝播し、血液をより均一に輸送し、有効毛細管密度(Functional Capillary Density)の向上が期待できる。この点に関しては、HbVは代用血漿剤の併用によって特徴的な

レオロジー特性を示し、またその調節も可能であるので、輸血代替以外の臨床応用にも利用できる可能性がある。今後は、HbVと一連の代用血漿剤を併用したときの安全性について詳細を確認するとともに、凝集の機序を明らかにして行く計画である。

#### D. 結論

HbVを各種代用血漿剤に分散させた溶液と血液の混合系に関して、レオロジー特性および凝集の可逆性について検討した。HES<sub>70, 130</sub>, rHSAに分散させたHbVと血液の混合液の粘度は血液と同等もしくはそれ以下であった。DEX、高分子量HES、MFGではHbVは凝集するが、血液中においても外力に依存して瞬時に解離すると共に、血液混合比の増大に伴い凝集の形成は低減することが確認された。HbV分散液と血液の混合系のマイクロチャネルの通過時間は単純に粘度に比例し、流路の塞栓は殆ど無かったことからHbV凝集体は血液の流路の塞栓因子に影響を与えないと考えられた。凝集体生起の生体への影響を確認する必要があるが、HbV分散液は分散媒との組み合わせでレオロジー特性を調節することができるので、輸血代替以外の用途に拡大する可能性もある。

(謝辞) 本研究の推進にあたり、高折 益彦 先生(東宝塚さとう病院)、武岡 真司 教授(早大理工学術院)の協力を得た。



## 2. Hb小胞体の粒子サイズの精密評価、静的構造と拡散ダイナミクス

### A. 研究目的

Hb小胞体(HbV)は、従来のカプセル型Hb(liposome-encapsulated Hb)とは本質的に異なり、高純度Hb溶液が高濃度に内包され、脂質被覆層数も少ないという構造上の特徴を有する。動物投与試験では、高いHb濃度によって十分な酸素運搬効率を示すこと、蓄積性が無く代謝排泄が容易であること、NO結合が遅延され血管収縮を生起しないこと等が証明されてきた。従来のHbVの構造解析法として、希薄系の粒径分布分析(簡易型の動的光散乱)、電顕観察などが用いられ、理論的な粒子体積、成分組成と分子占有面積から、内水相のHb濃度や被覆層数を計算、予測したが、半定量的議論の範疇に留まっていた。

本研究では、動的光散乱法(DLS)と小角散乱法(SAXS)の最新の測定・分析手法を適用し、(1) HbVの粒子サイズとサイズ分布の精密評価、(2) HbVの内部構造や内包Hbの溶存状態(蛋白質間相互作用ポテンシャルや分子内の微細構造)、(3) 濃厚系における粒子拡散ダイナミクスと分散安定性の関連性など、これまで定量分析が困難であった問題を精緻に検討した。

### B. 実験方法

#### 1. 測定試料

HbVと、Hbを内包しない空の小胞体分散液は、既報に従って調製した。動的光散乱法と小角散乱法の測定方法や目的に応じ、適宜、生理食塩水溶液で希釈し、濃度を調整した。

#### 2. 小角X線散乱

小角散乱測定にはラボ仕様小角散乱装置として世界的に最高の小角分解能と精度を誇るSAXSess (AntonPaar社)を用いた。 $0.06 \leq q/\text{nm}^{-1} \leq 10$ の散乱ベクトル領域のデータを分析に用いた。

### 3. 動的光散乱

HbVの粒子サイズ及びサイズ分布の精密評価には、シングルモード光学ファイバーとALV社製のシングルフォトン検出器を装備する動的光散乱ゴオニオメーターを用いた。温度制御され、デカリン溶媒で満たされたインデックスマッチバス、レーザー発生源はVerdi社 V5ダイオードレーザーで波長 432 nm、最高出力5 Wである。データの取得はALV 5000 マルチプルタウデジタルコリレータを用い、散乱強度相関関数の計算にはALV-5000/Eソフトウェアパッケージを用いた。

### 4. 超薄層セル動的光散乱

サブミクロン粒子サイズの濃厚コロイド系に特有の多重散乱の問題を克服し、試料の共同拡散過程を観測するために、濃厚HbV系に対し、超薄層セルを用いた動的光散乱測定を行った。セル厚は可変であり、15, 50, 100 mmにセットすることが出来る。波長 630 nmのHeNeレーザーを用い、強度自己相関測定にはシングルモード光学ファイバー、光電子増倍管とALV 5000 マルチプルタウデジタルコリレータを用いた。現状の光学系では15°から45°の前方散乱のみの測定が可能である。

### C. 実験結果と考察

#### 1. HbVの粒子径と分布の定量評価

Fig. 1にHbV希薄分散液系に対する動的光散乱データを示す。Fig. 5aは、擬似交差相関法で得られた強度相関関数 $g_2(t)$ を表す。測定はストック分散液を1600倍希釈し、構造因子 $S(q)=1$ 、流体力学関数 $H(q)=1$ を十分に満たす濃度条件で行った。装置性能及び分析法に起因するよる粒子サイズ分布評価の広がり誤差を確認するため、比較系として単分散に近いマイクロスフィア(Polysciences Inc., 直径公証値0.209  $\mu\text{m}$ )の希薄分散液を同時に測定した。Fig. 5bに散乱電場相関関数 $g_1(t)$ (または動的構造因子)に対し、間接逆ラプラス変換を適用するORT(Optimized Regularization Technique)分析によ

って計算されたHbV及びマイクロスフィアのサイズ分布関数を示す。分布関数は体積分布に換算してある。マイクロスフィアに対するORT分析の結果は装置性能によるサイズ分布評価の広がり誤差を実質的に無視できることを示している。単分散理想系に近いマイクロスフィアに比較すれば、HbVのサイズ分布は広いことはFig. 5bのデータから明らかであるが、体積分布に換算した平均流体力学直径は238nm、標準偏差は20nmと定量評価され、自己組織化を利用して階層的に構築された粒子系としては非常に狭いサイズ分布と狙い通りの平均粒子径に制御されていることが確認された。

## 2. Hbを内包する小胞体膜の内部構造

Fig. 6にHbを含有しない空の小胞体の濃厚分散液( [脂質] = 6g/dL )の小角X線散乱データを示す。散乱データは散乱ベクトル長 $q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$ の関数として得られる。 $\lambda$ はX線(K $\alpha$ 線)の波長、 $\theta$ は全散乱角である。Fig. 6aは、光学系補正前の小角広角同時測定の実験データである。低温領域( $T = 4.0^\circ\text{C}$ )においても図中に矢印で示した $q \sim 15 \text{ nm}^{-1}$  ( $d \sim 0.42 \text{ nm}$ )に $\alpha$ ゲルピークは観測されないことを確認した。DPPCの $\alpha$ ゲル-液晶転移温度は $41^\circ\text{C}$ であるが、添加されたコレステロールの効果によって、転移温度が消失し、 $41^\circ\text{C}$ 以下の低温領域においても脂質膜内部の構造は液晶状態であることを示している。

次に、小角散乱データ $I(q)$  (Fig. 6b)の濃度依存性を確認したところ、濃度で規格化した散乱曲線 $I(q)/c$ はデータの精度内で極めてよく良く一致し、ベシクル間相互作用の効果、すなわち粒子間の構造因子 $S(q)^{\text{inter}}$ の効果は測定可能な散乱ベクトル領域内には現れていないことが分かる(ベシクル間の相互作用に剛体球相互作用を仮定すると予想される $S(q)^{\text{inter}}$ の相関ピーク位置は $q = 0.025 \text{ nm}^{-1}$ となり、小角分解能外にある)。一方、散乱曲線上に脂質膜積層による干渉性散乱、すなわち粒子内の構造因子 $S(q)^{\text{intra}}$ の効果は全く見られない。脂質多重

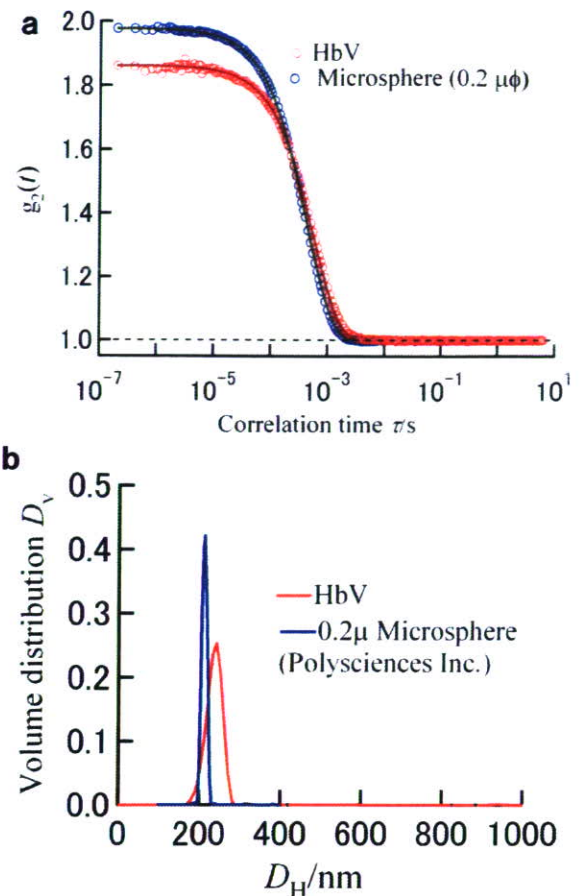
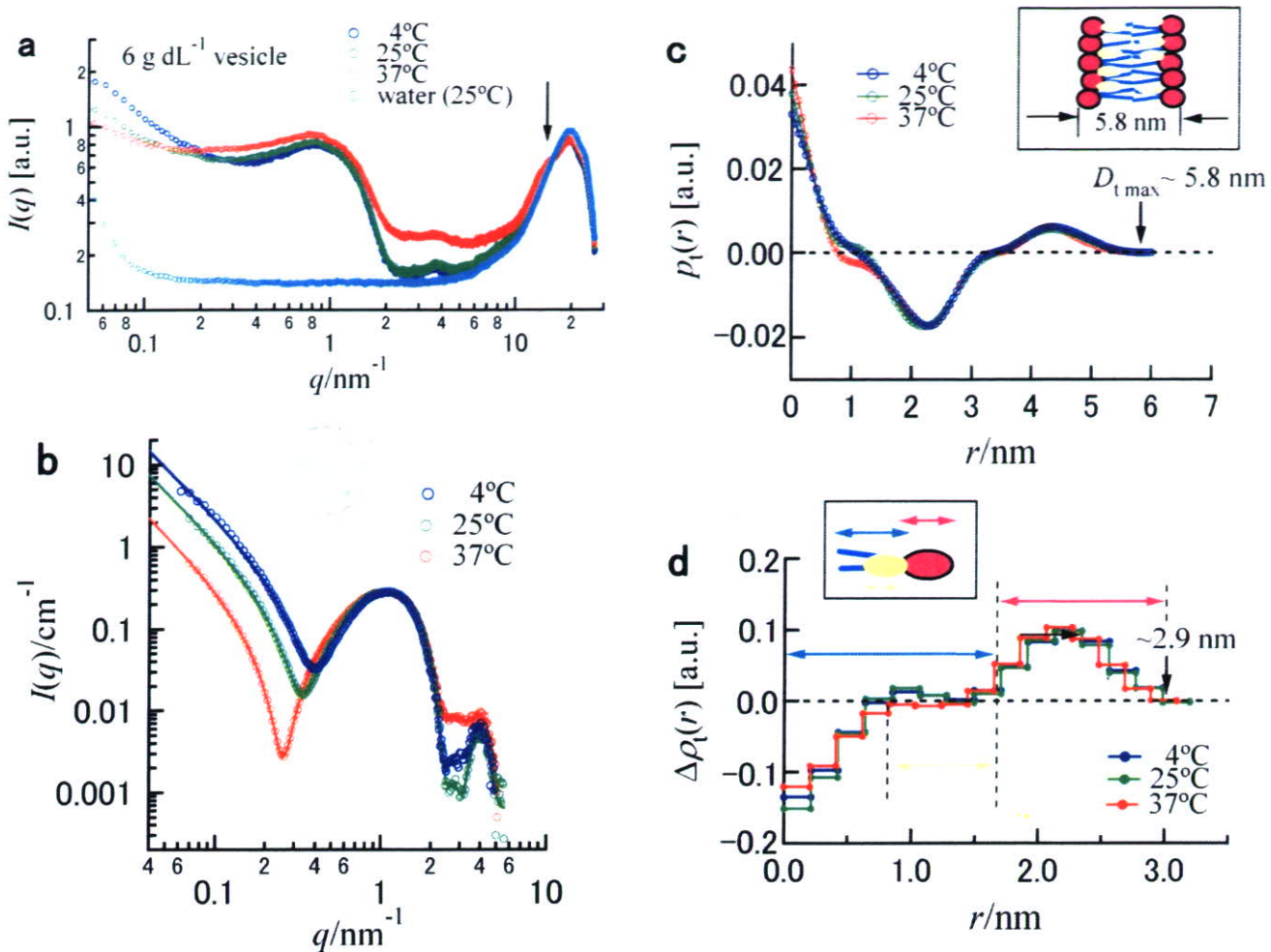


Fig. 5 HbV 及び単分散マイクロスフィア希薄分散液の動的散光データと ORT 法によるサイズ分布分析。

層が形成されれば、膜間距離 $d$ に対し、 $q^* = 2\pi/d$ の位置に $S(q)^{\text{intra}}$ のピークが現れる。また、平均積総数が2,3枚程度であっても $S(q)^{\text{intra}}$ の影響によって、 $I(q)$ の小角領域に波打ち、または、編曲点のような挙動が現れると予想される。しかし、実測の $I(q)$ には全くそのような挙動が見られない。従って、平均被覆枚数は1に近い、すなわち、単層膜ベシクルが形成されていると判断することが可能である。

Fig. 6cに、bで示した散乱曲線 $I(q)$ からIFT法によって計算した脂質膜厚み方向の二体間距離分布関数 $p(r)$ を示す。距離 $r$ が大きくなるに従い、正 $\rightarrow$ 負 $\rightarrow$ 正の挙動が見られたが、これは脂質膜内部の電子密度が水の電子密度と比して高い部分と低い部分が交互に存在することに起因する。また、Fig. 6c内に矢印で示したように、脂質膜の厚みが約5.8 nmであることが読み取れる。ここで、表面修飾





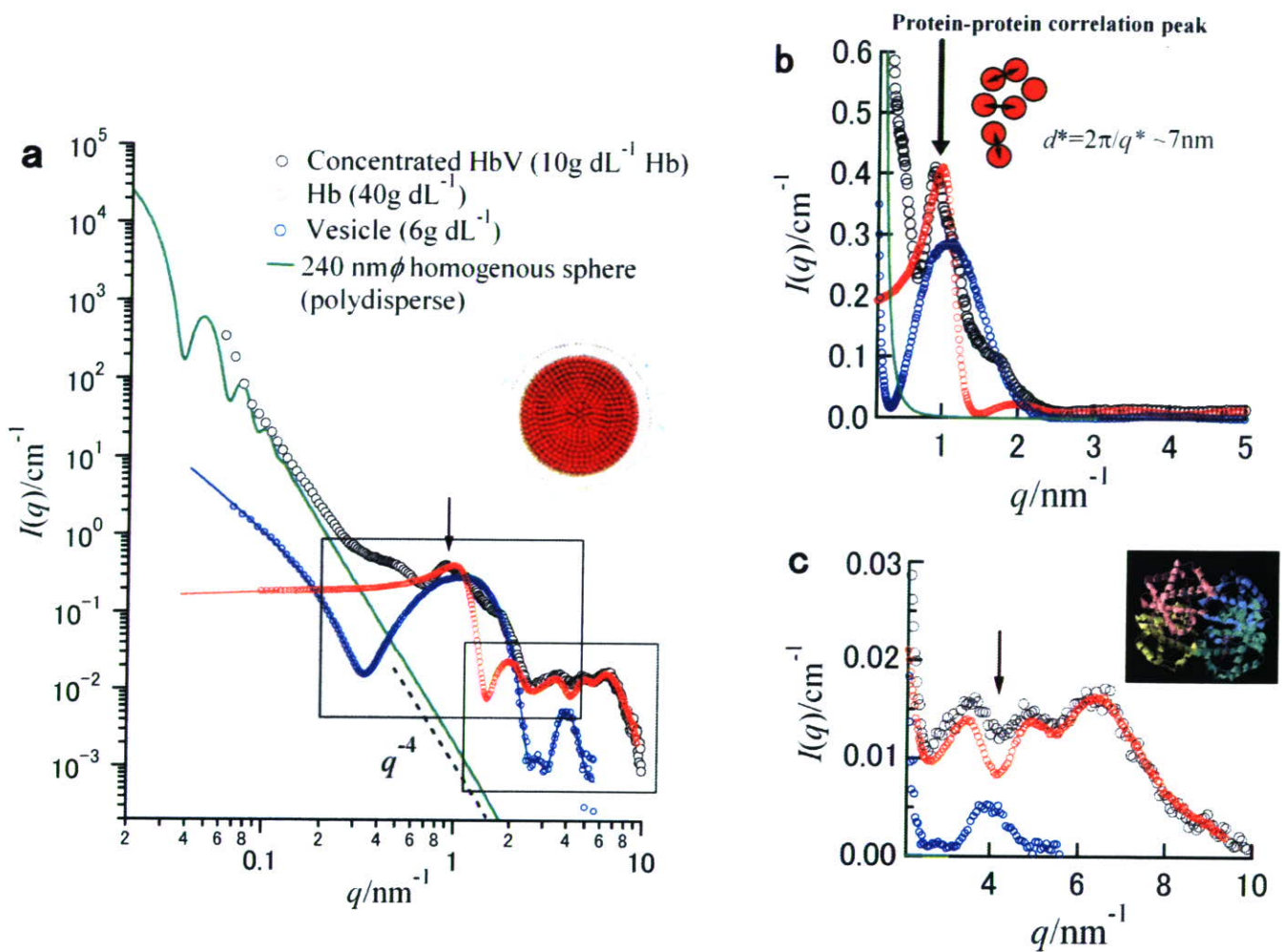
**Fig. 6** Hb 溶液を内包させる為の空のリン脂質小胞体分散液の小角 X 線散乱データ。(a)小角広角 X 線散乱曲線 (光学系補正無し)、(b)小角散乱曲線、(c)脂質膜厚み方向の二体間距離分布関数  $p_1(r)$ 、(d)脂質膜厚み方向の電子密度プロファイル  $\Delta\rho_1(r)$ 。

PEG鎖の寄与は、PEG鎖の低密度のため、データにほとんど現れていない。従って、厚み5.8 nmは表面修飾PEG鎖の広がりを含まない脂質膜の厚みであることに注意が必要である。さらに、 $p_1(r)$ を分解(deconvolute)して得た電子密度プロファイル  $\Delta\rho_1(r)$  (**Fig. 6d**)から、炭化水素基 (疎水部) の脂質膜内部での長さ約1.7~1.8 nm、コレステロール分子の疎水親水界面付近への局在と、親水頭部の大きさ約1.1nm が明らかになった。

本研究で得られた描像はモデル計算や構造モデルのパラメータフィッティングに基づくデータの分析によって求めたものではなく、逆FOURIER変換手法によってモデルフリーにデータを実空間に焼き直して得た、確度の高い定量情報であることを強調したい。

### 3. HbVの内部構造と内包Hbの溶存状態

**Fig. 7**に濃厚HbV分散液([Hb] = 10g/dL)の小角X線散乱データを示す。散乱曲線の小角部分(散乱ベクトル $q$ の小さい領域)は、**Fig. 7a**に緑色の理論曲線で示したように、多分散性を考慮した平均半径120nmの球状粒子の散乱関数を用いて、DLSの結果と整合性良く説明できる。ここでHbV粒子が均一な内部電子密度分布を有する球状粒子であると仮定すると、実測の散乱曲線は、**Fig. 7a**に示した緑色の理論散乱曲線に従い、 $q^{-4}$ に比例して、急速に減少するはずである。しかし、実際にはHbV散乱曲線の広角部分にはHbV内部の電子密度揺らぎに起因する特徴的な余剰散乱が観測される。**Fig. 7b**に示した空間スケール領域には、内包された濃



**Fig. 7** 濃厚 HbV 分散液の小角 X 線散乱データ。パネル **a** にはバルクの濃厚 Hb 溶液( $c = 40\text{g/dL}$ )と既に Fig. 2b に示したベシクル分散液の散乱曲線も同時に表示した。パネル **b** と **c** は、パネル **a** に 2 つの四角で示した領域の拡大図であり、それぞれ、内包 Hb 分子間の相互作用ピークと Hb 分子内微細構造を反映する。

濃厚 Hb 溶液の構造因子  $S(q)$  の効果が明確に現れている。内包濃厚 Hb 溶液の  $S(q)$  のピーク位置、ピーク高さおよび広がり、バルクの濃厚 Hb 溶液 ( $c = 40\text{g/dL}$ ) の  $S(q)$  のそれらと非常に近いことが解った。ピーク位置から近似的に評価した粒子間距離は  $7\text{nm}$  で、Hb 分子の最大直径  $\sim 6.5\text{nm}$  に近い。バルクの Hb 溶液中と同様、HbV 内水相の Hb 分子は剛体球相互作用に近い振舞いをする事が分かる。

一方、Fig. 7c に示された小空間スケール領域の散乱曲線は、内包 Hb 分子の分子内微細構造を反映する。 $q = 10\text{nm}^{-1}$  の広角領域に至るまで、内包 Hb 溶液とバルクの Hb 溶液散乱曲線が完全に一致する。このことは、HbV 内水相中とバルク溶液中の

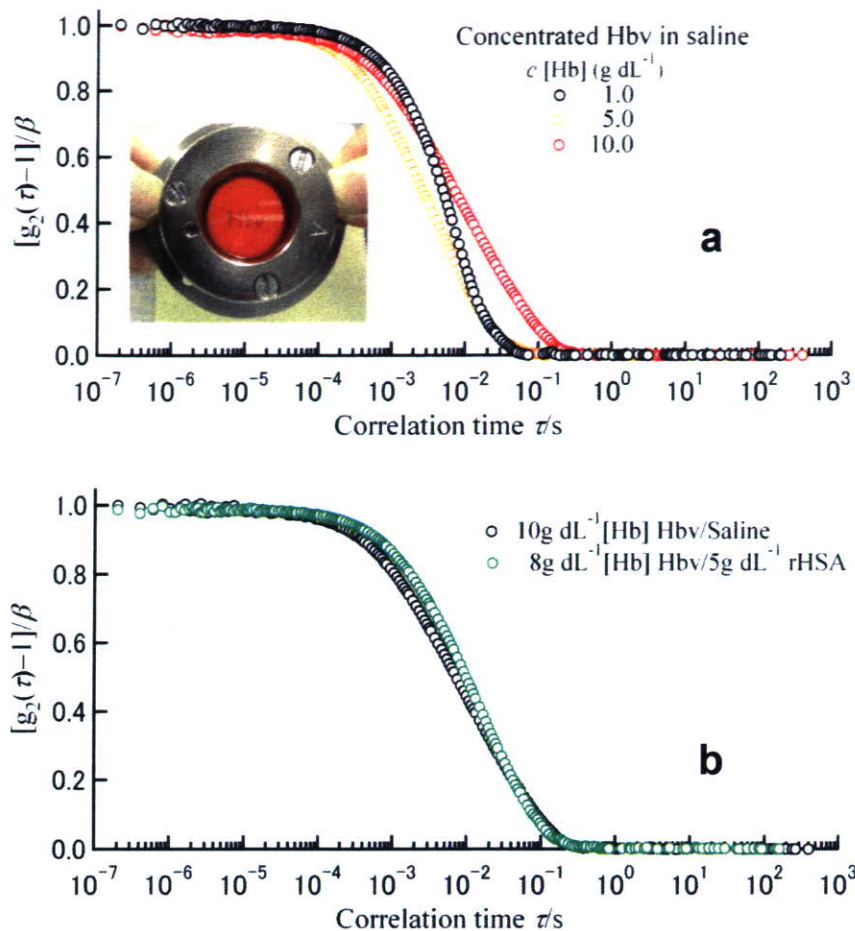
Hb の分子内微細構造が同一であることを強く示唆する。

これら全ての結果は、HbV 内水相中の Hb 間相互作用ポテンシャルは、閉じ込めの効果をほとんど受けておらず、バルクの Hb 溶液中とほとんど同一であること、Hb の分子内微細構造も同様に製造工程や内水相閉じ込めの効果を受けていないことを証明するものである。

#### 4. 濃厚 HbV 分散液中の拡散ダイナミクス

濃厚 HbV 分散液中の HbV の拡散ダイナミクスを観測するためには、サブミクロン粒子サイズの濃厚コロイド系に特有の多重散乱の問題を克服する





**Fig. 8** 超薄層セルを用いた濃厚HbV分散液の動的散乱測定。(a) 生理食塩水に分散させたHbV ([Hb]=1, 5, 10g/dL)、(b) 5g/dL rHSA 溶液に分散させたHbV([Hb]=8g/dL)。

必要がある。そこで、超薄層セルを用いた動的散乱測定を試みた。セル厚は50  $\mu\text{m}$ を選択した。**Fig. 8a**に、生理食塩水に分散させたHbVの規格化強度相関関数 $[g_2(t)-1]/\beta$ の濃度依存性を示す([Hb]=1, 5, 10g/dL)。ここで、 $\beta$ は動的散乱法による相関関数測定のインターセプトである。

**Fig. 8a**に挿入した写真が示すように、薄層セルに封入した濃厚HbV分散液は、あたかも赤いセロファンのように透明で、セルの反対側を透過して目視することが可能である。薄層セルによって、散乱体積を極限まで減少させて多重散乱や吸収の効果を克服、散乱強度相関関数を得ることに成功した。**Fig. 8a**から、濃度の増加と共に、HbV粒子の共同拡散が速くなることが解る。これは剛体球相互作用を含む全ての反駁的相互作用を示すコロ

イド粒子系に共通の挙動である。しかし、[Hb]=10g/dL (HbVの体積分率 $\sim 0.4$ )のような高濃度域になると逆に共同拡散ダイナミクスは濃度の増加と共に遅くなっている。これは、粒子濃度の増加に伴って、粒子間の平均距離が減少、衝突頻度が上昇し、HbV粒子間の弱い親和相互作用ポテンシャルによって、拡散ダイナミクスが遅延されるためと推測される。超薄層セルを用いた動的散乱法は、サブミクロン粒子サイズの濃厚コロイド系の拡散ダイナミクスの観測に優れた方法であるが、ヘテロサイン信号の発生や閉じ込め効果など、データの定量的解釈にはいくつかの注意が必要である。従って、後者の挙動に対する解釈は、現時点での推測に留まる。この点に関しては三次元交差相関法を用いた更なる検討が必要である。

**Fig. 8b**に、生理食塩水に分散させたHbV ([Hb]=10g/dL)と5g/dLのリコンビナントヒトアルブミン(rHSA)溶液に分散させたHbV([Hb]= 8.6 g/dL)の強度相関関数の比較を示す。rHSAの添加によって枯渇相互作用(depletion interaction)によるHbV粒子間の引力相互作用が誘発されると予想されたが、実際にはrHSA溶液に分散させた場合でもHbV粒子の共同拡散ダイナミクスの顕著なスローダウンは観測されず、rHSAの存在はHbV粒子の共同拡散ダイナミクスにほとんど影響を与えていないことが確認された。

**Fig. 8a,b**に示した全ての強度相関関数 $g_2(t)$ は、シングルステップの緩和挙動を示し、ベースラインの1に素早く漸近する。この事実は、濃厚HbV分散液系中で長寿命のクラスター形成などは起こらず、エルゴード性(=簡単のため、理解しやすいイメージとしては、コロイド粒子が全空間内を自由拡散できる安定流体としての性質)を保持している証拠であり、HbV分散液の高い分散安定性と長期の保存安定性を、粒子の拡散ダイナミクスの見地から支持する結果と言える。

#### D. 結論

Hb小胞体の(i) 粒子サイズとサイズ分布、(ii) 内部構造の詳細を含む静的構造、(iii) 粒子拡散ダイナミクスを精密評価するため、HbV分散液及び、モデル系として用意したHbを内包しないベシクル分散液に対し、動的光散乱法(DLS)と小角散乱法(SAXS)の最新の測定・分析法を適用した。動的光散乱法によって得たHbV希薄分散液系の強度相関関数 $g_2(t)$ に対するORT分析(逆ラプラス変換法)から、体積分布に換算した平均流体力学直径238 nm、標準偏差20 nmを得た。ベシクル分散液の小角散乱データの分析から、被覆枚数は平均で1、脂質膜の厚み5.8 nm (PEG層を含まず)が判明し、さらに脂質膜中の電子密度プロファイルを得て複合脂質膜の内部構造の詳細を明らかにした。一方、HbVのX線散乱曲線の小角部分は多分散性を考慮

した平均半径120nmの球状粒子の散乱関数を用いDLSの結果と整合性良く説明出来るが、広角部分にはHbV内部の電子密度揺らぎに起因する余剰散乱が観測されることを見出した。この余剰散乱の検討から、HbV内水相中のHb間相互作用ポテンシャルは閉じ込めの効果をほとんど受けておらず、バルクのHb溶液中とほとんど同一であること、Hbの分子内微細構造も同様に製造工程や内水相に濃度高く閉じ込めてあっても何ら蛋白変性等の影響を受けていないことを確認した。濃厚HbV分散液に関し、特殊な超薄膜セルを用いて多重散乱の影響を除去、希釈無しに初めてHbV粒子の拡散ダイナミクスの観測に成功し、生理食塩水及び濃度5g/dLのrHSA水溶液に分散させた濃厚HbV([Hb]= 10 g/dL, 体積分率 ~ 0.4)のエルゴード性を証明した。この事実は、HbVの高い分散安定性を粒子拡散の動的過程という見地から証明するものである。

(謝辞)

本研究の推進にあたり、Prof. Otto Glatter (Univ. of Graz, Austria)の協力を得た。記して謝意を表す。

### 3. リン脂質小胞体表面の陰性荷電と補体活性の関連

#### A. 研究目的

酸性リン脂質を含有する従来のアニオン性小胞体は補体系を活性化する因子として知られ、小胞体表面の陰性荷電基と補体成分(C1q)の静電相互作用が補体活性の原因と考えられている。一方、Hb小胞体は酸性脂質としてカルボン酸型脂質を含有し、これまでの動物投与試験やヒト血液を対象とする*in vitro*混合試験では補体系を含む免疫系の顕著な活性化を認めないことが確認されている(H15~17年 人工赤血球の安全性向上に関する研究 北海道赤十字血液センター 分担報告書)。

本研究では酸性リン脂質あるいはカルボン酸型脂質を含有する小胞体の表面電荷特性を比較解析し、表面電荷による静電的相互作用と陰性荷電基構造のどちらが補体活性化など生体反応に関与する因子であるか知見を得ることを目的とした。結果は陰性荷電基構造が主因子であることを示し、Hb小胞体に使用しているカルボン酸型脂質の特長として報告する。

#### B. 研究方法

##### 1. 試料

次の5種脂質を実験に使用した。

**PC:** 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

**CH:** cholesterol

**PG:** 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol

**SA:** L-glutamic acid, *N*-(3-carboxy-1-oxopropyl)-, 1,5-dihexadecyl ester or 1,5-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSG)

**PEG-DSPE:** 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phospho-ethanol-amine-*N*-[monomethoxy poly(ethylene glycol) (5000)]

##### 2. 小胞体調製

脂質成分をt-ブチルアルコールに溶解させ(5 g/dL)、凍結乾燥して混合脂質粉末を調製した。得られた混合脂質粉末を10mMリン酸緩衝溶液(NaCl

20 mM, pH 7.4) で水和し、これをEXTRUDER®に加え、加圧しながらポリカーボネート製メンブレンフィルター(最終孔径: 0.2mm)を透過させ粒径を制御した。

##### 3. 物性値測定

得られた小胞体の粒子径は動的光散乱法(COLUTER submicron particle analyzer, N4SD, Coulter, Hiialeah, FL)により決定した(Table 2)。リン脂質濃度はコリンオキシダーゼ法(Phospholipid C Test Wako, 和光純薬製)により決定した。

**Table 2** Diameter of prepared vesicles containing various amounts of acidic lipid.

Acidic lipid (mol%)	Mean diameter ± SD (nm)	
	SA-vesicles	PG-vesicles
0 (PC-vesicles)	232 ± 60	232 ± 60
1	224 ± 58	230 ± 60
5	193 ± 50	196 ± 58
9	205 ± 40	204 ± 49
15	194 ± 45	199 ± 55
20	198 ± 52	194 ± 64

##### 4. ゼータ電位測定

小胞体分散液(脂質濃度: 2g/dL)を所定の緩衝液で希釈して試料とした(脂質濃度: 0.01g/dL)。小胞体の電気泳動移動度( $U_E$ )をレーザードップラー法により測定(Zeta-Sizer Nano ZS, Malvern Instruments)し、ヘンリー式(式1)により、ゼータ電位( $\zeta$ )を算出した。

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa R)}{3\eta} \quad (式1)$$

ここで  $\zeta$ : ゼータ電位、 $U_E$ : 電気泳動移動度、 $\varepsilon$ : 誘電率、 $\eta$ : 粘度、 $f(\kappa R)$ : ヘンリー関数

##### 5. 静電的相互作用モデル

小胞体表面の陰性荷電が媒介する静電相互作用のモデルとして、 $Ca^{2+}$ 、カチオン性オリゴマー(ペントリシン)、カチオン性ポリマー(ポリ-L-リシン)



を所定濃度で小胞体分散液に添加し、ゼータ電位の変動を測定した。

## 6. 投与試験

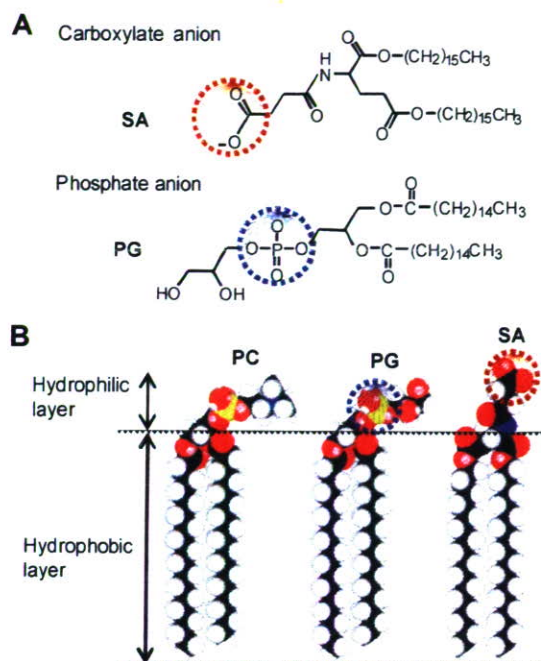
雄性Wistarラット(体重250±20 g)に対し、エーテル自発呼吸麻醉下、尾静脈に挿入した留置針を介して試料を投与した(投与量: 5.6 mL/kg、投与速度: 1mL/min)。投与後覚醒させ、1ないし24時間後に血液を採取し、遠心分離(1×10<sup>3</sup> g, 10 min)により血球成分を除去。続いて超遠心分離(3×10<sup>5</sup> g, 30 min)により小胞体を除去した。得られた試料について、血清補体価(CH50)の測定をBML社に依頼した。

## C. 研究結果・考察

### 1. 試料

本研究で比較した2種の酸性脂質をFig. 9に示す。SAとPGは解離基として各々カルボン酸とリン酸を有している(Fig. 9A)。CPKモデルによる脂質の分子長の比較により、これらの解離基はリン脂質小胞体の表面付近に配置されると考えられる(Fig. 9B)。酸性脂質の導入量を1~20mol%で変化させて調製した小胞体の粒子径は、フィルターの最終孔径の0.2mm付近に制御され、SAとPGで相違を認めない(Table 2)。

酸性脂質の導入量が1mol%以下では小胞体の凝集性が高く、特に酸性脂質を導入していない小胞体(PC-vesicles)は一日以内に沈殿する。PC-vesiclesで30nm程度粒子径が大きいのは高い凝集性の影響と考えられる。通常、+20 mVないし-20mV以上のゼータ電位を有すコロイド粒子は粒子間静電反発により安定な分散体として存在するとされている。ゼータ電位はイオン強度やpHなど溶液条件により変動することを考慮する必要があるが、10mMリン酸緩衝液(pH 7.4, NaCl 20 mM)の条件では酸性脂質を5mol%以上導入すればこの条件が満たされる。



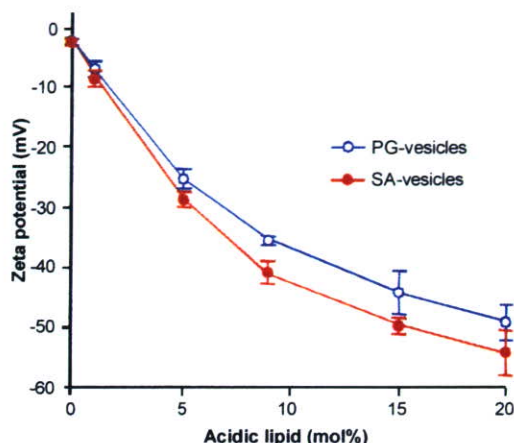
**Fig. 9.** Structure of anionic compounds for surface modification of vesicles. (A) Chemical structure of L-glutamic acid, *N*-(3-carboxy-1-oxopropyl)-, 1,5-dihexadecyl ester (SA) and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (PG). The focus of this study is the different acidic groups shown in the dotted circle. (B) The CPK model of SA and PG with 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PC) to estimate the distance of acidic groups from the membrane surface of PC. CPK models show the structure with minimized energy in molecular mechanistic calculation.

### 2. 小胞体のゼータ電位

Hb小胞体のような微粒子表面では対イオン濃度が上昇し、電気二重層を形成している。ゼータ電位は電気二重層の外層にある“すべり面”の電位であり、表面電位を反映する。酸性脂質の導入量の関数として小胞体のゼータ電位(pH7.4)を示したのがFig. 10である。PCとCHで構成される小胞体はほぼ中性表面を有する(ゼータ電位: -2.22±0.62mV)。SAとPGの導入量の増大に従いゼータ電位は陰性に増大し、小胞体表面の陰性荷電基を定量的に解析する指標としてゼータ電位が有効である。SA-vesiclesとPG-vesiclesを比較すると、何れの導入量においてもSA-vesiclesのゼータ電位が陰性に大きいことがわかる。Fig. 9Bで示したように、相対的な分子長から判断すると、SAのカルボキシ



ルアニオンはPGのリン酸アニオンに比較してリン脂質小胞体表面からわずかに突出した位置に配置されると見積られる。静電ポテンシャルは表面の電荷密度と距離で決まるため、小胞体表面からの垂直方向でのアニオン基の位置の相違がゼータ電位に反映されていると考えられる。この結果は、SAがPGと同等にリン脂質小胞体の負電荷成分としての性能を有していることを示す。



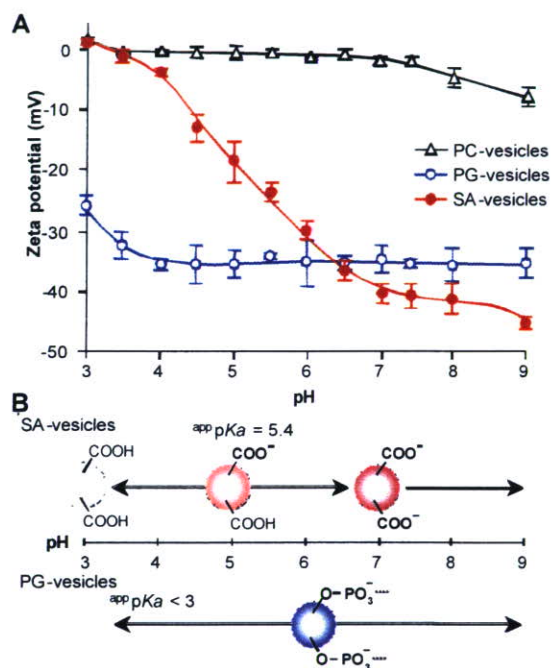
**Fig. 10.** Zeta potential of vesicles modified with SA (SA-vesicles) and PG (PG-vesicles) as a function of acidic lipid content. Zeta potentials were measured in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4, NaCl; 20 mM) at 37°C.

### 3. 酸性基の解離特性

解離基のイオン化状態の安定度は酸性度に影響され、酸性基の特性として重要である。酸性脂質を9 mol%含有するSA-vesiclesとPG-vesiclesについて、解離特性を調べた。Fig. 11Aに示すように、SA-vesiclesのゼータ電位は溶液pH (pH 3-7) に従い顕著な変動を示し、これはSAの解離状態を反映している。SAを含有していないPC-vesiclesはpHに依らずほぼ中性の表面を維持することからも、SAの特徴がゼータ電位に反映されていることがわかる。pHと酸性基のpKaの関係は、以下のHenderson-Hasselbalchの式(式2)により表される：

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[-\text{COO}^-]}{[-\text{COOH}]} \quad (\text{式2})$$

ゼータ電位が解離度と直線的に相関する条件で Fig. 11A のデータを式2により解析すると、SA-vesicles表面の見かけのpKaは5.4と算出される (Fig. 11B)。pH 7以上の条件では、SA-vesiclesのゼータ電位はほぼ一定であることから、pH7以上では大部分のカルボキシル基は解離していることがわかる。一方、PG-vesiclesのゼータ電位はpH4-9で範囲では殆ど変化なく、リン酸基が安定に解離しているためである。PG-vesiclesの見かけのpKaは3以下と見積もられた。この結果は、SA-vesiclesとPG-vesiclesの表面が各々SAの弱酸基とPGの強酸基の特性を反映し、すなわち酸性基固有の特徴により小胞体表面が標識されていることを示す。

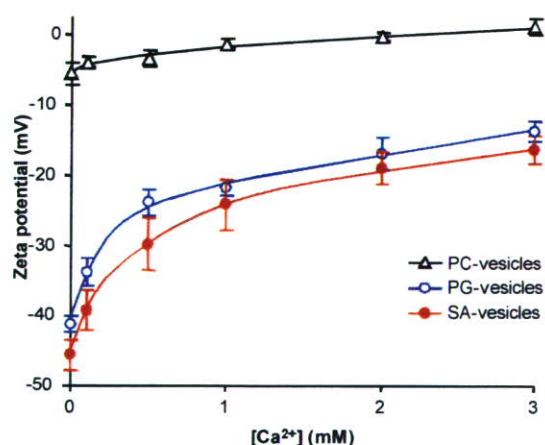


**Fig. 11.** Ionization state of acidic groups as a function of pH. (A) Zeta potential of vesicles (PC/CH, 1:1, molar ratio) (PC-vesicles), and vesicles containing 9 mol% of SA (SA-vesicles) or PG (PG-vesicles) at various pH. Zeta potentials were measured in 10 mM phosphate buffer (NaCl; 20 mM) at various pH (37°C). (B) Schematic representation of the ionization state of acidic groups with pH. The apparent pKas of SA-vesicles and PG-vesicles were calculated to be 5.4 and <3.

### 4. 静電的相互作用

通常血漿には2-3mMのCa<sup>2+</sup>が溶解している。Ca<sup>2+</sup>は生体成分の陰性荷電領域と結合するため、膜表面へのタンパク質の特異的結合など生体反応を媒

介することが知られている。特に、 $\text{Ca}^{2+}$ は酸性リン脂質に結合する。**Fig. 12**に示すように、小胞体の陰性荷電は $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を増加させることによって抑制されることから、 $\text{Ca}^{2+}$ が小胞体表面に結合していると考えられる。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を生理条件の3 mMまで増大しても、SA-vesiclesとPG-vesiclesのゼータ電位は各々 $-16.4 \pm 1.9\text{mV}$ と $-13.8 \pm 1.4\text{mV}$ であり、陰性荷電表面を維持していた。最近、ホスファチジン酸を含有する小胞体が特に強い $\text{Ca}^{2+}$ 親和性を示すとの報告があり、 $\text{Ca}^{2+}$ 結合により小胞体のゼータ電位が陰性から陽性に変化することが示されている。このため、本実験の焦点は、 $\text{Ca}^{2+}$ の結合においてSA-vesiclesとPG-vesiclesとの間に特異性を認めるかどうかという点、更に生理的濃度の $\text{Ca}^{2+}$ の存在下でSA-vesiclesの表面が陰性を維持しているかという点である。結果として、SA-vesiclesの表面は生理的濃度の $\text{Ca}^{2+}$ が存在しても陰性電荷を有し、加えて、SA-vesiclesとPG-vesiclesの間に相違を認めないことが明らかになった。



**Fig. 12.** Change in zeta potential of vesicles as a function of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. Vesicles were dispersed at 100 mg/mL in 10 mM HEPES buffer (pH 7.4, at 37°C) containing NaCl and  $\text{CaCl}_2$  (total: 20 mM). PC-vesicles: PC/ CH (1:1, molar ratio), SA-vesicles: PC/CH/SA (1:1:0.2, molar ratio), and PG-vesicles: PC/CH/PG (1:1:0.2, molar ratio).

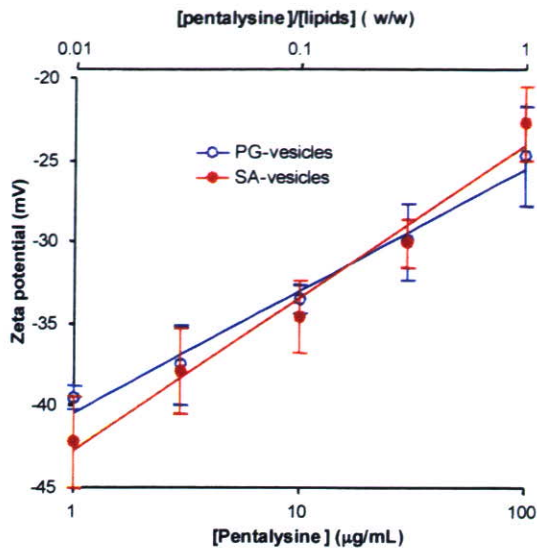
更なる静電的相互作用のモデルにはペントリシンとポリ-L-リシン(Mw. 15-30kDa)を用いた。リシ

ンのオリゴマーまたはポリマーは膜表面での塩基性オリゴマーや高分子量体の静電的相互作用のモデルとしてよく用いられている。**Fig. 13**に示すように、小胞体のゼータ電位はペントリシン濃度に対し一次関数的に変化した。SA-vesiclesとPG-vesiclesではペントリシン濃度の1/10につき9.3と7.4mVの傾きを持つ。PC-vesiclesでの傾きはわずか0.26mVであることから、酸性脂質の負電荷が塩基性ペントリシンとの相互作用の媒介となっていることがわかる。ゼータ電位の変化は塩基性ペプチドの結合を反映するため、ゼータ電位変化の同等の傾きは、SA-vesiclesとPG-vesicles表面への塩基性ペプチドの結合定数が同等であることを示す。

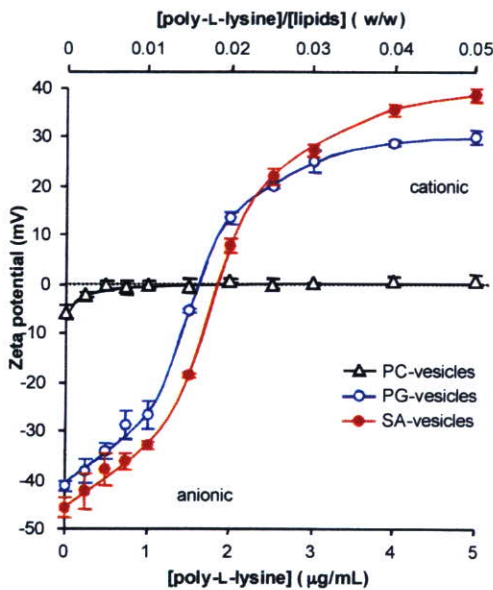
**Fig. 14**に示すように、ポリ-L-リシンとの相互作用により、これらの小胞体のゼータ電位は大幅に変化し、特に1.5-2g/mLのポリ-L-リシンの存在で陰性から陽性に変化した。一方、PC-vesiclesのゼータ電位の変化はごくわずかであり、酸性脂質が塩基性高分子との相互作用を媒介していることがわかる。この結果も、塩基性高分子に対するSA-vesiclesとPG-vesiclesの相互作用力が同等であることを示した。ここまでのゼータ電位と静電的相互作用に関する結果をまとめると、SA-vesiclesとPG-vesiclesの表面は生理的pHにおいて同等の陰性荷電を有し、かつ塩基性化合物との静電相互作用力も同等である。

C1qが酸性リン脂質を含有するアニオン性小胞体表面へのC1qの結合には静電的相互作用が関与することが示されている。小胞体表面の上の陰性荷電が補体活性化のために重要である場合には、SA-vesiclesとPG-vesiclesの両者とも同程度に補体系を活性化させるはずである。この点を明らかにするため、動物試験にて補体活性を調査することにした。





**Fig. 13.** Change in zeta potential of vesicles as a function of the concentration of basic oligomer (pentalysine). Vesicles were dispersed at 100 mg/mL in 10 mM HEPES buffer (pH 7.4, at 37°C, NaCl, 20 mM) containing various amount of pentalysine.

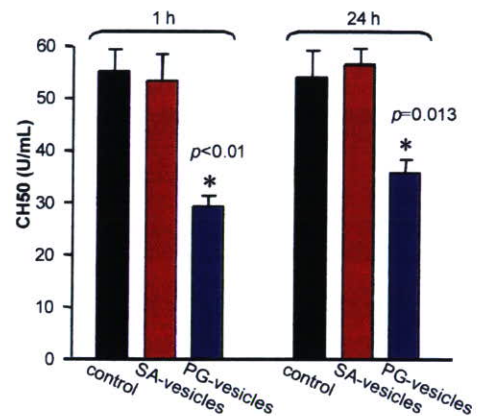


**Fig. 14.** Change in zeta potential of vesicles as a function of the concentration of basic macromolecule (poly L-lysine, Mw. 15-30 kDa). Vesicles were dispersed at 100 mg/mL in 10 mM HEPES buffer (pH 7.4, at 37°C, NaCl, 20 mM) containing various amount of poly L-lysine.

### 5. 補体活性

ラット尾静脈からSA-vesiclesまたはPG-vesiclesを同量投与し、1ないし24時間後のCH50レベルを測定するために血清を採取した。対照群は食塩水投与とした。投与1時間後の対照群、SA-vesicles投与群、およびPG-vesicles投与群のCH50値は各々55.1 ± 4.1 U/mL、53.2 ± 4.8 U/mL、および29.3 ± 1.6 U/mL

であった。投与後24時間では、対照群、SA-vesicles投与群、およびPG-vesicles投与群で各々54.0 ± 4.7 U/mL、56.5 ± 3.3 U/mL、35.8 ± 2.3 U/mL (Fig. 15)であった。対照群と比較し、PG-vesiclesを投与された群で認められるCH50の有意な低値は ( $p < 0.01$  at 1h,  $p = 0.013$  at 24h)、PG-vesicles投与による補体活性化により補体が消費されていることを示している。一方、SA-vesiclesを投与されたラットでは対照群と同等のCH50を示し、補体消費を認めなかった。図2~6で示したように、SA-vesiclesとPG-vesiclesのゼータ電位と静電的相互作用力は同等であることから、投与試験から得られた結果は小胞体表面の陰性荷電が必ずしも補体活性化の要因でなく、陰性荷電基の構造特異的な反応であることを強く示唆する。



**Fig. 15.** Comparison of the 50% hemolytic unit of complement (CH50) in rat serum at 1 or 24 h after infusion of saline (control), SA-vesicles, or PG-vesicles. CH50 value for PG-vesicles was significantly lower than that of the control ( $p < 0.01$  at 1 h,  $p = 0.013$  at 24 h), indicating the complement consumption in serum after activation.

### D. 結論

カルボン酸型脂質を含有する小胞体は、陰性荷電表面を有している。本研究により、小胞体表面の陰性荷電が必ずしも補体活性の要因でないことが示された。Hb小胞体の優れた血液適合性を支持する結果である。

## 4. Hb小胞体によるマウス摘出腸灌流試験

### A. 研究目的

これまでに、Hb小胞体(HbV)の投与が腸管機能に与える影響と安全性に関する基礎知見を得るため、マウス摘出小腸を用い、HbV灌流中に見られる腸管蠕動運動と、腸管上皮透過性の恒常性を観察し、最低2時間は腸管機能を維持できることを確認した。本手法を用いれば、将来的に摘出臓器の長時間保存を可能とするだけでなく、実験的手法として、摘出腸管の長時間の*ex vivo*観察を可能とし、腸管の生理機能について新しい知見が得られるものと期待される。そこで今回は一例として、細菌(*H. pylori*)感染したマウス腸管機能に与える影響を*ex vivo*観察した(本研究は、Prof. S. Collins, Dr. Presmyl Bercik, Dept. Gastroenterology, McMaster Univ., Canadaの共同研究として推進された)。

### B. 実験方法

雄性Balb/cマウスを最低4ヶ月間*H. Pyroli*感染させ、2週間抗生物質の投与をした後、更に2週間プロバイオティック細菌 *Lacidofil* (*Lactobacillus rhamnosus*, *L. acidophilus*)を経口投与した。腸管の透過性は、ピロリ菌を抗生物質で根絶してから2ヶ月経過後、摘出腸管を用いて観察した。

ketamin/xylazine腹腔内投与により麻酔状態とし、回腸末端の一部(3-5cm)を摘出、直ちに上腸間膜動脈の末端分岐にカニューレションし、HbV溶液、或は生理食塩水での動脈内灌流を開始した。Organ chamberに移し、腸管内腔を生理食塩水溶液で反口側方向に灌流した。吻側および肛側の灌流圧を外部トランスデューサで計測し、同時に腸管ループをビデオ録画し、画像解析を行った。灌流終了後、ホルマリン固定し、H/E染色を行い、組織病理学的検討を行った。物質透過性については、マーカーとして<sup>51</sup>Cr-EDTAおよび<sup>14</sup>C-mannitolを腸管内腔の灌流液に添加し、静脈血液をフラクションコレクターで回収、シンチレーションカウンターでマー

カー濃度を測定した。

### C. 結果および考察

ピロリ菌の感染により、慢性胃炎が引き起されたが、顕著な炎症反応は見られなかった。空腸マスト細胞数は感染の有無に関係なく同様であった。腸管壁の透過性は、ピロリ菌の感染によって上昇した。<sup>51</sup>Cr-EDTAの透過性は、ピロリ菌の根絶によって低減し、次いでプロバイオティック細菌の治療によって更に低減した。<sup>14</sup>C-mannitolの透過性には著変は認められなかった。

ピロリ菌の感染により、腸管壁の透過性が亢進し、これによって免疫系が更に細菌への暴露と食物の抗原負荷の増大となり、神経筋異常を引き起こしたと考えられる。バクテリアの根絶とプロバイオティック細菌による治療は、腸間壁の透過性を一部是正することに有効であることが明らかになった。

### D. 結論

腸管壁の物質透過性の計測は、*in vivo*実験ではまず不可能であり、*ex vivo*試験により、ある特定の標識化合物の透過性を追求する手法に限定される。この際、HbVを灌流液として用いることにより、腸管組織に充分量の酸素が供給され、*in vivo*と同等の腸管機能が再現され、長時間を要する実験にも対応できる。今回は腸内細菌の影響について検討を行ったが、今後様々な腸管機能について検討ができるものと期待される。臓器移植を想定した保存液としてのHbVの有効性についても検討を開始する予定である。

### E. 健康危険情報

該当なし

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. T. Sato, H. Sakai, K. Sou, E. Tsuchida. Molecular to