

- 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. Sinovcic, 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* (submitted).
 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)
 15. J. A. Plock, N. Rafatmehr, D. Sinovcic, Y. Harder, H. Sakai, E. Tsuchida, A. Banic, D. Erni. Hemoglobin vesicles improve wound healing and

- tissue survival in critically ischemic murine skin. (submitted).
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($\alpha,\alpha,\alpha,\alpha$ -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. M. Anraku, T. Kai, K. Taguchi, Y. Urata, E. Tsuchida, K. Kobayashi, M. Otagiri / Pharmacokinetic properties of hemoglobin-vesicles developed as a red blood cell substitutes / Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC) 2007 / 2007. 4. 22-25 / Amsterdam
2. 宮川賀仁、酒井宏水、佐藤 敦、堀之内宏久、武岡真司、高折益彦、小林紘一、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
3. 酒井宏水、堀之内宏久、小林紘一、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
4. 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
5. 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 / 2007.5.29-31 / 京都
6. 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.
7. 酒井宏水、佐藤敦、宮川賀仁、武岡真司、堀之内宏久、高折益彦、小林紘一、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
8. 田口和明、浦田由紀乃、安楽誠、甲斐俊哉、岩尾康範、土田英俊、小林紘一、小田切優樹 / 出血性ショック時におけるヘモグロビン小胞体の体内動態特性 / 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
9. 須崎裕典、酒井宏水、小林直樹、池田達彦、堀之内宏久、小林紘一、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
10. 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、小林紘一 / 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
11. 河野光智、堀之内宏久、泉陽太郎、酒井宏水、土田英俊、小林紘一 / 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
12. 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
13. 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
14. 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

15. 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／2007.6.14-15慶應義塾大学 三田キャンパス
16. 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／2007.5.29-31／東京
17. 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
18. 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.
19. 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.
20. 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 / Fukuoka International Congress Center.
21. 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 / 2007. Aug. 27-31 (Invited Lecture) / Fukuoka.
22. 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 / 2007. Aug. 27-31 / Fukuoka.
23. 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
24. 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
25. 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
26. K. Taguchi, Y. Urata, M. Anraku, T. Kai, Y. Iwao, K. Kobayashi, E. Tsuchida, M. Otagiri. / Possible utility of hemoglobin-vesicle for blood cell substitution pharmacokinetic properties in hemorrhagic shock rat model. / The 8th International Society for the Study of Xenobiotics (ISSX) / Oct. 8-12, 2007 / Sendai International Center
27. 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.
28. 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.

29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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
41. 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
42. 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

43. 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

44. 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

45. 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

46. 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

47. 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

48. A. Nakagawa, T. Komatsu, E. Tsuchida. / Albumin-heme: human serum albumin based dioxygen carrier / 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

49. 田口和明、岩尾康範、丸山徹、甲斐俊哉、土田英俊、小林紘一、小田切優樹 / 人工酸素運搬体へヘモグロビン小胞体の出血時における体内動態特性評価 / 第24回日本薬学会九州支部大会 / 2007.12.8-9 / 福岡

50. 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

51. 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.

52. 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

53. 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

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

1. ヘモグロビン含有小胞体の製造法 (第 2,936,109号)

2. ヘモグロビン内包脂質小胞体の製造方法 (特開H5-155758)

3. 粉末状ヘモグロビンの製造方法
(第3,194,050号) (WO2002/038530, US Patent 6,949,663)
4. ヘモグロビン精製法
(第3,331,433号)
5. リポソームの製造方法
(特開H5-293360)
6. ヘモグロビン内包脂質小胞体
(第3,479,915号)
7. ヘモグロビン含有水溶液の処理方法
(第3,648,261号)
8. ヘモグロビン溶液の製造方法
(第3,713,053号)
9. HbCOのHbO₂への変換方法及びその装置
(第3,682,072号)
10. 樹脂状分岐構造を持つ両親媒性化合物
(第3,181,276号, US Patent 6,933,352)
11. 安定保存可能な酸素輸液剤
(第3,466,516号, US Patent 6,864,094)
12. ヘモグロビン小胞体の光還元法
(特開2001-354585, US Patent 6,916,303)
13. 小胞体分散液の製造法
(WO2002/18539)
14. カルボン酸型脂質
15. 脱酸素化法
(第3,442,751号)
16. 多段式液処理装置
(特開2001-239135)
17. 両イオン性脂質およびその用途
(特開2003-064037, US Patent 6,965,049)
18. 人工酸素運搬体を含む医薬組成物
(特開2004-307404)
19. ヘモグロビン精製方法
(特願2003-433548)
20. リポソーム安定化剤
(特開2004-269442)
21. メト化防止剤を含有する人工酸素運搬体
(特開2006-036748)
22. 血中微粒子製剤の除去装置
(特開2006-325833)
23. 配位ガス交換法およびその装置
(特願2005-229222)
24. 配位子置換型輸液製剤
(特願2006-095901)
25. 血清または血漿の分離方法
(特願2006-095902)

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： Hb小胞体の配位子結合反応の特徴

分担研究者 酒井 宏水 早稲田大学 理工学研究所 准教授

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

研究要旨

Hb小胞体(HbV)は、高純度・高濃度Hb溶液をリン脂質小胞体に内包した人工酸素運搬体である。生体内ではごく微量のガス状分子(NO, CO)が血管弛緩因子として産生されるが、Hbとの親和性が極めて高いため、修飾Hb溶液の投与では、NO, COが捕捉され血管収縮・血圧亢進が生起する。Hb小胞体の投与ではこの副作用は見られず、赤血球と同様に、高濃度のHb溶液を内包した細胞型構造がNO, COの反応性を調節しているものと理解されている。本研究では、ストップフロー・ラピッドスキャン分光法からHb小胞体のガス分子との反応の抑制について解析し、ガス拡散のシミュレーションからその機序を検討した。脂質二分子膜には、ガスの拡散の障壁にならないことは実験的にも明らかになり、Hb溶液を粒子内に封入することによってNO結合が遅延されるのは、もともと結合の速いNOが粒子内に拡散してくる際に、急速に外側の高濃度Hb溶液に結合するため、粒子内部へのNO拡散の遅延(障壁)になることが結論できた。赤血球は粒子内のHb濃度が高く、また粒子径を大きくすることでNO, COの反応を遅延させており、これがHb小胞体の設計に活かされている。

A. 研究目的

赤血球は長径約 8 μ mの中窪み円板状粒子であり、酸素を結合できるHbの高濃度溶液（約35%）を赤血球膜に内包した構造を持つ。赤血球の細胞型構造の生理的意義は、① Hb溶液のコロイド浸透圧の抑制、② 本来毒性のあるHb逸脱の抑制、③ Hb機能維持のための各種リン酸などエネルギー分子、解糖 - ならびに還元 - 酵素系の保持、がまず挙げられる。更に、④ 内因性ガス状情報伝達分子(NO, CO)との反応性を調節していることも重要である。溶血を伴う病態、あるいは人工酸素運搬体（分子状の修飾Hb溶液）の投与において、血管内皮細胞由来の弛緩因子NOを捕捉するため、血管収縮（血圧亢進）、血管内皮の障害、また代謝異常や軽度の

神経性副作用などが生起することが明らかになっている。COもまた、特に肝微小循環において血管拡張因子として作用する分子であり、投与のHb溶液がCOを捕捉するために生起する類洞血管収縮が確認されている。副作用の原因は血漿層に存在する遊離Hb分子であり、赤血球の構造はHbの毒性を遮蔽していると言える。

赤血球構造がNO結合を遅延させるメカニズムに関しては、過去に多くの検討が行われているが、明確な答えが得られぬまま諸説が議論されている状態にある。これまで提案されている説としては、(1) 赤血球周囲に存在する非攪拌層によるNOの拡散障壁、(2) 赤血球の細胞骨格によるNOの拡散障壁、(3) 赤血球内の高粘度Hb溶液によるNOの拡散

Table 1. Physicochemical characterization of a series of HbV prepared for the stopped flow spectrophotometry to observe the NO and CO binding profiles. Samples 1–4 were used to examine the influence of intracellular Hb concentration ($[Hb]_{in}$). Samples 4–6 were used to study the influence of particle diameter. The P_{50} value (oxygen tension at which Hb is half-saturated with oxygen) were regulated in the narrow range of 13 – 16 torrs to minimize the influence of Hb allosteric on the binding rate constants of NO and CO.

Sample entry number	$[Hb]_{in}$ (g/dl)	Particle size (nm)	P_{50} (Torr)
1	1	305 ± 105	13
2	10	277 ± 103	15
3	20	278 ± 94	15
4	35	265 ± 57	14
5	35	178 ± 74	16
6	35	452 ± 184	14

障壁、である。赤血球は壊れ易くNOは化学的に不安定であるため、NOの反応解析は非常に難しい。この障害がメカニズムの解明を遅らせているのではないかと考えられた。

人工酸素運搬体として開発されたHb小胞体(HbV)は、赤血球と同等の酸素運搬能を有する。HbVは赤血球と同じ細胞型構造であるため、Hbと比較してNO結合速度が遅いことを確認している。また、投与のHbVは血管収縮を起こさない。脂質分子が疎水性相互作用だけで集合して形成するリン脂質小胞体(リポソーム)は不安定な構造体であるという認識が一般的であったが、脂質組成の最適化と、ポリエチレングリコール(PEG)による表面修飾によって構造の安定化は十分に可能であり、ストップフロー法を実施しても溶血を起こさないことを確認している。加えて、HbVは脂質とHbから成る分子集合体であるため物理化学的特性が容易に操作できる利点がある。そこで本研究では、HbVを利用して細胞型構造が配位子結合反応に及ぼす影響を解明することを目的とした。内包Hb濃度($[Hb]_{in}$)または粒径を変化させたHbVのNO、CO結合反応速度をストップフロー法から求めた。さらに、コンピュータシミュレーションを用いて結合反応の予測と赤血球の長径(8 μ m)と同じ粒径での結合反応速度の予測を実施した。

B. 実験方法

1. HbV、Hb溶液の調製

高濃度・高純度のHbCO溶液(40 g/dl, desalted)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既報に従い精製したものをを用いた。HbCO溶液をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で希釈して $[heme] = 300 \mu$ Mに調整後、配位子交換操作を経てHbO₂溶液を得た。

また、内包Hb濃度と粒子径を変化させたHbVの調製には、HbCO溶液をPBSで10倍に希釈後、限外ろ過(UHP-62K, cut-off Mr 10,000; Advantec社, 4 °C)を行い、 $[Hb] = 40$ g/dlに濃縮して原料のHb溶液とした。このHb溶液をPBSで希釈し、 $[Hb] = 1, 10, 20, 35$ g/dlのHb溶液をそれぞれ調製した。これらのHb溶液の粘度をレオメーター(Physica MCR 301; Anton Paar社製)で測定したところ、それぞれ0.9, 1.1, 2.1, 10.1 cPであった(10 s⁻¹, 25 °C)。HbのNO親和度と酸素親和度(P_{50})は直線関係にあることが知られているので、すべての測定試料の P_{50} を同じにするため、アロステリック因子を加えずに、単にCl⁻とPBSのリン酸塩のみで P_{50} を制御した。HbVの膜成分である脂質は、1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl-choline, cholesterol, 1,5-*O*-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate

(日本精化社製) = 5/5/1 (mol比)の混合脂質に、0.3 mol% の 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl-ethanolamine- N-poly(ethylene glycol)₅₀₀₀ (日本油脂社製) を混合して用いた。各HbCO溶液 ([Hb] = 1, 10, 20, 35 g/dl) に混合脂質を終濃度7 g/dlになるよう添加。強制攪拌機で水和分散 (250 rpm, 2 hrs, room temp.) させた後、エクストルージョン法で平均粒径265 – 305 nmに制御した。超遠心分離による未内包Hb溶液の除去、PBSによる再分散を経て、[heme] = 300 μMのHbVを得た。

粒径を変化させたHbVの調製には、HbCO溶液 ([Hb] = 35 g/dl) に混合脂質を終濃度7 g/dlになるよう添加。強制攪拌機で水和分散 (250 rpm, 2 hrs, room temp.) させた後、エクストルージョン法で平均粒径452 nmおよび178 nmのHbVを得た。HbVの配位子交換 (CO→O₂) をO₂雰囲気下で可視光を照射して行った。HbV分散液を入れたナス型フラスコをロータリーエバポレーターで穏やかに回転させ、フラスコ壁面にHbV分散液の薄層を形成させた。Hbの変性を防ぐ為にフラスコを氷水に浸しながらハロゲンランプ (500 watts) を照射し、O₂をフラスコ内に吹き込ませた。配位子交換の終了はHbCOのSoret帯λ max (420 nm)の有無で確認した。平均粒径は動的光散乱法 (Submicron Particle Size Analyzer, model N4 PLUS; Beckman-Coulter社製)、P₅₀は酸素結合解離曲線の測定 (Hemox-Analyzer; TCS Medical Science社製) から求めた。すべての測定試料のP₅₀は13 – 16に制御できた (37 °C)。調製したHbVの物理化学的特徴はTable 1にまとめた。

2. HbVのNO、CO結合反応の解析

ストップフロー法を用い、HbVのNO、CO結合反応を経時観測した。ストップフロー法とは、急速に流した2種の溶液を混合することによって反応を開始させ、その流れを停止し、観測キュベット内で進行する反応を主として光学的な方法で観測する手段である。本研究ではユニソク社製のストップフロー・ラピッドスキャン分光測定装

置 (RSP-1000型) を用いた。2種の溶液の高速混合は0.3 – 0.6 MPaの加圧で行い、混合デッドタイムは1.5 ms以下である。2つのリザーバー (AとB) にPBS溶液を3 mlずつ導入し、試料導入口をセプタムラバーで密閉してN₂バブルを30分以上行い、リザーバー内を完全に脱酸素化した。この操作はNOの損失とHbのmet化を防ぐ観点から非常に重要である。リザーバーAの[heme]が3 μMになるようにHbV分散液 (~30 μl, [heme] = 300 μM) をマイクロシリンジで導入後、ストップフロー測定を行い (波長範囲: 385-593 nm)、deoxyHbのSoret帯λ max (430 nm) の吸収ピークからHbの完全な脱酸素化を確認した。Hbの変性を防ぐ為にN₂バブルをN₂フローに切り換えた後、リザーバーBにNOもしくはCOガスを導入してバブルした。NO結合においては0.2004% NO/N₂混合ガス、CO結合においては14.14% CO/N₂混合ガス (高千穂化学工業社製) を用い、5分以上PBS溶液をバブルした後、ストップフロー測定を開始した。1 ms毎の測定を210 msまで行った。測定15回分を平均した値について、430 nmの吸光度の経時変化を解析した。また、全ての測定は25 °Cで実施した。

Hbが均一に分布していること、結合反応が不可逆であること、ガス濃度が一定であること、を仮定して、擬一次反応速度式(1)からみかけのNO、CO結合速度定数($k'_{on}{}^{(NO)}$, $k'_{on}{}^{(CO)}$)を算出した。

$$\ln \frac{\Delta A_t}{\Delta A_0} = -k'_{on} \cdot C_{Gas} \cdot t \quad (1)$$

ΔA_t は時刻 t におけるdeoxyHbの吸光度の変化量; ΔA_0 は初期におけるdeoxyHbの吸光度の変化量であり、それぞれ以下のように定義できる。

$$\Delta A_t = A_t - A_{t=\infty} \quad (2)$$

$$\Delta A_0 = A_{t=0} - A_{t=\infty} \quad (3)$$

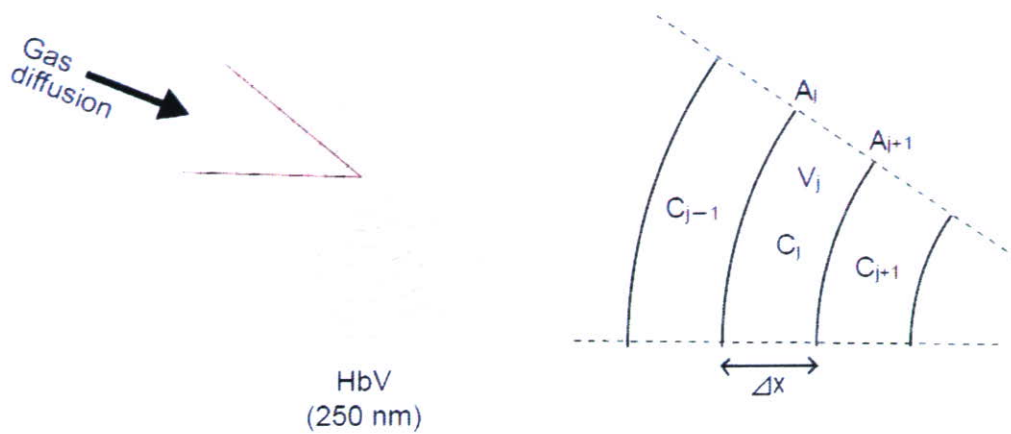


Fig. 1. Schematic illustration of simulation design for three-dimensional gas diffusion from the surface to the core of one particle containing a Hb soluiton. Particle diameter = 250 nm.

C_{Gas} 、初期のガス濃度。NOのガス濃度 ($1.9 \mu\text{M}$) はheme濃度 ($1.5 \mu\text{M}$) と比較して大過剰とは言えないので、反応の初期段階の傾きから $k'_{on}(\text{NO})$ を算出した。

3. シミュレーションを用いたNO、CO結合反応の予測

コンピュータシミュレーションを用い、内包Hb濃度および粒径の変化がHbVのNO、CO結合反応に与える影響を予測した。本シミュレーションでは、①ガス分子の拡散、②HbV内のHbのNO、CO結合反応、の2点のみに着目した。HbVは粒径250 nmの球体であり、溶液中に均一に分散していると仮定した。また、HbとHbVの拡散係数はガスの拡散係数と比較して非常に小さい。そこでHbとHbVを静止系と仮定して、ガスの拡散のみをシミュレーションした。また、小粒子を高速混合するため、細胞外の拡散障壁は無視することとした。脂質二分子膜の厚さ ($\sim 5 \text{ nm}$) は粒径 (250 nm) と比較して極めて小さいことから、脂質二分子膜の拡散障壁も無視することとした。(両者の障壁は、後述の結果からほとんど無いことが明らかとなった。) HbV

粒子の表面から中心までの距離125 nmを10つのセルに分割し、1セル12.5 nmの範囲での反応を最小単位と仮定した。例えば粒径8000 nmの粒子のシミュレーションでは、粒子表面から中心までの距離4000 nmの間に12.5 nmのセルが320個並ぶことになる。最初のセルはバルク濃度を表す濃度境界条件と接しており、最後のセルはHbVの中心点に対応する閉鎖境界条件とした。基本となるガス拡散方程式 (4) より、粒子表面から中心への一次元拡散を式 (5) で表した。

$$\frac{\partial C_{Gas}}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_{Gas}}{\partial x^2} \quad (4)$$

ここで、 $C_{Gas}(t_i, x_j)$ は、時刻 t_i 、セル x_j における溶存ガス濃度； $\Delta C_{Gas}(t_i, x_j)$ は、拡散による移動量； A_j は、セル $j-1$ と j と接している面積； Δt は、ステップ時間； V_j は、セル j の体積； Δx は、セル間の距離を示す (Fig. 1)。ガス分子は各セル内のhemeと反応し、ガスとhemeがそれぞれ消費される。反応が不可逆的であると仮定して、ガスとhemeの濃度変化を(6)および(7)の速度式で表した。

$$\Delta C_{Gas}(t_i, x_j) = D \cdot \left(\frac{-A_j \cdot (C_{Gas}(t_i, x_j) - C_{Gas}(t_i, x_{j-1})) + A_{j+1} \cdot (C_{Gas}(t_i, x_{j+1}) - C_{Gas}(t_i, x_j))}{V_j \cdot \Delta x} \right) \cdot \Delta t \quad (5)$$

$$\frac{dC_{heme}}{dt} = -k_{on} \cdot C_{Gas} \cdot C_{heme} \quad (6)$$

$$\frac{dC_{Gas}}{dt} = \frac{dC_{heme}}{dt} \quad (7)$$

ステップ時間 Δt 、セル間の距離 Δx における heme およびガスの濃度変化量 (ΔC_{heme} , $\Delta C'_{Gas}$) は式(6)と(7)を差分系にした式(8)と(9)により計算した。

$$\Delta C_{heme}(t_i, x_j) = -k_{on} \cdot C_{Gas}(t_i, x_j) \cdot C_{heme}(t_i, x_j) \cdot \Delta t \quad (8)$$

$$\Delta C'_{Gas}(t_i, x_j) = -k_{on} \cdot C_{Gas}(t_i, x_j) \cdot C_{heme}(t_i, x_j) \cdot \Delta t \quad (9)$$

ストップトフロー法では2液が混合された瞬間から反応が始まり、ガスが時間経過と共にHbV内部へ拡散する。したがって、HbV内の初期のガス濃度は

ゼロである。一方、HbV内の初期の未結合heme濃度は、内包Hb濃度に応じて620-21,700 μM となり、ガスとの結合反応によって徐々に減少していくこととなる。

シミュレーションのために必要な値はTable 2にまとめた。Hb分子の拡散係数は濃度依存性があり、Hb濃度の増大 (1→35 g/dl) によって減少する (77 → 7.4 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$)。一方、ガスの拡散係数はHbよりも2桁も大きい。Hb溶液内での O_2 の拡散係数 (D_{O_2}) もHb濃度の増大とともに減少する。NOとCOの拡散係数 (D_{NO} , D_{CO}) は D_{O_2} と式(10)を用いて算出した。

$$D_x = D_{\text{O}_2} \cdot \left(\frac{32}{MW_x} \right)^{1/2} \quad (10)$$

ここで、 MW_x 、ガス分子 x の分子量である。

ガス結合反応を加えた次元拡散シミュレーションは、式(5, 8, 9)を基にして、有限差分法を用いて次のように実施した。

Table 2. Parameters for computer simulations for each HbV with different $[\text{Hb}]_{\text{in}}$

Parameters	Values			
Diameter (nm)	50, 100, 200, 250, 500, 1000, 2000, 8000			
[heme] in solution (μM)	1.5			
Initial [NO] in solution (μM)	1.9			
Initial [CO] in solution (μM)	67.5			
$k_{on}^{(\text{NO})}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	2.7×10^7			
$k_{on}^{(\text{CO})}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	3.4×10^5			
	1 g/dl $[\text{Hb}]_{\text{in}}$	10 g/dl $[\text{Hb}]_{\text{in}}$	20 g/dl $[\text{Hb}]_{\text{in}}$	35 g/dl $[\text{Hb}]_{\text{in}}$
$[\text{heme}]_{\text{in}}$ (μM)	620	6200	12400	21700
D_{Hb} in HbV ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$)	77	53	29	7.4
D_{NO} in HbV ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) ^a	2080	1590	1160	706
D_{CO} in HbV ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) ^a	2150	1640	1200	731

^a D_{NO} in saline is 2210 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ and D_{CO} in saline is 2290 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. D_{Hb} in HbV is much smaller than D_{NO} and D_{CO} . For that reason, we did not use D_{Hb} in computer simulations. Consequently, we did not consider the so-called “facilitated gas diffusion” attributable to the diffusion and dissociation of HbNO or HbCO because of the low D_{Hb} and the significantly large equilibrium constants of HbNO and HbCO in comparison with that of HbO₂.

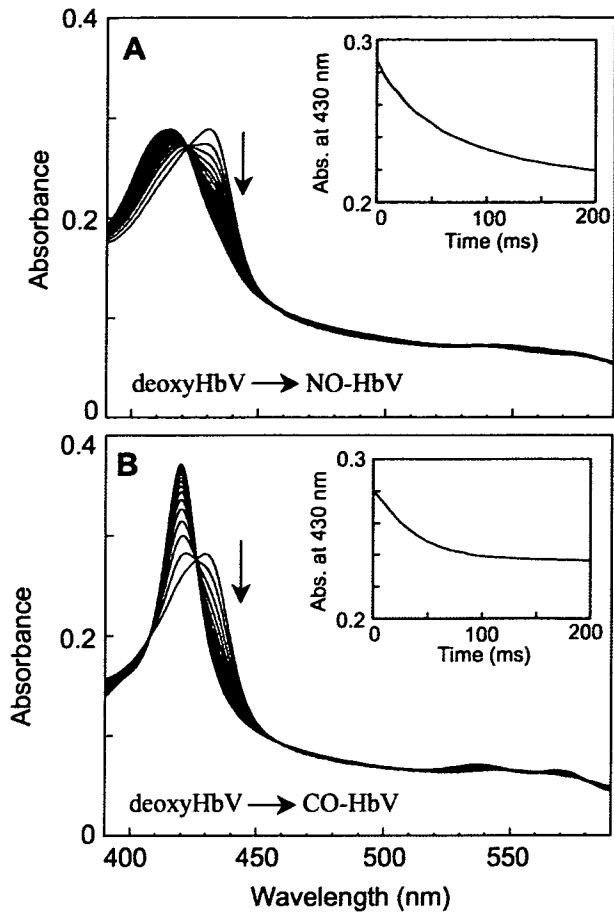


Fig 2. Representative profiles of the reactions of NO or CO with deoxygenated HbV ($[\text{Hb}]_{\text{in}} = 35 \text{ g/dl}$) using stopped-flow spectrophotometry. **(A)** A NO bubbled PBS ($[\text{NO}] = 3.8 \mu\text{M}$) and HbV in PBS ($[\text{heme}] = 3.0 \mu\text{M}$) were mixed rapidly using a stopped-flow spectrophotometer; the absorption spectra were collected every millisecond over 0.2 s after mixing. In this figure, the spectroscopic curves of every 10 ms are selected. The figure shows clearly that the spectrum of deoxyHbV is mostly converted to NO-HbV in 0.2 s. (Inset) The time course of the measured absorbance at 430 nm. **(B)** A CO-bubbled PBS ($[\text{CO}] = 135 \mu\text{M}$) and HbV in PBS ($[\text{heme}] = 3.0 \mu\text{M}$) were mixed rapidly using a stopped-flow spectrophotometer; the absorption spectra were collected every millisecond over 0.2 s after mixing. In this figure, the spectroscopic curves of every 10 ms were selected. This figure clearly shows that the spectrum of deoxyHbV is mostly converted to CO-HbV in 0.2 s. (Inset) The time course of the measured absorbance at 430 nm. The optical path length was 1 cm. All the experiments were performed at 25 °C.

① 時刻 t_i における C_{Gas} 、 C_{heme} は、前のステップ時間 t_{i-1} の結果を用いて計算した。

② ΔC_{heme} 、 $\Delta C'_{\text{Gas}}$ は式(8, 9)を用いて計算した。

③ ガス分子の拡散は濃度勾配に依存するので、式(9)で算出した $\Delta C'_{\text{Gas}}$ と式(5)で算出した ΔC_{Gas} を加えて、次のステップ時間の C_{Gas} を計算した。

④ hemeの拡散係数はゼロと仮定しているので、式(8)のみで ΔC_{heme} を計算した。

ステップ時間間隔 Δt を 0.01 μs に設定して 10^7 ステップを計算し、反応開始後 100 ms までをシミュレーションした。

反応の進行に伴い、バルク溶液のガス濃度は減少する。これを反映した式(11)を用いた。

$$C_2(\text{Gas}) = \frac{C_0(\text{Gas}) - C_1(\text{GasTotal}) \cdot \left(\frac{C_0(\text{heme})}{C_1(\text{heme})} \right)}{\left(1 - \frac{C_0(\text{heme})}{C_1(\text{heme})} \right)} \quad (11)$$

ここで、 $C_0(\text{Gas})$ は、初期のガス濃度； $C_2(\text{Gas})$ は、境界条件（バルク溶液）のガス濃度； $C_1(\text{GasTotal})$ は、結合ガスと未結合ガスの総和； $C_0(\text{heme})$ は、溶液全体の heme 濃度； $C_1(\text{heme})$ は、HbV 中の heme 濃度を示す。

全体の heme 中の未結合 heme の割合 (R) は、式(12)で示される。これは反応開始後 100 ms までの反応の進行度、および反応初期 (5 ms) の傾きから見かけの結合反応速度を求めるときに使用した。

$$R = \frac{\sum_j V_j \cdot C_{\text{heme}}(t_i, x_j)}{\sum_j V_j \cdot C_{\text{heme}}(t_0, x_j)} \quad (12)$$

C. 実験結果

1. HbV の NO、CO 結合特性

HbV は Hb や赤血球と比較して光散乱効果が大きく、Q 帯の吸収ピークが判別しづらいため、Soret

帯の吸収ピークの変化を解析することとした。HbVの完全な脱酸素化はdeoxyHbのSoret帯 λ_{\max} (430 nm)から確認した。deoxyHbV分散液をNO溶液と高速混合すると、430 nmの吸収ピークの減少にともない、nitrosylHb由来の418 nmの吸収ピークの増大が観測された (Fig. 2A)。COと高速混合すると、carbonyl Hb由来の419 nmの吸収ピークの増大が観測された (Fig. 2B)。両者の430 nmにおける吸光度の時間変

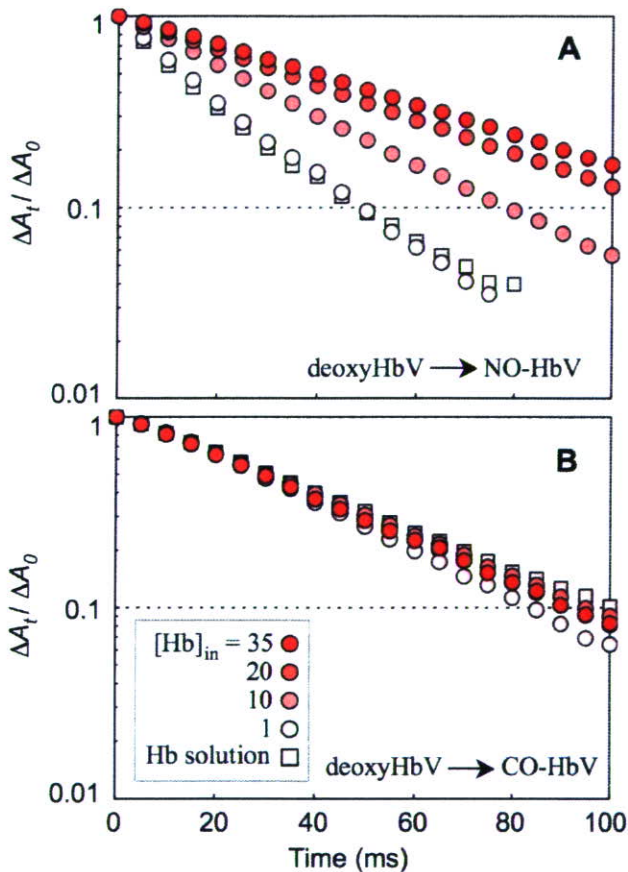


Fig. 3. Time courses of NO-binding and CO-binding by deoxygenated HbV with various $[Hb]_{in}$. A NO bubbled PBS (3.8 μ M) (A) or a CO bubbled PBS (135 μ M) (B) and HbVs in PBS ($[heme] = 3.0 \mu$ M) were mixed rapidly using a stopped flow spectrophotometer. $[Hb]_{in}$ varies from 1 to 35 g/dL ($[heme] = 620-21700 \mu$ M), thus the number of particles differs at the constant $[heme]$ (3.0 μ M) in each solution. The level of reaction was plotted on a semi-logarithmic graph as a ratio of absorption at 430 nm (ΔA_t) at time t , to the initial absorption (ΔA_0) at time 0. The results of the cell-free Hb solutions are also plotted, which are almost identical with those of HbV at $[Hb]_{in} = 1$ g/dl. The graph shows that NO-binding rate is retarded with increasing $[Hb]_{in}$ in (A). However, such change was not apparent in the case of CO-binding in (B). All the experiments were performed at 25 $^{\circ}$ C.

化は単一指数曲線を示し、小胞体内でのnitrosyl Hbおよびcarbonyl Hbの形成が明らかであった。

2. 内包Hb濃度と小胞体のNO、CO結合特性

Fig. 3には時刻 t における吸光度 (430 nm) と時刻0における吸光度の比の時間変化を示した。NO結合速度が内包Hb濃度の増大とともに減少することが示された。一方、CO結合速度は内包Hb濃度の増減

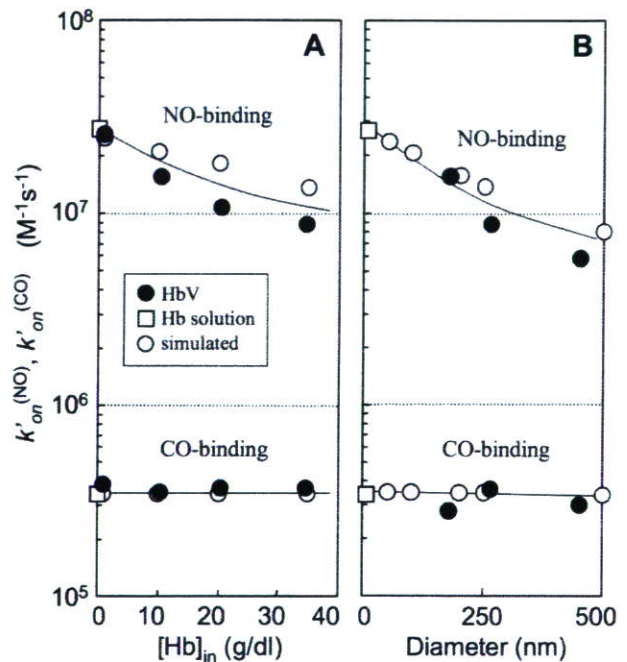


Fig. 4. Apparent binding rate constants of NO ($k'_{on}^{(NO)}$) and CO ($k'_{on}^{(CO)}$) of experimental results and computer simulations. (A) Plotted against $[Hb]_{in}$ of HbV, (B) plotted against particle diameter. (A) The apparent binding rate constants (experimental) were calculated from the slopes in Fig. 3. Values of the exact $k_{on}^{(NO)}$ and $k_{on}^{(CO)}$ of the elementary reactions of cell-free Hb solution are also plotted on the vertical axis. Those of computer simulations (diameter 250 nm) are plotted as open circles. (B) The apparent binding rate constants were calculated similarly and plotted against the particle diameter. Values of the exact $k_{on}^{(NO)}$ and $k_{on}^{(CO)}$ of cell-free Hb solution (diameter, 7 nm) were also plotted. Those of computer simulations (diameter, 50, 100, 200, 250, and 500 nm) at $[Hb]_{in} = 35$ g/dL are plotted as open circles. Both graphs show that computer simulations re-create well the tendencies of the experimental results; $k'_{on}^{(NO)}$ decreases considerably with increasing $[Hb]_{in}$ and diameter, and $k'_{on}^{(CO)}$ does not show such changes.

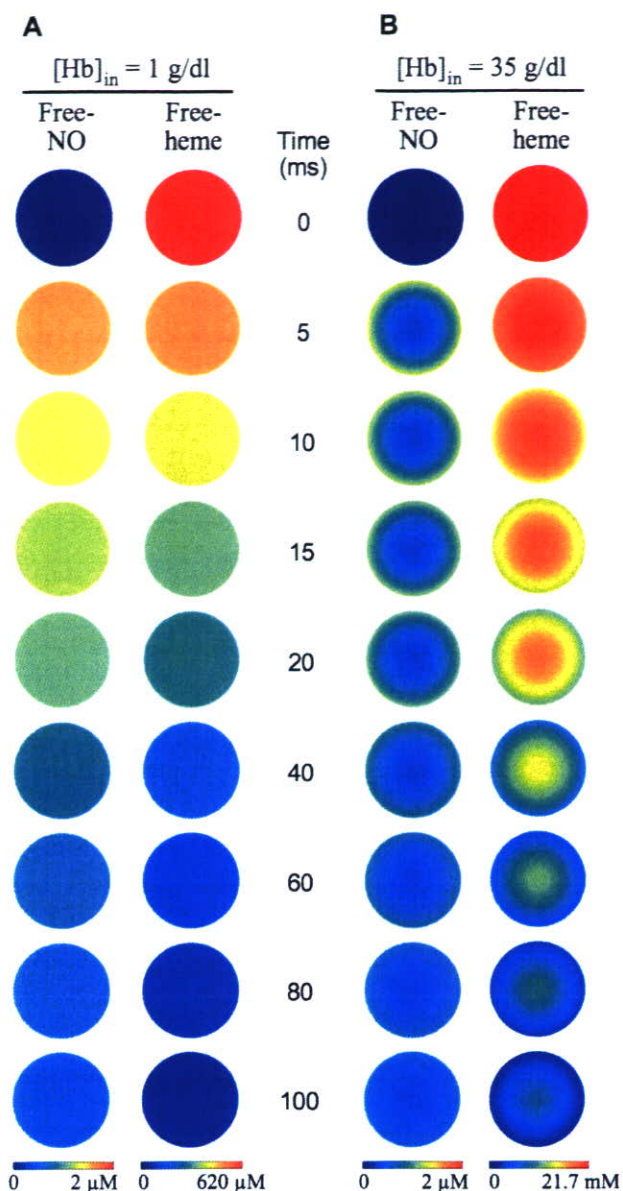


Fig. 5. Schematic two-dimensional representation of the simulated time courses of distributions of unbound free-NO and unbound free-heme in one HbV (250 nm). (A) At $[\text{Hb}]_{\text{in}} = 1 \text{ g/dl}$, both free NO and unbound hemes are distributed homogeneously at 5 ms, indicating that NO diffuses rapidly into HbV: the reaction proceeds homogeneously. (B) At $[\text{Hb}]_{\text{in}} = 35 \text{ g/dl}$, both free NO and unbound hemes are distributed heterogeneously at any time. The concentration changes gradually from the surface to the core, indicating formation of the intracellular diffusion barrier. Particle diameter is fixed at 250 nm. It is easily speculated from the results that such gradients will be enhanced in larger particles.

に対して変化を示さなかった。直線の傾きから、各HbVの $k'_{\text{on}}^{(\text{NO})}$ 、 $k'_{\text{on}}^{(\text{CO})}$ を算出し、内包Hb濃度との相関関係を検討した (Fig. 4A)。この図から $k'_{\text{on}}^{(\text{NO})}$

が内包Hb濃度に依存することが明らかであり、内包Hb濃度の増大 (1 → 35 g/dl) に伴い、 $k'_{\text{on}}^{(\text{NO})}$ が

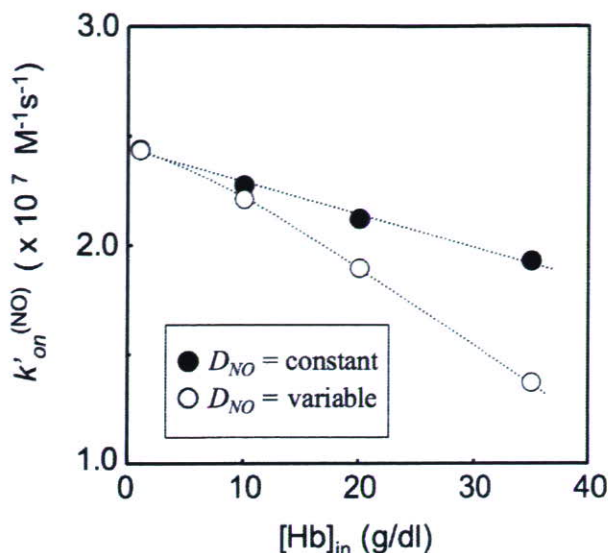


Fig. 6. Influence of D_{NO} on the retardation of NO-binding to HbV. Computer simulations of NO-binding to HbV were performed under the assumption that the diffusion constant of NO (D_{NO}) is independent of $[\text{Hb}]_{\text{in}}$ (closed circles). D_{NO} was fixed to the value in the bulk solution ($2210 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) to all HbV with different $[\text{Hb}]_{\text{in}}$. The HbV with a higher $[\text{Hb}]_{\text{in}}$ showed a slower rate of binding. However, the slope becomes gentle in comparison with the results of variable D_{NO} at each $[\text{Hb}]_{\text{in}}$ (open circles). This indicates the contribution of the reduced D_{NO} in a highly viscous Hb solution to the retardation of NO-binding. Particle diameter is fixed at 250 nm.

減少した ($2.6 \times 10^7 \rightarrow 0.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)。内包Hb濃度1 g/dlのHbVの $k'_{\text{on}}^{(\text{NO})}$ は、Hbの希薄溶液の $k'_{\text{on}}^{(\text{NO})}$ ($2.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) と同等であった。

一方、CO結合においては内包Hb濃度の変化 (1 → 35 g/dl) に対して、 $k'_{\text{on}}^{(\text{CO})}$ は変化せず ($3.1 \times 10^5 \rightarrow 3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)、全てのHbVの $k'_{\text{on}}^{(\text{CO})}$ はHbの希薄溶液の値とほぼ同じであった。

3. Hb 小胞体の粒径と NO、CO 結合特性

小胞体の粒径がNO、CO結合特性に与える影響を検討した。内包Hb濃度を一定 (35 g/dl) として、粒径の異なるHbVを調製し、粒径と $k'_{\text{on}}^{(\text{NO})}$ 、 $k'_{\text{on}}^{(\text{CO})}$ の相関を検討した (Fig. 4B)。NO結合においては、平均粒径の増大 (178 nm → 452 nm) に伴い、 $k'_{\text{on}}^{(\text{NO})}$

が減少した ($1.5 \times 10^7 \rightarrow 6.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)。一方、CO結合においては、大きな変化は示さなかった。

4. Hb小胞体のNO、CO結合特性の予測

内包Hb濃度の異なるHbV ($[\text{Hb}]_{\text{in}} = 1 - 35 \text{ g/dl}$) および粒径の異なるHbV (50, 100, 200, 250, 500 nm) に関して、NO、CO結合反応のシミュレーションを実施した結果をFig. 4に重ねて示した。

まず内包Hb濃度との相関であるが、NO結合速度が内包Hb濃度と粒径に依存していることが明らかであった。実験値の逸脱もあったが、内包Hb濃度の増大に伴い $k'_{\text{on}}(\text{NO})$ が減少する傾向は同じであった。一方、CO結合速度に関しては変化を示さず、実験結果とも良く一致した(Fig. 4A)。

次に粒径との相関であるが、 $k'_{\text{on}}(\text{NO})$ の粒径依存性と、 $k'_{\text{on}}(\text{CO})$ の非依存性に関しては実験結果と良く一致した (Fig. 4B)。粒径増大に伴い、NO結合速度は遅く、一方CO結合速度は変化しなかった。

内包Hb濃度1–35 g/dlのHbV単粒子について、未結合NOと未結合hemeの濃度変化の次元解析を2

次元解析に変換した (Fig. 5)。内包Hb濃度が1 g/dlの場合、未結合NOと未結合hemeは反応開始後5 msで既に粒子内に均一に分布していた。これはHbV内でのNOの拡散が非常に速いことを示している。一方、内包Hb濃度が35 g/dlの場合は、不均一に分布していた。粒子表面から中心にかけて、NOとhemeの濃度勾配が経時的に変化し、反応開始から100 ms経過しても、依然として分布は不均一であった。

HbV内のNO拡散係数 D_{NO} が結合反応速度に与える影響を明らかにするため、 D_{NO} のHb濃度依存性を無視した系 ($D_{\text{NO}}: 2210 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ で一定) を構築した。Fig. 6に示すように、 D_{NO} が変化する系と比較して、 D_{NO} が一定の系では、 $k'_{\text{on}}(\text{NO})$ の変化幅が小さかった。この結果から、高濃度Hb溶液における D_{NO} の減少がNO結合速度の遅延に大きく寄与していることが明らかとなった。

5. 大粒径Hb小胞体のNO、CO結合反応の予測

上述のシミュレーションは粒径500 nmまでの

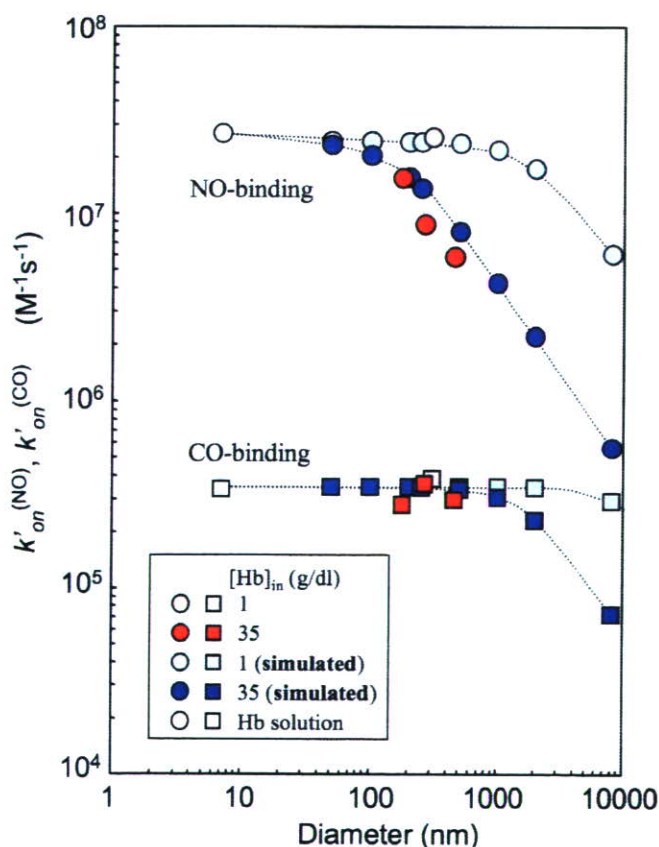


Fig. 7. Computer simulations of NO-binding and CO-binding by particles with different particle diameter. At $[\text{Hb}]_{\text{in}} = 35 \text{ g/dl}$, the apparent CO-binding rate constant, $k'_{\text{on}}(\text{CO})$, is almost identical up to 100 nm diameter; then it reduced considerably, concomitant with increasing the diameter (blue squares in the lower level). On the other hand, $k'_{\text{on}}(\text{NO})$ decreases slightly up to 10 nm diameter; it then decreases steeply with enlarging particle diameter (blue circles in the upper level). In the case of $[\text{Hb}]_{\text{in}} = 1 \text{ g/dl}$, both NO-binding (light blue circles) and CO-binding (light blue squares) showed less changes in the binding rate constants. However, the retardation becomes obvious when the particle diameter is larger than ca. 1000 nm for NO-binding, and even for CO-binding when the diameter is larger than ca. 2000 nm. Experimental values for the Hb solution (white circle and square) and HbV (pink or red colored squares and circles) are close to the simulated values. The apparent binding rate constants, $k'_{\text{on}}(\text{NO})$ and $k'_{\text{on}}(\text{CO})$, of a spherical particle with diameter of 8000 nm and $[\text{Hb}]_{\text{in}} = 35 \text{ g/dl}$ are estimated to be reduced to 5.6×10^5 and $7.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively. The reported $k'_{\text{on}}(\text{NO})$ values of a series of chemically modified HBOCs (diameter, 6–28 nm), about $3.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, were identical to that of an unmodified Hb solution (38), that coincided well with our simulation.

HbVを対象としていたが、さらに大きな粒径(1000, 2000, 8000 nm)のHbVについてもシミュレーションを実施した。内包Hb濃度が1および35 g/dlのHbVに関して、粒径が $k'_{on}^{(NO)}$, $k'_{on}^{(CO)}$ に与える影響を検討した(Fig. 7)。Hbの希薄溶液とHbVの実験値も一緒にプロットした。これらはシミュレーションの値と良く一致した。内包Hb濃度が35 g/dlの場合、 $k'_{on}^{(NO)}$, $k'_{on}^{(CO)}$ は粒径の増大に伴い、著しく減少した。興味深いことに、NO、CO結合の遅延が始まる粒径の“閾値”があり、 $k'_{on}^{(NO)}$ においては100 nm、 $k'_{on}^{(CO)}$ においては1000 nmを境に急激に値が減少した。HbVの $k'_{on}^{(CO)}$ はほぼ一定値を示したものの、粒径が1000 nm以上になればNO結合の遅延と同じ機序で、CO結合の遅延が起きることが明らかとなった。内包Hb濃度が1 g/dlの場合、NO、CO結合反応速度定数の変化は小さかった。しかしながら、NO結合に関しては1000 nm以上、CO結合に関しては2000 nm付近以上で反応の遅延が起きることが明らかとなった。内包Hb濃度が35 g/dl、粒径が8000 nmのHbVの $k'_{on}^{(NO)}$ が $5.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $k'_{on}^{(CO)}$ が $7.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と見積もれた。8000 nmの粒子に35 g/dlのHbを内包させると、Hbの希薄溶液と比較して、NO結合は2桁の減少、CO結合は1桁の減少が起きることが予測された。

D. 考察

HbのNO結合速度は、高濃度Hb溶液を小胞体に内包させると顕著に遅延した。一方、CO結合は500 nmより小さい小胞体に内包した場合は遅延を示さなかった。1 g/dlのHb溶液を内包した小胞体のNO、CO結合速度がHbの希薄溶液とほぼ同じであったことから、脂質二分子膜はガス拡散の障壁にはならない。コンピュータシミュレーションの結果から、HbVの場合は、粒子内のガス拡散が、結合速度を遅延させる主要な因子であり、粒子外のガス拡散は無視できるほどに小さいことが推測された。粒子内のガス拡散を遅延させる要因として、

- 1) hemeの非常に大きなNO結合速度
- 2) 高濃度の内包HbによるNOの捕捉
- 3) 高粘度Hb溶液によるNOの拡散障壁
- 4) 粒径の増大に伴うNOのHbV内拡散距離の延長

が考えられる (Fig. 8)。

1996年に我々は、Hb溶液のカプセル化がNO結合を遅延させることを初めて報告した(Sakai et al., *Polymer Adv Technol* 1996;7:639-644)。さらに、赤血球においても同様にNO結合速度が遅延されることを1998年、Liu, Lancasterらが報告した(*JBC* 1998;273:18709-19713)。米国海軍研究所のRudolphらはLiposome-encapsulated Hb (LEH)のNO結合が遅延されることをストップフロー法を用いて証明しようと試みたが、カプセル化の影響は観測できなかった。彼らの調製した小胞体の内包Hb濃度が低かったこと(14 g/dl)が原因と考えられる。その後約10年間、様々な議論が提唱されてきたが、未だ解明には至っていない。赤血球は、複雑かつ壊れやすい構造であるので、ストップフロー法では溶血が必ず起こる。一方のNOも不安定な分子であるため、正確な解析が難しい。これが議論を長引かせた理由であると思われる。ストップフロー法以外では、競争反応試験(裸のHb溶液とHctの大きな赤血球分散液の比較で実施される)があり、これはより生理条件に近い測定法と思われる。しかし、静的条件下で赤血球が不均一分布している状態でNO結合速度が正確に測定できるのか疑問である。細胞骨格層や内包Hb濃度を減らした再構成赤血球も調製されているが、溶血を完全に抑制できるのか疑問であるし、Hbのアロステリック因子である電解質濃度が維持されているのかも不明瞭である。

そこで本研究では、より詳細な解析を実施するため、HbVを赤血球の人工モデルとして利用することを考えた。HbVは各種物理化学的特徴の調節(内包Hb濃度の35 g/dlまでの調節、粒径の調節、 P_{50} の

調節)が容易であるし、溶血も起こさないのも、より系統的な解析が可能となる。

本研究ではNO結合反応の全体を観測するためにあえて低いNO濃度(1.9 μM)を選択した。従来の報告によれば、赤血球のNO結合速度のストップフロー解析は、高濃度のNO条件で実施しているため、結合速度が速すぎて反応の殆どがデッドタイム(1–2 ms)中に進行してしまう点が問題であった。しかし、本研究の低濃度のNO条件では、heme濃度と比較してNO濃度が大過剰とならず、擬一次反応則が適応できない。そこで、反応の初期段階の結果から $k'_{on}(\text{NO})$ を導出することでこの問題を解決した。しかし、Stamlerらの報告によれば、このような希薄条件ではhemeと低濃度NOとの間に酸化還元電荷移動が生起する可能性がある。また、シミュレーションにおいては、HbVの粒径分布と内包Hb濃度が問題となる。内包Hb濃度は内包前の仕込みのHb濃度であり、調製後の内包Hb濃度は測定していない。これらがシミュレーションと実験値のずれの原因であると考えられる。しかし、本研究の結果から、HbVのNO、CO結合反応の実験値の傾向をシミュレーションで再現できたことは注目すべきである。

本研究のシミュレーションは粒子外の拡散障壁: 1) 非攪拌層の形成; 2) 脂質二分子膜のバリア性、を考慮していないが、HbVのNO結合速度の遅延は細胞内拡散障壁のみで十分説明できた。この結果は、赤血球においても細胞外拡散律速がごくわずかである可能性を示唆している。これはVaughnらの結果を後押しするものである。

1) 先ず非攪拌層について、HbV(250 nm)は赤血球(8 μm)と比較して非常に小さい粒子であるので、Stokes-Einsteinの式に従い、粒子の拡散は速いはずである。従って、粒子表面近傍のバルク溶液はHbVの高速運動によって攪拌されているはずである。このため、HbVの非攪拌層の厚さは赤血球(1–3 μm)よりも非常に小さいと予想される。

2) 次に脂質二分子膜のバリア性について、 $[\text{Hb}]_{in}$

= 1 g/dlのHbVとHbの $k'_{on}(\text{NO})$ がほぼ等しかったことから、脂質二分子膜の拡散障壁は無視できるほど小さいと考えられる(しかし脂質二分子膜の拡散障壁を直接測定はしていない)。一方、Hanらは赤血球の細胞膜骨格がNO結合の障壁となることを牛の赤血球ゴーストを用いた実験から考察しているが、これは、NOとの結合速度が速いHbが細胞膜骨格に密に吸着していたためではないかと考えられる。寧ろ我々は、赤血球膜近傍に存在する濃厚HbがNO拡散障壁の主要因になっているのではないかと考える。Liuらは「赤血球内部へと拡散したNOは内水相のHb溶液によって瞬時に捕捉されるので、赤血球内のNOの濃度はゼロに近い値が維持される」と述べている。しかし、彼らはこれをNO細胞内拡散障壁として注目してはいなかった。

HbのCO結合速度定数($k_{on}(\text{CO})$)は、NO、 O_2 結合速度定数よりも非常に小さい。CO結合の律速段階はheme鉄との内部結合生成である。実際、電子論的解釈に基づくと、鉄原子と結合を完了するのに要する時間の1/100の間に既にCOはグロビン鎖内に入っている。従って、全体の二分子結合速度定数は小さい。本研究では、Hbをカプセル化してもCO結合速度が殆ど遅延しないことが明らかとなった。NO結合の場合は、その結合速度の速さ故に、HbV内の表層でNOが瞬時にHbに捕捉され、これがHbV中心へのNO拡散を遅らせる一因になっていると考えられる。しかし、CO結合の場合は結合速度が遅いのでCO拡散を遅延させる要因は高粘度HbによるCOの拡散係数の減少のみであり、500 nm以下のHbVでは結合反応自体が律速段階となるためカプセル化による遅延が起こらない。しかしながら、顕著に大きな粒径になると、CO結合においても遅延がでてくるのがシミュレーションの結果から予測できた。CoinとOlsonは、赤血球のみかけの O_2 、CO、ethyl isocyanate結合反応速度定数 k'_{on} と、Hbの素反応速度定数 k_{on} の比較を実施した。それぞれの k_{on} は、 3×10^6 、 2×10^5 、 $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ である。Hbの k_{on} が小さいほど、赤血球の k'_{on} との差が小さく、

特に遅いethyl isocyanate結合反応では、Hbと赤血球の違いは殆ど無かった。この結果は、我々がNOとCOの結合反応の比較から得た配位子結合の原則「素反応が速い系では、赤血球内の拡散障壁を増大させ、裸のHbと比較して反応が遅くなる」を支持するものである。

酸素 (O₂) の存在する血液循環においては、NOは主に酸素の結合した人工酸素運搬体および赤血球との反応によって酸化される。Heroldらによれば、NOとHbO₂の素反応の結合速度定数は、 $8.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり、deoxyHbとNOの素反応速度定数 $2.4 -$

$2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ よりも速い。従って、HbO₂のNO結合反応は、deoxyHbの反応よりも赤血球内の拡散障壁が大きくなると予測される。これは、AzarovやHuangらの報告を支持するが、彼らは機序として「細胞膜の拡散障壁」を提案しており、本研究で提案する機序とは根本的に異なる。

本研究で用いたシミュレーションは、内包Hb濃度、粒径、およびその他のパラメーターを変化させたHbVの配位子結合反応の予測に有効な手段であると考えられる。本方法を用いれば、赤血球の長径と同じ8 μm の直径をもつ粒子の大凡のNO、CO結合特性をシミュレートできる。内包Hb濃度が35 g/dlで、粒径8 μm の粒子の $k'_{on}(\text{NO})$ 、 $k'_{on}(\text{CO})$ はそれぞれ、 5.6×10^5 、 $7.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。これは、既報の赤血球のみかけのNO、CO結合反応速度 ($k'_{on}(\text{NO})$, $1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k'_{on}(\text{CO})$, $6.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k'_{on}(\text{CO})$, $6.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; 溶血5%未満) と近い値を示した。一方で、他の報告例 ($k'_{on}(\text{NO})$, $5.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k'_{on}(\text{CO})$, $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) と比較するとシミュレーションの $k'_{on}(\text{NO})$ の方が速かった。この値は上述の $k'_{on}(\text{CO})$ よりも小さいという矛盾があり、おそらく細胞内拡散障壁以外のメカニズムも寄与していたと考えられる。既報の実験系では、高Hct条件で実施しているようであり、赤血球の拡散が遅く、細胞外拡散障壁である非攪拌層などが寄与したのではないかと考えられる。しかし、たとえ非攪拌層の寄与があったとしても、赤血球内拡散障壁だけで、 $k'_{on}(\text{NO})$ がHb溶液と比較して2桁も減少しているので、遅延の主要因は赤血球内の拡散障壁と考えるべきである。シミュレーションの結果と赤血球の実験値が異なる理由としては他に、赤血球の両凹円板形による影響や、赤血球とは異なるP₅₀ (HbV : 13-16 Torr、赤血球 : 28 Torr) が結合定数に影響した可能性もある。

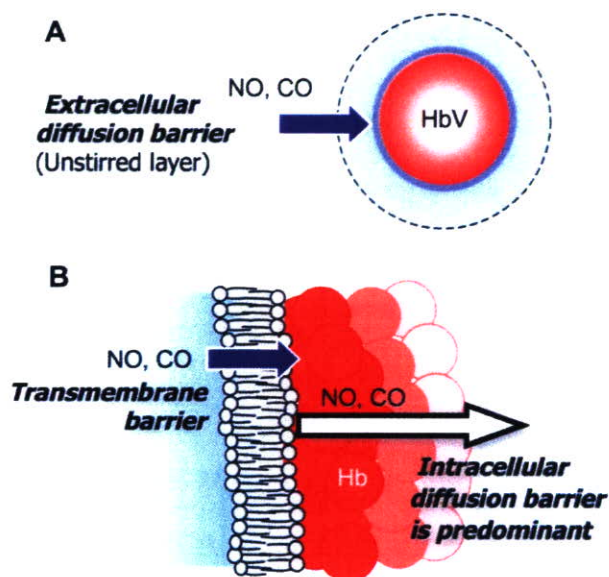


Fig. 7. Proposed mechanism of retardation of gas binding by encapsulated Hbs. (A) It has been suggested that an unstirred layer near the outer surface of a cell would become an extracellular diffusion barrier to retard ligand bindings. However, our experimental results and computer simulations suggest that this is not a major process for retardation of ligand bindings in the case of HbV. (B) The phospholipid bilayer membrane cannot have any barrier function to gas diffusion because the apparent binding rate constants of both NO and CO at $[\text{Hb}]_{in} = 1 \text{ g/dl}$ were close to those of an acellular Hb solution, as shown in Fig. 4. We propose that the determinant factor of retardation should be the intracellular diffusion barrier in the case of HbV, which was induced by (i) intrinsically larger binding rate constant of NO to a heme in an Hb molecule, (ii) numerous hemes as sites of gas entrapment at a higher $[\text{Hb}]_{in}$, (iii) a slowed gas diffusion in the intracellular viscous Hb solution, and (iv) a longer gas diffusion distance in a larger capsule.

配位子結合の遅延と粒径の相関について、興味深いことに粒径の閾値があることが示された(Fig. 4.9)。CO結合に関する粒径の閾値は、NO結合の場合よりも大きかった。COの結合速度はNOよりも遅

いので、細胞内の拡散障壁が引き起こされる粒径がより大きくなったものと考えられる。閾値よりも小さい粒子に関しては、配位子結合の素反応が律速段階であり、閾値よりも大きい粒子では、ガスの拡散が律速段階となる。ここで注目すべきは、内包Hb濃度が1 g/dlのHbVにおいても粒径の閾値がみられ(NO結合、1000 nm; CO結合、2000 nm)、遅延が予測されたということである。

Hbの内包によるNO結合の遅延だけでは、静脈投与のHbV(粒径250 nm)が血管収縮を生起しない現象を十分に説明することはできない。HbVの $k'_{on}(\text{NO})$ は、赤血球よりも一桁大きいからである。通常、赤血球は微小血管の中心側を流れ、管壁近傍に形成される血漿層(cell-free layer)がNO拡散の障壁となるのとは対照的に、人工酸素運搬体は血漿層に均一分散し血管壁近傍を流れるので、よりNOを捕捉し易い状態にある。Rohlfisらは、各種修飾Hb(分子径: 6–28 nm)のNO結合反応速度定数 $k'_{on}(\text{NO})$ をレーザーフラッシュホトリシス法で測定したが、全てHbの k_{on} ($3.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)と殆ど変わらなかった。この結果はFig. 7のシミュレーションの結果(粒径50 nm未満の k'_{on} は殆ど同じ)とも一致する。 $k'_{on}(\text{NO})$ が同じの各種修飾Hbによる50%血液交換を実施したところ、血管収縮を生起するものと生起しないものがあったことから、彼らは $k'_{on}(\text{NO})$ と血管収縮に相関が無いと結論付けている。また、他のメカニズムとして分子識別や酸素親和性との相関も提案されている。しかし我々は、血管内皮細胞層を透過できるかできないかといった、もう一つの粒径の閾値の存在を提案している。血管内平滑筋近傍にまで到達し、内皮細胞が産生するNOを捕捉し血管弛緩機能を低下させるか否かを定める粒径であり、これが血管収縮の有無を決定する因子の一つと考えられる。投与した人工酸素運搬体によって生起する血管収縮(血圧亢進)を抑制する「鍵」は、Olsonらが提唱する「NO結合反応の遅延(NO親和性の減少)」と、「粒径の増大」の両方と考える。我々は、さらに、人工酸素運搬体の血管

(円筒管)内での流動特性の違いがNO、CO結合反応を遅延する一因になっているのではないかと考え、更に研究を進めているところである。

D. 結論

本研究では、ストップドフロー法とコンピュータシミュレーションから、HbVおよび赤血球のNO、COの反応性の特徴について明らかにすることができた。具体的には、次の通り。

- 1) HbVのNO結合速度には、粒子内の拡散障壁が大きく寄与しており、脂質二分子膜の寄与は無いことが明らかとなった。
- 2) HbVのCO結合速度は素反応が律速段階であることが明らかとなったが、粒径が500 nm以上となると細胞内拡散障壁による結合反応の遅延が生じることが示唆された。
- 3) HbVに関して明らかとなった配位子結合反応のメカニズムは、赤血球の配位子結合反応のメカニズムにも適応できると推測された。

(謝辞) 本研究の推進にあたり、武岡 真司 教授、院生の 佐藤 敦 君(早大理工学術院)の協力を得た。また、シミュレーションについては、増田薫 氏(コベルコ科研)の協力を得た。

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. Sinovcic, H. Sakai, E. Tsuchida, M. Leunig, A. Banic, D. Ermi, Hemoglobin vesicles reduce