

quantities sufficient for clinical trials. Sterilization of the hemoglobin prior to encapsulation is performed using heat, and antioxidants are co-encapsulated to retard hemoglobin oxidation. Oxygen affinity is regulated to any desired P50 by co-encapsulation of allosteric effectors, and this group has contributed important studies

on the effect of different P50 on oxygen delivery to tissues by HbV. The product is claimed to be stable when stored for up to 2 years.

A commercial effort has been launched in Japan, and it is hoped that HbV could be in human clinical trials within the next few years.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly supported by Health Sciences Research Grants (Research on Regulatory Science), the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. The authors gratefully acknowledge Professor Suematsu and Doctors H. Horinouchi, M. Watanabe, Y. Izumi and E. Ikeda (Keio University), Doctor H. Ikeda (Hokkaido Red Cross Blood Center, Sapporo), Doctor M. Takaori (Higashitakarazuka Satoh Hospital), Professor M. Intaglietta (University of California, San Diego), Professor W. T. Phillips (University of Texas, San Antonio), Doctor D. Erni (Inselspital University Hospital, Berne) and their active colleagues for the meaningful discussions and contributions to this research.

REFERENCES

- Abe, H., Ikebuchi, K., Hirayama, J. *et al.* (2001). Virus inactivation in hemoglobin solution by heat treatment. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.*, **29**, 381–388.
- Bangham, A. D. and Horne, R. W. (1964). Negative staining of phospholipids and their structure modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.*, **8**, 660–668.
- Chang, T. M. S. (1991). Blood substitutes based on modified hemoglobin prepared by encapsulation or crosslinking: an overview. *Biomat. Artif. Cells 'Immob. Biotech.*, **20**, 159–182.
- Chung, J. E., Hamada, K., Sakai, H. *et al.* (1995). Ligand exchange reaction of carbonylhemoglobin to oxyhemoglobin in a hemoglobin liquid membrane. *Nippon Kagaku Kaishi*, **1995**, 123–127.
- Cliff, R.O., Kwasiborski, V. and Rudolph, A.S. (1995). A comparative study of the accurate measurement of endotoxin in liposome encapsulated hemoglobin. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.*, **23**, 331–336.
- Contaldo, C., Schramm, S., Wettstein, R. *et al.* (2003). Improved oxygenation in ischemic hamster flap tissue is correlated with increasing hemodilution with Hb vesicles and their O₂ affinity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**, H1140–H1147.
- Djordjevich, L. and Miller, I. F. (1977). Lipid encapsulated hemoglobin as a synthetic erythrocyte. *Fed. Proc.*, **36**, 567.
- Erni, D., Wettstein, R., Schramm, S. *et al.* (2003). Normovolemic hemodilution with hemoglobin vesicle solution attenuates hypoxia in ischemic hamster flap tissue. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **284**, H1702–H1709.
- Fukutomi, I., Sakai, H., Takeoka, S. *et al.* (2002). Carbonylation of oxyhemoglobin solution using a membrane oxygenator. *J. Artif. Organs*, **5**, 102–107.
- Goda, N., Suzuki, K., Naito, M. *et al.* (1998). Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J. Clin. Invest.*, **101**, 604–612.
- Harmon, P., Cabral-Lilly, D., Reed, R. A. *et al.* (1997). The release and detection of endotoxin from liposomes. *Anal. Biochem.*, **250**, 139–146.
- Huang, Y., Takeoka, S., Sakai, H. *et al.* (2002). Complete deoxygenation from a hemoglobin solution by an electrochemical method and heat treatment for virus inactivation. *Biotechnol. Progr.*, **18**, 101–107.
- Ito, T., Fujihara, M., Abe, H. *et al.* (2001). Effects of poly(ethyleneglycol)-modified hemoglobin vesicles on N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced responses of polymorphonuclear neutrophils *in vitro*. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.*, **29**, 427–437.
- Izumi, Y., Sakai, H., Hamada, K. *et al.* (1996). Physiologic responses to exchange transfusion with hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier in anesthetized rats: changes in mean arterial pressure and renal cortical oxygen tension. *Crit. Care Med.*, **24**, 1869–1873.
- Izumi, Y., Sakai, H., Takeoka, S. *et al.* (1997). Evaluation of the capabilities of a hemoglobin vesicle as an artificial oxygen carrier in a rat exchange transfusion model. *Am. Soc. Artif. Int. Organs J.*, **43**, 289–297.
- Kai, T., Kida, Y., Fukutomi, I. *et al.* (2004). Development of totally synthetic oxygen carriers. *Artif. Blood*, **13**, 34–41.
- Kerwin, B. A., Akers, M. J., Apostol, I. *et al.* (1999). Acute and long-term stability studies of deoxy hemoglobin and characterization of ascorbate-induced modifications. *J. Pharm. Sci.*, **88**, 79–88.

- Klibanov, A. L., Maruyama, K., Torchilin, V. P. and Huang, L. (1990). Amphipathic polyethylene glycol effectively prolongs the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.*, **268**, 235–237.
- Kobayashi, K., Izumi, Y., Yoshizu, A. *et al.* (1997). The oxygen carrying capability of hemoglobin vesicles evaluated in rat exchange transfusion models. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.*, **25**, 357–366.
- Levin, J. and Bang, F. B. (1964). The role of endotoxin in the extracellular coagulation of limulus blood. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **115**, 265–274.
- Levy, A., Zhang, L. and Rifkind, J. M. (1988). Hemoglobin: a source of superoxide radical under hypoxic conditions. *Oxy-radicals Mol. Pathol. Proc. Upjohn-UCLA Symp.*, 11–25.
- Murray, J. A., Ledlow, A., Launspach, J. *et al.* (1995). The effects of recombinant human hemoglobin on esophageal motor function in humans. *Gastroenterology*, **109**, 1241–1248.
- Naito, Y., Fukutomi, I., Masada, Y. *et al.* (2002). Virus removal from hemoglobin solution using Planova membrane. *J. Artif. Organs*, **5**, 141–145.
- Ogata, Y., Goto, H., Kimura, T. and Fukui, H. (1997). Development of neo red cells (NRC) with the enzymatic reduction system of methemoglobin. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.*, **25**, 417–427.
- Page, T. C., Light, W. R., McKay, C. B. and Hellums, J. D. (1998). Oxygen transport by erythrocyte/hemoglobin solution mixtures in an *in vitro* capillary as a model of hemoglobin-based oxygen carrier performance. *Microvasc. Res.*, **55**, 54–66.
- Richardson, E. C., Banerji, B., Seid, R. C. Jr *et al.* (1983). Interactions of lipid A and liposome-associated lipid A with *Limulus polyphemus* amoebocytes. *Infect. Immun.*, **39**, 1385–1391.
- Rudolph, A. S., Klipper, R. W., Goins, B. and Phillips, W. T. (1991). *In vivo* biodistribution of a radiolabeled blood substitute: ^{99m}Tc-labeled liposome-encapsulated hemoglobin in an anesthetized rabbit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10976–10980.
- Sakai, H., Takeoka, S., Yokohama, H. *et al.* (1993). Purification of concentrated Hb using organic solvent and heat treatment. *Protein Expr. Purif.*, **4**, 563–569.
- Sakai, H., Hamada, K., Takeoka, S. *et al.* (1996). Physical properties of hemoglobin vesicles as red cell substitutes. *Biotechnol. Progr.*, **12**, 119–125.
- Sakai, H., Takeoka, S., Park, S. I. *et al.* (1997). Surface-modification of hemoglobin vesicles with poly(ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90 per cent-exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjug. Chem.*, **8**, 23–30.
- Sakai, H., Tsai, A. G., Kerger, H. *et al.* (1998). Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with red cell substitutes consisting of polyethylene glycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J. Biomed. Mater. Res.*, **40**, 66–78.
- Sakai, H., Tsai, A. G., Rohlf, R. J. *et al.* (1999). Microvascular responses to hemodilution with Hb vesicles as red cell substitutes: influences of O₂ affinity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **276**, H553–H562.
- Sakai, H., Hara, H., Yuasa, M. *et al.* (2000a). Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **279**, H908–H915.
- Sakai, H., Yuasa, M., Onuma, H. *et al.* (2000b). Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: objective comparison between cellular and acellular types. *Bioconjug. Chem.*, **11**, 56–64.
- Sakai, H., Tomiyama, K., Sou, K. *et al.* (2000c). Poly(ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconjug. Chem.*, **11**, 425–432.
- Sakai, H., Onuma, H., Umeyama, M. *et al.* (2000d). Photo-reduction of methemoglobin by irradiation in near-ultraviolet region. *Biochemistry*, **39**, 14595–14602.
- Sakai, H., Horinouchi, H., Tomiyama, K. *et al.* (2001). Hemoglobin vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. *Am. J. Pathol.*, **159**, 1079–1088.
- Sakai, H., Masada, Y., Takeoka, S. and Tsuchida, E. (2002a). Characteristics of bovine hemoglobin as a potential source of hemoglobin vesicles for an artificial oxygen carrier. *J. Biochem.*, **131**, 611–617.
- Sakai, H., Takeoka, S., Wettstein, R. *et al.* (2002b). Systemic and microvascular responses to the hemorrhagic shock and resuscitation with Hb vesicles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283**, H1191–H1199.
- Sakai, H., Tomiyama, K., Masada, Y. *et al.* (2003a). Pretreatment of serum containing Hb vesicles (oxygen carriers) to avoid their interference in laboratory tests. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **41**, 222–231.
- Sakai, H., Suzuki, Y., Kinoshita, M. *et al.* (2003b). O₂ release from Hb vesicles evaluated using an artificial, narrow O₂-permeable tube: comparison with RBCs and acellular Hbs. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**, H2543–H2551.
- Sakai, H., Horinouchi, H., Masada, Y. *et al.* (2004a). Hemoglobin vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. *Crit. Care Med.*, **32**, 539–545.
- Sakai, H., Horinouchi, H., Masada, Y. *et al.* (2004b). Metabolism of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model. *Biomaterials*, **25**, 4317–4325.
- Sakai, H., Masada, Y., Horinouchi, H. *et al.* (2004c). Physiologic capacity of reticuloendothelial system for degradation of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, **311**, 874–884.
- Sakai, H., Masada, Y., Onuma, H. *et al.* (2004d). Reduction of methemoglobin via electron transfer from photoreduced flavin: restoration of O₂-binding of

- concentrated hemoglobin solution co-encapsulated in phospholipid vesicles. *Bioconjug. Chem.*, **15**, 1037–1045.
- Sakai, H., Hisamoto, S., Fukutomi, I. *et al.* (2004e). Detection of lipopolysaccharide in hemoglobin vesicles by *Limulus amoebocyte* lysate test with kinetic-turbidimetric gel clotting analysis and pretreatment of surfactant. *J. Pharm. Sci.*, **93**, 310–321.
- Shirasawa, T., Izumizaki, M., Suzuki, Y. *et al.* (2003). Oxygen affinity of hemoglobin regulates O₂ consumption, metabolism, and physical activity. *J. Biol. Chem.*, **278**, 5035–5043.
- Sou, K., Naito, Y., Endo, T. *et al.* (2003a). Effective encapsulation of proteins into size-controlled phospholipid vesicles using freeze-thawing and extrusion. *Biotechnol. Progr.*, **19**, 1547–1552.
- Sou, K., Klipper, R., Goins, B. *et al.* (2005). Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **312**, 702–709.
- Takeoka, S., Sakai, H., Nishide, H. and Tsuchida, E. (1993). Preparation conditions of human hemoglobin vesicles covered with lipid membranes. *Jpn J. Artif. Organs*, **22**, 566–569.
- Takeoka, S., Terase, K., Sakai, H. *et al.* (1994a). Interaction between phospholipid assemblies and hemoglobin (Hb). *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, **A31**, 97–108.
- Takeoka, S., Sakai, H., Terase, K. *et al.* (1994b). Characteristics of Hb vesicles and encapsulation procedure. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.*, **22**, 861–866.
- Takeoka, S., Ohgushi, T., Terase, K. and Tsuchida, E. (1996). Layer-controlled hemoglobin vesicles by interaction of hemoglobin with a phospholipid assembly. *Langmuir*, **12**, 1755–1759.
- Takeoka, S., Sakai, H., Kose, T. *et al.* (1997). Methemoglobin formation in hemoglobin vesicles and reduction by encapsulated thiols. *Bioconjug. Chem.*, **8**, 539–544.
- Takeoka, S., Teramura, Y., Atoji, T. and Tsuchida, E. (2002). Effect of Hb-encapsulation with vesicles on H₂O₂ reaction and lipid peroxidation. *Bioconjug. Chem.*, **13**, 1302–1308.
- Teramura, Y., Kanazawa, H., Sakai, H. *et al.* (2003). The prolonged oxygen-carrying ability of Hb vesicles by co-encapsulation of catalase *in vivo*. *Bioconjug. Chem.*, **14**, 1171–1176.
- Tsuchida, E. (ed.) (1995). *Artificial Red Cells: Materials, Performances, and Clinical Study as Blood Substitutes*. John Wiley, New York.
- Tsuchida, E. (ed.) (1998). *Blood Substitutes: Present and Future Perspectives*. Elsevier, Chichester.
- Vandegriff, K. D. and Olson, J. S. (1984). The kinetics of O₂ release by human red blood cells in the presence of external sodium dithionite. *J. Biol. Chem.*, **259**, 12609–12618.
- Wakamoto, S., Fujihara, M., Abe, H. *et al.* (2001). Effects of poly(ethyleneglycol)-modified hemoglobin vesicles on agonist-induced platelet aggregation and RANTES release *in vitro*. *Artif. Cells Blood Subst. Immob. Biotech.*, **29**, 191–201.
- Wang, L., Morizawa, K., Tokuyama, S. *et al.* (1992). Modulation of oxygen-carrying capacity of artificial red cells (ARC). *Polymer Adv. Technol.*, **4**, 8–11.
- Yamazaki, M., Aeba, R. and Yozu, R. (2004). Feasibility test of artificial red cells as a priming solution for the extracorporeal membrane oxygenator. *Artif. Blood*, **12**, 45 (abstract).
- Yoshioka, H. (1991). Surface modification of haemoglobin-containing liposomes with poly(ethylene glycol) prevents liposome aggregation in blood plasma. *Biomaterials*, **12**, 861–864.
- Yoshizu, A., Izumi, Y., Park, S. I. *et al.* (2004). Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier hemoglobin vesicle (HbV) maintains intestinal perfusion and suppresses the increase in plasma necrosis factor alpha (TNF α). *Am. Soc. Artif. Int. Organs J.*, **50**, 458–463.

第5章 人工赤血球

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

1 輸血代替の必要性

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

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

* 2 Keitaro Sou 早稲田大学 理工学総合研究センター 講師

* 3 Shinji Takeoka 早稲田大学 理工学術院 教授

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

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

2 赤血球構造 (膜) の重要性

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

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

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

3 ヘモグロビン小胞体の構成

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

第5章 人工赤血球

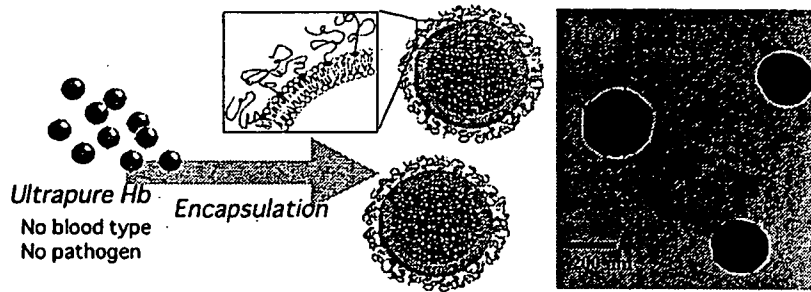


図1 ヘモグロビン小胞体

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

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

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

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

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

4 ヘモグロビン小胞体による酸素輸送効果

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

4.1 血液希釈

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

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

第5章 人工赤血球

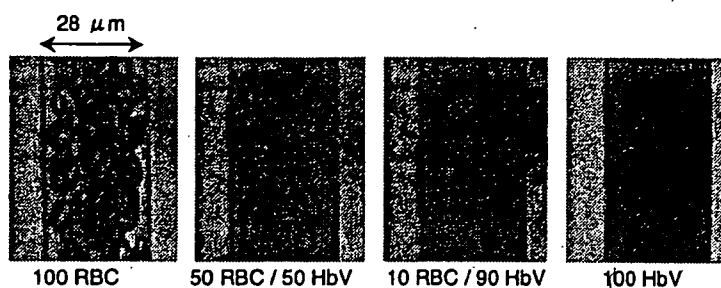


図2 微小モデル血管（内径28 μm ）を流動するHb小胞体と赤血球の混合液

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

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

4.2 出血ショック蘇生液

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

4.3 低酸素領域への酸素輸送

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

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

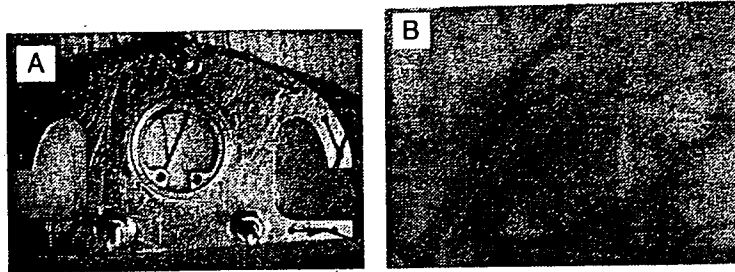


図3 ハムスター皮下微小循環観察モデルと、Hb小胞体投与後の微小循環動態
(A) 体重約60gのハムスター背部皮膚に硝子製の窓枠を装填することにより、顕微鏡下、細動静脈、毛細血管内の赤血球の流動状態や血管径、組織酸素分圧の観察が可能と成る。

(B) この動物実験モデルを用い、覚醒下PEG鎖で修飾したHb小胞体で循環血液量の80%を交換すると、Hb小胞体が血漿中に均一分散しているので、毛細管の形状が見える。PEGで修飾しないと、凝集体が多数観測された³¹⁾。

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

5 ヘモグロビン小胞体の安全度

5.1 血液適合性

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

第5章 人工赤血球

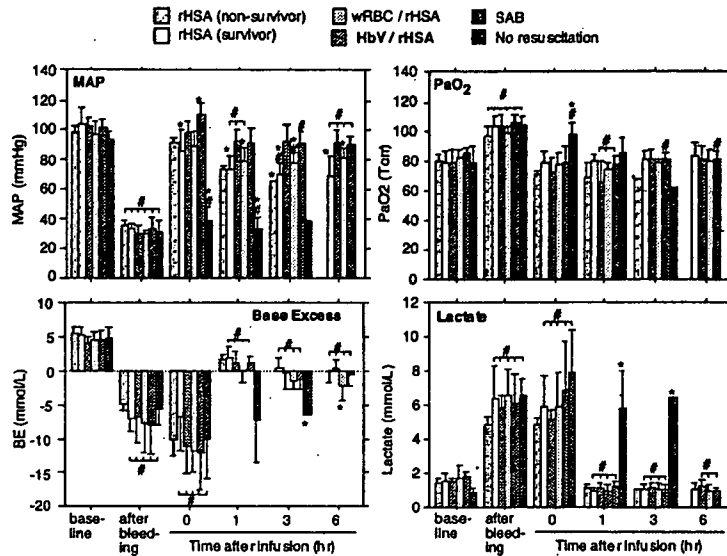


図4 Hb小胞体による出血ショック蘇生試験

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

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

5.2 循環動態の恒常性

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

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

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

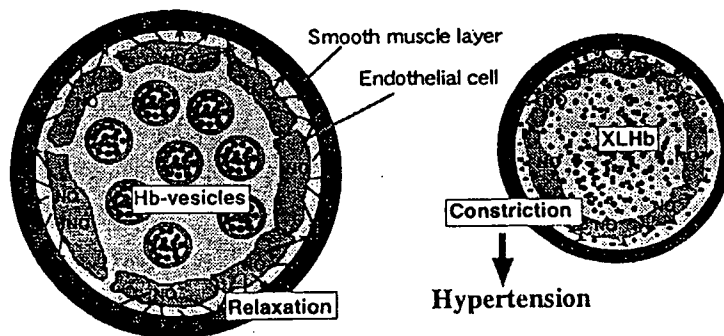


図 5 修飾ヘモグロビン投与による血管収縮の機序

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

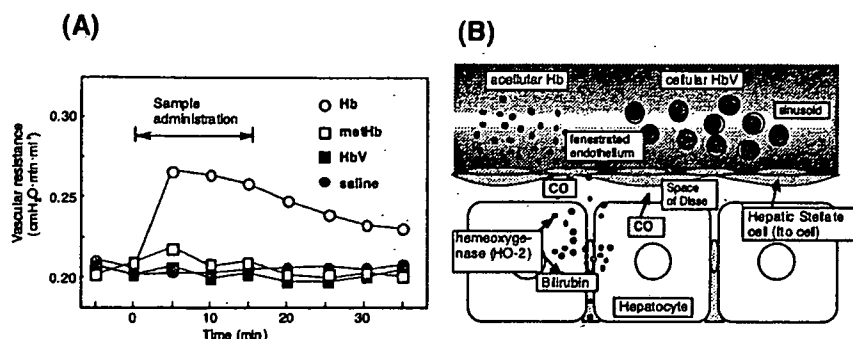


図6 肝の微小循環動態とHb代謝

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

5.3 代謝過程

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

5.4 反復投与試験

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



図7 ヘモグロビン小胞体の代謝過程

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

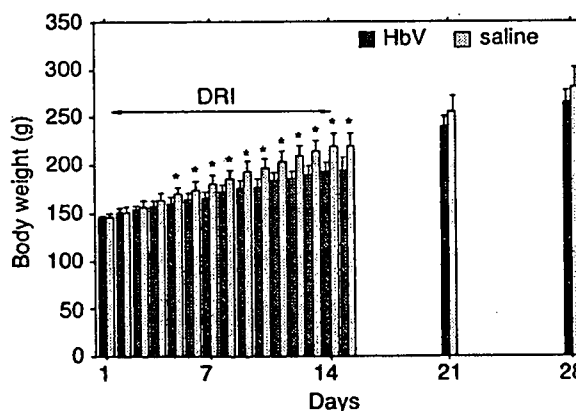


図8 ヘモグロビン小胞体の反復投与試験

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

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

6 おわりに

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

謝辞

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

文 献

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

医療用マテリアルと機能膜

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

医療用マテリアルと機能膜

2005年5月31日 第1刷発行

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

[印刷 倉敷印刷株式会社]

© A. Higuchi, 2005

落丁・乱丁本はお取替えいたします。

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

ISBN4-88231-503-3 C3043 ¥65000E



Association of nicotinic acetylcholine receptors with central respiratory control in isolated brainstem-spinal cord preparation of neonatal rats

EIKI HATORI¹, SHIGEKI SAKURABA¹, MASANORI KASHIWAGI^{1,2}, JUNYA KURIBAYASHI¹, MIKI TSUJITA¹, YUKI HOSOKAWA¹, JUNZO TAKEDA¹ and SHUN-ICHI KUWANA³

¹ Department of Anesthesiology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan.

² Department of Anesthesiology, Kitasato Institute Hospital, The Kitasato Institute, Tokyo, Japan.

³ Department of Physiology, School of Medicine, Teikyo University, Tokyo, Japan.

ABSTRACT

Nicotine exposure is a risk factor in several breathing disorders. Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) exist in the ventrolateral medulla, an important site for respiratory control. We examined the effects of nicotinic acetylcholine neurotransmission on central respiratory control by addition of a nAChR agonist or one of various antagonists into superfusion medium in the isolated brainstem-spinal cord from neonatal rats. Ventral C4 neuronal activity was monitored as central respiratory output, and activities of respiratory neurons in the ventrolateral medulla were recorded in whole-cell configuration. RJR-2403 (0.1-10 μ M), α 4 β 2 nAChR agonist induced dose-dependent increases in respiratory frequency. Non-selective nAChR antagonist mecamylamine (0.1-100 μ M), α 4 β 2 antagonist dihydro- β -erythroidine (0.1-100 μ M), α 7 antagonist methyllycaconitine (0.1-100 μ M), and α -bungarotoxin (0.01-10 μ M) all induced dose-dependent reductions in C4 respiratory rate. We next examined effects of 20 μ M dihydro- β -erythroidine and 20 μ M methyllycaconitine on respiratory neurons. Dihydro- β -erythroidine induces hyperpolarization and decreases intraburst firing frequency of inspiratory and preinspiratory neurons. In contrast, methyllycaconitine has no effect on the membrane potential of inspiratory neurons, but does decrease their intraburst firing frequency while inducing hyperpolarization and decreasing intraburst firing frequency in preinspiratory neurons. These findings indicate that α 4 β 2 nAChR is involved in both inspiratory and preinspiratory neurons, whereas α 7 nAChR functions only in preinspiratory neurons to modulate C4 respiratory rate.

Key terms: brainstem-spinal cord, neonatal rat, inspiratory neuron, preinspiratory neuron, nicotinic acetylcholine receptor.

INTRODUCTION

In central respiratory control, chemosensitive neurons in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) are thought to provide tonic drive to the neuronal network (Eugenin and Nicholls, 1997; Richerson, 1998; Eugenin et al., 2001), which mainly comprises inspiratory (Insp) neurons and preinspiratory (Pre-I) neurons involved in the generation of respiratory rhythm (Onimaru and Homma, 1987, 2003; Onimaru et al., 1988, 1989, 1997).

Acetylcholine (ACh) is an excitatory neurotransmitter that functions in central respiratory control (Murakoshi et al., 1985; Monteau et al., 1990; Burton et al., 1995; Shao and Feldman, 2000, 2001, 2002, 2005), including central chemosensitivity (Monteau et al., 1990; Burton et al., 1997; Eugenin and Nicholls, 1997; Eugenin et al., 2001; Okada et al., 2001; Sakuraba et al., 2005). Both muscarinic and nicotinic ACh receptors have been shown to participate in the cholinergic mechanisms that help regulate respiratory rhythm.

Corresponding author: Shun-ichi Kuwana, Ph.D, Department of Physiology, School of Medicine, Teikyo University, 2-11-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8605, Japan, Tel: (81-3) 3964-1211, ext. 2141, Fax: (81-3) 5248-1415, E-mail: kuwanas@med.teikyo-u.ac.jp

Received: November 2, 2005. In revised form: February 3, 2006. Accepted: March 1, 2006

Maternal cigarette smoking is indicated as a major dose-dependent risk factor in sudden infant death syndrome (Blair et al., 1996). Prenatal nicotine exposure also has been linked to a high incidence of apnea and altered breathing pattern in neonatal rodent (Robinson et al., 2002; Huang et al., 2004), although the contribution of nicotinic ACh receptors (nAChRs) to central respiratory activity remains imperfectly understood.

In the RVLM, which includes central respiratory control, nAChRs comprising $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ are expressed (Wada et al., 1989; Dominguez del Toro et al., 1994). In medullary slice preparations from neonatal rats that generate respiratory rhythm (Smith et al., 1991), nicotine induces increases in respiratory frequency and activations of inspiratory neuron (Shao and Feldman, 2001). These increases are antagonized by $\alpha 4\beta 2$ nicotinic antagonist dihydro- β -erythroidine (DH- β -E), while $\alpha 7$ antagonist α -bungarotoxin (α -BgTx) and methyllycaconitine (MLA) have no effects on nicotine-induced respiratory activation (Shao and Feldman, 2002). These findings suggest that the predominant subtype of nAChR involved in central respiratory control is the $\alpha 4\beta 2$ combination, not the homomeric $\alpha 7$ subunit. However, these studies were conducted in medullary slice preparations, in which the Pre-I neuron network is absent. This may be significant as Pre-I neurons have been shown to act as a source of respiratory rhythm generation and to trigger periodic activity in inspiratory neuron network in brainstem-spinal cord preparations of neonatal rats (Onimaru et al., 1988, 1989, 1997; Onimaru and Homma, 2003).

Recent studies have indicated that both Pre-I neurons and Insp neurons are essential for respiratory rhythmogenesis in brainstem-spinal cord preparations (Takeda et al., 2001; Mellen et al., 2003; Sakuraba et al., 2003). In a previous study, we found that neuromuscular blocking agents (NMBAs), which function as muscular nAChR antagonists, exert their inhibitory effects on Pre-I neurons (Sakuraba et al., 2003). This finding led us to hypothesize that some

subtypes of nAChRs might participate in the modulation of respiratory activities, such as rhythm generation, in the central respiratory network, comprising both Pre-I and Insp neurons. However, in brainstem-spinal cord preparations of neonatal rats in which the complete central respiratory network remains intact, it has been reported that the application of individual nAChR antagonists, such as the ganglion blocker mecamylamine (Meca) or the NMBA gallamine, does not affect C4 respiratory rate (Monteau et al., 1990).

In the present study, we reevaluate the effects of the sole application of nAChR antagonist and agonist on C4 respiratory rate in an attempt to clarify which subtypes of nAChRs participate in the central respiratory network comprising both Pre-I and Insp neurons.

MATERIALS AND METHODS

All procedures were conducted in accordance with the guidelines set forth by the scientific committee of Teikyo University. Data were obtained from 147 neonatal rats (0-4 days old, Wistar rats).

Isolated brainstem-spinal cord preparation

The isolated brainstem-spinal cord has been described in detail elsewhere (Kuwana et al., 1998; Sakuraba et al., 2003). In brief, the rats were deeply anesthetized with diethyl ether, and the brainstem and cervical spinal cord were isolated in a chamber filled with oxygenated artificial cerebrospinal fluid (ACSF). The cerebellum and pons were ablated. The preparation was transferred to a 2-ml recording chamber and fixed, ventral side up, to a silicon rubber base with miniature pins. The preparation was superfused at 26°C in control ACSF equilibrated with a control gas mixture (5 % CO₂ in O₂; pH = 7.4). The activity of C4 ventral roots was recorded using a glass suction electrode, amplified by a conventional AC amplifier (AVH 11, Nihon Kohden, Tokyo, Japan), and integrated (time constant 100 msec). Signals were

recorded on a thermal array recorder and stored on digital tape for subsequent analysis. The control ACSF was replaced by various ACSF solutions, as determined by the protocols described below.

Neuronal recording

The intracellular activity of Insp and Pre-I neurons in the superficial (< 400 μm) RVLM was recorded using a perforated patch clamp (Kuwana et al., 1998; Sakuraba et al., 2003). Neurons were identified and classified on the basis of their firing patterns and the temporal correlation of their activity to the respiratory cycle of the C4 ventral root activity (Onimaru et al., 1997; Sakuraba et al., 2003). Insp neurons discharge action potentials during the inspiratory phase (C4 burst activity phase). Pre-I neurons are characterized by preinspiratory and postinspiratory action potential discharges. A glass pipette (GC100-TF-10, Clark, Reading, UK) was pulled using a horizontal puller (PA-91, Narishige, Tokyo, Japan) to a tip size of approximately 2 μm . Electrode resistance ranged from 12 to 16 M Ω when the pipette was filled with a solution containing (in mM) 140 K-gluconate, 3 KCl, 10 EGTA, 10 HEPES, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, and nystatin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). pH was maintained at 7.2-7.3 using KOH. The micropipette was inserted into the RVLM using a manual hydraulic micromanipulator. Membrane potentials were recorded using a single-electrode voltage clamp amplifier (CEZ 3100, Nihon Kohden, Tokyo, Japan). Neurons were located by applying positive pressure (10-20 cm H₂O) inside the pipette. After a gigaohm seal was obtained, the recorded membrane potential gradually became negative and stabilized in about 10 min. The membrane potential (E_m) was presented without correcting the liquid junction potential. The resulting perforated patch recording remained stable for more than 60 min.

Protocols

After the preparation was superfused with control ACSF for at least 30 min and the C4 activity reached a steady state, the control

ACSF was replaced by several ACSF solutions containing nicotinic antagonist or agonist in accordance with the protocol. Mecamylamine hydrochloride (Meca, non-selective nAChR antagonist), dihydro- β -erythroidine hydrobromide (DH- β -E, $\alpha 4\beta 2$ nAChR antagonist), methyllycaconitine citrate (MLA, $\alpha 7$ nAChR antagonist), α -bungarotoxin (α -BgTx, $\alpha 7$ nAChR antagonist), and RJR-2403 hemigalactarate (RJR, $\alpha 4\beta 2$ nAChR agonist) were purchased from Sigma-Aldrich corporation (St. Louis, Missouri, USA). Experiments were conducted under the protocols described below.

Protocol-1: Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit and C4 respiratory rate

We analyzed the effects of a nAChR agonist and several antagonists on C4 respiratory rate. After making a baseline recording, the control ACSF was replaced by ACSF containing Meca, DH- β -E, MLA (0.1, 1, 10, 100 μM), α -BgTx (0.01, 0.1, 1.0 μM) or RJR (0.1, 1.0, 10 μM) for 10 min, followed by a washout period using the control ACSF for 10 min.

Protocol-2: Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit and respiratory neurons

We analyzed the effects of DH- β -E and MLA on Insp and Pre-I neurons in the RVLM. After the control recording, control ACSF was replaced to ACSF containing DH- β -E or MLA (20 μM) for 10 min, followed by a 10 min washout period in which control ACSF was reintroduced. We examined intraburst firing frequency, drive potential amplitude, and drive potential duration to assess changes in the drive respiratory potential of Insp and Pre-I neurons. Intraburst firing frequency was calculated as the number of spikes per firing period. Drive potential amplitude was defined as the voltage difference between resting E_m in the silent phase of the respiratory cycle and the peak plateau potential (without spikes) during depolarization. Drive potential duration was defined as the duration of the respiratory

neuron depolarization cycle. And depolarizing cycle rate was defined as the number of depolarization per minute.

Statistical analyses

All data before and during the application of drugs were analyzed using the paired-t test. $P < 0.05$ was considered significant. Data are expressed as mean \pm S.E.M.

RESULTS

Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit and C4 respiratory rate

Meca (0.1, 1, 10, 100 μ M), DH- β -E (0.1, 1, 10, 100 μ M) (Fig. 1A), MLA (0.1, 1, 10, 100 μ M) (Fig. 1B), and α -BgTx (0.01, 0.1, 1.0 μ M) all significantly reduced C4 respiratory rate (Table 1; $n = 102$). In contrast, RJR significantly increased C4 respiratory rate (Fig. 1C; Table 1; $n = 21$). These nAChR antagonists and agonists induced no changes in integrated C4 amplitude (data not shown).

Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit and respiratory neurons in RVLM

We analyzed the effects of DH- β -E and MLA on 24 respiratory neurons in RVLM. We classified these neurons into two groups – Insp and Pre-I neurons – based on their firing patterns during perfusion with control ACSF. The application of DH- β -E 20 μ M ($n = 12$) and MLA 20 μ M ($n = 12$) decreased C4 respiratory rate from 5.3 ± 0.6 to $3.4 \pm 0.5 \text{ min}^{-1}$ ($P < 0.01$) and from 4.8 ± 0.4 to $2.8 \pm 0.2 \text{ min}^{-1}$ ($P < 0.01$), respectively.

Effects of DH- β -E and MLA on Insp neurons

DH- β -E and MLA decreased C4 respiratory rate and depolarizing cycle rate in Insp neurons (Fig. 2; Table 2). DH- β -E induced hyperpolarization of E_m and decreased intraburst firing frequency, drive potential duration, and drive potential amplitude during DH- β -E-induced respiratory depression (Fig. 2A; Table 2). MLA

significantly decreased intraburst firing frequency of Insp neurons, but did not induce any changes in E_m , drive potential duration, or amplitude (Fig. 2B; Table 2).

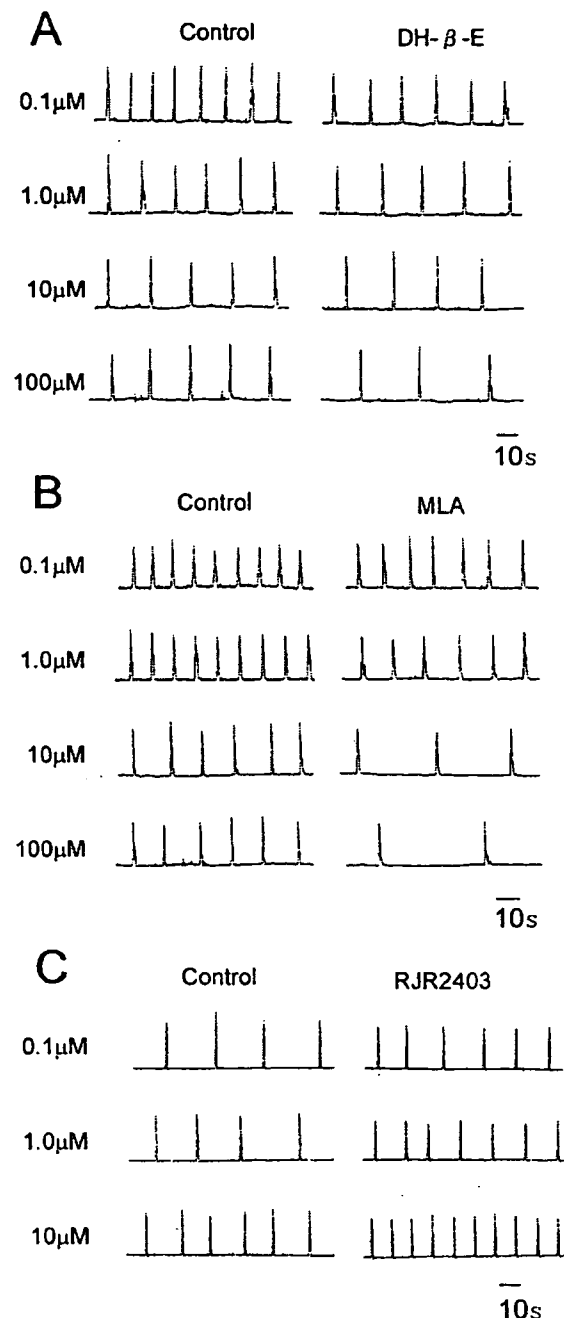


Figure 1: Representative recording of integrated C4 activity before and during the application of (A) DH- β -E (0.1, 1, 10, 100 μ M), (B) MLA (0.1, 1, 10, 100 μ M) and (C) RJR (0.1, 1, 10 μ M).