

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：ヘモグロビン小胞体(HbV)の臨床応用に関する検討

研究分担者 高折 益彦 東宝塚さとう病院 名誉院長
研究協力者 三宅 誠司 大阪府済生会 野江病院検査科

研究要旨

国内、国外のこの分野の研究者と我々の研究成果についての検討から、(1)ヘモグロビン人工酸素運搬体(HbV)ではいかにヘモグロビン自身のメト化を抑制するか、HbV粒子がいかに血管内で軸流とさせるかが問題となった。本研究班の分担研究者を訪問しデータを閲覧し、検討することによって研究の促進を得た。(2)またHbVが用いられる臨床現場を想定した患者血液の電解質測定について検討し、少なくとも今回使用した臨床機器では、HbV投与後の血清 Na^+ 、 Cl^- イオン濃度の測定が不可能であることが明らかとなった。

A. 研究目的

1) 国内、国外の人工酸素運搬体を研究・開発を行っている研究者、ならびに血液レオロジーの研究者に今までに得られたリポソーム内包Hb酸素運搬体(HbV)に関する研究成果を提示し、追加試験すべき諸点への意見を求める。

2) 本研究班の研究者と協議し、研究課題、研究方法、ならびに得られた成績、その解釈の検討を行う。

3) HbVを使用した患者の血液中の電解質測定において従来使用している電極法、ならびに最近使用頻度が高くなってきているドライ化学法との比較検討を行う。

B. 方法

1) 国内外の研究者に対し、それぞれの専門分野に応じた項目について、本研究班での成績（既発表論文、ならびに未発表成果）を郵送し、方法論の妥当性、成績の解釈についての意見を求めた。

2) 研究班会議、学会などの機会以外にも、共同

研究者が所属する施設を訪問、実験などから得られたそのままのデータを詳細に分析、検討した。

3) HbV原液の Na^+ 、 Cl^- イオン濃度をドライケミストリー法（ビトロス 250：V法）と、従来の電極法（TBA-200FR NEO：T法）とで測定するとともに、医療機関の倫理委員会の承認が得られた研究協力者からの血液に、HbV濃度が40%となるように混合、その血漿内の Na^+ 、 Cl^- イオン濃度を測定、両者の測定値を比較した。

C. 研究結果

1) 各研究者からの意見として、(1) HbVの血液中滞留時間と内包されるヘモグロビン(Hb)のメトヘモグロビン化をいかに長く防止するかの指摘、(2) 細網内皮系への貪食を防止する方策、(3) HbVが血液内で軸流を呈するように粒子サイズを大きくする試み、(4) 臨床使用には予期せざる出血への対応のみならず、希釈体外循環での人工心肺回路への充填を選択とすること、などが得られた。

2) 研究班内の研究者との討論、研究計画への参加に関しては、(1) 臨床使用を目的としてのHbVの安全性、有効性を検討するために、希釈式自己血輸血をモデルとした実験計画を作製した。(2) 各種人工膠質液との併用ともなうレオロジー変化の観察計画を作製した。これらの検討から、全臨床試験で施行すべき諸点を補充した。

3) HbV、すなわちHbV粒子浮遊生理食塩液を、V法で測定した場合には、製造証明書にある数値に近い 153 ± 1.3 mEq/Lなる Na^+ の値を得たが、T法にて測定した場合には、 104.3 ± 1.7 mEq/Lなる値を得た。また、 Cl^- 値についてはV法でも予想値より約13 mEq/L低値の 141 ± 1.0 mEq/Lなる値を得た。一方、T法では約40 mEq/L低い 102.5 ± 0.6 mEq/Lなる値を得た。

さらに、研究協力者から得られた血液($\text{Na}^+ = 150 \pm 2.3$ mEq/L, $\text{Cl}^- = 110 \pm 2.0$ Eq/L)にHbVを40%混合になるように添加したものの、 Na^+ 濃度はV法では 148.4 ± 4.8 mEq/Lなる値を得たが、T法では 129.8 ± 5.7 mEq/Lなる値を得た。一方、 Cl^- についてはV法での測定では測定不能との表示を得た。しかしT法では 108.7 ± 3.8 mEq/Lと予測値に近い値を得た。

D. 考察

1) 国内外の研究者からはHbVのような細胞型人工酸素運搬体に対する評価が高いことが示されたので、今後はさらなる基礎的研究を補足する必要性を感じた。

2) 研究班の研究者と個々に討論することによって、より具体的な実験計画の立案を行うことができ、その意義が大きいことが認められた。

3) 血清電解質濃度測定には、従来の電極法を用いても、近年開発されたドライケミストリー法を用いても、HbVが血液に混合された場合には、何

らかの方法でHbV粒子を除去しない限り測定できないことが認められた。またどの程度の混合まで測定可能か検討する必要性が認められた。

E. 結論

現在開発中の人工酸素運搬体: HbVは、十分に臨床使用に対応できるものと判断されるので、速やかに臨床試験第一相に進むべきものと思われた。また、HbVを使用した症例から得られた血液の電解質測定は、従来の電極法(TBA-200FR NEO)、あるいは最近開発されたドライケミストリー法(ビトロス 250)では測定できないことが認められた。

F. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 三宅誠司、大橋康広、高折益彦、ヘモグロビン基剤人工酸素運搬体混入血液での血液型判定 - とくに自動輸血検査器について- 人工血液 15, 85-89 (2007)

(総説・解説)

1. 高折益彦、人工酸素運搬体: その将来への期待. 人工血液 15, 90-98 (2007)

2. 学会発表

1. 高折益彦 / 人工酸素運搬体開発の現状と将来への展望 / 第24回 体液代謝管理研究会 / 東京 / 2008. 1. 31.

分担研究報告書

人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究

分担課題：

1. 小角X線散乱法による高純度・高濃度Hbの分子間相互作用の解析
2. Hb小胞体による膵島保存条件の向上に関する検討
3. Hb小胞体による動物種依存型の疑似アレルギー反応に関する検討

研究分担者	土田 英俊	早稲田大学 理工学研究所 顧問研究員・早大 名誉教授
研究協力者	酒井 宏水	早稲田大学 理工学研究所 准教授
	宗 慶太郎	早稲田大学 理工学研究所 准教授
	佐藤 高彰	信州大学 繊維学部 ファイバーナ/テク国際若手研究者育成拠点 助教 (早稲田大学 理工学研究所 客員研究員)
	小林 紘一	慶應義塾大学 医学部 外科 名誉教授
	藤堂 省	北海道大学大学院 医学研究科 第一外科 教授

研究要旨

(1) Hb小胞体は赤血球と同様に高濃度Hb溶液を内包している。しかしHbが析出や凝集せず均一に存在できる理由は良く知られていない。そこで小角X線散乱法を用い、高濃度Hb溶液中のHb間の相互作用について解析した。その結果、Hb間の弱い引力と、完全に遮蔽されていない弱い静電反発の高度なバランスによって擬似的に剛体球相互作用に近い相互作用ポテンシャルが実現され、球状蛋白質として高濃度でも流動性を失わず、Hbの機能を保持することに寄与していると考えられた。(2) マウス膵島移植モデルにおいて膵島の単離・保存過程でHbVを酸素供給源として用い、移植成績の改善の可能性を明らかにすることを目的とした。移植後の血糖正常化率は、control群の12.2%に対し、HbV添加群では50%と改善傾向を認めた。HbVを用いた積極的な酸素供給により、膵島のviabilityを改善し、さらに移植成績が向上した。HbVを用いた酸素供給は膵島移植において新たな治療戦略になり得るものと考えられた。(3) 実験動物の中でもブタは補体活性による循環動態の著変(疑アナフィラキシー反応)が生じ易いことが良く知られている。そこで、補体活性が生起することが良く知られている脂質(DPPG)から成る小胞体を投与し、生体適合性をみるモデルの作製を行った。

1. 小角X線散乱法による高純度・高濃度Hbの分子間相互作用の解析

A. 緒言

ヘモグロビン小胞体(HbV)は、高純度・高濃度Hb

溶液が被覆層数約1枚のベシクルの内水相中に内包された階層構造を特徴とする。動物投与試験では、高Hb濃度によって十分な酸素運搬効率を達成、蓄積性が無く代謝排泄が容易、NO結合が遅延され血管収縮を生起しないこと等が証明されてきた。

しかし、HbVおよび赤血球が何故Hbが球状蛋白質として35-40 g/dLといった例外的な高濃度領域においても析出したり凝集を生起せず、均一に存在可能なのか、Hbの酸素結合能に影響が無いのかは未だ良く理解されていない。この問題を解明し、Hbの機能性を定量的に理解するための基礎研究として、小角散乱法(SAXS)の最新の測定・分析手法を高濃度Hb溶液に適用し、(1) 結晶構造解析データとの比較による溶液中におけるHbの粒子構造や、(2) 構造因子S(q)分析によるHb間相互作用ポテンシャルの分析に取り組み、精緻に検討した。

B. 方法

1. 試料

Hb溶液は、日本赤十字社より譲渡された期限切れ血液より、加熱処理や限外濾過膜処理により精製した、高純度・高濃度Hb溶液を用いた(40 g/dL, リン酸緩溶液に溶解)。小角散乱曲線の濃度依存性測定のため、適宜、生理食塩水溶液で濃厚試料を希

釈し、濃度を調整した。

2. 小角X線散乱測定

小角散乱測定にはSAXSess (AntonPaar社)を用い、 $0.08 \leq q/\text{nm}^{-1} \leq 10$ の散乱ベクトル領域のデータを分析に用いた。SAXSessカメラは、W3830 封入ガラス管球X線発生源(PANalytical) [Cu-K α (波長=0.1542 nm)], 多層膜グロービュラーミラー、ブロックコリメータ、半透過式ビームストップ、耐真空キャピラリーセル、TCS 120 温度コントローラー、真空ハウジング、イメージプレート検出器を装備する。全ての測定は試料透過後のプライマリービーム強度を規格化することで透過率補正し、標準試料の強度測定より絶対強度補正を行った。

C. 結果および考察

4-1. Hb溶液の小角散乱曲線の濃度依存性

Fig. 1にHb溶液のX線散乱強度 $I(q)$ の濃度依存性のデータを示す。データは光学系補正を行い、散乱ベクトル長 $q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$ の関数として絶対強度でプロットされている。ここで λ はX線(K α 線)の波長、 θ は全散乱角である。Fig. 1下方には小角部分の散乱強度をリニアスケールで表示したものも同時に示した。一般に粒子系の散乱強度 $I(q)$ は n を粒子の数密度、 $P(q)$ を形状因子、 $S(q)$ を構造因子として、

$$I(q) = nP(q)S(q) \quad (1)$$

と表せる。Hb濃度の増加に従い、広角部分($q > 1.5 \text{ nm}^{-1}$)の散乱強度は濃度に比例して単調に増加するが、小角部分($q < 1.0 \text{ nm}^{-1}$)の強度はいったん増加したのち急激に減少(規格化した小角部分の散乱強度 $I(q \rightarrow 0)/c$ は単調減少)し、 $q = 1 \text{ nm}^{-1}$ 付近のピークが顕著になる。前者は(1)式中の散乱体の数密度 n が増加することによる。後者は濃度に依存したHb間の相互作用の効果、言い換えれば、Hbの構造因子 $S(q)$ の効果が高濃度領域で顕著になることに起

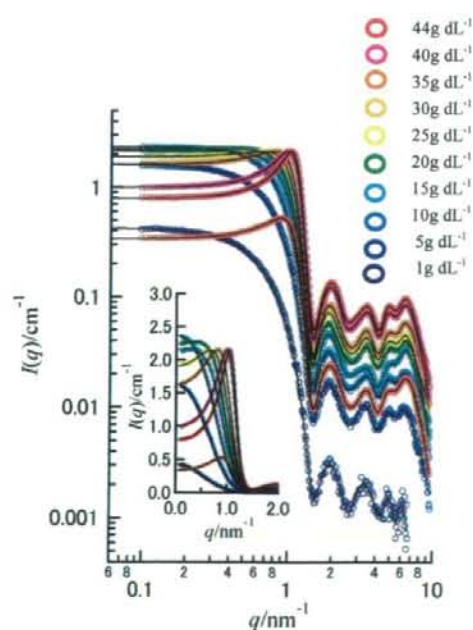


Fig. 1 Hb 溶液の小角散乱曲線の濃度依存性

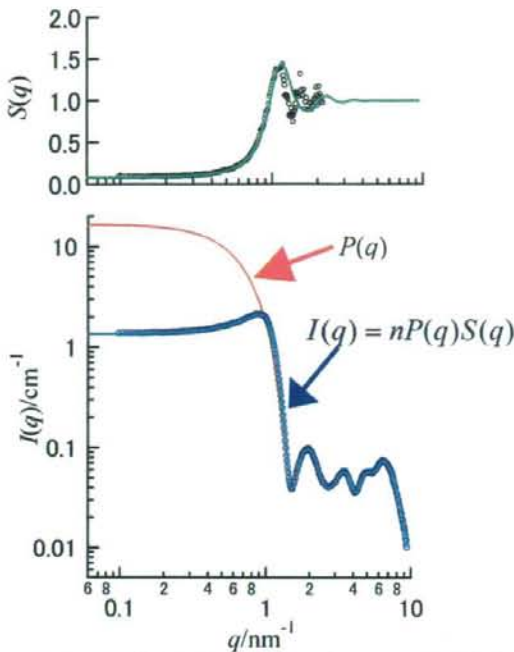


Fig. 2 Hb 溶液の小角散乱曲線の GIFT 分析例 ($c = 35 \text{ g/dL}$)。

因する。

4-2. GIFT 分析と溶液中における Hb の粒子構造
Hb 溶液の散乱曲線の定量評価を GIFT 法: Generalized Indirect Fourier Transformation によって行った。構造因子 $S(q)$ については、電粒子間の相互作用の記

述に適した Yukawa 型の遮蔽クーロンポテンシャル:

$$\beta v(r) = \frac{Z_{\text{eff}}^2 e_0^2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 kT} \cdot \frac{-e^{-\kappa(r-\sigma)}}{r(1+\kappa\sigma/2)^2}; \quad r > \sigma \quad (2)$$

$$= \infty; \quad r < \sigma$$

を仮定し、Rogers-Young 型の closure を用いて、Ornstein-Zernike 方程式を数値的に解くことによって計算した。ここで、 σ は粒子直径、 Z_{eff} は実効電荷である。ここで κ はデバイ遮蔽長の逆数であり、溶媒の静的誘電率 ϵ やイオン強度から、

$$\kappa = \sqrt{\frac{\beta e_0^2}{\epsilon\epsilon_0} \sum_i \rho_i} = \sqrt{\frac{\beta e_0^2}{\epsilon\epsilon_0} (nZ_{\text{eff}} + 2n_s)} \quad (3)$$

と決定される。 n は荷電粒子の数密度、 n_s は余剰な塩の数密度である。

Fig. 2 に GIFT 法による 35 g/dL の Hb の小角散乱曲線の分析例を示す。

構造因子 $S(q)$ については遮蔽クーロンポテンシャルのモデルを仮定したが、形状因子 $P(q)$ については実質的にモデルフリーの分析である。数学的に形状因子 $P(q)$ は二体間距離分布関数 $p(r)$ の Fourier 変換として

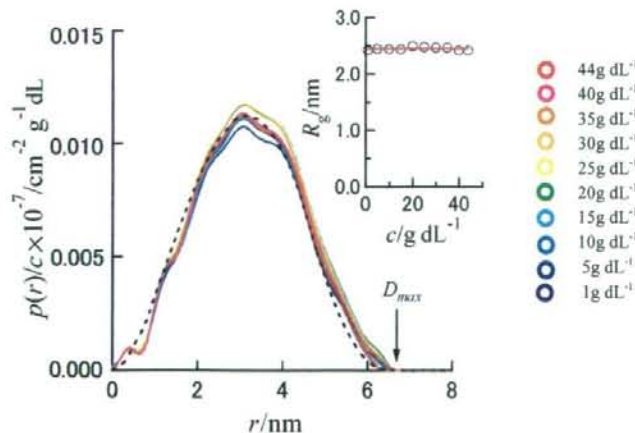


Fig. 3 GIFT 法によって計算された Hb の二体間距離分布関数 $p(r)$ の濃度依存性。破線は結晶構造データ (PDB code: 2DN2) から計算した $p(r)$ 。右上は $P(q)$ より計算した慣性半径 R_g 。

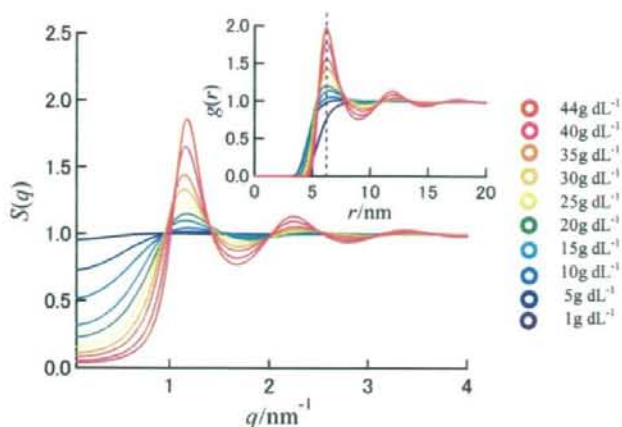


Fig. 4 Hb 溶液の構造因子 $S(q)$ 及び二体相関関数 $g(r)$ の濃度依存性

$$P(q) = 4\pi \int_0^{\infty} p(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (4)$$

と与えられるので、言い換えれば $p(r)$ は $P(q)$ の逆フーリエ変換に相当し、実空間における形状因子と解釈できる。従って、Hb の粒子構造を反映する実空間関数である。

Fig. 3 に GIFT 法によって小角散乱曲線から計算された Hb の $p(r)$ を示す。得られた溶液中の Hb の $p(r)$ は、全ての濃度において結晶構造解析データ (PDB コード: 2DN2) から計算した計算した $p(r)$ の特徴と極めて近いことが確認された。Hb の溶液中における立体構造が結晶構造解析と事実上同一であり、長寿命の会合体形成などが起こっていないことを示す結果である。また、 $P(q)$ より求めた慣性半径 R_g も約 2.4 nm で濃度に依らず一定である。

4.3. 溶液中における Hb 間の相互作用ポテンシャル

粒子系の $S(q)$ は、全相関関数 (total correlation function) $h(r) = g(r) - 1$ のフーリエ変換で与えられる。

$$S(q) - 1 = 4\pi n \int_0^{\infty} [g(r) - 1] r^2 \frac{\sin qr}{qr} dr \quad (5)$$

ここで、 n は粒子の数密度である。二体相関関数 $g(r)$ の物理的意味は、1 番目の粒子が原点に存在した際に、他の粒子を原点からの距離 r の位置に見出す確率を表すと考えればよい。 $4\pi n g(r) r^2 dr$ は、位置 $[r,$

$r+dr]$ に存在する粒子数を与える。

Fig. 4 に、Hb の $S(q)$ 及び $g(r)$ の濃度依存性を示す。GIFT 分析では遮蔽クーロンポテンシャルを仮定したが、構造因子もモデルフリーに得るため、 $I(q)/c$ を希薄溶液の測定で実験的に得た実験的な形状因子で除することによって実験的構造因子 $S^{eff}(q)$ を計算し GIFT 法で得られた $S(q)$ との整合性を確認した (Fig. 2) (ただし、Hb の散乱曲線の特徴として $P(q)$ の極小と $S(q)$ の極大の位置が近いこと、高散乱ベクトル側まで $S^{eff}(q)$ を得ることは困難である)。Hb の $S(q)$ の濃度依存性の最大の特徴はピーク位置が濃度によらず $q \sim 1.2 \text{ nm}^{-1}$ とほぼ一定となることである。このことを反映して $S(q)$ の実空間関数である二体相関関数 $g(r)$ は $r = 6.5 \text{ nm}$ 、すなわち Hb 分子の最大直径と一致する距離に濃度に依らず極大を持つ。このことは、単純な剛体球相互作用を仮定した粒子密度や通常の遮蔽クーロンポテンシャルを考えただけでは十分に説明できず、Hb 分子は濃度によらず接触距離に必ず二番目の分子を見出すことを示している。従って、Hb 間の弱いクラスター形成を示唆している。

一方、 $S(q)$ をゼロ散乱ベクトルに外挿した値 $S(q \rightarrow 0)$ は系の浸透圧縮率に比例する。すなわち、「系の圧縮されにくさ」の指標となる。粒子系の $S(q \rightarrow 0)$ は、一般に濃度の増加と共に混み合いの効果を反映して急激に減少する。また、静電反発の強い系

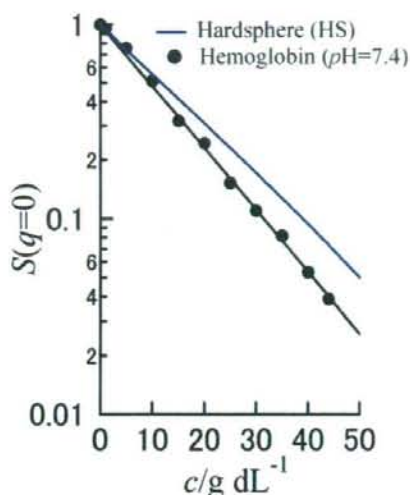


Fig. 5 Hb 溶液の $S(q \rightarrow 0)$ 値の濃度依存性

では系の圧縮されにくさのため、剛体球相互作用の場合と比較して遥かに小さな値 $S(q \rightarrow 0)$ を与える。Fig. 5 に Hb 溶液の $S(q \rightarrow 0)$ 値の濃度依存性を示す。蛋白質の比体積を密度 $0.75 \text{ cm}^3/\text{g}$ とし剛体球を仮定した場合の $S(q \rightarrow 0)$ 値を同時に示した。Hb 溶液の $S(q \rightarrow 0)$ 値が剛体球の場合より常に下回ることから、Hb 間の相互作用は剛体球相互作用を仮定した場合より依然としてわずかに反駁的であることが分かった。前述の $S(q)$ 及び $\rho g(r)$ の特徴的なピーク位置に関する情報と併せると、Hb 間の弱い引力相互作用と、完全に遮蔽されていない静電反発の高度なバランスによって擬似的に剛体球相互作用に近い Hb 間の相互作用ポテンシャルが実現され、球状蛋白質として例外的な高濃度領域でも溶液は流動性を失わず、Hb の機能維持に重要な寄与していると考えられる。

我々は昨年報告したように、HbV の小角散乱測定から散乱曲線広角部分 ($q > 1.5 \text{ nm}^{-1}$) に HbV 内部の電子密度揺らぎに起因する特徴的な余剰散乱を観測し、HbV に内包された濃厚 Hb 溶液の $S(q)$ のピーク位置、ピーク高さや広がり、バルクの Hb 溶液の $S(q)$ と非常に近いことを証明している。本研究で得られたバルク Hb 溶液中の Hb 間相互作用ポテン

シャルの詳細と合わせて解釈すれば、Hb 分子は HbV 中でもバルク溶液中と同様の粒子間相互作用ポテンシャルを維持し、閉じ込めの効果をほとんど受けておらず、擬似的に剛体球相互作用に近い振る舞いをすることが分かる。同時に、 $q = 10 \text{ nm}^{-1}$ の広角領域に至るまで、内包 Hb 溶液とバルクの Hb 溶液散乱曲線が完全に一致することから、HbV 内水相中とバルク溶液中の Hb の分子内微細構造が同一であることを強く示唆する。この結果は、Hb の分子内微細構造も同様に、製造工程や内水相閉じ込めの効果を受けていないことを証明するものである。

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

2. Hb 小胞体による膵島保存条件の向上に関する検討

A. 緒言

膵島移植直後の graft loss は、安定した移植成績を得る上で大きなハードルのひとつとなっている。膵島の単離・精製・保存の過程で低酸素状態に暴露されることが膵島障害を引き起こすことがその一因と考えられ、一連の操作において膵島代謝を維持する方法の確立が課題である。Hb 小胞体 (HbV) は、ヒト赤血球由来の Hb を精製・濃縮し、脂質膜でカプセル化した人工赤血球である。既に動物投与実験では輸血代替としての効果と安全性が確認され、臓器移植や細胞培養における酸素供給源としても期待されている。そこで本研究では、マウス膵島移植モデルにおいて膵島の単離・保存過程で HbV を酸素供給源として用い、移植成績の改善の可能性を明らかにすることを目的とした。

本研究は、北海道大学医学部第一外科の藤堂省教授との共同研究として推進された。

B. 方法

C57BL/6 (H-2^b)の膵島を単離・精製後、24時間培養した。HbV添加群は、単離過程でコラゲナーゼ溶液に、保存過程でRPMI1640培地にHbVをそれぞれ0.1g/mlずつ添加した。In vivoモデルとして、STZ誘導糖尿病C57BL/6マウス(H-2^b)の肝臓内に同種同系マウスの膵島175個を経門脈的に移植した。血糖が2日間連続200mg/dl以下をもって血糖正常化した。培養後の膵島をPropidium iodide染色し、viability = 生存細胞数/総細胞数としてviabilityを検討した。

C. 結果および考察

24時間培養後の膵島のviabilityを検討したところ、control群 89.6±5.2% (n=3) に比べ、HbV添加群は 99.3±1.8% (n=3) と有意に細胞死の割合が減少していた。移植後の血糖正常化率は、control群の12.2%に対し、HbV添加群では50%と改善傾向を認めた。

膵島の単離・精製・保存過程でHbVを用いた積極的な酸素供給により、膵島のviabilityを改善し、さらに移植成績が向上した。HbVを用いた酸素供給は膵島移植において新たな治療戦略になり得るものと考えられた。

3. Hb小胞体による動物種依存型の疑似アレルギー反応に関する検討

A. 緒言

Hb小胞体の血液適合性については、これまでに、げっ歯類、イヌ、サルを対象として行われ、特に問題となる所見を認めていない。また、従来のリ

ン脂質小胞体に比較して補体活性も生起しないことを確認している。しかし、いわゆるリボソーム製剤は、ブタへの投与に対して、肺動脈圧の一過性亢進など重篤な擬アレルギー性反応を呈することがSzeberiらによって報告されており(Circulation 1999;99:2302-9)、現行のHb小胞体の脂質膜についても反応性を知っておく事は重要と考える。そこで、ミニブタへの投与を行い、循環動態の計測を実施する計画である。本年度は、Negative controlとして、負電荷脂質にDPPGを有する小胞体について、どのような反応が生起するかについて予備的な検討を行うことを目的とした。本研究は、(株)日本バイオリサーチセンターの協力を得て行った。

B. 方法

ミニブタ(13-14ヶ月齢, 29-33kg)にアトロピン硫酸塩0.05mg/kgを頸背部筋肉内投与し、約10~30分後に塩酸ケタミン5mg/kgを頸背部筋肉内投与し導入麻酔後、吸入麻酔(N₂O:O₂=2:1の混合ガス+2~3%イソフルラン)し、気管カニューレ(PORTEX)を挿入した。人工呼吸器を10~15mL/kg、15~25回/分の呼吸条件とした。血圧は、左大腿動脈より挿入したポリエチレンチューブ(PE-90)を圧トランスジューサー(TP-300T、日本光電)に接続し、歪み圧力用アンプ(AP-641G、日本光電)を介してECGプロセッサインターフェース(EP-95、ソフトロン)に接続した。心拍数は、血圧波形を瞬時心拍計ユニット(AT-601G、日本光電)に接続した。心電図標準四肢第II誘導は、針電極より生体電気用アンプ(AB-621G、日本光電)を介して、ECGプロセッサインターフェース(EP-95、ソフトロン)に接続した。左心室内圧は、左総頸動脈より左心室まで挿入したカテーテル型圧トランスジューサー(5F、Millar)より歪み圧力用アンプ(AP-601G、日本光電)を介して、ECGプロセッサインターフェース(EP-95、ソフトロン)に接続した。左心室内圧一次微分値(LV dp/dt)は、左心室内圧波形を微分演算ユニット(EQ-601G、日本光電)に接続した。肺動脈圧は、右

総頸静脈より肺動脈まで挿入したSwan-Ganzカテーテル (AI-7167 7Fr. 110cm, Arrow International) より歪み圧力用アンブ (AP-601G, 日本光電) を介してECGプロセッサインターフェース (EP-95、ソフトロン) に接続した。平均右心房圧は、Swan-Ganzカテーテルと同一部位より挿入したポリエチレンチューブ (PE-90) を右心房に到達させ、歪み圧力用アンブ (AP-601G, 日本光電) を介して、ECGプロセッサインターフェース (EP-95、ソフトロン) に接続した。心拍出量はSwan-Ganzカテーテルの温度センサーを心拍出量計 (MTC-6210, 日本光電) に接続し、注入口より約0℃の5%ブドウ糖液 (大塚製薬) を5 mL急速投与して得られた結果を同機器のプリンターに印字した。なお、ポリエチレンチューブ及びSwan-Ganzカテーテル内は約20 unit/mLのヘパリンナトリウム加生理食塩液で管内を満たした。

解析は、血圧、左心室内圧、平均右心房圧及び肺動脈圧では歪み圧力用アンブ (AP-641GあるいはAP-601G, 日本光電) より誘導された信号より、心拍数では生体電気用アンブ (AB-621G, 日本光電) から誘導された標準四肢第Ⅱ誘導の信号より、心電図R波をトリガーとして、また、左心室内圧一次微分最大値は左心室内圧の信号よりECGプロセッサ (SBP-2000, ソフトロン) 内で行った。血圧、心拍数、心電図標準四肢第Ⅱ誘導、左心室内圧、左心室内圧一次微分値、平均右心房圧、肺動脈圧は、レコーダ (WT-645G, 日本光電) に連続して記録した。同時にデータ収録・解析システム (PowerLab, AD Instrument) に実験開始時から終了時までの測定データを記録した。

上記処置を施した後、血液ガス測定を行い、PaCO₂が35~40mmHgとなるように一回換気量、呼吸回数を調整した。血圧、心拍数、左心室内圧及び肺動脈圧及び心電図が安定した後、右大腿静脈に挿入したカテーテルにより、投与検体を投与し、各パラメータを測定した。

全肺血管抵抗 (Total Pulmonary Resistance, TPR) は $PVR = PAP / CO \times 80$

全身血管抵抗 (Total Systemic Resistance, TSR) は $TPR = [(MBP - RAP) / CO] \times 80$ として算出した。

左大腿動脈に挿入したポリエチレンチューブ (PE-90) より、ヘパリンナトリウム処理したシリンジを用いて約2 mLの動脈血を採取し、血液を空気に触れぬように血液ガス分析装置 (AVL OPTI CCA カセットB, シスメックス) にて測定した。解析項目はPaCO₂とし、1回目の投与前にPaCO₂が35~40mmHgとなるように呼吸流量、回数を調節する。

投与前、投与1、3、30分後に実施する。左大腿静脈に挿入したポリエチレンチューブ (PE-90) からEDTA-2K処理したシリンジを用いて血液約1mLを採取し、多項目自動血球分析装置 (XT-2000iV, シスメックス) を用いて血小板数 (PLT)、白血球数 (WBC) を測定した。また同時に、同じポリエチレンチューブからヘパリン処理した真空採血管に血液約2mLを採取し、遠心分離 [約4℃, 3000rpm (1600 ×g), 15分間] し、血漿を得た。後日 (株) エスアールエルに送付し、トロンボキサンB₂ (TXB₂) の測定を行った。

C. 結果および考察

DPPG系小胞体の投与 (0.05 ml/kg, n = 3) を行い、直後に一過性に、血圧、肺動脈圧の上昇、血管抵抗の上昇、徐脈、心拍出量の低下、PLTとWBCの低下、TXB₂の顕著な上昇認められ、Szebeniの報告する疑似アレルギー様症状が現れた。この理由としては、1) 補体活性による血小板の活性化と、それによるトロンボキサンA₂の産生により、末梢循環が顕著に悪化した、2) プタは肺血管内にマクロファージが存在し、これに小胞体が捕捉され一過性に肺循環に影響が出た、等が考えられる。但し、心電図では異常は全く認められず、反応としてはSzebeniらの報告 (Circulation 1999;99:2302-9) よりも軽微になった可能性がある。Szebeniらの小胞体と比較して、粒子径が整っていること、また完全に無菌的雰囲気での調製した製剤であることも影

響しているのかもしれない。今後は、現行のHb小胞体(DHSG系)の構成脂質からなる小胞体および、Hb小胞体について、同様の検討をする予定である。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. A. Fujimi, T. Matsunaga, M. Kobune, Y. Kawano, T. Nagaya, I. Tanaka, S. Iyama, T. Hayashi, T. Sato, K. Miyanishi, T. Sagawa, Y. Sato, R. Takimoto, T. Takayama, J. Kato, S. Gasa, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Ikebuchi, H. Hamada, Y. Niitsu. Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34+ cells by co-culturing with macrophages. *Int. J. Hematol.* 87, 339-350 (2008).
2. F. Ma, Y. Ebihara, K. Umeda, H. Sakai, S. Hanada, H. Zhang, Y. Zaike, E. Tsuchida, T. Nakahata, H. Nakauchi, K. Tsuji. Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 13087-13092 (2008)
3. 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.* 1778, 1035-1041 (2008)
4. 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 and Proteomics)* 1784, 1441-1447 (2008).
5. E.F. Verdu, P. Bercik, X.X. Huang, J. Lu, N. Al-Mutawaly, H. Sakai, T.A. Tompkins, K. Croitoru, E. Tsuchida, M. Prude, S.M. Collins. The role of luminal factors in the recovery of gastric functions and behavioral changes after chronic *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295, G664-G670 (2008)
6. 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. 多波長パルス分光法を用いたHb小胞体用パルスオキシメータに関する研究. *人工血液* 16, 198-204 (2008).
7. M. Yamaguchi, M. Fujihara, S. Wakamoto, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, 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.* 88A, 34-42 (2009).
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.* 151, 48-54 (2009).
9. 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* 31, 192-200 (2009).
10. H. Sakai, M. Okamoto, E. Ikeda, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Histopathological changes of rat brain after direct injection of

- hemoglobin-vesicles (oxygen carriers) and neurological impact in an intracerebral hemorrhage model. *J. Biomed. Materials Res. Part A* (in press).
11. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicles and red blood cells as carriers of carbon monoxide prior to oxygen for resuscitation after hemorrhagic shock in a rat model. *Shock* (in press).
 12. M. Yamaguchi, M. Fujihara, S. Wakamoto, H. Sakai, E. Tsuchida, H. Azuma, H. Ikeda. Effect of hemoglobin vesicles, cellular-type artificial oxygen carriers, on the ex vivo expansion of human hematopoietic stem/progenitor cells using a coculture system with human stromal cells. *ASAIO J.* (in press).
 13. 宗慶太郎、小峰梨沙、酒井宏水、小林紘一、土田英俊、村田満。ヘモグロビン小胞体を含む血液検体の臨床検査。人工血液 (in press).
 14. K. Taguchi, T. Maruyama, Y. Iwao, H. Sakai, K. Kobayashi, H. Horinouchi, E. Tsuchida, T. Kai, M. Otagiri. Pharmacokinetic analysis of hemoglobin vesicles for red blood cell substitution in a rat model of hemorrhagic shock. *J. Controlled Release* (in press).
 15. 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.* 19, 581–584 (2008).
 16. H. Horinouchi, H. Yamamoto, T. Komatsu, Y. Huang, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Enhanced radiation response of a solid tumor with the artificial oxygen carrier 'albumin-heme'. *Cancer Sci.* 99, 1274–1278 (2008).
 17. X. Qu, T. Komatsu, T. Sato, O. Glatter, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Structure, photophysical property, and cytotoxicity of human serum albumin complexed with tris(dicarboxymethylene)[60]fullerene. *Bioconjugate Chem.* 19, 1556–1560 (2008).
 18. 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.* 270, 187–192 (2008).
 19. G. Lu, E. Tsuchida, T. Komatsu. Human serum albumin nanotubes comprising layer-by-layer assembly with polycation. *Chem. Lett.* 37, 972–973 (2008).
 20. X. Qu, G. Lu, E. Tsuchida, T. Komatsu. Protein nanotubes comprised of an alternate layer-by-layer assembly using a polycation as an electrostatic glue. *Chem. Eur. J.* 14, 10303–10308 (2008).
- (総説、著書など)
1. 酒井宏水、土田英俊。人工赤血球の過去、現在、未来。ファルマシア 45, 23-28 (2009)。
 2. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Review of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers (Review paper). *Artif. Organs* 33, 139-145 (2009)
 3. E. Tsuchida, K. Sou, A. Nakagawa, H. Sakai, T. Komatsu, K. Kobayashi. Artificial oxygen carriers, hemoglobin vesicles and albumin-hemes, based on

Bioconjugate Chemistry. *Bioconjugate Chem.* (in press)

4. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicle, a cellular artificial oxygen carrier, that fulfils the physiological roles of the red blood cells structure. *Adv. Exp. Med. Biol.* (in press).

2. 学会発表

1. H. Sakai, E. Tsuchida / Hb encapsulation in vesicles retards the reaction with NO, but not CO, by intracellular diffusion barrier. / *Experimental Biology 2008* / April 5-9, 2008 / San Diego
2. 堀之内宏久、酒井宏水、土田英俊、池田達彦、小林紘一 / (教育講演) 人工酸素運搬体の臨床応用へ向けた取組みと開発状況 / 第56回日本輸血・細胞治療学会総会 / 福岡国際会議場 / 4.25-28, 2008
3. Taguchi K, Maruyama T, Kai T, Iwao Y, Kobayashi K, Tsuchida E and Otagiri M. / Further study on pharmacokinetics of hemoglobin-vesicles in a rat model of hemorrhagic shock. / 2nd Asian Pacific Regional Meeting / Shanghai, China / 2008, 5. 11-13
4. 佐藤高彰、酒井宏水、宗慶太郎、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体 (人工赤血球) の静的構造とダイナミクス / 第57回 高分子学会年次大会 / パシフィコ横浜 / 5.28-30, 2008
4. 酒井宏水、佐藤高彰、武岡真司、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体 (人工赤血球) のNO, CO反応挙動と血管不活性との相関 / 第57回 高分子学会年次大会 / パシフィコ横浜 / 5.28-30, 2008
6. 小松晃之、屈 雪、盧 剛、土田英俊 / 蛋白質ナノチューブの合成と構造制御 (依頼講演) / 第57回 高分子学会年次大会 / パシフィコ横浜 / 5.28-30, 2008
7. 中川晶人、小松晃之、土田英俊 / ヘムポケット入口にアルギニンを導入した組換えアルブミン-プロトヘム錯体の酸素結合能 / 第57回 高分子学会年次大会 / パシフィコ横浜 / 5.28-30, 2008
8. D. Erni, J.A. Plock, N. Rafatmehr, H. Sakai, E. Tsuchida, A. Banic. Hemoglobin vesicles reduce necrosis and improve primary wound healing in critically ischemic murine flaps (No. 73) / 19th Annual Meeting of the European Association of Plastic Surgeons / Madeira, Portugal / May 2008
9. H. Sakai, A. Sato, K. Masuda, S. Takeoka, E. Tsuchida / Hemoglobin encapsulation in vesicles (liposomes) retards the reaction with NO, but not CO, by intracellular diffusion barrier: Relevance to the vaso-inactive properties of red blood cells and hemoglobin-vesicles. / 11th Liposome Research Days / Yokohama Symposia / July 19-22, 2008
10. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hb-Vesicle: A Cellular Hb-Based Oxygen Carrier that Fulfills the Physiological Roles of the RBC Structure / ISOTT 2008 (International Society on Oxygen Transport to Tissue) / Sapporo Prince Hotel / August 3-7, 2008
11. T. Ikeda, H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hb-Vesicle: A Cellular Hb-Based Oxygen Carrier that Fulfills the Physiological Roles of the RBC Structure / ISOTT 2008 (International Society on Oxygen Transport to

- Tissue) / Sapporo Prince Hotel / August 3-7, 2008
12. 酒井宏水、土田英俊 / (招待講演) 医用生体工学と救命医療の接点、人工赤血球への期待 / 第23回日本救命医療学会 総会・学術集会 イブニングセミナー / センターホール(東京) / 2008. 9. 5.
 13. 酒井宏水、佐藤 敦、武岡 真司、土田英俊 / 人工赤血球-水溶性高分子(代用血漿剤)分散系のレオロジー特性 / 第57回高分子討論会 / 大阪市立大学 杉本キャンパス / 2008.9.24-26
 14. 酒井宏水、堀之内宏久、小林絃一、土田英俊 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)のNO、COとの反応制御と新しい医療応用 / 第57回高分子討論会 / 大阪市立大学 杉本キャンパス / 2008.9.24-26
 15. 屈 雪、小松晃之、土田英俊 / 蛋白質ナノチューブの鋳型合成とその特徴 / 第57回高分子討論会 / 大阪市立大学 杉本キャンパス / 2008.9.24-26
 16. 池田達彦、堀之内宏久、井澤菜緒子、河野光智、泉陽太郎、渡辺真純、川村雅文、宗慶太郎、酒井宏水、土田英俊、小林絃一 / Beagle犬を用いた40%脱血ショックにおけるHb小胞体の蘇生効果および中長期生存後の安全性の検討 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
 17. 勢司泰久、堀之内宏久、相川直樹、酒井宏水、土田英俊、小林絃一 / 腎障害による制御不能出血モデルに対するヘモグロビン小胞体の蘇生効果 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
 18. 堀之内宏久、勢司泰久、河野光智、泉陽太郎、酒井宏水、小林絃一、土田英俊 / 血管損傷による制御不要出血性ショックの蘇生 -人工酸素運搬体の効果について- / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
 19. 河野光智、竹田貴、堤恭介、池田達彦、泉陽太郎、渡辺真純、堀之内宏久、小林絃一、酒井宏水、土田英俊 / マウス肺切除 + 周術期出血モデルでのヘモグロビン小胞体投与の有効性の検討 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
 20. 藤原満博、東寛、山口美樹、高橋大輔、酒井宏水、土田英俊、池田久實 / 人工酸素運搬体、ヘモグロビン小胞体 (HbV)のin vitroにおけるヒト造血幹/前駆細胞への影響 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
 21. 田口和明、丸山徹、甲斐俊哉、酒井宏水、土田英俊、小林絃一、小田切優樹 / 出血性ショックモデルラットにおけ頻回投与時のヘモグロビン小胞体の体内動態特性 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
 22. 高橋大輔、藤原満博、東寛、宗慶太郎、酒井宏水、堀之内宏久、小林絃一、土田英俊、池田久實 / ヘモグロビン小胞体(HbV)が免疫系に及ぼす影響 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
 23. 宗慶太郎、酒井宏水、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体の表面荷電基の特徴 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23

24. 小松晃之、屈 雪、土田英俊、堀之内宏久、小林絢一 / アルブミン-フラーレン錯体の光物性と細胞毒性 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス北里講堂 / 2008.10.23
25. K. Taguchi, Y. Urata, M. Anraku, T. Maruyama, T. Kai, D. Kadowaki, H. Sakai, K. Kobayashi, E. Tsuchida, M. Otagiri / Effect of initially injected hemoglobin vesicles (HbV) on the pharmacokinetics of second injection of HbV in mice. / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
26. H. Azuma, H. Abe, D. Takahashi, M. Fujihara, H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, H. Ikeda / Transient induction of immune-suppressor cells in rat spleen by massive injection of hemoglobin-vesicle (HbV) / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
27. Y. Izumi, M. Yamamoto, K. Takeuchi, M. Watanabe, H. Horinouchi, Y. Teramura, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Potential tumor oxygenation by systemic administration of hemoglobin vesicles in a mouse Lewis lung carcinoma model / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
28. Y. Tomita, H. Toriumi, J. Tatarishvili, M. Tomita, M. Uekawa, H. Sakai, E. Tsuchida, H. Horinouchi, K. Kobayashi, N. Suzuki. / Effect of artificial RBCs on murine hemorrhagic model / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
29. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hemoglobin-vesicles as O₂- and CO carriers / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
30. H. Sakai, K. Sou, Y. Izumi, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hb-vesicle, a cellular Hb-based oxygen carrier, fulfills the physiological roles of the RBC structure. / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
31. Y. Izumi, H. Nagata, T. Yamada, H. Morisaki, H. Sakai, H. Horinouchi, J. Takeda, E. Tsuchida, K. Kobayashi / The effect of hemoglobin vesicle administration on ventilator induced lung injury / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
32. R. Aeiba, Y. Seishi, H. Horinouchi, M. Yamazaki, E. Tsuchida, H. Sakai, K. Kobayashi / Effect of artificial oxygen carrier Hb vesicle on cerebral blood flow during and after hemodiluted cardiopulmonary bypass in rat / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
33. P. Bercik, J. Lu, E.F. Verdu, H. Sakai, E. Tsuchida, S.M. Collins / Assessment of inflammation-altered intestinal permeability using arterially perfused murine jejunal loop. / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University

Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.

34. H. Sakai, A. Sato, K. Masuda, S. Takeoka, E. Tsuchida / Hemoglobin encapsulation in vesicles retards the reaction with NO by intracellular diffusion barrier / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
35. Y. Seishi, H. Horinouchi, N. Aikawa, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Effect of HbV as a resuscitation fluid in uncontrolled hemorrhage shock model: blunt kidney injury model / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
36. H. Horinouchi, Y. Seishi, M. Kohno, Y. Izumi, H. Sakai, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Resuscitation of hemorrhagic shock due to uncontrolled hemorrhage – effect of hemoglobin-vesicle in vascular injury model / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
37. A. Nakagawa, T. Komatsu, S. Curry, E. Tsuchida / O₂ Binding properties of recombinant albumin-heme complexes having arginine at the entrance of the heme pocket / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
18. 田口和明, 浦田由紀乃, 安楽誠, 丸山徹, 門脇大介, 甲斐俊哉, 小林紘一, 土田英俊, 小田切優樹 / 連続投与時におけるヘモグロビン小胞体の体内動態評価 / 第23回日本薬物動態学会年会 / 熊本 / 2008, 10/30-11/1
39. 酒井宏水, 堀之内宏久, 土田英俊, 小林紘一 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)とCOの反応性と細胞保護効果 / 第46回日本人工臓器学会大会 / 東京 六本木アカデミーヒルズ40階 / 2008.11.27-29
40. 中木村繁, 蒲池浩文, 渡辺正明, 蔵谷大輔, 腰塚靖之, 小倉正臣, 吉田雅, 山下健一郎, 松下通明, 酒井宏水, 土田英俊, 藤堂省 / 豚島移植における人工赤血球を用いた豚島の酸素化による移植成績改善効果の検討 / 第21回代用臓器・再生医学研究会 / 札幌 / 2009. 1. 31.
41. 酒井宏水, 宗慶太郎, 土田英俊 / 赤血球構造の生理的意義とヘモグロビン小胞体 / 平成20年度研究成果発表会「人工血液をつくる(9)」 / 慶應義塾大学医学部 北里講堂 / 2009.2.11.

分担課題：現行のヘモグロビン小胞体のNO、CO反応性の検討

研究分担者 酒井 宏水 早稲田大学 理工学研究所 准教授

研究協力者 土田 英俊 早稲田大学 理工学研究所 顧問研究員・早大 名誉教授

研究要旨

Hb小胞体は、高濃度・高純度Hb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ではあるがNO、COが産生され、血液循環の恒常性に寄与している。Hbはこれらのガス分子を強く結合するので、Hb小胞体の反応性について詳細を知る事は重要である。本研究では、現行のHb小胞体について、ストップドフロー-ラピッドスキャン分光法によって、嫌気性、好気性雰囲気におけるNOとの反応性、ならびに嫌気性条件におけるCOとの反応性について検討した。また、ガス溶解度がバルク水相に比較して高いと言われているリン脂質二分子膜の疎水性領域におけるNO消費の可能性を確認するため、NO濃度の推移を電極法により検討した。HbのNO反応速度は、ヒトHb溶液ならびに重合ウシHbに比較して極めて遅くなっていた。これは、Hb小胞体粒子内部に形成されるNO拡散障壁によるものと考えられた。一方、CO結合では、Hb小胞体は僅かに遅くなった。これは内包されているアロステリック因子；ピリドキサル 5'-リン酸の存在により、親和性が低下した為と考えられた。好気性雰囲気において、Hbを含有しない空の小胞体にNOを付加し、NOとO₂の反応によりNO濃度が低下する様子をNO電極で追跡したが、特にNO濃度が急激に低下することもなく、脂質二分子膜はガス溶解度が高いものの、NOの消失を促進するほどのことでは無かった。

A. 緒言

赤血球構造の生理的意義の一つとして、内因性のガス状情報伝達物質(NO, CO)の反応性を調節することが挙げられる。病態としての溶血の症状や、Hbを用いる人工酸素運搬体(HBOCs)の投与の後に、血管内皮由来のNOが捕捉されることにより、血管収縮、血圧亢進、末梢循環不全、血管障害などが生起することが明らかになっている。他方、微量の一酸化炭素(CO)も特に肝微小循環系において血管弛緩因子として機能し、非細胞型のHb溶液によってこれが捕捉され、類洞血管が収縮することが報告されている。血漿中に溶解するHb分子に関連

するこれら副作用は、生体内NO、COの反応制御の観点から赤血球構造が極めて重要であることを示唆している。赤血球のNO結合速度がHb溶液に比較して著しく遅くなる理由として、(i) 赤血球近傍に形成される非攪拌層が拡散障壁になる、(ii) 膜蛋白を多く含有する細胞膜にNOバリア性がある、(iii) 赤血球内の高濃度Hb溶液が粘度が高いので、NOの拡散障壁になる、などが提案されていた。

Hb小胞体は、Hbを脂質膜で包むことで、赤血球と同様にしており、血漿中にHbを溶解させない。これにより血管活性を抑制する事が可能となっているが、Hbの封入によってNOとの反応性が低下し

ている事も一つの要因と考えられる。我々はストップフロー-ラピッドスキャン分光法から得られたデータをコンピュータシミュレーションを用いて解析し、NO結合を遅延させる最大の要因は、粒子内部に形成されるNO拡散障壁であることを明らかにした。この結果は、次の事項を考えれば当然の事と言える。(i) HbへのNO結合速度定数が極めて大きい、(ii) 粒子内のHb濃度: $[Hb]_{in}$ が高いほど、NOの捕捉される部位は増える、(iii) 粒子内 $[Hb]_{in}$ が高いほど粘性が高くなり、NOの拡散が遅くなる、(iv) 脂質膜自体は、ガス拡散の障壁にはならない。

他方、細胞膜の疎水性領域は、水相に比較してガスの溶解度が高いことが予想される。NO、 O_2 の両方が疎水性領域に多く存在すれば、両者の反応によるNOの消費と、 NO_2 産生の促進が懸念される((Liu et al., PNAS 1998;95:2175-9)。Hb小胞体は赤血球と同様の構造をしており、更に粒子径が小さいため、脂質膜の重量は相対的に多く、疎水性領域も多い。従って、NOの消費が速いことが懸念される。

本研究では、現行のHb小胞体について、NOおよびCOの反応速度を測定し、非細胞型のヒトHb溶液、アロステリック因子であるピリドキサル 5'-リン酸(PLP)を添加した場合、また重合ウシHb溶液(Oxyglobin; Biopure社製)との比較を行った。また、脂質膜がNO消費を速めるか否かについても検討した。

本研究の一部は、カリフォルニア大学サンディエゴ校ほかとの共同研究として実施された。

B. 方法

1. Hb小胞体(HbV), Hb溶液, 空小胞体(EV), 赤血球の調製

Hb小胞体は従来法に従って調製した。Hb溶液は日本赤十字社から提供を受けた期限切れ赤血球から精製した。Hbは一酸化炭素化(HbCO)して安定化させ、限外濾過膜により38 g/dLまで濃縮した。これにアロステリック因子としてPLP (Sigma社製)を、

PLP/Hb tetramer = 2.5 モル比になるように添加した(赤血球では2,3-DPGが存在するが、不安定な化合物であるため、我々は従来よりPLPを使用している。イノシトールヘキサリン酸塩(IHP)も用いられる場合があるものの、IHPはHbに対する結合力が強く、酸素結合解離曲線が本来のS字曲線から歪んだ形(Langmuir型)となりヒル係数も1近くにまで低下する欠点がある)。PLPを添加したHb溶液に脂質粉末を分散させ、Hbを内包させる。脂質成分としては、1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC), cholesterol, 1,5-*O*-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (日本精化)および1,2-distearoyl-*sn*-glycerol-3-phosphatidyl-ethanolamine-*N*-PEG₅₀₀₀ (DSPE-PEG; 日油)が、モル比で5/5/1/0.033で混合されている。粒子径はエクストルージョン法により制御した。内包されたHbCOは、酸素気流下に可視光照射をしてHbO₂に変換した。粒子径は、光散乱法により測定した(Submicron Particle Size Analyzer, model N4 PLUS; Beckman-Coulter, Inc.)。Hbを内包しない空の小胞体(empty vesicle, EV)は、生理食塩水に上述の混合脂質粉末を分散させ、同様に調製した。脂質濃度6.8 g/dL、粒子径約250 nmは、Hb小胞体とほぼ同等である。

精製Hb溶液をリン酸緩衝生理食塩水に溶解させたものを調製し、PLPをPLP/Hb = 0, 2.5モル比で溶解させた。また比較として、重合ウシHb溶液(poly_BHb) (Oxyglobin; Biopure社製)を用いた。この溶液は、重合されていないサブユニット四量体_BHbが37.2%も含有し、非常に広い分子量分布を有する(Buehler et al., Anal Chem 2005;77:2175-9)。酸素結合解離曲線は、Hemox-Analyzer (TCS Medical Science)を用い37°Cにて測定し、 P_{50} 値およびヒル係数を算出した(Fig. 1)。

IACUCプロトコルに従い、マウス(C57BL/129, ♀)から血液を採取した。赤血球を遠心分離し(800g, 30 min), 40 mM-HEPES 緩衝液(pH = 7.4, 5 mM glucose, Sigma, 浸透圧285 mOsm にNaClで調節)に再分散させる操作を二回繰り返す、最終的に濃度を 2×10^6

cells/mL ([Hb] = 0.93 μ M, [heme] = 3.72 μ M)とした。

2. ストップフロー-ラピッドスキャン分光法

脱酸素化条件でのHbVおよびHb溶液のNO-, CO-結合の経時変化は、ストップフロー-ラピッドスキャン分光法により測定した(RSP-1000; ユニソク社)。気密性のあるリザーバー(A, B)に導入した二種類の溶液に 0.3-0.6 MPaの圧力をかけて急速に混合する。混合に要するDead timeは 1.5 ms以下、全ての測定は 25 $^{\circ}$ Cにて行った。PBS溶液(3 ml)を両リザーバーに導入し、セムタムラパーキャップで封入し、窒素バブルを30分以上することによって完全に脱酸素条件とした。HbVあるいはHbのストック溶液(約30 μ l, [heme] = 300 μ M)をリザーバーAにゴム栓を経由して入れheme濃度を 3 μ Mとし、泡立ちと変性を抑えるため窒素バブルをフローに換えた。完全に脱酸素化されたか否かの判断のため、予備的にストップフロー測定を行い(波長範囲: 385 - 593 nm)、Soret帯の最大吸収波長(λ_{max})が deoxyHb由来の430 nmになっていることを確認した。一般的に脱酸素化のために亜ニチオン酸ナトリウムが有効で多用されているが、過剰量の添加はHbやヘムを修飾する可能性が指摘されているので、本実験では使用しなかった。リザーバーBでは、NO混合ガス(NO, 0.2029%; N₂, 99.7971%, 高千穂商事) 或はCO混合ガスをバブルし(CO, 14.14%; N₂, 85.86%)、一方リザーバーAでは窒素フローを継続した。

約10分間バブルしてから測定を開始した。測定間隔は 1 ms、測定時間は210 msとした。測定は 3 回行い、430 nmにおける吸収の変化をプロットした。NOおよびCOの見かけの結合速度定数($k'_{on}(NO)$, $k'_{on}(CO)$)は、式(1)により得た。但し、Hbは均一に分散し、不可逆二次反応であり、またガスが大量にある場合には擬一次反応が成立するものと仮定した。

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

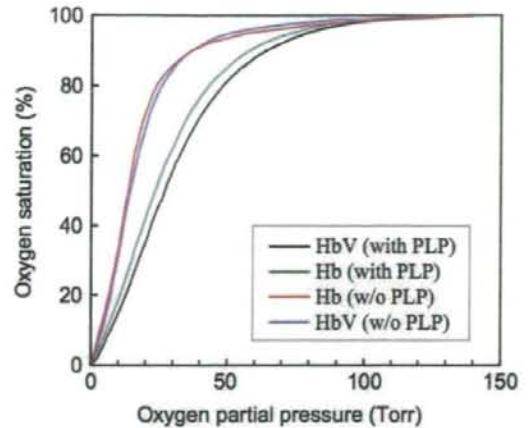


Fig. 1. Oxygen dissociation curves of Hb solutions and HbV with or without PLP measured with Hemox-Analyzer at 37 $^{\circ}$ C. The P₅₀ values and Hill numbers are listed in Table 1. The data of HbV (w/o PLP) is cited from our previous study (Sakai et al., JBC 2008;283:1508-17).

この式において、 ΔA_t isは時間tにおける 430 nmの吸光度変化(= $A_t - A_{t=\infty}$)、 ΔA_0 は初期の吸光度(= $A_{t=0} - A_{t=\infty}$)、また C_{Gas} は初期のガス濃度である。初期のNO濃度(1.9 μ M)は、ヘム濃度(1.5 μ M)に比較して大量には無いので、見かけの結合速度定数は、反応初期のスロープから算出した。

酸素を結合したHbVおよび各種Hb溶液のNOとの反応についても同様に行った。但し、大気に曝したPBS溶液をリザーバーAに導入し、Hbに酸素が結合している状態とした。反応追跡は波長は、metHb由来の408 nmとした。

3. NO電極法による脂質二分子膜におけるNO消費の計測

好気条件下、水溶液中におけるNO消失速度を、NO電極により測定した(amino-700 probe + inNO-T sensor, Innovative Instruments, Inc.)。HbV, EV, 或はマウス赤血球を含有するPBS溶液 3 mLをキュベットに入れ攪拌子で攪拌した。NOセンサーをキュベットに挿入し、定常に達したところで、NOのストック溶液(100 μ l)を注入し、NO濃度を約 2 μ Mとした。電極の表示するNO濃度は急激に上昇し、その

後、溶解している酸素あるいはHbとの反応により低下する。測定に用いた検体の濃度は次の通り: HbV ([heme] = 4 μ M, [Hb] = 65 mg/L, [Lipid] = 36 mg/L), EV ([lipid] = 36 mg/L), マウス赤血球 ([heme] = 3.72 μ M)。データ解析はSynergy KaleidaGraph 3.6 およびStatView 5を用いた。

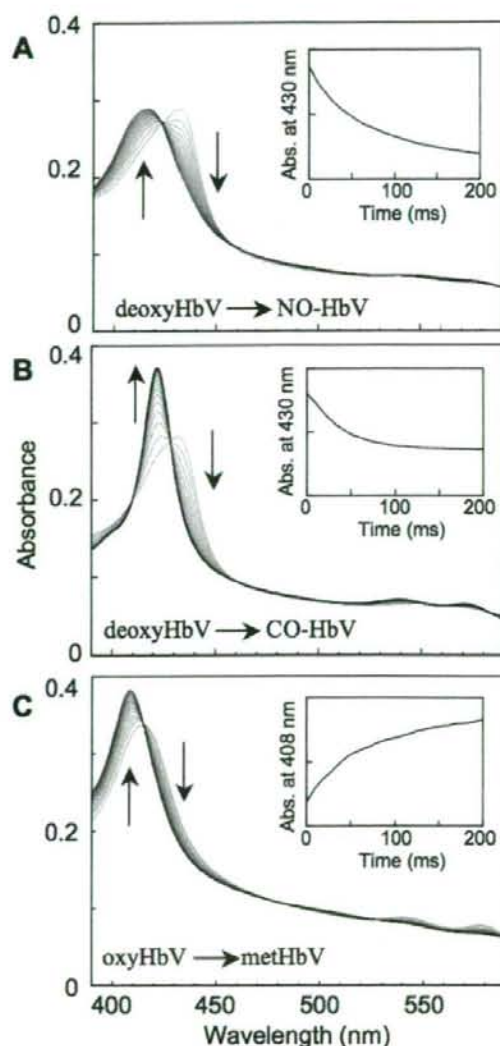
C. 結果

1. 嫌気条件下におけるNO, COの結合反応

完全な脱酸素化は、deoxyHb由来の λ_{\max} = 430 nmより確認した。HbVは光散乱の効果が非常に強いいため、Q帯領域は明確なスペクトル変化が得られないので、吸光度の大きいSoret帯を測定範囲とした。NOが溶解した液体と急速に混合すると、430 nmの吸光度が低下し、代わってHbNO由来の418 nmの吸光度が増大した(Fig. 2a)。COとの反応については、HbCO由来の419 nmの吸光度の増大が見られた(Fig. 2b)。両反応ともに、430 nmの吸光度変化から、小胞体内のHbがHbNOおよびHbCOに変化したことの指標になる。

Fig. 2. Representative profiles of the reactions of NO or CO HbV using stopped-flow spectrophotometry. (A) A NO-bubbled PBS ([NO] = 3.8 μ M) and deoxygenated HbV in PBS ([heme] = 3.0 μ M) were mixed rapidly; the absorption spectra were collected every millisecond for 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 during 0.2 s. (inset) The time course of the measured absorbance at 430 nm. (B) A CO-bubbled PBS ([CO] = 135 μ M) and deoxygenated HbV in PBS ([heme] = 3.0 μ M) were mixed rapidly using a stopped-flow spectrophotometer. 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. (C) A NO-bubbled PBS ([NO] = 3.8 μ M) and oxygenated HbV in PBS ([heme] = 3.0 μ M) were mixed. The spectrum of oxygenated HbV is mostly converted to metHbV during 0.2 s. (inset) The time course of the measured absorbance at 408 nm. The optical path length was 1 cm. In these experimental conditions, the CO-binding in (C) seems faster than the NO reactions (A & B), due to the higher concentration of CO (135 μ M) than that of NO (3.8 μ M). However, the calculated reaction rate constant of the CO binding is much smaller than those of NO reactions as shown in Table 1.

計測を3回行い、時間 t における430 nmの吸光度 (ΔA_t)の初期吸光度(ΔA_0)に対する比を時間に対してプロットした(Figs. 3a and 3b)。Hb溶液の測定結果も同様にプロットした。このグラフから、HbVのNO, CO結合速度は明らかにPLPを添加していないHb溶液に比較して遅くなっていた。しかし、PLPを添加したHb溶液は、CO結合速度に関してはHbVとほぼ同等であった。NO結合速度に関しては、PLPの有無に関係なくHb溶液はHbVよりも著しく速かった。また、Poly_BHbのNO結合速度は、ヒトHb溶液と同様に極めて速いものであった。見かけの結



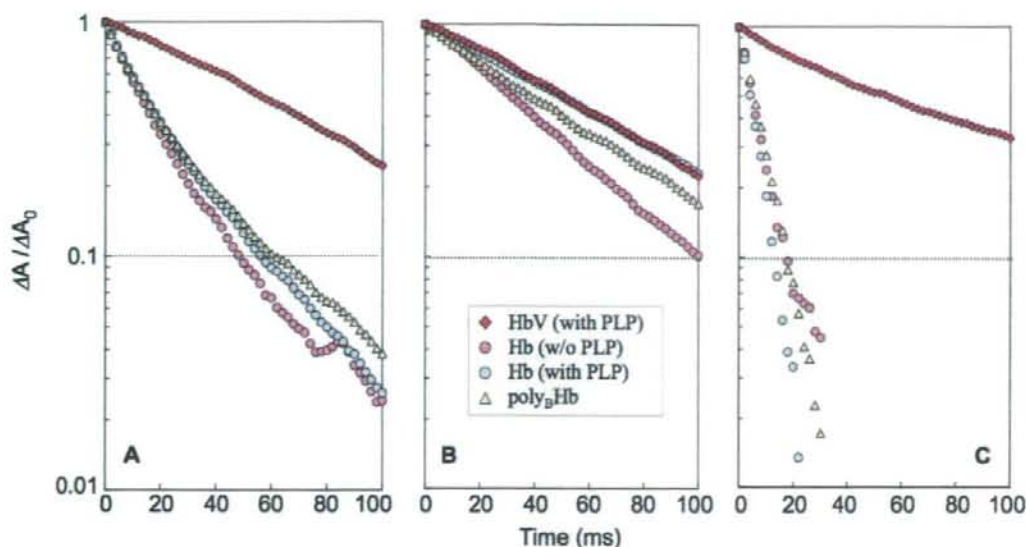


Fig. 3. Time courses of NO and CO reactions by HbV, human Hb solutions, and PolyHb. The level of reaction was plotted on a semi-logarithmic graph as a ratio of absorption at 419 or 430 nm (DA_t) at time t , to the initial absorption (DA_0) at time 0. (A) A NO-bubbled PBS ([NO] = 3.8 μ M) and deoxygenated-Hb-containing solutions in PBS ([heme] = 3.0 μ M) were mixed. (B) A CO-bubbled PBS ([CO] = 135 μ M) and deoxygenated-Hb-containing solutions in PBS ([heme] = 3.0 μ M) were mixed. (C) A NO-bubbled PBS ([NO] = 3.8 μ M) and an oxygenated-HbO₂-containing solution in PBS ([heme] = 3.0 μ M) were mixed.

Table 1. Apparent reaction rate constants of Hb, HbV, and polyHb with different P_{50} . The data of HbV without PLP were referred from a previous paper (Sakai et al., JBC 2008;283:1508-17).

	HbV (with PLP)	HbV ^a (w/o PLP)	Hb (with PLP)	Hb (w/o PLP)	polyHb
$k'_{on}{}^{(CO)}$ ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	2.1	3.4 ^a	2.1	3.4	2.7
$k'_{on}{}^{(NO)}$ ($10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	0.61	0.88 ^a	2.4	2.6	2.4
$k'_{ox}{}^{(NO)}$ ($10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	0.88	-	8.7	7.4	6.6
P_{50} (Torr)	25–31	14 ^a	23	14	54 ^b
Hill number	2.1	2.1	1.9	2.2	1.2 ^b
Size	279 nm	265 nm ^a	65 kDa	65 kDa	87–502 kDa ^c

^a Sakai et al., JBC 2008;283:1508-17; ^b Cabrales et al., AJP Heart 2004;287:H2825-33;

^c Buehler et al., Anal Chem 2005;77:3466-78.

合速度定数 $k'_{on}{}^{(NO)}$ および $k'_{on}{}^{(CO)}$ をTable 1に示した。

2. 酸素が結合したHbVまたはHb溶液とNOとの反応

酸素が結合したHbVは、Soret帯の最大吸収波長が415 nmになる(Fig. 2c)。NOを混合すると、この

吸収が急激に低下し、代わってmetHb由来の405 nmのピークが増大した。測定を3回行い、平均化し、時間 t における408 nmの吸光度($\Delta A_t = A_t - A_{t=\infty}$)の初期吸光度($\Delta A_0 = A_{t=0} - A_{t=\infty}$)に対する比を計算し、時間に対してプロットした(Fig. 3c)。このグラフから明らかに、酸素を結合した条件でも、HbVの反応