

**Fig. 4.** NO decay in an aerobic condition in PBS solution after injection of NO yielding a concentration of 2000 nM NO. **(A)** PBS solution, as a standard curve of NO decay by the dissolved  $O_2$ . The decay rate is calculated as  $3.7 \times 10^{-3} s^{-1}$ . **(B)** PBS solution containing EV ([lipids] = 36 mg/mL). The decay rate is calculated as  $3.9 \times 10^{-3} s^{-1}$ . **(C)** PBS solution containing HbV ([heme] = 4  $\mu M$ , [Hb] = 65 mg/L, [Lipid] = 36 mg/L). The arrows indicate the points of three injections. At the first and the second injections, HbV consumed NO so rapidly that the NO electrode was undetectable. At the third injection, Hb of HbV would be totally inactivated, and the NO level increased, and subsequently decreased gradually through reaction with the physically dissolved  $O_2$ . **(D)** A PBS solution containing mice RBCs ([heme] = 3.72  $\mu M$ ). In contrast to HbV, the NO level increased at the first NO injection, although it did not reach to 2000 nM, and the NO decay was much faster than that in (A).

速度はHb溶液よりも著しく遅くなった。PLPの添加は影響が見られなかった。Poly<sub>B</sub>Hbの反応速度は、ヒトHb溶液と同等であった。NO添加による見かけの酸化速度定数  $k'_{ox}(NO)$  を Table 1 にまとめた。

### 3. 大気下におけるHbV, 赤血球, 空小胞体によるNO消費

PBS溶液にNOストック溶液を注入したところ、大気下においてもNO電極は約2000 nMを表示した。NOと $O_2$ が反応して $NO_2$ を生成するにつれ、表示値は低下した(Fig. 4)。200秒後からのNO消失曲線スロープをもとに計算したNO消失速度定数は、 $3.7 \times 10^{-3} s^{-1}$ となった。EVが存在する場合は、この様相はPBS溶液の場合とほぼ同等であり、NO消失速度定数は  $3.9 \times 10^{-3} s^{-1}$ であった。本実験では、脂質二

分子膜の疎水性領域がNO消費を速めるという説を支持する結果を見出すことはできなかった。水相におけるNOの反応が主要なものであると考えられた。

一方で、HbVが存在する場合は、注入されたNO (2000 nM) は、電極が感知するよりも速く消失した。再度同量のNOを注入したところ、その一部が観測された。3回目のNO注入では恐らくHbが全てNOと反応し尽くされ、漸くNO消失曲線が観測された。一方、赤血球が存在する場合には、1回のNO注入でNO消失曲線が観測された。しかし、NO消失は極めて速かった(横軸の時間スケールが異なることに注意)。HbVによるNO消失速度を得ることはNO電極では困難であり、ストップフロー-ラピッドスキャン分光法に頼らざるを得ない。

#### D. 考察

本研究で明らかになった重要なことは、(i) Hb溶液をリン脂質小胞体に内包する事によってNOとの反応が顕著に遅延されること、(ii) CO結合は内包では遅延されないが、アロステリック因子であるPLPの存在によって僅かに遅延された、(iii) 好気的条件下において、HbVの脂質二分子膜の疎水性領域は、NO消費を速める可能性は低く、むしろ内水相のHbとの反応が殆どを占める、である。

昨年度の研究成果として、リン脂質小胞体へのHb内包によってHbのNO結合速度が顕著に低下するのは、粒子内部のNO拡散障壁の形成によるものであることを明らかにした。NOのHbへの結合は極めて速くまた強いため、HbV粒子内の外側側のHbがNOの消失場となり、外側から反応が進まない限りNOは粒子内部にまで到達し得ない。また高濃度Hb溶液のため、粘性が上昇し、NOの拡散速度も低下することも影響する。既報のデータも合わせ、 $P_{50}$ 値の異なる二種類のHbV( $P_{50} = 25$  Torr, 14 Torr)について比較すると、 $k'_{on}(NO)$  はごく僅か変化するのみであった ( $0.61 \times 10^7$  vs.  $0.88 \times 10^7$   $M^{-1}s^{-1}$ )。従って、NOを遅延する最大の要因は、高濃度Hb溶液のカプセル化と断定できる。一方、非細胞型のHb溶液はNOと著しく速く反応し ( $2.4 - 2.6 \times 10^7$   $M^{-1}s^{-1}$ )、PLPの存在は影響しなかった。文献によるとNO結合速度は、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖、またT-状態とR-状態との間で違いが無いとのことであり、我々の結果もこれを支持した。Poly<sub>B</sub>Hbは、四量体<sub>B</sub>Hbを多く含有しており、また血管収縮とこれによる血圧亢進を起すことが知られている。今回の実験では、Poly<sub>B</sub>Hbも極めて速いNO結合を示した。

一方COについて、CO結合速度定数はNOに比較して二桁も小さく極めて遅い反応であり、COがHbに結合する前に粒子内部にまで拡散する十分な時間が与えられることにあり、カプセル化しても結合の遅延が認められないことを昨年度に報告した。今回の実験では僅か乍ら遅延が認められたが、こ

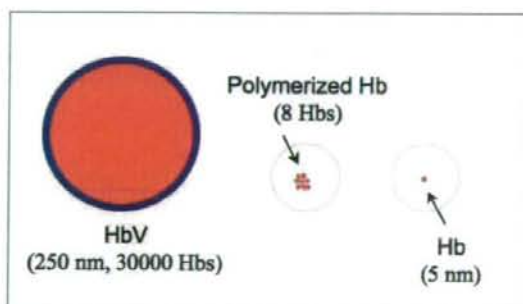
れは、アロステリック因子PLPが内包されたためと考えられる。要するに、PLPによってT-状態が安定化され、COの結合が遅くなったと考えるべきである。事実、NO結合とは対象的に、COはHbの4つのヘムに対して協同的に結合し、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖、またT-状態とR-状態との間で結合速度定数が異なる。Poly<sub>B</sub>Hbについて、文献によれば、未修飾<sub>B</sub>Hbの  $k_{on}(CO)$  は  $1.3 \times 10^5$   $M^{-1}s^{-1}$  であるが、これが妥当とすれば、グルタルアルデヒドによる重合でPoly<sub>B</sub>HbのCO結合は速くなったことになる ( $2.7 \times 10^5$   $M^{-1}s^{-1}$ )。

血流内では酸素が大量にあるので、HBOCsあるいは赤血球に酸素が結合した状態でNOと反応することが主となる。非細胞型のヒトHb溶液のNOとの反応速度定数は、PLPの存在に関係が無く極めて速かった ( $7.4 - 8.7 \times 10^7$   $M^{-1}s^{-1}$ )。またこの速度は、deoxyHbとNOの反応速度定数 ( $k'_{on}(NO) = 2.4 - 2.6 \times 10^7$   $M^{-1}s^{-1}$ ) よりも速いものであった。これはHeroldらの結果と一致する (Biochemistry 2001;40:3385-3395)。HbO<sub>2</sub>をリン脂質小胞体に内包することにより、NOとの反応速度は著しく低下し、 $k'_{ox}(NO)$  は  $0.88 \times 10^7$   $M^{-1}s^{-1}$  となった。この測定法では、ヘムの配位状態の変化を見ているに過ぎず (HbO<sub>2</sub> → metHb)、NO濃度の直接的な測定は別の方法を用いなければならない。好気性雰囲気では、NOはO<sub>2</sub>とゆっくり反応しNO<sub>2</sub>を産生する。

Hb小胞体を構成する脂質のHbに対する重量比は約0.5 - 0.6であるのに対し、赤血球の場合は約0.15と低い。Hb小胞体の脂質二分子膜には赤血球よりも多くの疎水性領域が存在するので、Liuら(PNAS 1998;95:2175-9)が提唱している脂質膜内でのNOの消費が速くなることが懸念された。もしこの影響が排除されない場合には、大気下実施したストブドフロー法による測定結果の解釈が複雑になる。そこで、Hbを含有しない空の小胞体を用い、NO消失速度をNO電極で検討したところ、生理食塩水中のNO消失速度とほぼ同等であり、小胞体の影響は殆ど無いことが明らかになり、Hb小胞体のNOとの反応においても、内部のHbとの反応が主であるこ

とが結論できた。この結果は脂質種にも依存する可能性がある。Hb小胞体の場合は飽和型脂質(DPPC, 相転移温度41°C)とコレステロールを主成分としており、Liuらが使用した不飽和脂質よりも酸化反応を受け難い。また、不飽和結合のニトロ化反応もNO消失の一因になりうる。対して、Hb小胞体の構成成分であるDPPCは飽和型の脂質であり、またコレステロールが加わることにより、不飽和脂質が形成する膜よりも安定な疎水場を形成すると考えられる。もしもNOと酸素との反応が化学量論的に $4\text{NO} + \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}^+ + 4\text{NO}_2^-$ で進行するとすれば、水分子が必須となる。不飽和脂質から形成される不安定な疎水場に比較して、HbVの安定な疎水場では、水分子の透過が低下しているのかもしれない。以上の結果から、大気下におけるNOとHbVとの反応は、脂質膜の影響は殆どなく、内包されたHbとの反応が主であることが結論出来た。

HbV存在下でのNO消失速度は、赤血球の場合に比較して極めて速くなった。またNO電極では $\text{O}_2$ -HbVとNOの反応を追跡することができなかった。NOはHbVの内部のHbと主に反応をしていることになる。Fig. 4の結果から、ストップフロー法により混合されたNOの総量の僅か0.1%が物理的



**Figure 5.** Comparison of particle size between HbV (250 nm), Hb (5 nm) and polymerized Hb. According to the molecular weight distribution of Poly<sub>B</sub>Hb, the molecular weight (Mw) of the largest polymerized Hb is 502 kDa, which corresponds to 8 Hbs. One HbV contains about 30,000 Hbs. It is obvious that HbV is much larger than the largest fraction of Poly<sub>B</sub>Hb. For the retardation of NO binding, both Hb concentration in the particle and the particle size are important.

に溶解した酸素と200 ms以内に反応すると推定される。

昨年度の成果において、脱酸素条件においてNOの結合速度の方がCOよりも極めて速く、速い反応であるほど粒子内部に拡散障壁を形成し易いことを結論した。今回の実験において、HbO<sub>2</sub>とNOの反応の方が、deoxyHbとNOの反応よりも速い。そしてFigure 2が示す通り、カプセル化によってdeoxyHbとNOの反応速度は1/4になったのに対し、HbO<sub>2</sub>とNOの反応は1/8にまで低下した。従ってカプセル化の効果は好気条件でより増大したことになる。

これまでの動物投与試験の結果から、HbVは血管収縮とそれによる血圧亢進を生起しないことを報告して来た。しかし、今回の実験でNOとの反応がカプセル化によって遅延され、またCOとの反応がアロステリック因子の内包によって遅延されたものの、赤血球に比較すると極めて速く、今回の結果だけでは血管収縮を回避することの説明はできない。あらゆるHBOCは赤血球よりもずっと小さく、血漿中に存在する。従って、血管内皮近傍の赤血球の存在しない層(RBC-free layer)は、HBOCsのみが存在する領域となり、これがNOの消失場になりうる。Rohlfersらによると(JBC 1998;273:12128-34)、一連の非細胞型のHBOCs (6-28 nm径)についてフラッシュホトリシス法により測定したNO結合速度はどれも未修飾Hb溶液と同等( $3.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )であるにも関わらず、その中で唯一、PEG-Hbのみが血管収縮を生起しないことから、NO結合速度と血管収縮には一切関係が無いこと、むしろ酸素親和性や酸素の促進輸送が関与していると主張している。Poly<sub>B</sub>Hbは血管収縮を生起するのは、未重合成成分が大量に存在することと、P<sub>50</sub>値が高いことが要因として考えられる(Cabrales et al., AJP Heart 2004;287:H2825-33)。

また、粒子径が重要であることも予想できる。血管内皮を透過して、例えば肝微小循環系のDisse腔、あるいは平滑筋と内皮の間のスペースなど、

COやNOが産生されて標的作動部位に到達するまでの微小空間にまで、HBOC拡散できるか否かを決める粒子径があるのかもしれない。事実、Hb小胞体(250 nm)は、1粒子内に約30000個のHbを含有し、Fig. 5に示す通りどのHBOCsよりも大きい。配位子反応を遅延させることと粒子径を大きくすることの両方が、血管収縮を回避するのに重要と考えられる。

## 謝辞

本研究の推進にあたり、武岡 真司 教授、佐藤 敦 君 (早稲田大学)、Prof. Marcos Intaglietta, Dr. Peter Sobolewski (University of California, San Diego), Dr. John A. Frangos (La Jolla Bioengineering Institute)の協力を得た。記して謝意を表する。

## 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. 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).

4. 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)
5. 須崎裕典、酒井宏水、小林直樹、池田達彦、堀之内宏久、小林 絢一、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).
6. 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).
7. 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).
8. 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).

9. 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).

10. 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).

11. 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).

12. 宗慶太郎、小峰梨沙、酒井宏水、小林絃一、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).

13. 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. Control. Release* (in press).

(総説、著書など)

1. 酒井宏水、堀之内宏久、小林絃一. FDA Workshop on Hemoglobin Based Oxygen Carriersに参加して、

人工血液 16, 23-29 (2008).

2. 太田宗夫、宮尾秀樹、大谷渡、酒井宏水. (特別座談会: 世界初、遺伝子組換えアルブミン製剤の承認)臨床開発の経緯と今後の期待について、救急領域の臨床試験責任者に聞く. 人工血液 16, 148-161 (2008)

3. 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).

4. 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)

5. 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)

6. 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、小林絃一 / (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. 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、佐藤敦、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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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.
10. 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
11. 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
12. 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
13. 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
14. 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

15. 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Y. Tomita, H. Toriumi, J. Tatarishvili, M. Tomita, M. Unekawa, 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.
24. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hemoglobin-vesicles as O<sub>2</sub>- and CO carriers / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.

25. 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.
26. 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.
27. R. Aeba, 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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
33. 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 / 脾臓移植における人工赤血球を用いた脾臓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.
34. 酒井宏水 / 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GMP製剤製造方法の確立

分担研究者 甲斐 俊哉 ニプロ株式会社 医薬品研究所 所長  
 研究協力者 西田 誠司 ニプロ株式会社 医薬品研究所 製剤部 部長  
 片山 直久 ニプロ株式会社 医薬品研究所 製剤部 製剤第三研究室長

## 研究要旨

弊社医薬品研究所でのHbV小胞体製造体制構築を進め、ヒト赤血球の入手およびヘモグロビン精製の委託製造体制を再構築した。また、無菌製剤の品質確保の観点から、脂質のバイオバーデン管理向上の方法を検討している。

## A. 目的

昨年度より実施した弊社へのHbV小胞体（HbV）製造技術移転を受け、医薬品研究所内での製造体制の構築を図った。ヒト赤血球の入手およびヘモグロビン精製の委託製造体制を再構築した。

一方、将来的な一段高い無菌製剤の品質確保を目指す観点から、基礎的な製造法検討も同時行い、原材料、特に脂質のバイオバーデン管理向上の方法を詳細に評価することとした。

## B. 方法

## 1. 製造

弊社独自の製造体制を整えるため、精製ヒトヘモグロビンの原料として日本赤十字社から有効期限切れ「赤血球製剤」（未使用）の弊社への提供を受けた。さらにヘモグロビンの精製を株式会社ローマン工業へ委託した。

技術移管された製造技術を参考に弊社施設に対応した製造手順を検討した。

## 2. 製造法検討

原料のうち、一般的に滅菌が困難な脂質混合物

あるいはその予調製物である脂質分散液について、種々の方法による滅菌効果とその安定性を評価した。すなわち、微生物殺滅効果を確認すると共に、これらの熱などの負荷による脂質の安定性や分散液の性状を評価した。

## C. 結果及び考察

## 1. 製造

B-1.の対応の結果、恒常的にヒト精製ヘモグロビン（5～10L/ロット）の入手が可能となった。

なお、担当者の技術習得としてプラセボ（空のリポソーム懸濁液、10Lスケール）を調製した。

## 2. 製造法検討

現在、高圧蒸気滅菌を含め2、3の方法での滅菌と安定性確保の可能性を調べている。特に安定性評価には脂質成分分解物の低分子・極性化の可能性を考慮して脂質抽出に依らない成分定量（HPLC）も新たに取り入れた。

その結果、脂質成分の分解は、特に温度、続いてpHに依存していた。高圧蒸気滅菌のように100℃を超える条件では脂質の分解が当然みられ

る。この時、脂質成分により安定性に顕著な差があることを確認した。実製造における前後工程との整合性も考慮してこれらの滅菌方法を工程に組み込む検討を進めたい。

## D. 研究業績

### 1. 論文発表

1. Taguchi K, Maruyama T, Iwao Y, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Tsuchida E, Kai T, Otagiri M. Pharmacokinetics of single and repeated injection of hemoglobin-vesicles in hemorrhagic shock rat model. *J Control Release* (2009) in press.
2. Ishima Y, Akaike T, Kragh-Hansen U, Hiroshima S, Sawa T, Suenaga A, Maruyama T, Kai T, Otagiri M. S-nitrosylated human serum albumin-mediated cytoprotective activity is enhanced by fatty acid binding. *J Biol Chem.* (2008) 283(50):34966-75.
3. Katayama N, Nakajou K, Komori H, Uchida K, Yokoe J, Yasui N, Yamamoto H, Kai T, Sato M, Nakagawa T, Takeya M, Maruyama T, Otagiri M. Design and evaluation of S-nitrosylated human serum albumin as a novel anticancer drug. *J Pharmacol Exp Ther.* (2008) 325(1):69-76.

### 2. 学会発表

1. Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Maruyama T, Kai T, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Tsuchida E, Otagiri M. Effect of the Initially Injected Hemoglobin Vesicles (HbV) on the Pharmacokinetics of Second Injection of HbV in Mice. The 6th Current Issues on Blood Substitute Research (Tokyo, Japan; 2008, 10/24-25)
2. Maruyama T, Katayama N, Nakajou K, Ishima Y, Komori H, Uchida K, Yokoe J, Yasui N, Yamamoto H, Kai T, Sato M, Otagiri M. Design and Evaluation

of S-nitrosylated Human Serum Albumin as a Novel Anticancer Drug. The 6th Current Issues on Blood Substitute Research (Tokyo, Japan; 2008, 10/24-25)

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. Ishima Y, Akaike T, Kragh-Hansen U, Hiroshima S, Sawa T, Suenaga A, Maruyama T, Kai T, Otagiri M. S-nitrosylated human serum albumin-mediated cytoprotective activity is enhanced by fatty acids binding. 2nd Asian Pacific Regional Meeting (Shanghai, China; 2008, 5/11-13)
5. 田口和明, 丸山徹, 岩尾康範, 酒井宏水, 土田英俊, 小林紘一, 甲斐俊哉, 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解析/第128年会 日本薬学会/横浜/2008, 3/26-28
6. 廣山秀一, 異島優, 甲斐俊哉, 丸山徹, 小田切優樹/簡便なS-ニトロソ化アルブミン製剤の調製について/第128年会 日本薬学会/横浜/2008, 3/26-28
7. 宇野公之, 瀧川総太郎, 石丸武文, 清田浩平, 甲斐俊哉, 石川吉伸, 富杉佳計, 青山浩/ヘモグロビン四量体の会合安定化に寄与するアミノ酸残基の探索/第18回金属の関与する生体関連反応シンポジウムSRM2008(名古屋, 2008.6.5).
8. 異島 優, 片山直久, 中城圭介, 小森久和, 甲斐俊哉, 佐藤 誠, 小田切優樹/新規抗癌物質としてのS-ニトロソ化アルブミンの設計と評価/第24回日本DDS学会/東京/2008, 6/29-30

9. 甲斐俊哉／輸血代替物としての人工酸素運搬体／第20回北海道輸血シンポジウム（2008.7.4、札幌）
  10. 異島優、廣山秀一、Ulrich Kragh-Hansen、赤池孝章、澤智裕、末永綾香、甲斐俊哉、小田切優樹／脂肪酸結合によりSNO-HSAの細胞保護効果は増強する／第30回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム／札幌／2008、8/7-8
  11. 田口和明、丸山徹、甲斐俊哉、酒井宏水、土田英俊、小林紘一、小田切優樹／出血性ショックモデルラットにおける頻回投与時のヘモグロビン小胞体の体内動態特性評価／第15回日本血液代替物学会年次大会／東京／2008、10/23
  12. 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
  13. 異島優、赤池孝章、澤智裕、末永綾香、丸山徹、甲斐俊哉、小田切優樹／脂肪酸はS-ニトロソ化ヒト血清アルブミンによるS-ニトロソ転位反応の新規制御因子になり得る／第23回日本薬物動態学会年会／熊本／2008、10/30-11/1
- G. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）**
1. 脂肪酸を含有するS-ニトロソタンパク質とその製法／異島 優、赤池 孝章、小田切 優樹／特開2008-050294
  2. 糖鎖含有アルブミン、その製造方法およびその用途／中城 圭介、片山 直久、甲斐 俊哉、小田切 優樹／特開2008-043285
  3. ビキア酵母を用いた組換えヒトヘモグロビンの製造／中城 圭介、帆足 洋平、甲斐 俊哉、宇野公之、小田切 優樹／特開2008-017774
  4. 人工酸素運搬体製剤／甲斐俊哉、西田誠司、片山直久、堀伸明、真鍋宣久、須賀裕子／特開2008-195656（特願2007-032978）

## 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. 人工臓器としてのHb小胞体の臨床応用における安全性の評価  
2. 試料の滅菌法の開発：超高压処理による滅菌の可能性の検討

研究分担者	高野 久輝	ニプロ株式会社 総合研究所 人工臓器開発センター	センター長
研究協力者	堀江 政雄	ニプロ株式会社 総合研究所 人工臓器開発センター	部長
	山根 恒彦	ニプロ株式会社 医薬研究所 製剤研究部製剤研究部	主席
	岸田 晶夫	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 分子制御分野	教授
	堀之内 宏久	慶應義塾大学医学部 呼吸器外科	准教授
	勢司 泰久	慶應義塾大学 総合医科学研究センター	助教

## 研究要旨

(1) 体外循環を用いた手術の初期充填液に人工酸素運搬体であるHb小胞体を用いることで高次脳機能の欠落を回避できる可能性が報告されたが、実際に体外循環を行った後にHb小胞体がどのような変化を受けるかについては明らかとなっていないので、ラットにおける体外循環の検討をしたのちの体外循環回路に残った血液から赤血球を取り除いた血漿成分の中のHb小胞体についてその粒径分布、酸素解離曲線について検討したところ、体外循環を行う前の試料と粒径、酸素解離曲線に有意な差を認めず、体外循環を経たのちもHb小胞体は安定した粒径を保持して機能することが明らかとなった。このことは体外循環後にHb小胞体を完全に除去せずとも、体内で人工酸素運搬体として機能し、代謝されることを示すものと考えられた。また、採取したHb小胞体の形態を簡便に観測する為に低真空スキャニング電子顕微鏡を用い評価できるかについて検討した。この方法は、試料をエッチングやスパッタリングをせずに形態を観察することができる装置であるが、凍結操作が入るため、脂質2重膜のIntegrityが失われる可能性があり、Hb小胞体の状態を観察する為には条件設定が必要であった。

(2) 生体投与を行う人工酸素運搬体であるHb小胞体の臨床応用を考えた場合に滅菌が重要な課題である。各種滅菌法のなかで、加熱や放射線照射は試料に変性を与える。我々は、新たに超高压処理法を検討した。まず超高压処理による滅菌の可能性の検討を行った。その結果、超高压処理により、常在菌の栄養型細菌及びvirusは、60℃で3,000気圧を10分以上加えることにより滅菌が可能であることが判明した。しかし、芽胞を形成するbacillusは、10℃および30℃で10,000気圧を10分保持しても滅菌効果を認めなかったが、30℃および37℃で、10,000気圧を60～100分保持することにより、滅菌が可能であることが判明した。なお、60℃で3,000気圧を10分以上保持することにより、滅菌が可能であることも判明した。しかし、超高压で人工酸素運搬体に変性するか否かの検討、更に印加する気圧、温度、加圧時間、および評価に用いるBacillusの数を変えて、試料の最も実用的な超高压滅菌法の確立を図る予定である。

## 1. 人工臓器としてのHb小胞体の臨床応用における安全性の評価

### A. 研究目的

血液は”流れる臓器”とも呼ばれ、その機能は体組織に対し必須成分(酸素、栄養分、ホルモンなど)の運搬、老廃物の運搬、環境条件(温度、pH、浸透圧)の維持、生体防御など、多岐に及ぶ。その意味で、人工酸素運搬体は”人工臓器”の一つとして定義されている。Hb小胞体(HbV)が赤血球に比較して長期保存が可能であり、また赤血球に比較して低張溶血が起こり難いなど、構造的安定性に優れることが明らかになっている。しかし、体内に投与した場合のHb小胞体の安定性、ひいては人工臓器使用時の安定性に関する知見は皆無といえる。平成20年度は、18、19年度に続き、剪断速度に対するHb小胞体の安定性について基礎的な知見を得るとともに、人工臓器使用時のHb小胞体の安全性について検討するため、動物モデルを用いた検討を行った。

### B. 方法

人工酸素運搬体の生体への投与による安全性と有効性については、現在までの研究で明らかにされつつあるが、人工臓器として広く用いられている人工弁、人工腎臓、膜型肺、ローラーポンプ、遠心ポンプが使用される状況下での変化については十分な知見が得られていない。現在、体外循環の充填液としての臨床応用の可能性が検討されている。人工心肺の回路は人工肺、ローラーポンプ、熱交換器より成り、この回路での適合性を評価することによってこのような人工臓器との併用状況で問題となる凝固系への影響や血球成分の変化、Hb小胞体そのものの剪断応力に対する安定性などが総合的に判定できると考えられた。

#### 1. ラットを用いた人工心肺モデル

ラット用に開発したPriming Volume40ml、人工肺部分長10cm、熱交換器とリザーバーを有する回路を作成し、脱血は上大静脈、送血は尾動脈とし、200ml/kg/minのスピードで90分間の人工心肺の運転を行う、高次脳機能の解析に用いるモデルを用いて検討した。

90分後、人工心肺を終了した際に、回路に残る血液を回収、4500 rpm、15分で血球成分を回収、動物に返血した。

本実験には体外循環開始前、及び返血後に残った血漿成分を用いて検討を行った。血漿成分は試料を4500rpm15分で遠心し、沈殿した層を赤血球成分として除去し、残りの血漿成分を用いて検討した。HbVはこの条件の遠心処理では沈殿せずに血漿層に分散して残るため、混濁した赤橙色を呈していた。

#### 2. 粒径、酸素解離曲線の測定

粒径の測定は動的光散乱法を用いて、酸素解離曲線は窒素ガス痙攣法による分光分析を用いて求めた。測定はいずれも25℃、大気圧下で行った。

#### 3. 体外循環施行前後のHb小胞体の電子顕微鏡的観察

体外循環前後のHb小胞体分散液をHitachi High-Technologies社Model SU6600を用いて低真空スキャン電子顕微鏡観察を行った。

### C. 結果および考察

#### 1. ラットを用いた人工心肺モデル

体外循環は安定して運転することができ、運転終了後動物が覚醒することを確認し、循環系に急性の障害作用を起こさないことが確認された。体外循環終了後の試料の採取、試料の分離にも困難はなかった。

#### 2. 粒径、酸素解離曲線の測定

人赤血球では体外循環を行うとFragmentationや、溶血が少なからず認められるが、今回の検討では赤血球の除去して粒径分布を計測した。体外循環前後の粒径分布はHb試料作成時とほぼ同等の260nm付近にあり、体外循環前の試料と粒径において有意差はなかった。また、酸素解離曲線も体外循環前後でほとんど変化を認めなかった。

### 3. 体外循環施行前後のHb小胞体の電子顕微鏡的観察

低真空SEMは試料の設置に凍結操作が入るため、Hb小胞体の脂質2重膜のIntegrityが失われ、簡便に微小形態を解析する方法としては条件設定を摸索する必要があると考えられた。

## 2. 試料の滅菌法の開発：超高压処理による滅菌の可能性の検討

### A. 研究目的

人工酸素運搬体は、多量を生体血管内に投与するので、感染症ないし敗血症を生じないことが肝要で、無菌状態でなければならぬ。そこで、本研究では、人工酸素運搬体であるHbV(Hb小胞体)の滅菌法の検討を行う。

滅菌法には、一般的に表-1に示すごとき方法が用いられている。試料には、ヘモグロビン(Hb)を含有しているため、高温加熱する滅菌法や高熱を出す方法、および変性させる滅菌方法は用いる事は不可能である。文献による血液に対する加熱の限界は、60℃を10時間まで可能と報告されている。濾過法が望ましいように思われるが、濾過は細菌までで、より小さいvirusは除去することはできない。放射線照射法は、試料に変性を起こす可

能性があり、本試料には不適であることが判明した。

そこで我々は、再生医療で滅菌を兼ねて開発した超高压静水圧印加による、移植用生体組織の処理方法(特許公開2004-97552)を用いることを検討した。この方法は、本来異種動物の組織を臨床に用いる場合に、拒絶反応を生じないように、その動物の細胞を破壊、除去する目的に開発された方法で、動物の組織に高压(約10,000気圧)を印加して異種動物の細胞及びvirus、細菌類の微生物を死滅、除去させるものである。

本研究は本方法を、人工酸素運搬体(試料)の滅菌に応用する可能性を検討するものである。

### B. 研究方法

各種細菌、virus、真菌の内、先ず滅菌が最も困難な芽胞を形成するBacillusの内、Bacillus atrophaeus(Bacillus subtilis var. niger)を滅菌の指標に選定して滅菌効果を検討した。本菌を103個封入した培地(NAMSA製SCDB)(以後これを検体と呼ぶ)を密閉容器に入れ、図1に示す冷間等方圧加圧装置(CIP:神戸製鋼製)で、300MPa(3,000気圧)、1,000MPa(10,000気圧)の超高压を印加し、印加中の温度を10℃、30℃、50℃、および60℃に維持し、加圧保持時間を10分、30分、60分にして、微生物の生存を培地の色の変色(培地が黄変すればbacillusが生存していることを意味し、変色しなければ死滅を意味する)で、判定した。

### C. 結果

栄養型細菌及びvirusは、50~60℃3,000気圧30分で、死滅効果を認めた。即ち滅菌可能であった。一方、芽胞を形成するBacillusは、10℃、30℃では、10分間10,000気圧加圧では、培地が黄変し、Bacillusの死滅効果は認めなかった。しかし、60分~100分間10,000気圧の加圧では培地の変化を認めなく死滅効果を認めた(表-2)。

表一 滅菌法の種類



表一2 超高压処理実験成績(压力設定：10, 000気圧)

培地：NAMSA SCDB 培養器：PIC-100、30～37℃

サンプル No	温度(℃)	昇圧時間(分)	保持時間(分)	減圧時間(分)	培地の変色
1	10	5	10	5	黄変
2	10	5	10	5	黄変
3	30	5	10	5	黄変
4	30	5	10	5	黄変
5	30	15	10	15	黄変
6	30	15	10	15	黄変
7	30	15	10	15	黄変
8	30	15	100	15	変化なし
9	30	15	100	15	変化なし
10	30	15	60	15	変化なし
11	30	15	60	15	変化なし
12	37	15	60	15	変化なし
13	37	15	60	15	変化なし
14	37	15	10	15	変化なし
15	37	15	10	15	変化なし

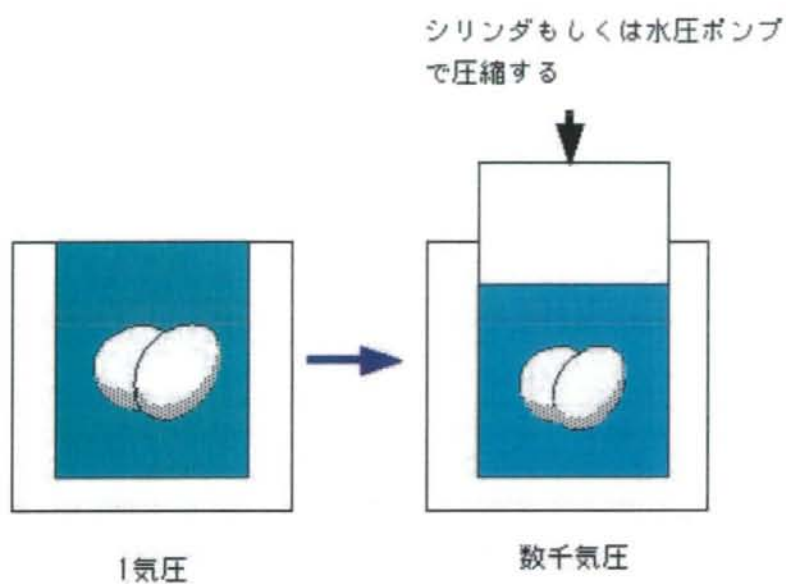


図- 2. 冷間等方圧超高压加压装置 (CIP)

~10,000atm





表一3 超高压処理実験成績(圧力設定：3,000気圧)

培地：NANSA SCDB 培養器：PIC-100、30~37℃

サンプル No	温度(℃)	昇圧時間(分)	保持時間(分)	減圧時間(分)	培地の変色
3 1	6 0	1 0	6 0	1 0	変化なし
3 2	6 0	1 0	6 0	1 0	変化なし
3 3	6 0	1 0	3 0	1 0	変化なし
3 4	6 0	1 0	3 0	1 0	変化なし
3 5	6 0	1 0	3 0	1 0	変化なし
3 6	5 0	1 0	1 0 0	1 0	変化なし
3 7	5 0	1 0	1 0 0	1 0	変化なし
3 8	5 0	1 0	1 0 0	1 0	変化なし
3 9	5 0	1 0	6 0	1 0	変化なし
4 0	5 0	1 0	6 0	1 0	変化なし
4 1	5 0	1 0	6 0	1 0	変化なし
4 2	5 0	1 0	3 0	1 0	変化なし
4 3	5 0	1 0	3 0	1 0	変化なし
4 4	5 9	1 0	3 0	1 0	変化なし

なお、3,000気圧の加圧でも、50~60℃と温度を高め30分~100分の加圧保持時間であれば、培地の変色が無く死滅効果を認めた(表一3)。

#### D. 考察

冷間等方圧加圧装置を用いた超高压処理による滅菌の可能性の検討を行なった。常在菌の栄養型細菌及びvirusは、60℃で3000気圧を10分以上加えることにより滅菌が可能であることが判明した。しかし、芽胞を形成Bacillusは、60℃で3000気圧10分以上加圧又は、30℃で、10000気圧60~100分間保持で、滅菌が可能であることが判明した。

そこで、完全な滅菌法が存在しない現況では、通常血液製剤は、滅菌されているので、人工赤血球の原材料(ヘモグロビン)は滅菌されているはずである。そこで、製剤の操作(リボゾームへのヘモグロビンの封入)を無菌的に行う原則に立って、試料を作成(製剤)し、最終的に60℃で3000気圧10分以上加圧又は、30℃で、10,000気圧60~100分で、ほぼ滅菌が可能と考えられる。

なお、今回の評価では、評価に用いたBacillusの数が103個であったが、今後もっと多回数、106個での評価を試みなければならない。更に3,000気圧

と10,000気圧を代表的な超高压として滅菌の評価としたが、今後更に低圧での検討も行わなければならない。また、常温で更に超高压のより短時間の印加での検討を加えて無ければならない。さらに、超高压による試料の変性、変質の有無をも検討しなければならない。

#### E. 結論

最終的に60℃で3000気圧10分以上加圧又は、30℃で、10,000気圧60~100分で、ほぼ滅菌が可能と考えられる。しかし、超高压の印加による試料への影響(編成の有無)、さらに印加する気圧、温度、加圧時間、評価に用いるBacillusの数を変えて、最も実用的な超高压滅菌法の確率を図りたい。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究業績

該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 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：人工酸素運搬体を用いた体外循環における高次脳機能の保護に関する検討

研究分担者	饗庭 了	慶應義塾大学医学部心臓外科 准教授
研究協力者	堀之内 宏久	慶應義塾大学医学部呼吸器外科 准教授
	勢司 泰久	慶應義塾大学 総合医科学研究センター 助教

## 研究要旨

人工酸素運搬体を用いた体外循環の初期充填が術後の高次脳機能の保持に有効であることをわれわれは既に報告した。高次脳機能が保護される要因について脳血流と脳の酸素分圧が体外循環中にどのように変化しているかについて検討した。その結果、Hb小胞体を用いて初期充填を行った群では5%アルブミン生食を用いて初期充填を行った群と比較して離脱時の脳血流の低下が著しくないことが明らかとなり、赤血球やHb小胞体のような人工酸素運搬体が脳血流を維持し、高次脳機能を保護している可能性が示唆された。

## A. 研究目的

心奇形の発生率は1986年の厚生省の全国調査によると1.08%とされている。このうち高度心奇形の症例や新生児期、乳児期に心不全となる症例はこの時期に心奇形に対する手術を行うことが必要となる。新生児期や乳児期に体外循環を用いた手術を行うには体外の回路の初期充填量が循環血液量に比して大量となるので、導入、離脱時の幹事の負担を低減させる努力が必要である。通常成人では体外循環時の初期充填には輸血を用いずとも安定した体外循環を確立することが可能となっている。しかし、新生児、乳児期の体外循環で無輸血で初期充填を行うと、体外循環運転時のヘマトクリットが極端に減少し、術後の高次脳機能に影響を与えるとされており、通常は輸血を用いた初期充填が行われている。

輸血を用いた初期充填は血液を介した感染症の可能性を残すため、可能であればこの方法を避け

て、安全な体外循環を確立する方法が必要である。われわれはHb小胞体を初期充填に使用することで、術後の高次脳機能を維持できることを既に報告した。今回、高次脳機能を保護できる要因として、体外循環前後の脳血流および組織酸素分圧の変化についての検討を行うことを目的とした。

## B. 方法

我々が確立したラットに対する体外循環モデルを用いた。

尾動脈に送血用の22Gサーフローを留置、右頸静脈より16G脱血カニューレを右心房近傍まで挿入、留置した。体外循環回路はラット用に開発した人工肺を用いPriming Volumeを約35mlの回路を作成し、Heat exchanger (37.5℃)を介在させて脱血路、送血路に接続した。頭部皮膚を切開、剥離して頭蓋を露出、左右に4 mm大の開頭を行い、止血を行った後、硬膜を切開、レーザードップラー血流計

を用い右開頭窓の軟膜直下の脳実質にプローブを穿刺、脳実質の血流を測定した。また、左側開頭窓の軟膜下に酸素電極を刺入し、酸素分圧を測定した。

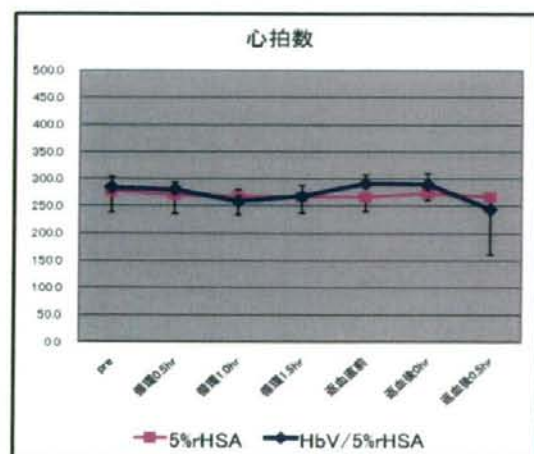
開頭窓の処置が済んだあとに1000 U/kgのヘパリンを静注して全身をヘパリン化した。状態が安定したのを確認した後に体外循環を開始、0.02 L/minから開始して徐々にスピードを上げ、約5分で200 ml/kg/minまで上昇させ、安定化させた。体外循環時間は90分とし、90分後から徐々にポンプ流量を下げ、約5分で停止する。体外循環回路内の血液を回収し、4000 rpm 15分で沈殿した赤血球成分を20分かけて輸注した。測定時点は体外循環開始前、開始後0.5、1.0、1.5、返血開始直前、返血終了直後、返血後30分とした。測定項目は心拍数、脳血流量、脳組織酸素分圧、ヘマトクリットとした。

初期充填液を5%rHSAとした群(5%rHSA群 n=5)と5%rHSAにHbV小胞体を分散した溶液とした群(HbV/5%HAS群 n=6)を実施し、比較した。

## C. 結果

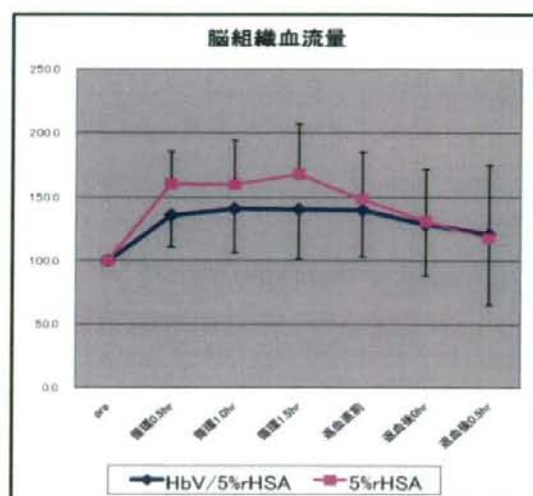
### 1. 心拍数

心拍数は5%HAS群、HbV/5%HAS群ともに実験終了時まで250~300の間を推移し、明らかな差を認めなかった。



### 2. 脳組織血流

脳組織血流は体外循環中は5%アルブミン生食群で高値を示し、術前値に比して高値であった。また、HbV群では体外循環中は術前値に比して変化が少なかった。その変化率は5%アルブミン群では体外循環1.5時間後に最高となり、 $168.0 \pm 38.0\%$ であったが、HbV群では体外循環1時間後で $141.1 \pm 34.5\%$ であり、有意差はないもののアルブミン生食群で高値であった。また、体外循環を終了すると脳血流は5%アルブミン生食群で明らかに減少した。減少率を両群で比較したが、明かな差はなかった。

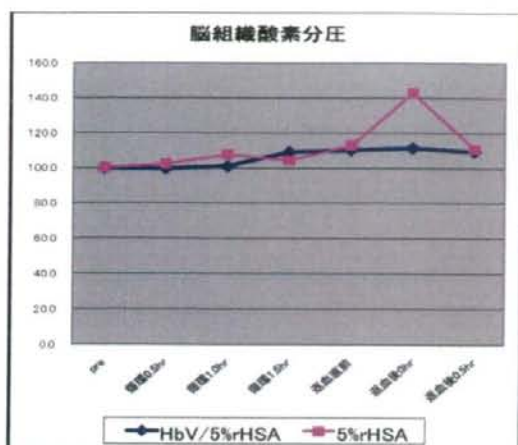


### 3. 脳組織酸素分圧

脳組織酸素分圧はほとんど変化はなく、両群間に有意差もなかった。

### 4. ヘマトクリット

ヘマトクリットは体外循環成立とともに著しく低下し、体外循環終了後の回路内の赤血球の返血操作によって上昇が認められた。その変化は両群間でほぼ同様であった。



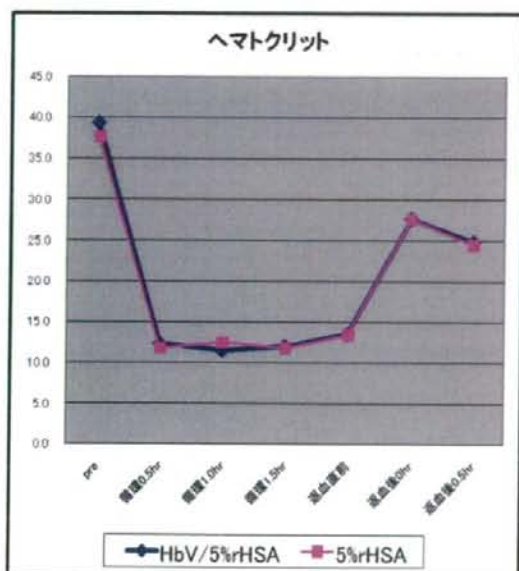
無輸血体外循環後の高次脳機能の低下がどのようなプロセスによって引き起こされるかについては体外循環中の脳内での酸素代謝が減少することが原因ではないかと推測されている。

今回われわれはラットを用いた体外循環のモデルを用いて脳内の酸素代謝の変化について検討した。その結果、脳組織の酸素分圧は体外循環の前後を通じてほとんど一定に保たれ、自己制御能力が高いことがうかがわれた。一方、脳組織血流は体外循環開始とともに上昇し、上昇の程度は5%アルブミン生食のほうで大きかった。また、上昇した脳組織血流は体外循環を終了すると減少した。その減少率は5%アルブミン生食群で高く、HbV群では変動が抑制されていた。

脳内の血流は自己調節能に富み、酸素需給によって血流量を自己調節していると考えられており、脳神経より分泌されるnNOSや、アセチルコリン、セロトニン、ドパミンなどの神経伝達物質やカテコラミンが調節にかかわっていると考えられている。

ラットに用いた体外循環の血流量(200ml/kg/min)はヒトに換算すると10L/minとかなりの高流量となっており、ヘマトクリットの低下と凝固能の低下によって各臓器の血流量も上昇していると考えられた。脳血流も上昇を認め、体外循環後には術前値に戻る変化を示し、Autoregulationが機能し、体外循環90分ではこの自己調節能の変調はきたさないことが明らかとなった。特にHb小胞体を用いた初期充填を行った群では脳血流の変動が少なく、脳神経に与える影響が少ないのではないかと推察された。今回の検討では大開頭を行い、頭蓋内圧がほぼ一定の条件下で行った。もし頭蓋が閉鎖状態で検討が行われたと考えると、アルブミン生食群では頭蓋内圧が亢進し、脳血流が低下する事態に陥っていたことが予想された。

HbVはヘマトクリットが減少した体外循環状態で酸素供給を行うことにより、脳血流を一定に保ち、頭蓋内圧の急激な変動から脳組織を守ること



#### D. 考察

体外循環が全身の臓器にドラスティックな変化を与えることは周知の事実であり、電解質バランスの管理、尿量の管理、心機能の変化の観察、神経症状や高次脳機能の変化の観察など術後管理には通常の麻酔とは異なる注意が必要である。われわれは学習という高次脳機能の変化についてラットの体外循環モデルを用いて検討してきた。その結果、無輸血にて体外循環を90分行うと、学習機能の低下が遷延することを明らかとした。