

物質透過性については、マーカーとして $^{51}\text{Cr-EDTA}$  および $^{14}\text{C-mannitol}$ を腸管内腔の灌流液に添加し、静脈血液をフラクションコレクターで回収、シンチレーションカウンターでマーカー濃度を測定し

た。

### C. 結果および考察

予備的試験として、HbVをRinger's Lactate溶液

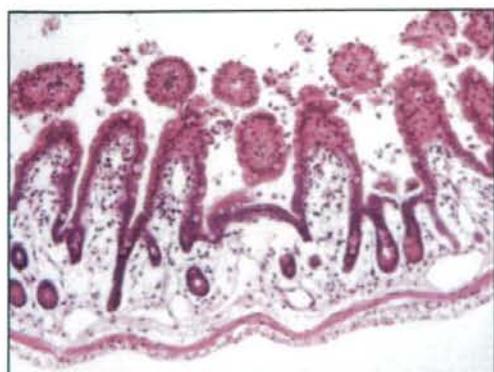


Fig 3. Intestinal histology after 1 hr of perfusion with Krebs' solution

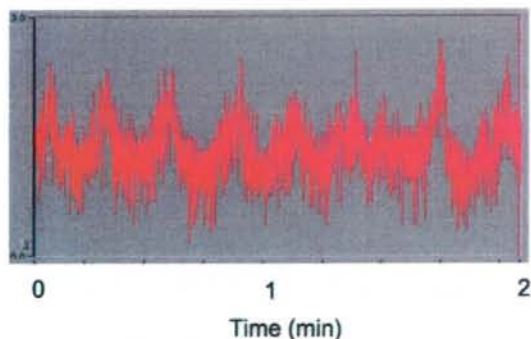


Fig. 4. Manometric recording during perfusion with erythrocyte solution.

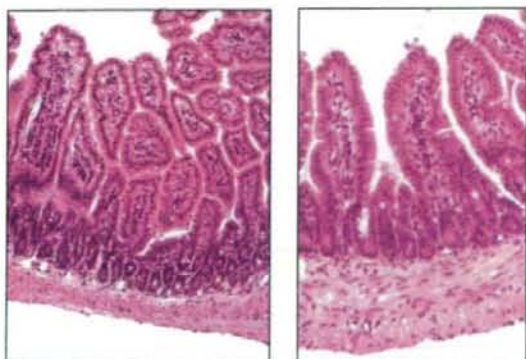


Fig. 5. Intestinal histology after 2 hrs of perfusion with erythrocytes re-suspended in Krebs' solution (H&E staining).

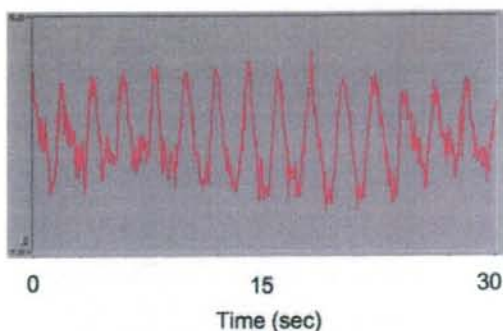


Fig 6. Manometric recording during perfusion with HbV-Krebs' solution

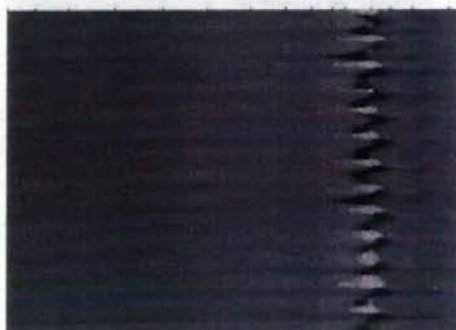


Fig. 7. Perfusion with HbV-Krebs' solution and spatio-temporal image of the motion of intestine.

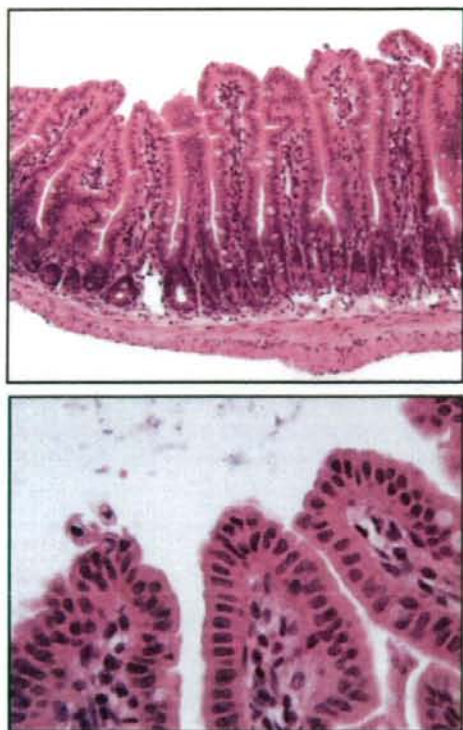


Fig. 8. Intestinal histology after 2 hrs of perfusion with HbV-Kreb's solution (H&E staining).

15%アルブミン(HSA)に分散させ、これを100%酸素化して灌流した。しかし灌流2時間後に顕著な腸管粘膜の落層がみられ、内腔のフローが停止した。運動機能は、最初は正常であったが、1時間以内に悪化。特に、肛側方向の遅い周期の収縮は、不規

則な収縮に。組織病理学的には、絨毛先端の変形が観測された。そこでMcMaster Univ.と早大で協議を重ね、Ringer's Lactateではなく、Kreb's 溶液を使用することにした。

酸素化したKreb's溶液にHSAを添加した溶液で30分間の灌流を試みたところ、最初は、Fig. 1, 2に示すように収縮の伝搬が観測された。しかしこの収縮は30分後には不規則となり、圧力は高いが弱い周期の収縮に変化した。また、内腔灌流液に落層した腸管粘膜が観測された。組織病理学的検討でも腸管構造の損傷が著しく、腸管壁の浮腫、絨毛の変形も確認された(Fig. 3)。これらの変化は、灌流1時間で観測された。

次に、マウスの洗浄赤血球をKreb's溶液/HSAに分散させた溶液(Hct= 40%)で検討した(n=5)。3匹について微小な塞栓が観測され異常な運動パターンが観測され、腸管粘膜の障害が観測された。また2匹において規則正しい収縮が確認された(Fig. 4)。動脈圧は安定していたが、次第に上昇する傾向にあった。組織病理学的検討では、腸管粘膜と筋肉層の構造の保持が2時間灌流後も確認された(Fig. 5)。絨毛の先端が僅かに変形していた。

HbVを用いた灌流試験は、HbV(7 g/dL)が5g/dL-HSA含有Kreb's 溶液に分散された溶液を用いて行った(n=4)。その結果、マウスで*in vivo*で観察される場合と同様の周期性のあるゆっくりとした収縮が認められた(Fig. 6)。ビデオ画像解析からも、周期的な収縮と、波動の両端方向への伝搬が観測さ

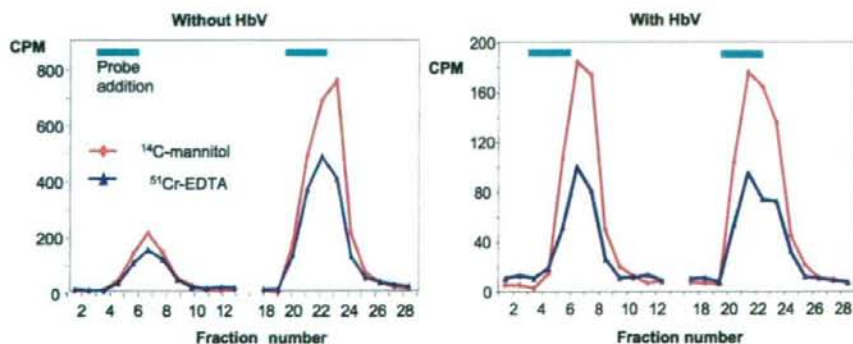


Fig. 9. Permeability of macromolecular probes during the perfusion of intestinal segments with and without HbV.

れた(Fig. 7)。動脈圧は実験中安定した値を推移し(40-60 mmHg)、腸管機能の安定性を示唆した。組織病理学的検討では、2時間灌流後でも腸管の構造が保持されていた(Fig. 8)。腸粘膜と神経筋層の構造も完全に保たれた。一部絨毛の先端の落屑も認められたが、洗浄赤血球による灌流と同等であった。

腸粘膜の物質透過性を検討したところ(Fig. 9)、HbVを含有しない場合は、1回目(6min)の測定に比較して2回目(60min)の測定で顕著に透過性が亢進したが、HbVを含有する場合には2回目の測定で得られた透過性は1回目と同等であり、透過性の亢進が無いことが確認でき、病理組織の変化が無いことと一致している。

#### D. 結論

HbVとKreb's溶液/HSAの組合わせた溶液を用いて、摘出小腸を灌流すると、*in vivo*で観察される場合と同様の蠕動運動が観測された。腸管粘膜の落屑も回避され、腸粘膜の物質透過性も亢進せず、関門機能が保持された。以上のことより、HbVは腸管機能に影響を与えないことが結論できた。

本研究の結果は、HbVの溶液組成(代用血漿剤、電解質)の最適化をはかれば、臓器灌流液としてのみならず、組織・臓器再生のための酸素供給液として使用することの可能性を示すものである。

## 15. Hb小胞体によるマウス摘出腸灌流試験(2)

### A. 研究目的

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

### B. 実験方法

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

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

ターで回収、シンチレーションカウンターでマーカー濃度を測定した。

### C. 結果および考察

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

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

### D. 結論

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

## 16. 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

C57BL6 (H-2<sup>b</sup>)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C57BL6マウス(H-2<sup>b</sup>)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とした。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。

脾島の単離・精製・保存過程でHbVを用いた積極的な酸素供給により、脾島の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脾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。

## 17. 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し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(N<sub>2</sub>O:O<sub>2</sub>=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、歪み圧力用アンブ (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ブ (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。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プ (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、PaCO<sub>2</sub>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PaCO<sub>2</sub>とし、1回目の投与前にPaCO<sub>2</sub>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°C、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B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>)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、TXB<sub>2</sub>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A<sub>2</sub>の産生により、末梢循環が顕著に悪化した、2) ブ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中で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

## 1.8. リン脂質小胞体表面の陰性荷電と補体活性の関連

### A. 研究目的

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

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

### B. 研究方法

#### 1. 試料

次の5種脂質を実験に使用した。

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

CH: cholesterol

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

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

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

#### 2. 小胞体調製

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

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

### 3. 物性値測定

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

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

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

### 4. ゼータ電位測定

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

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

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

### 5. 静電的相互作用モデル

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

を所定濃度で小胞体分散液に添加し、ゼータ電位の変動を測定した。

## 6. 投与試験

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

## C. 研究結果・考察

### 1. 試料

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

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

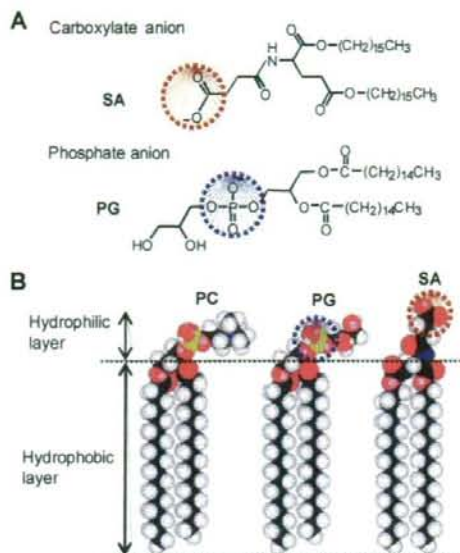


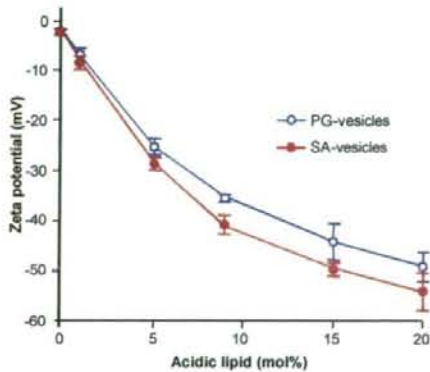
Fig. 9. Structure of anionic compounds for surface modification of vesicles. (A) Chemical structure of L-glutamic acid, *N*-(3-carboxy-1-oxopropyl)-, 1,5-dihexadecyl ester (SA) and 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (PG). The focus of this study is the different acidic groups shown in the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

### 2. 小胞体のゼータ電位

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



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



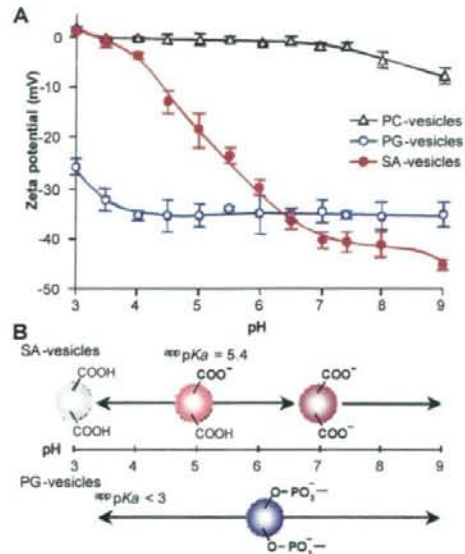
**Fig. 10.** Zeta potential of vesicles modified with SA (SA-vesicles) and PG (PG-vesicles) as a function of acidic lipid content. Zeta potentials were measured in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4, NaCl; 20 mM) at 37°C.

### 3. 酸性基の解離特性

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

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

ゼータ電位が解離度と直線的に相関する条件でFig. 11Aのデータを式2により解析すると、SA-vesicles表面の見かけのpKaは5.4と算出される(Fig. 11B)。pH 7以上の条件では、SA-vesiclesのゼータ電位はほぼ一定であることから、pH 7以上では大部分のカルボキシル基は解離していることがわかる。一方、PG-vesiclesのゼータ電位はpH 4-9で範囲では殆ど変化なく、リン酸基が安定に解離しているためである。PG-vesiclesの見かけのpKaは3以下と見積もられた。この結果は、SA-vesiclesとPG-vesiclesの表面が各々SAの弱酸基とPGの強酸基の特性を反映し、すなわち酸性基固有の特徴により小胞体表面が標識されていることを示す。



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

### 4. 静電的相互作用

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

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

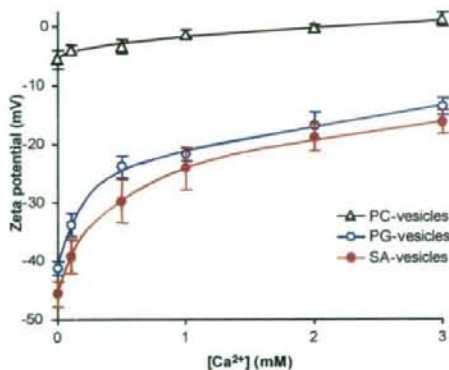


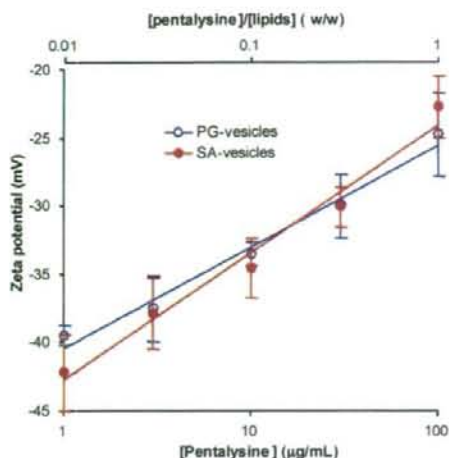
Fig. 12. Change in zeta potential of vesicles as a function of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. Vesicles were dispersed at 100 mg/mL in 10 mM HEPES buffer (pH 7.4, at 37°C) containing NaCl and  $\text{CaCl}_2$  (total: 20 mM). PC-vesicles: PC/CH (1:1, molar ratio), SA-vesicles: PC/CH/SA (1:1:0.2, molar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

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

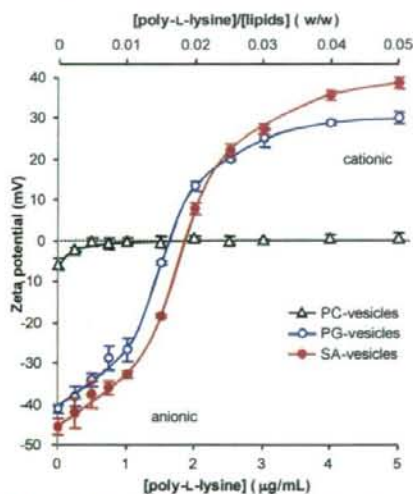
ンのオリゴマーまたはポリマーは膜表面での塩基性オリゴマーや高分子量体の静電的相互作用のモデルとしてよく用いられている。Fig. 13に示すように、小胞体のゼータ電位はペントリシン濃度に対して一次関数的に変化した。SA-vesiclesとPG-vesiclesではペントリシン濃度の1/10につき9.3と7.4mVの傾きを持つ。PC-vesiclesでの傾きはわずか0.26mVであることから、酸性脂質の負電荷が塩基性ペントリシンとの相互作用の媒介となっていることがわかる。ゼータ電位の変化は塩基性ペプチドの結合を反映するため、ゼータ電位変化の同等の傾きは、SA-vesiclesとPG-vesicles表面への塩基性ペプチドの結合定数が同等であることを示す。

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

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



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

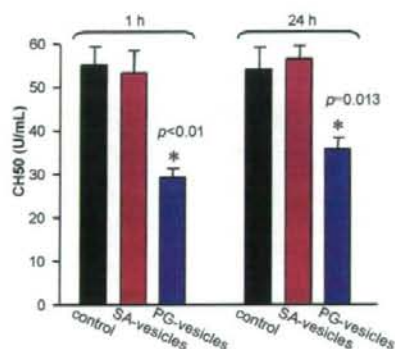


**Fig. 14.** Change in zeta potential of vesicles as a function of the concentration of basic macromolecule (poly L-lysine, Mw. 15-30 kDa). Vesicles were dispersed at 100 mg/mL in 10 mM HEPES buffer (pH 7.4, at 37°C, NaCl, 20 mM) containing various amount of poly L-lysine.

## 5. 補体活性

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

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



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

## D. 結論

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

## 19. Hb小胞体/代用血漿剤分散系の粘弾性計測

### A. 研究目的

Hb小胞体(HbV)分散液の膠質浸透圧は殆んどゼロに近い。従って、大量投与に際しては代用血漿剤の併用が循環血液量の維持に重要となる。従来、HbVを5%アルブミン(HSA)溶液或はリコンビナントアルブミン(rHSA)溶液に分散させ膠質浸透圧を20mmHgに調節し、この分散液を用いた出血ショック蘇生試験や、循環血液量の40~90%を置換する試験から、HbVが血液と同等の酸素運搬効果を有し、且つ毒性が極めて低いことが明らかになっている。HbVをアルブミンに分散させてHb濃度を8.6-10 g/dLとした場合の粘度は血液と同等であり、剪断速度依存性からNewtonianに近い挙動を示している。しかし、実際の臨床現場ではアルブミン以外に代用血漿剤として、デキストランやヒドロキシエチルスターチが使用されており、海外では更に、高分子量体や修正ゼラチン溶液なども使用されている。また、HbVをこれらの血漿増量剤に分散させて投与することで、虚血領域の酸素化改善効果も得られている(Emi *et al.*, 2003; Plock *et al.*, 2005)。そこで本研究では、各種代用血漿剤にHbVを分散させ、その溶液の粘弾性を検討してみた。今回は、粘弾性挙動を最新の高感度コーン型レオメータ(Anton

Parr, MCR 301)を使用して凝集体生成(Flocculation)について詳細検討を行うと共に、マイクロチャネル流路を用いる解析により、凝集体が毛細管を流動する状態について考察した。

### B. 研究方法

#### 1. 試料の調製

生理塩水に分散しているHbVを超遠心分離(75000 g, 60 min)して生理塩水を除去した後、Table 1に示す各種代用血漿剤中に分散させた([Hb] = 10 g/dL)。組換えアルブミン(rHSA, Bipla, 25wt%)は、生理食塩水で5wt%に希釈して用いた。デキストラン(DEX, 小林製薬, Mw.40kDa, 10wt%溶液)、低分子量ヒドロキシエチルスターチ(HES<sub>70</sub>, 杏林製薬 サリンヘス, Mw.70kDa)、中分子量ヒドロキシエチルスターチ(HES<sub>130</sub>, HES<sub>200</sub>, Fresenius社 Voluben<sup>TM</sup>, Mw. 130kDa, 200 kDa, 6wt%溶液)、高分子量ヒドロキシエチルスターチ(HES<sub>670</sub>, Hospira社製 Hextend<sup>TM</sup>, Mw. 670 kDa, 6 wt%溶液)、修正ゼラチン(Modified gelatin, B.Braun Gelofusin<sup>TM</sup>, Mw. 30 kDa, 4 wt%溶液)を用いた。膠質浸透圧(COP)は、Wescor社製浸透圧計(Model 4420; Cut-off Mw. = 10,000)を用いた。HbVをHES<sub>670</sub>, HES<sub>200</sub>, HES<sub>130</sub>, DEX,およびMFGに分散させた場合、凝集体の生起とその沈降は目視でも明らかで、上澄液は透明であり、Hbの色も観測できなかったため溶血は無いと考えた。

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

Plasma substitute solutions	Mw (kDa)	Concentration (g/dL) in saline	COP (Torr)	Viscosity (cP) at 25 °C.	
				at 10 s <sup>-1</sup>	at 1000 s <sup>-1</sup>
DEX	40	10	22	4.5	4.5
MFG	30	4	52	2.2	2.3
HES <sub>670</sub>	670	6	27	4.5	4.4
HES <sub>200</sub>	200	6	28	2.5	2.5
HES <sub>130</sub>	130	6	35	2.3	2.3
HES <sub>70</sub>	70	6	26	2.0	2.0
rHSA	67	5	19	1.4	1.2

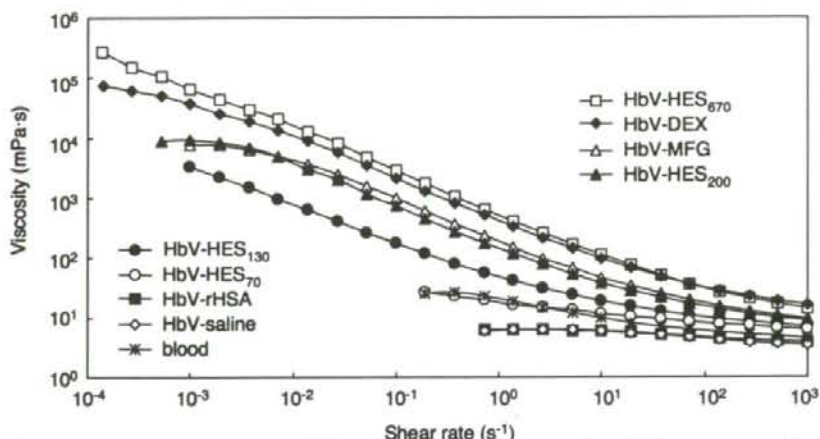
DEX, dextran; HES, hydroxyethyl starch; MFG, modified fluid gelatin; rHSA, recombinant human serum albumin; COP, colloid osmotic pressure.

粘弾性計測の直前に、分散液を孔径0.45 $\mu\text{m}$ のフィルタを透過させた。比較として、採血後6時間以内のヘパリン添加ヒト新鮮血液についても測定した。

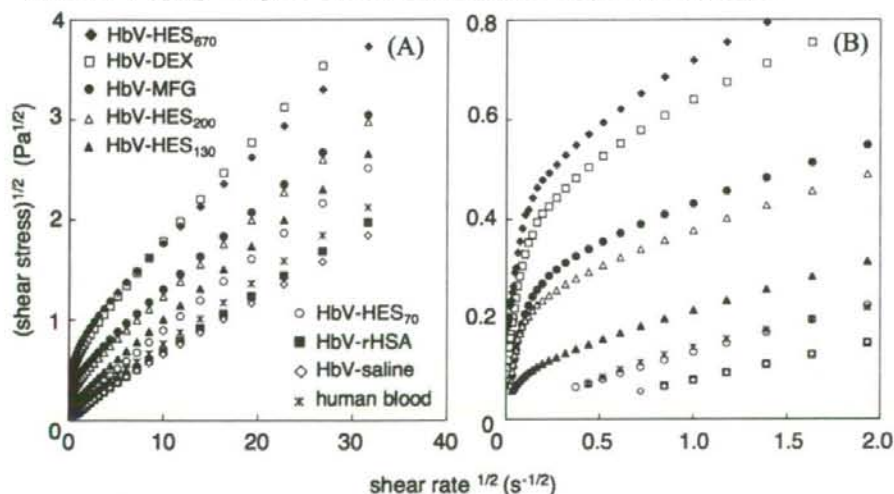
## 2. Hb小胞体分散液の粘弾性計測

各HbV分散液について、粘度と応力の剪断速度依存性の測定、ひずみ分散測定による貯蔵弾性率( $G'$ )と損失弾性率( $G''$ )の測定、Step-shear(剪断速度を急激に変化)に対する粘度応答は、コーンプレート型

レオメータ(Physica MCR 301、Anton Parr社製)を用いた(コーン径: 50mm, コーンとプレート間の角度:  $1^\circ$ )。パラレルプレート(50mm)も、プレートと試料溶液の間の滑りの有無を確認するために用いた。全ての測定は25 $^\circ\text{C}$ で行った。約650 $\mu\text{L}$ の試料溶液をコーンとプレートの間に挟み、過剰量を拭き取った。剪断速度依存性の測定では、剪断速度を $10^3$ から $10^{-4}\text{s}^{-1}$ に低下させた。ヒステリシスの有無を確認するため、剪断速度を逆に上昇させることも実施



**Fig. 1.** Viscosity of HbV suspended in various plasma substitute solutions measured using a MCR 301 rheometer. The shear rate was decreased from  $10^3$  to  $10^{-4}\text{s}^{-1}$ . Fluids with higher viscosity allowed measurement at a lower shear rate because of a sufficiently high strain to detect. Therefore, the low-viscosity HbV-rHSA and HbV-saline were only measurable above  $0.7\text{s}^{-1}$ . [Hb] = 10 g/dL, 25 $^\circ\text{C}$ . The blood data are inserted for comparison.



**Figure 2.** Casson plots of the root of shear stress versus the root of shear rate. These lines indicate that no clear stress yield exist. The graph is magnified in (B). The blood data are inserted for comparison.

した。この場合、前処理として測定開始前に $1\text{s}^{-1}$ で60秒間回転させた後、300秒間放置した。低剪断速度側で特に数値のばらつきがあるので、測定は全て3回行い、その平均値を示した。ひずみ分散測定は、2Hzで0.01–100%のひずみを与えた。

Step-shear測定では、先ず $0.1\text{s}^{-1}$ で120秒間粘度が一定であることを確認した後、 $100\text{s}^{-1}$ に急激に上昇させ220秒間測定した後、再度 $0.1\text{s}^{-1}$ に戻し20秒間粘度を測定した。

キャピラリーレオメータ(DCR, Anton Paar社)を用い、貯蔵弾性率( $G'$ )、損失弾性率( $G''$ )、複素粘度の剪断速度依存性を測定した( $37^\circ\text{C}$ , 周波数 2 Hz, 剪断速度  $5\text{--}330\text{ s}^{-1}$ )。

### 3. マイクロチャネル流路を用いた流動形式の観察

マイクロチャネル流路(Bloody6-7, 日立原町電子工業(株)製, 幅: $7\mu\text{m}$ 、長さ: $30\mu\text{m}$ 、深さ: $4.5\mu\text{m}$ 、合計8735本の流路)をMicrochannel flow analyzer (MC-FAN)に設置した。体内の毛細管における灌流圧に相当する $20\text{ cmH}_2\text{O}$ の圧力差で $100\mu\text{L}$ の試料溶液が通過に要する時間を測定。また、流動中および停止状態の試料の顕微鏡写真を撮影した。

## C. 結果

### 1. 剪断速度依存性

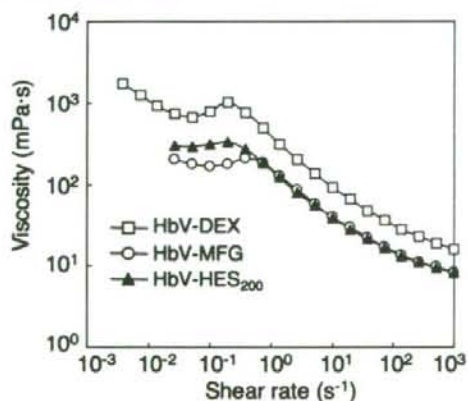


Fig. 3. Shear thickening of HbV-DEX, HbV-HES<sub>200</sub>, and HbV-MFG were observed when the shear rate was increased oppositely from  $10^{-4}$  to  $10^3\text{ s}^{-1}$ . [Hb] =  $10\text{ g/dL}$ ,  $25^\circ\text{C}$ .

Fig. 1に、剪断速度を $10^3\text{s}^{-1}$ から $10^{-4}\text{s}^{-1}$ に低下させたときの粘度変化を示す。rHSAに分散させた場合(HbV-rHSA)はほぼNewtonian流体を示し、粘度の変化は殆ど無かった。これは生理食塩水に分散されたHbV-salineとほぼ同じであった。HbV-rHSAおよびHbV-HES<sub>70</sub>の粘度は、ヒト血液とほぼ同等であった。使用したレオメータの検出感度の限界のため、低粘度試料は $0.5\text{s}^{-1}$ が限界であった。しかし、他の高粘度の試料: HbV-HES<sub>130</sub>, HbV-HES<sub>200</sub>, HbV-HES<sub>670</sub>, HbV-DEX, HbV-MFGではより低剪断速度までの測定が可能であった。これらは、高剪断速度になるほど粘度が低下する所謂“Shear thinning”が観測され、non-Newtonian流体となるが、これはHbVの凝集の生起に起因する。

HESの分子量が大きくなるにつれ、粘度が高くなる傾向が認められ、高分子量であるほどHbVは凝集し易くなることが明確であった。

Fig. 2A, 2Bは、Fig.1の測定の際に同時に得られる剪断応力と剪断速度の関係をCasson Plotとして表したものである。HbV-saline, HbV-rHSA, HbV-HES<sub>70</sub>は、ほぼ直線的な関係、他の高粘度を示す試料では、上側に凸型の曲線となる。Fig.2BはFig.2Aの原点付近を拡大した図であるが、明確な降伏値は確認されなかった。

剪断速度を逆に $10^{-4}$ から $10^3\text{s}^{-1}$ に上昇させた場合、

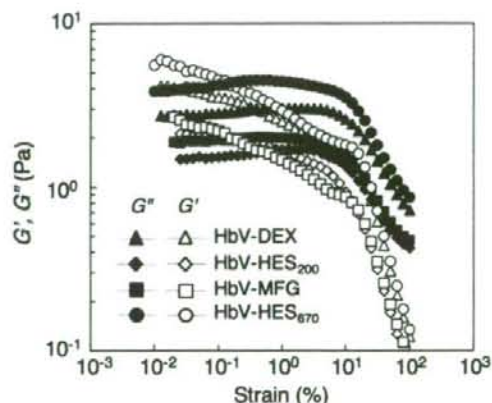


Fig. 4. The strain dependence of the storage modulus ( $G'$ ) and loss modulus ( $G''$ ) of HbV suspended in various plasma substitutes. [Hb] =  $10\text{ g/dL}$ ,  $f = 2\text{ Hz}$ .

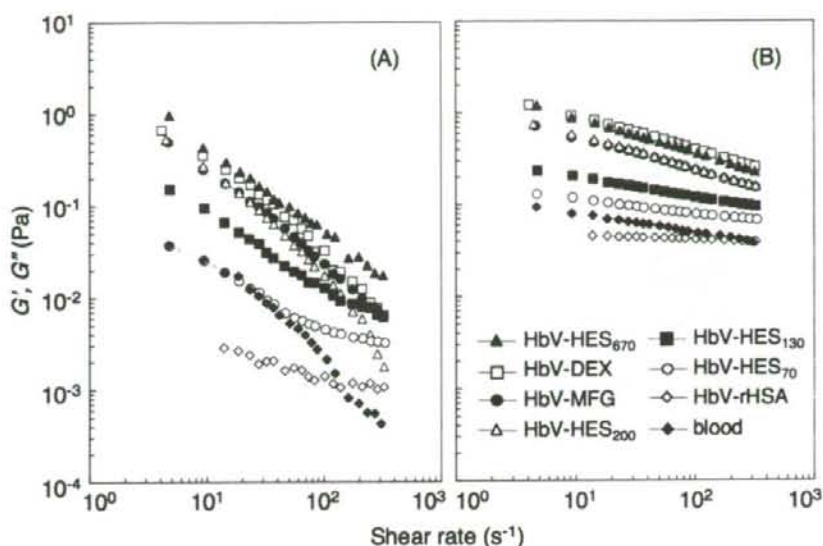


Fig. 5. Respective shear rate dependencies of (A) storage modulus,  $G'$ ; and (B) loss modulus,  $G''$ , of HbV suspended in various plasma substitute solutions, as measured using a DCR rheometer.  $[Hb] = 10 \text{ g/dL}$ ,  $37^\circ\text{C}$ . The blood curves are shown for comparison.

HbV-DEX, HbV-HES<sub>200</sub>, HbV-MFGでヒステリシスが確認された(Fig. 3)。また、 $0.1 - 1 \text{ s}^{-1}$ 付近で曲線に肩が出現し、shear-thickeningを示す領域の存在を観測した。他の低粘度試料: HbV-HES<sub>70</sub>, HbV-HES<sub>130</sub>ではshear-thickeningは観察されず、短調なshear-thinningを示すのみであった。パラレルプレートで液厚を変化させた場合も同様のshear-thickeningが観察されたことから、測定結果は再現性があり、またプレートと試料溶液の間のスリップに起因するものではないことが示唆された。

## 2. 貯蔵弾性率( $G'$ )、損失弾性率( $G''$ )の測定

Fig. 4は、ひずみ分散計測をした場合の貯蔵弾性率( $G'$ )および損失弾性率( $G''$ )を示す。歪みが小さいほど、 $G''$ より $G'$ が大きくなり、弾性項の寄与が大きくなる傾向が、特にHbVの凝集が顕著なHbV-DEX, HbV-DEX, HbV-HES<sub>670</sub>, HbV-HES<sub>200</sub>, およびHES-MFGで確認された。 $G'$ 値は歪みが大きくなるほど低下したが、 $G''$ はほぼ一定値を示した。降伏値(臨界歪み,  $\gamma_c$ )は、何れの試料も歪みが10%程度のところに見られた。HbV-rHSAに関しては、

$G'$ 、 $G''$ ともに測定限界以下の低い値であり、グラフには記さなかった。

Fig. 5に、キャピラリー粘度計により得られた $G'$ 、 $G''$ の剪断速度依存性を示す。低剪断速度では、HbVの凝集形成が顕著なHbV-DEX, HbV-HES<sub>670</sub>, HbV-HES<sub>200</sub>およびHbV-MFGにおいて $G'$ が $G''$ よりも高い値を示した。 $G'$ の寄与は剪断速度が高くなるに従って急激に低下した。Fig. 6A, 6Bは、一例としてHbV-DEXについて、分散媒のDEX濃度一定の状態ではHbVの濃度を変化させたときの $G'$ 、 $G''$ 、複素粘度を示す。HbVの濃度低下に従って、これらの値は顕著に低下した。他の試料でも同様の傾向が観測された。

$G'$ と粒子占有体積( $\phi$ )の相関から、凝集体の性質についての情報が得られるので、Fig. 7に剪断速度 $18\text{s}^{-1}$ のときの $G'$ と占有体積の関係をグラフとして記した。HbV-DEX, HbV-HES<sub>200</sub>およびHbV-MFGについて、 $G'$ は $\phi$ の2.1~2.4乗に比例する関係が得られた。

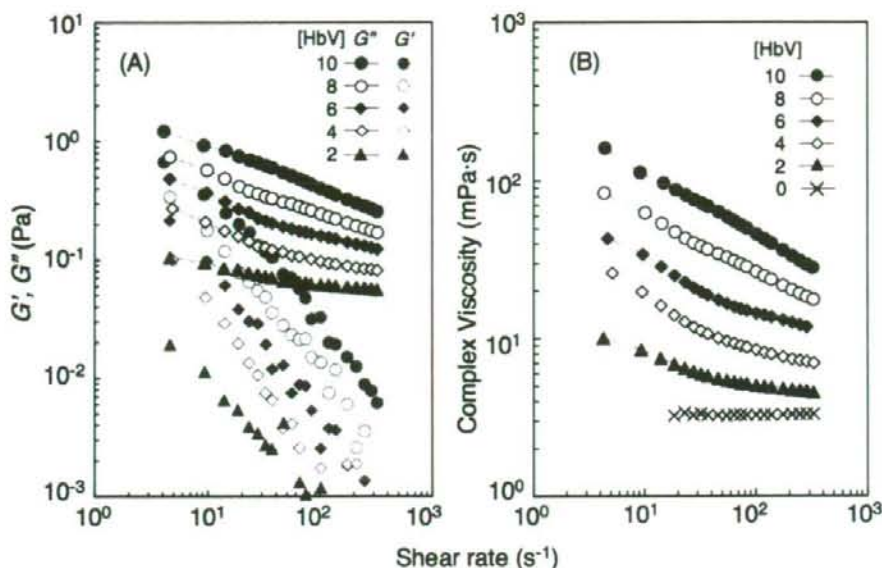


Fig. 6. Representative profile of the concentration dependence on  $G'$  and  $G''$  (A), and on complex viscosity (B) when the concentration of HbV in the HbV-DEX was reduced from  $[Hb] = 10$  to  $0$  g/dL, at the constant DEX concentration ( $10$  g/dL).

### 3. Step-shear測定

Fig. 8Aに、剪断速度を急速に変化させたときの粘度応答を示す。低剪断速度( $0.1s^{-1}$ )のとき、HbV-DEX, HbV-HES<sub>670</sub>, HbV-HES<sub>200</sub>, および

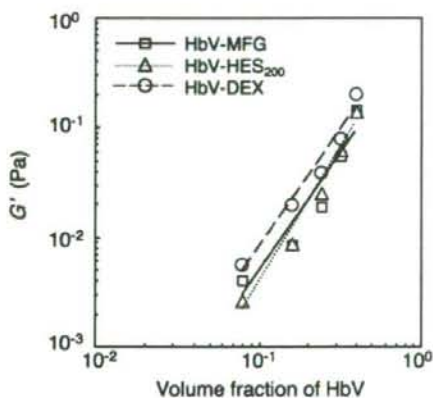


Fig. 7. Logarithmic graphs of  $G'$  at  $18 s^{-1}$  vs.  $f$  (volume fraction of HbV) for HbV-DEX, HbV-HES<sub>200</sub>, and HbV-MFG. For all cases,  $G'$  varies with  $f$  following a power law of order 2.1–2.4. HbV-DEX,  $G' \sim f^{2.13}$  ( $R^2 = 0.9722$ ); HbV-HES,  $G' \sim f^{2.45}$  ( $R^2 = 0.9753$ ); HbV-MFG,  $G' \sim f^{2.14}$  ( $R^2 = 0.9139$ ).

HbV-MFGは凝集体形成による高粘度を示した。剪断速度を急激に $100s^{-1}$ (細動脈の剪断速度に相当)に上昇させると、粘度は急激に低下した。剪断速度を再度 $0.1s^{-1}$ に戻すと、粘度もほぼ元の値に復した。Fig. 8Bは、Fig.8Aを横軸方向に拡大したものである。剪断速度を上げたときの粘度低下は凝集体の解離に基づく変化であり、これが僅か $0.2s$ 以内に完了している。また、逆に剪断速度を上げたときの粘度上昇は、凝集体の形成に基づく変化であり、約2秒以内に完了している。この応答性は、コーンプレートの回転で剪断速度がどの程度鋭敏に変化するかに大きく依存すると考えられるが、HbV凝集体の形成と解離は可逆的、且つ極めて速い反応であることが明らかである。

### 5. マイクロチャネル流路の流動特性

MC-FANによりマイクロチャネル流路を $100\mu L$ の試料溶液の通過時間を測定し、 $1000 s^{-1}$ における粘度(Fig.1)に対するプロット図を作製した(Fig.9)。最も粘度の高いHbV-DEXは、 $200s$ を要した。粘度



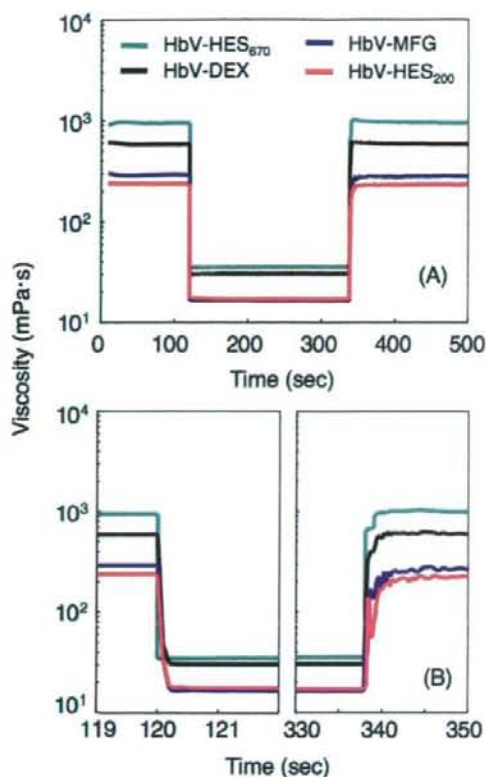


Fig. 8. (A) Responses of the viscosities of the HbV suspended in DEX, HES<sub>200</sub>, HES<sub>670</sub> and MFG to the rapid change of shear rates, as performed by the MCR 301 rheometer. The shear rate was changed rapidly from 0.1 to 100 s<sup>-1</sup>; it was then returned to 0.1 s<sup>-1</sup>. The graph is magnified in (B). [Hb] = 10 g/dL, 25°C.

と通過時間は直線関係であった( $R^2 = 0.9793$ )。

高粘度を示すHbV-DEX, HbV-HES<sub>670</sub>, HbV-MFG, およびHbV-HES<sub>200</sub>でも、マイクロチャネル流路の流動状態を観察すると、塞栓などは全く確認されなかった(Fig. 10)。他方、ヒト血液は粘度(4.5 cP)も通過時間(48s)も十分に小さいが、流路の一部は塞栓が存在していた。流動を停止させたところ、HbV-DEX, HbV-MFG, HbV-HES<sub>200</sub>, およびHbV-HES<sub>670</sub>では、流動の痕跡がみられ、凝集体が相分離している様子が観察された。

#### D. 考察

リン脂質小胞体(liposome)が水溶性高分子と相互

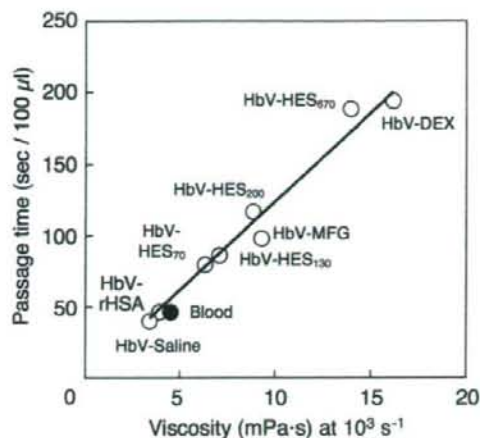


Fig. 9. Microchannel flow measurements of HbV suspended in various plasma substitute solutions, and human blood. The time required for the passage of 100  $\mu$ L of each suspension was plotted against the viscosity at 1000 s<sup>-1</sup> (from Fig. 1). The straight line indicates a linear approximation:  $Y = 12.4X$  ( $R^2 = 0.9727$ ).

作用して凝集体(flocculation, aggregation)を形成する事については多くの報告があるが、その殆どが希薄溶液の濁度または光散乱の計測で観察しているに過ぎない。HbVは従来に無い極めて高濃度の分散系で(溶質: 16g/dL, 占有体積: 40vol%)、HbVの凝集体は溶液全体に三次元的ネットワークを形成し、これが固体的性質を与え、貯蔵弾性率( $G'$ )増大として観察されると考えられる。本実験で使用した粘弾性計測装置(Physica MCR Model 301)は、微小な応力も感知でき、非常に幅広い剪断速度領域( $10^{-4}$ - $10^3$  s<sup>-1</sup>)の測定が可能であった。赤血球も可逆的凝集体を形成し、40-55vol%もの体積を占有するので、非ニュートン性流体としての因子であり、また血液に水溶性高分子が混合されると赤血球が凝集し、血液粘度、血行動態、組織酸素化に影響を及ぼす事が知られている。従って、HbV分散液についても同様の粘弾性特性の観測は重要となる。

HbV-rHSAは、ほぼニュートン流体の挙動を示した。高剪断速度における粘度は、血液とほぼ同等であった。対照的に、HES, DEX, MFGに分散させた場合は、HbVの凝集体形成のため、低剪断速度で

高い粘度を示し高剪断速度になるに従い粘度が低下するshear-thinningを示した。またHES(Mw. 70, 130, 200, 670 kDa)について、凝集体形成には分子量依存性が存在し、高分子量になるほど高粘度を示した。分子量が最も小さいHES<sub>70</sub>に分散させた場合には血液の粘度と同等であった。Fig. 1をCasson Plot (Fig. 2)として見ると、降伏値は確認されなかった。これはレオメータの感度が高いため低剪断速度まで測定が可能であったことも要因の一つとして考えられる。他に、極めて弱い相互作用により生起しているHbV凝集体の形成と解離が連続的に発生するため、明確な臨界点が存在しないとも考えられる。

Liposome凝集の機序は、幾つかの理論が提唱されている。(i) 水溶性高分子鎖が粒子表面に吸着することにより粒子間を架橋する、(ii)水溶性高分子がliposomeから水和水を奪い、liposomeが溶液から排除される、また、(iii)水和したliposomeから高分子が排除されるため、liposome粒子間に形成される空間からも高分子コイルが排除され、これによりバルク溶液とliposome粒子間の溶液との間に浸透圧差が生じ、この浸透圧差を小さくするために凝集が促進されて粒子間距離が短くなる。この場合、粒子間に形成される空間の大きさと高分子コイルの大きさの相対的寸法差が重要と成る。HES, DEX, MFGの構造には分岐があるので、球状蛋白質のrHSAに比較して更に拡大された構造をしていると考えられる。文献によれば、これら高分子の慣性半径( $R_g$ )は、HES<sub>130</sub>(約12.3 nm)、DEX (8.1 nm)、MFG (10.7nm)、HSA(約2.8 nm)である。より広がった構造を有する高分子ほどliposome表面から排除され、liposome凝集が促進されると考えられる。また、(i)の機序でも、より長い構造の高分子が粒子間を架橋し易いと考えられる。凝集の機序については今後更に検討をする必要がある。

剪断速度を $10^{-4}$ から $10^3 \text{ s}^{-1}$ に上昇させた場合、興味深い事に、高粘度分散系(HbV-DEX, HbV-HES<sub>670</sub>, HbV-HES<sub>200</sub>, HbV-MFG)では粘度にヒステリシスと

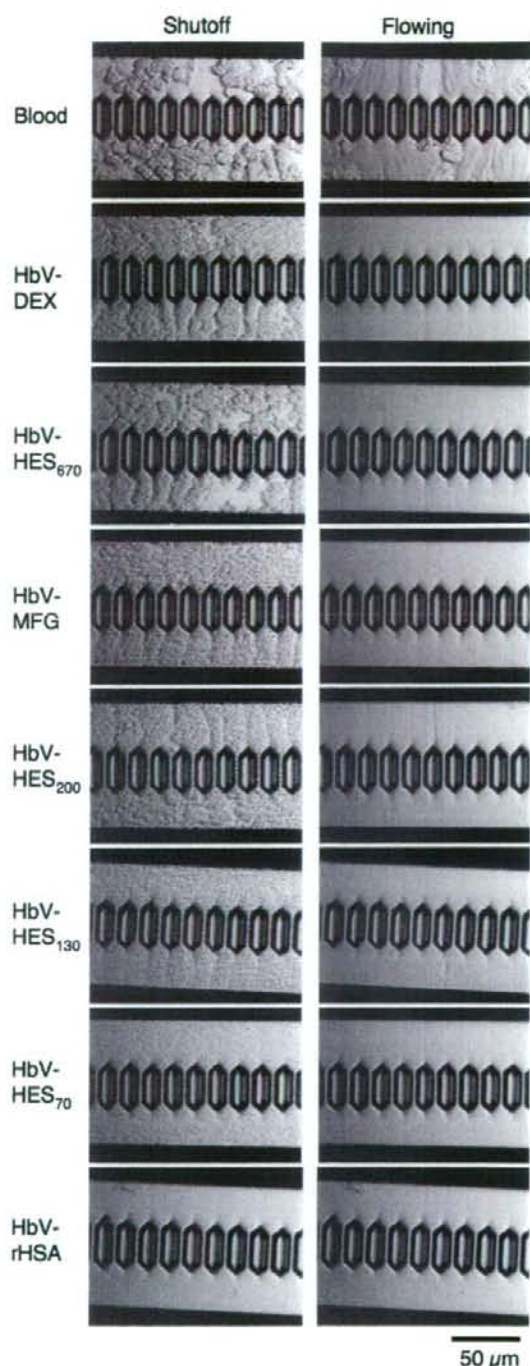


Fig.10. Images of microchannels during the flowing condition and at the cessation of flow. The flocculate formation is apparent at the cessation for HbV-DEX, HbV-HES, and HbV-MFG. However, no flocculation was apparent for HbV-rHSA. In the flowing condition, no plugging of channels occurred for any HbV suspensions. Blood showed partial plugging.

shear-thickeningが観察された。これらの分散系は凝集体形成の時間変化を反映した粘性変化があることを示唆する。shear-thickeningは合成高分子分散系でも報告されている。高剪断速度になるに従いHbV粒子間の距離が大きくなり、エントロピー損失を生じ、局所的な粘度上昇が確認されたと推論される。また他の可能性として、コーンプレート間の試料溶液は極めて薄いが、この中でもHbVの凝集体が沈降し、コーン側にHbV濃度の希薄な領域が形成され、これが低剪断速度のときに低粘性として観察され、コーンがある程度の回転数になると溶液が攪拌されて均一になる過程でshear-thickeningが観察されたのかもしれない。

HbV分散液が弾性を示す事は、貯蔵弾性率( $G'$ )が高い値を示す事から明らかである。粘度が高い分散系(HbV-DEX, HbV-HES<sub>200</sub>, HbV-MFG)ほど高い $G'$ を示した。歪み分散試験において、歪みが大きくなるに従い、 $G'$ が顕著に低下した。しかし $G''$ の低下は歪みが小さい領域では僅かであるが、歪みが10%以上になって漸く顕著な低下を示した。従って、HbVの凝集体の構造は強固なものではなく、変形が極めて容易であると考えられる。HbVの凝集体は、凝集体が互いに結合した三次元的フラクタル構造をしているものと考えられる。 $G'$ と $\phi$ (体積分率)の両対数グラフではほぼ直線関係が得られた。Bascallらの理論によれば、微粒子の拡散抑制による凝集体形成では $G' \sim \phi^{3.5 \pm 0.2}$ の関係が得られ、化学結合が関与する凝集体形成ではより直線の傾きの大きい $G' \sim \phi^{4.5 \pm 0.2}$ の関係となる。HbV分散系では、 $G'$ は $\phi$ の2.1-2.4乗に比例し、上述の理論値に比較して低めの値となった。従って、HbVの凝集体は極めて弱い相互作用により形成されていることが考えられる。

HbVの表面にはPEG鎖が修飾されており、HSA溶液中における分散安定度に寄与していることを既に報告して来た。現行のPEG修飾の条件は、血漿中での分散安定度を維持するには十分と思われる。しかし、本研究で代用血漿剤によってはPEG修飾し

てあってもHbVの凝集体形成が促進されてしまうことが明らかになった。しかしマイクロチャンネル流路で観察した限りでは一切の塞栓形成が無かった。20cm水柱(静脈内圧に相当)における流量と粘度の関係は直線関係が得られ、単純にPoiseuilleの法則に従っていると考えられた。他方、血液の通過性は赤血球の変形能、血小板や白血球の活性化など、病態によって変化することが知られている。

代用血漿剤を静脈内投与した場合、血液と代用血漿剤の両方が希釈される。従って、ここにHbVが投与された場合、凝集体形成は低減されると考えられる。事実、Erniら(Inselspital Hospital, Univ. of Bern)はHbVをDEXあるいはHES<sub>200</sub>に分散させ、ハムスターの循環血液量の40%を交換し、毛細血管の塞栓が無いことを確認し、寧ろ有茎皮弁の虚血領域の微小循環を改善する効果があることを見出した。最近、幾つかのグループが、高粘性流体が血管壁により高い剪断応力を生じるため血管拡張分子を誘導させ結果的に末梢血流が改善されると主張している。また、高粘性流体では末梢毛細管により均一に圧力が伝播し、血液をより均一に輸送し、有効毛細管密度(Functional Capillary Density)の向上が期待できる。この点、HbVは特徴的なレオロジー挙動を示し、またその調節も可能なので、輸血代替以外の臨床応用にも利用できる可能性がある。しかし、HbVと一連の代用血漿剤を併用したときの安全性について詳細を確認する必要はある。

## E. 結論

数ある代用血漿剤のうち、rHSA溶液とHES<sub>70</sub>では、HbVと混合しても顕著な粘度増大は見られなかったが、DEXおよび欧州や米国で使用されている高分子量HES、或は修正ゼラチン溶液では凝集生起を認め、粘度上昇が顕著であった。しかし凝集の形成と解離は極めて迅速で可逆的であり、事実マイクロチャンネル流路には一切の塞栓が無かった。凝集体生起の生体への影響を確認する必要があるが、HbV分散液は分散媒との組み合わせでレオロジー

特性を調節する事ができるので、輸血代替以外の用途に拡大する可能性もある。

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

## 20. Hb小胞体/代用血漿剤分散系とその血液混合系の粘弾性計測

### A. 研究目的

ヘモグロビン小胞体(HbV)は、高純度・高濃度Hbをリン脂質小胞体(粒子径280 nm)に内包した人工酸素運搬体である。これまでの動物投与試験から、HbVが血液と同等の酸素運搬能と十分な安全性を有することが明らかになっている。輸血代替としての投与量は非常に多く、循環血液量の40%以上になることも想定される。赤血球と同等の酸素運搬機能を持たせるため、HbV分散液の固形分濃度は他の所謂リポソーム製剤と比較して非常に高い(Hb濃度10 g/dL; 脂質濃度5~6 g/dL)。従ってHbVの安全性を評価する上で、ヘモレオロジーに対比させてHbV分散液のレオロジー特性を検討することは重要である。

血漿中に5 g/dL程存在するアルブミンは血液と間質液の膠質浸透圧(COP)を平衡に保ち、循環血液量を維持する機能を有する血漿蛋白質である。この機能を維持する為に、COPは血液代替物が備えるべき必須条件の一つである。HbVは1粒子あたり約3万個のHbを内包しており、分散液のCOPは殆どゼロである。従って、HbVの大量投与に際しては代用血漿剤の併用が循環血液量の維持に重要となる。従来、HbVを5%アルブミン(HSA)溶液或いはリ

コンビナントアルブミン(rHSA)溶液に分散させCOPを20 Torrに調節し、この分散液を用いた出血ショック蘇生試験や、循環血液量の40~90%を置換する試験から、rHSAに分散させたHbVが血液と同等の酸素運搬効果を有することを明らかにしてきた。HbVをrHSAに分散させてHb濃度を8.6~10 g/dLとした場合の粘度は血液と同等であり、剪断速度依存性からニュートン流体に近い挙動を示している。しかし、実際の臨床現場ではHSA以外に代用血漿剤として、デキストラン(DEX)やヒドロキシエチルスターチ(HES)が使用されており、海外ではそれ以外に、HESの高分子量体や修正ゼラチン溶液(MFG)なども使用されている。また、HbVをこれらの代用血漿剤に分散させて投与することで、虚血領域の酸素化の改善効果も報告されている。このような背景のもと、我々は各種代用血漿剤に分散させたHbVのレオロジー特性の詳細な解析を進めている。rHSAと低分子量HESではHbVと混合しても顕著な粘度増大は見られないが、DEXおよび欧州や米国で使用されている高分子量HESやMFGではHbVの凝集生起を認め、粘度上昇が顕著となる。しかし凝集の形成と解離は極めて可逆的で迅速であり、血液流動性測定装置(Microchannel array flow analyzer, MC-FAN)のマイクロチャンネルには一切の塞栓が無いことを確認している。

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

### B. 実験方法

#### 1. HbV分散液の調製