

HbV分散液は無菌条件下、既報に従って調製した。Hb溶液は日本赤十字社（東京）から提供を受けた期限切れ非使用赤血球から精製した。HbVの内水相には高濃度のHb（38 g/dL）と共に、アロステリック因子としてピリドキサル5'-リン酸（PLP、14.7 mM）がモル比でPLP/Hb = 2.5になるように添加した。HbVの膜成分である脂質は、日本精化社製の Presome PPG-I（1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン）、コレステロール、1,5-bis-O-ヘキサデシル-N-スクシニル-L-グルタマート = 5/5/1（モル比）に0.3 mol%の1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン-N-ポリ（エチレングリコール）（日本油脂社製）を混合して用いた。HbVは生理食塩水に分散、フィルター滅菌し（Dismic、東洋濾紙社製：0.45 μ m）、窒素通気により酸素を除去して保存した。HbVの粒子径は279 \pm 95 nmであった。

2. 各種代用血漿剤

遺伝子組み換えヒト血清アルブミン（rHSA, Bipla, Mw. 67 kDa, 25 wt%溶液）は生理食塩水で5 wt%に希釈して用いた。デキストラン（DEX, 小林製薬工業 デキストラン40注「小林」TM, Mw. 40 kDa, 10 wt%溶液）、低分子量ヒドロキシエチルスターチ（HES₇₀, 杏林製薬 サリンヘスTM, Mw. 70 kDa, 6 wt%溶液）、中分子量ヒドロキシエチルスターチ（HES₁₃₀, HES₂₀₀, Fresenius社 VoluvenTM, Mw. 130 kDa, 200 kDa, 6 wt%溶液）、高分子量ヒドロキシエチルスターチ（HES₆₇₀, Hospira社 HextendTM, Mw. 670 kDa, 6 wt%溶液）、修正ゼラチン（MFG, B. Braun社 GelofusineTM, Mw. 30 kDa, 4 wt%溶液）を用いた。各種代用血漿剤の膠質浸透圧（COP）は浸透圧計（model 4420, Wescor社製、Cut-off Mw. = 10,000）を用いて測定した。

3. 各種代用血漿剤に分散させたHbV及び血液試料の調製

生理食塩水に分散させたHbVを超速心分離（20 000

g, 30 min）で沈降させて上澄みの生理食塩水を除去後、代用血漿剤中に分散させ（[Hb] = 10 g/dL）、フィルター処理した（Dismic、東洋濾紙社製：0.45 μ m）。血液試料は5%ヘパリン加ヒト新鮮血を用い、採血後6時間以内に測定を行った。

4. 各種代用血漿剤に分散させたHbVとその血液混合系のレオロジー測定

粘度の剪断速度依存性はモジュラーコンパクトレオメータ（Physica MCR301：Anton Paar社製）を用いて測定した。測定治具はコーンプレート（コーン径：50 mm、ギャップ角度：1°）を用い、25 °Cで剪断速度を 10^3 から 10^4 s^{-1} に低下させた。貯蔵弾性率 G' の剪断速度依存性はキャピラリーレオメータ（DCR：Anton Paar社製）を用いて測定した（剪断速度 5 ~ 320 s^{-1} 、周波数2 Hz、37 °C）。

5. 各種代用血漿剤に分散させたHbVとその血液混合系のマイクロチャンネル流動性試験

各種代用血漿剤に分散させたHbV（[Hb] = 10 g/dL）とヘパリン加ヒト新鮮血の混合液を測定試料とした。マイクロチャンネルアレイBloody6-7（幅7 μ m、長さ30 μ m、深さ4.5 μ m、流路数8,736本：日立原町電子工業社製）にMC-FAN（KH-3：日立原町電子工業社製）を用いて20 cm水柱差で流し、試料100 μ Lの通過時間を測定した。通過時間は試料測定の前直前に測定された生理食塩水100 μ Lの通過時間を用いて（通過時間） \times 12秒/（生理食塩水通過時間）により生理食塩水通過時間が12秒の場合に換算した。また、流動中と停止後の試料の顕微鏡写真を撮影した。

C. 実験結果

1. 各種代用血漿剤に分散させたHbVとその血液混合系のレオロジー特性

Fig. 1Aに、各種代用血漿剤に分散させたHbVについて、剪断速度を 10^3 s^{-1} から 10^4 s^{-1} に低下させたときの粘度変化を示した。rHSAに分散させた場合

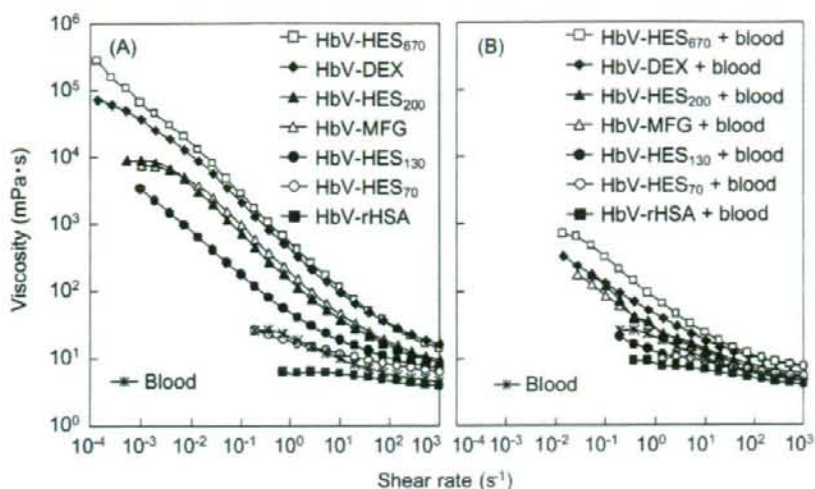


Fig. 1. Shear rate dependence of the viscosity of (A) the HbV suspended in various plasma-substitute solutions, and (B) the mixtures of blood and HbV suspended in various plasma-substitute solutions at a volume ratio of 1/1. The shear rate decreased from 10^3 to 10^{-4} s^{-1} . [Hb] = 10 g/dL, 25°C. The blood data are inserted for comparison.

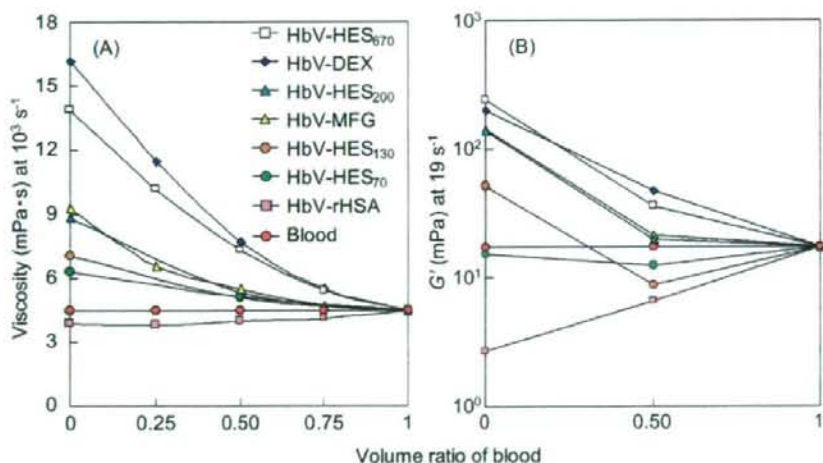


Fig. 2. Viscoelasticity of the mixtures of blood and HbV suspended in various plasma-substitute solutions at a volume ratio of 0/1, 1/3, 1/1, 3/1, and 1/0. (A) The viscosity at a shear rate of 10^3 s^{-1} measured with an MCR 301 rheometer at 25°C. (B) The storage modulus (G') at a shear rate of 1.9 s^{-1} measured with a capillary rheometer at 37°C.

(HbV-rHSA) は、粘度の変化は殆ど無く、ほぼニュートン流体を示した。HbV-rHSA および HbV-HES₇₀ の粘度は、ヒト血液とほぼ同じであった。使用したレオメータの検出感度では、低粘度試料は 0.5 s^{-1} が限界であった。一方、HbV-HES₁₃₀、HbV-HES₂₀₀、HbV-HES₆₇₀、HbV-DEX、HbV-MFG はヒト血液よりも高い粘度を示し、高剪断速度に

なるほど粘度が低下する Shear-thinning 流動が観測された。この非ニュートン流体の性質は HbV の凝集体の生起に起因する。これらはより低剪断速度までの測定が可能であった。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に示された。

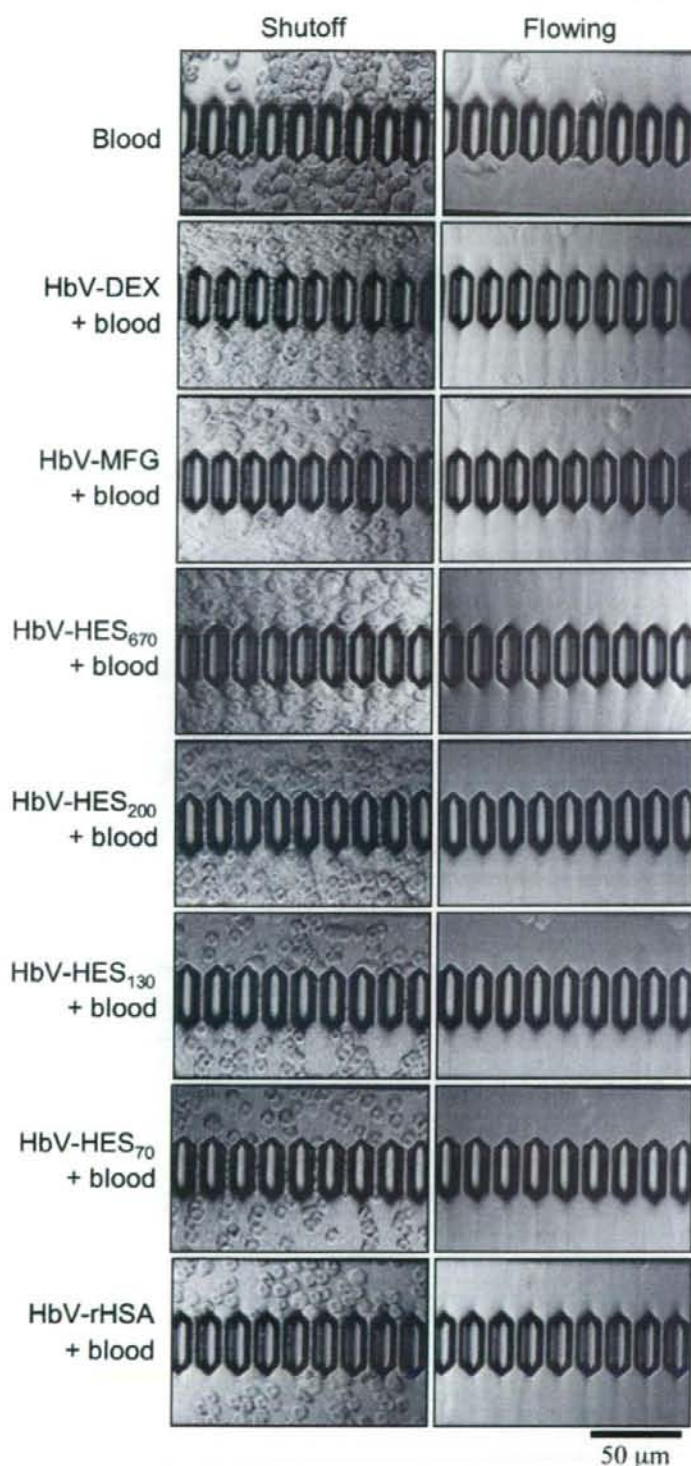


Fig. 3. Images of microchannels during the flowing condition and the cessation of flow. The flocculate formation is apparent in the plasma phase at the cessation for HbV-DEX + blood, HbV-HES + blood, and HbV-MFG + blood. However, no flocculation was apparent for HbV-rHSA + blood. In the flowing condition, partial plugging of channels occurred due to platelets or white blood cells in blood samples (top).

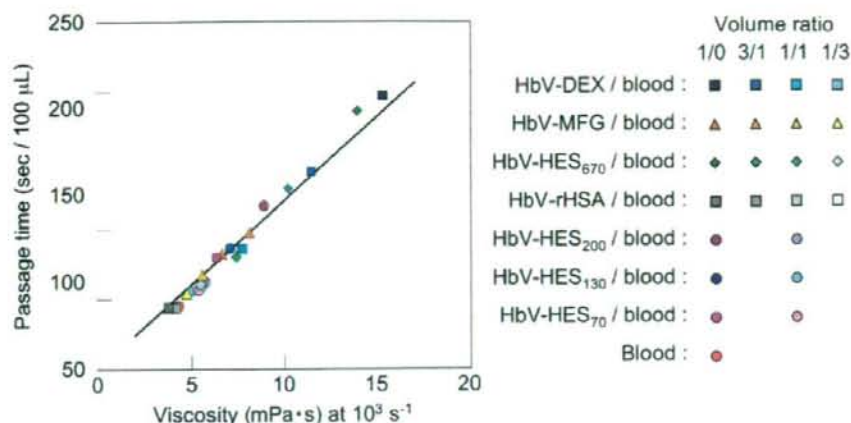


Fig. 4. Microchannel flow measurements of the mixtures of blood and HbV suspended in various plasma-substitute solutions at a volume ratio of 1/0, 3/1, 1/1, 1/3, and 0/1. The time required for the passage of 100 μL of each suspension was plotted against the viscosity at 10^3 s^{-1} . The straight line indicates a linear approximation: $Y = 12.1X$ ($R^2 = 0.9728$).

Fig. 1Bに、各種代用血漿剤に分散させたHbVと血液を体積比1:1で混合した溶液について、**Fig. 1A**と同様に測定した結果を示した(剪断速度 $10^3 - 10^4 \text{ s}^{-1}$ 、 25°C)。HbV-rHSAの血液混合液は血液よりも低い粘度を示した。HbV-HES₇₀、HbV-HES₁₃₀の血液混合液は血液とほぼ同じ粘度を示した。一方、HbV-DEX、HbV-HES₆₇₀、HbV-HES₂₀₀、HbV-MFGの血液混合液は、混合前と比較して全域で粘度の減少を示したが、血液よりも高い粘度であった。**Fig. 2**には血液とHbV分散液の混合比を変化させたときの(A) 粘度、(B) 貯蔵弾性率 G' の変化を示す。HbV-rHSAを除くHbV分散液に関して、血液混合比の増大に伴い粘度と G' が減少する傾向が観測された。一方、HbV-rHSAの粘度と G' は血液よりも小さいため、血液混合比の増大に伴ってこれらが増大し、血液の値に収束していく傾向が観測された。

2. 各種代用血漿剤に分散させたHbVとその血液混合系のマイクロチャネル流動性試験

各種代用血漿剤に分散させたHbVとその血液混合系の流動性試験を、体積混合比を変化させて行った。全血の通過時間(46秒)は他の文献の報告値とほぼ一致した。HbV-DEXの通過時間は196秒

であったが、血液混合比の増大に伴い通過時間は短縮し、HbV-DEXと血液の混合比1:3においては59秒であった。**Fig. 3**には、各種代用血漿剤に分散させたHbVと血液を体積比1:1で混合した分散液の静止状態と流動状態の顕微鏡観察写真を示した。HbVの粒子径は $279 \pm 95 \text{ nm}$ と小さい為、均一分散系においてはその存在を光学顕微鏡で確認できないが、静止状態で形成される凝集体はみかけのサイズが大きい為に血漿相中に確認できた。血液と同等の粘度を示したHbV-rHSA、HbV-HES₇₀はHbVの凝集体が殆ど観測されなかった。一方、高粘度を示したHbV-HES₆₇₀、HbV-DEX、HbV-MFGはHbVの凝集体が観測された。しかし、流動中の凝集体は解離して流路を殆ど閉塞せずに流動した。剪断速度 1000 s^{-1} における試料の粘度とマイクロチャネルの通過時間の相関を検討したところ(**Fig. 4**)、HbV分散液の粘度と通過時間(流量の逆数)に比例関係が成立した。直線の式を最小二乗法で求めると $Y = 12.1X$ (Y : 通過時間(sec/100 μL)、 X : 粘度($\text{mPa} \cdot \text{s}$)、 $R^2 = 0.9728$)であり、Poiseuilleの法則に従った。

D. 考察

リン脂質小胞体(リポソーム)が水溶性高分子

と相互作用して凝集体を形成する現象については多くの報告例があるが、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、表面に修飾されたポリエチレングリコール(PEG)鎖の立体反発効果によって、血漿中においても均一な分散系を形成する。しかし、HbVは極めて高濃度の分散系であるため(固形分濃度: 16 g/dL, 占有体積: 40 vol%)、これが凝集した場合は、凝集体が溶液全体に三次元ネットワークを形成し、これが固体的性質を与え、粘度及び貯蔵弾性率 G' の増大として観察されると考えられる。赤血球も可逆的な凝集体を形成し、40~45 vol%の体積を占有するので、これが血液を非ニュートン流体とする主要な因子であり、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ことが知られている。従って、HbV分散液についても同様のレオロジー特性の解析を行った。

HbV-rHSA分散液はほぼニュートン流体の特性を示し、高剪断速度における粘度は血液とほぼ同等であった(Fig. 1A)。HbVの表面に修飾されたPEG鎖がアルブミン中の分散安定度に寄与していると考えられる³⁾。対照的にHES、DEX、MFGに分散させたHbVは、低剪断速度で高い粘度を示し剪断速度が高くなるに従い粘度が低下するShear-thinningを示した(Fig. 1A)。これは凝集分散系に特徴的な粘度挙動である。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HES₇₀に分散させた場合には血液と同等であった。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修飾が施されてもHbVの凝集体が形成してしまうことが明らかとなった。

リボソーム凝集の機序については、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

溶性高分子がリボソーム表面から水和水を奪い、リボソームが溶液から排除される、また、(iii) リボソームの水和領域から高分子が排除されるため、リボソーム粒子間に形成される空間からも高分子が排除されることになり、バルク溶液とリボソーム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と言われている。特に(iii)の場合、粒子間に形成される空間の大きさと高分子の大きさの相対的寸法差が重要と成る。HES、DEX、MFGには分岐構造があるので、球状蛋白質のrHSAに比較してより低密度で排除体積の大きい構造をしていると考えられる。DEXは水中でコイル状の分子構造をとることが報告されている。MFGは、修飾されたコハク酸の静電反発によって拡大した分子構造をとる。この様な高分子はリボソーム表面から排除され易く、リボソーム凝集が促進されると考えられる。また、(i)の機序でも、直鎖状構造の高分子が粒子間を架橋し易いと考えられる。一方、HESの分子構造は分岐状であり、その形は球状に近いので、排除体積はDEX、MFGと比較して小さいと考えられる。しかし、高分子量体になるに従い、排除体積も大きくなるので、リボソーム凝集が促進される。我々は各種代用血漿剤に含まれる水溶性高分子の慣性半径の違いから凝集度を説明できると考えており、現在その解析を進めている。また、水溶性高分子による凝集を抑制する為に、現行よりも鎖長の長いPEG鎖をHbV表面に修飾し、粒子間の立体反発力を高めることも可能と考えられる。事実、我々はリボソームの表面に修飾するPEG鎖の分子量を大きくさせると、リボソームの分散安定性が增加することを報告している。

実際にHbVの投与を行う場合には、①代用血漿剤を投与した後に生理食塩水に分散されたHbVを投与、或いは②濃厚な代用血漿剤(例: 25%アルブミン溶液)があればこれをHbV分散液に添加して同時に投与([Hb] = 8.6 g/dL) するなどが想定される。血液交換率は50%程度と想定され、HbV、代用血漿

剤ともに更に希釈されるので凝集は低減されると考えられる。事実、DEX、HES₆₇₀、MFGに分散させたHbVは血液よりも高い粘度を示したが、血液と体積比1:1で混合すると全ての剪断速度で粘度が減少した (Fig. 1B)。更に血液の混合比の増大に伴い、粘度およびG'が減少する傾向が観測された (Fig. 2)。HbVと代用血漿剤の双方が血液で希釈され、凝集の低減が起きることが明らかとなった。

次に、各種代用血漿剤に分散させたHbVと血液の混合系がマイクロチャネルを流動する挙動をMC-FANを用いて検討した。血液のマイクロチャネルの通過時間は、赤血球の変形能、白血球による流路の塞栓および血栓による塞栓などが影響すると考えられる。このうち、赤血球の変形能はレオメータでの粘度測定にも影響を及ぼすが、流路の塞栓はマイクロチャネルを持つMC-FANでしか測定できない項目である。我々は各種代用血漿剤に分散させたHbVがマイクロチャネルを一切塞栓することなく流動し、100 μ Lの通過時間と粘度に比例関係が得られ、これがPoiseuillesの法則に従っていることを報告してきた。この関係が成り立つのは流路の塞栓が無い場合に限られる。仮に流路の塞栓が顕著であれば、通過時間は大きく延長して、粘度との比例関係は成立しない筈である。結果より、各種代用血漿剤に分散させたHbVと血液の混合液の通過時間は、全例が粘度に比例した (Fig. 4)。よって各種代用血漿剤に分散させたHbVは血液の流路塞栓因子に影響を及ぼさないと考えられる。事実、我々はラットを用いた60%血液交換試験において、各種代用血漿剤を投与後、HbVによる蘇生を行ったが、凝集体による影響は全く見られず、全例が生じた。この理由として、代用血漿剤、血液、HbVが互いに希釈され、凝集が低減したこと、凝集体が血液の剪断速度に応じて可逆的に形成・解離したこと、そして血液中の塞栓因子に影響が無かったことなどが考えられる。

最近、幾つかの研究グループが、高粘性流体が血管壁に対し、より高い剪断応力を与えるため血管

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。EmiらはHbVをHES₂₀₀あるいはDEX (Mw. 70 kDa)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、むし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。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。この点に関しては、HbVは代用血漿剤の併用によって特徴的なレオロジー特性を示し、またその調節も可能であるので、輸血代替以外の臨床応用にも利用できる可能性がある。今後は、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とともに、凝集の機序を明らかにして行く計画である。

D. 結論

HbVを各種代用血漿剤に分散させた溶液と血液の混合系に関して、レオロジー特性および凝集の可逆性について検討した。HES₇₀、₁₃₀、rHSAに分散させたHbVと血液の混合液の粘度は血液と同等もしくはそれ以下であった。DEX、高分子量HES、MFGではHbVは凝集するが、血液中においても外力に依存して瞬時に解離すると共に、血液混合比の増大に伴い凝集の形成は低減することが確認された。HbV分散液と血液の混合系のマイクロチャネルの通過時間は単純に粘度に比例し、流路の塞栓は殆ど無かったことからHbV凝集体は血液の流路の塞栓因子に影響を与えないと考えられた。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ことができるので、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。

2.1. Hb小胞体の分散安定度に寄与するPEG鎖の水和状態の解析

A. 緒言

Hb小胞体(HbV)の脂質膜には0.3mol%のポリエチレングリコール(PEG)結合脂質(PEG-DSPE₅₀₀₀; PEG鎖の平均分子量が5000)が含まれ、これにより平均粒径250nmのHbV粒子一つの表面が約6000本のPEG鎖で覆われている。PEG修飾はHbVの凝集を抑制し、室温棚置き保存を可能にするだけでなく、アルブミン溶液中および血中に投与したときの分散安定度にも寄与している。

PEG修飾はHbVのみならず、リン脂質小胞体(liposome)を用いる薬物送達系(Drug Delivery System: DDS)に広く用いられているが、分散安定度向上の機序として、水和したPEG鎖の立体障害の効果によるとの定性的な推測に留まっている。そこで本研究では、PEG鎖による表面修飾によってHbVの分散安定性が大幅に向上する機序を分子レベルで調べるため、PEG結合リン脂質である1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-(polyethyleneglycol) : DSPE-PEG (PEG鎖平均分子量 $M_{PEG} = 2000, 5000, 12000$ Da)のミセル水溶液に関して、物理化学的検討を行った。誘電分光測定(DRS)と小角X線散乱(SAXS)を行った。これにより、溶液中におけるPEG鎖の水和挙動、溶媒(水)の水素結合ネットワーク協同再配列のダイナミクス、DSPE-PEGミセルの構造やミセル間の相互作用ポテンシャル等を詳細に調べた。DSPEとPEGの結合部位にはリン酸残基(アニオン)があるので、この寄与も検討するため、比較として、同じ分子量を持つPEG水溶液についても誘電分光測定を行い、DSPE-PEGミセル中におけるPEG鎖の水和状態の違いを検討した。

B. 実験方法

1. 試料

PEG結合脂質DSPE-PEG ($M_{PEG} = 2000, 5000, 12000$ Da)及び、脂質が結合していないPEG ($M_{PEG} = 2000, 5000, 12000$ Da)は、日本油脂から購入した。溶媒にはMillipore社製超純水製造装置を用いて得た超純水を用いた。試料濃度は水溶液中のPEG重量分率が1, 2, 3, 4, 5wt%となるよう電子天秤を用いて調整した。得られたしたPEG脂質溶液を約60°Cで約3時間保持し、さらに平衡状態とするため半日間静

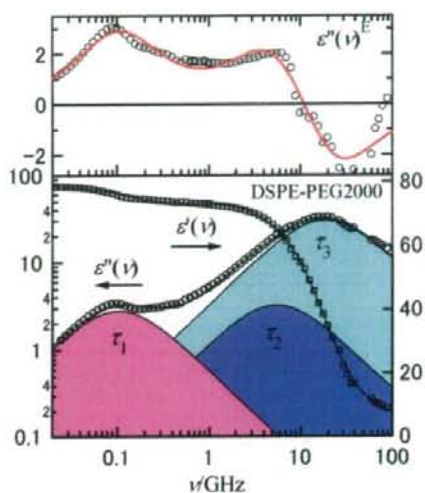


Fig. 1 The complex dielectric spectra of aqueous DSPE-PEG solution in $0.03 < \nu/\text{GHz} < 89$ at 25 ± 0.03 C. The spectrum of aqueous DSPE-PEG at polymer concentration $c = 7.1$ g/dL.

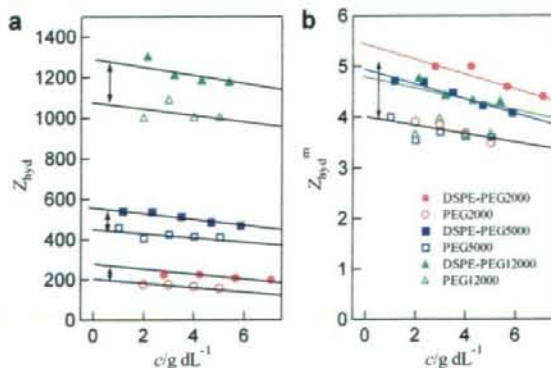


Fig. 2. The effective hydration number of DSPE-PEG and PEG molecules, Z_{hyd} (a), and those per ethylene glycol monomer unit, Z_{hyd}^m (b), as a function of polymer concentration, c .

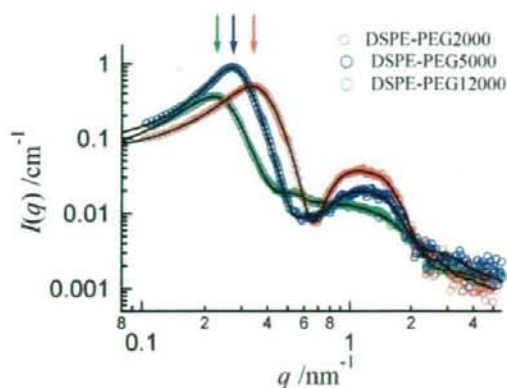


Fig. 3. The absolute X-ray scattered intensities $I(q)$ of the aqueous DSPE-PEG solutions with $M_{\text{PEG}} = 2000, 5000, \text{ and } 12000$ at $W_{\text{DSPE-PEG}} (\text{weight fraction of DSPE-PEG}) = 0.04$ at 25°C . The arrows indicate the intermicellar correlation peak positions q^* , where the distance $d^* = 2\pi/q^*$ gives a measure of centre of mass-to centre of mass distance of the micelles.

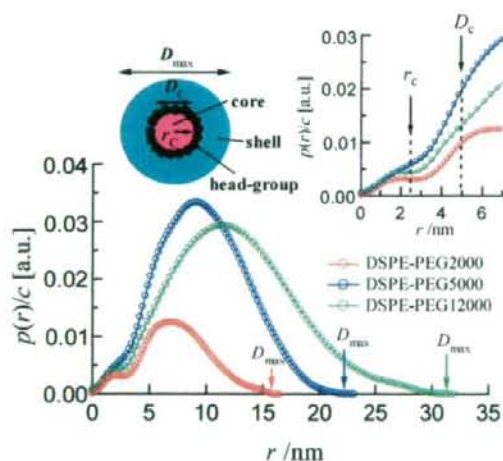


Fig. 4. Particle characterization of the DSPE-PEG micelles. The normalized pair-distance distribution functions by polymer molar concentration, $p(r)/c$. The enlarged view in the low- r region is also presented in the inset. The two inflection points in $p(r)$ highlighted by two arrows can be the prominent measure of the core radius, r_c , and diameter, D_c , from which $r_c = 2.5 \pm 0.1 \text{ nm}$ is deduced for all M_{PEG} .

置した後、誘電分光測定及び小角散乱測定に用いた。

2. 測定

マイクロ波領域(30MHz-20GHz)の誘電分光測定には時間領域反射法(TDR法)を用いた。TDR法は高速ステップパルスに対する試料の応答を時間領域で観測し、フーリエ変換によって周波数領域のスペクトルによって測定する方法である。ミリ波領域(27GHz-89GHz)の誘電測定には導波管干渉計(ドイツRegensburg大)を用いた。導波管とステップモーターによって制御されたセラミックプローブにより、印加電磁波干渉のパス長依存性測定から試料の複素誘電率を求めた。小角散乱測定にはラボ仕様小角散乱装置として世界的に最高の分解能と精度を誇るSAXSess (AntonPaar)を用いた。 $0.1 \leq q/\text{nm}^{-1} \leq 5$ の散乱ベクトル領域のデータを後述のGIFT分析に用いた。

C. 結果および考察

Fig. 1に示すようにDSPE-PEG水溶液には30MHz-89GHzの周波数領域に3つの起源の異なる誘電緩和過程が存在する。100MHzに誘電損失ピークを示す低周波過程はPEGの誘電スペクトルには観測されず、さらに緩和強度がDSPE-PEG中のPEGの分子量や濃度によらず、DSPEのモル濃度に比例することから、リン脂質荷電基の回転による過程に帰属できる。一方、6GHz、19GHzに誘電損失ピークを示す2つの高周波過程は、純水の誘電スペクトルやPEG水溶液のスペクトルとの定量的比較から、それぞれ、水和したPEG鎖の分子運動、バルク水の水素結合ネットワークの協同的再配列に帰属される。

PEGに水和した水分子の緩和時間は25ps程度となり、水和水の運動性は、バルク水と比べ3-4倍低下(**Fig. 1**の τ_2 過程参照)していることが分かる。従って、バルク水の示す速い緩和過程(緩和時間8.3ps)に寄与することが出来ない。このことを利用して、バルク水の協同的再配列に起因する分極揺らぎ振幅(誘電緩和強度)の定量分析から、水溶液中に存在する水分子のうちバルク水としての性質を保持している水と水和により運動性の低下

した水の濃度を定量的に評価することが可能である。(例えば、ある濃度の溶液中に50mol/l存在する水が、47mol/lのバルク水相当の誘電緩和強度しか示さないとすれば、3mol/lが水和によってバルク水の示す速い緩和過程に寄与できなかった、つまり、水和水に相当すると考える。)ここから、DSPE-PEG分子の水和数を評価することが出来る。

Fig. 2に誘電分光法によって評価されたPSPE-PEG及びPEGの一分子あたりの水和数を示す。PEGの分子量に依存せず、DSPE-PEGのエチレンオキサイドモノマーユニット当たり約5.0-5.5(無限希釈に外挿値)の水分子が水和することが明らかになった。これより、PEG5000一本あたりの水和数は560-630個となる。水和数は溶質濃度の増加と共に緩やかに減少する。PEGに比べ、DSPE-PEGは20%程度高い水和数を示している。これには、ミセルへのPackingによる効果とDSPE荷電基への水和の効果、双方が寄与していると考えられる。

Fig. 3にDSPE-PEG水溶液の小角散乱データを示す。散乱データは散乱ベクトル $q=(4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$ の関数として得られる。 λ はX線(K α 線)の波長、 θ は散乱角である。これらの散乱曲線から、DSPE-PEGミセル構造の実空間描像を引き出すため、最適化された間接的逆フーリエ変換手法と構造因子分析を組み合わせた最新の散乱曲線分析手法であるGeneralized Indirect Fourier Transformation (GIFT法)を用いて、二体距離分布関数 $p(r)$ を計算した。

Fig. 4に $p(r)$ を示す。 $p(r)$ は試料の電子密度揺らぎの空間自己相関関数に相当し、ミセルのサイズ、形状及び、内部構造(コアシェル構造)の情報を与える。Fig. 4に示す結果から、 $M_{PEG}=2000, 5000, 12000$ DaのDSPE-PEGは、それぞれ水中で直径16、22、31nmの球状に近いミセルを形成し、疎水性コアの半径 r_c はPEG分子量によらず2.5nm、会合数はほぼ一定の72($\pm 10\%$)であることが分かった。一方、ミセル間相互作用ポテンシャルを反映する構造因子 $S(q)$ は、静電遮蔽を考慮したクーロン反発ポテン

シャル(湯川ポテンシャル)モデルで近似できる。

Fig. 5に構造因子分析から求めたDSPE-PEGミセルの二体相関関数 $g(r)$ を示す。 $g(r)$ は原点 $r=0$ に置かれたひとつのミセルから見たミセルの空間相関を表す関数である。DSPE-PEG₁₂₀₀₀については、ミセル間の静電反発の及ぶ距離に対し、ミセルサイズが相対的に大きいことから水和PEG層の重なりが示唆された。DSPE-PEG₂₀₀₀及びDSPE-PEG₅₀₀₀に関しては、低イオン強度下では、ミセル間静電反発によってミセル同士が接触することが出来ない(正確には、溶液中でミセル同士が接触する頻度は低い)。このように、条件によっては、水和したPEGの立体障害効果のみならず、ミセル間の静電反

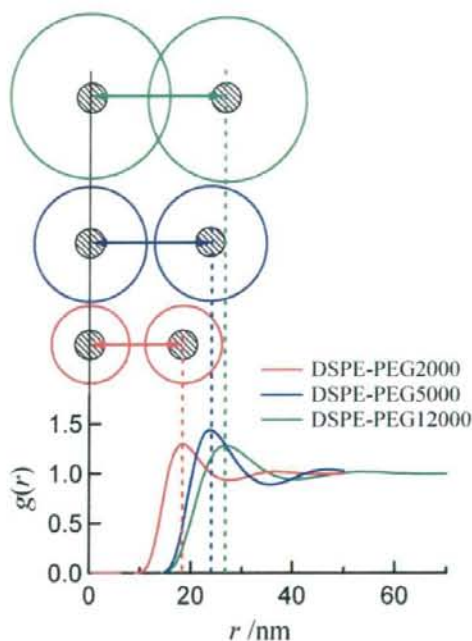


Fig. 5. The pair-correlation functions $g(r)$ for the DSPE-PEG micelles, as obtained by GIFT analysis of SAXS intensities $I(q)$, assuming a screened Coulomb (Yukawa) potential and the Rogers-Young (RY) closure relation. On the same spatial scale, the schematic picture of the micelles is drawn to visualize the interplay between the intermicellar (average) distance and the micellar geometry, where the shaded circle represents a hydrophobic core having $r_c \sim 2.5$ nm.

発を含めたミセル間の反駁的相互作用が小胞体の分散安定度に寄与するファクターと成りえることが示唆された。

D. 結論

一連のPEG鎖分子量のDSPE-PEGミセル水溶液を検討した結果、水和したPEG鎖の立体障害効果のみならず、DSPE-PEG₂₀₀₀、DSPE-PEG₅₀₀₀ではDSPEのリン酸残基の反駁的相互作用が存在し、これらが小胞体の分散安定度にも寄与することが示唆された。しかし、生理条件のように高いイオン強度下では、静電遮蔽によって水和したPEGの立体障害効果がより主要な役割を示すと推測される。引き続き、ミセル構造とミセル間相互作用のイオン強度依存性に関して、より詳細な研究が進行中である。また、次年度は、小胞体表面の脂質荷電の水和状態、HbVの内部及び全体構造の精密分析、内包高濃度Hbの溶存状態の解析、各種代用血漿剤存在下におけるHbVの協同拡散過程と粒子間相互作用ポテンシャルを明らかにする研究を実施する予定である。

2.2. Hb小胞体の粒子サイズの精密評価、静的構造と拡散ダイナミクス

A. 研究目的

Hb小胞体(HbV)は、従来のカプセル型Hb(liposome-encapsulated Hb)とは本質的に異なり、高純度Hb溶液が高濃度に内包され、脂質被覆層数も少ないという構造上の特徴を有する。動物投与試験では、高いHb濃度によって十分な酸素運搬効率を示すこと、蓄積性が無く代謝排泄が容易であること、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。従来のHbVの構造解析法と

して、希薄系の粒径分布分析(簡易型の動的光散乱)、電顕観察などが用いられ、理論的な粒子体積、成分組成と分子占有面積から、内水相のHb濃度や被覆層数を計算、予測したが、半定量的議論の範疇に留まっていた。

本研究では、動的光散乱法(DLS)と小角散乱法(SAXS)の最新の測定・分析手法を適用し、(1) HbVの粒子サイズとサイズ分布の精密評価、(2) HbVの内部構造や内包Hbの溶存状態(蛋白質間相互作用ポテンシャルや分子内の微細構造)、(3) 濃厚系における粒子拡散ダイナミクスと分散安定性の関連性など、これまで定量分析が困難であった問題を精緻に検討した。

B. 実験方法

1. 測定試料

HbVと、Hbを内包しない空の小胞体分散液は、既報に従って調製した。動的光散乱法と小角散乱法の測定方法や目的に応じ、適宜、生理食塩水溶液で希釈し、濃度を調整した。

2. 小角X線散乱

小角散乱測定にはラボ仕様小角散乱装置として世界的に最高の小角分解能と精度を誇るSAXSess(AntonPaar社)を用いた。 $0.06 \leq q/\text{nm}^{-1} \leq 10$ の散乱ベクトル領域のデータを分析に用いた。

3. 動的光散乱

HbVの粒子サイズ及びサイズ分布の精密評価には、シングルモード光学ファイバーとALV社製のシングルフォトン検出器を装備する動的光散乱ゴオニオメーターを用いた。温度制御され、デカリン溶媒で満たされたインデックスマッチバス、レーザー発生源はVerdi社 V5ダイオードレーザーで波長 432 nm、最高出力5 Wである。データの取得はALV 5000 マルチプルタウデジタルコリレータを用い、散乱強度相関関数の計算にはALV-5000/E ソフトウェアパッケージを用いた。

4. 超薄層セル動的散乱

サブミクロン粒子サイズの濃厚コロイド系に特有の多重散乱の問題を克服し、試料の共同拡散過程を観測するために、濃厚HbV系に対し、超薄層セルを用いた動的散乱測定を行った。セル厚は可変であり、15, 50, 100 nmにセットすることが出来る。波長 630 nmのHeNeレーザーを用い、強度自己相関測定にはシングルモード光学ファイバー、光電子増倍管とALV 5000 マルチプルタウデジタルコリレータを用いた。現状の光学系では15° から45°の前方散乱のみの測定が可能である。

C. 実験結果と考察

1. HbVの粒子径と分布の定量評価

Fig. 1にHbV希薄分散液系に対する動的散乱データを示す。Fig. 5aは、擬似交差相関法で得られた強度相関関数 $g_2(t)$ を表す。測定はストック分散液を1600倍希釈し、構造因子 $S(q)=1$ 、流体力学関数 $H(q)=1$ を十分に満たす濃度条件で行った。装置性能及び分析法に起因する粒子サイズ分布評価の広がり誤差を確認するため、比較系として単分散に近いマイクロスフィア(Polysciences Inc., 直径公証値0.209 μm)の希薄分散液を同時に測定した。Fig. 5bに散乱電場相関関数 $g_1(t)$ (または動的構造因子)に対し、間接逆ラプラス変換を適用するORT(Optimized Regularization Technique)分析によって計算されたHbV及びマイクロスフィアのサイズ分布関数を示す。分布関数は体積分布に換算してある。マイクロスフィアに対するORT分析の結果は装置性能によるサイズ分布評価の広がり誤差を実質的に無視できることを示している。単分散理想系に近いマイクロスフィアに比較すれば、HbVのサイズ分布は広いことはFig. 5bのデータから明らかであるが、体積分布に換算した平均流体力学直径は238nm、標準偏差は20nmと定量評価され、自己組織化を利用して階層的に構築された粒子系としては非常に狭いサイズ分布と狙い通りの平均粒子径に制御されていることが確認された。

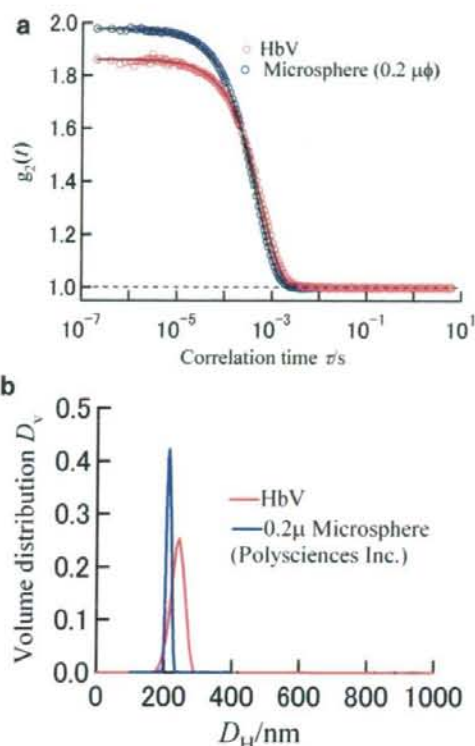


Fig. 5 HbV及び単分散マイクロスフィア希薄分散液の動的散乱データとORT法によるサイズ分布分析。

2. Hbを内包する小胞体膜の内部構造

Fig. 6にHbを含有しない空の小胞体の濃厚分散液([脂質] = 6g/dL)の小角X線散乱データを示す。散乱データは散乱ベクトル長 $q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta/2)$ の関数として得られる。 λ はX線($K\alpha$ 線)の波長、 θ は全散乱角である。Fig. 6aは、光学系補正前の小角広角同時測定のデータである。低温領域($T = 4.0^\circ\text{C}$)においても図中に矢印で示した $q \sim 15 \text{ nm}^{-1}$ ($d \sim 0.42 \text{ nm}$)に α ゲルピークは観測されないことを確認した。DPPCの α ゲル-液晶転移温度は 41°C であるが、添加されたコレステロールの効果によって、転移温度が消失し、 41°C 以下の低温領域においても脂質膜内部の構造は液晶状態であることを示している。次に、小角散乱データ $I(q)$ (Fig. 6b)の濃度依存性を確認したところ、濃度で規格化した散乱曲線 $I(q)/c$ はデータの精度内で極めてよく良く一致し、

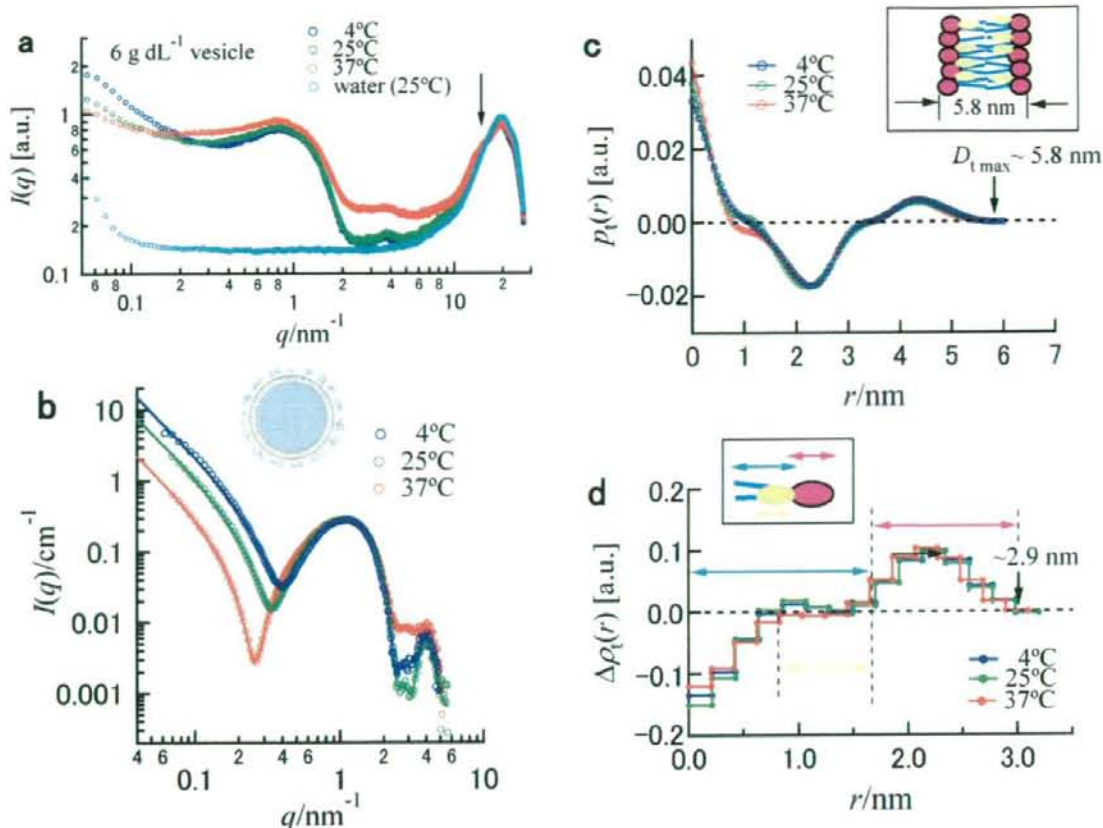


Fig. 6 Hb 溶液を内包させる為の空のリン脂質小胞体分散液の小角 X 線散乱データ。(a)小角広角 X 散乱曲線 (光学系補正無し)、(b)小角散乱曲線、(c)脂質膜厚み方向の二体間距離分布関数 $p(r)$ 、(d)脂質膜厚み方向の電子密度プロファイル $D(r)$ 。

ベシクル間相互作用の効果、すなわち粒子間の構造因子 $S(q)^{inter}$ の効果は測定可能な散乱ベクトル領域内には現れていないことが分かる (ベシクル間の相互作用に剛体球相互作用を仮定すると予想される $S(q)^{inter}$ の相関ピーク位置は $q = 0.025 \text{ nm}^{-1}$ となり、小角分解能外にある)。一方、散乱曲線上に脂質膜積層による干渉性散乱、すなわち粒子内の構造因子 $S(q)^{intra}$ の効果は全く見られない。脂質多重層が形成されれば、膜間距離 d に対し、 $q^* = 2\pi/d$ の位置に $S(q)^{intra}$ のピークが現れる。また、平均積総数が 2.3 枚程度であっても $S(q)^{intra}$ の影響によって、 $I(q)$ の小角領域に波打ち、または、編曲点のような挙動が現れると予想される。しかし、実測の $I(q)$ には全くそのような挙動が見られない。従って、平均被覆枚数は 1 に近い、すなわち、単層膜ベシクルが形

成されていると判断することが可能である。

Fig. 6c に、**b** で示した散乱曲線 $I(q)$ から IFT 法によって計算した脂質膜厚み方向の二体間距離分布関数 $p(r)$ を示す。距離 r が大きくなるに従い、正一負一正の挙動が見られたが、これは脂質膜内部の電子密度が水の電子密度と比して高い部分と低い部分が交互に存在することに起因する。また、**Fig. 6c** 内に矢印で示したように、脂質膜の厚みが約 5.8 nm であることが読み取れる。ここで、表面修飾 PEG 鎖の寄与は、PEG 鎖の低密度のため、データにほとんど現れていない。従って、厚み 5.8 nm は表面修飾 PEG 鎖の広がりを含まない脂質膜の厚みであることに注意が必要である。さらに、 $p(r)$ を分解 (deconvolute) して得た電子密度プロファイル $D(r)$ (**Fig. 6d**) から、炭化水素基 (疎水部) の脂質膜内部

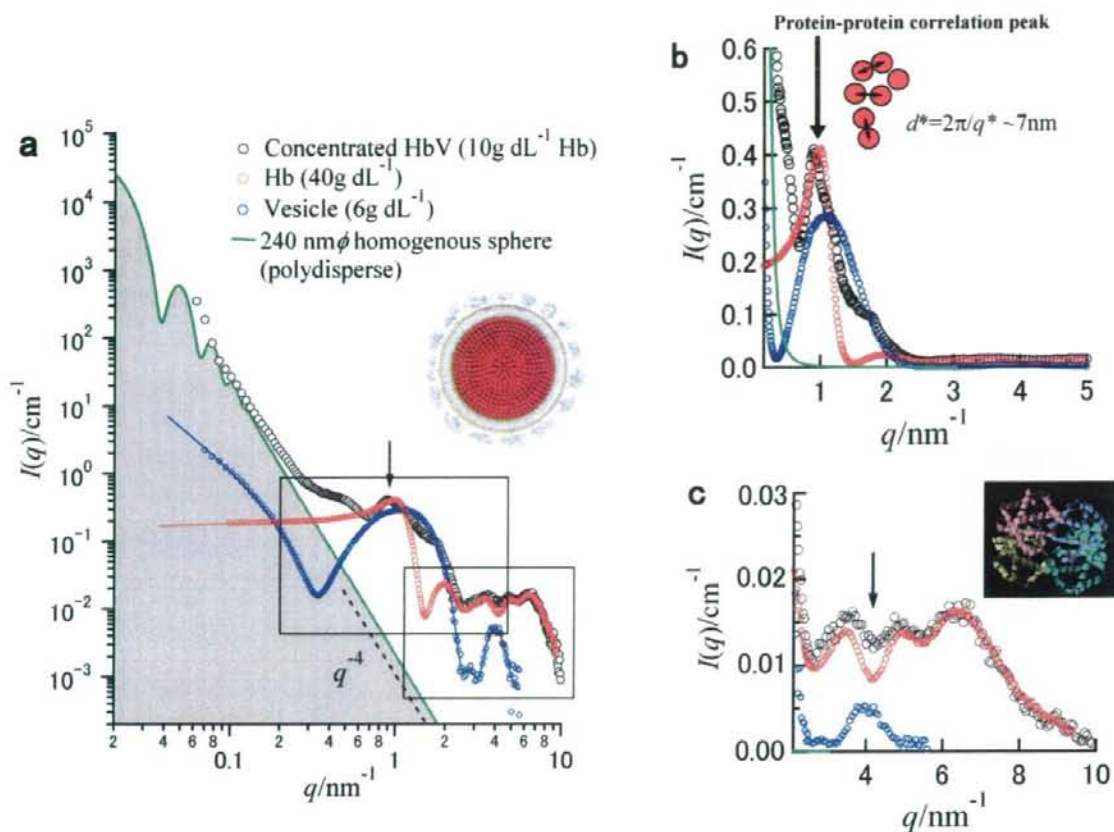


Fig. 7 濃厚 HbV 分散液の小角 X 線散乱データ。パネル a にはバルクの濃厚 Hb 溶液 ($c = 40\text{g/dL}$) と既に Fig. 2b に示したベシクル分散液の散乱曲線も同時に表示した。パネル b と c は、パネル a に 2 つの四角で示した領域の拡大図であり、それぞれ、内包 Hb 分子間の相互作用ピークと Hb 分子内微細構造を反映する。

での長さ約 1.7~1.8 nm、コレステロール分子の疎水親水界面付近への局在と、親水頭部の大きさ約 1.1nm が明らかになった。

本研究で得られた描像はモデル計算や構造モデルのパラメータフィッティングに基づくデータの分析によって求めたものではなく、逆FOURIER変換手法によってモデルフリーにデータを実空間に焼き直して得た、確度の高い定量情報であることを強調したい。

3. HbVの内部構造と内包Hbの溶存状態

Fig. 7 に濃厚 HbV 分散液 ($[\text{Hb}] = 10\text{g/dL}$) の小角 X 線散乱データを示す。散乱曲線の小角部分(散乱ベ

クトル q の小さい領域)は、**Fig. 7a** に緑色の理論曲線で示したように、多分散性を考慮した平均半径 120nm の球状粒子の散乱関数を用いて、DLS の結果と整合性良く説明できる。ここで HbV 粒子が均一な内部電子密度分布を有する球状粒子であると仮定すると、実測の散乱曲線は、**Fig. 7a** に示した緑色の理論散乱曲線に従い、 q^{-4} に比例して、急速に減少するはずである。しかし、実際には HbV 散乱曲線の広角部分には HbV 内部の電子密度揺らぎに起因する特徴的な余剰散乱が観測される。**Fig. 7b** に示した空間スケール領域には、内包された濃厚 Hb 溶液の構造因子 $S(q)$ の効果が明確に現れている。内包濃厚 Hb 溶液の $S(q)$ のピーク位置、ピーク高さおよび広がり、

バルクの濃厚Hb溶液($c = 40\text{g/dL}$)の $S(q)$ のそれらと非常に近いことが解った。ピーク位置から近似的に評価した粒子間距離は 7nm で、Hb分子の最大直径 $\sim 6.5\text{nm}$ に近い。バルクのHb溶液中と同様、HbV内水相のHb分子は剛体球相互作用に近い振舞いをする事が分かる。

一方、Fig. 7cに示された小空間スケール領域の散乱曲線は、内包Hb分子の分子内微細構造を反映する。 $q = 10\text{nm}^{-1}$ 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。このことは、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。

これら全ての結果は、HbV内水相中のHb間相互作用ポテンシャルは、閉じ込めの効果をほとんど受けておらず、バルクのHb溶液中とほとんど同一であること、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。

4. 濃厚HbV分散液中の拡散ダイナミクス

濃厚HbV分散液中のHbVの拡散ダイナミクスを観測するためには、サブミクロン粒子サイズの濃厚コロイド系に特有の多重散乱の問題を克服する必要がある。そこで、超薄層セルを用いた動的光散乱測定を試みた。セル厚は 50mm を選択した。Fig. 8aに、生理食塩水に分散させたHbVの規格化強度相関関数 $[g_2(t)-1]/b$ の濃度依存性を示す($[\text{Hb}] = 1, 5, 10\text{g/dL}$)。ここで、 b は動的散乱法による相関関数測定のインターセプトである。

Fig. 8aに挿入した写真が示すように、薄層セルに封入した濃厚HbV分散液は、あたかも赤いセロファンのように透明で、セルの反対側を透過して目視

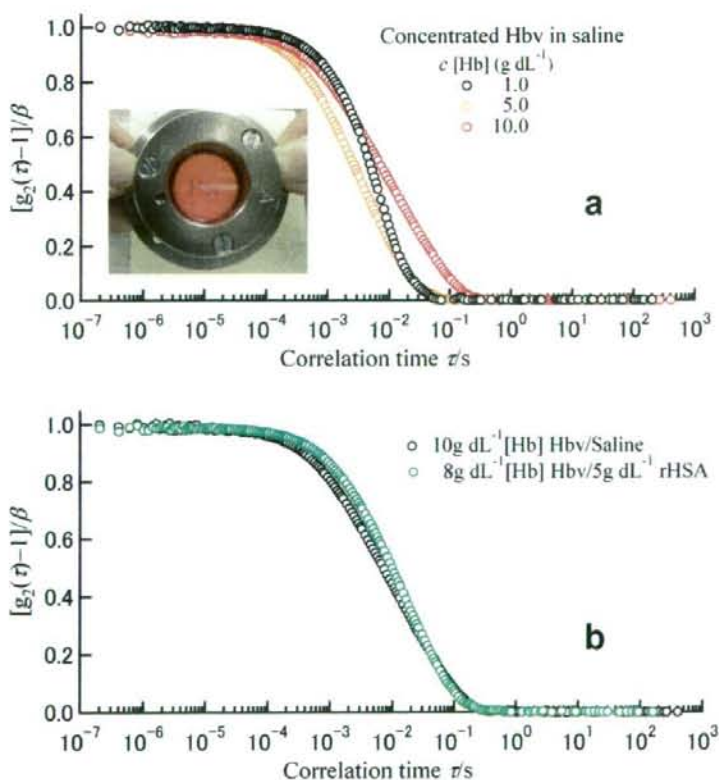


Fig. 8 超薄層セルを用いた濃厚HbV分散液の動的散乱測定。(a) 生理食塩水に分散させたHbV ($[\text{Hb}] = 1, 5, 10\text{g/dL}$)、(b) 5g/dL rHSA溶液に分散させたHbV ($[\text{Hb}] = 8\text{g/dL}$)。

することが可能である。薄層セルによって、散乱体積を極限まで減少させて多重散乱や吸収の効果を克服、散乱強度相関関数を得ることに成功した。Fig. 8aから、濃度の増加と共に、HbV粒子の共同拡散が速くなることが解る。これは剛体球相互作用を含む全ての反駁的相互作用を示すコロイド粒子系に共通の挙動である。しかし、 $[Hb]=10\text{g/dL}$ (HbVの体積分率 ~ 0.4)のような高濃度域になると逆に共同拡散ダイナミクスは濃度の増加と共に遅くなっている。これは、粒子濃度の増加に伴って、粒子間の平均距離が減少、衝突頻度が上昇し、HbV粒子間の弱い親和相互作用ポテンシャルによって、拡散ダイナミクスが遅延されるためと推測される。超薄層セルを用いた動的散乱法は、サブミクロン粒子サイズの濃厚コロイド系の拡散ダイナミクスの観測に優れた方法であるが、ヘテロサイン信号の発生や閉じ込め効果など、データの定量的解釈にはいくつかの注意が必要である。従って、後者の挙動に対する解釈は、現時点での推測に留まる。この点に関しては三次元交差相関法を用いた更なる検討が必要である。

Fig. 8bに、生理食塩水に分散させたHbV ($[Hb]=10\text{g/dL}$)と 5g/dL のリコンビナントヒトアルブミン(rHSA)溶液に分散させたHbV ($[Hb]=8.6\text{g/dL}$)の強度相関関数の比較を示す。rHSAの添加によって枯渇相互作用(depletion interaction)によるHbV粒子間の引力相互作用が誘発されると予想されたが、実際にはrHSA溶液に分散させた場合でもHbV粒子の共同拡散ダイナミクスの顕著なスローダウンは観測されず、rHSAの存在はHbV粒子の共同拡散ダイナミクスにほとんど影響を与えていないことが確認された。

Fig. 8a,bに示した全ての強度相関関数 $g_2(t)$ は、シングルステップの緩和挙動を示し、ベースラインの1に素早く漸近する。この事実は、濃厚HbV分散液中で長寿命のクラスター形成などは起こらず、エルゴード性 (=簡単のため、理解しやすいイメージとしては、コロイド粒子が全空間内を自由拡

散できる安定流体としての性質)を保持している証拠であり、HbV分散液の高い分散安定性と長期の保存安定性を、粒子の拡散ダイナミクスの見地から支持する結果と言える。

D. 結論

Hb小胞体の(i)粒子サイズとサイズ分布、(ii)内部構造の詳細を含む静的構造、(iii)粒子拡散ダイナミクスを精密評価するため、HbV分散液及び、モデル系として用意したHbを内包しないベシクル分散液に対し、動的散乱法(DLS)と小角散乱法(SAXS)の最新の測定・分析法を適用した。動的散乱法によって得たHbV希薄分散液系の強度相関関数 $g_2(t)$ に対するORT分析(逆ラプラス変換法)から、体積分布に換算した平均流体学直径 238nm 、標準偏差 20nm を得た。ベシクル分散液の小角散乱データの分析から、被覆枚数は平均で1、脂質膜の厚み 5.8nm (PEG層を含まず)が判明し、さらに脂質膜中の電子密度プロファイルを得て複合脂質膜の内部構造の詳細を明らかにした。一方、HbVのX線散乱曲線の小角部分は多分散性を考慮した平均半径 120nm の球状粒子の散乱関数を用いたDLSの結果と整合性良く説明出来るが、広角部分にはHbV内部の電子密度揺らぎに起因する余剰散乱が観測されることを見出した。この余剰散乱の検討から、HbV内水相中のHb間相互作用ポテンシャルは閉じ込め効果をほとんど受けておらず、バルクのHb溶液中とほとんど同一であること、Hbの分子内微細構造も同様に製造工程や内水相に濃度高く閉じ込めてあっても何ら蛋白変性等の影響を受けていないことを確認した。濃厚HbV分散液に関し、特殊な超薄膜セルを用いて多重散乱の影響を除去、希釈無しに初めてHbV粒子の拡散ダイナミクスの観測に成功し、生理食塩水及び濃度 5g/dL のrHSA水溶液に分散させた濃厚HbV ($[Hb]=10\text{g/dL}$, 体積分率 ~ 0.4)のエルゴード性を証明した。この事実は、HbVの高い分散安定性を粒子拡散の動的過程という見地から証明するものである。

(謝辞)

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

2.3. 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

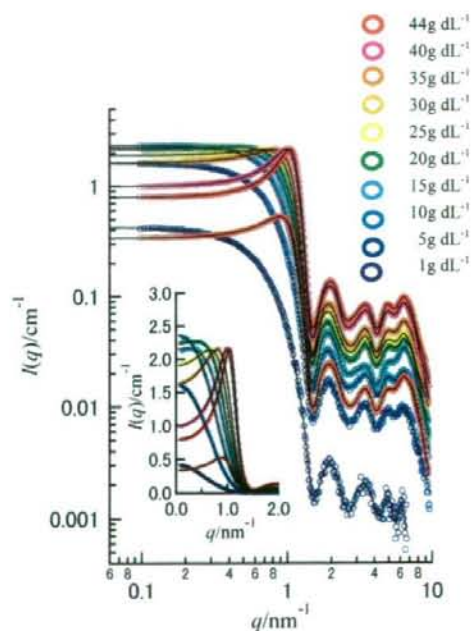


Fig. 1 Hb 溶液の小角散乱曲線の濃度依存性

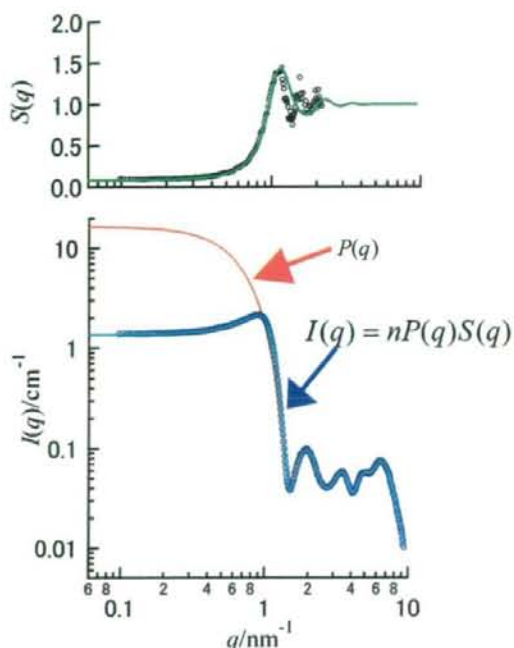


Fig. 2 Hb 溶液の小角散乱曲線の GIFT 分析例 ($c = 35 \text{ g/dL}$)。

対強度でプロットされている。ここで λ は X 線 ($K\alpha$ 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:

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

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

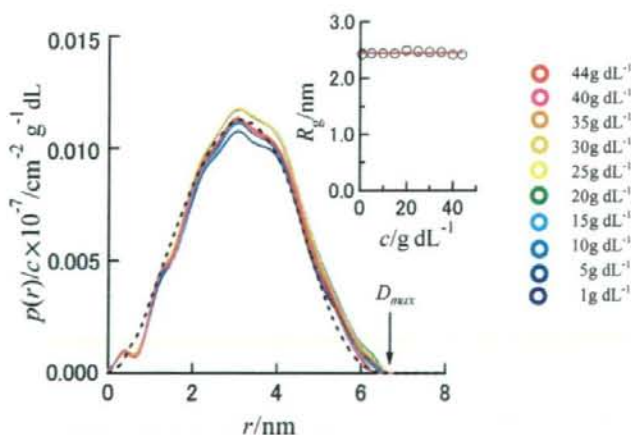


Fig. 3 GIFT 法によって計算された Hb の二体間距離分布関数 $p(r)$ の濃度依存性。破線は結晶構造データ (PDB code: 2DN2) から計算した $p(r)$ 。右上は $P(q)$ より計算した慣性半径 R_g 。

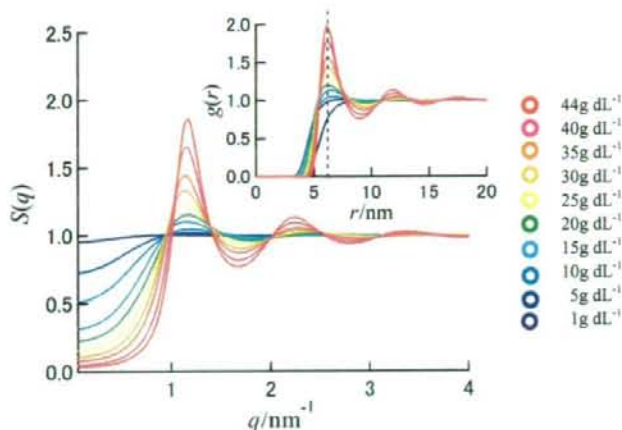


Fig. 4 Hb 溶液の構造因子 $S(q)$ 及び二体相関関数 $g(r)$ の濃度依存性

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、

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

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

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

と与えられるので、言い換えれば $p(r)$ は $P(q)$ の逆 Fourier 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

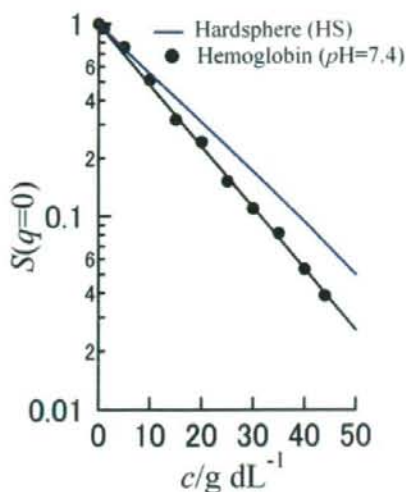


Fig. 5 Hb 溶液の $S(q \rightarrow 0)$ 値の濃度依存性

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組み合わせ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動的であることが分かった。前述の $S(q)$ 及び $g(r)$ 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事が分かる。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。

2.4. Hbをカプセル化することにより配位子結合が遅延されることの機序の解明

A. 研究目的

赤血球は長径約 $8 \mu\text{m}$ の中窪み円板状粒子であり、酸素を結合できるHbの高濃度溶液(約35%)を赤血球膜に内包した構造を持つ。赤血球の細胞型構造の生理的意義は、① Hb溶液のコロイド浸透圧の抑制、② 本来毒性のあるHb逸脱の抑制、③ Hb機能維持のための各種リン酸などエネルギー分子、解糖 - ならびに還元 - 酵素系の保持、が先ず挙げられる。更に、④ 内因性ガス状情報伝達分子(NO, CO)との反応性を調節していることも重要である。溶血を伴う病態、あるいは人工酸素運搬体(分子状の修飾Hb溶液)の投与において、血管内皮細胞由来の弛緩因子NOを捕捉するため、血管収縮(血圧亢進)、血管内皮の障害、また代謝異常や軽度の神経性副作用などが生じることが明らかになっている。COもまた、特に肝微小循環において血管拡張因子として作用する分子であり、投与のHb溶液がCOを捕捉するために生じる類洞血管収縮が確認されている。副作用の原因は血漿層に存在する遊離Hb分子であり、赤血球の構造はHbの毒性を遮蔽していると言える。

赤血球構造がNO結合を遅延させるメカニズムに関しては、過去に多くの検討が行われているが、明確な答えが得られぬまま諸説が議論されている状態にある。これまで提案されている説としては、(1) 赤血球周囲に存在する非攪拌層によるNOの拡散障壁、(2) 赤血球の細胞骨格によるNOの拡散障壁、(3) 赤血球内の高粘度Hb溶液によるNOの拡散障壁、である。赤血球は壊れ易くNOは化学的に不安定であるため、NOの反応解析は非常に難しい。この障害がメカニズムの解明を遅らせているのではないかと考えられた。

人工酸素運搬体として開発されたHb小胞体(HbV)は、赤血球と同等の酸素運搬能を有する。HbVは赤血球と同じ細胞型構造であるため、Hbと

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

B. 実験方法

1. HbV、Hb溶液の調製

高濃度・高純度のHbCO溶液(40 g/dl, desalted)は、日本赤十字社(東京)から提供を受けた期限切れ非使用赤血球から既報に従い精製したものをを用いた。HbCO溶液をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で希釈して[heme] = 300 μM に調整後、配位子交換操作を経てHbO₂溶液を得た。

また、内包Hb濃度と粒子径を変化させたHbVの調製には、HbCO溶液をPBSで10倍に希釈後、限外ろ過(UHP-62K, cut-off Mr 10,000; Advantec社, 4 °C)を行い、[Hb] = 40 g/dlに濃縮して原料のHb溶液とした。このHb溶液をPBSで希釈し、[Hb] = 1, 10, 20, 35 g/dlのHb溶液をそれぞれ調製した。これらのHb溶液の粘度をレオメーター(Physica MCR 301; Anton Paar社製)で測定したところ、それぞれ0.9, 1.1, 2.1, 10.1 cPであった(10 s⁻¹, 25 °C)。HbのNO親和度と酸素親和度(P₅₀)は直線関係にあることが知られているので、すべての測定試料のP₅₀を同じ