

にするため、アロステリック因子を加えずに、単にCl⁻とPBSのリン酸塩のみでP₅₀を制御した。HbVの膜成分である脂質は、1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl-choline, cholesterol, 1,5-*O*-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (日本精化社製) = 5/5/1 (mol比)の混合脂質に、0.3 mol% の 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl-ethanolamine- *N*-poly(ethylene glycol)₅₀₀₀ (日本油脂社製) を混合して用いた。各HbCO溶液 ([Hb] = 1, 10, 20, 35 g/dl) に混合脂質を終濃度7 g/dlになるよう添加。強制攪拌機で水和分散 (250 rpm, 2 hrs, room temp.) させた後、エクストルージョン法で平均粒径265–305 nmに制御した。超遠心分離による未内包Hb溶液の除去、PBSによる再分散を経て、[heme] = 300 μMのHbVを得た。

粒径を変化させたHbVの調製には、HbCO溶液 ([Hb] = 35 g/dl) に混合脂質を終濃度7 g/dlになるよう添加。強制攪拌機で水和分散 (250 rpm, 2 hrs, room temp.) させた後、エクストルージョン法で平均粒径452 nmおよび178 nmのHbVを得た。HbVの配位子交換 (CO→O₂) をO₂雰囲気下で可視光を照射して行った。HbV分散液を入れたナス型フラスコをロータリーエバポレーターで穏やかに回転させ、フラスコ壁面にHbV分散液の薄層を形成させた。Hbの変性を防ぐ為にフラスコを氷水に浸しながらハロゲンランプ (500 watts) を照射し、O₂をフラス

コ内に吹き込ませた。配位子交換の終了はHbCOのSoret帯max (420 nm)の有無で確認した。平均粒径は動的光散乱法 (Submicron Particle Size Analyzer, model N4 PLUS; Beckman-Coulter社製)、P₅₀は酸素結合解離曲線の測定 (Hemox-Analyzer; TCS Medical Science社製) から求めた。すべての測定試料のP₅₀は13–16に制御できた (37 °C)。調製したHbVの物理化学的特徴はTable 1にまとめた。

2. HbVのNO、CO結合反応の解析

ストップフロー法を用い、HbVのNO、CO結合反応を経時観測した。ストップフロー法とは、急速に流した2種の溶液を混合することによって反応を開始させ、その流れを停止し、観測キュベット内で進行する反応を主として光学的な方法で観測する手段である。本研究ではユニソク社製のストップフロー・ラピッドスキャン分光測定装置 (RSP-1000型) を用いた。2種の溶液の高速混合は0.3–0.6 MPaの加圧で行い、混合デッドタイムは1.5 ms以下である。2つのリザーバー (AとB) にPBS溶液を3 mlずつ導入し、試料導入口をセプタムラバーで密閉してN₂バブルを30分以上行い、リザーバー内を完全に脱酸素化した。この操作はNOの損失とHbのmet化を防ぐ観点から非常に重要である。リザーバーAの[heme]が3 μMになるようにHbV分散液 (~30 μl, [heme] = 300 μM) をマイクロシリ

Table 1. Physicochemical characterization of a series of HbV prepared for the stopped flow spectrophotometry to observe the NO and CO binding profiles. Samples 1–4 were used to examine the influence of intracellular Hb concentration ([Hb]_{in}). Samples 4–6 were used to study the influence of particle diameter. The P₅₀ value (oxygen tension at which Hb is half-saturated with oxygen) were regulated in the narrow range of 13–16 torrs to minimize the influence of Hb allostery on the binding rate constants of NO and CO.

Sample entry number	[Hb] _{in} (g/dl)	Particle size (nm)	P ₅₀ (Torr)
1	1	305 ± 105	13
2	10	277 ± 103	15
3	20	278 ± 94	15
4	35	265 ± 57	14
5	35	178 ± 74	16
6	35	452 ± 184	14

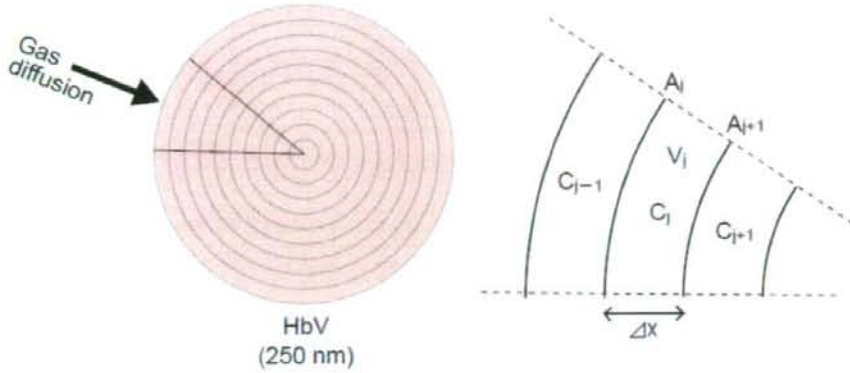


Fig. 1. Schematic illustration of simulation design for three-dimensional gas diffusion from the surface to the core of one particle containing a Hb solution. Particle diameter = 250 nm.

ンジで導入後、ストップフロー測定を行い（波長範囲：385-593 nm）、deoxyHbのSoret帯max（430 nm）の吸収ピークからHbの完全な脱酸素化を確認した。Hbの変性を防ぐ為にN₂バブルをN₂フローに切り換えた後、リザーバーBにNOもしくはCOガスを導入してバブルした。NO結合においては0.2004% NO/N₂混合ガス、CO結合においては14.14% CO/N₂混合ガス（高千穂化学工業社製）を用い、5分以上PBS溶液をバブルした後、ストップフロー測定を開始した。1 ms毎の測定を210 msまで行った。測定15回分を平均した値について、430 nmの吸光度の経時変化を解析した。また、全ての測定は25 °Cで実施した。

Hbが均一に分布していること、結合反応が不可逆であること、ガス濃度が一定であることを仮定して、擬一次反応速度式(1)からみかけのNO、CO結合速度定数($k'_{on}^{(NO)}$, $k'_{on}^{(CO)}$)を算出した。

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

ΔA_t は時刻 t におけるdeoxyHbの吸光度の変化量； ΔA_0

は初期におけるdeoxyHbの吸光度の変化量であり、それぞれ以下のように定義できる。

$$\Delta A_t = A_t - A_{t_{max}} \quad (2)$$

$$\Delta A_0 = A_{t=0} - A_{t_{max}} \quad (3)$$

C_{Gas} 、初期のガス濃度。NOのガス濃度（1.9 μM）はheme濃度（1.5 μM）と比較して大過剰とは言えないので、反応の初期段階の傾きから $k'_{on}^{(NO)}$ を算出した。

3. シミュレーションを用いたNO、CO結合反応の予測

コンピュータシミュレーションを用い、内包Hb濃度および粒径の変化がHbVのNO、CO結合反応に与える影響を予測した。本シミュレーションでは、①ガス分子の拡散、②HbV内のHbのNO、CO結合反応、の2点のみに着目した。HbVは粒径250 nmの球体であり、溶液中に均一に分散していると仮定した。また、HbとHbVの拡散係数はガスの拡散係数と比較して非常に小さい。そこでHbとHbVを静

$$\Delta C_{Gas}(t_i, x_j) = D \cdot \left(\frac{-A_j \cdot (C_{Gas}(t_i, x_j) - C_{Gas}(t_i, x_{j-1})) + A_{j+1} \cdot (C_{Gas}(t_i, x_{j+1}) - C_{Gas}(t_i, x_j))}{V_j \cdot \Delta x} \right) \cdot \Delta t \quad (5)$$

止系と仮定して、ガスの拡散のみをシミュレーションした。また、小粒子を高速混合するため、細胞外の拡散障壁は無視することとした。脂質二分子膜の厚さ(～5 nm)は粒径(250 nm)と比較して極めて小さいことから、脂質二分子膜の拡散障壁も無視することとした。(両者の障壁は、後述の結果からほとんど無いことが明らかとなった。) HbV 粒子の表面から中心までの距離125 nmを10つのセルに分割し、1セル12.5 nmの範囲での反応を最小単位と仮定した。例えば粒径8000 nmの粒子のシミュレーションでは、粒子表面から中心までの距離4000 nmの間に12.5 nmのセルが320個並ぶことになる。最初のセルはバルク濃度を表す濃度境界条件と接しており、最後のセルはHbVの中心点に対応する閉鎖境界条件とした。基本となるガス拡散方程式(4)より、粒子表面から中心への一次元拡散を式(5)で表した。

$$\frac{\partial C_{Gas}}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_{Gas}}{\partial x^2} \quad (4)$$

ここで、 $C_{Gas}(t_b, x_j)$ は、時刻 t_b 、セル x_j における溶存ガス濃度； $\Delta C_{Gas}(t_b, x_j)$ は、拡散による移動量； A_j は、セル $j-1$ と j と接している面積； Δt は、ステップ時間； V_j は、セル j の体積； Δx は、セル間の距離を示す(Fig. 1)。ガス分子は各セル内のhemeと反応し、ガスとhemeがそれぞれ消費される。反応が不可逆的であると仮定して、ガスとhemeの濃度変化を(6)および(7)の速度式で表した。

$$\frac{dC_{heme}}{dt} = -k_{on} \cdot C_{Gas} \cdot C_{heme} \quad (6)$$

$$\frac{dC_{Gas}}{dt} = \frac{dC_{heme}}{dt} \quad (7)$$

ステップ時間 Δt 、セル間の距離 Δx における heme およびガスの濃度変化量 (ΔC_{heme} , ΔC_{Gas}) は式(6)と(7)を差分系にした式(8)と(9)により計算した。

$$\Delta C_{heme}(t_i, x_j) = -k_{on} \cdot C_{Gas}(t_i, x_j) \cdot C_{heme}(t_i, x_j) \cdot \Delta t \quad (8)$$

Table 2. Parameters for computer simulations for each HbV with different $[Hb]_{in}$

Parameters	Values			
Diameter (nm)	50, 100, 200, 250, 500, 1000, 2000, 8000			
[heme] in solution (μM)	1.5			
Initial [NO] in solution (μM)	1.9			
Initial [CO] in solution (μM)	67.5			
$k_{on}^{(NO)}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	2.7×10^7			
$k_{on}^{(CO)}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	3.4×10^5			
	1 g/dl [Hb] _{in}	10 g/dl [Hb] _{in}	20 g/dl [Hb] _{in}	35 g/dl [Hb] _{in}
[heme] _{in} (μM)	620	6200	12400	21700
D_{Hb} in HbV ($\mu m^2 s^{-1}$)	77	53	29	7.4
D_{NO} in HbV ($\mu m^2 s^{-1}$) ^a	2080	1590	1160	706
D_{CO} in HbV ($\mu m^2 s^{-1}$) ^a	2150	1640	1200	731

^a D_{NO} in saline is $2210 \mu m^2 s^{-1}$ and D_{CO} in saline is $2290 \mu m^2 s^{-1}$. D_{Hb} in HbV is much smaller than D_{NO} and D_{CO} . For that reason, we did not use D_{Hb} in computer simulations. Consequently, we did not consider the so-called "facilitated gas diffusion" attributable to the diffusion and dissociation of HbNO or HbCO because of the low D_{Hb} and the significantly large equilibrium constants of HbNO and HbCO in comparison with that of HbO₂.

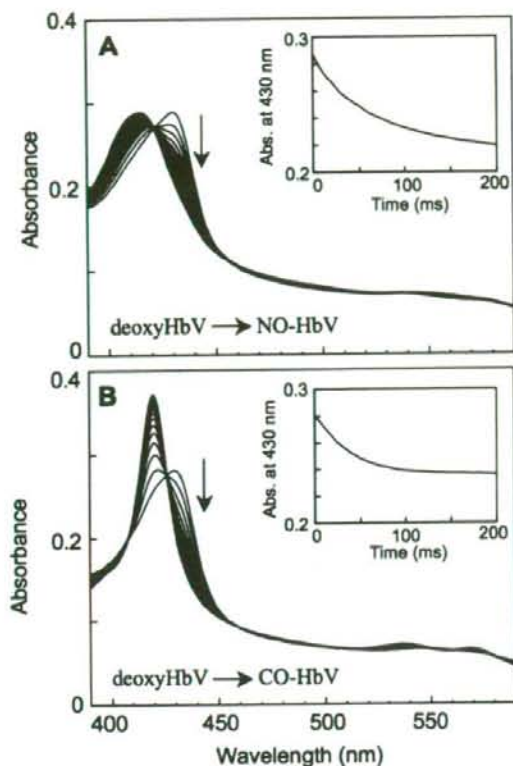


Fig 2. Representative profiles of the reactions of NO or CO with deoxygenated HbV ($[\text{Hb}]_{\text{in}} = 35 \text{ g/dl}$) using stopped-flow spectrophotometry. (A) A NO bubbled PBS ($[\text{NO}] = 3.8 \mu\text{M}$) and HbV in PBS ($[\text{heme}] = 3.0 \mu\text{M}$) were mixed rapidly using a stopped-flow spectrophotometer; the absorption spectra were collected every millisecond over 0.2 s after mixing. In this figure, the spectroscopic curves of every 10 ms are selected. The figure shows clearly that the spectrum of deoxyHbV is mostly converted to NO-HbV in 0.2 s. (Inset) The time course of the measured absorbance at 430 nm. (B) A CO-bubbled PBS ($[\text{CO}] = 135 \mu\text{M}$) and HbV in PBS ($[\text{heme}] = 3.0 \mu\text{M}$) were mixed rapidly using a stopped-flow spectrophotometer; the absorption spectra were collected every millisecond over 0.2 s after mixing. In this figure, the spectroscopic curves of every 10 ms were selected. This figure clearly shows that the spectrum of deoxyHbV is mostly converted to CO-HbV in 0.2 s. (Inset) The time course of the measured absorbance at 430 nm. The optical path length was 1 cm. All the experiments were performed at 25 °C.

$$\Delta C'_{\text{Gas}}(t_i, x_j) = -k_{\text{on}} \cdot C_{\text{Gas}}(t_i, x_j) \cdot C_{\text{heme}}(t_i, x_j) \cdot \Delta t \quad (9)$$

ストップフロー法では2液が混合された瞬間から反応が始まり、ガスが時間経過と共にHbV内部へ拡散する。したがって、HbV内の初期のガス濃度はゼロである。一方、HbV内の初期の未結合heme濃度は、内包Hb濃度に応じて620-21,700 μM となり、ガスとの結合反応によって徐々に減少していくこととなる。

シミュレーションのために必要な値はTable 2にまとめた。Hb分子の拡散係数は濃度依存性があり、Hb濃度の増大 (1→35 g/dl) によって減少する ($77 \rightarrow 7.4 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$)。一方、ガスの拡散係数はHbよりも2桁も大きい。Hb溶液内での O_2 の拡散係数 (D_{O_2}) もHb濃度の増大とともに減少する。NOとCOの拡散係数 ($D_{\text{NO}}, D_{\text{CO}}$) は D_{O_2} と式(10)を用いて算出した。

$$D_x = D_{\text{O}_2} \cdot \left(\frac{32}{MW_x} \right)^{1/2} \quad (10)$$

ここで、 MW_x 、ガス分子xの分子量である。

ガス結合反応を加えた一次元拡散シミュレーションは、式(5, 8, 9)を基にして、有限差分法を用いて次のように実施した。

- ① 時刻 t_i における C_{Gas} 、 C_{heme} は、前のステップ時間 t_{i-1} の結果を用いて計算した。
 - ② ΔC_{heme} 、 $\Delta C'_{\text{Gas}}$ は式(8, 9)を用いて計算した。
 - ③ ガス分子の拡散は濃度勾配に依存するので、式(9)で算出した $\Delta C'_{\text{Gas}}$ と式(5)で算出した ΔC_{Gas} を加えて、次のステップ時間の C_{Gas} を計算した。
 - ④ hemeの拡散係数はゼロと仮定しているので、式(8)のみで ΔC_{heme} を計算した。
- ステップ時間間隔 Δt を0.01 μs に設定して 10^7 ステップを計算し、反応開始後100 msまでをシミュレーションした。

反応の進行に伴い、バルク溶液のガス濃度は減少する。これを反映した式(11)を用いた。

$$C_2(\text{Gas}) = \frac{C_0(\text{Gas}) - C_1(\text{GasTotal}) \cdot \left(\frac{C_0(\text{heme})}{C_1(\text{heme})} \right)}{\left(1 - \frac{C_0(\text{heme})}{C_1(\text{heme})} \right)} \quad (11)$$

ここで、 $C_0(\text{Gas})$ は、初期のガス濃度； $C_2(\text{Gas})$ は、境界条件（バルク溶液）のガス濃度； $C_1(\text{GasTotal})$ は、結合ガスと未結合ガスの総和； $C_0(\text{heme})$ は、溶液全体のheme濃度； $C_1(\text{heme})$ は、HbV中のheme濃度を示す。

全体のheme中の未結合hemeの割合 (R) は、式(12)で示される。これは反応開始後100 msまでの反応の進行度、および反応初期 (5 ms) の傾きから見かけ

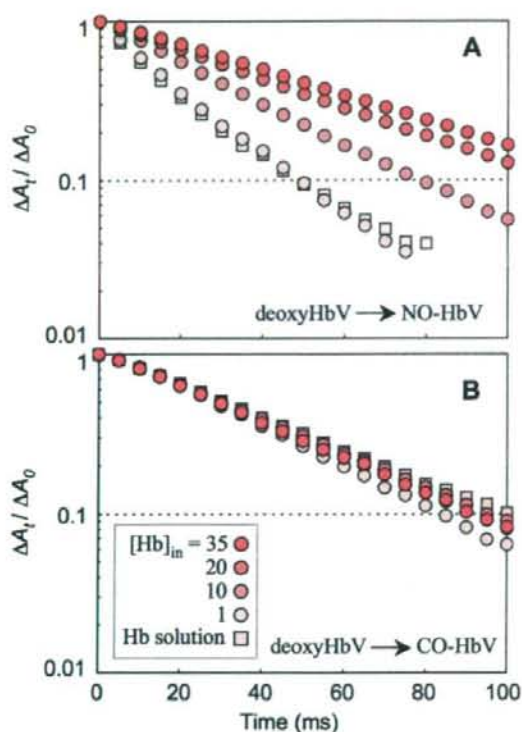


Fig. 3. Time courses of NO-binding and CO-binding by deoxygenated HbV with various $[\text{Hb}]_{\text{in}}$. A NO bubbled PBS (3.8 μM) (A) or a CO bubbled PBS (135 μM) (B) and HbVs in PBS ($[\text{heme}] = 3.0 \mu\text{M}$) were mixed rapidly using a stopped flow spectrophotometer. $[\text{Hb}]_{\text{in}}$ varies from 1 to 35 g/dL ($[\text{heme}] = 620\text{--}21700 \mu\text{M}$), thus the number of particles differs at the constant $[\text{heme}]$ (3.0 μM) in each solution. The level of reaction was plotted on a semi-logarithmic graph as a ratio of absorption at 430 nm (ΔA_t) at time t , to the initial absorption (ΔA_0) at time 0. The results of the cell-free Hb solutions are also plotted, which are almost identical with those of HbV at $[\text{Hb}]_{\text{in}} = 1 \text{ g/dl}$. The graph shows that NO-binding rate is retarded with increasing $[\text{Hb}]_{\text{in}}$ in (A). However, such change was not apparent in the case of CO-binding in (B). All the experiments were performed at 25 $^\circ\text{C}$.

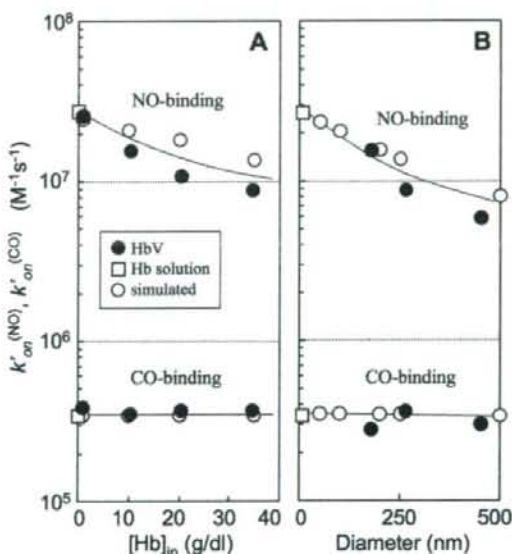


Fig. 4. Apparent binding rate constants of NO ($k'_{\text{on}}(\text{NO})$) and CO ($k'_{\text{on}}(\text{CO})$) of experimental results and computer simulations. (A) Plotted against $[\text{Hb}]_{\text{in}}$ of HbV, (B) plotted against particle diameter. (A) The apparent binding rate constants (experimental) were calculated from the slopes in Fig. 3. Values of the exact $k_{\text{on}}(\text{NO})$ and $k_{\text{on}}(\text{CO})$ of the elementary reactions of cell-free Hb solution are also plotted on the vertical axis. Those of computer simulations (diameter 250 nm) are plotted as open circles. (B) The apparent binding rate constants were calculated similarly and plotted against the particle diameter. Values of the exact $k_{\text{on}}(\text{NO})$ and $k_{\text{on}}(\text{CO})$ of cell-free Hb solution (diameter, 7 nm) were also plotted. Those of computer simulations (diameter, 50, 100, 200, 250, and 500 nm) at $[\text{Hb}]_{\text{in}} = 35 \text{ g/dL}$ are plotted as open circles. Both graphs show that computer simulations re-create well the tendencies of the experimental results; $k'_{\text{on}}(\text{NO})$ decreases considerably with increasing $[\text{Hb}]_{\text{in}}$ and diameter, and $k'_{\text{on}}(\text{CO})$ does not show such changes.

の結合反応速度を求めるときに使用した。

$$R = \frac{\sum_j V_j \cdot C_{heme}(t_i, x_j)}{\sum_j V_j \cdot C_{heme}(t_0, x_j)} \quad (12)$$

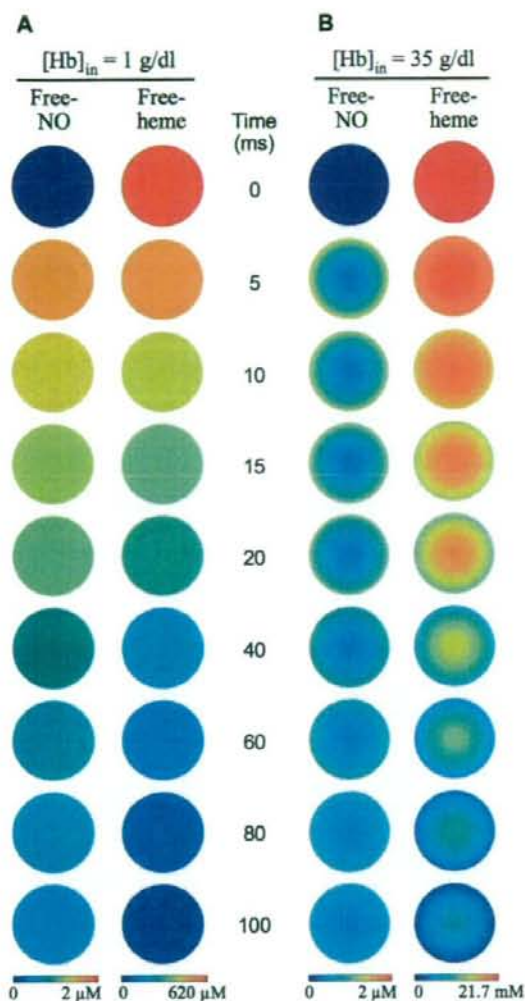


Fig. 5. Schematic two-dimensional representation of the simulated time courses of distributions of unbound free-NO and unbound free-heme in one HbV (250 nm). **(A)** At $[Hb]_{in} = 1$ g/dl, both free NO and unbound hemes are distributed homogeneously at 5 ms, indicating that NO diffuses rapidly into HbV: the reaction proceeds homogeneously. **(B)** At $[Hb]_{in} = 35$ g/dl, both free NO and unbound hemes are distributed heterogeneously at any time. The concentration changes gradually from the surface to the core, indicating formation of the intracellular diffusion barrier. Particle diameter is fixed at 250 nm. It is easily speculated from the results that such gradients will be enhanced in larger particles.

C. 実験結果

1. HbVのNO、CO結合特性

HbVはHbや赤血球と比較して光散乱効果が大きく、Q帯の吸収ピークが判別しづらいため、Soret帯の吸収ピークの変化を解析することとした。HbVの完全な脱酸素化はdeoxyHbのSoret帯 λ_{max} (430 nm)から確認した。deoxyHbV分散液をNO溶液と高速混合すると、430 nmの吸収ピークの減少にともない、nitrosylHb由来の418 nmの吸収ピークの増大が観測された (**Fig. 2A**)。COと高速混合すると、carbonyl Hb由来の419 nmの吸収ピークの増大が観測された (**Fig. 2B**)。両者の430 nmにおける吸光度の時間変化は単一指数曲線を示し、小胞体内でのnitrosyl Hbおよびcarbonyl Hbの形成が明らかであった。

2. 内包Hb濃度と小胞体のNO、CO結合特性

Fig. 3には時刻における吸光度 (430 nm) と時刻0における吸光度の比の時間変化を示した。NO結合速度が内包Hb濃度の増大とともに減少することが示された。一方、CO結合速度は内包Hb濃度の増大に対して変化を示さなかった。直線の傾きから、各HbVの $k'_{on}^{(NO)}$ 、 $k'_{on}^{(CO)}$ を算出し、内包Hb濃度との相関関係を検討した (**Fig. 4A**)。この図から $k'_{on}^{(NO)}$ が内包Hb濃度に依存することが明らかであり、内包Hb濃度の増大 (1 → 35 g/dl) に伴い、 $k'_{on}^{(NO)}$ が減少した ($2.6 \times 10^7 \rightarrow 0.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)。内包Hb濃度1 g/dlのHbVの $k'_{on}^{(NO)}$ は、Hbの希薄溶液の $k'_{on}^{(NO)}$ ($2.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) と同等であった。

一方、CO結合においては内包Hb濃度の変化 (1 → 35 g/dl) に対して、 $k'_{on}^{(CO)}$ は変化せず ($3.1 \times 10^5 \rightarrow 3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)、全てのHbVの $k'_{on}^{(CO)}$ はHbの希薄溶液の値とほぼ同じであった。

3. Hb小胞体の粒径とNO、CO結合特性

小胞体の粒径がNO、CO結合特性に与える影響を検討した。内包Hb濃度を一定 (35 g/dl) として、粒径の異なるHbVを調製し、粒径と $k'_{on}^{(NO)}$ 、 $k'_{on}^{(CO)}$ の相関を検討した (Fig. 4B)。NO結合においては、平均粒径の増大 (178 nm→452 nm) に伴い、 $k'_{on}^{(NO)}$ が減少した ($1.5 \times 10^7 \rightarrow 6.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)。一方、CO結合においては、大きな変化は示さなかった。

4. Hb小胞体のNO、CO結合特性の予測

内包Hb濃度の異なるHbV ($[\text{Hb}]_{in} = 1 - 35 \text{ g/dl}$) および粒径の異なるHbV (50, 100, 200, 250, 500 nm) に関して、NO、CO結合反応のシミュレーションを実施した結果をFig. 4に重ねて示した。

まず内包Hb濃度との相関であるが、NO結合速度が内包Hb濃度と粒径に依存していることが明らかであった。実験値の逸脱もあったが、内包Hb濃度の増大に伴い $k'_{on}^{(NO)}$ が減少する傾向は同じであった。一方、CO結合速度に関しては変化を示さず、実験結果とも良く一致した (Fig. 4A)。

次に粒径との相関であるが、 $k'_{on}^{(NO)}$ の粒径依存性と、 $k'_{on}^{(CO)}$ の非依存性に関しては実験結果と良く一致した (Fig. 4B)。粒径増大に伴い、NO結合速度は遅く、一方CO結合速度は変化しなかった。

内包Hb濃度1-35 g/dlのHbV単粒子について、未結合NOと未結合hemeの濃度変化の一次元解析を2次元解析に変換した (Fig. 5)。内包Hb濃度が1 g/dlの場合、未結合NOと未結合hemeは反応開始後5 msで既に粒子内に均一に分布していた。これはHbV内でのNOの拡散が非常に速いことを示している。一方、内包Hb濃度が35 g/dlの場合は、不均一に分布していた。粒子表面から中心にかけて、NOとhemeの濃度勾配が経時的に変化し、反応開始から100 ms経過しても、依然として分布は不均一であった。

HbV内のNO拡散係数 D_{NO} が結合反応速度に与える影響を明らかにするため、 D_{NO} のHb濃度依存性を無視した系 ($D_{NO}: 2210 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ で一定) を構築した。

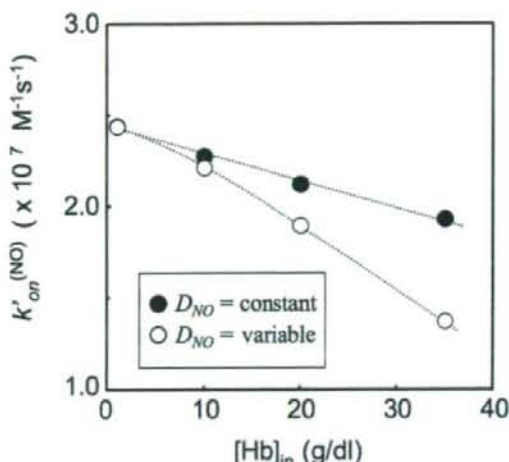


Fig. 6. Influence of D_{NO} on the retardation of NO-binding to HbV. Computer simulations of NO-binding to HbV were performed under the assumption that the diffusion constant of NO (D_{NO}) is independent of $[\text{Hb}]_{in}$ (closed circles). D_{NO} was fixed to the value in the bulk solution ($2210 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) to all HbV with different $[\text{Hb}]_{in}$. The HbV with a higher $[\text{Hb}]_{in}$ showed a slower rate of binding. However, the slope becomes gentle in comparison with the results of variable D_{NO} at each $[\text{Hb}]_{in}$ (open circles). This indicates the contribution of the reduced D_{NO} in a highly viscous Hb solution to the retardation of NO-binding. Particle diameter is fixed at 250 nm.

Fig. 6に示すように、 D_{NO} が変化する系と比較して、 D_{NO} が一定の系では、 $k'_{on}^{(NO)}$ の変化幅が小さかった。この結果から、高濃度Hb溶液における D_{NO} の減少がNO結合速度の遅延に大きく寄与していることが明らかとなった。

5. 大粒径Hb小胞体のNO、CO結合反応の予測

上述のシミュレーションは粒径500 nmまでのHbVを対象としていたが、さらに大きな粒径 (1000, 2000, 8000 nm) のHbVに関してもシミュレーションを実施した。内包Hb濃度が1および35 g/dlのHbVに関して、粒径が $k'_{on}^{(NO)}$ 、 $k'_{on}^{(CO)}$ に与える影響を検討した (Fig. 7)。Hbの希薄溶液とHbVの実験値も一緒にプロットした。これらはシミュレーションの値と良く一致した。内包Hb濃度が35 g/dlの場合、 $k'_{on}^{(NO)}$ 、 $k'_{on}^{(CO)}$ は粒径の増大に伴い、著しく減少した。

興味深いことに、NO、CO結合の遅延が始まる粒径の“閾値”があり、 $k'_{on}^{(NO)}$ においては100 nm、 $k'_{on}^{(CO)}$ においては1000 nmを境に急激に値が減少した。HbVの $k'_{on}^{(CO)}$ はほぼ一定値を示したものの、粒径が1000 nm以上になればNO結合の遅延と同じ機序で、CO結合の遅延が起きることが明らかとなった。内包Hb濃度が1 g/dlの場合、NO、CO結合反応速度定数の変化は小さかった。しかしながら、NO結合に関しては1000 nm以上、CO結合に関しては2000 nm付近以上で反応の遅延が起きることが明らかとなった。内包Hb濃度が35 g/dl、粒径が8000 nmのHbVの $k'_{on}^{(NO)}$ が $5.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $k'_{on}^{(CO)}$ が $7.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と見積もれた。8000 nmの粒子に35 g/dlのHbを内包させると、Hbの希薄溶液と比較して、NO結合は2桁の減少、CO結合は1桁の減少が起きることが予測された。

D. 考察

HbのNO結合速度は、高濃度Hb溶液を小胞体に内包させると顕著に遅延した。一方、CO結合は500 nm

より小さい小胞体に内包した場合は遅延を示さなかった。1 g/dlのHb溶液を内包した小胞体のNO、CO結合速度がHbの希薄溶液とほぼ同じであったことから、脂質二分子膜はガス拡散の障壁にはならない。コンピュータシミュレーションの結果から、HbVの場合は、粒子内のガス拡散が、結合速度を遅延させる主要な因子であり、粒子外のガス拡散は無視できるほどに小さいことが推測された。粒子内のガス拡散を遅延させる要因として、

- 1) hemeの非常に大きなNO結合速度
- 2) 高濃度の内包HbによるNOの捕捉
- 3) 高粘度Hb溶液によるNOの拡散障壁
- 4) 粒径の増大に伴うNOのHbV内拡散距離の延長

が考えられる (Fig. 8)。

1996年に我々は、Hb溶液のカプセル化がNO結合を遅延させることを初めて報告した(Sakai et al., *Polymer Adv Technol* 1996;7:639-644)。さらに、赤血

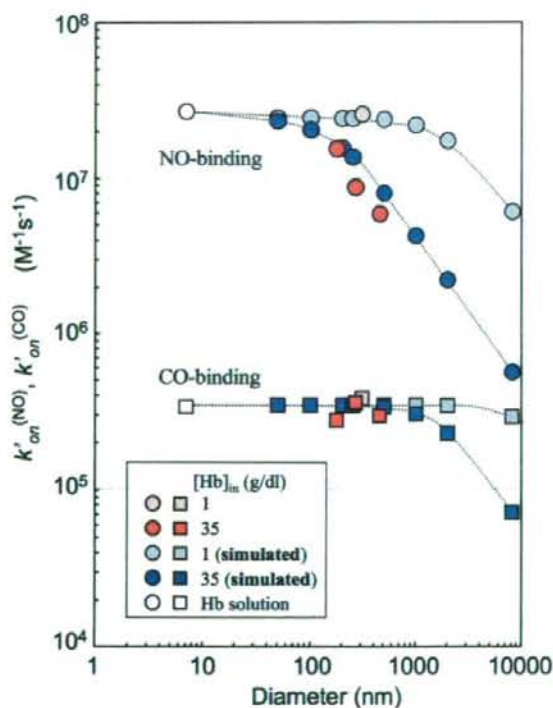


Fig. 7. Computer simulations of NO-binding and CO-binding by particles with different particle diameter. At $[\text{Hb}]_{in} = 35 \text{ g/dl}$, the apparent CO-binding rate constant, $k'_{on}^{(CO)}$, is almost identical up to 100 nm diameter; then it reduced considerably, concomitant with increasing the diameter (blue squares in the lower level). On the other hand, $k'_{on}^{(NO)}$ decreases slightly up to 10 nm diameter; it then decreases steeply with enlarging particle diameter (blue circles in the upper level). In the case of $[\text{Hb}]_{in} = 1 \text{ g/dl}$, both NO-binding (light blue circles) and CO-binding (light blue squares) showed less changes in the binding rate constants. However, the retardation becomes obvious when the particle diameter is larger than ca. 1000 nm for NO-binding, and even for CO-binding when the diameter is larger than ca. 2000 nm. Experimental values for the Hb solution (white circle and square) and HbV (pink or red colored squares and circles) are close to the simulated values. The apparent binding rate constants, $k'_{on}^{(NO)}$ and $k'_{on}^{(CO)}$, of a spherical particle with diameter of 8000 nm and $[\text{Hb}]_{in} = 35 \text{ g/dl}$ are estimated to be reduced to 5.6×10^5 and $7.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively. The reported $k'_{on}^{(NO)}$ values of a series of chemically modified HBOCs (diameter, 6–28 nm), about $3.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, were identical to that of an unmodified Hb solution (38), that coincided well with our simulation.

球においても同様にNO結合速度が遅延されることを1998年、Liu, Lancasterらが報告した(JBC 1998;273:18709-19713)。米国海軍研究所のRudolphらはLiposome-encapsulated Hb (LEH)のNO結合が遅延されることをストップフロー法を用いて証明しようと試みたが、カプセル化の影響は観測できなかった。彼らの調製した小胞体の内包Hb濃度が低かったこと(14 g/dl)が原因と考えられる。その後約10年間、様々な議論が提唱されてきたが、未だ解明には至っていない。赤血球は、複雑かつ壊れ易い構造であるので、ストップフロー法では溶血が必ず起こる。一方のNOも不安定な分子であるため、正確な解析が難しい。これが議論を長引かせた理由であると思われる。ストップフロー法以外では、競争反応試験(裸のHb溶液とHctの大きな赤血球分散液の比較で実施される)があり、これはより生理条件に近い測定法と思われる。しかし、静的条件下で赤血球が不均一分布している状態でNO結合速度が正確に測定できるのか疑問である。細胞骨格層や内包Hb濃度を減らした再構成赤血球も調製されているが、溶血を完全に抑制できるのが疑問であるし、Hbのアロステリック因子である電解質濃度が維持されているのかも不明瞭である。

そこで本研究では、より詳細な解析を実施するため、HbVを赤血球の人工モデルとして利用することを考えた。HbVは各種物理化学的特徴の調節(内包Hb濃度の35 g/dlまでの調節、粒径の調節、 P_{50} の調節)が容易であるし、溶血も起こさないの、より系統的な解析が可能となる。

本研究ではNO結合反応の全体を観測するためにあえて低いNO濃度(1.9 μM)を選択した。従来報告によれば、赤血球のNO結合速度のストップフロー解析は、高濃度のNO条件で実施しているため、結合速度が速すぎて反応の殆どがデッドタイム(1-2 ms)中に進行してしまう点が問題であった。しかし、本研究の低濃度のNO条件では、heme濃度と比較してNO濃度が大過剰とならず、擬一次

反応則が適応できない。そこで、反応の初期段階の結果から $k'_{on}(\text{NO})$ を導出することでこの問題を解決した。しかし、Stamlerらの報告によれば、このような希薄条件ではhemeと低濃度NOとの間に酸化還元電荷移動が生起する可能性がある。また、シミュレーションにおいては、HbVの粒径分布と内包Hb濃度が問題となる。内包Hb濃度は内包前の仕込みのHb濃度であり、調製後の内包Hb濃度は測定していない。これらがシミュレーションと実験値のずれの原因であると考えられる。しかし、本研究の結果から、HbVのNO、CO結合反応の実験値の傾向をシミュレーションで再現できたことは注目すべきである。

本研究のシミュレーションは粒子外の拡散障壁: 1) 非攪拌層の形成; 2) 脂質二分子膜のバリア性、を考慮していないが、HbVのNO結合速度の遅延は細胞内拡散障壁のみで十分説明できた。この結果は、赤血球においても細胞外拡散律速がごくわずかである可能性を示唆している。これはVaughnらの結果を後押しするものである。

1) 先ず非攪拌層について、HbV(250 nm)は赤血球(8 μm)と比較して非常に小さい粒子であるので、Stokes-Einsteinの式に従い、粒子の拡散は速いはずである。従って、粒子表面近傍のバルク溶液はHbVの高速運動によって攪拌されているはずである。このため、HbVの非攪拌層の厚さは赤血球(1-3 μm)よりも非常に小さいと予想される。

2) 次に脂質二分子膜のバリア性について、 $[\text{Hb}]_{in} = 1 \text{ g/dl}$ のHbVとHbの $k'_{on}(\text{NO})$ がほぼ等しかったことから、脂質二分子膜の拡散障壁は無視できるほど小さいと考えられる(しかし脂質二分子膜の拡散障壁を直接測定はしてない)。一方、Hanらは赤血球の細胞膜骨格がNO結合の障壁となることを牛の赤血球ゴーストを用いた実験から考察しているが、これは、NOとの結合速度が速いHbが細胞膜骨格に密に吸着していたためではないかと考えられる。寧ろ我々は、赤血球膜近傍に存在する濃厚HbがNO拡散障壁の主要因になっているのではないかと考

える。Liuらは「赤血球内部へと拡散したNOは内水相のHb溶液によって瞬時に捕捉されるので、赤血球内のNOの濃度はゼロに近い値が維持される」と述べている。しかし、彼らはこれをNO細胞内拡散障壁として注目してはいなかった。

HbのCO結合速度定数 ($k_{on}^{(CO)}$) は、NO、O₂結合速度定数よりも非常に小さい。CO結合の律速段階はheme鉄との内部結合生成である。実際、電子論的解釈に基づく、鉄原子と結合を完了するのに要する時間の1/100の間に既にCOはグロビン鎖内に入っている。従って、全体の二分子結合速度定数は小さい。本研究では、Hbをカプセル化してもCO結合速度が殆ど遅延しないことが明らかとなった。NO結合の場合は、その結合速度の速さ故に、HbV内の表層でNOが瞬時にHbに捕捉され、これがHbV中心へのNO拡散を遅らせる一因になっていると考えられる。しかし、CO結合の場合は結合速度が遅いのでCO拡散を遅延させる要因は高粘度HbによるCOの拡散係数の減少のみであり、500 nm以下のHbVでは結合反応自体が律速段階となるためカプセル化による遅延が起こらない。しかしながら、顕著に大きな粒径になると、CO結合においても遅延がでてくることがシミュレーションの結果から予測できた。CoinとOlsonは、赤血球のみかけのO₂、CO、ethyl isocyanate結合反応速度定数 k'_{on} と、Hbの素反応速度定数 k_{on} の比較を実施した。それぞれの k_{on} は、 3×10^6 、 2×10^5 、 $2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ である。Hbの k_{on} が小さいほど、赤血球の k'_{on} との差が小さく、特に遅いethyl isocyanate結合反応では、Hbと赤血球の違いは殆ど無かった。この結果は、我々がNOとCOの結合反応の比較から得た配位子結合の原則「素反応が速い系では、赤血球内の拡散障壁を増大させ、裸のHbと比較して反応が遅くなる」を支持するものである。

酸素 (O₂) の存在する血液循環においては、NOは主に酸素の結合した人工酸素運搬体および赤血球との反応によって酸化される。Heroldらによれば、NOとHbO₂の素反応の結合速度定数は、 8.9×10^7

$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり、deoxyHbとNOの素反応速度定数 $2.4 - 2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ よりも速い。従って、HbO₂のNO結合反応は、deoxyHbの反応よりも赤血球内の拡散障壁が大きくなると予測される。これは、AzarovやHuangらの報告を支持するが、彼らは機序として「細胞膜の拡散障壁」を提案しており、本研究で提案する機序とは根本的に異なる。

本研究で用いたシミュレーションは、内包Hb濃度、粒径、およびその他のパラメーターを変化させたHbVの配位子結合反応の予測に有効な手段であると考えられる。本方法を用いれば、赤血球の

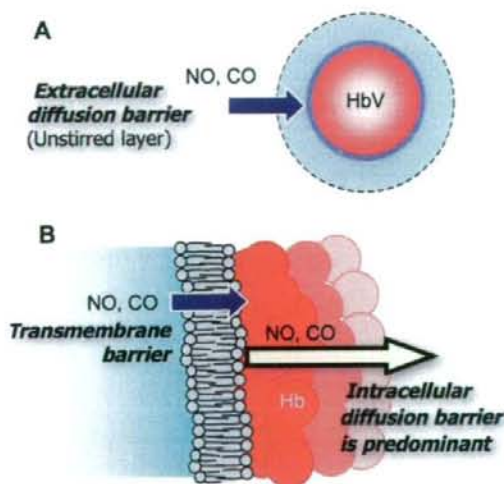


Fig. 7. Proposed mechanism of retardation of gas binding by encapsulated Hbs. (A) It has been suggested that an unstirred layer near the outer surface of a cell would become an extracellular diffusion barrier to retard ligand bindings. However, our experimental results and computer simulations suggest that this is not a major process for retardation of ligand bindings in the case of HbV. (B) The phospholipid bilayer membrane cannot have any barrier function to gas diffusion because the apparent binding rate constants of both NO and CO at $[\text{Hb}]_{in} = 1 \text{ g/dl}$ were close to those of an acellular Hb solution, as shown in Fig. 4. We propose that the determinant factor of retardation should be the intracellular diffusion barrier in the case of HbV, which was induced by (i) intrinsically larger binding rate constant of NO to a heme in an Hb molecule, (ii) numerous hemes as sites of gas entrapment at a higher $[\text{Hb}]_{in}$, (iii) a slowed gas diffusion in the intracellular viscous Hb solution, and (iv) a longer gas diffusion distance in a larger capsule.

長径と同じ8 μm の直径をもつ粒子の大凡のNO、CO結合特性をシミュレートできる。内包Hb濃度が35 g/dlで、粒径8 μm の粒子の $k'_{on}(\text{NO})$ 、 $k'_{on}(\text{CO})$ はそれぞれ、 5.6×10^5 、 $7.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。これは、既報の赤血球のみかけのNO、CO結合反応速度($k'_{on}(\text{NO})$, $1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k'_{on}(\text{CO})$, $6.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k'_{on}(\text{CO})$, $6.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; 溶血5%未満)と近い値を示した。一方で、他の報告例($k'_{on}(\text{NO})$, $5.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $k'_{on}(\text{CO})$, $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)と比較するとシミュレーションの $k'_{on}(\text{NO})$ の方が速かった。この値は上述の $k'_{on}(\text{CO})$ よりも小さいという矛盾があり、おそらく細胞内拡散障壁以外のメカニズムも寄与していたと考えられる。既報の実験系では、高Hct条件で実施しているようで、赤血球の拡散が遅く、細胞外拡散障壁である非攪拌層などが寄与したのではないかと考えられる。しかし、たとえ非攪拌層の寄与があったとしても、赤血球内拡散障壁だけで、 $k'_{on}(\text{NO})$ がHb溶液と比較して2桁も減少しているので、遅延の主要因は赤血球内の拡散障壁と考えるべきである。シミュレーションの結果と赤血球の実験値が異なる理由としては他に、赤血球の両凹円板形による影響や、赤血球とは異なる P_{50} (HbV: 13-16 Torr, 赤血球: 28 Torr) が結合定数に影響した可能性もある。

配位子結合の遅延と粒径の相関について、興味深いことに粒径の閾値があることが示された(Fig. 4.9)。CO結合に関する粒径の閾値は、NO結合の場合よりも大きかった。COの結合速度はNOよりも遅いので、細胞内の拡散障壁が引き起こされる粒径がより大きくなったものと考えられる。閾値よりも小さい粒子に関しては、配位子結合の素反応が律速段階であり、閾値よりも大きい粒子では、ガスの拡散が律速段階となる。ここで注目すべきは、内包Hb濃度が1 g/dlのHbVにおいても粒径の閾値がみられ(NO結合、1000 nm; CO結合、2000 nm)、遅延が予測されたということである。

Hbの内包によるNO結合の遅延だけでは、静脈投与のHbV (粒径250 nm) が血管収縮を生起しない

現象を十分に説明することはできない。HbVの $k'_{on}(\text{NO})$ は、赤血球よりも桁大きいからである。通常、赤血球は微小血管の中心側を流れ、管壁近傍に形成される血漿層(cell-free layer)がNO拡散の障壁となるのとは対照的に、人工酸素運搬体は血漿層に均一分散し血管壁近傍を流れるので、よりNOを捕捉し易い状態にある。Rohlfら、各種修飾Hb (分子径: 6–28 nm) のNO結合反応速度定数 $k'_{on}(\text{NO})$ をレーザーフラッシュホトリシス法で測定したが、全てHbの k_{on} ($3.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) と殆ど変わらなかった。この結果はFig. 7のシミュレーションの結果(粒径50 nm未満の k'_{on} は殆ど同じ)とも一致する。 $k'_{on}(\text{NO})$ が同じの各種修飾Hbによる50%血液交換を実施したところ、血管収縮を生起するものと生起しないものがあったことから、彼らは $k'_{on}(\text{NO})$ と血管収縮に相関が無いと結論付けている。また、他のメカニズムとして分子識別や酸素親和性との相関も提案されている。しかし我々は、血管内皮細胞層を透過できるかできないかといった、もう一つの粒径の閾値の存在を提案している。血管内平滑筋近傍にまで到達し、内皮細胞が産生するNOを捕捉し血管弛緩機能を低下させるか否かを決める粒径であり、これが血管収縮の有無を決定する因子の一つと考えられる。投与した人工酸素運搬体によって生起する血管収縮(血圧亢進)を抑制する「鍵」は、Olsonらが提唱する「NO結合反応の遅延(NO親和性の減少)」と、「粒径の増大」の両方と考える。我々は、さらに、人工酸素運搬体の血管(円筒管)内での流動特性の違いがNO、CO結合反応を遅延する一因になっているのではないかも考え、更に研究を進めているところである。

D. 結論

本研究では、ストップドフロー法とコンピュータシミュレーションから、HbVおよび赤血球のNO、COの反応性の特徴について明らかにする事ができた。具体的には、次の通り。

1) HbVのNO結合速度には、粒子内の拡散障壁が大

きく寄与しており、脂質二分子膜の寄与は無いことが明らかとなった。

2) HbVのCO結合速度は素反応が律速段階であることが明らかとなったが、粒径が500 nm以上となると細胞内拡散障壁による結合反応の遅延が生じることが示唆された。

3) HbVに関して明らかとなった配位子結合反応のメカニズムは、赤血球の配位子結合反応のメカニズムにも適応できると推測された。

(謝辞) 本研究の推進にあたり、武岡 真司 教授、院生の 佐藤 敦 君(早大理工学術院)の協力を得た。また、シミュレーションについては、増田薫 氏(コベルコ科研)の協力を得た。

2.5. 現行のHb小胞体のNO, CO反応性の検討

A. 緒言

赤血球構造の生理的意義の一つとして、内因性のガス状情報伝達物質(NO, CO)の反応性を調節することが挙げられる。病態としての溶血の症状や、Hbを用いる人工酸素運搬体(HBOCs)の投与の後に、血管内皮由来のNOが捕捉されることにより、血管収縮、血圧亢進、末梢循環不全、血管障害などが生起することが明らかになっている。他方、微量の一酸化炭素(CO)も特に肝微小循環系において血管弛緩因子として機能し、非細胞型のHb溶液によってこれが捕捉され、類洞血管が収縮することが報告されている。血漿中に溶解するHb分子に関連するこれら副作用は、生体内NO, COの反応制御の観点から赤血球構造が極めて重要であることを示唆している。赤血球のNO結合速度がHb溶液に比較して著しく遅くなる理由として、(i) 赤血球近傍に

形成される非攪拌層が拡散障壁になる、(ii) 膜蛋白を多く含有する細胞膜にNOバリア性がある、(iii) 赤血球内の高濃度Hb溶液が粘度が高いため、NOの拡散障壁になる、などが提案されていた。

Hb小胞体は、Hbを脂質膜で包むことで、赤血球と同様にしてあり、血漿中にHbを溶解させない。これにより血管活性を抑制する事が可能となっているが、Hbの封入によってNOとの反応性が低下している事も一つの要因と考えられる。我々はストップフロー-ラピッドスキャン分光法から得られたデータをコンピュータシミュレーションを用いて解析し、NO結合を遅延させる最大の要因は、粒子内部に形成されるNO拡散障壁であることを明らかにした。この結果は、次の事項を考えれば当然の事と言える。(i) HbへのNO結合速度定数が極めて大きい、(ii) 粒子内のHb濃度: $[Hb]_m$ が高いほど、NOの捕捉される部位は増える、(iii) 粒子内 $[Hb]_m$ が高いほど粘性が高くなり、NOの拡散が遅くなる、(iv) 脂質膜自体は、ガス拡散の障壁にはならない。

他方、細胞膜の疎水性領域は、水相に比較してガスの溶解度が高いことが予想される。NO, O₂の両方が疎水性領域に多く存在すれば、両者の反応によるNOの消費と、NO₂産生の促進が懸念される((Liu et al., PNAS 1998;95:2175-9)。Hb小胞体は赤血球と同様の構造をしており、更に粒子径が小さいため、脂質膜の重量は相対的に多く、疎水性領域も多い。従って、NOの消費が速いことが懸念される。

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

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

B. 方法

1. Hb小胞体(HbV), Hb溶液, 空小胞体(EV), 赤血球の調製

Hb小胞体は従来法に従って調製した。Hb溶液は日本赤十字社から提供を受けた期限切れ赤血球から精製した。Hbは一酸化炭素化(HbCO)して安定化させ、限外濾過膜により38 g/dLまで濃縮した。これにアロステリック因子としてPLP (Sigma社製)を、PLP/Hb tetramer = 2.5 モル比になるように添加した(赤血球では2,3-DPGが存在するが、不安定な化合物であるため、我々は従来よりPLPを使用している。イノシトールヘキサリン酸塩(IHP)も用いられる場合があるものの、IHPはHbに対する結合力が強く、酸素結合解離曲線が本来のS字曲線から歪んだ形(Langmuir型)となりヒル係数も1近くにまで低下する欠点がある)。PLPを添加したHb溶液に脂質粉末を分散させ、Hbを内包させる。脂質成分としては、1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC), cholesterol, 1,5-*O*-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (日本精化)および1,2-distearoyl-*sn*-glycerol-3-phosphatidyl-ethanolamine-*N*-PEG₅₀₀₀ (DSPE-PEG; 日油)が、モル比で 5/5/1/0.033で混合されている。粒子径はエクストルージョン法により制御した。内包されたHbCOは、酸素気流下に可視光照射をしてHbO₂に変換した。粒子径は、光散乱法により測定した(Submicron Particle Size Analyzer, model N4 PLUS; Beckman-Coulter, Inc.)。Hbを内包しない空の小胞体(empty vesicle, EV)は、生理食塩水に上述の混合脂質粉末を分散させ、同様に調製した。脂質濃度6.8 g/dL、粒子径約250 nmは、Hb小胞体とほぼ同等である。

精製Hb溶液をリン酸緩衝生理食塩水に溶解させたものを調製し、PLPをPLP/Hb = 0, 2.5モル比で溶解させた。また比較として、重合ウシHb溶液(poly_BHb) (Oxyglobin; Biopure社製)を用いた。この溶液は、重合されていないサブユニット四量体_BHbが37.2%も含有し、非常に広い分子量分布を有する(Buehler et al., Anal Chem 2005;77:2175-9)。酸素結合

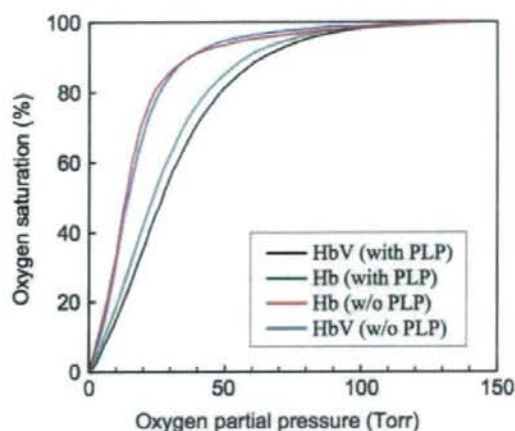


Fig. 1. Oxygen dissociation curves of Hb solutions and HbV with or without PLP measured with Hemox-Analyzer at 37°C. The P₅₀ values and Hill numbers are listed in Table 1. The data of HbV (w/o PLP) is cited from our previous study (Sakai et al., JBC 2008;283:1508-17).

解離曲線は、Hemox-Analyzer (TCS Medical Science)を用い37°Cにて測定し、P₅₀値およびヒル係数を算出した(Fig. 1)。

IACUCプロトコルに従い、マウス(C57BL/129, ♀)から血液を採取した。赤血球を遠心分離し(800g, 30 min)、40 mM-HEPES 緩衝液(pH = 7.4, 5 mM glucose, Sigma, 浸透圧285 mOsm にNaClで調節)に再分散させる操作を二回繰り返す、最終的に濃度を2x10⁶ cells/mL ([Hb] = 0.93 μM, [heme] = 3.72 μM)とした。

2. ストップフロー-ラピッドスキャン分光法

脱酸素化条件でのHbVおよびHb溶液のNO-, CO-結合の経時変化は、ストップフロー-ラピッドスキャン分光法により測定した(RSP-1000; ユニソク社)。気密性のあるリザーバー(A, B)に導入した二種類の溶液に 0.3-0.6 MPaの圧力をかけて急速に混合する。混合に要するDead timeは 1.5 ms以下、全ての測定は 25 °Cにて行った。PBS溶液(3 ml)を両リザーバーに導入し、セムタムラバーキャップで封入し、窒素バブルを30分以上することによって完全に脱酸素条件とした。HbVあるいはHbのストック溶液(約30 μl, [heme] = 300 μM)をリザーバーA

にゴム栓を経由して入れheme濃度を 3 μM とし、泡立ちと変性を抑えるため窒素バブルをフローに換えた。完全に脱酸素化されたか否かの判断のため、予備的にストップフロー測定を行い(波長範囲: 385 - 593 nm)、Soret帯の最大吸収波長(λ_{max})が deoxyHb由来の430 nmになっていることを確認した。一般的に脱酸素化のために亜ニチオン酸ナトリウムが有効で多用されているが、過剰量の添加はHbやヘムを修飾する可能性が指摘されているので、本実験では使用しなかった。リザーバーBでは、NO混合ガス(NO, 0.2029%; N₂, 99.7971%, 高千穂商事) 或はCO混合ガスをバブルし(CO, 14.14%; N₂, 85.86%)、一方リザーバーAでは窒素フローを継続した。

約10分間バブルしてから測定を開始した。測定間隔は 1 ms、測定時間は210 msとした。測定は 3 回行い、430 nmにおける吸収の変化をプロットした。NOおよびCOの見かけの結合速度定数($k'_{\text{on}}(\text{NO})$, $k'_{\text{on}}(\text{CO})$)は、式(1)により得た。但し、Hbは均一分散し、不可逆二次反応であり、またガスが大量にある場合には擬一次反応が成立するものと仮定し

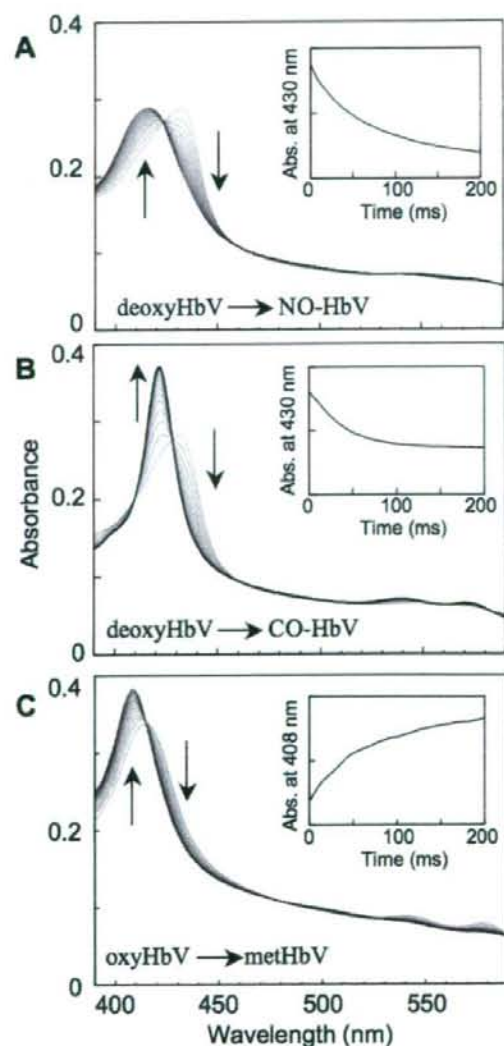
た。

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

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

酸素を結合したHbVおよび各種Hb溶液のNOとの反応についても同様に行った。但し、大気に曝

Fig. 2. Representative profiles of the reactions of NO or CO HbV using stopped-flow spectrophotometry. (A) A NO-bubbled PBS ([NO] = 3.8 μM) and deoxygenated HbV in PBS ([heme] = 3.0 μM) were mixed rapidly; the absorption spectra were collected every millisecond for 0.2 s after mixing. In this figure, the spectroscopic curves of every 10 ms are selected. The figure shows clearly that the spectrum of deoxyHbV is mostly converted to NO-HbV during 0.2 s. (inset) The time course of the measured absorbance at 430 nm. (B) A CO-bubbled PBS ([CO] = 135 μM) and deoxygenated HbV in PBS ([heme] = 3.0 μM) were mixed rapidly using a stopped-flow spectrophotometer. This figure clearly shows that the spectrum of deoxyHbV is mostly converted to CO-HbV in 0.2 s. (inset) The time course of the measured absorbance at 430 nm. (C) A NO-bubbled PBS ([NO] = 3.8 μM) and oxygenated HbV in PBS ([heme] = 3.0 μM) were mixed. The spectrum of oxygenated HbV is mostly converted to metHbV during 0.2 s. (inset) The time course of the measured absorbance at 408 nm. The optical path length was 1 cm. In these experimental conditions, the CO-binding in (C) seems faster than the NO reactions (A & B), due to the higher concentration of CO (135 μM) than that of NO (3.8 μM). However, the calculated reaction rate constant of the CO binding is much smaller than those of NO reactions as shown in Table 1.



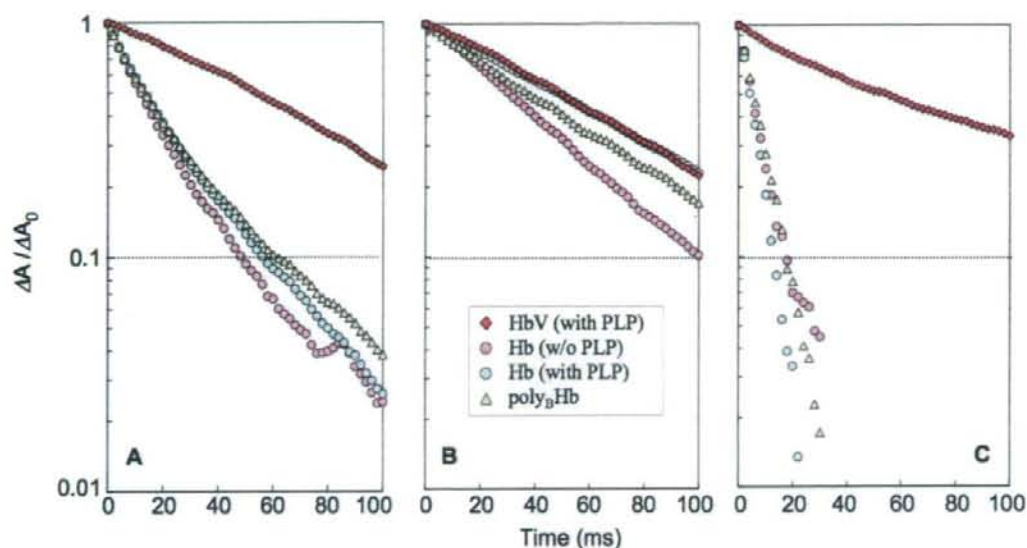


Fig. 3. Time courses of NO and CO reactions by Hb V, human Hb solutions, and PolyB Hb. The level of reaction was plotted on a semi-logarithmic graph as a ratio of absorption at 419 or 430 nm (DA_t) at time t , to the initial absorption (DA_0) at time 0. (A) A NO-bubbled PBS ([NO] = 3.8 μ M) and deoxygenated-Hb-containing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

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

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

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

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

したPBS溶液をリザーバーAに導入し、Hbに酸素が結合している状態とした。反応追跡は波長は、metHb由来の408 nmとした。

3. NO電極法による脂質二分子膜におけるNO消費の計測

好気条件下、水溶液中におけるNO消失速度を、NO電極により測定した(amino-700 probe + inNO-T sensor, Innovative Instruments, Inc.)。HbV, EV, 或はマウス赤血球を含有するPBS溶液 3 mLをキュベットに入れ攪拌子で攪拌した。NOセンサーをキュベットに挿入し、定常に達したところで、NOのスト

ック溶液(100 μ L)を注入し、NO濃度を約 2 μ Mとした。電極の表示するNO濃度は急激に上昇し、その後、溶解している酸素あるいはHbとの反応により低下する。測定に用いた検体の濃度は次の通り: HbV ([heme] = 4 μ M, [Hb] = 65 mg/L, [Lipid] = 36 mg/L), EV ([lipid] = 36 mg/L), マウス赤血球 ([heme] = 3.72 μ M)。データ解析は Synergy KaleidaGraph 3.6およびStatView 5を用いた。

C. 結果

1. 嫌気条件下におけるNO, COの結合反応

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

計測を3回行い、時間 t における430 nmの吸光度 (ΔA_t)の初期吸光度(ΔA_0)に対する比を時間に対してプロットした (Figs. 3a and 3b)。Hb溶液の測定結果も同様にプロットした。このグラフから、HbVのNO, CO結合速度は明らかにPLPを添加していないHb溶液に比較して遅くなっていた。しかし、PLPを添加したHb溶液は、CO結合速度に関してはHbVとほぼ同等であった。NO結合速度に関しては、PLPの有無に関係なくHb溶液はHbVよりも著しく速かった。また、Poly_BHbのNO結合速度は、ヒトHb溶液と同様に極めて速いものであった。見かけの結合速度定数 $k'_{\text{on}}(\text{NO})$ および $k'_{\text{on}}(\text{CO})$ をTable 1に示した。

2. 酸素が結合したHbVまたはHb溶液とNOとの反応

酸素が結合したHbVは、Soret帯の最大吸収波長

が415 nmになる(Fig. 2c)。NOを混合すると、この吸収が急激に低下し、代わってmetHb由来の405 nmのピークが増大した。測定を3回行い、平均化し、時間 t における408 nmの吸光度($\Delta A_t = A_t - A_{t=\infty}$)の初期吸光度($\Delta A_0 = A_{t=0} - A_{t=\infty}$)に対する比を計算し、時間に対してプロットした(Fig. 3c)。このグラフから明らかに、酸素を結合した条件でも、HbVの反応速度は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_BHb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 $k'_{\text{ox}}(\text{NO})$ 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O₂が反応してNO₂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、 $3.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 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 $3.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 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消失曲線が観察された。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、ストップドフロー-ラビッドスキヤン分光法に頼らざるを得ない。

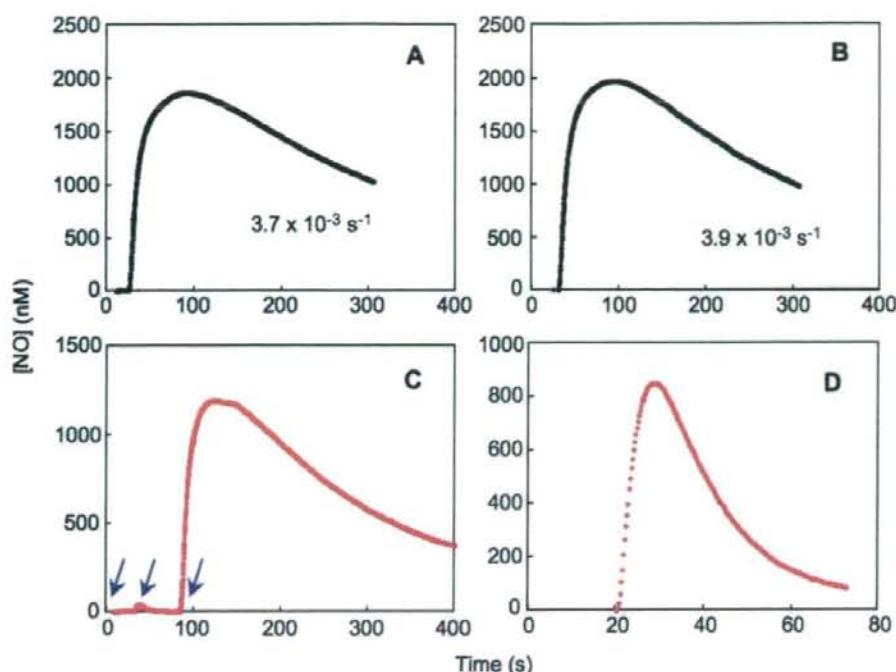


Fig. 4. NO decay in an aerobic condition in PBS solution after injection of NO yielding a concentration of 2000 nM NO. (A) PBS solution, as a standard curve of NO decay by the dissolved O_2 . The decay rate is calculated as $3.7 \times 10^{-3} s^{-1}$. (B) PBS solution containing EV ([lipids] = 36 mg/mL). The decay rate is calculated as $3.9 \times 10^{-3} s^{-1}$. (C) PBS solution containing HbV ([heme] = 4 μM , [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 μM). 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).

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) 好氣的条件において、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粒子内の外表側の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 (0.61×10^7 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、 α 鎖と β 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_BHbは、四量体_BHb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生起することが知られている。今回の実験では、

Poly_BHb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、 α 鎖と β 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_BHbについて、文献によれば、未修飾_BHbの $k_{on}^{(CO)}$ は $1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 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_BHbのCO結合は速くなったことになる($2.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)。

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 ($7.4 - 8.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)。またこの速度は、deoxyHbとNOの反応速度定数($k'_{on}^{(NO)} = 2.4 - 2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)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)。HbO₂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 $0.88 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 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(HbO₂ → 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O₂とゆっくり反応しNO₂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ップ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O₂-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、HbO₂とNOの反応の方が、deoxyHbとNOの反応よりも速い。そし

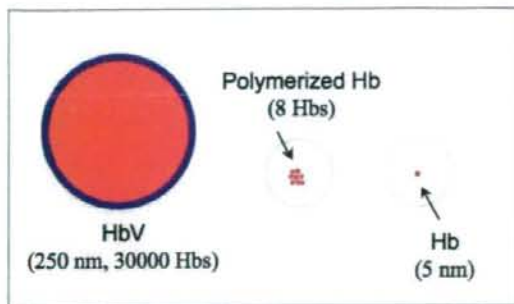


Figure 5. Comparison of particle size between HbV (250 nm), Hb (5 nm) and polymerized Hb. According to the molecular weight distribution of Poly₈Hb, the molecular weight (Mw) of the largest polymerized Hb is 502 kDa, which corresponds to 8 Hbs. One HbV contains about 30,000 Hbs. It is obvious that HbV is much larger than the largest fraction of Poly₈Hb. For the retardation of NO binding, both Hb concentration in the particle and the particle size are important.

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、HbO₂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、赤血球と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。Rohlfis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。Poly₈Hb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、P₅₀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。

26. 人工酸素運搬体のGMP製剤製造工程確立、製造・規格試験法設定

治験薬GMP設備が稼働し、その設備を使用した治験薬製造方法の確立を実施した。さらには、暫定規格値の設定も行った。

A. 研究目的

人工酸素運搬体（Hb小胞体）の研究は厚生労働科学研究(平成9-14年度研究代表者: 土田英俊、平成15-17年度研究代表者: 小林紘一)として推進され、酸素運搬の役割を代替するために必要な物性と機能の改良を行い、動物試験によりその有効性と安全性の基本的事項が証明されている。臨床応用にはGMP製剤が必要であることから、平成13年度にオキシジェニクス社を設立し、産官学の共同体制のもと、厚労科研の成果として得た基本製造法を早稲田大学よりオキシジェニクス社に技術移転を行った。平成18年度には5Lまでスケールアップを行い、物性規格値の見直し、製造工程の最終決定、GMP製造設備の設計と設置を実施した。平成18年度は、GMP下での治験薬製造方法の確立および規格試験方法の設定を行うことを目的とした。

B. 研究方法

原料のヒト赤血球は日本赤十字社から期限切れの未使用「人赤血球濃厚液」の供与を受けた。これを原料に、株式会社ローマン工業にGMP基準下でのヒトヘモグロビンの精製を委託した。また脂質類は日本精化株式会社と日本油脂株式会社から供給を受けた。オキシジェニクス社の京都研究所にて、治験薬GMPに則ったHb小胞体(OXY-0301)の製造方法の確立、規格試験法の設定を行った。

C. 結果及び考察

1ロット当たり12Lスケールの治験薬製造設備の建設を完了し、機器の据付時バリデーション等を実施した。さらに、本製造設備を用いて、OXY-0301の大量製造方法の検討を行った。同時に、製造ロットの実測値を元に、暫定規格値の設定を行った。

D. 結論