

G. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）

該当なし

分担研究報告書

人工赤血球の臨床応用を目指した至適投与法の策定とGMP製造技術の確立

分担課題：ヘモグロビン小胞体の製造技術の改良ならびに

電解質濃度測定への影響に関する検討

研究分担者 高折 益彦 東宝塚さとう病院 名誉院長

研究要旨

- (1) 共同研究者との協議にもとづき、ヘモグロビン(Hb)を酸素運搬体とする人工酸素運搬体(HbV)の作製段階で、いかに無菌化を確実にしめるかを最重要課題とすることを決定した。
- (2) また将来的にHbVの食細胞作用を軽減させるとともに、血管内壁での剪断応力(shear stress)を得るためにHbVに変形能を与え、かつ微小血管内で軸流を得るためHbVサイズを現在の10倍程度にする基礎的知識の獲得に努めた。(3) 前年に引き続きHbV混入血液での血清電解質濃度の限界、またその障害原因について検討した。

A. 研究目的

- 1) 過去におけるHbVの無菌化はフィルターによる濾過滅菌法によっていたが、これには幾つかの危険性をともなう。そのため最適な方法を求める。
- 2) ミクロンサイズのリポソーム作製の検討をおこなう。
- 3) HbV混入血液での血清電解質(Na^+ , K^+ , Cl^-)測定方法の検討を行ない、HbV混合にともなう干渉機序の解明を行なう。

B. 方法

- 1) HbV製造を担当するニプロ株式会社研究部と、血液製剤滅菌技術に多くのノウハウを有するベネシス株式会社研究部職員との合同会議により、新技術の開発を行う。
- 2) 巨大リポソーム作製技術を有する三重大学工学部の湊元幹太講師との会合を持ち、2~3ミクロ

ンサイズのHbVの作成技術を協議する。

- 3) HbV原液の Na^+ , Cl^- イオン濃度をドライケミストリー法（ピトロス250：V法）と、従来の電極法（TBA-200FR NEO：T法）とで測定するとともに、医療機関の倫理委員会の承認が得られた研究協力者から得た血清にHbV濃度が40.00 - 1.25%になるように混合、その中の Na^+ , K^+ , Cl^- 濃度の測定値を比較する。またヘモグロビン液を含有しないで蒸留水を包埋したりポソームに生理食塩水を添加して Na^+ , Cl^- が測定可能か検討する。

C. 実験結果

- 1) 協議の結果、HbV作製後、ガンマ線照射を行なう、あるいは薄層紫外線照射装置にてUVCを照射するなどの方法が提案された。しかしニプロ株式会社研究部は現行のHbV作製回路の完全滅菌、リポソーム作製材料のリン脂質の完全滅菌を行い、全自動化操作により作製することを先行したいとの結論に達した。そして現在はこの方法を逐次進

めている。

2) 湊元講師との数回にわたる協議の結果、技術的にはHb溶液を包埋したHbV作製が可能であるとの結論に達した。ただその実施に関しては現行の作製法、すなわち上記の滅菌法の確立がなされたからの方が好ましいとの考えから、しばし凍結することとした。

3) 現在臨床で使用されている血清電解質測定機器はあくまでヒト血清サンプルを対象としている。そのためHbVにヒトアルブミンを添加して測定することを試みた。これによってV法では測定が可能であった。むろんヒト血清にHbVが40%混合されたサンプルについても測定することができた。しかし、従来使用されてきたT法では、HbVが6%以下の混合では測定可能であったが、それ以上のHbVの共存下では測定できなかった。なおHbV浮遊液に微量の K^+ がT法にて検出された。

次にT法での測定が一定濃度のHbVの共存で障害される原因について蒸留水包埋リポソームにて検討した結果、V法、T法ともにリポソーム容積が25%以下においては同等の精度で測定可能であることが認められた。

D. 考察

1) ニプロ研究部において作製する手法は80%可能と推測されている。しかしon line系の装置の作製よりもリン脂質の費用面から今後への問題を生じかねない。しかし今後この方法での探索を継続して解決の道を求めて行く予定とした。

2) HbVサイズを大きくすることは、脂質／ヘモグロビン比を小ならしめて軽微ではあるが想定される免疫的反応をさらに抑制し、HbV単位当たりの酸素運搬量を大ならしめ、さらにHbVの変形能を獲得する上からも最上の手段と考えられた。

3) V法ではHbVそのもののみが浮遊するエマルジョン状態でも Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 濃度の測定が可能であったが、従来のT法ではHbVの混入率が一定以下にならないと測定できなかった。理由は現在も明らかになっていない。しかしヘモグロビンを含有するリポソームそのものが測定に干渉していると認められた。なお、HbV浮遊液中の微量の K^+ の存在は、今後の研究課題として残された。

E. 結論

無菌的なHbVの作製方法に関しては未だ結論が得られていない。またHbVサイズへの新手法の導入はHbVの滅菌法確立後に検討することになった。またHbVを使用した症例から得られた血液の電解質の測定は、従来のT法ではHbVの混入度に限定される。そしてその理由はHbVを構成するリン脂質によるのみでないことが判明した。しかしV法では測定可能であることが証明された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 高折益彦. 人工酸素運搬体開発の現状と将来への展望. *体液・代謝管理* 25, 29-38 (2009).
2. M. Seiji, J. Takemura, M. Takaori. Determination of electrolyte concentrations in serum containing cellular artificial oxygen carrier (HbV). *人工血液* 18 (2010) 印刷中.

(著書)

高折益彦 著, “代用血漿剤HES”. 克誠堂出版 (東京), 2010.

2. 学会発表

1. 三宅誠司、武村次郎、高折益彦 / 細胞型人工酸

素運搬体混入血液での電解質(Na, K, Cl)濃度測定に関する検討 / 第16回 日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学北里講堂 / 2009. 10. 16-17.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担研究報告書

人工赤血球の臨床応用を目指した至適投与法の策定とGMP製造技術の確立

分担課題：

1. Hb小胞体と水溶性高分子(代用血漿剤)との相互作用に関する検討
2. Hb小胞体による皮弁内虚血領域の治癒効果に関する検討

研究分担者 土田 英俊 早稲田大学 理工学研究所 顧問研究員・早大 名誉教授

研究協力者 酒井 宏水 早稲田大学 理工学研究所 准教授

Dominique Erni Inselspital Hospital, University of Berne・Professor

研究要旨

(1) Hb小胞体を大量投与する際には代用血漿剤(水溶性高分子)の併用が必要となる。Hb小胞体をアルブミンに分散させた場合には、ほぼニュートン性流体となるが、高分子量体のヒドロキシエチルスターチ(HES)やデキストラン(DEX)に分散させると、Hb小胞体は枯渇性相互作用(depletion interaction)により凝集し、非ニュートン性流体となる。その機序を明らかにするため、水溶性高分子(HES, DEX, MFG, rHSA)の濃度4 g/dLの条件のもと粘度を計測した。HESおよびDEXでは分子量が大きくなって流体力学半径(R_h)、慣性半径(R_g)が増大するにつれ、Hb小胞体の凝集の程度は増大し粘度が増大した。しかし、高分子の種類(HESとDEX)の間には大きな隔たりがあった。そこで、Crowding Index (C_i) [= 高分子鎖の排除体積×モル濃度×アボガドロ数]を R_h または R_g を使って定義し、高分子鎖の混み具合を示すパラメータとしたところ、全ての高分子において、 C_i が1に接近するに従い凝集が増大した。要するに計算上、水溶性高分子の排除体積の総和が溶液全体の体積を超える条件において、Hb小胞体は溶液から排除されるように凝集を余儀なくされる様相が明らかになった。(2) 外傷、外科的処置、血管性障害等による局所的な低酸素状態は、組織の生存や創傷治癒に影響する。そこで高酸素親和度のHb小胞体を投与し、重篤な虚血性状態にある皮膚について治癒効果の有無を検討した。背中両側に頭部方向に存在する皮弁を持つマウスモデルに対し、 $P_{50} = 9$ TorrのHb小胞体を投与した。循環血液量の20%相当のHb小胞体を、外科的処置直後と24時間後に投与した。24時間後、皮弁内の酸素分圧は、Control群23%に対し39%に増大した。6日後、皮弁組織の生存率は、33%から57%にまで増大し、治癒組織の幅は6.6 mmから12.7 mmまで増大した。また、毛細管数と血管内皮NO合成酵素の発現量の増大が認められ、Hb小胞体の投与による酸素輸送の促進のほか、血管新生の促進が寄与しているものと考えられた。

1. Hb小胞体と水溶性高分子(代用血漿剤)との相互作用に関する検討

A. 緒言

Hb小胞体はいわゆるリポソーム製剤の一つとも

言えるが、最大の違いは、溶質の濃度が極めて高く([Hb] = 10 g/dL, [脂質] = 5-6 g/dL)、投与量も数リットルに及ぶ場合が想定されることであり、血液循環にも多大な影響を与える可能性がある。従

って、Hb小胞体微粒子の分散流体としてのレオロジー特性を知っておく事は極めて重要である。

アルブミンは血漿中に最も濃度高く存在する蛋白質であり、血液と間質の膠質浸透圧を維持することにより循環血液量を調節している。輸血代替を考える上で、この循環血液量の維持は重要であるが、Hb小胞体は粒子ひとつにHb分子が約30000個封入されているので、赤血球と同様に膠質浸透圧を示さない。従って、大量投与に際しては、アルブミンや、遺伝子組換えアルブミン、ヒドロキシエチルスターチ(HES)やデキストラン(DEX)など、いわゆる代用血漿剤との併用が必要となる。これまでのHb小胞体の動物投与試験では主にアルブミンを併用してきたが、日本国内ではHESの分子量の異なるものが臨床試験の段階にあるので、先を見通して様々な代用血漿剤についても併用を検討する必要があると考えられる。Hb小胞体をアルブミンに分散させた場合にはほぼニュートン性流体を呈するが、HESやDEXなどの水溶性高分子は一般的に微粒子と相互作用して、シリカや赤血球なども含む微粒子の凝集を生起することが知られている。特に分子量が大きくなるに従ってこの現象は顕著になる。ところが、リポソームの凝集の機

序については幾つかの説が報告されているが、未だ明らかになっていない。そこで本研究では、各種分子量の水溶性高分子の水溶液を準備し、高分子鎖の広がり具合と排除体積効果を計測し、溶液の混み具合と小胞体の凝集の程度の相関を調べることを目的とした。

B. 方法

1. Hb小胞体(HbV)の調製

Hb小胞体は従来法に従って調製した。粒径 279 ± 95 nm。生理食塩水に分散し、Hb濃度を10 g/dLに調節した。

2. 水溶性高分子

本実験に用いた代用血漿剤ならびに市販の水溶性高分子をTable 1にまとめた。修正ゼラチン溶液(MFG, GelofusinTM, Mw 30 kDa, 4 wt% in saline)は、B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Germany)より提供を受けた。MFGの濃度4 wt%は、代用血漿剤の中で一番低いので、他の高分子の濃度はすべて4 wt%に統一した。遺伝子組換えアルブミン(rHSA, Mw 67 kDa, 25 wt%)は、ニプロから提供を受けた。これを生理食塩水で4wt%に希釈して用いた。粉末状の

Table 1. Molecular weights and colloid osmotic pressures (COP) of plasma substitute solutions at 4 wt%.

Plasma substitute solutions	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Mw/Mn	COP (Torr)
DEX ₄₀	42 ^a	22 ^a	1.9	29
DEX ₇₀	73 ^a	38 ^a	1.9	25
DEX ₂₀₀	184 ^a	84 ^a	2.2	18
DEX ₅₀₀	505 ^a	-	-	14
HES ₇₀	68 ^a	17 ^a	4.0	21
HES ₁₃₀	130 ^a	50 ^a	2.6	21
HES ₂₀₀	240 ^a	70 ^a	3.4	15
HES ₆₇₀	670 ^a	194 ^b	3.5	13
MFG	30 ^a	23 ^a	1.3	44
rHSA	67 ^a	67 ^a	1.0	13

DEX, dextran; HES, hydroxyethyl starch; MFG, modified fluid gelatin; rHSA, recombinant human serum albumin; ^aData provided by the manufacturer.

^bCalculated from the concentration dependence of COP (unpublished data).

DEX₄₀, DEX₇₀, DEX₂₀₀, およびDEX₅₀₀ (Mw 40 kDa, 70 kDa, 200 kDa, 500 kDa)は、Sigma-Aldrich Corp. より購入し、生理食塩水に溶かして4 wt%とした。HES₇₀ (サリンヘスTM, Mw 70 kDa, 6 wt%)は杏林製薬から購入した。HES₁₃₀ (VoluvenTM, Mw 130 kDa, 6 wt%) および 粉末状HES₂₀₀ (HES200/0.5, Mw 200 kDa) は、 Fresenius Kabi AG (Homburg v.d.H., Germany) より提供を受けた。HES₇₀とHES₁₃₀は4 wt%に希釈した。HES₂₀₀は生理食塩水に溶解して4wt%とした。HES₆₇₀ (HextendTM, Mw 670 kDa, 6 wt%)はHospira Inc. (Lake Forest, IL, USA)より購入し、生理食塩水で4 wt%に希釈して用いた。

3. Hb小胞体-水溶性高分子分散液の調製

Hb小胞体は生理食塩水に分散されているので、これを超遠心分離(20,000g, 30 min)し、上澄みを除去し、沈殿に各種水溶性高分子の水溶液(4 wt%)を添加し、ポルテックスミキサーなどを用いてHb小胞体を再分散させ、Hb濃度を10 g/dLに調節した。孔径0.45μmのフィルタを透過させて粘度測定の実験に用いた。DEX₅₀₀およびrHSAに分散させたHb小胞体については、更に20倍、高分子水溶液で希釈したのち、顕微鏡観察を行った。

4. 膠質浸透圧の測定と慣性半径の算出

膠質浸透圧の測定には、膜型浸透圧計(Wescor Model 4420, 限外分子量 10,000)を用いた。高分子水溶液を生理食塩水で希釈し、各濃度における膠質浸透圧を測定し、溶液中の溶質の化学ポテンシャルを表す熱力学方程式を用いて解析した。膠質浸透圧(Π)と水溶性高分子の濃度(C)の関係はEq. 1として表せる。

$$\Pi/C = R \cdot T/M_n + R \cdot T \cdot B \cdot C \quad \text{Eq. 1}$$

ここで、 R はガス定数、 T は絶対温度(K)、 M_n は数平均分子量、 B は第二ビリアル係数であり、溶液の理想状態の程度を表す。各高分子の M_n は、 Π/C と C の相関グラフの最小二乗法から求めた。 B 値はその傾きから求めた。 M_n と B をEq. 2に代入し、慣

性半径(R_g)を求めた。

$$R_g = \left(\frac{3[M_n]^2 B}{16 \pi N} \right)^{1/3}, \quad \text{Eq. 2}$$

ここで、 N はアボガドロ数を示す。

5. 水溶性高分子の粘度測定と流体力学的半径の算出

剪断速度一定のもと、溶液粘度をレオメータ(Physica MCR 301, Anton Paar)を用いて測定した。コーンプレートの直径は50 mm, コーンとプレートの角度1°であった。測定は25°Cにて行った。試料溶液650 μLをコーンとプレートの間にはさみ、余剰の液体を拭き取ってから測定した。流体力学的半径(R_h)は、1000 s⁻¹における粘度をもとに、次の計算式から算出した。固有粘度 $[\eta]$ は、粘度 η の濃度依存性から求めた。

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} (\eta_{sp}/C) \quad \text{Eq. 3}$$

$$\eta_{sp} = (\eta - \eta_0)/\eta_0 \quad \text{Eq. 4}$$

ここで、 η_0 は溶媒の粘度、 η_{sp} は高分子溶液の固有粘度を表す。Einsteinの粘度式(Eq 5)により、 $[\eta]$ はEq. 6のように表せる。

$$\eta = \eta_0(1 + 2.5 [\eta] C) \quad \text{Eq. 5}$$

$$[\eta] = (2.5 \cdot N \cdot V_e) / M \quad \text{Eq. 6}$$

これらの式において、 V_e は高分子の球状体積を示し、Eq. 7として表記できる。

$$V_e = (4\pi \cdot R_h^3) / 3 \quad \text{Eq. 7}$$

Eq. 6, 7より、流体力学的半径 R_h は、Eq. 8として表せる。

$$R_h = \left(\frac{3[\eta]M}{10 \pi N} \right)^{1/3} \quad \text{Eq. 8}$$

6. Hb小胞体-高分子水溶液分散系の粘度測定

剪断速度を10³から10⁴ s⁻¹に変化させて、粘度を計測した。殆どの分散液が非ニュートン性で、低剪断速度領域で凝集を生起して粘度が高くなるが高剪断速度領域でこれが解離して粘度が低下するShear-thinningを示した。本研究では、凝集の強度を表すパラメータとして、Flocculation Index (F_i)を

Eq. 9のように定義した。

$$F_i = (\eta_{10} - \eta_0) / (\eta_{1000} - \eta_0) \quad \text{Eq. 9}$$

ここで、 η_{10} および η_{1000} は、それぞれ10, 1000 s^{-1} における粘度である。一本の高分子の排除体積 V_{ex} は、 V_e の4倍になる。従って V_{ex} は、Eq. 10として表記で

きる。

$$V_{ex} = 4 \cdot V_e = 4 \cdot (4\pi R^3/3), R = R_h \text{ or } R_g \quad \text{Eq. 10}$$

高分子水溶液の混み具合を表すパラメータ(C_i)を定義する。これはEq. 11として表記できる。

$$C_i = V_{ex} \cdot C \cdot N \quad \text{Eq. 11}$$

ここで、 N はアボガドロ数、 C は高分子4wt%濃度から換算したモル濃度を示す。凝集の機序を明らかにするため、 F_i を $R_h, R_g, {}^nV_{ex}, {}^nV_{ex}, {}^n C_i$ および ${}^n C_i$ に対してプロットした。ここで、肩の記号 n および η はそれぞれ、膠質浸透圧あるいは粘度の測定から得られたパラメータであることを意味する。

7. 枯濁性相互作用力の見積

枯濁性相互作用は、AsakuraとOoswaらによってはじめて提唱され、粒子と高分子の位置的關係から相互作用力を計算している。我々の実験において、Hb小胞体(半径 $a = 140 \text{ nm}$)が、高分子コイルの水溶液に分散していると仮定した。Depletion-free attraction, E_{dep} は、粒子間距離 d が R_g の二倍よりも小さいときに、Eq. 12として表せる。

$$-E_{dep} = (\pi N_p / 12) \cdot (2R_g - d)^2 \cdot (6a + 4R_g + d) \cdot k \cdot T$$

$$\text{Eq. 12}$$

ここで、 N_p は高分子のnumber density、 k はボルツマン定数、 T は絶対温度(=298 K)を示す。粒子表面間の距離 d を1, 2, 3, 4, 5, 6と換えて計算し、Flocculation Index (F_i)と $-E_{dep}$ の相関をグラフとしてみた。

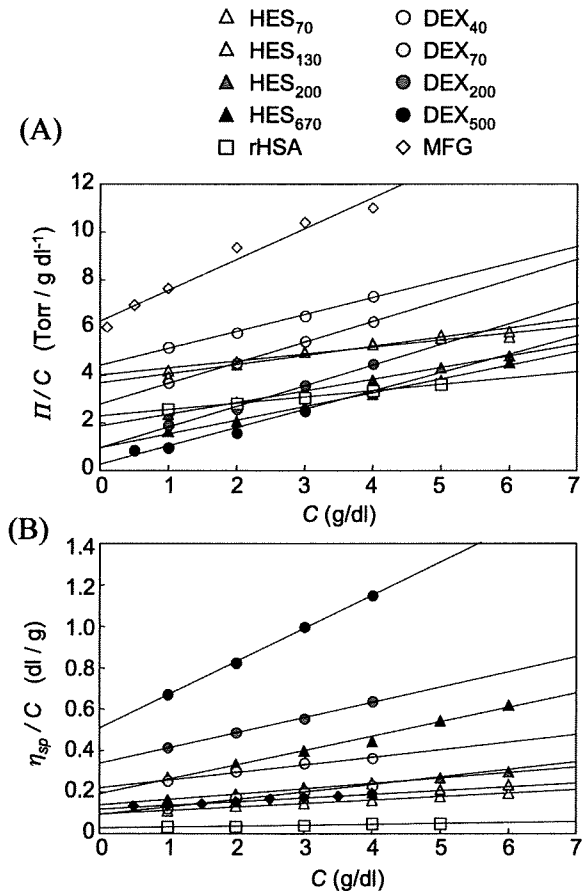


Figure 1. (A) Colloid osmotic pressure data shown as Π/C versus C , where Π is the colloid osmotic pressure (Torr) and C is the polymer concentration (g/dL). (B) Viscosity data of polymer solutions are shown as η_{sp}/C versus C , where η_{sp} is the specific viscosity (-) and C is the polymer concentration (g/cm³).

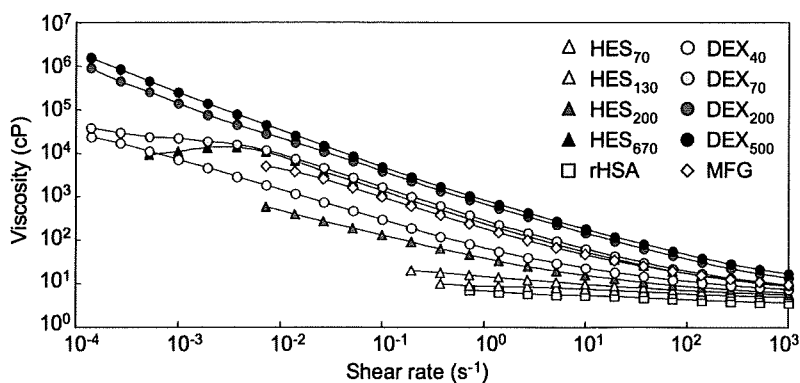


Figure 2. Viscosity of HbVs suspended in various water-soluble biopolymers. [Hb] = 10 g/dL, 25°C.

C. 結果

1. 膠質浸透圧と粘度からの R_g , R_h , V_{ex} , C_i の計算

高分子水溶液の膠質浸透圧(Π)を、濃度(C)を変化させて測定し、 C に対して Π/C をプロットした(Fig. 1A)。全ての高分子水溶液について、ほぼ直線関係がえられ、最小二乗法により直線で結び、傾きと切片からEq. 1, Eq. 2を用いて R_g を算出した (Table 2)。

高分子水溶液の濃度 C を変化させて粘度を測定し、 C に対して η_{sp}/C をプロットした(Fig. 1B)。最小二乗法により直線で結び、 $[\eta]$ とEq.8から R_h を算出した。 ${}^nV_{ex}$, ${}^nV_{ex}$, nC_i , nC_i は、 R_h , R_g を用いEq. 10, Eq. 11から算出した(Table 2)。DEX, HESともに、分子量が増

大するにつれ R_h , R_g は大きな値を示し、それに従い、 V_{ex} , C_i ともに増大した。rHSAは最小の C_i を示した。

2. 各種高分子水溶液に分散させたHb小胞体の粘度計測と F_i の算出

Figure 2にHb小胞体分散液の粘度の剪断速度依存性を示す。rHSAに分散させた場合はほぼニュートン性流体を示す。粘度が低く剪断応力の検出限界のため、HbV-rHSA系は、 $7 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 以下は測定ができなかった。他方、HbVをHES, DEX, MFGに分散させた場合には、HbVの凝集形成に由来するShear-thinningがみられ、非ニュートン性流体となった。この場合は、広い剪断速度範囲で観測が可

Table 2. Plasma substitute solutions and their physicochemical properties at 4 wt%.

Plasma substitute solutions	C (mM)	Parameters obtained by Π			Parameters obtained by η		
		R_g (nm)	${}^nV_{ex}$ (nm ³)	nC_i	R_h (nm)	${}^nV_{ex}$ (nm ³)	nC_i
DEX ₄₀	0.957	4.1	1154	0.667	3.94	1025	0.591
DEX ₇₀	0.550	5.9	3441	1.141	6.34	4270	1.416
DEX ₂₀₀	0.217	12	28952	3.784	9.97	16605	2.170
DEX ₅₀₀	0.079	28.2	375747	17.92	15.98	68372	3.261
HES ₇₀	0.588	3.2	549	0.194	4.68	1717	0.608
HES ₁₃₀	0.308	3.8	919	0.170	6.13	3859	0.715
HES ₂₀₀	0.167	6.4	4392	0.441	8.08	8838	0.887
HES ₆₇₀	0.060	10.5	19396	0.697	12.68	34159	1.228
MFG	1.333	3.9	994	0.798	3.83	941	0.756
rHSA	0.602	4.5	1527	0.553	3.08	490	0.177

Table 3. Viscosities of HbVs suspended in polymer solutions (4 wt%) and flocculation index (F_i). [Hb] = 10 g/dL.

Polymer solution for HbV suspension	Viscosity (cP)		F_i
	at 10 s^{-1}	at 1000 s^{-1}	
DEX ₄₀	23.1	7.5	3.78
DEX ₇₀	64.3	9.3	8.84
DEX ₂₀₀	146	13.3	14.22
DEX ₅₀₀	181.5	16.8	15.29
HES ₇₀	7.7	4.9	1.88
HES ₁₃₀	9.7	5.5	2.10
HES ₂₀₀	15.6	6.1	3.21
HES ₆₇₀	53.0	8.9	8.05
MFG	46.7	9.3	5.91
rHSA	5.3	3.6	1.68

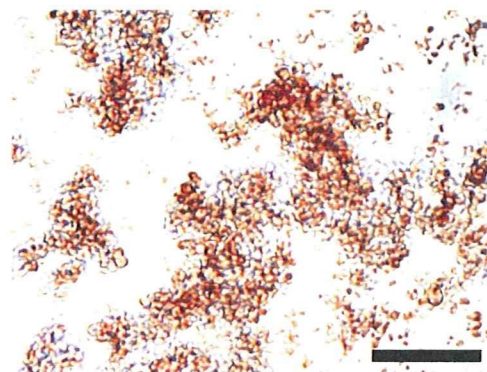


Figure 3. Microscopic view of the flocculates of HbV when suspended in DEX₅₀₀. The scale bar is 100 μm .

能となった。

この粘度測定の結果をもとに、Eq. 9に従い Flocculation Index (F_i)を算出した(Table 3)。HESおよびDEXの分子量が大きくなるにつれ、 F_i は増大した。

Fig. 3に、最も高い粘度と F_i を示したHbVをDEX₅₀₀に分散させたときの溶液の光学顕微鏡写真を示す。多数の凝集体の存在が解る。他方、rHSAに分散させた場合には、凝集体は無かった。

3. F_i と水溶性高分子の物理化学的パラメータとの

相関

Fig. 4Aに R_g および R_h に対して F_i をプロットしたグラフを示す。 R_g , R_h が増大するに従い F_i は大きくなるが、DEXとHESの間では異なった挙動を示した。

Fig. 4Bには、高分子の排除体積(${}^nV_{ex}$, ${}^{\eta}V_{ex}$)に対して F_i をプロットしたグラフを示す。DEXとHESラインの相違はFig. 4Aに比較して拡大されたように見える。

Fig. 4CにはCrowding Index; nC_i および ${}^{\eta}C_i$ に対して F_i をプロットしたグラフを示す。全てのプロットが一つのS字型のラインに乗っていることが解った。 F_i は nC_i および ${}^{\eta}C_i$ が0.6を超えるあたりから

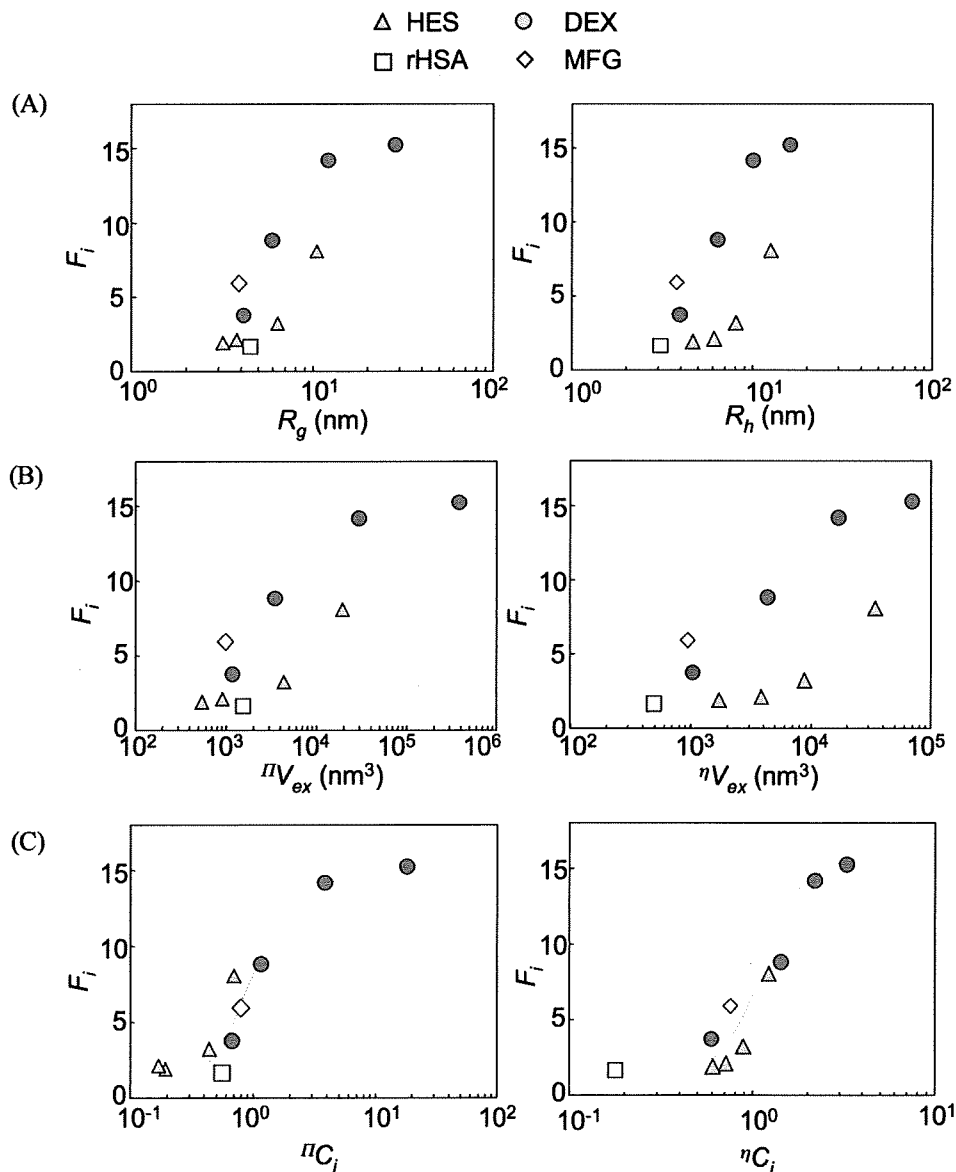


Figure 4. Flocculation index (F_i) values of HbVs suspended in water-soluble polymers are shown against (A) polymer sizes R_g and R_h , (B) excluded volumes of one polymer chain, ${}^nV_{ex}$ and ${}^{\eta}V_{ex}$, and (C) the crowding index of the polymer solution, nC_i and ${}^{\eta}C_i$.

増大し始め、1.0近傍で急激に増大する。つまり、高分子鎖の排除体積の総和が、溶液の体積と同等になるとき最も F_i が顕著に増大することになる。

4. Depletion Energyの予測

Eq. 12を用いて E_{dep} を算出した。粒子間距離 d については、参照データ無い。しかし条件として $d < 2R_g$ であり、また一番小さな $2R_g$ はHES₇₀の場合の6.4なので、 d を1から6まで変化させてみた。Fig. 5に示す通り、 F_i が高くなる高分子の場合に、あらゆる d についてより大きな $(-E_{dep})$ を示す。DEX500に分散させた場合に、最大値: 1.3×10^{-23} Jを示した。 $d=1-3$ nmとした場合、HES₆₇₀の方がMFGやDEX₄₀よりも F_i が大きいのに、 $(-E_{dep})$ は小さくなった。 $d=6$ nmとした場合、HES₂₀₀の方がMFGやDEX₄₀よりも F_i が小さいのに、 $(-E_{dep})$ は大きくなった。他方、 $d=4$ あるいは5 nmとした場合はそのような矛盾点は認められず、HbVの凝集体における粒子間距離は4乃至5 nmと見積もられた。

D. 考察

本研究において我々は、リン脂質小胞体(リポソーム)が水溶性高分子溶液に分散させたときの凝集のメカニズムについて検討し、各高分子の種類が違っていても、Crowding Index (高分子鎖の混み具合を表すパラメータ)で極めて明快に説明することができた。DEXおよびHESはともに多糖である。DEXは α -1,6結合でグルコースが結合されているが、分岐が α -1,4結合(稀に α -1,2, α -1,3)を介して存在する。一方、HESはデンプンを修飾したもので、主に α -1,4結合の直鎖状多糖であり、ヘリックス構造を形成する。デンプンは血中で容易にアミラーゼにより分解されるので、これを防ぐためにグルコースの水酸基がヒドロキシエチル基でランダム置換されている。この置換率(DS)がHESの製造メーカーによって異なる。主要な血漿蛋白であるHSAは球状蛋白で、生理的条件において負電荷を帯びている($pI = 4.8$)。MFGはゼラチンの加水分解

物を再度コハク酸で架橋したもので、負電荷を帯びている。このように、本実験で用いた水溶性高分子は構造や性質が異なるが、リポソームの凝集の度合いを表す共通のパラメータとして、高分子溶液の混み具合を表すCrowding Index (C_i)が有用であることが解った。

リポソームが水溶性高分子と相互作用をして凝集することは良く知られており、主にその希薄溶液について濁度の変化や、光散乱強度の変化から解析が行われている。希薄条件では、ある大きさの凝集体は個々別々に分散している。しかし、HbV分散液の場合は極めて濃度が高く、溶質濃度は16 g/dL, 占有体積は40%におよぶ。そのような濃厚分散液の凝集体は連続的であり、その解析に、我々はレオメータを用いた。HbVをrHSAに分散させた場合にはニュートン性を示したが、HES, DEX, MFGに分散させた場合には非ニュートン性を示し、低い剪断速度のときにHbVが凝集して高い粘度を示すShear-thinningがみられた。HESおよびDEXについて、高分子量になるほど凝集が顕著になる傾向がみられた。しかしこの凝集体は、高剪断速度では解離し、可逆性があることが解っている。

リポソームの凝集の機序については、様々な説

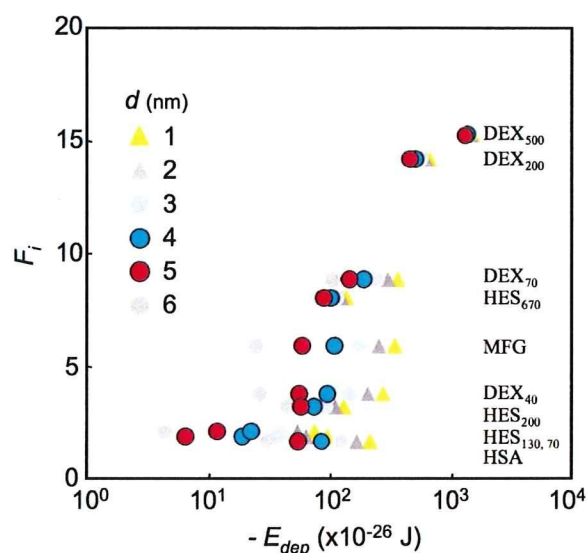


Figure 5. Flocculation index (F_i) of HbVs suspended in water-soluble polymers is shown against depletion energies ($-E_{dep}$) calculated assuming that the surface distance, d , of flocculated HbVs is 1–6.

がある。一つはDEXあるいはPEGなどの高分子鎖が粒子表面に吸着して架橋点を形成することである。確かに実験結果からも、高分子量のものほどより多くの吸着点を持って架橋を強固なものにしていると説明できる。しかし、PEG水溶液とDEX水溶液を混合すると、相分離することが知られているので、PEGで修飾したHbVにDEXが吸着することは考え難い。また、Kawakamiらは、PEG修飾していないリポソームの表面にはDEXは殆ど吸着しないことを最近報告した。従って、高分子鎖の吸着により凝集が起こるといことは考え難い。他の説として、(i)高分子鎖が水和水を沢山持つことによってリポソームが脱水和を起こして凝集するというものである。しかし、リポソーム分散液に対して半透膜を介して高分子を添加しても、凝集は生起しなかったことから、この説も否定された。最近のより適切な説としては、(ii) 枯渇性相互作用: depletion interactionがある。高分子コイルの配位エントロピー(configurational entropy)が、吸着エネルギーを上回るとき、粒子表面に枯渇層(depletion layer)が形成される。このとき、粒子表面近傍における高分子コイルの濃度は、バルク溶液における濃度よりも小さくなる。従って、粒子が接近すると、粒子間隙の溶液とバルク溶液との間に浸透圧の違いが生じ、溶媒の移動が起き、これにより枯渇性相互作用が生じる。このため、高分子コイルの濃度が低い粒子間隙の領域を最小限にするため、粒子間に引力が働くのである。このとき、粒子間距離と、高分子コイルの大きさの関係が重要となる。以前の粘弾性計測の実験結果において、HbVの凝集体の粘度と G' は、非可逆的に高分子が結合して凝集を形成した場合の値と比較して極めて小さい値であり、HbVの凝集体形成の機構が枯渇性相互作用であることを支持する。

本実験より高分子コイルの半径を二つの方法により R_g と R_h として求める事ができた。 R_h は流動状態における流体力学的半径であり、 R_g は第二ビリアル係数から求めた値である。同じ半径でも両者の

意味するところは異なり、確かに同じ高分子でも同一の値にはならなかった。しかし、高分子量になるほど R_g と R_h が大きくなる傾向は一致していた。これらのパラメータをもとに、各高分子について排除体積 ${}^1V_{ex}$ と ${}^2V_{ex}$ を算出した。Armstrongらによると、赤血球の凝集の度合いと各種高分子の R_h の間には明確な相関が得られているが、我々のHbVの結果では、水溶性高分子の種類によって F_i が異なり、高分子の半径だけでは十分に説明できない。

本研究では、高分子水溶液の混み具合を表すパラメータとしてCrowding Index (C_i)を定義した。これは、単に高分子鎖一つの排除体積だけではなく、高分子の濃度も考慮した体積である。 R_g と R_h ともに、極限に希釈されたとき、つまり高分子鎖が最も自由に広がった状態での大きさであり、それをもとに C_i を計算している。そのため、高分子量の溶液については、 $C_i=1$ を超える場合がある。このとき、高分子鎖はもはや広がった状態になりえず、高分子鎖が過度に詰め込まれた状態にあることを示す。つまり、溶液全体が高分子鎖で占有されていることを示し、このような状態では排除体積効果が増大していると考えられる。 C_i に対して F_i をプロットしたところ、種類の違う高分子についても全てS字型のカーブの上ののっており、 C_i の値が1を超えるかどうか、リポソームの凝集を示すことの指標になりうる。

Eq.12を用い、Depletion energyを予測した。HbVの粒子間距離 d を4-5 nmとしたときに、明確な E_{dep} の臨界値が得られた(Fig. 5)。この粒子間距離は、強い凝集を誘起しない高分子群(rHSA, HES₇₀, HES₁₃₀)の大きさよりも僅かに小さい。より大きな高分子は、次の順列でより強固な凝集体を形成する: HES₂₀₀ < DEX₄₀ < MFG < HES₆₇₀ < DEX₇₀ < DEX₂₀₀ < DEX₅₀₀。粒子間距離4-5 nmではもはやこれらの巨大な高分子が粒子間隙に移動することは不可能となる。

血漿蛋白質も水溶性高分子であり、これが濃度高く存在する血漿がリポソームを凝集させるかど

うか予測するため、血漿の C_i を計算してみた。主な血漿蛋白として、fibrinogen (Mw = 340 kDa, < 0.4 wt%, $R_h = 10.95$ nm), IgA (162 kDa, < 0.41 wt%, 6.5 nm), IgG (150 kDa, < 1.7 wt%, 5.29 nm), IgM (950 kDa, < 0.26 wt%, 12.65 nm), albumin (67 kDa, 4 wt%, 3.08 nm)を選択し、これらの総和として計算したところ、 C_i は0.626となり、凝集を生起しない筈である。事実、PEG修飾したHbVは血漿中では凝集しないことを確認している。

代用血漿剤は静脈内に投与されると血液で希釈され、血中濃度は0.5–1wt%以下になると考えられるので、PEG修飾したHbVおよび赤血球はそのような濃度では凝集は殆ど起こらないことになる。赤血球凝集惹起剤として微小循環の研究に多用されているDEX₅₀₀については、希釈されても C_i が1を超えている可能性があり、そのため凝集を生起していると考えられる。

本実験の課題として、今回は代用血漿剤とその関連の高分子量の高分子に限定して実験を行った点であり、カチオン性やアニオン性の合成高分子については検討をしなかった。表面荷電はPEG鎖によって遮蔽されたり、溶存する電解質の影響を受けたり、粒子間の反駁作用も変化する。従って、本実験結果は、生理的な限られた条件での結果に過ぎない可能性もある。

Hb小胞体分散液のレオロジーは、溶存する高分子によって調節ができるともいえる。静脈内投与する液体として粘度が高すぎる事は良くないと言われていたが、最近では、粘度が高い方が血管壁に及ぼす剪断応力が増大し、血管拡張を促し血流を良くするという説が有力になっている。従って、Hb小胞体と水溶性高分子の組み合わせによって、単なる輸血代替としてだけでなく新しい応用に繋がる可能性がある。

結論として、本研究で我々は高分子水溶液の混み具合を表すパラメータとしてCrowding Index (C_i)を定義し、これが1を超える場合に小胞体の凝集が顕著になる事を明らかにした。この状態のとき、

高分子鎖の排除体積は溶液全体の体積を占有することになり、小胞体が排除されるようにして凝集する。このパラメータを用いれば、様々な条件における凝集の有無についての判断が容易になる。

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)の協力を得た。記して謝意を表する。

2. Hb小胞体による皮弁内虚血領域の治癒効果に関する検討

A. 緒言

組織への酸素輸送は、血液供給量と酸素含量の積として表せる。もし外傷で血管が損傷したり、閉塞性動脈疾患によって血液循環が低下すると、重篤な虚血状態や、細胞性低酸素状態となり、辺遠部位では壊疽がみられる。また、創傷治癒の過程において虚血は、傷の慢性化や、外科処置後の治癒を遅延し、また創傷部位からの感染を助長することもありうる。最善の処置は、障害のある血管を外科的に再構築することであるが、解剖学的あるいは患者の容態によってはうまくいかない場合もあり、別の方法が求められている。可能性のある方法として、繊維芽細胞の増殖、血管新生、コラーゲン合成など創傷治癒の過程に必要な酸素を補うことである。我々は有茎皮弁モデル(ハムスター)を用いる急性期の実験において、Hb小胞体を投与することにより、皮弁内の酸素供給や微小循環が改善されること、またその効果が高酸素親和度のHb小胞体で高くなることを報告して来た。そこで、本実験では、より長期的に、皮弁の治癒過程に与える効果について明らかにすることを目的とした。本研究は、Prof. Dominique Erni (Department of Reconstructive and hand surgery, Inselspital Hospital,

University of Berne)との共同研究として推進された。

B. 方法

1. Hb小胞体(HbV)の調製

Hb小胞体は従来法に従って調製した。今回はアロステリック因子を内包せず、結果として酸素親和度 P_{50} は9 Torrとなった。生理食塩水に分散させ、Hb濃度は10 g/dLに調節した。また、小胞体の体内動態に関する知見を得るため、Sulforhodamine B溶液(10 mM, Invitrogen)を内包した小胞体を調製した。

2. 皮弁モデル

動物実験については、NIHガイドラインに従い、学内倫理委員会の承認を得て行った。48匹のDDYマウス(22-26g)を用いた。18匹は体内動態および血漿粘度の測定に用いた。残りは未処置群と、生理食塩水投与群、ならびにHb小胞体投与群に分けた。

室温28℃にて、heating padの上に麻酔にかけたマウスを臥位に置き、背中中の毛を剃り、脱毛をした。

Fig. 1に示すように、頭部方向に2枚の皮弁を作製した(13 x 15 mm)。皮弁は、皮膚、皮下筋肉薄層、および皮下組織から構成される。外側胸動脈を結紮し、皮下の網状血管を經由したランダムな側副経路によって血液が供給される。外科処置中、皮

弁は生理食塩水溶液を塗布して乾燥を防いだ。皮弁はシリコンシートを挟んで(創傷部位からの血管成長を防ぐため)、元の場所に縫合した。

3. 組織の酸素化

皮膚の酸素飽和度の測定は、非侵襲的に微小プローブを用いる方法を採用した(O₂C-system, LEA-Medizim-technik, Giessen, Germany)。1mm²範囲、深さ方向800 μmを測定した。プローブは正常組織(首の部分)および、皮弁の身体に近い部分(proximal, 5 mm)、中央部(central, 15 mm)、遠位部(distal, 25 mm)に置き、測定した。

4. 組織の生存と初期の創傷治癒

治癒された創傷部位の中央部の長さ(2枚の皮弁を縫い合わせた部分)、ならびに外側の部分の長さ(正常な皮膚に縫い合わせた部分)を測定した。またデジタル画像を取り込み、皮弁の壊死面積を計算した。

5. 組織学的観察

脾臓、肝臓、腎臓など、Hb小胞体の代謝に関わる臓器組織のほか、皮弁組織の所定位置の部位(5 mm距離)も摘出した。この部位は、炎症や壊死の

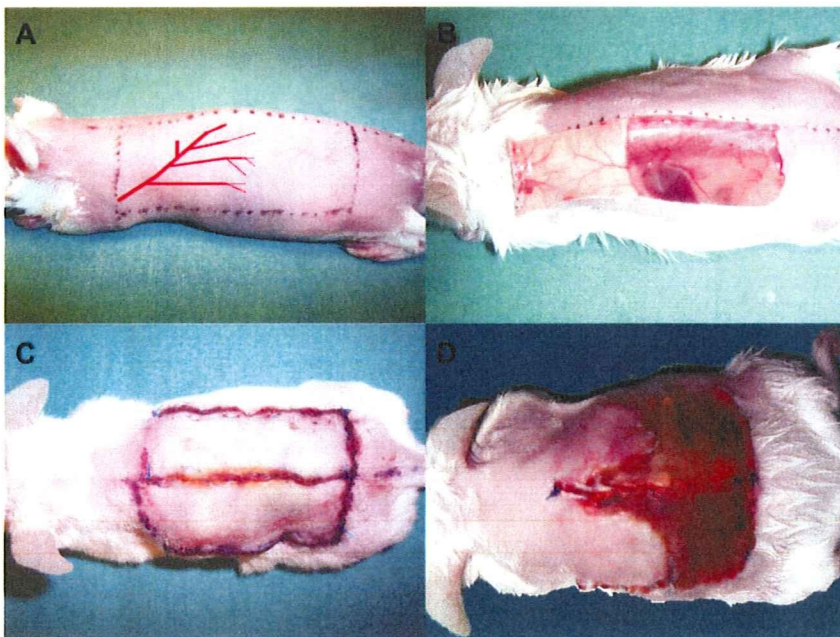


Figure 1. Experimental model. *A* and *B*: a cranially based skin flap is raised on both sides of the dorsal midline of anesthetized mice. The flap extends the vascular territory of the nourishing lateral thoracic artery and vein (marked in red in *A*). The lateral thoracic artery is ligated. *C*: the flap is sutured back into its original position after interpositioning a silicone sheet to avoid revascularization from the wound bed. *D*: 6 days postoperatively, a clear demarcation can be observed between vital and necrotic flap skin and between healed and nonhealed suture lines.

影響を受けていない健全な皮弁組織部位として選んだ。4%パラホルムアルデヒドで固定し、PBS洗浄、70%エタノールで保存し、最後にパラフィンブロックとした。5 µm厚にスライスし、スライド上で37°Cで一晩乾燥させた。H/E染色による形態学的観測のほか、ギムザ染色により白血球を観察した。また、eNOSを観察するため免疫染色を行った(一次抗体: ウサギ抗eNOS抗体, Santa Cruz; 二次抗体: 抗ウサギ EnVision, DakoCytomation En Vision; + System Labelled Polymer HRP ant-Rabbit K4003, 発色剤: Aminoethyl Carbazole Substrate Kit, Zymed)。Positive, Negative Controlを各群の組織で作製した。免疫染色は半定量的に、顕微鏡で200倍で観測し、毛細管数とeNOSに染色された毛細管数を数えた。ランダムに選んだ3箇所画像のカウント数を平均して表記した。

6. 実験室分析

採血液中のHb濃度およびmetHb率を血液ガス測定装置(ABL 625)を用いて測定した。また、硝子細管を用いてヘマトクリットを測定した。Hb小胞体は遠心分離後も血漿中に分散しているので、これをHb小胞体由来のHb濃度とmetHb率の測定に用いた。

小胞体の体内動態と血漿粘度を明らかにするため、3匹のマウスの血液を各採血ポイントでプールした。血漿粘度はHoppler-type粘度計にて37°Cで測定し、4回の測定の平均値を得た。血漿中の小胞体濃度は、蛍光リーダーを用いた(Infinite M 200,

Tecan)。この場合、血漿を96-wellディッシュに入れて測定した。予め小胞体の濃度と蛍光強度の相関から検量線を得ておき、また、小胞体の無い血漿をnegative controlとした。

7. 動物実験プロトコル

マウスをdemetomidine (500 µg/kg), clomazepam (5 mg/kg), およびFentanyl (50 µg/kg)にて麻酔にかけた。また処置後、atipamezole (1.25 mg/kg), sarmazenil (0.5 mg/kg), naloxone (0.6 mg/kg)にて拮抗させた。実験後、マウスはネンプタール過剰投与で犠牲死させた。

皮弁作製が完了した時点で直ぐに、循環血液量の20%に相当するHb小胞体分散液、あるいは生理食塩水を尾静脈から10分かけて投与した。

投与1日後、皮下の酸素飽和度の測定、また再度循環血液量の20%に相当するHb小胞体分散液、あるいは生理食塩水を尾静脈から投与した。

投与6日後、組織の生存状態と、創傷治癒の初期段階の状態を観察した。その後、心臓から血液を採取して生化学的分析を行い、また組織を摘出して組織学的検討を行った。

実験中の死亡例、創傷部位の感染、実験操作の過誤、皮弁内静脈側の血栓、縫合の失敗などを除外基準とし、この場合は実験から除外した。

体内動態および血漿粘度の測定のための投与実験についても同様に行った。採血時間は、投与後30分、24h、48h後とした。

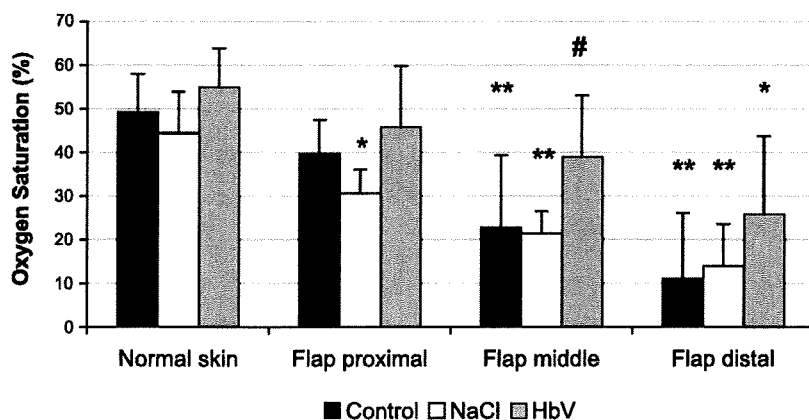


Figure 2. Oxygen saturation (SO₂) in normal skin and proximal, middle, and distal flap skin in untreated control animals and animals receiving 2 x 20% of total blood volume (TBV) of 0.9% NaCl or hemoglobin vesicle (HbV) solution. Data are expressed in mean values and SD. **P* < 0.05 and ***P* < 0.01 vs. normal skin; #*P* < 0.05 vs. control.1

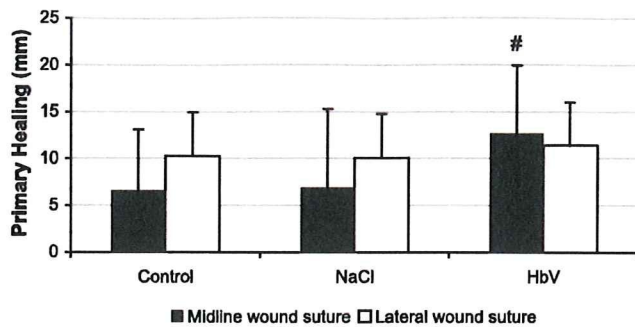


Figure 3. Length of primarily healed wounds in midline and lateral suture in untreated control animals and animals receiving 2 x 20% of TBV of 0.9% NaCl or HbV solution. Data are expressed in mean values and SD. [#] $P < 0.05$ vs. control.

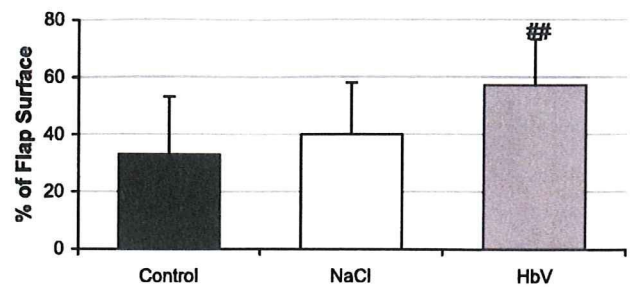


Figure 4. Flap tissue survival in untreated control animals and animals receiving 2 x 20% of TBV of 0.9% NaCl or HbV solution. Data represent percentages of total flap surface and are expressed in mean values and SD. ^{##} $P < 0.01$ vs. control.

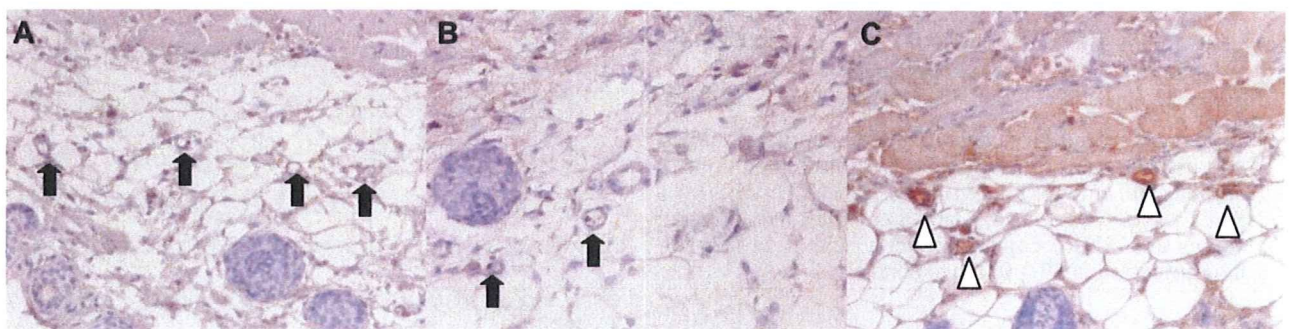


Figure 5. Immunohistochemical endothelial nitric oxide synthase (eNOS) staining of flap tissue 6 days postoperatively in untreated control animals (A) and animals receiving 2 x 20% of TBV of 0.9% NaCl (B) or HbV solutions (C). Pictures were taken at x200 magnification. Black arrows exemplarily indicate cross-sections of capillaries, whereas white arrowheads indicate capillaries with endothelial cells stained positive for eNOS.

8. 統計学的処理

統計的データ解析にはInStat version 3.0 (GraphPad)を使用した。数値は平均値±標準偏差として表記した。有意差検定には、unpaired analysis of varianceおよびBonferroni post testを用いた。 $p < 0.05$ を有意差判定とした。

C. 結果

5匹のマウスが除外基準に該当した(死亡例1, 感染例1, 技術的問題3)。その結果、コントロール群 $n=9$ 、処置群が $n=8$ となった。

外科的処置1日後、酸素飽和度が徐々に低下し、正常組織で $49 \pm 9\%$ に対し、両群において辺遠部位で $11 \pm 15\%$ まで低下した(Fig. 2)。生理食塩水投与群では同等の値に留まったが、HbVを投与することにより、皮弁の中央部位での酸素飽和度が有意に

増加した($p < 0.05$)。

6日後になると、治癒された縫合ラインとまだ治癒されていない縫合ラインとの間に明瞭な違いが見られたが、生存している組織と壊死している組織の明確な境界はなかった(Fig. 1)。コントロール群においては、近傍の 6.6 ± 6.5 mmの中央領域は治癒されていた(Fig. 3)。この長さは、HbV投与群において 12.7 ± 7.2 mmまで有意に増大した。しかし、生理食塩水投与群では変化が無かった。皮弁側方の治癒された皮膚の長さは、全群で10.1 – 11.4 mmで同等であった。皮弁組織の生存率は、コントロール群で $33 \pm 20\%$ であったが、HbV投与群では $57 \pm 16\%$ にまで増大した。しかし生理食塩水投与群ではコントロール群と同等であった(Fig. 4)。

免疫染色の結果、未処置群の皮弁近傍領域の毛細管数は 3.0 ± 0.9 本/fieldであったが、HbV投与群では 5.3 ± 0.9 本/fieldに増大した($p < 0.01$) (Fig. 5, Fig. 6)。

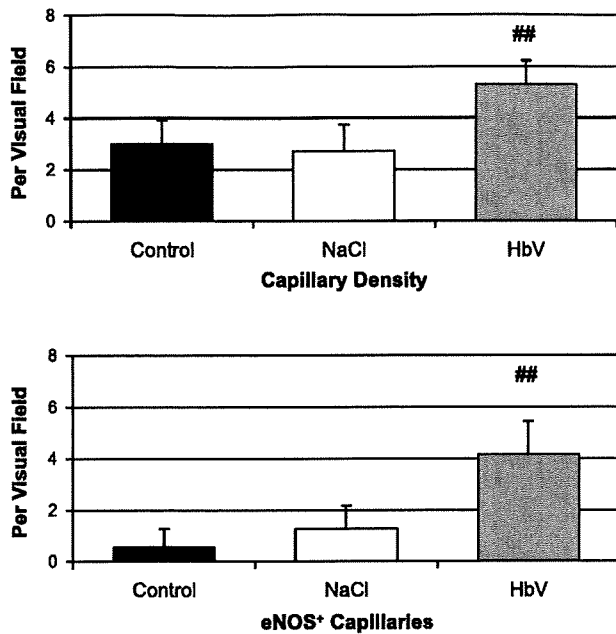


Figure 6. Capillary density and capillary eNOS expression 6 days postoperatively in untreated control animals and animals receiving 2 x 20% of TBV of 0.9% NaCl or HbV solution. Data are expressed in mean values and SD of capillaries per visual field at x200 magnification. ^{##}*P* < 0.01 vs. control.

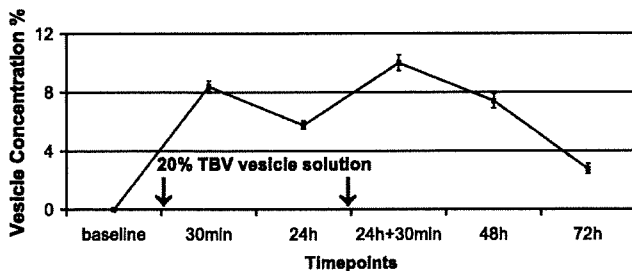


Figure 7. Vesicle pharmacokinetics. The values represent plasma concentrations of vesicles filled with a sulforhodamin B solution, measured with computerized fluorescence reading before and after receiving 2 x 20% of TBV of vesicle solution. Data are presented in percentages of the concentration present in the injected vesicle solution and are expressed in mean values and SD.

また、HbV群でeNOSの発現が増大し、eNOSの発現した毛細管数が 4.1 ± 1.3 本/field存在した。主要臓器の組織学的検討の結果、特に問題は認められなかった。

血液学的検討の結果、6日後のパラメータは同等であった。また6日後(二回目の投与の5日後)にはHbVは殆ど消失し、metHb率も同等(0.02-0.04%)であった。体内動態の実験の結果、24時間後には投

与した小胞体の68%が血中に滞留し、二回目の投与後、24時間後および48時間後にそれぞれ88%、32%の小胞体が滞留していた(Fig. 7)。血漿の粘度は未処置群で1.19cPであった。対して二回目の小胞体投与後、血漿粘度は24、48時間後にそれぞれ1.41 cP、1.31 cPであった。

D. 考察

本研究では、高酸素親和度のHb小胞体を投与することにより、二つの皮弁が縫合された低酸素状態の組織と、極度に虚血状態に陥っていた皮弁組織の治癒が促進されたことが明らかになった。

このことは、Hb小胞体投与1日後の酸素飽和度と連動しており、組織の酸素化は生存には十分であるが、皮弁の身体に近い部分(proximal)の治癒効果には不十分であり、またより遠位部(distal)においては、酸素が不十分であり、細胞が生存できない。

一般に創傷治癒の過程では、酸素に依存した過程、例えば繊維芽細胞、筋繊維芽細胞の活動、血管新生、コラーゲン産生のため酸素需要は増大しているが、低酸素条件では酸素供給は不十分となり、創傷治癒は弱められる。本研究では、Hb小胞体の投与により酸素供給が改善され、結果として皮弁中央部の縫合部位の治癒効果が得られたものと考えられる。側方部分の健全な皮弁領域では、そのようなHb小胞体の投与による改善はみられず、全く影響は無かった。

免疫抗体染色により、HbV投与群においてより毛細管数とeNOS発現量が増大していた。eNOSは血管新生と脈管新生に重要である。新しく血管をつくることに刺激を与えるだけでなく、eNOSは内皮細胞のアポトーシスを抑制する。eNOSは創傷治癒過程において重要であり、皮弁組織の生存の維持あるいは改善に貢献している。eNOSの発現は酸素に依存しており、剪断応力にも依存し、また炎症サイトカインによって抑制される。

これらの機序のいずれもが、Hb小胞体の投与に影響を受けると考えられる。投与物の構成成分の

うち水分とNaClが血管外に直ぐに消失したとして、初回の投与Hb小胞体の血中濃度は15%になっている。そして体内動態の結果から、3日後においても1/3はまだ血中に滞留している。また、酸素供給量を増やしている以外に重要な点は、血漿層に分散することによって、赤血球から組織への酸素供給を媒介できることである。Hb小胞体の酸素親和度が増大している場合、酸素放出のためには酸素分圧の勾配が大きくなっている必要がある。従って、酸素放出はより低酸素分圧の領域側に配分されることになる。この高酸素親和度Hb小胞体による低酸素領域への酸素供給については、これまでも報告して来た。またHb小胞体の投与により血漿粘度が増大し、これにより血流が改善され、血管壁における剪断応力が増大する。以前の研究で我々は、皮弁モデルに高酸素親和度Hb小胞体を投与することにより、幾つかの二次的な利点、例えば組織エネルギー代謝、アポトーシス、炎症性サイトカイン産生、白血球活性化などの項目においても改善が見られている。

本製剤の副作用に対する、生物学的な利点を強調するため、Hb小胞体の分解と排泄に関わる腫瘍臓器、肝臓、脾臓、腎臓について組織病理学的な検討を行った。比較的大量のHb小胞体の投与を受けたにも関わらず、今回の観測時間においては臓器に異常は認められなかった。このことは、以前の投与試験の結果とも合致している。

以上のことから、高酸素親和度Hb小胞体は、皮弁の辺遠部位の治癒を促進する効果があることが解り、eNOS発現による血管新生が関与している可能性が考えられた。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida.

Hemoglobin-vesicles and red blood cells as carriers of carbon monoxide prior to oxygen for resuscitation after hemorrhagic shock in a rat model. *Shock* 31, 507-514 (2009).

2. M. Yamaguchi, M. Fujihara, S. Wakamoto, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, H. Hamada, H. Azuma, H. Ikeda. Effect of hemoglobin vesicles, cellular-type artificial oxygen carriers, on the ex vivo expansion of human hematopoietic stem/progenitor cells using a coculture system with human stromal cells. *ASAIO J.* 55, 200-205 (2009)

3. K. Taguchi, T. Maruyama, Y. Iwao, H. Sakai, K. Kobayashi, H. Horinouchi, E. Tsuchida, T. Kai, M. Otagiri. Pharmacokinetics of single and repeated injection of hemoglobin-vesicles in hemorrhagic shock rat model. *J. Control. Release* 136, 232-239 (2009)

4. 宗慶太郎、小峰梨沙、酒井宏水、小林紘一、土田英俊、村田満. ヘモグロビン小胞体を含有する血液検体の臨床検査. *人工血液* 17, 6-15 (2009)

5. T. Sato, H. Sakai, K. Sou, O. Glatter, E. Tsuchida. Static structure and dynamics of hemoglobin vesicles (HbV) developed as a transfusion alternative. *J. Phys. Chem. B.* 113, 8418-8428 (2009)

6. K. Taguchi, Y. Urata, M. Anraku, T. Maruyama, H. Watanabe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, T. Kai, M. Otagiri. Pharmacokinetic study of enclosed hemoglobin and outer lipid component after the administration of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier. *Drug Metab. Dispos.* 37, 1456-1463 (2009)

7. H. Sakai, A. Sato, N. Okuda, S. Takeoka, N. Maeda, E. Tsuchida. Peculiar flow patterns of RBCs suspended in viscous fluids and perfused through a narrow tube (25 μ m). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H583-H589 (2009)
8. H. Sakai, A. Sato, S. Takeoka, E. Tsuchida. Mechanism of flocculate formation of highly concentrated phospholipid vesicles suspended in a series of water-soluble biopolymers. *Biomacromolecules* 10, 2344-2350 (2009).
9. H. Sakai, M. Okamoto, E. Ikeda, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Histopathological changes of rat brain after direct injection of hemoglobin-vesicles (oxygen carriers) and neurological impact in an intracerebral hemorrhage model. *J. Biomed. Mater. Res.* 90A, 1107-1119 (2009).
10. J. A. Plock, N. Rafatmehr, D. Sinovic, Y. Harder, H. Sakai, E. Tsuchida, A. Banic, D. Erni. Hemoglobin vesicles improve wound healing and tissue survival in critically ischemic murine skin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H905-910 (2009).
11. K. Taguchi, Y. Urata, M. Anraku, H. Watanabe, D. Kadowaki, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, T. Maruyama, M. Otagiri. Hemoglobin vesicles, polyethylene glycol (PEG)ylated liposomes developed as a red blood cell substitute, do not induce the accelerated blood clearance phenomenon in mice. *Drug Metab. Dispos.* 37, 2197-2203 (2009).
12. T. Komatsu, A. Nakagawa, S. Curry, E. Tsuchida, K. Murata, N. Nakamura, H. Ohno. The role of an amino acid triad at the entrance of the heme pocket in human serum albumin for O₂ and CO binding to iron protoporphyrin IX. *Org. Biomol. Chem.* 7, 3836-3841 (2009).
13. K. Sou, B. Oyajobi, B. Goins, W.T. Phillips, E. Tsuchida. Characterization and cytotoxicity of self-organized assemblies of curcumin and amphiphatic poly(ethylene glycol). *J. Biomed. Nanotechnol.* 5, 202-208 (2009).
14. A. Nakagawa, T. Komatsu, S. Curry, E. Tsuchida. O₂ binding properties of human serum albumin quadruple mutant complexed iron protoporphyrin IX with axial His-186 coordination. *Chem. Lett.* 38, 776-777 (2009).
15. K. Sou, B. Goins, M.M. Leland, E. Tsuchida, W.T. Phillips. Bone marrow-targeted liposomal carriers: a feasibility study in nonhuman primates. *Nanomedicine (Lond)* 5, 41-49 (2010).
16. H. Sakai, N. Okuda, A. Sato, S. Takeoka, E. Tsuchida. Hemoglobin encapsulation in vesicles retards NO- and CO-bindings and O₂-release when perfused through narrow gas-permeable tubes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298, H956-H965 (2010).
17. 堀之内宏久、小林紘一、酒井宏水、土田英俊. 人工酸素運搬体. 「からだと酸素の事典」酸素ダイナミクス研究会 編. 第5章:酸素の利用. pp.478-484, 2009, 朝倉書店, 東京.
18. E. Tsuchida, K. Sou, A. Nakagawa, H. Sakai, T. Komatsu, K. Kobayashi. Artificial oxygen carriers, hemoglobin vesicles and albumin-hemes, based on bioconjugate chemistry. *Bioconjugate Chem.* 20, 1419-1440 (2009).

19. H. Sakai, K. Sou, E. Tsuchida. Hemoglobin vesicles as a transfusion alternative. *Methods Enzymol.* 465 (Liposomes Part G) 363-384 (2009).
20. 小松晃之、屈 雪、土田英俊、中川明人. ヒト血清アルブミンを用いた機能分子・材料の創製. *人工血液*, 17, 82-89 (2009).
21. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicle, a cellular artificial oxygen carrier, that fulfils the physiological roles of the red blood cells structure. *Adv. Exp. Med. Biol.* 662 (Oxygen Transport to Tissue XXXI) 433-438 (2010).
22. 酒井宏水、小松晃之、土田英俊、西出宏之. 臨床応用可能な酸素輸液の研究開発. *日経BPムック(早稲田産学連携レビュー2010)*, 52-53 (2010)
- 2. 学会発表**
1. 中木村繁、蒲池浩文、山下健一郎、渡辺正明、蔵谷大輔、腰塚靖之、小倉正臣、松下通明、酒井宏水、土田英俊、藤堂省 / マウス臍島移植における人工赤血球添加効果の検討 / 第109回日本外科学会定期学術集会 / 福岡国際会議場 / 2009.4.2-4
2. 小林紘一、堀之内宏久、土田英俊、酒井宏水 / 人工酸素運搬体 / 日本医工学治療学会第25回学術大会 / 大阪国際会議場 / 2009.4.10
3. 酒井宏水、土田英俊 / 人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）のガスバイオロジー / 第48回日本生体医工学会大会 / 東京 タワーホール船堀 / 2009.4.23-25.
4. 酒井宏水、佐藤敦、武岡真司、土田英俊 / 人工赤血球—水溶性高分子（代用血漿剤）分散系のレオロジー特性 / 第48回日本生体医工学会大会 / 東京 タワーホール船堀 / 2009.4.23-25.
5. 奥田直人、酒井宏水、武岡真司、土田英俊 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)分散液の配位子反応に対する拡散性の影響 / 第58回 高分子学会年次大会 / 2009.5.28 (中止, 予稿集発行)
6. H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Hb-vesicles as O₂- and CO-carriers for cytoprotection at resuscitation from hemorrhagic shock / 55th- ASAIO-IFAO conference / Dallas / 2009. 5.28-30
7. 奥田直人、酒井宏水、武岡真司、土田英俊 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)分散液の配位子反応に対する拡散性の影響 / シンポジウム: 分野横断的手法を活用した新時代の生命科学研究 / 東京大学 本郷キャンパス 山上会館 / 2009.8.18
8. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Physicochemical characteristics of Hb-Vesicles as RBC substitutes / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
9. H. Horinouchi, Y. Seishi, K. Kobayashi, Y. Izumi, M. Kohno, H. Sakai, E. Tsuchida. / Resuscitation with hemoglobin-vesicle can improve survival in uncontrolled hemorrhage model in rats: hemorrhage from large vessel model / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
10. K. Taguchi, T. Maruyama, H. Watanabe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, M. Otagiri / Pharmacokinetic profiles of