

- hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
11. N. Okuda, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida. / Hb encapsulation in vesicles retards NO- and CO-bindings and O<sub>2</sub>-releasing when perfused through a gas-permeable narrow tube. / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
12. Y. Seishi, H. Horinouchi, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Effect of large volume resuscitation with the cellular type artificial oxygen carrier (Hb-vesicle) in rat model of uncontrolled hemorrhagic shock via a caudal artery. / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
13. Y. Seishi, H. Horinouchi, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Effect of large volume resuscitation with the cellular type artificial oxygen carrier (Hb-vesicle) in rat uncontrolled hemorrhagic shock model caused by blunt kidney injury. / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
14. 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 / 日本化学会第3回関東支部大会 / 2009.9.4-5
15. 酒井宏水、宗慶太郎、土田英俊 / 細胞型人工酸素運搬体をつくる-ヘモグロビン精製から小胞体化まで- / 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.
16. 酒井宏水、岡本紀子、池田栄二、堀之内宏久、小林紘一、土田英俊 / 脳内出血モデルによるHb小胞体の脳神経組織への影響に関する検討 / 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.
17. 奥田直人、酒井宏水、武岡真司、土田英俊 / 微小モデル血管内を流動する人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)分散流体の配位子反応 / 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.
18. 田口和明、渡邊博志、門脇大介、酒井宏水、堀之内宏久、土田英俊、小林紘一、丸山徹、小田切優樹 / 出血性ショックモデルラットにおけるヘモグロビン小胞体頻回投与時の体内動態解析 / 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.
19. 勢司泰久、堀之内宏久、酒井宏水、土田英俊、小林紘一 / 制御不能尾動脈出血モデルを用いたヘモグロビン小胞体輸液蘇生の検討 / 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.
20. 堀之内宏久、泉陽太郎、酒井宏水、小松晃之、土田英俊、小林紘一 / 実験腫瘍における腫瘍酸素分圧のマッピングと人工酸素運搬体投与による腫瘍の酸素加 / 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.
21. 高橋大輔、東寛、脇田大功、藤原満博、宗慶太郎、酒井宏水、堀之内宏久、西村孝司、小林紘一、土田英俊、池田久實 / ヘモグロビン小胞体(HbV)が免疫系に及ぼす影響 / 第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.

22. 宮里麻友美、田口和明、渡邊博志、酒井宏水、堀之内宏久、土田英俊、小林紘一、丸山徹、小田切優樹 / 四塩化炭素誘発肝障害モデルラットにおけるヘモグロビン小胞体の体内動態の検討 / 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.
23. 藤原満博、東寛、若本志乃舞、泉陽太郎、酒井宏水、堀之内宏久、土田英俊、小林紘一、武田純三、池田久實 / 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.
24. H. Horinouchi, H. Sakai, E. Tsuchida, k. Kobayashi.  
/ Research and development of hemoglobin vesicle, a cellular type artificial oxygen carrier / 20th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion, Asia / 名古屋国際会議場 / 2009. 11. 14-18.

## 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. ヘモグロビン小胞体の配位子反応と血管活性の相関
2. Hb小胞体による疑似アレルギー反応と血行動態に与える影響に関する検討

研究分担者 酒井 宏水 早稲田大学 理工学研究所 准教授

## 研究要旨

(1) 非細胞型のHb溶液は投与に際し血管収縮を引き起す事が知られているが、これは血管弛緩因子であるNOやCOを捕捉すること、また酸素を速やかに放出するために、血管の自動調節機能が働いたためと考えられている。そこでこれらガス反応の詳細を調べるため、ガス透過性のある微小細管(内径25 $\mu$ m)を用い、実質的な濃度(10 g/dL)のHbを含有する各種溶液[ヒトHb、重合ウシHb (Poly<sub>B</sub>Hb)、Hb小胞体(HbV)、ヒト赤血球(RBC)]を1mm/sの中心流速で灌流させ、Hb溶液のガス反応率を顕微可視吸収スペクトルにより計測した。細管をNOあるいはCOガスが溶解した水溶液に浸漬した場合、deoxy状態のHb、Poly<sub>B</sub>Hbは、HbVおよびRBCよりも速くガスを結合し、またHbVとRBCは同等の結合速度であった。細管を窒素雰囲気曝した場合、酸素を結合したHbとPoly<sub>B</sub>Hbは、HbVおよびRBCよりも速い酸素放出を示した。Poly<sub>B</sub>Hbは酸素親和度が最も低いため、最も速い酸素放出速度を示した。管内における粒子の拡散挙動をNavier-StokesおよびMaxwell-Stefan式を用いてシミュレーションしたところ、微小なHb(6nm径)では、側方拡散が速く流体の攪拌が促進されるが、粒子径の大きいHbVではそのような速い拡散はみられなかった。この側方拡散の違いが、ガス反応性の違いを生じていると考えられる。純粋に物理化学的な性質の相違が、血管収縮の有無を決定している可能性がある。(2) 実験動物の中でもブタは補体活性による循環動態の著変(疑似アナフィラキシー反応)が生起し易いことが良く知られている。そこで、Hb小胞体と同一の脂質組成からなる空の小胞体を投与し、補体活性が生起することが良く知られている脂質(DPPG)から成る小胞体の投与と比較した。その結果、現行の小胞体組成では血行動態の変動が縮小され、より生体適合性に優れることが明らかになった。

## 1. ヘモグロビン小胞体の配位子反応と血管活性の相関

### A. 緒言

非細胞型のHb利用人工酸素運搬体(Hb-based oxygen carrier, HBOCs)には、分子内架橋型、重合型、PEG結合型などが知られており、臨床試験の最終

段階にある製剤もある。HBOCsの利点は明らかで、長らくその実現が期待されているが、血管収縮と血圧亢進の問題のため、認可された製剤はまだ無い。血管収縮の原因としては、主に血管弛緩因子であるNOを捕捉することが考えられて来た。小粒径のHb分子は血管内皮を透過して平滑筋近傍にま

で到達し、NOを捕捉する可能性がある。対してHb小胞体は粒子径が大きいので、そのようなことは起こらないと考えられる。ストップドフロー-ラピッドスキャン分光法により、HbのNO結合速度は、Hbを粒子内に内包することで粒子内にNOの拡散障壁が形成されることで遅延されることが明らかになっている。この拡散障壁が形成される条件としては、i) 粒子内のHb濃度が高いことと、ii) 粒子径がより大きいことである。いわゆるLiposome-encapsulated Hbは1977年のDjordjevicの研究以来、多くの研究者が試して来たが、我々のHb小胞体の特長は、35g/dLの高濃度Hb溶液を内包し、また粒子径が250-280 nmに制御され、その分散液としてHb濃度10g/dLを達成している。HbVが血管収縮や血圧亢進を生起しない理由としては、NOの結合速度がHb溶液に比較して遅いことが挙げられる。しかし、NO結合速度は赤血球に比較するとまだ速く、十分な説明が出来ない。粒子径が大きく血管壁の平滑筋近傍にまで到達できないことが効いているのかもしれない。他方、HBOCsを投与した際の血管収縮の原因は、NO捕捉のことだけではない。例えば、肝実質細胞のhemeoxygenase-2によりヘムが分解される過程で産生されるCOは、肝微小循環系において血管弛緩因子として作動する。小粒径のHb分子は、類洞血管のfenestrationを透過してDisse腔に到達し、COを捕捉するため、血管収縮と灌流圧の上昇が認められる。また、酸素過多になると

血管は自動調節機能により収縮し、酸素供給を調節する。小粒径のHb修飾体の投与は酸素の“促進輸送”を誘発し、血管収縮を生起するとの報告が幾つかある。従って、HBOCsについて、NOのみならずCO、O<sub>2</sub>との反応性について詳細を検討する必要がある。従来、Hbとガス分子の反応速度定数を調べる方法としては、ストップドフロー-ラピッドスキャン分光法や、フラッシュホトリシス法が知られている。しかし、キュベット内のHb濃度を2μM(約0.003 g/dL)にまで希釈する必要があり、投与における実質的な濃度(4-10 g/dL)に比較して非常に希薄な濃度となる。また、フラッシュホトリシス法では、光照射によって解離したガス分子の再結合反応を追跡するが、量子収率が低いので、再結合の一部を見ている可能性がある。またHb小胞体や赤血球のような巨大な粒子では、解離したガスが粒子外に放出される前に再結合が起こりうるので、結果の解釈が複雑になることが問題である。要するにこれらの方法では、血管内で生起するガス反応の生理的条件とはかなり逸脱した条件といえる。

ガス透過性のある微小細管を用いれば、実質的な濃度(例えば10g/dL)でこれらのガス反応を観測できる。過去に我々はテフロン製の微小細管(内径25 μm)を用い、酸素の放出について観測しているし、海外でもHellumsやWinslowらのグループでガス透過性が高いシリコン製の微小流路を用いて酸素放出について検討している。今回我々は、同じ

**Table 1.** Physicochemical properties of HbV, Poly<sub>B</sub>Hb, Hb, and RBC.

	HbV	Poly <sub>B</sub> Hb	Hb	RBC
[Hb] (g/dl)	10	10	10	10
Hb/PLP by mol.	1/2.5	-	1/4	-
$k'_{on}^{(CO)}$ ( $10^5 M^{-1}s^{-1}$ )	2.1	2.7	2.1	0.65
$k'_{on}^{(NO)}$ ( $10^7 M^{-1}s^{-1}$ )	0.61	2.4	2.4	0.012
$k'_{off}^{(O_2)}$ ( $s^{-1}$ ) in 50 mM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	32	119	84	4.4
P <sub>50</sub> (Torr)	25-28	54	26	27
Size	279 nm	87-502 kDa <sup>c</sup>	65 kDa	8 μm
Viscosity (mPa s) at $10^3 s^{-1}$	3.75	1.48	1.35	2.46
Viscosity (mPa s) at $10 s^{-1}$	6.88	1.54	1.35	3.18
Perfusion Pressure (kPa)	21.0-23.0	7.0-8.0	6.0-7.0	9.0-10.0

$k'_{on}^{(NO)}$ , apparent NO-binding rate constant;  $k'_{on}^{(CO)}$ , apparent CO-binding rate constant;  $k'_{off}^{(O_2)}$ , apparent

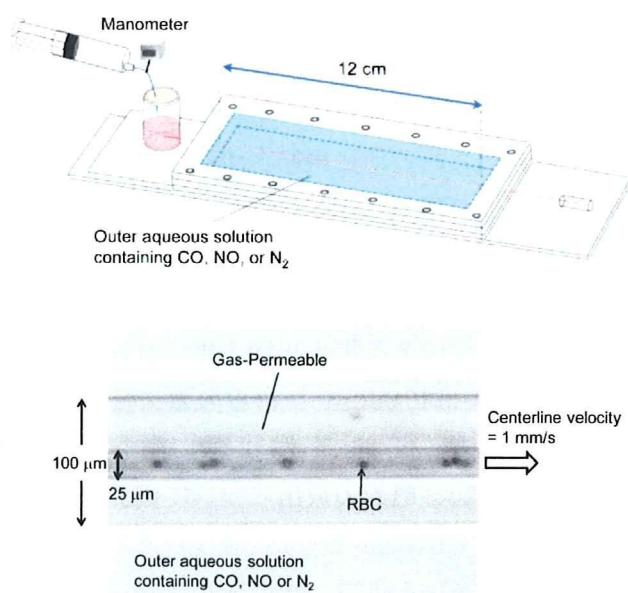
O<sub>2</sub>-releasing rate constant; P<sub>50</sub>; oxygen partial pressure at which Hb is half-saturated.

モデルを用い、O<sub>2</sub>放出のみならず、NO結合、CO結合についても検討した。また、修飾Hbや赤血球との相違を検討した。そして、粒子の拡散挙動をシミュレーションし、Hb小胞体の拡散の特徴との相関について検討した。

## B. 方法

### 1. Hb小胞体(HbV), Hb溶液, Poly<sub>B</sub>Hb, 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、PBSに溶解させ、Pyridoxal 5'-phosphate (PLP)をPLP/Hb = 4の割合で添加した。何れもHb濃度が10 g/dLになるようにした。また比較対象として、重



**Fig. 1. (Top)** Experimental setup of a gas-permeable artificial narrow tube (red line) immersed in a water bath (light blue) made by the gap between two transparent acrylic plates with a rubber supporting plate. One end of the narrow tube was connected to a reservoir (pink colored) of the Hb containing suspension. The reservoir is pressurized by N<sub>2</sub> gas for perfusion of a fluid through the tube. **(Bottom)** Microscopic view of a gas-permeable artificial narrow tube. The tube, made of perfluoro polymer, is gas permeable. The tube is immersed in water equilibrated with N<sub>2</sub>, low concentration CO, or NO gases. The wall thickness,  $\{(100-25)/2 = 37.5 \mu\text{m}\}$ , is important not only for regulation of measurable gas permeability but also for the stiffness of the tube of greater than 12 cm traveling distance. The centerline flow velocity was adjusted to 1 mm/s. To monitor the velocity, a small amount of RBC solution is mixed. Measurements of absorption spectrophotometry of the fluid in the tube were performed at several traveling distances.

合ウシHb (Poly<sub>B</sub>Hb, Biopure社製 Oxyglobin)を用いた。13 g/dL濃度で封入されているので、これをPBSで10g/dLに希釈して用いた。Poly<sub>B</sub>Hbは修飾Hb溶液の中で唯一入手可能な物質であり、動物臨床用に認可されたものである。血管活性があることや、その37.2%が非重合体であることなど、詳細が報告されている。また、比較対象として、ヒト赤血球を用いた。早稲田大学「人を対象とする研究に関する倫理委員会」の承認を得て、ヒト新鮮血を採取し、洗浄と白血球除去フィルタ処理(Pall Corp.製)を行い(洗浄RBCを得た。生理食塩水に分散させHb濃度を10g/dLとした。酸素親和度はHemox Analyzerにより測定した。分散液の粘度はレオメータ(Physica MCR 301; Anton Paar社製)により測定した(Table 1)。

### 2. 微小細管内の流動

本実験で用いた微小細管(内径25μm, 壁厚37.5 μm, 長さ150 mm)は、平河ヒューテック社より購入した。材質はフッ素化ethylene-propylene copolymerで撥水性、ガス透過性である。細管の一端をHb溶液が入っているリザーバタンクに連結させた。透明アクリル板とシリコン板を用いて水槽を作製し、細管を水槽の中に浸漬した。装置の概略をFigure 1に示す。リザーバタンク内の溶液は小型スターラーで攪拌した。顕微鏡(Olympus IX-71)のステージに水平に置き、リザーバタンクにシリンジで圧力をかけることで、Hb溶液を流動させた。圧力は圧力センサー(AP-C30, キーエンス社製)でモニターした。細管内の中心流速の測定には、フォトダイオード相関法を用い(Velocity Tracker Mod-102 B; Vista Electronics Co.), 全ての実験において1 mm/sに調節した。この方法では、測定部位のコントラストの変化が必要なので、均一な溶液、HbV, Poly<sub>B</sub>Hb単独では測定が出来ない。そこで、5 vol%のRBC分散液を添加した。この添加量では、スペクトル測定に影響が無いことを確認している。水槽には亜二チオン酸ナトリウム(10 mM)の溶液を

満たし、完全に酸素を排除した。NO結合およびCO結合挙動を観測する場合には、水槽を低濃度NOガス (NO, 4.7%; N<sub>2</sub>, 95.3%)あるいはCOガス (CO, 14.14%; N<sub>2</sub>, 85.86%)で通気した亜二チオン酸水溶液で満たした。

### 3. 測定装置

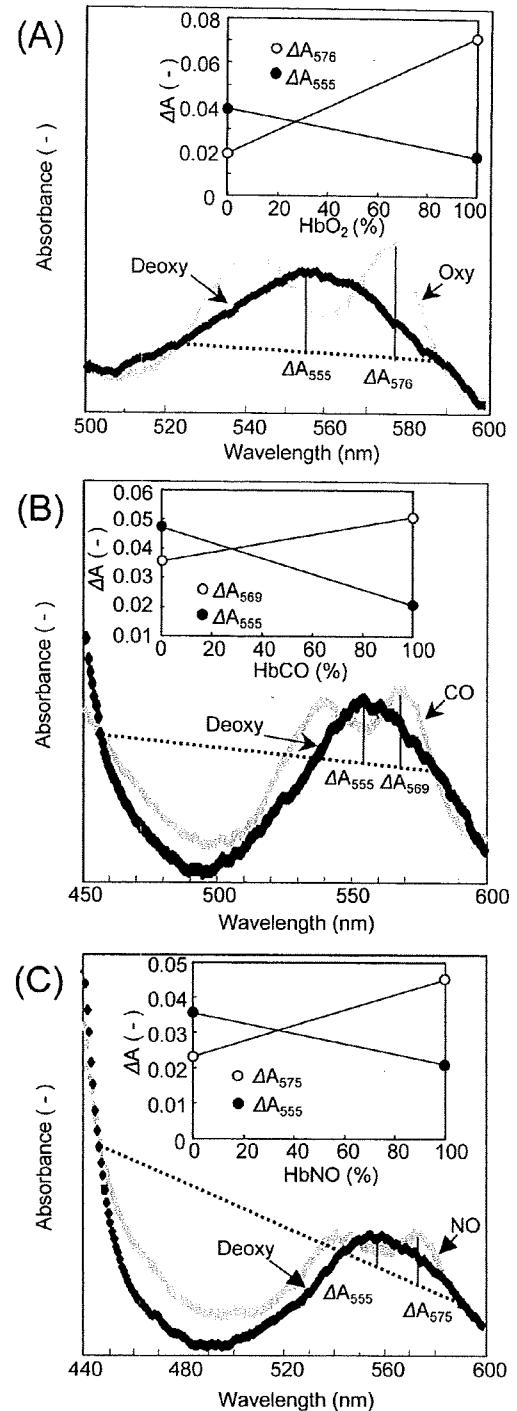
測定装置の構成は、倒立型顕微鏡(IX-71, 対物レンズx40 ULWD CDPlan 40 PL, Olympus)に顕微スペクトル装置(Photonic multi-channel analyzer Model PMA-11, 浜松ホトニクス)を接続させたもので、顕微鏡ハロゲンランプを光源としチューブに照射し、25 μm径のスポットについて194 -956 nmの範囲の吸収スペクトルを計測した(スキャン速度100 ms/scan, 100 scan, 0.2 nm間隔)。1点の測定に10秒を要した。測定ポイントは常にCCDカメラにて撮影し、モニターで確認した。

### 4. 酸素放出速度の測定

酸素放出速度を観察する場合は、細管を窒素雰囲気下の亜二チオン酸ナトリウム水溶液に浸漬し、酸素を結合したHb溶液を灌流させ、流動距離10, 30, 50, 70, 90 mmのスポットのスペクトルを測定した。100%デオキシ型と100%オキシ型のスペクトルを測定し、Q帯の等吸収点(522, 586 nm)を直線で結びベースラインとし、555 nm ( $A_{555}$ ,  $\lambda_{max}$  deoxyHb) および 576 nm ( $A_{576}$ ,  $\lambda_{max}$  oxyHb)の吸光度比( $R = A_{555}/A_{576}$ )と酸素飽和度(%)の検量線を作製した(Fig. 2)。各試料の各測定ポイントにおける測定は3回行い、mean ± SDとして表記した。

### 5. CO結合速度の測定

CO結合速度の測定の場合には、細管をCOが溶解した溶液に浸漬し、deoxy状態のHb含有溶液を灌流させた。通気したガスのCO濃度は14.14%で、水槽溶液中には135 μMのCOが溶解していた計算になる。100%デオキシ型のスペクトルと、100%カルボニル型のスペクトルを測定し、等吸収点(454, 578



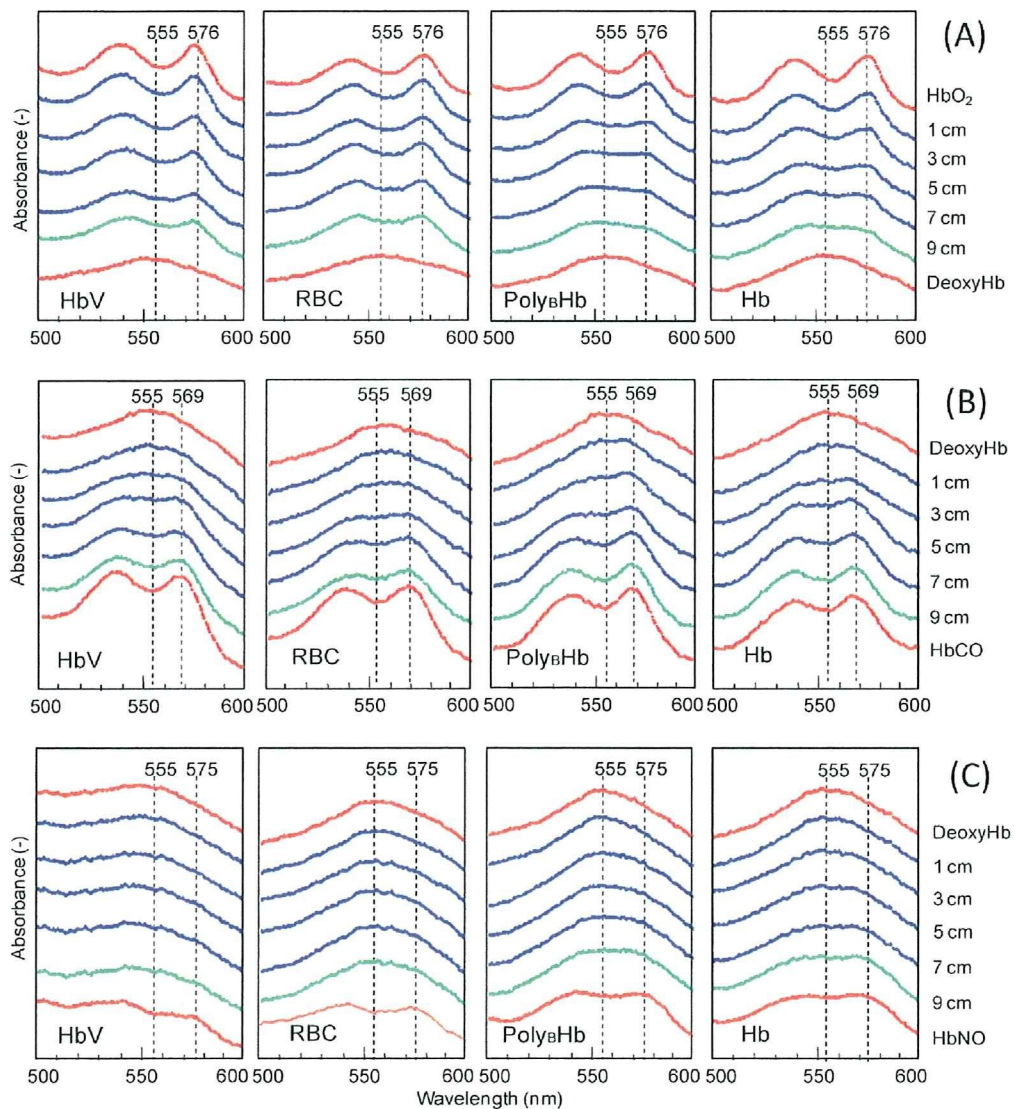
**Fig. 2.** Calculation of reaction levels (A) HbO<sub>2</sub>, (B) HbCO, and (C) HbNO from the absorption changes. For the oxygen saturation determination, for example, two isosbestic points of the spectra of deoxygenated (deoxy-) and oxygenated (oxy) HbVs (at 522 and 586 nm) were connected by a straight line (baseline). Based on absorbances at 555 ( $\Delta A_{555}$ ,  $\lambda_{max}$  of deoxyHb) and 576 ( $\Delta A_{576}$ ,  $\lambda_{max}$  of oxyHb) nm from the baseline, linear relations between the level of HbO<sub>2</sub> (%) and  $\Delta A_{555}$  and  $\Delta A_{576}$  are obtained individually as shown in the inset. Then the ratio of the two absorbances ( $R = A_{555}/A_{576}$ ) was utilized to obtain the level of HbO<sub>2</sub>. The levels of HbCO (B) and HbNO (C) were calculated similarly.

nm)を直線で結びベースラインとし、555 nm ( $A_{555}$ ,  $\lambda_{max}$  deoxyHb)および569 nm ( $A_{569}$ ,  $\lambda_{max}$  HbCO)の吸光度比( $R = A_{555}/A_{569}$ )とCO結合率(%)の検量線を作製した。測定はO<sub>2</sub>放出の場合と同様に行った。

## 6. NO結合速度の測定

NO結合速度の測定の場合には、細管をNOが溶解した溶液に浸漬し、deoxy状態のHb含有溶液を灌

流させた。通気したガスのNO濃度は4.7%で、水槽溶液中には88 $\mu$ MのNOが溶解していた計算になる。100%デオキシ型のスペクトルと、100%ニトロシル型のスペクトルを測定し、等吸収点(449, 592 nm)を直線で結びベースラインとし、555 nm ( $A_{555}$ ,  $\lambda_{max}$  deoxyHb)および575 nm ( $A_{575}$ ,  $\lambda_{max}$  HbNO)の吸光度比( $R = A_{555}/A_{575}$ )とNO結合率(%)の検量線を作製した。測定はO<sub>2</sub>放出、CO結合の場合と同様に行った。



**Fig. 3.** Spectroscopic changes in  $Q$  bands of the Hb containing fluids by perfusing through the narrow tube at the traveling distances of 1 – 9 cm. The red plot lines represent the absorption spectroscopy of 0% and 100% reactions. The green lines represent the spectroscopy at 9 cm traveling distance. **(A)** Measurement of O<sub>2</sub>-releasing behavior by perfusing through the narrow tube immersed in an anaerobic condition. Two characteristic peaks ( $\lambda_{max} = 541$  and 576 nm) attributed to oxyHb decreased with the traveling distance. A new peak (555 nm) attributed to deoxyHb increased. **(B)** NO-binding perfused through the narrow tube. Two characteristic new peaks attributed to HbNO ( $\lambda_{max} = 545$  and 575 nm) increased with the traveling distance; deoxyHb (555 nm) decreased. **(C)** Spectroscopic changes in  $Q$  bands of the Hb containing fluids with CO-binding perfused through the narrow tube. Two new characteristic peaks attributed to HbCO ( $\lambda_{max} = 540$  and 569 nm) increased with the traveling distance; deoxyHb (555 nm) decreased.

## 7. Hb溶液およびHb小胞体の拡散挙動のシミュレーション

Hb分子(6 nm)およびHb小胞体(250 nm)が細管内を流動している際に溶液がどのように攪拌されるかを明らかにするため、粒子の拡散挙動をシミュレーションした。ここでは、細管内の入口において管壁近傍に流入した粒子の拡散挙動を追跡した。物性の異なる、二種類の流体が流入することを仮定し、Component-1は管中心から半径11.5  $\mu\text{m}$ までの領域に流入し、Component-2は、半径11.5  $\mu\text{m}$ から管壁(半径12.5  $\mu\text{m}$ )までの領域に流入したと仮定した。そしてComponent-2が管中央方向に拡散して溶液が混合される様子をシミュレーションした。

Hb分子の大きさ(6 nm)は細管内径(25  $\mu\text{m}$ )に比較して非常に小さい。ここでは、Navier-Stokes方程式を用いた。Hb小胞体の場合は、細管内径の1/100と無視できない体積を持つため、球状の個体粒子として扱い、個液2相の混相流動解析を行った。Maxwell-Sterfan advection-diffusion 方程式を用いた。

## C. 結果

### 1. O<sub>2</sub>放出挙動

Hbを含有する全ての試料について、細管内を流動させると次第にスペクトルが変化し、HbO<sub>2</sub>由来の2つの吸収ピーク( $\lambda_{\text{max}}$ , 541, 576 nm)の吸光度が低下し、deoxyHb由来のピーク( $\lambda_{\text{max}}$ , 555 nm)の増大が見られた(Fig. 3A)。特にPoly<sub>B</sub>HbとSFHbでその変化が顕著であった。HbVとRBCでは、9cm流動した時点でもまだ2つのピークが確認された。Fig. 4Aは、流動距離と酸素飽和度の相関をまとめたグラフである。9cm流動した時点で、Poly<sub>B</sub>HbとSFHbはそれぞれ、27 $\pm$ 8%および43 $\pm$ 6%にまで低下したが、HbVおよびRBCsはそれぞれ68 $\pm$ 7%と76 $\pm$ 4%までの低下に留まり、HbVとRBCsは同等であった。

### 2. CO結合挙動

DeoxyHb由来のピークは555 nmに存在するが、

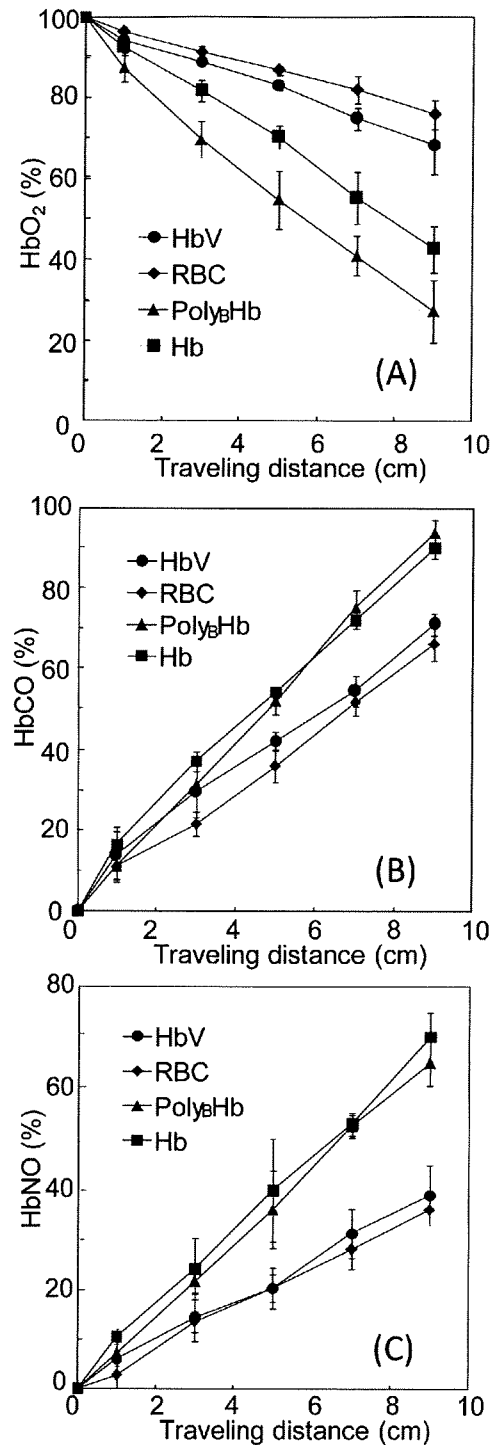
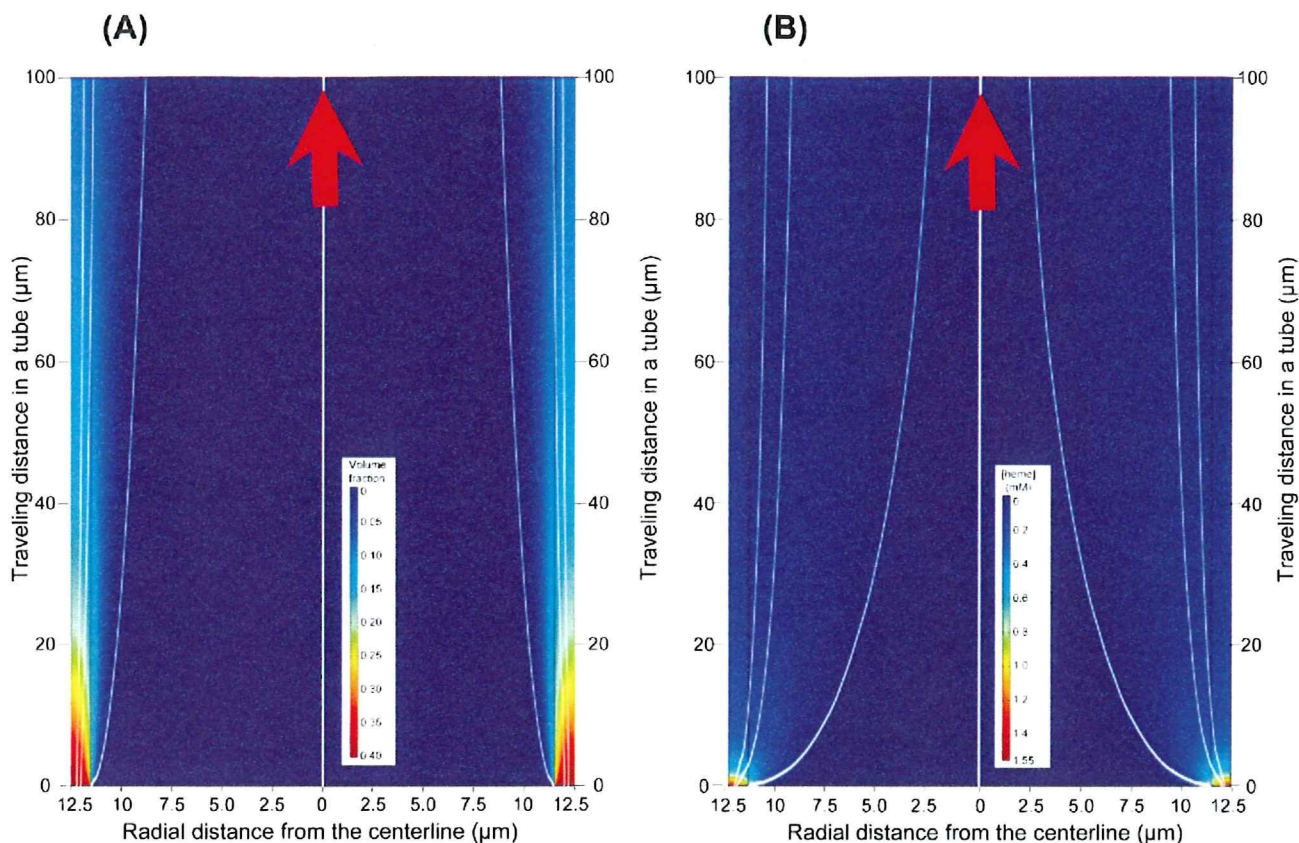


Fig. 4. The change of the level of ligand reactions of the Hb containing fluids, HbV (circle), Poly<sub>B</sub>Hb solution (triangle), Hb solution (square), and RBC (rhombic) with traveling distance. (A) Levels of O<sub>2</sub> release. (B) Levels of CO-binding. (C) Levels of NO-binding. The levels of the reactions are calculated from the data in Fig. 3.

細管内流動してCOを結合するに従い、全てのHb含有溶液について、540 nmと569 nm付近に新たなピークが出現した(Fig. 3B)。9 cm流動時に、Poly<sub>B</sub>Hb





**Fig. 5.** Schematic representation of the simulated density distribution and track of Hb molecule in a narrow tube (< 100  $\mu\text{m}$  traveling distance). We assumed that two different solutions with the same physicochemical properties enter and flow through the same tube. The radius of the tube was 12.5  $\mu\text{m}$ : component-1 (blue color) enters the core of the tube (radial distance from the centerline, 0–11  $\mu\text{m}$ ), and component-2 (red color) enters near the wall (radial distance from the centerline, 11–12.5  $\mu\text{m}$ ). Finally, both components are mixed completely, but the rate is dependent on the physicochemical properties. **(A)** Diffusivity of HbV particles as component-2. The concentration of the particle (HbV) is expressed as volume fraction (volume fraction is 0.4 at  $[\text{Hb}] = 10 \text{ g/dL}$ ). **(B)** Diffusivity of Hb molecules as component-2. The color gradation reflects the change of the component-2 concentration; the white lines represent tracking data of representative particles. The concentration of Hb is expressed as heme concentration ( $[\text{heme}] = 1.55 \text{ mM}$  at  $[\text{Hb}] = 10 \text{ g/dL}$ ).

とSFHbは $94 \pm 3\%$ および $90 \pm 3\%$ のCO化率にまで到達したが、HbVおよびRBCsはそれぞれ $71 \pm 3\%$ と $66 \pm 4\%$ であり、低い値に留まった(**Fig. 4B**)。

### 3. NO結合挙動

HbNOは、545 nmと575 nmに特徴的なピークを示す。Poly<sub>B</sub>HbとSFHbはともに、9 cm流動の時点で特徴的な2つのピークの出現が認められた(**Fig. 3C**)。しかし、HbVとRBCについては、575 nm付近にShoulderが認められるが、明確なピークは出現しなかった。HbおよびPoly<sub>B</sub>Hbは9 cm流動の時点で、NO結合率がそれぞれ $70 \pm 5\%$ 、 $65 \pm 5\%$ にまで到達したが(**Fig. 4C**)、RBCsとHbVはそれぞれ $36 \pm 3\%$ 、 $39 \pm 6\%$ と、低い値に留まった。

### 4. 細管内におけるHb、Hb小胞体の拡散挙動

本研究のシミュレーションでは、同一の物性を有する二種類の液体(HbV-1とHbV-2)を流動させ、これらがどのように混合されるかを明らかにすることを目的とした。**Figure 5A**はHbVの拡散挙動を示す。赤色はHbV-2が管壁近傍に流入したことを示し、これが流動と共に次第に黄色、緑、水色に変化しており、つまりHbV-2が拡散してHbV-1と混合していき、HbV-2の濃度が低下することを示す。しかし、流動距離が100  $\mu\text{m}$ の時点でもまだ完全には均一になっていない。白線は、HbV-2の流動の軌跡を示し、半径11.5  $\mu\text{m}$ のところに入力したHbV-2は、100  $\mu\text{m}$ 流動時では半径9  $\mu\text{m}$ のところまで拡散し

うることを意味する。

他方、Hb溶液の拡散は非常に速く、赤色領域の変化は流動距離10  $\mu\text{m}$ の時点で殆ど終了しており、急速に均一に攪拌されたことが解る(Fig. 5B)。半径11.5  $\mu\text{m}$ のところに流入したHb-2は、100  $\mu\text{m}$ 流動時では半径3  $\mu\text{m}$ のところにまで拡散しうることを意味する。Hb-2は1 mm流動すると管中心にまで到達するが、HbV-2では25 mmの流動を要する。

#### D. 考察

本研究で明らかになった重要な点は、NO結合、CO結合、酸素放出、どの反応においても、分子状のHb溶液で見られた速い反応が、Hbを小胞体に内包させること、或はHbが赤血球内に入っていることによって、遅延されたことである。このことは、非細胞型のHb溶液の投与で血管収縮が生起し、またHbVや赤血球では血管収縮が生起しないことと関連があるものと考えられる。

溶血性疾患において、またHBOCsの研究開発において、血管内皮由来弛緩因子であるNOが捕捉されて血管収縮が生起し、血圧亢進、末梢循環障害、血管障害が誘導されることは良く知られている。COに関しては、COが肝微小循環系において弛緩因子として作動し、これが分子状のHbに捕捉されると類洞血管が収縮する。従って、本来Hbが赤血球中に存在することは、内因性のNOやCOの情報伝達物質としての機能を保持するために極めて重要であるといえる。他方、HBOCsによる酸素の促進輸送は、迅速に酸素を運搬するには有効であると考えられていたが、最近では、酸素過多になるとこれを低減しようと自動調節機能が働いて血管収縮が生起する機序が提案されている。

血漿層(RBC-free layer)は、赤血球と血管壁の間のガス拡散の障壁となることは良く知られている。非細胞型のHb溶液はこの血漿層に均一に分散することになるので、ガス反応を促進することになる。細胞型のHb小胞体は、Hb分子に比較したら大きい

が、赤血球に比較すると1/30と小さい。しかし、HbVの場合はガス反応が促進されることは無い。このことを明らかにするため、拡散のシミュレーションを行ったところ、HbとHbVでは顕著な違いが認められた。微小なHbではHbVに比較して側方拡散が速く流動中の攪拌効果も大きい。この違いが、ガス反応性に影響したと考えられる。

Table 1に示すように、HbVとRBCの反応速度定数:  $k'_{on}(\text{NO})$ ,  $k'_{on}(\text{CO})$ ,  $k'_{off}(\text{O}_2)$ には大きな隔たりがあるが、微小細管内を流動させたときのガス反応速度は同等であった。反応速度定数は、Stopped-flow rapid scan 分光法で計測しているが、この場合はHb濃度を0.0024-0.032 g/dLにまで希釈する必要がある。今回の実験では希釈せずに10 g/dLの実質的濃度での測定であり、その方がより生理的条件に近く、また粒子個々の反応速度よりも、粒子が分散する流体としてのガス反応に意味があると考えられる。HbVや赤血球は側方拡散が著しく遅くなる。赤血球は血漿層が拡散障壁になる。HbVの方がRBCよりも若干粘度が高い分、より側方拡散が低下しているのかもしれない。それによってHbVとRBCではガス反応速度に大きな差が無いものと考えられる。興味深い事に、HbとHbVの $k'_{on}(\text{CO})$ は殆ど同じであるが、細管内に濃厚溶液を流動させたときは、CO結合速度に明らかな違いがある。このこともまた、キュベット内の希薄な個々の粒子のガス反応速度よりも、粒子の濃厚な分散流体としての反応速度が重要であることを示唆する。CO, NO分子ともに、外部水槽から細管壁内を拡散して、管内に到達し、液面で直ちにHbに結合するものと考えられる。溶液の攪拌が促進されると常に新しい結合サイトが提供され、反応が促進されることになる。また、酸素放出に関しては酸素濃度勾配が最も大きい管壁近傍から酸素が消失していく。この場合も攪拌が促進されると常に濃度勾配も高くなり、酸素移動を促進させるものと考えられる。Poly<sub>B</sub>HbはHbよりも大きいので、酸素放出も遅くなることを予想したが、逆に速くなった。これは、

両者の粘度が殆ど同じ(それぞれ1.48 cP, 1.35 cP)、またPoly<sub>B</sub>Hbには37.2%ものモノマー(Hb<sub>B</sub>)が存在していること、またPoly<sub>B</sub>Hb酸素親和度が54 Torrと低く、 $k'_{off}(O_2)$ についてもHbよりPoly<sub>B</sub>Hbの方が大きいことが理由として考えられる。HbおよびPoly<sub>B</sub>Hbについて、もし粘度を増大させることが可能であれば、Stokes-Einstein式に従い粒子の拡散が抑制されるので、ガス反応速度を低下できるものと考えられる。また、粘度を増大させれば、血管壁における剪断応力が増大し、血管拡張因子の産生を増やし血管拡張に繋がる可能性もある。事実、非細胞型Hbに高粘度HESを混合したり、HbにPEG鎖を結合させることでガス反応を低減させ、微小循環を改善できることが報告されている。

本実験系の限界として、i) 管内あるいは管外へのガス移動量は、管の材質と外部のガス濃度に依存していること、ii) 内径25  $\mu\text{m}$ 、チューブ長が12cmに限定されること、iii) 外部水槽のNO, CO濃度は生理条件からは著しく逸脱していること、などが挙げられる。しかしこれらは、微小細管内における定常流の状態でのガス反応の変化を観察するためには必要な条件である。生体内において、微小血管(細動脈)の領域で相当量の酸素が血液から放出されることが知られている。その意味で25  $\mu\text{m}$ は適当と言える。なぜならば、このサイズの細動脈は、抵抗血管として酸素濃度や、剪断応力、NO濃度などに敏感に反応して、末梢血流を調節しているからである。Pageらは、ガス透過性が極めて高いシリコンゴムを利用して4mmの流路を作製し、酸素放出を観察しているが、この場合、流動時間は僅か1秒である。また彼らの論文にスペクトルは掲載されていない。McCarthyらも同様なモデルを用いて酸素放出速度を観察しているが、この場合は酸素電極を使用しており、間接的な計測といえる。我々の方法は顕微分光法によりHbのスペクトルから直接的にガス反応を観察しており、また流動するHBOCsのNO, COの結合挙動を観察したことについては初めての報告である。

血管収縮の有無について、本実験で得られたガス反応性の相違の他にも様々な要因が考えら得る。緒言でも触れたように、平滑筋近傍にまで到達できるかどうか、また肝臓の類洞血管におけるfenestrationを透過してDisse腔にまで到達できるかどうか、粒子径も重要と考えられる。

結論として、本研究では純粋に物理化学的パラメータの相違(管内における拡散性の相違)が、ガス反応速度の相違を生じ、これが血管収縮の機序の一つとして提案することができた。このガス反応速度の相違は、血管外漏出のことも考慮すると更に拡大されるものと考えられる。勿論、血管収縮の機序については生化学的観点からアドレナリンレセプターやエンドセリン-1の増大など他にも提案されているので、我々の結果をもって全てを説明する事は不可能である。しかし、少なくとも非細胞型のHBOCsがなぜ血管収縮を引き起こし、細胞型では血管収縮が無いのか説明するための一助になる。本実験では、赤血球が常に最もガス反応が遅いことが解った。赤血球は、毒性の側面のあるHbを包み込んで、ガス反応を遅延させるよう、進化の過程で設計されて来た細胞なのかもしれない。このことは、HBOCsを設計する上で極めて重要である。

#### 謝辞

本研究の推進にあたり、武岡 真司教授、奥田直人君(早稲田大学)、また山上達也氏(コベルコ科研)の協力を得た。記して謝意を表する。

## 2. Hb小胞体による疑似アレルギー反応と血行動態に与える影響に関する検討

### A. 緒言

Hb小胞体の血液適合性については、これまでに、げっ歯類、イヌ、サルを対象として検討され、特

に問題となる所見を認めていない。また、従来のリン脂質小胞体に比較して補体活性も生起しないことを確認している。しかし、いわゆるリポソーム製剤は、ブタへの投与に対して、肺動脈圧の一過性亢進など重篤な擬アレルギー性反応を呈することが Szeberi らによって報告されており (Circulation 1999;99:2302-9)、現行のHb小胞体の脂質膜についても反応性を知っておく事は重要と考える。そこで、ミニブタへの投与を行い、循環動態の計測を実施する。昨年度は、Negative controlとして、負電荷脂質にDPPGを有する空の小胞体について検討し、投与直後に顕著な血球数の変化と血行動態の変化が認められた。そこで本年度は、Hb小胞体と同一の脂質組成と、どのような反応が生起するかについて予備的な検討を行うことを目的とした。本研究は、(株)日本バイオリサーチセンターの協力を得て行った。

## B. 方法

ミニブタ(13-14ヶ月齢, 29-33kg)にアトロピン硫酸塩0.05mg/kgを頸背部筋肉内投与し、約10~30分後に塩酸ケタミン5mg/kgを頸背部筋肉内投与し導入麻酔後、吸入麻酔( $N_2O:O_2=2:1$ の混合ガス+2~3%イソフルラン)し、気管カニューレ (PORTEX) を挿入した。人工呼吸器を10~15mL/kg、15~25回/分の呼吸条件とした。血圧は、左大腿動脈より挿入したポリエチレンチューブ (PE-90) を圧トランスジューサー (TP-300T、日本光電) に接続し、歪み圧力用アンプ (AP-641G、日本光電) を介してECGプロセッサインターフェース (EP-95、ソフトロン) に接続した。心拍数は、血圧波形を瞬時心拍計ユニット (AT-601G、日本光電) に接続した。心電図標準四肢第Ⅱ誘導は、針電極より生体電気用アンプ (AB-621G、日本光電) を介して、ECGプロセッサインターフェース (EP-95、ソフトロン) に接続した。左心室内圧は、左総頸動脈より左心室まで挿入したカテーテル型トランスジューサー (5F、Millar) より歪み圧力用アンプ (AP-601G、日本光電) を介し

て、ECGプロセッサインターフェース (EP-95、ソフトロン) に接続した。左心室内圧一次微分値 (LV dP/dt) は、左心室内圧波形を微分演算ユニット (EQ-601G、日本光電) に接続した。肺動脈圧は、右総頸静脈より肺動脈まで挿入したSwan-Ganzカテーテル (AI-7167 7Fr. 110cm、Arrow International) より歪み圧力用アンプ (AP-601G、日本光電) を介してECGプロセッサインターフェース (EP-95、ソフトロン) に接続した。平均右心房圧は、Swan-Ganzカテーテルと同一部位より挿入したポリエチレンチューブ (PE-90) を右心房に到達させ、歪み圧力用アンプ (AP-601G、日本光電) を介して、ECGプロセッサインターフェース (EP-95、ソフトロン) に接続した。心拍出量はSwan-Ganzカテーテルの温度センサーを心拍出量計 (MTC-6210、日本光電) に接続し、注入口より約0℃の5%ブドウ糖液(大塚製薬) を5 mL急速投与して得られた結果を同機器のプリンターに印字した。なお、ポリエチレンチューブ及びSwan-Ganzカテーテル内は約20 unit/mLのヘパリンナトリウム加生理食塩液で管内を満した。

解析は、血圧、左心室内圧、平均右心房圧及び肺動脈圧では歪み圧力用アンプ (AP-641GあるいはAP-601G、日本光電) より誘導された信号より、心拍数では生体電気用アンプ (AB-621G、日本光電) から誘導された標準四肢第Ⅱ誘導の信号より、心電図R波をトリガーとして、また、左心室内圧一次微分最大値は左心室内圧の信号よりECGプロセッサ (SBP-2000、ソフトロン) 内で行った。血圧、心拍数、心電図標準四肢第Ⅱ誘導、左心室内圧、左心室内圧一次微分値、平均右心房圧、肺動脈圧は、レコーダ (WT-645G、日本光電) に連続して記録した。同時にデータ収録・解析システム (PowerLab、AD Instrument) に実験開始時から終了時までの測定データを記録した。

上記処置を施した後、血液ガス測定を行い、 $PaCO_2$  が 35~40mmHgとなるように一回換気量、呼吸回数を調整した。血圧、心拍数、左心室内圧及び肺動脈圧及び心電図が安定した後、右大腿静脈に挿

入したカテーテルにより、投与検体を投与し、各パラメータを測定した。

全肺血管抵抗 (Total Pulmonary Resistance、TPR) は  
 $PVR = PAP / CO \times 80$

全身血管抵抗 (Total Systemic Resistance、TSR) は  
 $TPR = [(MBP - RAP) / CO] \times 80$   
として算出した。

左大腿動脈に挿入したポリエチレンチューブ (PE-90) より、ヘパリンナトリウム処理したシリンジを用いて約2 mLの動脈血を採取し、血液を空気に触れぬように血液ガス分析装置 (AVL OPTI CCA カセットB、シスメックス) にて測定した。解析項目はPaCO<sub>2</sub>とし、1回目の投与前にPaCO<sub>2</sub>が35～40mmHgとなるように呼吸流量、回数を調節する。

投与前、投与1、3、30分後に実施する。左大腿静脈に挿入したポリエチレンチューブ (PE-90) からEDTA-2K処理したシリンジを用いて血液約1mLを採取し、多項目自動血球分析装置 (XT-2000iV、シスメックス) を用いて血小板数 (PLT)、白血球数 (WBC) を測定した。また同時に、同じポリエチレンチューブからヘパリン処理した真空採血管に血液約2mLを採取し、遠心分離[約4°C、3000rpm (1600×g)、15分間] し、血漿を得た。後日(株)エスアールエルに送付し、トロンボキサンB<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>)の測定を行った。

投与試料としては、現行のHb小胞体と同一の脂質組成について、生理食塩水に分散させてExtrusion法により粒子径制御を行い、脂質濃度を6 g/dLに調節した。また昨年度の比較試験用の試料は、現行の混合脂質組成(DHSG系)のうちDHSGをDPPGに置換したもので、作製法は全く同じである。

### C. 結果および考察

昨年度、DPPG系小胞体の投与(0.05 ml/kg, n= 3)を行い、直後に一過性に、血圧、肺動脈圧の上昇、血管抵抗の上昇、徐脈、心拍出量の低下、PLTとWBCの低下、TXB<sub>2</sub>の顕著な上昇認められ、Szebeniの報告する疑似アレルギー様症状が現れた。この

理由としては、1) 補体活性による血小板の活性化と、それによるトロンボキサンA<sub>2</sub>の産生により、末梢循環が顕著に悪化した、2) プタは肺血管内にマクロファージが存在し、これに小胞体が捕捉され一過性に肺循環に影響が出た、等が考えられる。但し、心電図では異常は全く認められず、反応としては Szebeni らの報告 (Circulation 1999;99:2302-9)よりも軽微になった可能性がある。Szebeniらの小胞体と比較して、粒子径が整っていること、また完全に無菌的雰囲気で作製した製剤であることも影響しているのかもしれない。

対して、現行のHb小胞体(DHSG系)の構成脂質からなる小胞体については、これらの反応が顕著に抑制された。従って、より生体適合性に優れると考えられる。来年度はHb小胞体についても検討する予定である。

### 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む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  $\mu\text{m}$ ). *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. Sinovcic, 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. Y. Yamanashi, M. Mori, K. Terajima, T. Tsueshita, H. Horinouchi, H. Sakai, A. Sakamoto. A transient inflammatory reaction in the lung after experimental hemorrhagic shock and resuscitation with a hemoglobin-vesicles solution compared with rat RBC transfusion. *ASAIO J.* 55, 478-483 (2009).
  12. 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).
  13. H. Sakai, N. Okuda, A. Sato, S. Takeoka, E. Tsuchida. Hemoglobin encapsulation in vesicles retards NO- and CO-bindings and O<sub>2</sub>-release when perfused through narrow gas-permeable tubes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298, H956-965 (2010).
  14. 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.
  15. 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).
16. H. Sakai, K. Sou, E. Tsuchida. Hemoglobin vesicles as a transfusion alternative. *Methods Enzymol.* 465 (Liposomes Part G) 363-384 (2009).
17. 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).
18. 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回日本生体医工学学会大会 / 東京 タワーホール船堀 / 2009.4.23-25.
5. 321. 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 O<sub>2</sub>- 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 hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
11. N. Okuda, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida. / Hb encapsulation in vesicles retards NO- and CO-bindings and O<sub>2</sub>-releasing when perfused through a gas-permeable narrow tube. / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
12. Y. Seishi, H. Horinouchi, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Effect of large volume resuscitation with the cellular type artificial oxygen carrier (Hb-vesicle) in rat model of uncontrolled hemorrhagic shock via a caudal artery. / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
13. Y. Seishi, H. Horinouchi, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Effect of large volume resuscitation with the cellular type artificial oxygen carrier (Hb-vesicle) in rat uncontrolled hemorrhagic shock model caused by blunt kidney injury. / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
14. 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 / 日本化学会第3回関東支部大会 / 2009.9.4-5
15. H. Sakai / Gas bioengineering of artificial red cells / Opening Ceremony of Waseda Bioscience Research Institute in Singapore / Biopolis, Singapore / 2009. 9.
- 14
16. 酒井宏水、宗慶太郎、土田英俊 / 細胞型人工酸素運搬体をつくる - ヘモグロビン精製から小胞体化まで - / 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.
17. 酒井宏水、岡本紀子、池田栄二、堀之内宏久、小林紘一、土田英俊 / 脳内出血モデルによるHb小胞体の脳神経組織への影響に関する検討 / 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.
18. 奥田直人、酒井宏水、武岡真司、土田英俊 / 微小モデル血管内を流動する人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)分散流体の配位子反応 / 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.
19. 田口和明、渡邊博志、門脇大介、酒井宏水、堀之内宏久、土田英俊、小林紘一、丸山徹、小田切優樹 / 出血性ショックモデルラットにおけるヘモグロビン小胞体頻回投与時の体内動態解析 / 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.
20. 勢司泰久、堀之内宏久、酒井宏水、土田英俊、小林紘一 / 制御不能尾動脈出血モデルを用いたヘモグロビン小胞体輸液蘇生の検討 / 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.
21. 堀之内宏久、泉陽太郎、酒井宏水、小松晃之、土田英俊、小林紘一 / 実験腫瘍における腫瘍酸素分圧のマッピングと人工酸素運搬体投与による腫瘍の酸素加 / 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.



22. 高橋大輔、東寛、脇田大功、藤原満博、宗慶太郎、酒井宏水、堀之内宏久、西村孝司、小林紘一、土田英俊、池田久實 / ヘモグロビン小胞体 (HbV)が免疫系に及ぼす影響 / 第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.
23. 宮里麻友美、田口和明、渡邊博志、酒井宏水、堀之内宏久、土田英俊、小林紘一、丸山徹、小田切優樹 / 四塩化炭素誘発肝障害モデルラットにおけるヘモグロビン小胞体の体内動態の検討 / 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.
24. 藤原満博、東寛、若本志乃舞、泉陽太郎、酒井宏水、堀之内宏久、土田英俊、小林紘一、武田純三、池田久實 / 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.
25. H. Horinouchi, H. Sakai, E. Tsuchida, k. Kobayashi.  
/ Research and development of hemoglobin vesicle, a cellular type artificial oxygen carrier / 20th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion, Asia / 名古屋国際会議場 / 2009. 11. 14-18.
26. H. Sakai / Artificial Red Cells / 福岡県立香住ヶ丘高校修学旅行 特別講演 / Singapore / 2009. 11. 28
27. 酒井宏水 / Gas Bioengineering of Artificial Red Cells / FBT-PBL Joint Symposium / 早稲田大学 西早稲田キャンパス / 2009. 1. 23

## 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：Hb 小胞体の GMP 製剤製造方法の確立

分担研究者	甲斐 俊哉	ニプロ株式会社	医薬品研究所	研究所長
研究協力者	西田 誠司	ニプロ株式会社	医薬品研究所	製剤研究部 部長
	片山 直久	ニプロ株式会社	医薬品研究所	製剤研究部製剤第三研究室 室長
	横江 淳一	ニプロ株式会社	医薬品研究所	製剤研究部製剤第三研究室
	山根 恒彦	ニプロ株式会社	医薬品研究所	製剤研究部製剤第一研究室
	松田 健作	ニプロ株式会社	医薬品研究所	製剤研究部製剤第一研究室
	山本 尚志	ニプロ株式会社	医薬品研究所	薬理研究部

## 研究要旨

弊社研究所にて Hb-V の実製造のための製法確立の検討を行っており、混合脂質の定量法について既存の方法（ODS カラムと示差屈折計検出による HPLC 法）を再構築し分析パラメーターを確認した。ヘモグロビン共存下（工程中および Hb-V サンプル）の脂質定量法を検討した。その上でリポソームの可溶化と溶媒添加による脂質溶解と蛋白除去を行うサンプル処理により、溶媒抽出による分析精度の低下、労力などの問題を改善した。その結果、ヘモグロビン共存下においても同様に混合脂質の 4 成分が定量可能となり、また脂質測定キット（酵素法）による定量法での妥当性も確認できた。基本的に工程中サンプルの脂質成分の定量が可能となった。

## A. 目的

Hb-V の製造管理において、主要原料である脂質の収支をトレースすることは、リポソームの挙動を理解するとともに、製品の適正な品質管理において重要である。

ヘモグロビンと混合された脂質の定量は、従来臨床検査用の脂質測定キット（酵素法）を利用した方法によるレシチン（DPPC）とコレステロールしか測定することが出来ず、他の2成分である PEG-DSPE と DHSG は明らかに出来なかった。Hb-V の品質評価においてリポソームのステルス性の物質的な裏付けを定量的に行うため、4成分を同時に分離定量できる ODS カラムと示差屈折計検出による HPLC 法がオキシジェニクスにおいても実施されていた。しかしサンプル処理には凍結乾燥による水除去や溶媒抽出法を用いていたため、抽出の再現性や処理時間などの点で労力を要し実用性が必ずしも高くなかった。

そこでまずこの HPLC 法を弊社においても再構築し、定量分析としての分析能を評価した。続いて、サンプルの前処理法に検討を加えて分析の所要時間の短縮と再現性の向上を目指した。この過程において酵素法での Hb-V の可溶化も再検討した。

## B. 方法

### 1. HPLC 法の評価

1) 脂質分散液の HPLC による脂質定量は以下の方法に依った。

試験条件

検出器；示差屈折計

カラム；Cadenza CD-C18 150 mm×4.6 mmI.D.

(3 μm) Imtact 社製

カラム温度；40 °C

移動相；メタノール：テトラヒドロフラン：蒸留水：トリフルオロ酢酸（950：30：20：1）

流速；1.0 mL/min

注入量；10 μL

### 2) 脂質分散液の調製

Hb-V の製造原料である混合脂質（DPPC, Chol, PEG-DSPE 及び DHSG からなる混合物）の標準溶液を調製した。

混合脂質 6.0 g をとり、蒸留水 291 mL を加えた後、1 mol/L 水酸化ナトリウム 8.9 mL を添加した。液温を 40 °C 付近にした後、ホモミキサーにて 16000 rpm 10 分間攪拌して脂質分散液を調製した。

脂質分散液（混合脂質濃度として 20 mg/mL）100 mL をとり、凍結乾燥機により水を完全に除去した。その後、凍結乾燥粉末 1.0 g をとり、クロロホルム：メタノール（2：1）で溶解し、全量を 10 mL としたものを測定試料溶液とした。

### 3) 分析能パラメーターの評価

DPPC, Chol, PEG-DSPE 及び DHSG それぞれの検量線を各試験方法に応じて作成することとした。DPPC を 1682.8 mg, Cholesterol を 771 mg, PEG-DSPE を 86.7 mg 及び DHSG を 312 mg 別々に秤取し、クロロホルム：メタノール（2：1）を添加して溶解し、全量を正確に 20 mL とした。この液をクロロホルム：メタノール（2：1）を用いて希釈系列を調製した。標準溶液及び希釈系列 10 μL につき、上記の条件で試験を行った。

### 2. サンプル処理法の検討

1) リポソーム可溶化法の検討では、酵素法の前処理として可溶化剤に n-オクタノール-β-D-グルコシド（TG, 同人化学）を使用した。

Hb-V 懸濁液（ヘモグロビン濃度約 100 g/L）を蒸留水で 5 倍希釈したサンプルに種々濃度の TG 溶液

を添加し、室温にて5分間放置した。この液につき常法により脂質測定キット(酵素法)を用いてDPPCおよびコレステロールを測定し、吸光度の安定するところからTG濃度を決定した。その後はこの条件にて測定した。

2) HPLC法サンプルの前処理では、Hb-V懸濁液1 mLに62 mg/L TG液を等量加え良く攪拌し可溶化する。ここに2-プロパノールを2 mL徐々に加えてさらに攪拌してヘモグロビンを凝集させるとともに凝集塊が大きくなるようにした。これを3000 rpmで5分間遠心処理し、その上清を回収し、さらに残液を2-プロパノールで洗い込み、5 mLにメスアップした。この液につき異物ろ過のためろ過後、HPLCにて分析した。

### C. 結果及び考察

#### 1. HPLC法の評価

混合脂質を100 mg/mLで溶解した標準溶液10 μLにつき測定を行った。得られたクロマトグラフを図1に示す。

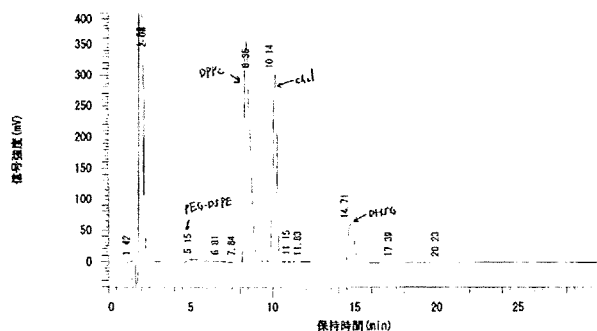


図1 標準溶液のクロマトグラム

示差屈折計で測定した結果、全ての脂質成分が検出され、かつ単一のピークにて分離可能であった。なお、UV検出ではPEG-DSPEは検出できなかった。

次に分析能パラメーターとして、「特異性」、「直線性」、「範囲」、「検出限界」及び「定量限界」を調べた。

以下には代表として、DPPCとPEG-DSPEについて示す。他の2成分も同様の結果を得た。

#### 「特異性」

混合脂質を100 mg/mLで溶解した標準溶液及び脂質各成分をそれぞれ標準溶液と同濃度になるように溶解したサンプル10 μLにつき測定を行った。ブランク及びDPPCとPEG-DSPEについて示す。得られたクロマトグラムを図2-1~2-3に示す。

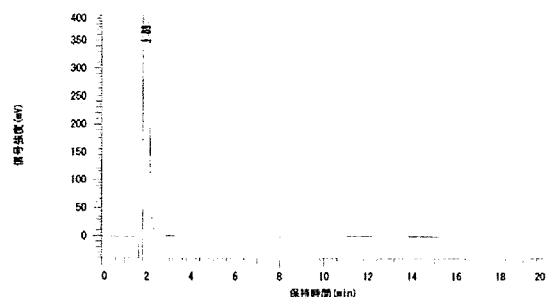


図2-1 ブランクのクロマトグラム

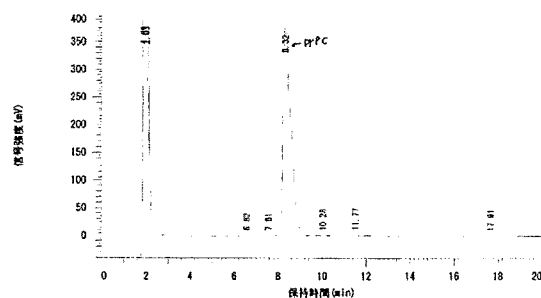


図2-2 DPPCのクロマトグラム

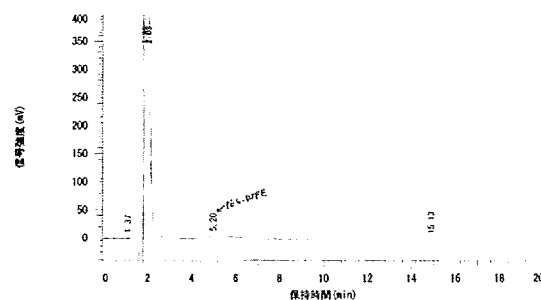


図2-3 PEG-DSPEのクロマトグラム

分析対象物であるDPPC、Chol、PEG-DSPE及び