

(Fig. 10). 一方, HbV 蘇生 7 日後においては, HbV 蘇生後 4 日目ほどの補体価の低下は確認されなかった. これらの結果より, HbV 蘇生 4 日目は, 2 回目投与された HbV が補体の活性化によりオプソニン化されること, つまり ABC 現象が誘導されたことにより血漿中濃度の減少が起こったのではないかと推察される. 一方, HbV 蘇生 7 日目には, これとは別の経路で血漿中濃度の減少が起こった可能性が示唆された.

2-5. 食食活性

ABC 現象の誘導を考える場合, 抗リポソーム

IgM による補体価の低下の他に, Kupffer 細胞を初めとした細網内皮系細胞の食食活性が鍵を握っている. そこで次に, 細網内皮系細胞の食食活性を評価することができるカーボンクリアランス法を用いて, HbV で出血性ショックモデルラットを蘇生後 4 日目及び 7 日目の食食活性を測定した. その結果, 食食活性は HbV 蘇生後 4 日目において健常時の約 1.5 倍, 一方, HbV 蘇生 7 日後では, 約 2 倍に上昇していた (Fig. 11). これらの結果より, HbV 蘇生 4 日目の血漿中濃度の減少は, 補体活性による HbV のオプソニン化だけではなく, 食食活性の上昇も関与していることが推察された. また, HbV 蘇生 7 日目に起こった血漿中濃度の減少には食食活性の上昇が重要な役割を果たしている可能性が示唆された.

3. カニクイザルにおける安全性評価

3-1. 一般状態

すべてのカニクイザルにおいても HbV 投与による摂餌量, 体重などに特記する異常は確認されなかった. また, HbV 投与後から観察終了日 (投与後 14 日目) まで, HbV 投与によるショック症状や瀕死状態あるいは死亡した例はなかった.

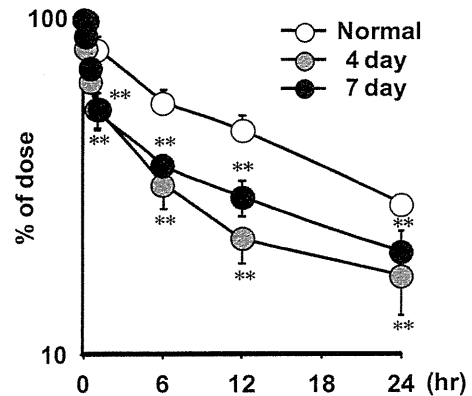


Figure 8 Plasma concentration curve of ^{125}I -HbV after administration to normal (opened circles), HS_{4day} (gray circles) and HS_{7day} (closed circles) rats at a dose of 1400 mg Hb/kg. Each point represents the mean \pm SD (n=5). ** p<0.01 vs. normal rats. HS; hemorrhagic shock.

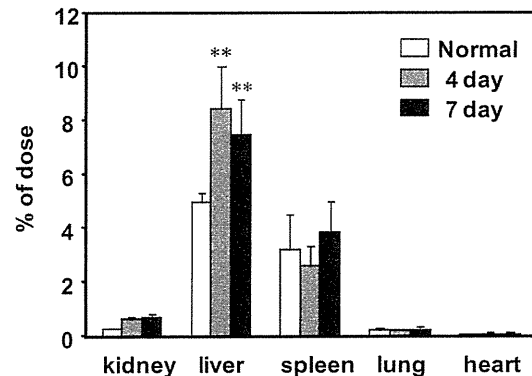


Figure 9 Tissue distributions of ^{125}I -HbV at 24 hr after administration to normal (opened column), HS_{4day} (gray column) and HS_{7day} (closed column) rats at a dose of 1400 mg Hb/kg. Each point represents the mean \pm SD (n=5). **p<0.01 vs. normal rats. HS; hemorrhagic shock.

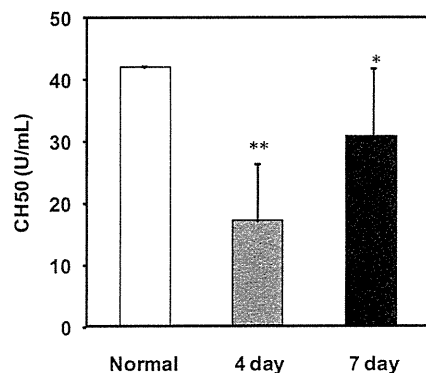


Figure 10 The measurement of complement activity in normal (opened column), HS_{4day} (gray column) and HS_{7day} (closed column) rats. Each bar represents the mean \pm SD (n=5). *p<0.05, **p<0.01 vs. normal rats. HS; hemorrhagic shock.

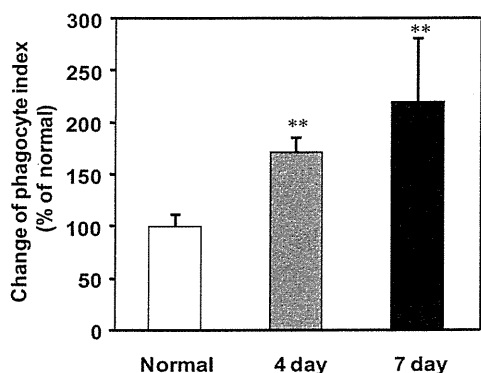


Figure 11 The phagocyte index in normal (opened column), HS_{4day} (gray column) and HS_{7day} (closed column) rats. Carbon clearance was estimated, and K was calculated from the clearance of carbon particles. Each bar represents the mean \pm SD (n=5). **p<0.01 vs. normal rats. HS; hemorrhagic shock.

3-2. 血圧

これまでに開発されてきた非細胞型 Hb-based oxygen carrier (HBOCs) を投与した際、一酸化窒素の捕捉により、血圧の上昇が引き起こされた。そこで、HbV を投与した際の血圧の変化を HbV 投与終了後 1, 6 時間、1, 3, 7, 14 日目に評価を行った。その結果、いずれの時間においても HbV 投与による収縮期及び拡張期血圧に変化は確認されなかった。(data not shown)

3. 血液ガス

HbV 投与による血液ガスへの影響を評価するために、HbV 投与前、HbV 投与終了後 1, 3, 7, 14 日目に酸素分圧 (pO₂)、炭酸ガス分圧 (pCO₂)、pH の測定を行った。その結果、投与前と比較して各血液ガスパラメータの有意な変化はなく、アシドーシスなどの異常は認められなかった。(data not shown)

4. 血清生化学検査

HbV 投与による血液生化学的検査値への影響を評価するために、HbV 投与前、HbV 投与終了後 1, 3, 7, 14 日目に Figure 12 に示す全 12 項目について評価を行った。その結果、投与前と比較

して、AST・ALT の一過性の上昇が確認された。また、脂質関連パラメーター (リン脂質・トリグリセリド・総コレステロール・HDL-コレステロール) においては、HbV 代謝による影響と考えられる経時的な上昇が確認された。

5. 体内動態

HbV を含む血液は遠心分離処理することにより血漿分画に HbV が残存するため、HbV は赤血

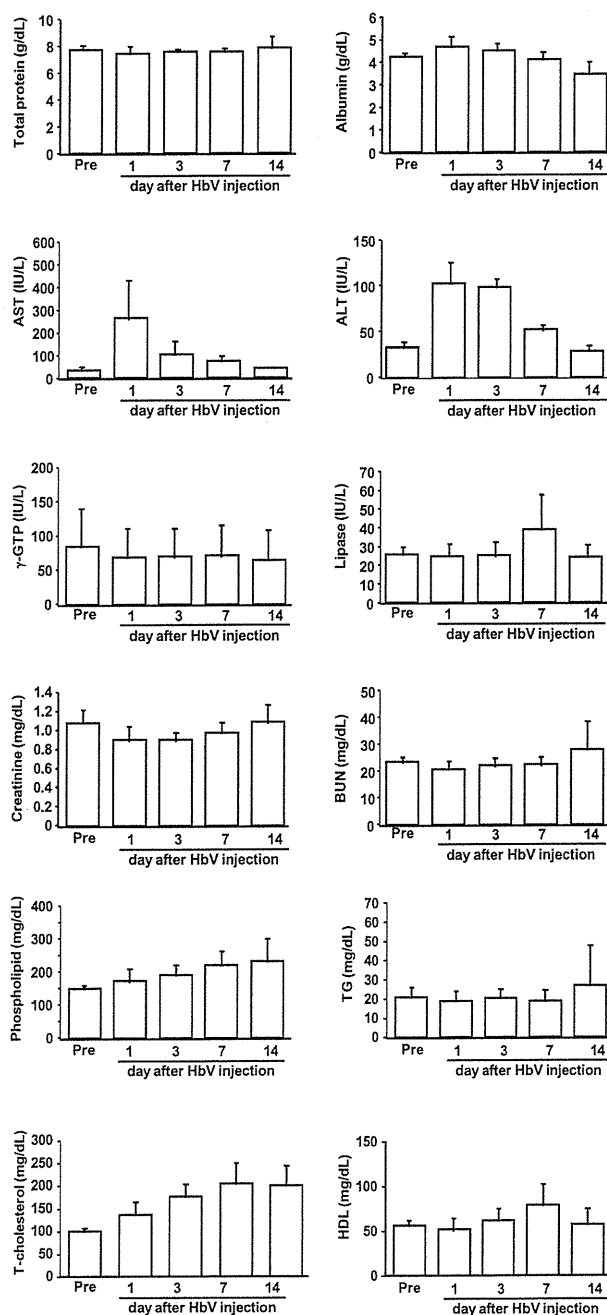


Figure 12 The changes of laboratory parameters in male cynomolgus monkeys. Each point represents the mean \pm SD (n=4).

球との分離が容易に行える。そこで次に、HbVの血中動態を検討するために血漿中ヘモグロビン濃度を測定することで、HbVの血中動態を評価した。その結果、HbV投与12時間後まで一定の血中濃度を示し、消失の飽和現象が見られた。しかしながら、投与12時間以降ではHbV血中濃度は減少し、投与168時間後には血中からほとんどが検出されなかった (Fig. 13)。これらの結果より、HbVは霊長類 (カニクイザル) においても十分な血中滞留性を有し、また、血中蓄積性もないことが確認された。

D. 総括

今回の検討により、(i) HbVの肝疾患時における体内動態評価、(ii) 出血性ショックモデルラットにHbV頻回投与時での体内動態評価、(iii) カニクイザルにHbVを臨床推奨量である1400 mg Hb/kgで投与した際の安全性の評価を行った。

その結果、HbVは病態時・頻回投与時において体内動態特性は変動するものの、生体蓄積性はないことが確認された。しかしながら、病態時・頻回投与時における投与設計が必要である可能性が示唆された。加えて、カニクイザルに対し、HbVを臨床推奨量である1400 mg Hb/kgで投与しても、瀕死状態あるいは死亡する例はみられず、また、投与前後で血圧・血液ガスの変化に特記する異常は確認されなかった。一方、血清生化学検査においてHbVの代謝に伴うAST・ALTの一過性の上昇及び脂質関係のパラメーター (リン脂質・トリグリセリド・総コレステロール・HDL-コレステロール) の経時的な上昇が確認された。

今回得られた知見は、HbVが現行の輸血システムで用いられた場合を想定しており、臨床試験へ向けての有用な基礎資料になるものと考えられる。

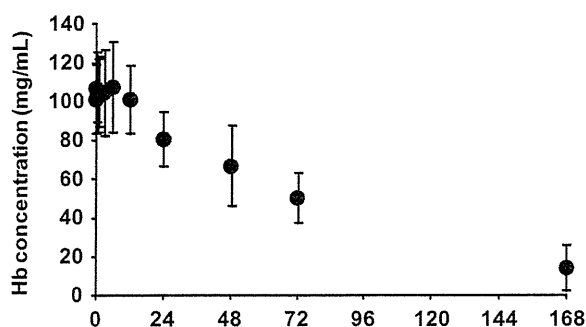


Figure 13 Plasma concentration of hemoglobin after administration of 1400 mg Hb/kg via injection of male cynomolgus monkeys. Each point represents the mean \pm SD (n=4).

12. ヘモグロビン小胞体の表面膜における電解質成分の透過性の検討

A. 研究目的

細胞型人工酸素運搬体 (HbV) を使用した患者の血清中電解質濃度測定時の安定性を確立するとともに、水分子、Na,K,Cl の HbV 表面膜透過性に関して研究する。

B. 研究方法

1) HbV現役の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-200FRNEO:T法) とで測定するとともに、施設の倫理委員会の承認が得られた研究協力者から得られた血清にその濃度が40%になるようにHbVを混合、その血清中のNa⁺, K⁺, Cl⁻濃度の上記2法による測定値を比較した。また、蒸留水を包埋したりポソームに所定濃度の食塩液を添加してNa⁺, Cl⁻濃度を測定した。

2) 蒸留水を内包し蒸留水内に分散させた上記リポソーム粒子と、0.4%アルブミンを含有した0.84%食塩液とを混合、経時的に168時間目までその電解質濃度をV法にて測定した。また、上記リポソーム粒子エマルジョンと4%アルブミンを含有した0.84%食塩液と混合、3時間後まで経時的に電解質濃度をV法にて測定した。

C. 研究結果

1) 血清電解質測定の際にはHbVが40%混合されたサンプルについて測定が可能であった。しかし、T法では10%以上のHbV混入下では測定不能であった。一方蒸留水包埋リポソーム25%容量以下の混入以下の混合においてはV法、T法ともに測定可能であることが認められた。

2) 蒸留水内包のリポソーム粒子を0.4%アルブミン含有0.84%食塩液と混合した場合、3分以内にリ

ポソーム粒子内水分によって外液が希釈され、予想される濃度に各電解質濃度が低下した。一方、4%アルブミンを含有した0.84%食塩液と混合した場合には3時間後まで予想された初期希釈濃度から変化がなかった。

D. 考察

1) 血清電解質濃度測定でT法ではリポソーム粒子にヘモグロビンが含有されることによって干渉されるがその詳細な機序は不明であった。

2) HbVに使用されるリポソーム膜は消失浸透圧の作用を受けて少なくとも3分以内に内部の水分を透過させることが認められた。しかしさらにその正確な時間決定には測定方法を改良すべきことが認められた。

E. 結論

HbVが混入した血液サンプルについても電解質測定は可能であることが確認された。また、水分子は速やかにリポソーム膜を通過するが、Na,Kは変化が遅れるので、HbV作製後に分散液の電解質濃度の経時的測定が必要と思われた。今回作成した計画でHbVに対する第一相治験を安全にかつ倫理性を踏まえて施行できると思われた。

13. ヘモグロビン小胞体の臨床応用を踏まえた 第一相治験計画の策定

A. 研究目的

HbVの臨床応用を踏まえ、その第1相治験計画を作製することを研究目的とした。

B. 研究方法

1) 我が国でHbVの臨床応用に関心を持つ臨床教室の研究者を訪ねて将来にHbVの治験第二相を実行する場合、その対象症例（疾患、病態、あるいは社会的環境条件を含む）について訊ねた。

2) それらの対象症例で第二相治験施行の場合、その基盤となる第一相治験での生理、生化学的検査を厚生労働省の副作用報告指針を中心に検討、選択した。

3) このような条件の第一相治験計画を過去に行われた各種新薬開発の過程、とくに被験者人数、施行期間を参考に検討した。

C. 研究結果

1) 上記対象臨床教室での結果を総合し、(1) 外傷性出血治療のために救急外来に搬送された患者、(2) 予期せざる手術性大量出血を生じ、供給血液に不足を来した患者、(3) 希釈性自己血輸血を志向する患者、(4) 宗教上の信条に基づき、一般的な輸血を受け入れられない患者、を対象として第二相治験が可能であるとの結果を得た。ただ、上記(1)、(2)においてはHbV使用についてのインフォームドコンセントをいかに得るか問題があるとの指摘を受けた。

2) 第一相治験において安全性の確証を必要とする点では(1) HbVを第二相治験で使用できる使用量上限の確立、(2) 基本となる循環、呼吸機能の安全性の確立であった。そしてその基本として平成4年に厚生省が提示した新薬の副作用報告を参考とすることが適切であると認めた。

3) 安全性を確保するために投与量を10mlから200mlまでの単独投与を有害事象の発生のないことを順次確認しつつ施行し、その治験数は計8例をした。

4) 次の400ml投与ではそれに伴う循環血液量負荷を避け、対象者の血液と等量のHbVの交換を6症例にて行う計画とした。

5) 第二相治験をふまえて等量HbVにその半量のヒドロキシ澱粉液を添加し、被験者の600ml、800mlの血液との交換をそれぞれ8例にて施行する計画を立案した。

D. 考察

1) HbVの最小投与量を10mlとしたのは薬物アレルギー反応が発生する場合にはきわめて少量（たとえば0.1～0.5ml）でも発生することを考慮した。また、一般に悪物アレルギー反応は注入2～3分以内に発生するため、その注入時間も20分とした。これにより、HVの注入はこの間に1.0から1.5mlにとどまることとなった。したがってこの注入量・速度は最も慎重を期したものと思われた。

2) HbVの分散媒は生理食塩水で、その2/3は注入後速やかに血管外へ流出し、HbV単独の等量交換のみでは被験者の血液量減少を来す危険性があると想定したため、600ml以上のHbVと被験者の血液交換ではヒドロキシ澱粉液を添加した。

3) 検査項目ではHbVに対するアレルギー反応を感知する項目（肺機能、動脈血酸素飽和度）をHbV単独投与群でHbV投与量が600ml以上では全身酸素供給量の指標としての中心静脈酸素飽和度、血液乳酸値を採用した。一方、HbV投与にともなうサイトカインあるいはアラキドンサン代謝物発生に関する検査は採血量の増加を考慮して回避した。

はじめに施行した諸検査からそれらの遊離、発生が疑われた場合には新たな追加試験の設定をすることとした。

E. 結論

上記臨床第1相治験計画では第1にHbVの投与量、投与方法を持って被験者の安全性の確保をし、第2に最小限の検査項目を採用してHbVに対する生体反応を知ること努め、第3に被験者数を最小として研究施行上での倫理性を全うした。これにより第二相試験が十分行える基礎を作ることができたと判断した。

1 4. ヘモグロビン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

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).

(MFG, Gelofusin™, 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™, Mw 70 kDa, 6 wt%)は杏林製薬から購入した。HES₁₃₀ (Voluven™, 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 (Hextend™, 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、ボ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。

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

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、 M 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, コーンとプレートとの角度1°であった。測定は25℃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 10^3 から 10^{-4} 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。

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

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。

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

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。

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

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 $R_h, R_g, \eta_{V_{ex}}, \eta_{V_{ex}}, \eta_{C_i}$, および η_{C_i} に対してプロットした。ここで、肩の記号 Π 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らによつてはじめて提唱され、粒子と高分子の位置的関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。

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

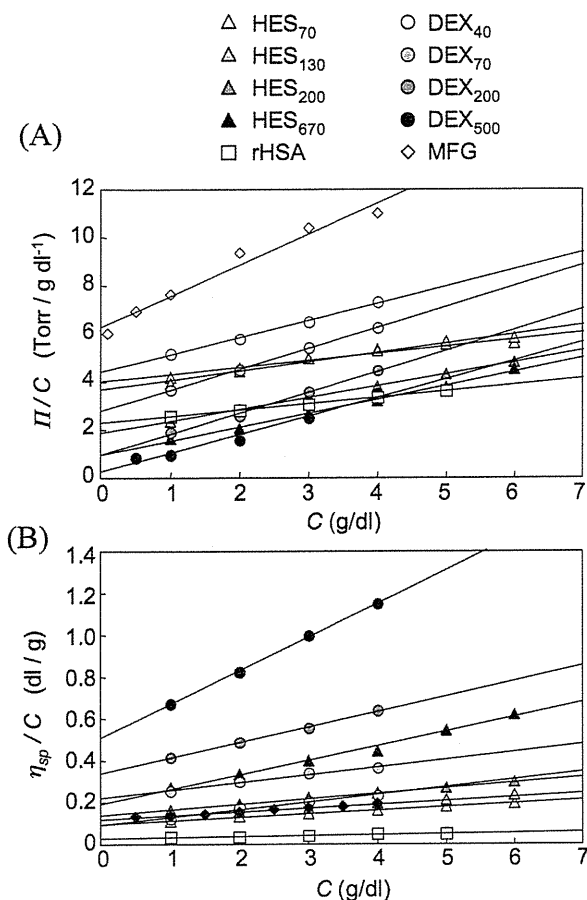


Figure 1. (A) Colloid osmotic pressure data shown as Π/C versus C , where Π is the colloid osmotic pressure (Torr) and C is the polymer concentration (g/dL). (B) Viscosity data of polymer solutions are shown as η_{sp}/C versus C , where η_{sp} is the specific viscosity (cm^2/s) and C is the polymer concentration (g/cm^3).

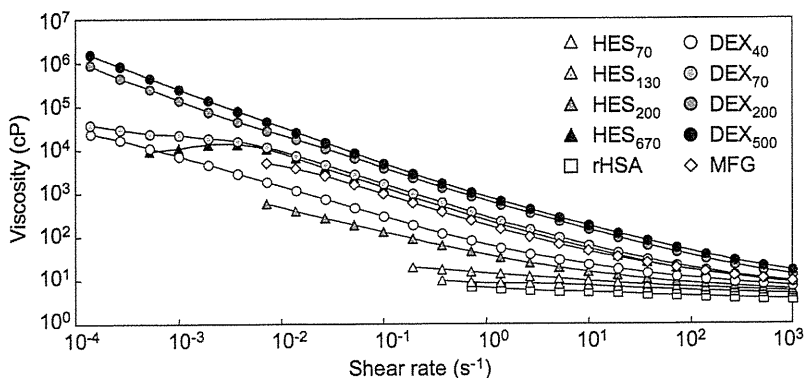


Figure 2. Viscosity of HbVs suspended in various water-soluble biopolymers. $[\text{Hb}] = 10 \text{ g/dL}$, 25°C .

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。

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。 ${}^{\Pi}V_{ex}$, ${}^{\eta}V_{ex}$, ${}^{\Pi}C_i$, ${}^{\eta}C_i$ 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

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)	${}^{\Pi}V_{ex}$ (nm ³)	${}^{\Pi}C_i$	R_h (nm)	${}^{\eta}V_{ex}$ (nm ³)	${}^{\eta}C_i$
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

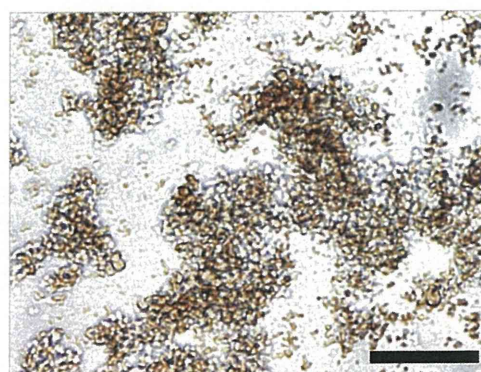


Figure 3. Microscopic view of the flocculates of HbV when suspended in DEX₅₀₀. The scale bar is 100 μ m.

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

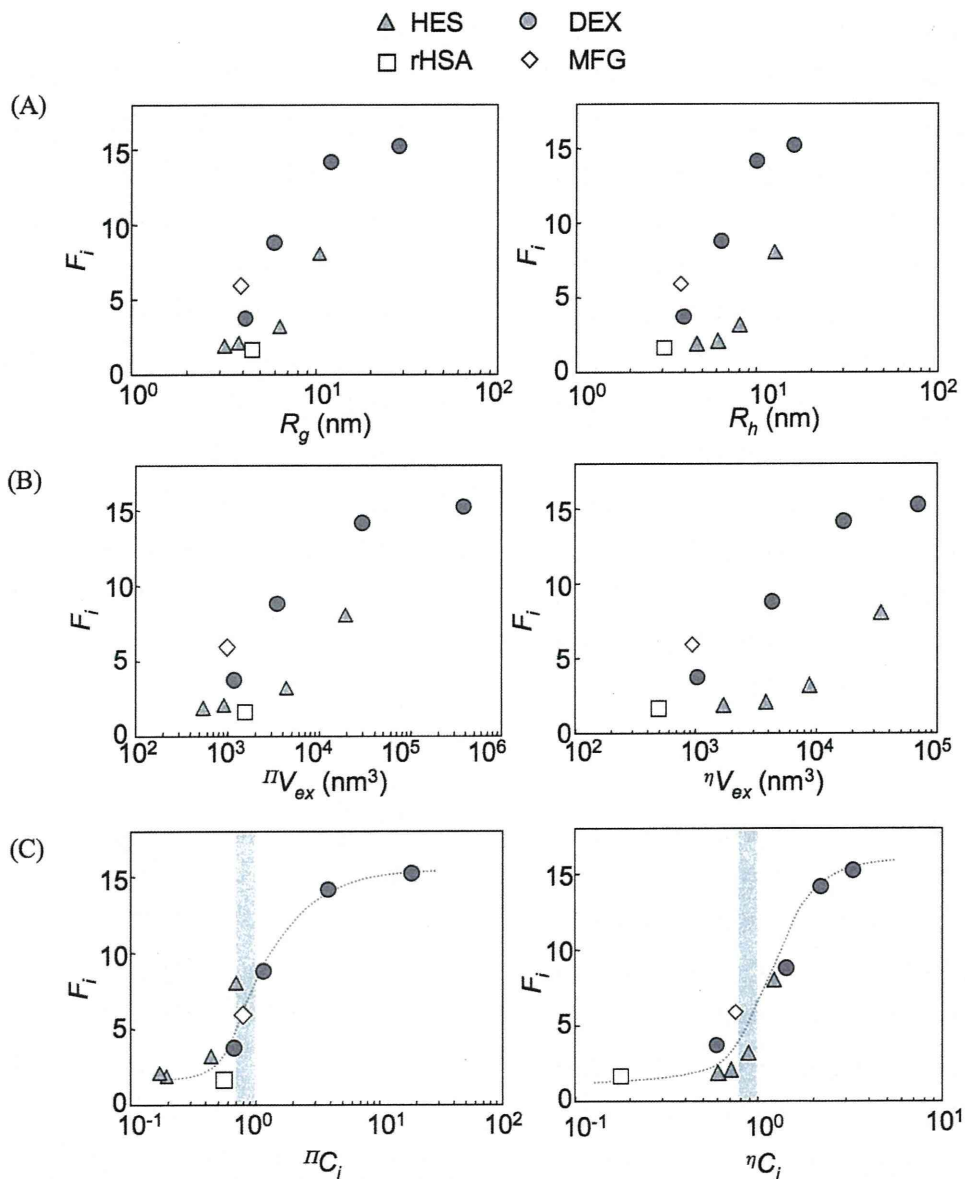


Figure 4. Flocculation index (F_i) values of HbVs suspended in water-soluble polymers are shown against (A) polymer sizes R_g and R_h , (B) excluded volumes of one polymer chain, ${}^{\pi}V_{ex}$ and ${}^{\eta}V_{ex}$, and (C) the crowding index of the polymer solution, ${}^{\pi}C_i$ and ${}^{\eta}C_i$.

た。Fig. 4Bには、高分子の排除体積(${}^nV_{ex}$)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 nC_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 ${}^nV_{ex}$ が0.6を超えるあたりから増大し始め、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、

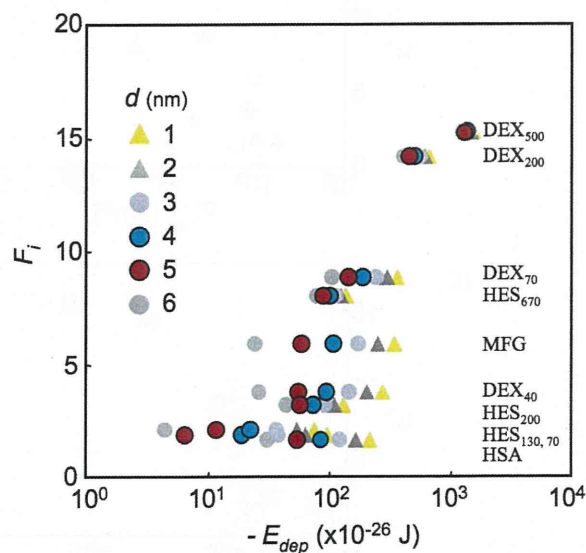


Figure 5. Flocculation index (F_i) of HbVs suspended in water-soluble polymers is shown against depletion energies ($-E_{dep}$) calculated assuming that the surface distance, d , of flocculated HbVs is 1–6.

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

機序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 ${}^{\prime\prime}V_{ex}$ と ${}^{\prime}V_{ex}$ 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 R_g 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 R_g 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 ($M_w = 340$ 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。

1 5. 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、O₂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、ストップフロー-ラピッドスキャン分光法や、

Table 1. Physicochemical properties of HbV, Poly_BHb, Hb, and RBC.

	HbV	Poly _B 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 ₂ S ₂ O ₄	32	119	84	4.4
P ₅₀ (Torr)	25-28	54	26	27
Size	279 nm	87-502 kDa ^c	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 O₂-releasing rate constant; P₅₀; oxygen partial pressure at which Hb is half-saturated.

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 $2\mu\text{M}$ (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($4\text{--}10\text{ g/dL}$)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 $25\text{ }\mu\text{m}$)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、同じモデルを用い、 O_2 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_BHb, 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 $\text{PLP/Hb} = 4$ 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、重合ウシHb (Poly_BHb, 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_BHb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)。

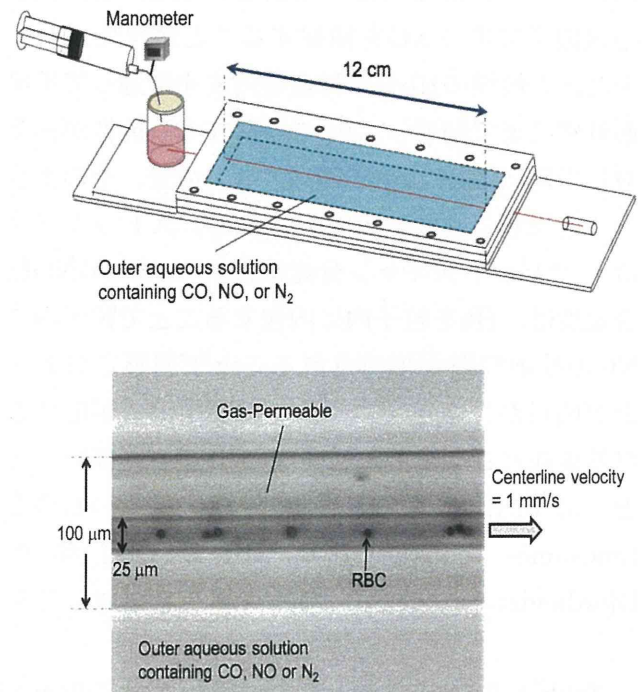


Fig. 1. (Top) Experimental setup of a gas-permeable artificial narrow tube (red line) immersed in a water bath (light blue) made by the gap between two transparent acrylic plates with a rubber supporting plate. One end of the narrow tube was connected to a reservoir (pink colored) of the Hb containing suspension. The reservoir is pressurized by N_2 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_2 , low concentration CO, or NO gases. The wall thickness, $\{(100\text{--}25)/2 = 37.5\text{ }\mu\text{m}\}$, 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.

本実験で用いた微小細管(内径25 μm , 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ー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。リザーバー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、リザーバー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_BHb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。水槽には亜ニ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%; N₂, 95.3%)あるいはCOガス (CO, 14.14%; N₂, 85.86%)で通気した亜ニチオン酸水溶液で満した。

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)に顕微分光スペクトル装置(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。

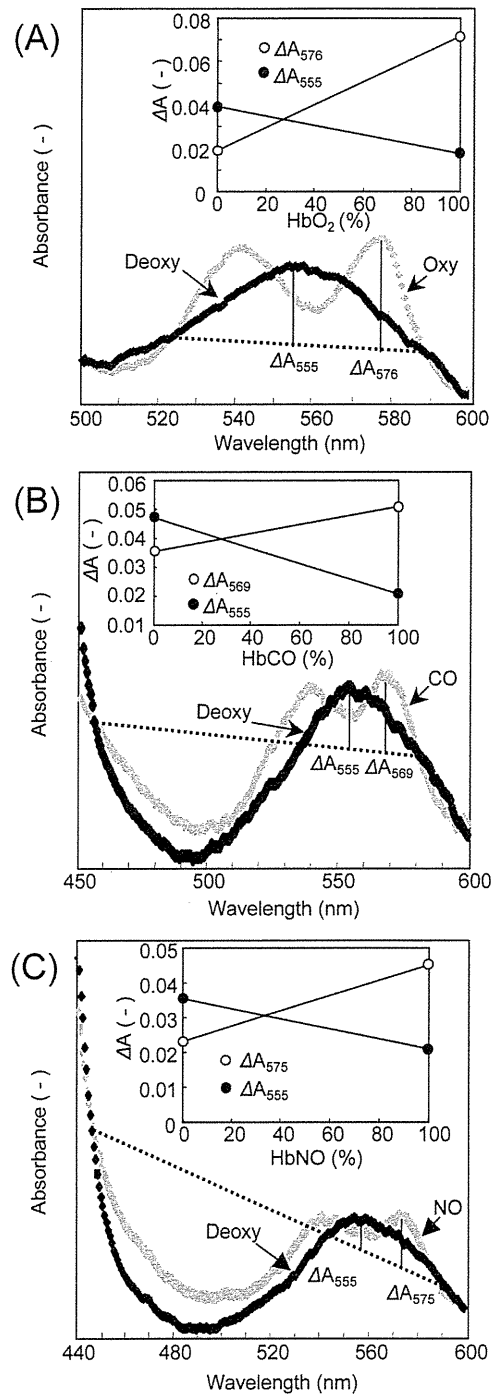


Fig. 2. Calculation of reaction levels (A) HbO₂, (B) HbCO, and (C) HbNO from the absorption changes. For the oxygen saturation determination, for example, two isosbestic points of the spectra of deoxygenated (deoxy-) and oxygenated (oxy) HbVs (at 522 and 586 nm) were connected by a straight line (baseline). Based on absorbances at 555 (ΔA_{555} , λ_{max} of deoxyHb) and 576 (ΔA_{576} , λ_{max} of oxyHb) nm from the baseline, linear relations between the level of HbO₂ (%) and ΔA_{555} and ΔA_{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 HbO₂. The levels of HbCO (B) and HbNO (C) were calculated similarly.

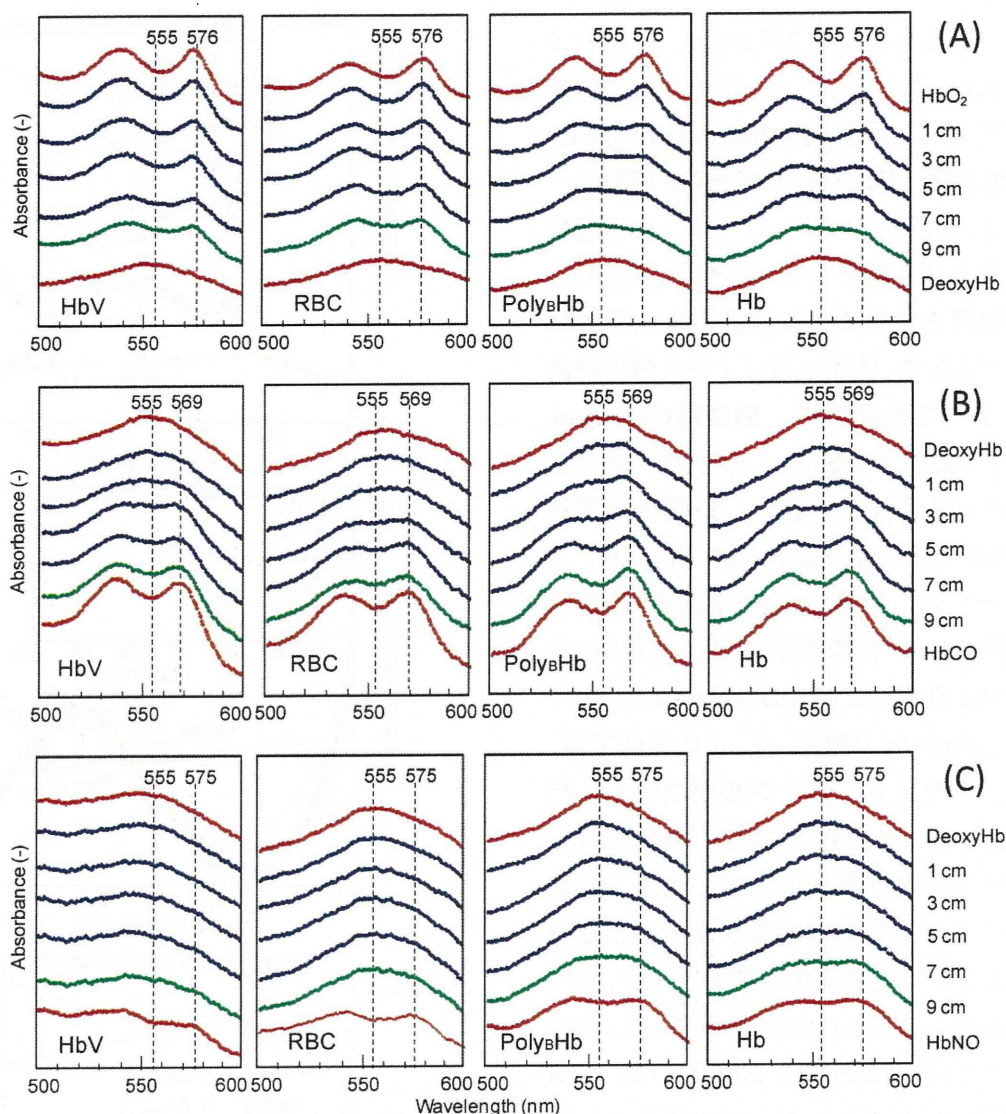


Fig. 3. Spectroscopic changes in *Q* bands of the Hb containing fluids by perfusing through the narrow tube at the traveling distances of 1 – 9 cm. The red plot lines represent the absorption spectroscopy of 0% and 100% reactions. The green lines represent the spectroscopy at 9 cm traveling distance. **(A)** Measurement of O₂-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

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硝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} , λ_{\max} deoxyHb) および 576 nm (A_{576} , λ_{\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、

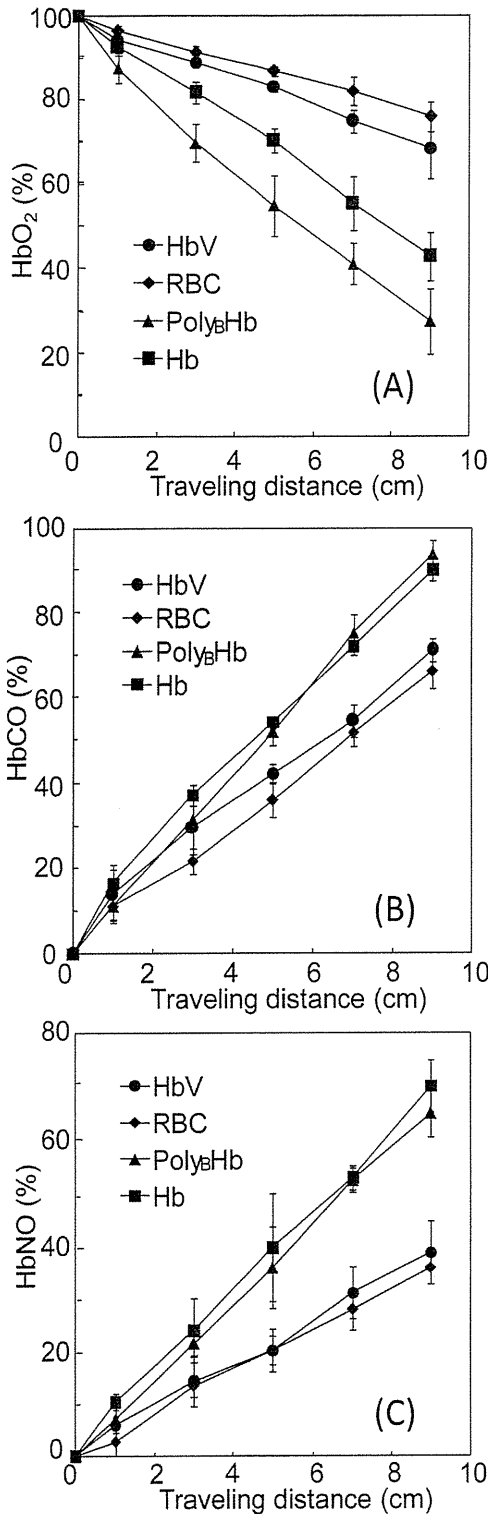


Fig. 4. The change of the level of ligand reactions of the Hb containing fluids, HbV (circle), RBC (rhombic), PolyβHb solution (triangle), Hb solution (square), and RBC (rhombic) with traveling distance. (A) Levels of O₂ release. (B) Levels of CO-binding. (C) Levels of NO-binding. The levels of the reactions are calculated from the data in Fig. 3.

水槽溶液中には135μM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 nm)を直線で結びベースラインとし、555 nm (A_{555} , λ_{max} deoxyHb)および569 nm (A_{569} , λ_{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O₂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88μM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} , λ_{max} deoxyHb)および575 nm (A_{575} , λ_{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O₂放出、CO結合の場合と同様に行った。

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 μmまでの領域に流入し、Component-2は、半径11.5 μmから管壁(半径12.5 μm)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 μm)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、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. O₂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、HbO₂由来の2つの吸収ピーク(λ_{\max} , 541, 576 nm)の吸光度が低下し、deoxyHb由来のピーク(λ_{\max} , 555 nm)の増大が見られた(Fig. 3A)。特にPoly_BHb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_BHb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、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、

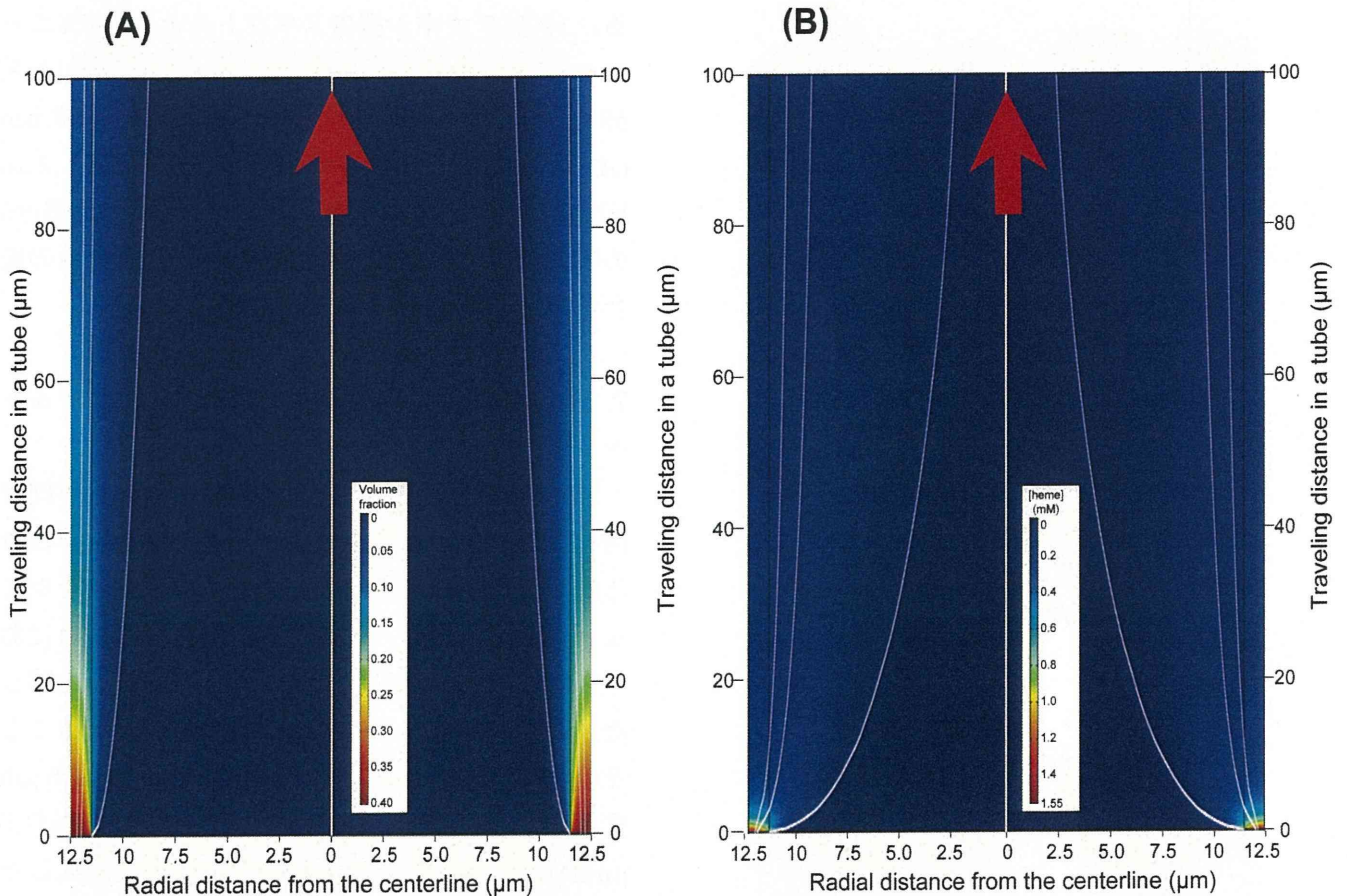


Fig. 5. Schematic representation of the simulated density distribution and track of Hb molecule in a narrow tube (< 100 μm traveling distance). We assumed that two different solutions with the same physicochemical properties enter and flow through the same tube. The radius of the tube was 12.5 μm: component-1 (blue color) enters the core of the tube (radial distance from the centerline, 0–11 μm), and component-2 (red color) enters near the wall (radial distance from the centerline, 11–12.5 μm). 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 [Hb] = 10 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 ([heme] = 1.55 mM at [Hb] = 10 g/dL).