

Poly_BHbとSFHbは94±3%および90±3%のCO化率にまで到達したが、HbVおよびRBCsはそれぞれ71±3%と66±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_BHb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_BHbは9 cm流動の時点で、NO結合率がそれぞれ70±5%、65±5%にまで到達したが(Fig. 4C)、RBCsとHbVはそれぞれ36±3%、39±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100μm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 μmのところに入力したHbV-2は、100 μm流動時では半径9 μm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 μm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 μmのところに入力したHb-2は、100 μm流動時では半径 3 μmのところ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じし、またHbVや赤血球では血管収縮が生じ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じし、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、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: $k'_{on}(NO)$, $k'_{on}(CO)$, $k'_{off}(O_2)$ には大きな隔りがあるが、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 $k'_{on}(CO)$ 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。

PolyBbHb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PolyBbHbには37.2%ものモノマー(Hb_B)が存在していること、またPolyBbHb酸素親和度が54 Torrと低く、 $k'_{off}(O_2)$ についてもHbよりPolyBbHbの方が大きいことが理由として考えられる。HbおよびPolyBbHb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 μm 、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 μm 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。

16. 混錬法によるヘモグロビン小胞体の効率の高い製造法の検討

A. 緒言

リン脂質小胞体の製造方法としては、超音波照射法、有機溶媒を用いる逆相法、界面活性剤を用いて分散させた後これを透析で除去する方法などが知られている。しかし、Hbのような機能蛋白質を扱い、且つ、血管内投与を前提とした製剤の製造においては、工程中の蛋白質の変性や、残存物質の懸念があり、これらの方法は向いていない。また、一般的なりポソーム製剤と比較して大量投与を前提とする人工赤血球製剤の製造法としては、効率が極めて低い。人工赤血球の粒子ひとつの性能を表すパラメータとして、単位脂質重量に対するHb重量の比が使われる。この値が高いほど、Hbに結合した酸素を効率よく運搬できることになる。そのためには、粒子の内水相のHb濃度を出来るだけ高くすることが必要であり、要するに高濃度（例えば35-45 g/dL）のHb溶液中に複合脂質を分散させて、小胞体が形成される時にHbを濃度が高い状態で内包させることが要件となる。高濃度Hb溶液は粘度が高く、そこに脂質粉末を分散させると更に粘度が高くなる。

これをいわゆる押し出し法(Extrusion Method)によって孔径の異なるフィルタを段階的に（例えば、Millipore社製MFフィルタ、孔径 3.0 μm , 0.8 μm , 0.6 μm , 0.45 μm , 0.3 μm , 0.22 μm の順で）透過させて粒子径を調節する場合は、フィルタの交換が煩雑である上に、フィルタの目詰まりが起り易い。それを回避するために、脂質を予め水溶液中で小胞体を形成させて凍結乾燥して得られた粉末を使用する方法が知られている（Sou K, Naito Y, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. *Biotechnol Prog.* 2003; 19(5): 1547-1552）。しかし、水を凍結乾燥で除去する操作は極めて長時間を要し、またコストもかかり、産業化を考えた場合には効率が悪いことが

課題となった。また、粒子径の小さい乾燥小胞体が混在し、これはHb溶液に分散させた後、Hbを十分に内包せずに最後まで残ってしまう場合があった。粘稠な濃厚Hb溶液に添加できる乾燥脂質の重量も攪拌効率や押し出し法の効率の面で制約を受け、せいぜい6 g/dLが上限であった(6 gの脂質を1 dLの濃厚Hb溶液に分散させること)。攪拌後に大量に発生する泡を消去するのに時間が要すること、また泡が蛋白質の変性を助長すること、脂質粉末が完全に分散せずに塊になって残存することも課題であった。

また、乾燥した複合脂質粉末を粘稠な濃厚Hb溶液に分散させる方法として、プロペラ式攪拌器を用いる方法は、脂質塊が形成されることがあり結果として長時間を要すること、また脂質粉末が水和するときに発生する気泡は粘稠溶液中ではなかなか消えず、これが押し出し法におけるフィルタの通過性を低下させることや、分散しきれなかった脂質塊がフィルタ上に残り損失となることも問題であった。Hbの回収率はせいぜい20%となり、内包されなかったHbは、再度回収して再濃縮して再利用するか、あるいは廃棄せざるを得ず、極めて効率の悪いものであった。

また、粘稠なHb溶液-複合脂質分散液を、マイクロフレイダイザー法によって、高圧高速で対面に噴出させて衝突させて剪断応力を発生させ、それにより粒子径を小さくする方法が知られている（Beissinger RL, Farmer MC, Gossage JL. *ASAIO Trans.* 1986; 32: 58-63）。しかしこの方法では、剪断応力の調節が難しいこと、また、Hb脂質分散液を回路に通すためにある程度の流動性が必要であり、従って脂質の濃度を6 g/dL程度にまで低下させることが必要であり、結果としてHbの回収率は20%程度と低いものであった。

また、脂質粉末を予め少量の水で乳化、水和膨潤させてペーストを形成し、これをHb溶液と高速に混合・乳化することでHbを内包させる方

法も知られている（特許文献；特開2009-035517号公報）。しかし、乾燥脂質を少量の水で水和させた際に既に小胞体が形成され、それがHb混合後もHbを内包することなくそのまま残る可能性があり、結果としてHbを効率よく内包できず、Hbの内包効率が低下することが予想される。

そこで本研究では、「混錬法」による人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）製剤の新しい製造方法を検討した。ヘモグロビンの回収率を従来よりも格段と高め、工程を簡略化し、操作時間を短縮でき、また、生体適合性を高めることもできるリン脂質小胞体（リポソーム）製剤の製造方法を提供することを目的とした。粒子ひとつひとつの酸素運搬機能を上げるには、やはり乾燥した複合脂質粉末を濃厚ヘモグロビン溶液と直接的に混合することが重要である。効率よく「多量の嵩高い乾燥状態の複合脂質粉末」と「粘稠な濃厚ヘモグロビン溶液」を混合し、濃厚ヘモグロビン溶液を小胞体に内包し、且つ粒子径を調節し、且つヘモグロビンの回収率を高めることを目的とした。

B. 研究方法と結果

複合脂質として1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC)、cholesterol、1,5-O-dihexadecyl-N-succinyl-glutamate (DHSG)、ならびに1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-Poly(oxyethylene)5000 (DSPE-PEG5000、PEG鎖の分子量5000)を、モル比で5/4/0.9/0.03となるように、合計10gをt-ブタノール1dLに溶解させ、0.5L茄子型フラスコに入れた。そしてドライアイス/メタノール混合冷媒で凍結し、凍結乾燥装置(東京理化製FD-1000)を24時間かけて行い、複合脂質粉末を得た。この粉末について、10gをテフロン製のシンキー社製の円柱状容器(外径:76mm、高さ約93mm、内壁を凹凸を加え容器上から見た時にクローバー形になっているもの)

に入れ、高純度ヒトHb溶液(一酸化炭素結合-HbCO体、45 g/dL、0.4dL、pH7.4)を添加した。このときのHb(18g):脂質(10g)の重量比は、1.8:1となる。そして、内蓋をして封入し、混錬装置(自転公転攪拌器、シンキー社製、ARE-310)にて公転1500回転、自転600回転にて3分間混錬処理し、冷却に3分待ったあと、容器内の気相を完全に一酸化炭素ガスで置換して封入した。そして、再度、公転1500回転、自転600回転にて3分混錬・3分冷却する操作を繰り返し、合計30回(合計90分)の混錬処理を行なった。このとき、ペーストの温度は、混錬の際の剪断応力と装置からの伝熱のため40℃程度にまで上昇しており、Hbの変性を抑制するためにCO化が重要と判断された。暗赤色の粘稠で均一なペーストが得られた。脂質の塊や泡は一切認められなかった。次いで、冷却した生理食塩水0.50dLを添加し、15秒間回転させ、ペーストの粘度を低下させ、分散液とした。溶液を更に生理食塩水で二倍に希

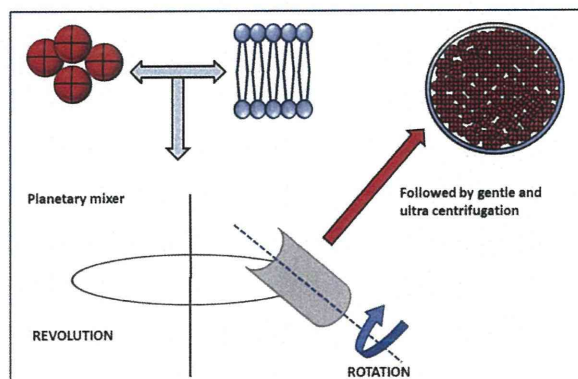


図1. 混錬法によるHb小胞体の調製法の概要。容器が遊星運動(自転・公転)をすることにより、内容物の攪拌ができる。高濃度での混合が可能となる。

釈したあと、遠心分離(3000rpm、30分、Hitachi社製CF12RX)したところ、分散しきれていない粒子径の大きい分画の沈殿と、一部変性したHbの沈殿が見られた。上澄みの相について、超遠心分離用の遠心チューブ(230mL容器)に入れ、更に生理食塩水を満たし、50,000gにて30分間超遠心分離した(Hitachi社製CP90WX)。回転させる前の分散液および分離後の上澄みのHb濃度と体積を計測し、Hb

の内包効率を計算したところ、約65%が得られた。粒子径をHORIBA製Nanoparticle analyzerを用いて計測したところ、約270nmとなった。メト化率をSoret帯のスペクトルをもとに計算し、3%以下であることを確認した。超遠心分離して得られた沈殿は、再度生理食塩水に再分散させ、Hb濃度を2.5g/dLに調節し、2dLずつ2L茄子型フラスコに入れてロータリーエバポレータにて回転させ、内部に空気を通気しながら、外部からハロゲンランプを45分間照射し、COガスを光解離させ、酸素が結合したHbに変換した。得られた溶液を再度超遠心分離にかけ、沈殿を生理食塩水に分散させ、Hb濃度を10g/dLに調節した。

C. 考察

人工赤血球の調製法として、乾燥脂質粉末を濃度高く濃厚Hb溶液に均一に分散させ、且つ粒子径を小さくして調節し、且つHbの回収率を高め、且つ操作中のHbの変性を抑制することのできる、混錬操作の原理を採用する方法を考案した(図1)。例えば攪拌脱泡装置は、混錬材料(少量の液体と大量の粉末を混ぜたペースト状の材料)を作製するものとして使われているが、本研究では、この攪拌脱泡装置は単に混ぜるという機能以外の機能を有することを見出し、また、この装置は操作を効率よく行なうことができる装置であるという点に着目した。この装置は基本的に、混錬させたい試料を封入した円柱型容器を自転方向と公転方向に同時に回転させて遊星運動させることによって、容器内を均一に攪拌させ、また公転による遠心力で脱泡を行なうことができるものであるが、完全な閉鎖容器内での混錬により、無菌的雰囲気維持が可能になる。これによって、この装置を製造工程の一部に用いれば、Hb溶液に対して従来よりも大量の脂質粉末を添加・分散でき、Hb小胞体分散液の調製を効率よく行なうことができる。また、単に脂質を分散させるだけでなく、脂質分子が自発的に集合形成する小胞体の粒子径を調節することができる。また、強い剪断応力が発生するので、

予めHbを鉄二価の状態に安定にさせるため、一酸化炭素を結合させておくことが重要である。従来、一酸化炭素を結合させることにより、Hb精製工程における加熱処理によるウイルス不活化を可能にする技術、一酸化炭素を結合したままHb小胞体を投与することにより、細胞保護効果を得ることのできる輸液製剤などは知られているが、混錬操作中における変性の防止法として利用するのは本研究が初めてである。

従来、この混錬装置(攪拌脱泡装置)の応用例としては、金/銀/カーボンペースト等の導電/抵抗材用途、ガラス/セラミックペースト等の封止/絶縁材用途、エポキシ樹脂等のシール材/接着剤用途、LED蛍光剤・シリコン樹脂等の成型材用途、インキ/塗料/顔料等、各種色材の混合用途、歯科材料/医薬品軟膏材料/化粧品基材等の製造用途、精密部品等の研磨用途等、食品分野ではマヨネーズなど本来混ざり合わない油と水の乳化などへの利用が知られていたが、本発明のような脂質分子を分散させて分子集合体を形成させることや、静注用リポソーム製剤の調製に使用する例は無かった。従来のいわゆるリポソーム製剤においては、そこまでの高濃度溶液の内

D. 結論

従来とは全く異なるHb溶液の内包プロセスを採用することにより、Hbの回収率が50-70%、平均粒子径は200 - 300 nmとなるHb小胞体分散液を短時間で得る方法を考案した。混合脂質粉末は、有機溶媒に溶解させてから減圧留去して得られる通常の脂質粉末で対応が可能であった。従来の、水中に空の小胞体を形成させて凍結乾燥によって得られる小胞体粉末を用いる必要性は無いと考えられた。スケールアップを目指すべく、現在、混錬装置はARE-310より一段階大型のARE-500にて検討を進めている。

17. ヘモグロビン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

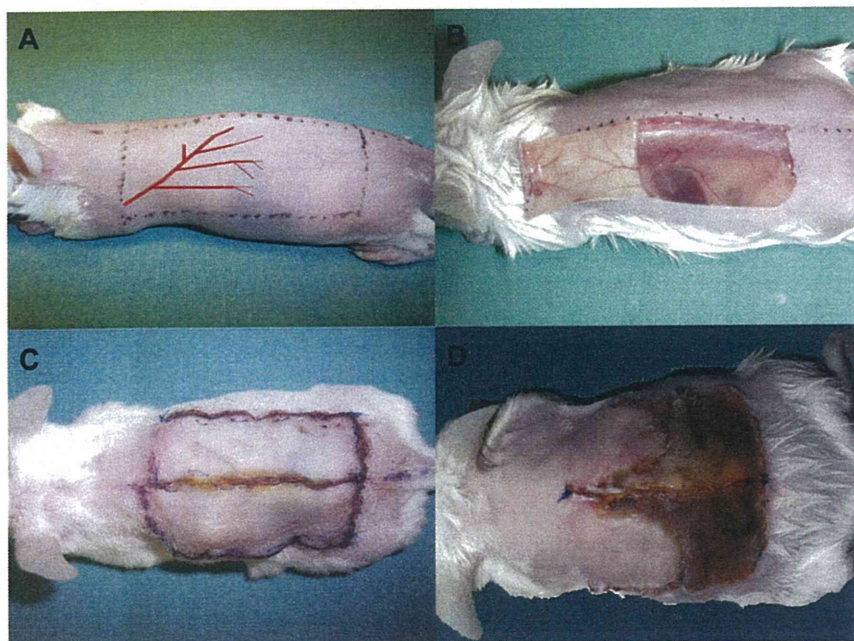


Figure 1. Experimental model. *A* and *B*: a cranially based skin flap is raised on both sides of the dorsal midline of anesthetized mice. The flap extends the vascular territory of the nourishing lateral thoracic artery and vein (marked in red in *A*). The lateral thoracic artery is ligated. *C*: the 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.

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ため、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

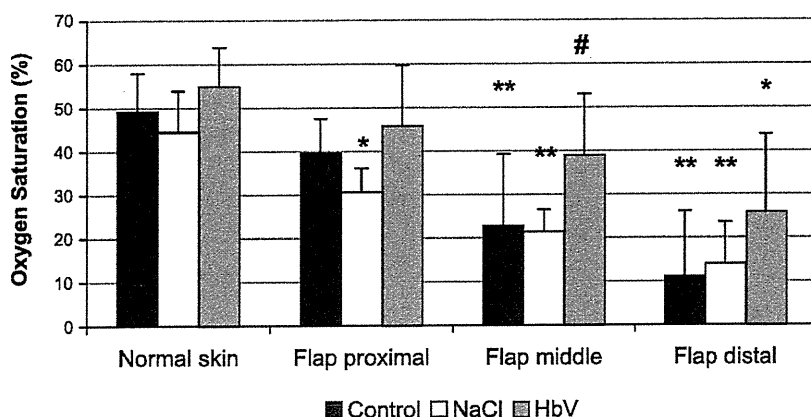


Figure 2. Oxygen saturation (SO₂) in normal skin and proximal, middle, and distal flap skin in untreated control animals and animals receiving 2 x 20% of total blood volume (TBV) of 0.9% NaCl or hemoglobin vesicle (HbV) solution. Data are expressed in mean values and SD. **P* < 0.05 and ***P* < 0.01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

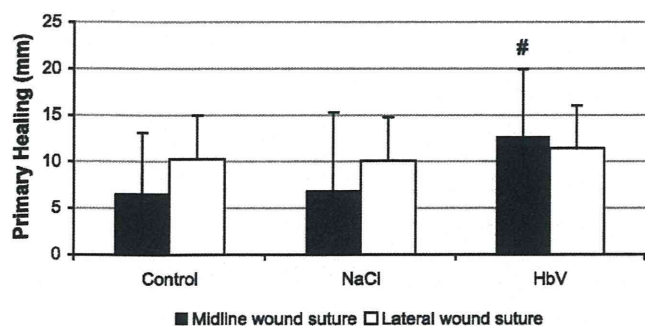


Figure 3. Length of primarily healed wounds in midline and lateral suture in untreated control animals and animals receiving 2 x 20% of TBV of 0.9% NaCl or HbV solution. Data are expressed in mean values and SD. [#]*P* < 0.05 vs. control.

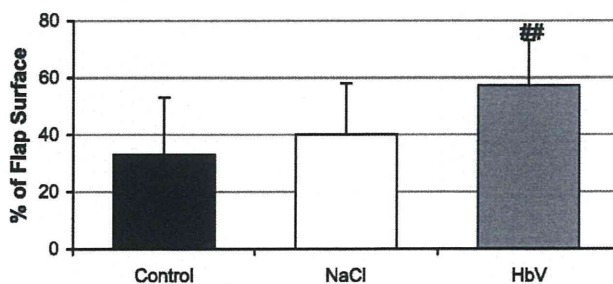


Figure 4. Flap tissue survival in untreated control animals and animals receiving 2 x 20% of TBV of 0.9% NaCl or HbV solution. Data represent percentages of total flap surface and are expressed in mean values and SD. ^{##}*P* < 0.01 vs. control.

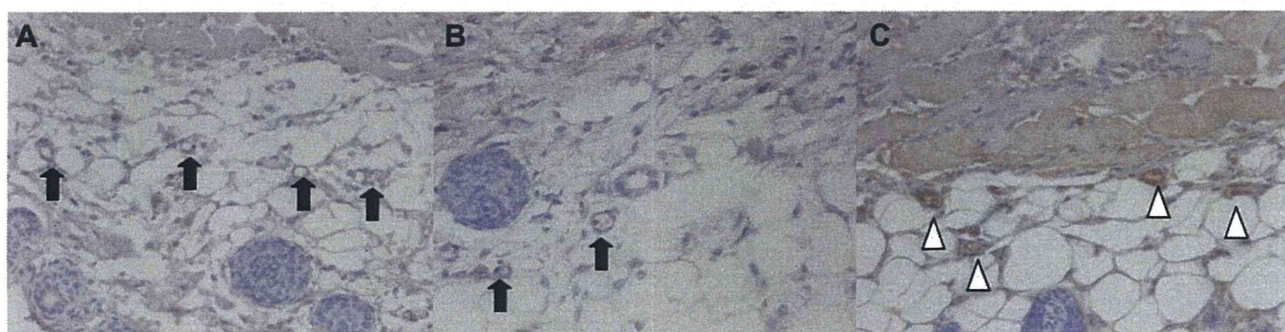


Figure 5. Immunohistochemical endothelial nitric oxide synthase (eNOS) staining of flap tissue 6 days postoperatively in untreated control animals (A) and animals receiving 2 x 20% of TBV of 0.9% NaCl (B) or HbV solutions (C). Pictures were taken at x200 magnification. Black arrows exemplary indicate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

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、マウスはネブ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。

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。

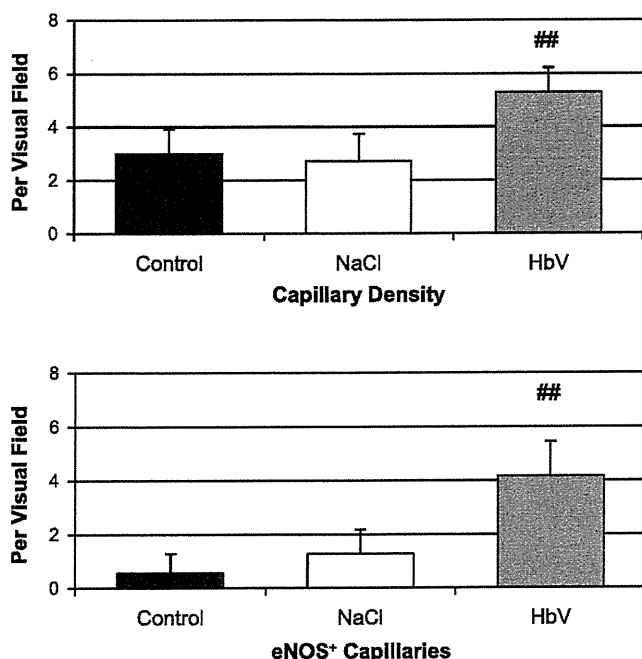


Figure 6. Capillary density and capillary eNOS expression 6 days postoperatively in untreated control animals and animals receiving 2 x 20% of TBV of 0.9% NaCl or HbV solution. Data are expressed in mean values and SD of capillaries per visual field at x200 magnification. ^{##} $P < 0.01$ vs. control.

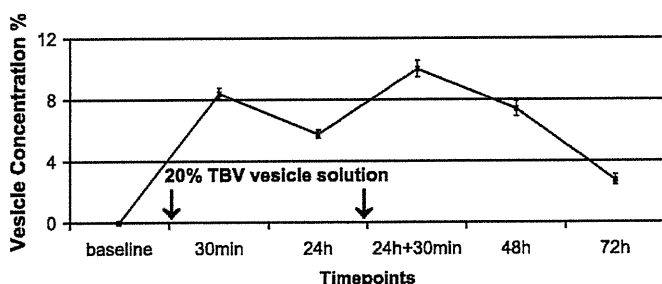


Figure 7. Vesicle pharmacokinetics. The values represent plasma concentrations of vesicles filled with a sulforhodamin B solution, measured with computerized fluorescence reading before and after receiving 2 x 20% of TBV of vesicle solution. Data are presented in percentages of the concentration present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

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)。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 1.19 cP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

では、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。側方部分の健常な皮弁領域では、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いなる。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。

本薬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。

18. ヘモグロビン小胞体による疑似アレルギー性反応と血行動態に与える影響に関する検討

A. 研究目的

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. 研究方法

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(N₂O:O₂=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°C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、

$$\text{PVR} = \text{PAP} / \text{CO} \times 80$$

全身血管抵抗 (Total Systemic Resistance、TSR) は

$$\text{TPR} = [(\text{MBP} - \text{RAP}) / \text{CO}] \times 80$$

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_2 とし、1回目の投与前に PaCO_2 が35~40mmHgとなるように呼吸流量、回数を調

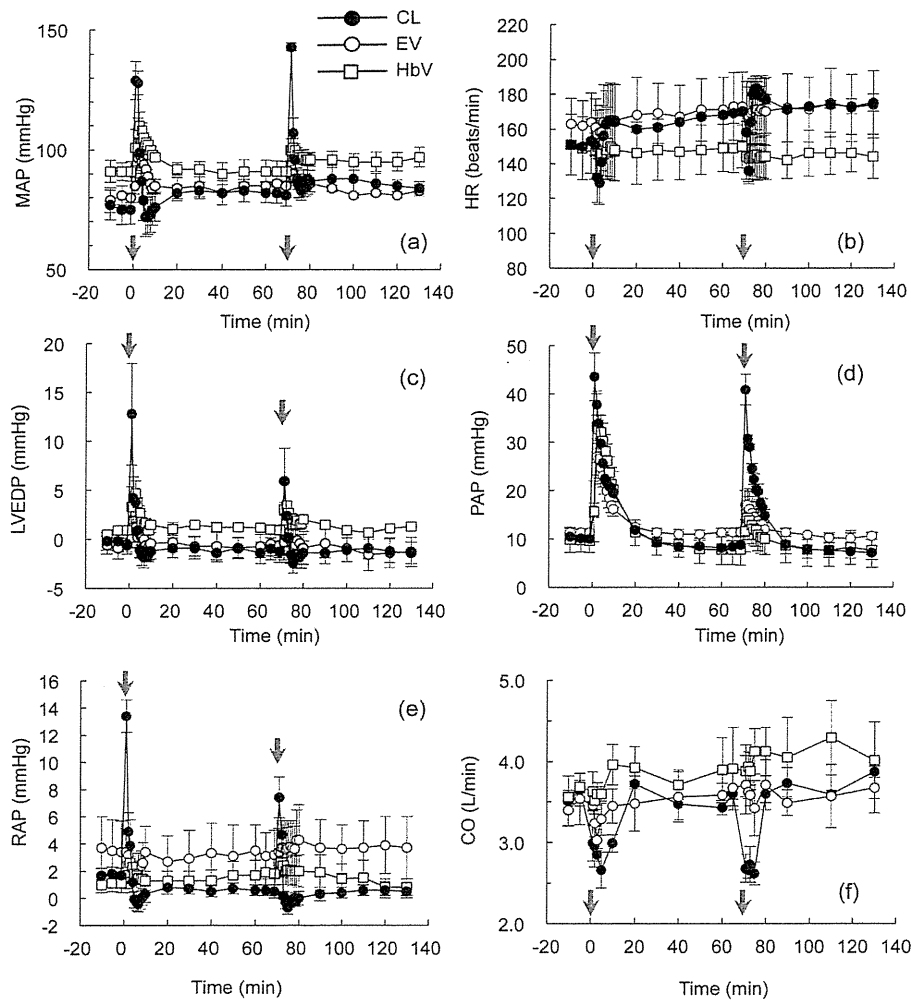


Figure 1. Systemic cardiovascular responses to the repeated injections of liposome suspensions (1st, 0.05 mL/kg; 2nd, 0.5 mL/kg; closed circle, CL; opened circle, EV, opened square, HbV. (a) Mean arterial pressure, MAP; (b) Heart rate, HR; (c) Left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP; (d) Pulmonary arterial pressure, PAP; (e) Right atrial pressure, RAP; and (f) Cardiac output, CO. For LVEDP, one rat for the HbV group was omitted because of unsuccessful measurement with abnormal value at the baseline. The CL group showed stronger and repeated responses to the 1st and 2nd injections. On the other hand, both HbV and EV showed lower responses. Arrows indicate the time points of the 1st and the 2nd injections (0, 70 min).

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B₂ (TXB₂)の測定を行った。

これまでに投与した試料は、Hb小胞体 (HbV)、HbVと同一の脂質組成の空の小胞体 (EV)、および

負電荷脂質としてDPPGを含有する空の小胞体 (CL)である。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。1回目の投与(0.05 mL/kg)のあと60分間観察し、その10分後に2回目の投与を行なった。2回目は1回目の投与量の10倍量(0.5mL/kg)とし、投与後60分間観察した。

C. 結果および考察

DPPG系小胞体 (CL)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、TXB₂の顕著な上昇認められ(Figs. 1, 2, 3, 4)、また、二回目の投与(0.5mL/kg)でも同等の反応が得られた。Szebeniの報告する補体活性を原因とする疑似

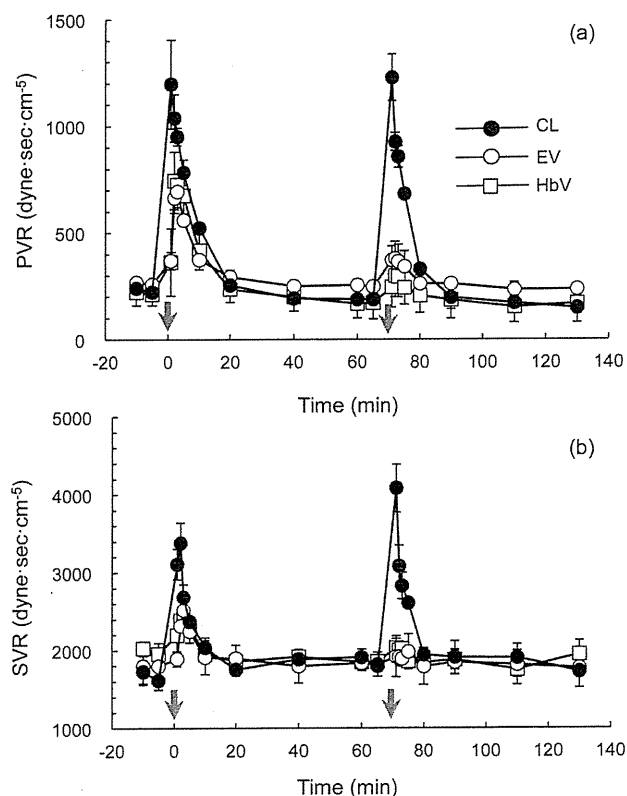


Figure 2. Changes in (a) pulmonary vascular resistance, PVR, and (b) systemic vascular resistance, SVR, at the repeated injections of liposome suspensions (1st, 0.05 mL/kg; 2nd, 0.5 mL/kg); closed circle, CL; opened circle, EV, opened square, HbV. The CL group showed stronger and repeated changes in response to both the 1st and the 2nd injections. On the other hand, both HbV and EV showed lower responses. Arrows indicate the time points of the 1st and the 2nd injections (0, 70 min).

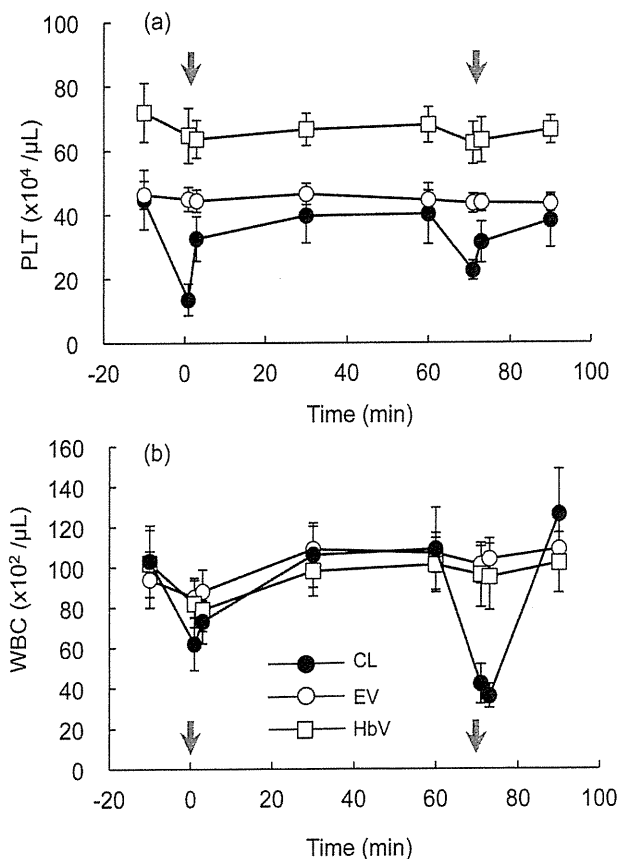


Figure 3. Changes in (a) number of platelet, PLT, and (b) number of white blood cells, WBC, in response to the repeated injections of liposome suspensions (1st, 0.05 mL/kg; 2nd, 0.5 mL/kg); closed circle, CL; opened circle, EV, opened square, HbV. For PLT one rat in the HbV group was omitted because of abnormal high value at the baseline. Arrows indicate the time points of the 1st and the 2nd injections (0, 70 min).

アレルギー様症状が確認された。但し、心電図では異常は全く認められず、Szebeniらの報告(Circulation 1999)よりも反応が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中で調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、DHSG系の構成脂質からなるHb小胞体(HbV)、および空の小胞体(EV)については、1回目の投与では肺動脈圧と体動脈圧の上昇が見られたがCL群に比較して軽微であり、また心拍出量は殆ど変化が無かった。そのため、肺血管抵抗および全身血管抵抗も上昇したもののCL群よりも軽微であった。更に特徴的なのは、HbV群、EV群の2回目の投与において殆ど変化が無かったこと、また血小板数の低下が1回目、2回目においても殆ど観察されなかったこと、そして、TXB2の上昇がCL群

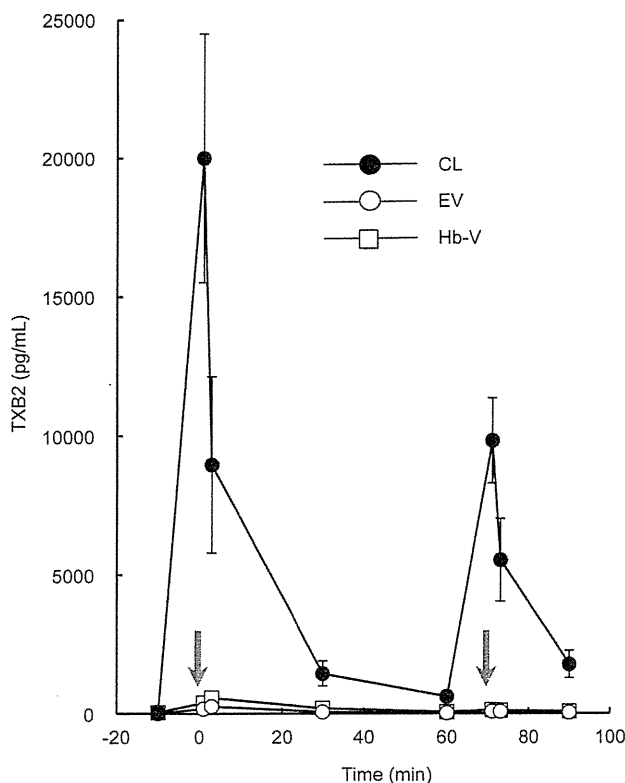


Figure 4. Changes in the plasma level of thromboxane B₂ (TXB₂) in response to the repeated injections of liposome suspensions (1st, 0.05 mL/kg; 2nd, 0.5 mL/kg); closed circle, CL; opened circle, EV, opened square, HbV. Arrows indicate the time points of the 1st and the 2nd injections (0, 70 min).

に比較して極めて低い値を推移したことである。HbV群の肺の電子顕微鏡写真(Fig. 5)から肺血管内マクロファージ (Pulmonary intravascular macrophage, PIMs)がHbVを貪食していることが解った。

PIMsは、反芻動物や、ブタなど、限られた動物種に見られ、ヒトや齧歯類には通常存在しない。齧歯類では投与した異物の殆どが脾臓や肝臓で捕捉されるが、ブタやヒツジなどでは、肺で主に捕捉される。これまでHbVおよびEVの齧歯類への投

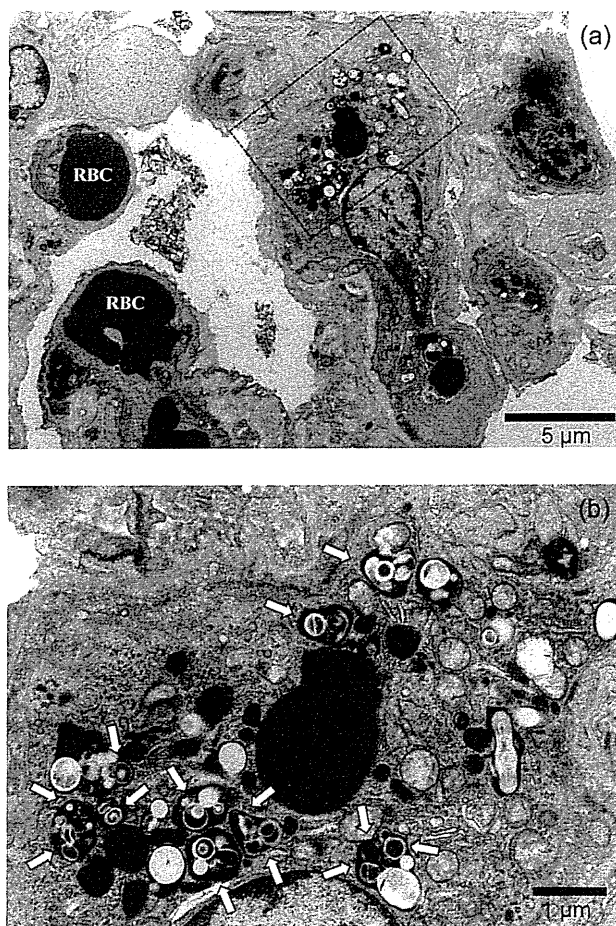


Figure 5. Transmittance electron micrographs of a lung tissue in the HbV group which was sacrificed immediately after the experiment of two injections of HbV. (A) Whole view of a pulmonary intravascular macrophage, PIM, and the surrounding tissues. "N" indicates the nucleus of the PIM. RBCs indicate the red blood cells in the pulmonary capillaries. (B) A magnified view of the section in (A) surrounded by a broken line. The individual HbV particles are seen in the phagosomes of the PIM as indicated with white arrows. The large blackened part in the center and smaller ones would be phagocytized senescent red blood cells.

与試験およびヒト血液との混合試験において、補体活性を生起しないことを明らかにしてきた。本試験において HbV および EV は TXB2 の顕著な産生が無いこと、また血小板数の低下も無いことから、ブタへの投与に対しても補体活性は僅か(或は生起しない)と考えられるが、PIMs への取り込みは避けられず、1 回目の投与においてのみ顕著な反応が見られたと思われる。CL 群においては、補体

活性が主因のため、1 回目、2 回目の投与ともに、顕著な反応が見られたと考えられる。従って、現行の Hb 小胞体は、従来の組成の小胞体よりも生体適合性に優れると考えられる。ヒトとブタに組織構造的にまた生理学的に類似点が多いため、ブタが非臨床試験に用いられる場合があるが、今後 Hb 小胞体の安全生試験を行なう上で、ブタを使用する場合は注意が必要である。

19. ヘモグロビン小胞体の心筋虚血 - 再灌流障害に対する保護効果

A. 研究目的

救急・災害医療に利用可能な人工赤血球として、細胞型のヘモグロビン小胞体(HbV)が有力な候補となっている。HbV を外傷時や、出血時に緊急投与する際には、心臓への影響、特に虚血・再灌流時の心筋障害の発生への留意が必要となる。我々は、ラットの摘出心臓をランゲンドルフ灌流する方法を用いて、ヘモグロビン小胞体(HbV)30倍希釈分散液(Hbとして0.33 g/dL)を虚血直前に10分間灌流した時、虚血-再灌流時の心機能が有意に回復することを明らかにした(1)。そこで、この効果のメカニズムを解明するため、実験(I) HbVの効果がsarcolemmal K_{ATP}-channel、アデノシン受容体やプロスタノイドを経由するか否か、実験(II) HbVが、虚血-再灌流で生じるnitroso-redox balanceの破綻を改善するか否か、実験(III) HbVが、虚血直後にそれを灌流した時にも、虚血-再灌流後の心機能を回復させるか否か、を検討した。

B. 研究方法

1. 用いた試薬類：実験(I)(II)(III)共通

実験には、ニプロ株式会社が製造したHbVを用いた。灌流液の作製には、特級レベルの試薬と比抵抗18.2 MΩ以下の超純水を用いた。比較対象とした各種の薬物や各種測定用の試薬も特級レベルのものを用いた。

2. 用いた動物、心臓灌流法および心機能の測定：

実験(I)(II)(III)共通

生後8-9週齢のWistar系雄性ラット(Charles River Japan Inc.)を用いた。ヘパリン(ノボ・ヘパリン注1000、持田製薬)1000 Uを腹腔内投与し、10分後に、ネンブタール60 mg/kg(ソムノペンチル麻酔用注射液、シェリング・プラウ アニマルヘルス社、Na-pentobarbital 64.8 mg/mL溶液)を腹腔内投与して麻酔した。開腹・開胸して心臓を

取り出し、直ちに氷冷したmodified Krebs-Henseleit buffer (NaCl 116 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.5 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 11.0 mM)(以下mKH-bufferと省略する)に投入して心臓の拍動を停止させた。大動脈にカニューレを挿入し、mKH-bufferを用いて静水圧100 cmH₂O、37°Cでランゲンドルフ灌流した。mKH-bufferをはじめとする灌流液は、実験開始前から終了するまで95% O₂ + 5% CO₂の混合ガスを通気し、pHを7.4に調整した。

左心室に生理食塩水を満たしたラテックス・バルーンを挿入し、圧トランスデューサー(P-50, Gould Inc.)を介して多チャンネル記録計(WS-641G, Nihon Kohden)に接続し、左室発生圧(LVDP)、左室拡張末期圧(LVEDP)、心拍数(HR)などを実験開始から終了まで連続的に記録した。バルーンの容積は、control灌流時の左室拡張末期圧(LVEDP)が0-5 mmHgになるようにした。control灌流開始時から実験終了まで、心臓を灌流して出てきた灌流液を5分毎に採取して冠灌流量(coronary flow, CF)を測定した。

3. HbVのmKH-bufferへの分散：実験(I)(II)(III)

共通

HbV 30倍希釈分散液：

純水約90 mLに、297 mgのD-glucoseを溶解させた。これにmKH-bufferの構成イオン成分を個別に溶解させた溶液を加え、次にHbV原液5 mLを加え、最後に純水で150 mLにメスアップした。但し、NaCl溶液のvolumeは、HbV原液5 mLが含有するNaCl(0.9%)を差し引いたものとした。

こうして作製したHbV分散液のHb濃度は0.33 g/dL相当となる(30倍希釈分散液)。この分散液は、37°Cに加温し、95% O₂ + 5% CO₂の混合ガスを30分以上通気した後実験に用いた。

実験(I) HbVの効果はsarcolemmal K_{ATP}-channel、アデノシン受容体やプロスタノイドを経由するか

1. 各種薬剤の mKH-buffer への溶解：

この実験に用いた sarcolemmal K_{ATP} -channel blocker の glimepiride (glim)、アデノシン受容体拮抗薬の theophylline (theo)、prostaglandin 合成阻害剤の indomethacin (indo)は、いずれも 10 μ M 濃度で mKH-buffer および HbV 30 倍希釈分散液に溶解させた。NO 合成阻害剤の L-NAME は、100 μ M 濃度で mKH-buffer に溶解させた。

こうして作製した薬物溶液は、37°C に加温し、95% O_2 + 5% CO_2 の混合ガスを 30 分以上通気した後実験に用いた。

2. 実験のプロトコール

この実験のプロトコールを Fig. 1 に示した。各実験群の実験内容は以下の通りとした。

(1) ischemia-reperfusion 群 (n=7)：以下 ir 群
control 灌流を 20 分間行った後に、灌流を停止させて虚血(global ischemia)を惹起し、虚血を 25 分間継続した後再灌流を 30 分間行った。

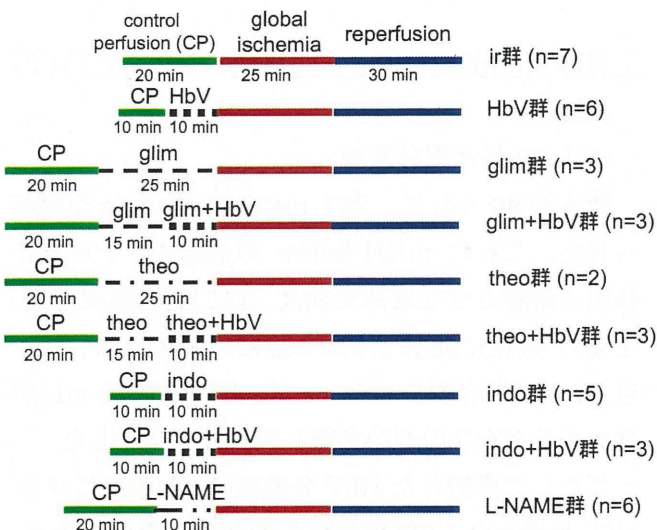


Fig. 1 心機能に関する実験のプロトコールと実験例数

(2) HbV 0.33 g/dL 群 (n=6)：以下 HbV 群
10 分間の control 灌流直後に灌流液を HbV 希釈分散液に切り換え、同じ灌流圧で 10 分間灌流した。その後、ir 群と同様に虚血 25 分-再灌流 30 分の処置を行った。

(3)glim 10 μ M 群 (n = 3)：以下 glim 群
20 分間の control 灌流直後に灌流液を glim 10 μ M/mKH-buffer 溶液に切り換え、同じ灌流圧で 25 分間灌流した。その後、ir 群と同様に虚血 25 分-再灌流 30 分の処置を行った。

(4) glim 10 μ M + HbV 0.33 g/dL 群 (n = 3)：以下 glim+HbV 群
20 分間の control 灌流直後に灌流液を glim 10 μ M/mKH-buffer 溶液に切り換え、同じ灌流圧で 15 分間灌流した。その後、灌流液を glim 10 μ M を含有する HbV 0.33 g/dL 分散液に切り換えてさらに 10 分間灌流した後、ir 群と同様に虚血 25 分-再灌流 30 分の処置を行った。

(5) theo 10 μ M 群 (n = 2)：以下 theo 群
20 分間の control 灌流直後に灌流液を theo 10 μ M/mKH-buffer 溶液に切り換え、同じ灌流圧で 25 分間灌流した。その後、ir 群と同様に虚血 25 分-再灌流 30 分の処置を行った。

(6) theo 10 μ M + HbV 0.33 g/dL 群(n = 3)：以下 theo+HbV 群
20 分間の control 灌流直後に灌流液を theo 10 μ M/mKH-buffer 溶液に切り換え、同じ灌流圧で 15 分間灌流した。その後灌流液を theo 10 μ M を含有する HbV 0.33 g/dL 分散液に切り換えてさらに 10 分間灌流した後、ir 群と同様に虚血 25 分-再灌流 30 分の処置を行った。

(7)indo 10 μ M 群 (n=5)：以下 indo 群
10 分間の control 灌流直後に灌流液を indo 10 μ M/mKH-buffer 溶液に切り換え、同じ灌流圧で 10 分間灌流した。その後、ir 群と同様に虚血 25 分-再灌流 30 分の処置を行った。

(8) indo 10 μ M + HbV 0.33 g/dL 群(n = 3)：以下 indo+HbV 群
10 分間の control 灌流直後に灌流液を indo 10 μ M

を含有する HbV 0.33 g/dL 分散液に切り換えて 10 分間灌流した後、ir 群と同様に虚血 25 分-再灌流 30 分の処置を行った。

(9) L-NAME 100 μ M 群 (n = 6): 以下 L-NAME 群 20 分間の control 灌流直後に灌流液を L-NAME 100 μ M/ KH-buffer 溶液に切り換え、同じ灌流圧で 10 分間灌流した。その後、ir 群と同様に虚血 25 分-再灌流 30 分の処置を行った。

3. 灌流実験終了後の心臓の処理

上のプロトコールに従って灌流実験を行った心臓は、別の実験を行うまで -80°C に保管した。

ir 群、HbV 群および L-NAME 群の各 6 例の心臓を用いて組織中の GSH と GSSG を測定した。また、ir 群、HbV 群、L-NAME 群と以下で述べる実験(II)の control 群の各 2 例について組織蛋白質の thiol 残基の酸化度の測定(biotinylated-iodoacetamide labeling)を行った。

4. 各種の測定

(1) 心筋組織中の GSH と GSSG content の測定 :

ir 群、HbV 群、L-NAME 群の各 6 例の心臓組織を、100 μ M の diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA)を含む 10% TCA 溶液で抽出し、遠心分離した後その上清中の GSH と GSSG 濃度を Lakritz J et al (2)の方法に従って HPLC 法で測定した。遠心沈査中の蛋白質を BCA 法 (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)で測定し、各実験群の心筋組織中の GSH と GSSG content を mg/g-protein で表記した。

(2) 組織蛋白質の thiol 残基の酸化度の測定 :

Kim JR at al.(3)の方法に従って、ir 群、HbV 群、L-NAME 群と実験(II)の control 群の各 2 例の心臓組織を、100 μ M の biotinylated iodoacetamide (BIAM)を含む PIPES buffer (PIPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl_2 5 mM, diethylene triamine penta acetic acid 50 mM, PMSF 2 mM, Triton

X-100 0.5%, pH 6.5)で homogenize して BIAM との反応を行わせた後、その上清中の BIAM でラベルされた蛋白質を SDS-PAGE で分離した。

5. データの計算と統計処理 :

各実験群で測定した計数データはすべて平均値 (mean)と標準偏差(SD)で表示した。この実験では、左室発生圧 (LVDP)のみを図示した(Fig.4-8)。これらのデータは、時系列分散分析を行った後、Bonferroni の多重比較法で群間の有意差検定を行った。組織中の GSH, GSSG content (Fig. 9)は、両側 ANOVA を行った後、各実験群の有意差検定を Tukey 多重比較法で検定した。

実験(II) HbV は、虚血-再灌流で生じる nitroso-redox balance の破綻を改善するか

1. 実験のプロトコール

この実験のプロトコールを Fig. 2 に示した。各実験群の実験内容は以下の通りとした。

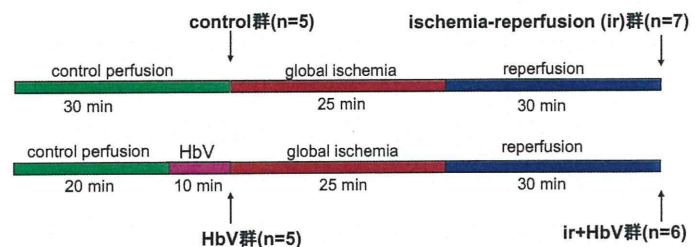


Fig. 2 心筋組織中のnitrate含有量、redox関連酵素活性、関連蛋白質発現測定のための実験のプロトコールと実験例数

(1)control 群 (n = 5)

control 灌流を 30 分間行った後に、心臓を液体窒素で冷却したアルミブロックで挟んで凍結させた。

(2)HbV 0.33 g/dL 群 (n=5) : 以下 HbV 群

20 分間の control 灌流直後に灌流液を HbV 希釈分散液に切り換え、同じ灌流圧で 10 分間灌流した。その後、control 群と同様に心臓を液体窒素で冷却したアルミブロックで挟んで凍結させた。

(3)ischemia-reperfusion (ir)群 (n = 7)

control 灌流を 30 分間行った後、灌流を停止させて虚血(global ischemia)を惹起した。虚血を 25 分間継続した後再灌流を 30 分間行い、その後 control 群と同様に心臓を液体窒素で冷却したアルミブロックで挟んで凍結させた。

(4) ir + HbV 群 (n = 6)

20 分間の control 灌流直後に灌流液を HbV 希釈分散液に切り換え、同じ灌流圧で 10 分間灌流した。その後、ir 群と同様に虚血 25 分-再灌流 30 分の処置を行い、心臓を液体窒素で冷却したアルミブロックで挟んで凍結させた。

以上の実験で凍結させた心臓は、液体窒素中で細かく粉砕して -80°C に保管した。

2. 各種の測定

(1)心筋組織中の NO_2 の測定 :

各実験群の心臓組織を、lysis buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Na_2EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, sodium pyrophosphate 2.5 mM, β -glycerophosphate 1 mM, Na_3VO_4 1 mM, Triton X-100 1%, leupeptin 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PMSF 0.2 mM, pH 7.4)で抽出し、 4°C 、10,000g で 10 分間遠心分離した。Misko TP et al. (4)の方法に従って、上清中の NO_2 を 2,3-diaminonaphthalene と 37°C で 30 分間反応させ、その反応生成物を蛍光法で測定した。上清中の蛋白質を BCA 法で測定し、組織中の NO_2 content を nmol/mg-protein で表記した。

(2) 心筋組織中の redox に関する酵素活性の測定 :

各実験群の心臓組織を、Tris-HCl buffer (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, DTT 1 mM, leupeptin 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PMSF 0.2 mM, pH 7.5)で抽出し、 4°C 、10,000g で 10 分間遠心分離した。上清中の glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), Cu/Zn-superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), Mn-superoxide dismutase

(Mn-SOD) および catalase 活性を Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)の測定キットで測定した。上清中の蛋白質を BCA 法で測定し、組織中の各酵素活性を U/mg-protein あるいは反応速度/mg-protein (Table 1)で表記した。

(3)心筋組織中の各種蛋白質発現量の western blotting 法による測定 :

(a)心筋組織からの蛋白質の抽出 :

上記の実験の control 群、HbV 群、ir 群、ir+HbV 群の各 5 例の心臓組織を、lysis buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Na_2EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 1% Triton, sodium pyrophosphate 2.5 mM, β -glycerophosphate 1 mM, Na_3VO_4 1 mM, Leupeptin 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)で抽出し、 4°C 、10,000g で遠心分離した後その上清中の蛋白質を BCA 法 (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)で測定した。残った上清は以下の western blotting の実験を行うまで -80°C に保管した。

(4)抽出した蛋白質の western blotting :

抽出液中の蛋白質の western blotting は定法に従って行った。概略は以下の通り。抽出液を 4%の 2-mercaptoethanol を含む Laemmli sample buffer (BioRad)と等量混合し、heat block を用いて 95°C で 5 分間加熱した。SERCA2, calsequestrin 2 (以下 cls2 と省略)、および phospholamban (以下 plb と省略)の測定では加熱操作を行わなかった。こうして調製した処理液の蛋白質 15 μg 相当分を用いて 12% SDS-PAGE を行った。PAGE 終了後 blotting buffer (Tris-glycine-SDS buffer)を用いて分離した蛋白質をゲルから PVDF 膜(BioRad)に blotting した(15V, 1.4 時間)。blotting 終了後、PVDF 膜を blocking 液(ナカライテック)に 1 時間浸漬して blocking を行った後、10%の blocking 液を含む 1% Tween-20 含有リン酸 buffer (PBST) に溶解させた以下の 1 次抗体と室温で 1 ないし 2 時間反応させた。

Cu/Zn-SOD (Stressgen)、Mn-SOD (Stressgen)、