

人工血液

第 11 卷 第 3 号 2003 年 11 月

目次

| | | |
|----|--|----------|
| 会告 | | 166 |
| 原著 | テトラ(シクロヘキサノイル基)を有するヘムを包接した ヒト血清アルブミン-ヘム複合体の酸素結合反応 ...小松晃之 | 167 |
| | 酸素輸液ヘモグロビン小胞体に混在する リポポリサッカライドの定量法 | 酒井宏水 173 |
| | 摘出肝臓を用いた高酸素親和性人工酸素運搬体 (Neo Red Cell)の酸素運搬能の評価 | 木村哲寛 179 |

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 11 No. 3 November, 2003

Contents

| | | |
|---------------------------|---|-----------------------------|
| <i>Announcement</i> | | 166 |
| <i>Original Article :</i> | | |
| | <i>Oxygen-Binding Reaction of Human Serum Albumin Hybrid Including Heme with Tetra(cyclohexanoyl)-Groups</i> | <i>Teruyuki Komatsu</i> 167 |
| | <i>Detection of Lipopolysaccharide Contaminating Hemoglobin-Vesicles as Artificial Oxygen Carriers</i> | <i>Hiromi Sakai</i> 173 |
| | <i>Estimation of oxygen carrying capacity of Neo Red Cell with high oxygen affinity in the excised liver</i> | <i>Tetsuhiro Kimura</i> 179 |

会 告

第11回日本血液代替物学会年次大会

会期：平成16年7月13日(火), 14日(水)

会場：北方圏センター（札幌市）

URL：http://www.hokuyu-aoth.org/11jbs

E-mail：11jbs@hokuyu-aoth.org

第11回日本血液代替物学会は上記の会期で、札幌で行われます。特定医療法人 北楡会が担当させて頂きます。ふるってご参加ください。URL, mailの開設は12月以降になります。

それまでのお問い合わせは大会事務局にお願い申し上げます。

事務局：

〒003 - 0006 札幌市白石区東札幌 6 - 6

特定医療法人 北楡会 札幌北楡病院

TEL 011 - 865 - 0111(1590)

FAX 011 - 865 - 9719

テトラ(シクロヘキサノイル基)を有するヘムを包接した ヒト血清アルブミン-ヘム複合体の酸素結合反応

Oxygen-Binding Reaction of Human Serum Albumin Hybrid Including Heme with Tetra(cyclohexanoyl)-Groups

小松晃之, 石原星児, 土田英俊

Teruyuki Komatsu, Seiji Ishihara, Eishun Tuchida

和文抄録

組換えヒト血清アルブミン (rHSA) に4つのピバロイル基を有するテトラフェニルポルフィリン鉄 (ヘム) 錯体 (FepivP) を包接させて得たアルブミン-ヘム複合体は、生理条件下で酸素を可逆的に吸脱着できる人工酸素運搬体 (赤血球代替物) である。本報では、アルブミン-ヘム酸素錯体のさらなる安定度向上を目指し、ヘム中心鉄近傍に疎水性の高いシクロヘキサノイル基を4つ導入した新しいヘム誘導体 (FecycP) を合成、それを包接させたrHSA複合体の構造、酸素及び一酸化炭素結合能、血液適合性を明らかにしたので報告する。rHSA 1分子に対するFecycPの最大包接数は8。rHSA-FecycPとrHSAの等電点、CDスペクトルパターンが一致したことから、ヘム包接後もアルブミンの二次構造に変化はないと考えられる。酸素親和性 ($P_{1/2}^{O_2}$) は34Torr (37%), 酸素結合に伴う熱力学パラメーター (ΔH , ΔS) は包接ヘム数に依存せず -59 kJ mol^{-1} , $-108 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ であった。レーザーフラッシュホトリシス法を用いて、酸素及び一酸化炭素の結合解離速度定数 (k_{on} , k_{off}) を決定。気体分子の再結合過程は多相性を示し、包接サイト近傍分子環境の影響を受けているものと推察された。酸素錯体半減期 (9h, 37%) は、従来系 (rHSA-FepivP) に比べて長く、この値はミオグロビンに匹敵する値であった。得られた赤色のrHSA-FecycP水溶液 ([rHSA]: 5g dL⁻¹, FecycP/rHSA=4, 8 (mol/mol)) は室温での長期保存も可能。rHSA-FecycPと全血液を1:1 (v/v) の割合で混合した場合も、凝集・沈殿を認めず、血液適合性も高い。

Abstract

Recombinant human serum albumin (rHSA) incorporating tetraphenylporphyrinatoiron(II) (heme) derivative with four pivaloyl-groups (FepivP), albumin-heme, is an artificial oxygen-carrier (red cell substitute), which can reversibly bind and release oxygen under physiological conditions. This paper describes for the first time the structure, oxygen- and carbon monoxide-binding abilities, and blood compatibility of an rHSA hybrid including new heme derivative having more hydrophobic cyclohexanoyl-groups around the central iron (FecycP), rHSA-FecycP. The maximum binding numbers of heme to one albumin molecule were determined to be eight. Since the isoelectric point and CD spectral pattern of rHSA-FecycP were identical to those of rHSA itself, the two-dimensional structure of albumin could be unchanged after the incorporation of heme. The oxygen-binding affinity ($P_{1/2}^{O_2}$) of rHSA-FecycP was 34 Torr, and its thermodynamic parameters (ΔH , ΔS) were -59 kJ mol^{-1} and $-108 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, respectively. The oxygen- and carbon monoxide-association and dissociation rate constants (k_{on} , k_{off}) were also measured by laser flash photolysis. The rebinding kinetics of these gaseous ligands consisted of multiple-exponentials; therefore we supposed that oxygen- and carbon monoxide-binding reactions to FecycP are affected by the molecular environment around the each heme-sites. The half-lifetime of the oxygenated rHSA-FecycP (9h, 37%) was significantly longer than that of rHSA-FepivP and closed to the myoglobin's. The obtained red-colored solution was stable and showed a long shelf life at room temperature. The equivalent mixture of rHSA-FecycP and whole blood showed no coagulation and precipitation, which suggested the high blood compatibility of rHSA-FecycP.

Keywords

oxygen-binding reaction, human serum albumin, heme, albumin-heme, synthetic oxygen-carrier, red cell substitute

1. 緒言

現在、我国におけるアルブミン製剤の年間使用量は約190万L (2002年度, 原料血漿換算)であり, 低蛋白血症による病態, 人工心肺を使用する心臓手術のほか, その多くは出血性ショックに対する循環血漿量の補充液として用いられている¹⁾. もし, この血清アルブミンにの酸素輸送能を付与することができれば, 人工酸素運搬体(赤血球代替物)としての臨床利用価値はきわめて高く, 例えば救急医療現場における救命措置への適用を考えただけでも, その絶大な効果が容易に推測される.

興味あることに, 血漿蛋白質の中にはヘムを取り込んでヘム蛋白質を構成するものもある. Hbから血流中へ遊離したプロトポルフィリン鉄(III)錯体(ヘミン)は, 細胞毒性や活性酸素を発生するため, ヘモペキシンと呼ばれる糖蛋白質により速やかに捕捉され肝臓へと運ばれる²⁾. ヘモペキシン-ヘミン複合体のX線結晶構造解析の結果から, ヘミン分子は2つのヒスチジン残基との軸配位, プロピオン酸側鎖とアミノ酸残基間の多重水素結合により, 非常に強く固定されている様子 $(K > 10^{12} \text{M}^{-1})$ ³⁾. しかし, ヘモペキシンの血中濃度は $< 17 \mu\text{M}$ と低いため, これが飽和した場合には, 血清アルブミンがその機能代替を果たす. アルブミンは血漿中で最も多量に存在する蛋白質であり, ヘミンとの結合定数も約 10^6M^{-1} と高い⁴⁾. ごく最近, 著者らのグループは, アルブミン-ヘミン-ミリスチン酸複合体の結晶構造解析に初めて成功した(分解能: 3.2\AA)⁵⁾. ヘミンはアルブミンのサブドメインIBに取り込まれ, Tyr-161との軸配位, 3つの塩基性アミノ酸残基との水素結合により固定されている. 窒素雰囲気下でこの水溶液に亜二チオン酸を添加し, ヘミンを鉄(II)錯体(ヘム)へ還元すると, 可視吸収スペクトルはTyr-161が配位した鉄(II)5配位高スピン錯体を形成するが, 中心鉄(II)は酸素との接触により瞬時に酸化され, 安定な酸素錯体を得ることはなかった⁶⁾.

他方, 我々は4つのピバロイル基を有するテトラフェニルポルフィリン鉄錯体(FepivP)でもアルブミンに効率よく包接され, 得られたアルブミン-ヘム複合体が生理条件下(生理塩水中, pH7.3, 37°C)でヘモグロビン(Hb)やミオグロビン(Mb)と同じように酸素を吸脱着できることを明らかにしている^{7,11)}. 赤外吸収, 共鳴ラマン, 磁気円偏光二色性スペクトルなどから, 酸素配位錯体の電子状態を詳細に解析. 生体内でも“酸素運搬のできる血清ヘム蛋白質”として機能することを動物実験から定量的に検証している¹²⁾. また現在, 人工赤血球として開発が先行しているHb製剤の欠点である血圧亢進(副作用)も全く観測されていない¹³⁾. アルブミンはHbに比べ等電点が低く, 内皮細胞を取り囲む基底膜との間に負電荷どうしの静電反発を生じるため, その血管内皮透過性が低く, 血管内皮弛緩因子である一酸化窒素を消去しないので, 急激な血圧変動は見られないのである.

我々はアルブミン-ヘム酸素錯体のさらなる安定度向上を目指し, ヘム中心鉄近傍に疎水性の高いシクロヘキサノイル基を4つ導入したヘム誘導体(FecycP, Fig. 1)を合成¹⁴⁾, それを包接させたrHSA複合体の酸素錯体寿命が従来系(rHSA-

FepivP)に比べ4.5倍長くなることを見出した. 本報ではrHSA-FecycPの構造, 酸素及び一酸化炭素結合能, 血液相溶性について報告する.

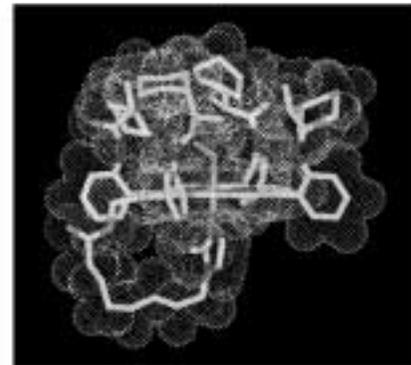
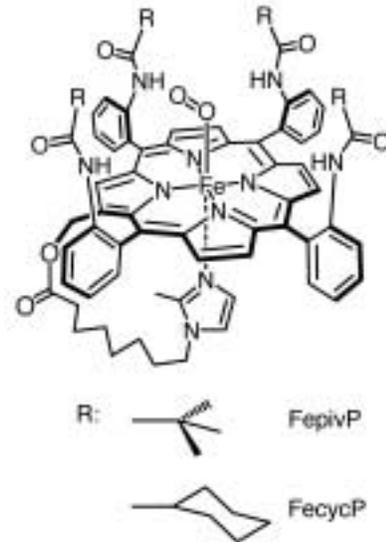


Figure 1. Structures of FecycP and FepivP, and the simulated structure of oxygenated FecycP. The esff forcefield simulation was performed using an Insight II system (Molecular Simulations Inc.). The structure was generated by alternative minimizations and annealing dynamic calculations from 1,000 K to 100 K. Dielectric constant was fixed at 2.38 D, corresponding to toluene solution. The dotted surface represents the van der Waals radius.

2. 実験方法

2.1 試薬, 試料, 装置

FecycP (2-[8-(N(2-methylimidazolyl)octanoyloxymethyl)-5,10,15,20-tetrakis(, , , - -methylcyclohexanoylamino)phenylporphyratoiron(FecycP))は既報に従い合成した¹⁴⁾. 組換えヒト血清アルブミン(rHSA) 25g dL^{-1} (Albrec[®])はニプロ(株)より提供頂いた. 従来法により, アルブミン-ヘム

([FecycP]/[rHSA] = 4, mol/mol, rHSA-FecycP (4), または 8, mol/mol, rHSA-FecycP (8)) 水溶液を調製¹⁴⁾. 紫外可視吸収 (UV-vis.) スペクトルは日本分光V-570を用い350 - 700 nmの範囲で測定. 円偏光二色性 (CD) スペクトルは日本分光 J-725 を用いて測定した (25). 等電点電気泳動は, Pharmacia Phastgel Systemを用いて測定. アルブミン濃度の定量はアルブミンテストワコー (和光純薬工業) を用い, ヘム (鉄イオン) 濃度の定量は誘導結合高周波プラズマ分光分析 (セイコー電子工業SPS7000A) により行った. FecycP酸素錯体の分子シミュレーションはInsight II (Molecular Simulations Inc.) を用いて構築, 分子力学計算と分子動力学計算を 1000 Kから100 Kまで降温させながら交互に実施 (誘電率は 2.38 D (トルエン溶液中) に設定) した.

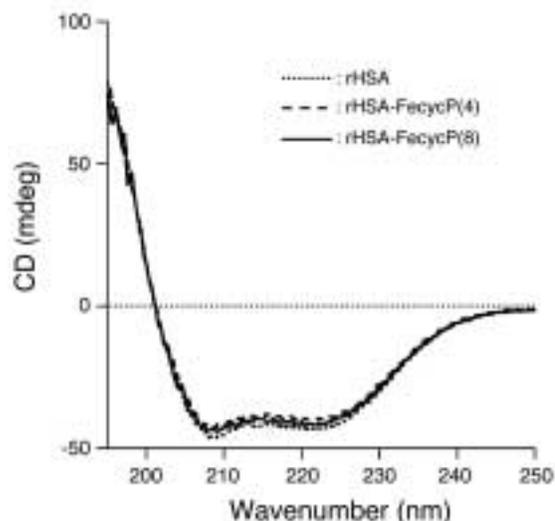


Figure 2. CD spectra of rHSA and rHSA-FecycP in water at 25 °C.

2.2 酸素及び一酸化炭素結合パラメーター

得られたrHSA-FecycP水溶液 ([FecycP]=20 μ M, pH7.3) へ酸素及び一酸化炭素を通気し, UV-vis.スペクトル変化を測定, スペクトルパターンから酸素錯体及び一酸化炭素錯体の形成を判定した. また, 酸素錯体吸収 (λ_{max} : 555 nm) の吸光度変化より酸素錯体半減期 ($t_{1/2}$) を算出. 異なる酸素及び一酸化炭素分圧に対するUV-vis.スペクトルの連続変化から, Drago式またはHill式を用いて酸素親和性 [$P_{1/2}^{O_2} = (K^{O_2})^{-1}$] 及び一酸化炭素親和性 ($P_{1/2}^{CO}$) を決定した^{9,14)}. また, 異なる温度における K^{O_2} 測定から, van't Hoff プロットを作成, 酸素結合に伴う熱力学パラメーター (ΔH , ΔS) を算出した⁹⁾.

さらに, レーザーフラッシュホトリシス装置 (ユニソク TSP-600, Nd:YAGレーザー第二高調波 (532 nm)) を用いて, 酸素及び一酸化炭素結合解離速度定数 (k_{on} , k_{off}) を決定^{9,14)}. 気体分子の再結合反応が多相系からなる場合は, 吸光度の減衰曲線を multiple-exponential curve でフィティングし, 速い成分と遅い成分に分離, 各々の速度定数を算出した⁹⁾.

また, キャピラリー粘度計 (Anton Paar DCR) を用いた溶液粘度測定 (37) からrHSA-FecycPと血液適合性を評価した.

3. 結果および考察

3.1 アルブミン-ヘムの構造

得られたrHSA-FecycP溶液のrHSA濃度及びFecycP (Fe) 濃度を定量し, [FecycP]/[rHSA] が 4 及び 8 (mol/mol) であることを確認した. [FecycP]/[rHSA] を 10 (mol/mol) 以上で調製した場合でも, 得られたアルブミン-ヘム溶液中の[FecycP]/[rHSA] は 8 ~ 9 (mol/mol) であったことから, rHSA 1 分子に対するFecycPの最大結合数を 8 分子と決定した. rHSA-FecycPのCDスペクトルパターンはFecycPの包接数によらずrHSAと同等であり, ヘムが結合した後もアルブミンの二次構造に変化はない (α -ヘリックス含量: 67%) (Fig. 2). また, rHSA-FecycP (4, 8) の等電点 (pI) も包接ヘム数によらず 4.8 と一定で, この値はFecycPを結合していないrHSAの値と一致した. FepivPと同様, FecycPIはrHSAの疎水ドメインへ疎水性相互作用により取り込まれていると考えられる.

3.2 酸素及び一酸化炭素結合能

rHSA-FecycP (4, 8) のUV-vis.スペクトルは, 窒素雰囲気下で λ_{max} : 445, 543, 567nmを示し, ヘム鉄 (II) が 5 配位高スピン錯体 (deoxy体) であることを示唆している⁷⁾. そこへ酸素を通気すると, スペクトルパターンは酸素分圧の増大に伴い等吸収点を持ちながら連続的に変化し, 酸素錯体型 (λ_{max} : 428, 555nm) (oxy体) へ移行した (Fig. 3). この酸素結合解離は酸素 / 窒素の吹き込みに伴い可逆的に繰り返し観測された. また, 一酸化炭素を吹き込むと, きわめて安定なcarbonyl体 (λ_{max} : 429, 545 nm) が得られた. 異なる酸素分圧に対するUV-vis.スペクトル変化から算出した酸素親和性 ($P_{1/2}^{O_2}$) は 34 ~ 35 Torr (37) でヒト赤血球 (27 Torr) やHb (T-state)

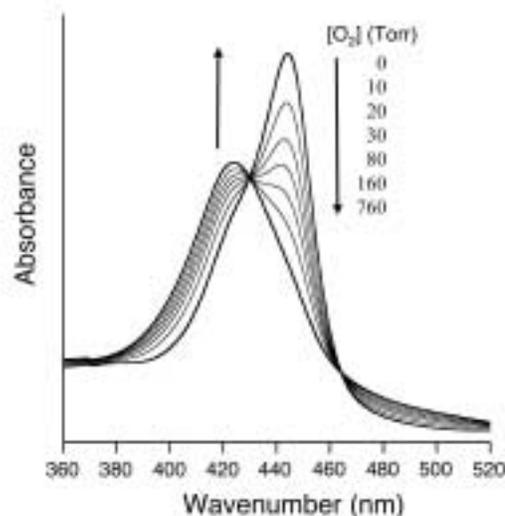


Figure 3. UV-vis. absorption spectral changes of rHSA-FecycP(4) dependent of the oxygen partial pressure in phosphate buffer solution (pH 7.3) at 37 °C.

Table 1. O₂-Binding equilibrium parameters and half-lifetime of rHSA-FecycP in phosphate buffer solution (pH 7.3).

| | $P_{1/2}$ [Torr] ^{a)} | ΔH [kJ mol ⁻¹] | ΔS [J K ⁻¹ mol ⁻¹] | $t_{1/2}$ [hr] ^{a)} |
|------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|---|------------------------------|
| rHSA-FecycP(4) | 34 | -59 | -108 | 9 |
| rHSA-FecycP(8) | 35 | -59 | -107 | 9 |
| rHSA-FepivP(4) ^{b)} | 36 | -60 | -114 | 2 |
| rHSA-FepivP(8) ^{b)} | 33 | -60 | -112 | 2 |
| Red cell ^{c)} | 27 | | | |
| Hba | 40 ^{d)} | -57 to -65 ^{e)} | -116 to -133 ^{e)} | 35 ^{f)} |
| Mb ^{d)} | 40 ^{d)} | -57 to -65 ^{e)} | -116 to -133 ^{e)} | 12 ^{g)} |

^{a)}At 37°C, ^{b)}Ref. 7, ^{c)}pH 7.4, ref. 15, ^{d)}T-state, pH 7, 20°C, ref. 16, ^{e)}pH 7.4, ref. 17, ^{f)}At 37°C, pH 7.2, ref. 18, ^{g)}At 35°C, pH 7.0, ref. 19.

(40 Torr)に近い (Table 1)^{5,16)}. Hbの酸素結合過程に見られる協同現象 (アロステリック効果) は観測されないが (Hill係数: 1.0), 例えば肺 (P_{O_2} : 110 Torr) ~ 末梢組織 (P_{O_2} : 40 Torr) 間におけるrHSA-FecycPの酸素運搬効率 (22%) は赤血球の値 (22%) に匹敵することから, 人工酸素運搬体としての十分な酸素輸送能力を有していると言ってよい.

van't Hoff プロット (Fig. 4) から決定した酸素結合反応のエントルピー変化 ΔH (-59 kJ mol⁻¹) 及びエントロピー変化 ΔS (-107 J K⁻¹mol⁻¹) は, 包接ヘム数によらず一定で, rHSA-FepivPや赤血球の値と同等であった (Table 1)^{7,17)}. 4つのピバロイル基をシクロヘキサノイル基に変換しても, 酸素親和性やその熱力学パラメーターに変化はないことが明らかとなった.

また, 酸素錯体半減期 ($t_{1/2}$) は9 h (37) と長く, この値はMbの $t_{1/2}$: 12hにも迫る^{18,19)}. 酸素配位座近傍に疎水性の

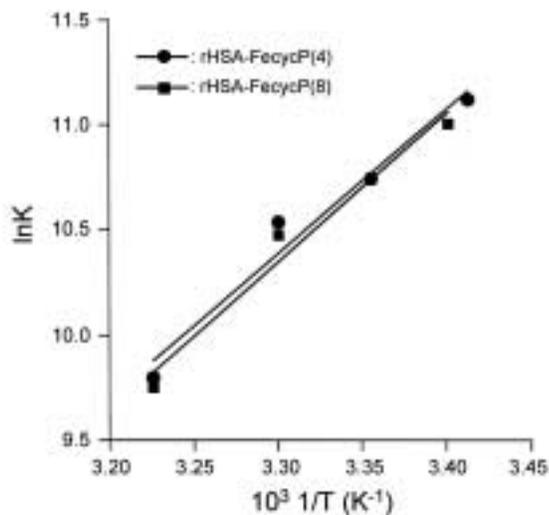


Figure 4. van't Hoff plots of oxygen-binding affinity of rHSA-FecycP in phosphate buffer solution (pH 7.3).

Table 2. O₂-Association and dissociation rate constant of rHSA-FecycP in phosphate buffer solution (pH 7.3) at 25 .

| | k_{on} [M ⁻¹ s ⁻¹] | | k_{off} [s ⁻¹] | |
|------------------------------|---|-------------------|------------------------------|-------------------|
| | fast | slow | fast | slow |
| rHSA-FecycP(8) | 4.6×10^7 | 7.3×10^6 | 9.8×10^2 | 1.6×10^2 |
| rHSA-FepivP(8) ^{a)} | 3.4×10^7 | 9.5×10^6 | 7.5×10^2 | 2.0×10^2 |
| Hb (T-state) $\alpha^b)$ | 2.9×10^6 | | 1.8×10^2 | |

^{a)}Ref. 9, ^{b)}pH 7, 20°C, ref. 16.

Table 3. CO-Binding parameters of rHSA-FecycP in phosphate buffer solution (pH 7.3) at 25 .

| | $P_{1/2}^{CO}$ [Torr] | k_{on} [M ⁻¹ s ⁻¹] | |
|--------------------------|-----------------------|---|-------------------|
| | | fast | slow |
| rHSA-FecycP(8) | 0.04 | 5.9×10^6 | 8.9×10^5 |
| rHSA-FepivP(8) | 0.1 | 4.9×10^6 | 6.7×10^5 |
| Hb (T-state) $\alpha^a)$ | 0.3 | 2.2×10^5 | |

^{a)}Aqueous, pH 7-7.4, 20°C, ref. 21, 22.

高いシクロヘキサノイル基を4つ導入したことにより, 配位酸素へのプロトン付加が誘起する一分子酸化過程が抑制できたためと考えられる. FecycP酸素錯体の分子シミュレーション結果からも, 4つのシクロヘキサノイル基が, 配位酸素分子を取り囲むように位置している様子がわかる (Fig. 1).

アルブミン-ヘム水溶液にレーザーフラッシュを照射すると, 配位酸素や一酸化炭素の解離と再結合が観測される. この瞬時に起こる非平衡状態から平衡状態へのUV-vis.スペクトル変化から, 配位気体分子の結合解離速度定数 (k_{on} , k_{off}) が算出できる^{9,13)}. rHSA-FecycPへの一酸化炭素再結合過程 (deoxy体からcarbonyl体へ戻る際の吸光度の時間変化) はtriple-exponential curvesのフィッティングが最適であった. 最も速い成分は一酸化炭素分圧に依存せず, 軸塩基配位子であるイミダゾール基の脱離を経由した反応と考えられる^{9,20)}. 一方, 残りの2成分は一酸化炭素濃度に比例し, これらがdeoxy体への一酸化炭素再結合反応に相当する. アルブミン内部に取り込まれたヘムへの一酸化炭素結合は, ヘム近傍の微小な分子環境の相違に影響を受けるため, 厳密には各サイトでそれぞれ異なる速度定数を示すものと推測されるが, 大別して速い反応と遅い反応の二つの過程として解析することができた^{9,13)}.

一方, rHSA-FecycP (4, 8) への酸素結合過程は2成分から構成された. レーザーフラッシュ照射後の酸素再結合過程には, 軸配位子であるイミダゾールの解離を経由した反応は見られないことが知られており²⁰⁾, 酸素の再結合も一酸化炭素の場合同様, 2成分系として解析した. rHSA-FecycP (4, 8) の酸素及

び一酸化炭素結合パラメーターをTable 2, 3にまとめる^{16,21,22}。

また, rHSA-FecycP (4, 8)の一酸化炭素親和性 ($P_{1/2}^{CO}$)は0.04Torrで, rHSA-FepivPの $P_{1/2}^{O_2}$: 0.1Torrに比べて小さい(一酸化炭素親和性は高い)。これはFecycPの酸素配位座近傍における極性が, FepivPに比べて低いためと考えている。両者のCO結合速度定数 (k_{on}^{CO})が, それぞれ 5.9×10^6 , $4.9 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$ と同等であったことから, FecycPの高い一酸化炭素親和性は小さな解離速度定数に起因するものと推察される。この結果はHbやMbの低い一酸化炭素親和性が遠位ヒスチジンの立体障害ではなく, ヘムポケットの高い極性によるという最近の解釈を支持している^{23,24}。

3.3 アルブミン-ヘムの血液適合性

rHSA-FecycP溶液の粘度曲線をFig. 5に示す。rHSA-FecycP (4, 8)は共にニュートン粘性を示し, ずり速度 $230s^{-1}$ における粘度は1.2cPで, rHSAとほぼ同等であった。rHSA-FecycP溶液を血液と1:1 (v/v)で混合した場合, 沈殿・凝集は全く認められず, 安定な混合溶液として存在した ($2.0cP$ ($230s^{-1}$))。rHSA-FecycP溶液の高い血液適合性が実証された。

4. 結論

組換えヒト血清アルブミンに4つのシクロヘキサノイル基を有するヘム誘導体を包接させたアルブミン-ヘム複合体は, 従来系に比べて安定な酸素錯体を形成できる。酸素配位座近傍に疎水性のシクロヘキサノイル環を4つ導入したことにより, 配位酸素へのプロトン(水)付加が誘起する一分子酸化過程が抑制されたためと考えられる。さらに我々は, 分子内配位している軸塩基(2-メチルイミダゾリルオクタノイル基)をHbと同じヒスチジル基に変換すると, 酸素錯体半減期が25h (37)まで延命することも見出している¹²⁾(この場合, 酸素親和性は1.0Torrと高い)。rHSA-FecycPの酸素親和性(34Torr)はrHSA-FepivPの値と変わることなく, 半減期のみが9hに延長

され, その安定度はMb ($t_{1/2}$: 12h)に迫った。得られたrHSA-FecycP溶液は, 室温2年間の保存が可能。また, 酸素及び一酸化炭素の結合解離過程には, 速い相と遅い相の二つの反応が存在した。包接サイトの構造の違い(例えばアミノ酸残基が酸素結合部位周辺に立体障害基として存在するなど)により, 各ヘムへの酸素及び一酸化炭素結合速度に差が生じたものと考えられる。rHSA-FecycPと全血液を同容量で混合した場合も凝集・沈殿の惹起を認めず, 血液適合性も高い。最近, このrHSA-FecycPを用いた動物実験から, 本製剤が生体内でも安全性高く酸素運搬できることを明らかにしている。現在, 赤血球代替物としてのさらなる機能評価を進めているので, その詳細は次報で紹介したい。

謝辞

本研究の一部は, 厚生労働科学研究費補助金(医薬安全総合研究事業)およびニプロ(株)からの支援により行われた。記して謝意を表す。

参考文献

1. 厚生労働省ホームページ (<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2003/06/s0627-12.html>) 平成15年度第2回薬事・食品衛生審議会血液事業部会需給調査会資料。
2. Tolosano E, Altruda F. Hemopexin: structure, function, and regulation. *DNA Cell Biol* 2002;21:297-306.
3. Paoli M, Anderson BF, Baler HM, Morgan WT, Smith A, Baker EN. Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two α -propeller domains. *Nature Struct Biol* 1999;6:926-931.
4. Adams PA, Berman MC. Kinetics and mechanism of the interaction between human serum albumin and monomeric heamin. *Biochem J* 1980;191:95-102.
5. Zunszain PA, Ghuman J, Komatsu T, Tsuchida E, Curry S. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC Struct Biol* 2003;3:6.
6. Komatsu T, Ohmichi N, Tsuchida E, unpublished data.
7. Tsuchida E, Komatsu T, Mastukawa Y, Hamamatsu K, Wu J. Human serum albumin incorporating tetrakis(*o*-pivalamido)phenylporphinato-iron(II) derivative as a totally synthetic O_2 -carrying hemoprotein. *Bioconjugate Chem* 1999;10:797-802.
8. Komatsu T, Hamamatsu K, Tsuchida E. Cross-linked human serum albumin dimers incorporating sixteen (tetraphenylporphinato)iron(II) derivatives: synthesis, characterization, and O_2 -binding property. *Macromolecules* 1999;32:8388-8391.
9. Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E. Kinetics of CO and O_2 binding to human serum albumin-heme hybrid. *Bioconjugate Chem* 2000;11:772-776.

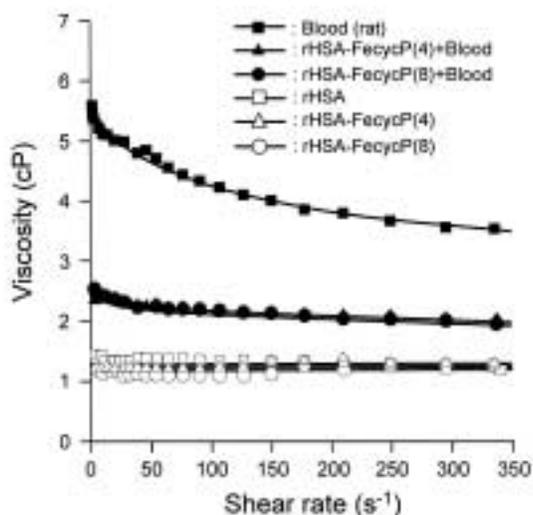


Figure 5. Viscosity of rHSA-FecycP solution with whole blood at 37 °C.

10. Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E. Reaction of nitric oxide with synthetic hemoprotein, human serum albumin incorporating tetraphenylporphyrinatoiron(II) derivatives. *Bioconjugate Chem* 2001;12:71-75.
11. Komatsu T, Okada T, Moritake M, Tsuchida E. O₂-binding properties of double-sided porphyrinatoiron(II)s with polar substituents and their human serum albumin hybrids. *Bull Chem Soc Jpn* 2001;74:1695-1702.
12. Tsuchida E, Komatsu T, Hamamatsu K, Matsukawa Y, Tajima A, Yoshizu A, Izumi Y, Kobayashi K. Exchange transfusion of albumin-heme as an artificial O₂-infusion into anesthetized rats: physiological responses, O₂-delivery and reduction of the oxidized heme sites by red blood cells. *Bioconjugate Chem* 2000;11:46-50.
13. Tsuchida E, Komatsu T, Matsukawa Y, Nakagawa A, Sakai H, Kobayashi K, Suematsu M. Human serum albumin incorporating synthetic heme: red blood cell substitute without hypertension by nitric oxide scavenging. *J Biomed Mater Res* 2003;64A:257-261.
14. Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E. Effect of heme structure on O₂-binding properties of human serum albumin-heme hybrids: intramolecular histidine coordination provides a stable O₂-adduct complex. *Bioconjugate Chem* 2002;13:397-402.
15. Severinghaus JW. Blood gas calculator. *J. Appl Physiol* 1966;21:1108-1116.
16. Sawicki CA, Gibson QH. Properties of the T state of human oxyhemoglobin stideid by laser flash photolysis. *J Biol Chem* 1977;252:7538-7547.
17. Imai K, Yonetani T. Thermodynamical studies of oxygen equilibrium of hemoglobin. *J Biol Chem* 1975;250:7093-7098.
18. Sugawara Y, Shikama K. Autoxidation of native oxymyoglobin. *Eur J Biochem* 1980;110:241-246.
19. Mansouri A, Winterhalter H. Nonequivalence of chains in hemoglobin oxidation. *Biochemistry* 1973;12:4946-4949.
20. Traylor TG, Tsuchiya S, Campbell D, Mitchell M, Stynes D, Koga N. Anthracene heme cyclophanes. Steric effects in CO, O₂, and RNC Binding. *J Am Chem Soc* 1985;107:604-614.
21. Steinmeier RC, Parkhurst LJ. Kinetic studies on the five principle components of normal adult human hemoglobin. *Biochemistry* 1975;14:1564-1573.
22. Sharma VS, Schmidt MR, Ranney HM. Dissociation of CO from carboxyhemoglobin. *J Biol Chem* 1976;251:4267-4272.
23. Springer BA, Sligar SG, Olson JS, Philips GN Jr. Mechanism of ligand recognition in myoglobin. *Chem Rev* 1994;94:699-714.
24. Matsuura M, Tani F, Naruta Y. Formation and characterization of carbon monoxide adducts of iron "twin coronet" porphyrins. Extremely Low CO affinity and a strong negative polar effect on bound CO. *J Am Chem Soc*;2002;124:1941-1950.

酸素輸液ヘモグロビン小胞体に混在するリポポリサッカライドの定量法

Detection of Lipopolysaccharide Contaminating Hemoglobin-Vesicles as Artificial Oxygen Carriers

久本 秀治, 酒井 宏水, 福富 一平, 宗 慶太郎, 武岡 真司, 土田 英俊*

Shuji Hisamoto, Hiromi Sakai, Ippei Fukutomi, Keitaro Sou, Shinji Takeoka, and Eishun Tsuchida*

和文抄録

菌体由来のリポポリサッカライド (LPS) は両親媒性分子であるため、疎水性相互作用によりリン脂質小胞体或いはリポソームの脂質二分子膜に取込まれ易く、一般的なリムルステスト (*Limulus* Amebocyte Lysate: LALゲル化反応試験) では正確に定量されないことが問題となる。リン脂質小胞体の内水相に高濃度ヘモグロビン (Hb) を内包したHb小胞体 (HbV) の品質管理の面でも正確なLPS定量の確立は重要課題である。そこで本研究では、界面活性剤deca(oxyethylene)dodecyl ether ($C_{12}E_{10}$) でHbVを溶解してLPSを遊離させた後、LAL試薬と混合し、ゲル化反応を比濁時間分析法によって解析する方法を検討した (検出波長660 nm)。界面活性剤 $C_{12}E_{10}$ はゲル化反応を濃度依存的に阻害するので、 $C_{12}E_{10}$ 濃度とHbV可溶性および阻害作用の相関を解析し、LPSの検出限界が0.1 EU/mLとなる最適測定法を確立した。

Abstract

A method to quantitatively measure the bacterial endotoxin content (lipopolysaccharide, LPS) in phospholipid vesicles or liposomes has been required because the conventional *Limulus* amebocyte lysate (LAL) test does not provide an accurate measurement due to the hydrophobic interaction of LPS and vesicles that shields the activity of LPS to clot the LAL coagulant. Hemoglobin-vesicles (HbV) are artificial oxygen carriers encapsulating a conc. Hb solution in phospholipid vesicles. To accurately measure the LPS content in the HbV for the quality control, we tested the solubilization of HbV with deca(oxyethylene) dodecyl ether ($C_{12}E_{10}$) to release the LPS entrapped in the vesicles as a pretreatment for the succeeding LAL assay of the kinetic-turbidimetric gel clotting analysis (detecting wavelength, 660 nm). The $C_{12}E_{10}$ surfactant interferes with the gel clotting in a concentration dependent manner, and the optimal condition was determined in terms of minimizing the dilution factor and $C_{12}E_{10}$ concentration. We clarified the condition that allowed the measurement of LPS higher than 0.1 EU/mL in the HbV suspension.

Keywords

endotoxin, hemoglobin, lipopolysaccharide, oxygen carriers, *limulus* amebocyte lysate.

1. 緒言

ヘモグロビン (Hb) を濃度高くリン脂質小胞体の内水相に内包したヘモグロビン小胞体 (HbV) が人工酸素運搬体として開発され、赤血球と同等の酸素運搬機能と安全性が動物投与試験から明らかにされてきた^{1,5)}。生物製剤に分類されるHbVの製造工程はGMP (good manufacturing practice) の基準に沿って、不純物やウィルス / 菌体の混入防御に関して厳格に対処し

なければならない。エンドトキシンとして知られるグラム陰性菌体由来のリポポリサッカライド (LPS) は極く微量でも様々な毒性を示す⁶⁾。例えばLPSの致死量 (LD_{50}) は、ラットで3 mg/kg、犬で1 mg/kgである^{7,8)}。米国FDAはヒトに対する非経口的投与薬剤の場合、LPS許容投与量を5 EU/kgと規定している⁹⁾。この規定はHbV静注液にも該当すると考えられる。LPS濃度はエンドトキシン活性 (Endotoxin Unit: EU; 1EU=100

pg)として表され、カプトガニの血球抽出物 (*Limulus* amoebocyte lysate; LAL試薬)との反応によって測定する(リムルステスト)。LALはLPSに対し濃度依存的に凝固しゲルを形成する¹⁰⁾。ウサギ発熱試験に比較して、リムルステストでは検体が少量でも繰り返し測定できる利点を有する¹¹⁾。人工酸素運搬体の適応は主として出血ショック蘇生や血液希釈であり、投与量は20 mL/kg或いはそれ以上が想定され、この場合LPSの許容量は、0.25 EU/mL (= 5/20)となる。これは注射用水の許容量0.25 EU/mLと同じである。

菌体由来LPSは両親媒性の巨大分子であり、蛋白質や生体膜と疎水性相互作用をする¹²⁾。HbもLPSと強く結合し様々な神経毒性を示すことが報告されている¹³⁾。LAL試薬のゲル化を惹起するのはLPS分子中のLipid-Aとよばれる糖結合リン脂質の部分である¹⁴⁾。数本の脂肪酸を有するLipid-Aは、リン脂質小胞体の二分子膜に容易に挿入されるので、LPS特有のLAL試薬のゲル化反応や、その他の反応性が阻害される^{15,16)}。従って、HbVの品質管理においてLPSの正確な定量法の確立が極めて重要と成る¹⁷⁻²⁰⁾。本研究では、界面活性剤を利用してHbVを容易に溶解しLPSを遊離する条件を見出すとともに(Fig. 1)、トキシノメータ[®]によりLAL試薬のゲル化反応を比濁時間分析法によって解析し、阻害反応をできるだけ抑制する前処理条件を決定することを目的とした。

2. 方法

ヘモグロビン小胞体 (HbV) の調製

PEG修飾HbVは既報²¹⁻²³⁾に従い無菌雰囲気下にて調製した。高純度Hbは北海道赤十字血液センター(札幌)および日本赤十字社(東京)から提供された期限切れ献血血液から精製した。限外濾過膜によるストローム除去と、加熱処理(60℃, 10時間)で変性沈澱した夾雑蛋白質の除去により、高純度Hbを得た(>99.9%)²⁴⁾。濃厚Hb溶液(38 g/dL)にアロステリック因子として14.7mMのpyridoxal-5'-phosphate (PLP, メルク社製, Darmsdort, Germany)を、モル比でPLP/Hb = 2.5となるように添加し小胞体に内包した。小胞体の脂質二分子膜の構成成分は、1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC), コレステロール, 1,5-di-*O*-hexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate

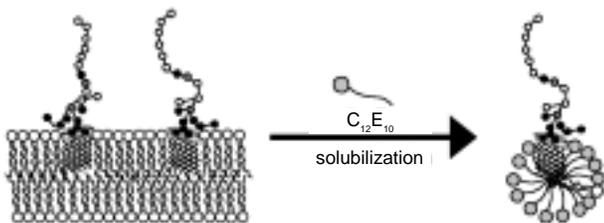


Figure 1. Solubilization of LPS-contaminated vesicles with a detergent to form mixed micelles.

(DPEA 日本精化製, 大阪)および, 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-PEG₅₀₀₀ (PEG-DSPE, 日本油脂社製, 東京)である²⁵⁾。DPPC/コレステロール/DPEA/PEG-DSPEの混合比は5/5/1/0.033 (モル比)とした。HbV粒子は生理食塩水中にHb濃度10 g/dLになるように分散した。HbVの物性パラメータは以下の通り: 粒径, 251 ± 80 nm; [Hb], 10 g/dL; [metHb], <3%; [lipids], 5.6 g/dL; 酸素親和度 (P₅₀), 31 Torr。分析法は全て既報²⁶⁾に従った。

界面活性剤によるHbVの可溶性条件の決定

HbV分散液を純水で2又は5倍希釈し ([Hb]=2 or 5 g/dL, 200 μL), deca(oxyethylene)dodecyl ether (C₁₂E₁₀, Sigma社製, 純水中に0~10vol%で溶解, 800 μL)と混合して石英キューベット(2 mm)に入れた。混合液を42℃, 2分加熱して可溶化を促進させた。紫外可視分光光度計(V-560, 東京電子, 東京)により, 660 nmの濁度を測定した。比較として, リポソームや生体膜の可溶化によく用いられるドデシル硫酸ナトリウム(SDS, 関東化学(株)製, 東京), Triton-X100, nona(oxyethylene)dodecyl ether (C₁₂E₉) (Sigma社製)についても比較検討した。

リムルステストにおける検量線と界面活性剤の影響

日本薬局方で規定された標準LPS粉末(*E. coli* UKT-B由来, マンニトールとグリシンを含む, 和光純薬工業社製, 東京)を注射用蒸留水(大塚製薬社製, 大阪)に溶解して原液([LPS]=500 EU/mL)を調製した。LPS標準溶液([LPS]=0.01-20 EU/mL)は原液を注射用蒸留水で希釈して調製した。LPS標準溶液(200 μL)とC₁₂E₁₀溶液(0~5 vol%, 800mL)を混合し, 注射用蒸留水で8倍希釈し, 等容量のLAL試薬(リムルスES-テストワコー, 和光純薬工業社製)と混合した。LAL試薬には, カプトガニ*Limulus Polyphemus*血球抽出物, トリス塩酸緩衝液(pH = 7.1), -1,3-グルカン誘導体を含む。注射用蒸留水中のLPS含量は検出範囲外(<0.0001 EU/mL)であった。LPS含量は, LAL試薬とLPSのゲル化反応による濁度変化をトキシノメータ[®](ET-201, 和光純薬工業社製)を用いた比濁時間分析法により定量した。ゲル化時間はマニュアルに従い660 nmの透過率が95%まで減少した時間と定義した。Hb溶液およびHbVの場合, Hbの強い光吸収が400~600 nmにあるため, キシノメータ[®]の測定波長660 nmは, Hbの吸収を避けているので適当と考える。

HbV分散液中のLPS定量法とその検証

Fig. 2のスキームに沿って, HbV分散液([lipid] = 6.0 g/dL, [Hb] = 10 g/dL)をLPSフリーの試験管に分注して注射用蒸留水で希釈し, C₁₂E₁₀溶液と混合, 42℃で2分加熱した。次いで混合液を注射用蒸留水により8倍希釈しその後, 溶液をLAL試薬に添加し, ゲル化による濁度変化をトキシノメータ[®]ET-201を用いた比濁時間分析法により解析した。

本法の妥当性を検証するため, 添加LPSの回収率を測定した。

LPS標準溶液 ([LPS] = 0.4 ~ 10.0 EU/mL) を脂質粉末に添加し、脂質濃度を6.0 g/dLに調整した。脂質分散液を攪拌し、注射用蒸留水により5倍希釈し、凍結融解を3回行ってLPS担持小胞体を調製した。回収率は、上述の方法によって定量したLPS濃度と添加LPS濃度の比較から算出した。

更にHbVでも同様の実験を行った。HbV分散液 ([Hb]= 4 g/dL) を等容量のLPS標準液 ([LPS] = 0.04 ~ 4.0 EU/mL) と混合してLPS担持HbV分散液 ([Hb] = 2 g/dL) を調製し、 $C_{12}E_{10}$ 溶液で溶解し上述の方法によりリムルテストを行った。Hb溶液については、同上のLPS標準溶液 ([LPS] = 0.002 ~ 2.0 EU/mL) を等容量のHb溶液 ([Hb] = 4 g/dL) と混合して、LPS含有Hb溶液 ([Hb] = 2 g/dL) を調製し、直接LAL試薬と混合後LPS濃度を定量した。回収率は、定量したLPS濃度と添加LPS濃度の比較から算出した。

$C_{12}E_{10}$ 処理の有効性を確認するために、LPS担持小胞体を上述の方法に従って、 $C_{12}E_{10}$ を使う系と使わない系で比較検討した。先ず、LPS溶液 (1.0 EU/mL) を脂質粉末に添加 (1.2 g/dL) して小胞体を調製。脂質分散液に凍結融解を3度行って分散を高め、粒径を約500 nmに制御した。上述のように、 $C_{12}E_{10}$ を使う系と使わない系でLPS濃度を定量した。

3. 結果

$C_{12}E_{10}$ 界面活性剤によるHbVの可溶化

波長660 nmにおけるHbV分散液の吸光度は1.13であり、HbV粒子による光散乱 (濁度) のためHb溶液の吸光度 (0.08) よりも極めて高い値となった。しかし $C_{12}E_{10}$ 溶液の添加につれ吸光度は減少し、HbVの可溶化が示唆された。完全溶解には2 vol%の $C_{12}E_{10}$ 溶液の添加を必要とした。この時の吸光度は小胞体が無いHb溶液のみの吸光度と等しくなった。可溶化処理後、溶

液は赤色から褐色に変化し、metHbへの変化が示唆されたが、沈澱形成は認められなかった。結果的に溶液中の $C_{12}E_{10}$ 濃度とHbVの脂質濃度は各々1.6 g/dL, 0.24 g/dLであった。 $C_{12}E_{10}$ は混合ミセルの87 wt% (86 mol%) を占めている。他の界面活性剤については、 $C_{12}E_9$ が $C_{12}E_{10}$ と同様のHbV可溶化能を示した。一方、Triton-X100では吸光度は0.4までの低下、SDSでは0.6までの低下であり、HbVを十分に可溶化できなかった。

リムルテストに対する $C_{12}E_{10}$ の影響

ゲル化時間とLPS終濃度の関係を対数プロットとして示し、これを検量線とした (Fig. 3)。幅広いLPS濃度範囲 (LPS終濃度: 0.000125 ~ 0.25 EU/mL) で直線関係が得られた。 $C_{12}E_{10}$ 濃度を増加させるにつれ、ゲル化が妨げられる傾向 (ゲル化時間の延長) が見られた。しかし、 $C_{12}E_{10}$ 終濃度が0.1 vol%の時はゲル化の著しい阻害は見られなかった。LPS濃度0.01 EU/mLの場合、 $C_{12}E_{10}$ 無添加のゲル化時間は約32分であったが、 $C_{12}E_{10}$ 濃度0.1 vol%では39分、2.0 vol%では約107分に延長した。エチレンオキサイド鎖が1ユニット短い $C_{12}E_9$ の場合、濃度0.1 vol%の場合はゲル化時間が50分に延長し、 $C_{12}E_9$ のゲル化阻害効果は $C_{12}E_{10}$ よりも高かった。

HbV分散液中のLPS定量

LPS検出限界の向上のため、可溶化処理におけるHbV濃度の増加、又は希釈率の低減によって希釈倍率を変えてみた (Table 1)。 $C_{12}E_{10}$ 濃度0.1 vol%の条件 (Entry-1) に、最小の検出限界 (0.1 EU/mL) が得られた。Entry-2, 3, 4の条件では希釈倍率を減らすことができたが、Fig. 3に示すように、 $C_{12}E_{10}$ 濃度が0.4 vol%以上では著しいゲル化の阻害起るため、検出限界が悪くなった (0.23 EU/mL)。

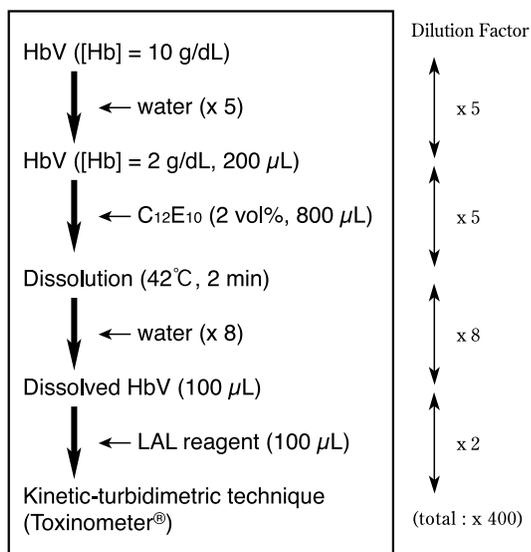


Figure 2. Procedures to quantitatively measure LPS in the HbV suspension using $C_{12}E_{10}$ for HbV solubilization and LAL assay, and dilution factors at every mixing of solutions. The experimental condition is for Entry 1 in Table 1.

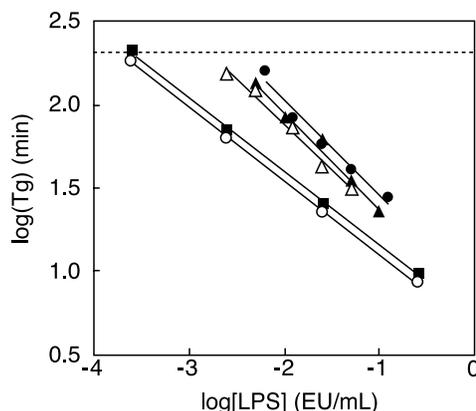


Figure 3. Calibration curves for the quantitative measurement of LPS in the presence of $C_{12}E_{10}$ at various concentrations (vol%); 2.0 (●), 0.8 (○), 0.4 (△), 0.1 (▲), 0 (□). [LPS] is the final concentration in the test tube for turbidimetry. Dilution factors should be multiplied to obtain [LPS] in the HbV suspension at [Hb] = 10 g/dL. For example, [LPS] should be multiplied with 400 at [$C_{12}E_{10}$] = 0.1 vol%. The broken line indicates the gelation time limit for Toxinometer[®] (200 min).

Table 1. Solubilization conditions of HbV with C₁₂E₁₀ and detection limit of LPS. The calibration curves are shown in Fig. 3.

| Entry | Condition of HbV solubilization | | dilution factor ^{a)} | Final [C ₁₂ E ₁₀] (vol%) | Detection limit of LPS (EU/mL HbV) ^{b)} |
|-----------------|---------------------------------|--|-------------------------------|---|--|
| | HbV / 200 μL ([Hb] g/dL) | C ₁₂ E ₁₀ / 800 μL ([C ₁₂ E ₁₀] vol%) | | | |
| 1 ^{c)} | 2 | 2 | 400 | 0.1 | >0.1 |
| 2 | 2 | 2 | 100 | 0.4 | >0.25 |
| 3 | 2 | 2 | 50 | 0.8 | >0.25 |
| 4 | 5 | 5 | 20 | 2.0 | >0.23 |

^{a)} see Fig. 2. from HbV ([Hb]= 10 g/dL) to gel clotting assay.

^{b)} at [Hb]=10 g/dL.

^{c)} The optimal condition in this study

添加LPSの回収率は、低濃度から高濃度まで幅広いLPS濃度範囲で92%と124%の間におさまった (Table 2). Hb溶液のLPS定量では、界面活性剤を必要としないためより低いLPS濃度 (0.005 EU/mL) の検出が可能であり、C₁₂E₁₀を必要とするHbVの検出限界 (0.1 EU/mL) と比べて検出感度が向上した. 1987年に発表されたFDAガイドラインによると、検出限界濃度の4倍濃度でのLPS添加回収試験の実施を必要とし、回収率は100 ± 25%以内でなければならない. そこでリン脂質小胞体に0.4 EU/mL (=4 × 0.1 EU/mL), Hb溶液に0.02 EU/mL (=4 × 0.005 EU/mL) のLPSを添加し回収率を測定したところ、全て100 ± 25%以内であることが確認できた.

LPS担持小胞体中のLPS定量では、C₁₂E₁₀を用いた上記リムルテストにより1.03 EU/mLと判明した. 一方、C₁₂E₁₀を添加せず小胞体を破壊しない状態でリムルテストをしたところ0.6 EU/mLとなった. この場合、回収率は60%に留まった.

4. 考察

両親水性LPSとリン脂質小胞体の疎水性相互作用がLAL試薬の活性に影響すること、またその他LPSの生理活性が抑制されることは多々報告されている^{15,16,27,28}). 他方、HbとLPSの相互作用についてはJurgensらが最近、Hb分子1個当たり3~5個のLPSが結合することを報告している²⁹). 従ってリムルテストによるHbVのLPS定量の前段階として、何らかのLPS遊離法が必要なることは明らかである. これまでにリン脂質小胞体の前処理として有機溶媒や界面活性剤を使用する方法が報告されているが^{18,19,30}), HbVに多量に含まれる蛋白質Hbは有機溶媒に不溶なので、我々は界面活性剤を利用する方法を検討し、Hb濃度10 g/dLのときLPS濃度0.1 EU/mLまでの測定を可能とした. HbVの分散状態と形態の安定度は極めて高いが、界面活性剤としてC₁₂E₁₀を添加し42 で2分間インキュベーションすればHbVは完全に溶解でき、前処理法として利用できることが明らかとなった.

Fig. 3に示すように、C₁₂E₁₀は特に高濃度でLAL試薬のゲル化時間を延長した. しかしC₁₂E₁₀最終濃度0.1 vol%では阻害作用は

Table 2. Inhibition/enhancement testing to monitor the recovery of spiked LPS. LPS was spiked in the C₁₂E₁₀-solubilized vesicles and HbV, and Hb solution without C₁₂E₁₀. *n = 3. All the data are converted to the conditions of [Hb]=10 g/dL, or [lipid]=6 g/dL.

| Sample | Spiked LPS (EU/mL) | Recovery (%) |
|---|---|--------------|
| Vesicles (6 g/dL) with C ₁₂ E ₁₀ | 0.4 | 108.6±4.6* |
| | 1.25 | 92 |
| | 2.5 | 116 |
| | 5 | 103 |
| | 10 | 120 |
| HbV (Hb, 10 g/dL; lipid, 6 g/dL) with C ₁₂ E ₁₀ | 0.1 | 107 |
| | 0.4 | 111.3±3.6* |
| | 1.0 | 114 |
| | 10.0 | 112 |
| | Hb solution (10 g/dL) without C ₁₂ E ₁₀ | 0.005 |
| 0.02 | | 103.9±4.4* |
| 0.05 | | 101 |
| 0.5 | | 124 |
| 5 | | 97 |

低減される. 他の界面活性剤を検討したところ、nona (oxyethylene) dodecyl ether (C₁₂E₉) はHbVの溶解能には優れるがより強いゲル化阻害作用を示し、Triton-X100はHbVの溶解能が不十分となった. イオン性界面活性剤SDSも十分に溶解できないし、更に文献によればSDSは僅か0.005 wt%以上でLAL試薬のゲル化を完全に抑制する¹⁹). 対照的に非イオン性C₁₂E₁₀は、濃度依存的に穏和なゲル化阻害作用を示す. つまり、C₁₂E₁₀はHbVの溶解能に優れ、且つ、リムルテストにおいて十分に低いゲル化阻害作用を示すに留まる. HbVをC₁₂E₁₀で溶解すると混合ミセルが形成されるが (Fig. 1), このときC₁₂E₁₀は構成成分全体の86 mol%を占め、PEG-DSPEの含量 (0.04 mol%) を遥かに凌ぐ. C₁₂E₁₀ミセルの会合数は約100なので³¹), LAL試薬に含まれるLPS認識蛋白質 (Factor C) はPEG-DSPEの立体障害の影響を殆ど受けずに容易に混合ミセルの親疎水界面付近に存在するLPSのLipid-A部位と結合することができると思われる.

LPS検出限界の向上には、希釈率の低減とC₁₂E₁₀濃度の低下が要件と成る. しかし希釈率低減は逆にC₁₂E₁₀最終濃度の上昇をもたらす. 検討の結果、C₁₂E₁₀濃度が0.1 vol%のとき、Fig. 3に示す通り阻害作用は極めて僅かであり、Table1のEntry-1に示す最適の前処理条件を決定できた. このとき総希釈倍率は400となった. FDAの指針には、最大投与量とLAL試薬の感度に応じた最大希釈倍率 (Maximum Valid Dilution, MVD) が定義されている. HbVの許容LPS濃度 0.25 EU/mLと、Fig. 3のLPS検量線上の検出限界0.00025 EU/mL (log(0.00025) EU/mL=-3.60) より、HbVのMVDは1000 (= 0.25/0.00025) と算出される. 従って希釈率400はMVD範囲内にある.

小胞体に含有するLPSの定量を $C_{12}E_{10}$ の有無で比較したところ、 $C_{12}E_{10}$ で溶解した方が高いLPS濃度を示したことから、脂質二分子膜内に挿入していたLPS或いは小胞体の内水相に取込まれていたLPSが遊離して検出されたことが明らかである。LPS添加回収試験の結果、Table 2に示す通り広範なLPS濃度において回収率は92～124%の範囲で再現性があった。FDA指針に従えば、回収率が $100 \pm 25\%$ のときに溶質の影響が無いと判断できる⁹⁾。この基準値は1991年に $100 \pm 50\%$ に変更された³²⁾。Hb分子1個当たり3～5個のLPSが結合すると報告されているが²⁹⁾、我々のHb溶液での添加回収試験ではHbに抛る阻害作用を認めていない。LevinらはHbに結合したLPSはLAL試薬のゲル化を促進すると報告しているが^{13,33)}、逆にArchambaultらはLPSがHbに結合することでLAL活性が低下するとしている³⁴⁾。JurgensらはLAL活性はLPSとHbの濃度に依存することを観測している²⁹⁾。このような見解の相違は恐らく、LPSの濃度設定に係ると考えられる。我々の実験条件では、LPS濃度を0.2 EU/mL (約20 pg/mL) 以下に設定したが、他の研究グループは著しく高いLPS濃度 (100 pg/mL～800 μg/mL) で測定を実施しており、場合によってはLPSの臨界凝集濃度 (10～38 μg/mL) を越えている³⁵⁾。LPSが凝集するとLAL活性が著しく低下することが知られているので³⁶⁾、Hbが存在するとLPSは凝集せずにHbに結合して分散性が向上し、見かけ上LAL活性が上昇したと考えられる。他方、我々の測定条件では極めて希薄なLPS濃度に設定しているためLPSの凝集は無く、より自由にHb溶液中に分散し、Hb溶液の阻害作用は無いものと推測できる。

5. 結論

本研究では、Hb小胞体を界面活性剤 ($C_{12}E_{10}$) で前処理することによりHb小胞体に結合したLPSを遊離させた後に、LAL法にてLPS定量する方法を検討し、0.1 EU/mLまでの検出限界を得ることができた。また、添加回収法によりその妥当性を検証することができた。本法は現在、Hb小胞体の製造工程で日常的に使用されている。

謝辞

リムルステスト実験法に関する御指導、御討論に対しまして、小林絏一先生、堀之内宏久先生 (慶大医)、高橋純吉氏 (和光純薬) に御礼申し上げます。本研究の一部は、厚生労働科学研究 (高度先端医療研究事業: 人工血液開発分野) および日本学術振興会科学研究費補助金 (B12558112, B12480268) によって行われました。記して謝意を表します。

参考文献

1. Djordjevich L, Mayoral J, Miller IF, Ivankovich AD. Cardiorespiratory effects of exchanging transfusions with synthetic erythrocytes in rats. *Crit Care Med* 1987;15:318-323.

2. Phillips WT, Klipper RW, Awasthi VD, Rudolph AS, Cliff R, Kwasiborski V, Goins BA. Polyethylene glycol-modified liposome-encapsulated hemoglobin: a long circulating red cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288:665-670.
3. Izumi Y, Sakai H, Hamada K, Takeoka S, Yamahata T, Kato R, Nishinde H, Tsuchida E, Kobayashi K. Physiologic responses to exchange transfusion with hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier in anesthetized rats: changes in mean arterial pressure and renal cortical tissue oxygen tension. *Crit Care Med* 1996;24:1869-1873.
4. Sakai H, Tomiyama K, Masada Y, Takeoka S, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Pretreatment of serum containing Hb-vesicles (oxygen carriers) to avoid their interference in laboratory tests. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:222-231.
5. Sakai H, Takeoka S, Wettstein R, Tsai AG, Intaglietta M, Tsuchida E. Systemic and microvascular responses to the hemorrhagic shock and resuscitation with Hb-vesicles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H1191-H1199.
6. Rietschel ET, Brade H. Bacterial Endotoxin. *Sci Am* 1992; August:54-57.
7. Fletcher JR, Ramwell PW. The effects of prostacyclin on endotoxin shock and endotoxin-induced platelet aggregation in dogs. *Circ Shock* 1980;7:299-308.
8. Shibayama Y, Asaka S, Nakata K. Endotoxin hepatotoxicity augmented by alcohol. *Exp Mol Pathol* 1991;55:196-202.
9. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service, Food and Drug Administration. 1987. Guideline on validation of the Limulus amoebocyte lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices.
10. Levin J, Bang FB. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of Limulus blood. *Bull Johns Hopkins Hospital* 1964;115:265-274.
11. Fujiwara H, Ishida S, Shimazaki Y, Naito S, Tsuchiya M, Matsuura S. Measurement of endotoxin in blood products using an endotoxin specific Limulus test reagent and its relation to pyrogenic activities in rabbit. *Yakugaku Zasshi* 1990;110:332-340 (in Japanese).
12. Carr C Jr, Morrison DC. Lipopolysaccharide interaction with rabbit erythrocyte membranes. *Infect Immun* 1984;43:600-606.
13. Kaca W, Roth RI, Levin J. Hemoglobin, a newly recognized lipopolysaccharide (LPS)-binding protein that enhances LPS biological activity. *J Biol Chem* 1994;269:25078-25084.
14. Yin ET, Galanos C, Kinsky S, Bradshaw RA, Wessler S, Luderitz O, Sarmiento ME. Picogram-sensitive assay for endotoxin: gelation of Limulus polyphemus blood cell

- lysate induced by purified lipopolysaccharides and lipid A from Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1972;261:284-289.
15. Dijkstra J, Mellors JW, Ryan JL, Szoka FC. Modulation of the biological activity of bacterial endotoxin by incorporation into liposomes. *J Immunol* 1987;138:2663-2670.
 16. Richardson EC, Banerji B, Seid Jr RC, Levin J, Alving CR. Interactions of lipid A and liposome-associated lipid A with *Limulus polyphemus* amoebocytes. *Infect Immun* 1983;39:1385-1391.
 17. Cliff RO, Kwasiborski V, Rudolph AS. A comparative study of the accurate measurement of endotoxin in liposome encapsulated hemoglobin. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 1995; 23:331-336.
 18. Harmon P, Cabral-Lilly D, Reed RA, Maurio FP, Franklin JC, Janoff A. The release and detection of endotoxin from liposomes. *Anal Biochem* 1997;250:139-146.
 19. Piluso LG, Martinez MY. Resolving liposomal inhibition of quantitative LAL methods. *PDA J Pharm Sci Technol* 1999;53:260-263.
 20. Matsumae H, Minobe S, Kindan K, Watanabe T, Sato T, Tosa T. Specific removal of endotoxin from protein solutions by immobilized histidine. *Biotechnol Appl Biochem* 1990;12: 129-140.
 21. Sou K, Naito Y, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. Effective encapsulation of proteins into size-controlled phospholipid vesicles using the freeze-thawing and extrusion. *Biotechnol Progr* 2003; (in press).
 22. Sakai H, Masada Y, Takeoka S, Tsuchida E. Characteristics of bovine hemoglobin for the potential source of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier. *J Biochem* 2002;131:611-617.
 23. Takeoka S, Ohgushi T, Terasa K, Ohmori T, Tsuchida E. 1996. Layer-controlled hemoglobin vesicles by interaction of hemoglobin with a phospholipid assembly. *Langmuir* 1996;12:1755-1759.
 24. Sakai H, Takeoka S, Yokohama H, Seino Y, Nishide H, Tsuchida E. Purification of concentrated hemoglobin using organic solvent and heat treatment. *Protein Expr Purif* 1993;4:563-569.
 25. Sou K, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. Polyoxyethylene-modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of polyoxyethylene-lipid into the vesicles. *Bioconjugate Chem* 2000;11:372-379.
 26. Sakai H, Tomiyama K, Sou K, Takeoka S, Tsuchida E. Polyethyleneglycol-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as O₂ carriers in a liquid state. *Bioconjugate Chem* 2000;11:425-432.
 27. Alving CR, Richardson EC. Mitogenic activity of lipid A and liposome-associated lipid A: effects of epitope density. *Rev Infect Disease* 1984;6:493-496.
 28. Dijkstra J, Ryan JL, Szoka FC. A procedure for the efficient incorporation of wild-type lipopolysaccharide into liposomes for use in immunological studies. *J Immunol Methods* 1988;114:197-205.
 29. Jurgens G, Muller M, Koch MHJ, Brandenburg K. Interaction of hemoglobin with enterobacterial lipopolysaccharide and lipid A. *Eur J Biochem* 2001;268: 4233-4242.
 30. Schmidtgen M, Brandl M. Detection of lipopolysaccharides in phospholipids and liposomes using the *Limulus* test. *J Liposome Res* 1995;5:109-116.
 31. le Marie M, Champeil P, Moller JV. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta* 2000;1508:86-111.
 32. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service, Food and Drug Administration. 1991. Interim guidance for human and veterinary drug products and biologicals.
 33. Roth RI, Levin J. Measurement of endotoxin levels in hemoglobin preparations. *Methods Enzymol* 1994;231:75-91.
 34. Archambault M, Olivier M, Foiry B, Diarra MS, Paradis SE, Jacques M. Effects of pig hemoglobin binding on some physical and biological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides. *J Endotoxin Res* 1997;4:53-65.
 35. Aurell CA, Wistrom AO. Critical aggregation concentration of gram-negative bacterial lipopolysaccharides (LPS). *Biochem Biophys Res Commun* 1998;253:119-123.
 36. Takayama K, Mitchell DH, Din ZZ, Mukerjee P, Li C, Coleman DL. Monomeric Re lipopolysaccharide from *Escherichia coli* is more active than the aggregated form in the *Limulus* amoebocyte lysate assay and in inducing Egr-1 mRNA in murine peritoneal macrophages. *J Biol Chem* 1994;269:2241-2244.

摘出肝臓を用いた高酸素親和性人工酸素運搬体 (Neo Red Cell) の酸素運搬能の評価

Estimation of oxygen carrying capacity of Neo Red Cell with high oxygen affinity in the excised liver

木村 哲寛¹⁾, 黒澤 尋²⁾, 緒方 嘉貴¹⁾

Tetsuhiro Kimura¹⁾, Hiroshi Kurosawa²⁾, and Yoshitaka Ogata¹⁾

和文抄録

高酸素親和性NRC (H-NRC; high oxygen affinity NRC, 3%-Hb) を調製し, 酸素放出特性について, 通常のNRC (N-NRC; normal NRC, 3%-Hb) と比較した. H-NRCの酸素解離曲線は左に大きくシフトしていた. すなわち, 高酸素環境下ではH-NRCは少量の酸素しか放出せず, 低酸素環境下でも多くの酸素を保持していた. さらに, H-NRCの酸素放出速度は, いずれの酸素分圧においてもN-NRCに比べて遅かったが, 酸素分圧の影響が少なく比較的安定していた. H-NRCを肝臓に灌流した場合, 組織中の酸素分圧は灌流速度に影響をほとんど受けず, 低酸素レベル (5 mmHg) を推移した. N-NRCを灌流した場合は, 肝臓中の酸素レベルは灌流速度に顕著に影響され, 酸素レベルはH-NRCよりも高く保たれた. 含有される総酸素量はいずれのNRC溶液も同じであるので, H-NRCの方が, 酸素分圧が比較的高いところで酸素を放出することなく, より末梢へ酸素を運ぶのに適していると考えられた.

Abstract

The Neo Red Cell (NRC) with high oxygen affinity (H-NRC, 3%-Hb, $p_{50}=6$ mmHg at 25) was prepared and compared with normal NRC (N-NRC, 3%-Hb, $p_{50}=25$ mmHg at 25) about the oxygen releasability. Oxygen dissociation curve of H-NRC shifted to the left extremely, therefore, H-NRC released the small amount of oxygen under high oxygen environment, and then it could hold large amount of oxygen even under the low oxygen environment. Moreover, oxygen release rate of H-NRC was lower than that of N-NRC under every oxygen partial pressure condition, but it was relatively stable without the influence of the oxygen partial pressure. When the liver was perfused with H-NRC, the tissue oxygen partial pressure was kept low (5 mmHg), but not affected by the perfusion rate. The oxygen level with N-NRC in liver was notably influenced by the perfusion rate and kept higher than H-NRC. Total amount of oxygen bonded with hemoglobin in both NRC solution was equal, therefore H-NRC which had high oxygen affinity was more suitable to deliver the oxygen to peripheral tissues with low oxygen partial pressure.

Keywords

oxygen, artificial blood, high oxygen affinity, liver perfusion, high oxygen affinity

1. はじめに

人工酸素運搬体 (NRC; Neo Red Cell) は, 安全, かつ安定な輸血用赤血球製剤の代替物を目指して開発が進められてき

た. NRCは高濃度のヘモグロビン (Hb; Hemoglobin) 溶液を, リン脂質等でリポソームカプセル化した血液代替物である^{1,3)}. 通常の赤血球内では, ジホスホグリセリン酸 (2,3-DPG; 2,3-

1) テルモ株式会社 研究開発センター 〒259-0151神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500 Terumo Corporation R&D Center, 1500 Inokuchi, Nakai-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa 259-0151, Japan

2) 山梨大学大学院医学工学総合研究部生体環境医工学系 山梨大学大学院医学工学総合研究部生体環境医工学系 Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, Institute of Biological Environment and Medical Engineering, University of Yamanashi, 4-3-11 Takeda, Kofu-shi, Yamanashi 400-8511, Japan

論文受付 2003年9月20日 受理 2003年11月5日

diphosphoglycolate) が機能し, Hbの酸素親和性を至適に制御しているが, NRCでは製造過程で2,3-DPGが消失するため, アロステリックエフェクターとしてイノシトールヘキサリン酸 (IHP; Inositol-hexaphosphate) を添加し, 酸素親和性を制御している. 例えば, 内包されたHbのpHと添加するIHP量を調節することによって, NRCの酸素運搬効率を赤血球製剤の2倍程度まで高めることも可能である. このように酸素親和性の制御は, 酸素の運搬効率を高める上で重要である. これまで, ピリドキサルリン酸 (PLP) で修飾して酸素親和性を調整したポリヘモグロビンやヒトヘモグロビンに比べ酸素親和性が低いウシヘモグロビンを利用した研究が試みられている⁴⁶⁾. また, 酸素親和性を積極的に制御し, その酸素放出の挙動と組織での酸素利用効率を評価した研究も行われている⁷⁾. NRCは今後, 輸血代替としての人工酸素運搬体だけではなく, 目的部位に確実に酸素を供給するための, 酸素輸送システムとしての利用性も高まっていくものと期待される. 本研究では, 酸素親和性の異なるNRC (高親和性型と通常親和性型) を作製し, これらの酸素放出の特徴を, スピナーフラスコを用いたin vitro実験系で明らかにした. さらに, 分離したラット肝臓を利用した組織灌流系において, 酸素親和性の異なるNRCから酸素がどのように放出され, 組織に利用されているのかを評価した.

2. 実験方法

2.1 人工酸素運搬体 (NRC)

高親和性のNRC (H-NRC) (7 mmol-Hb に対してIHPが2 mmolになるようIHP・12Naを添加) 及びイノシトールヘキサリン酸により酸素親和性を制御した通常の親和性のNRC (N-NRC) を使用した. 両NRCは灌流液にヘモグロビン濃度で3% (3%-Hb) となるように希釈調整して実験に使用した. 灌流液の最終的な組成は, 3.6 g/L NaCl, 0.25 g/L KCl, 2.0 g/L Glucose, 2.4 g/L HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-

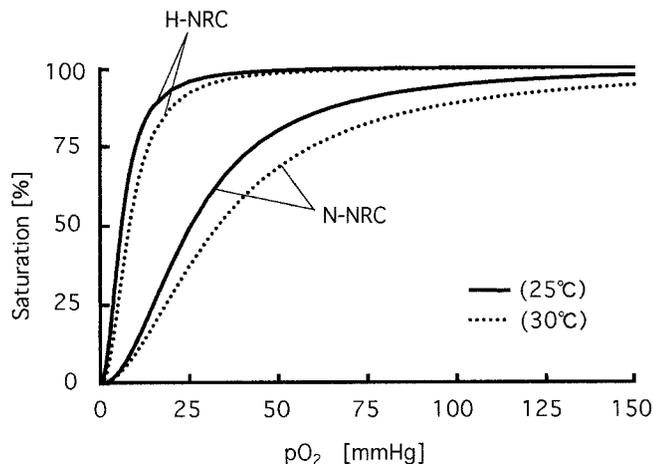


Figure 1. Oxygen-binding and dissociation equilibrium curves of H-NRC and N-NRC. These curves were calculated by the changes in absorbency of oxyhemoglobin at 576nm under different oxygen partial pressure condition at 25 (straight line) and 30 (dotted line).

ethanesulfonic acid), 2% アルブミン, 0.1M NaOH, pH 7.4 である. Fig. 1に両NRCの25 及び30 における酸素解離曲線を示した. H-NRCの酸素解離曲線は, N-NRCに比べて左に大きくシフトしていた. N-NRCのp50値が, 25 mmHg (25) 及び30 mmHg (30) であったのに対して, H-NRCのp50値は, 6 mmHg (25) 及び8 mmHg (30) であった.

2.2 スピナーフラスコを用いたin vitro実験系

スピナーフラスコを用いて, NRCの酸素放出特性を検証した. 125-mL容スピナーフラスコに, H-NRC (3%-Hb), N-NRC (3%-Hb), あるいは灌流液を60 mL入れ, 30 に保持し250 rpmで攪拌した. 気相部に窒素ガスを流速600 mL/minで供給し, その時の液層部の溶存酸素濃度 (酸素分圧; pO_2 [mmHg]) の変化を, ガルバニル型酸素電極により連続的に計測した (Fig. 2). 灌流液中の溶存酸素の減少速度は, スピナーフラスコの気液界面の酸素移動速度式 (1) に依存した. ここで, $k_L a$ は酸素移動容量係数, C は溶存酸素濃度, C_0 は通気ガスで平衡化した時の溶存酸素濃度を示す. 窒素ガス通気の場合, $C_0 = 0$ とおくことができる.

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_0 - C) \quad (1)$$

本実験条件におけるスピナーフラスコの $k_L a$ は 0.156 min^{-1} である.

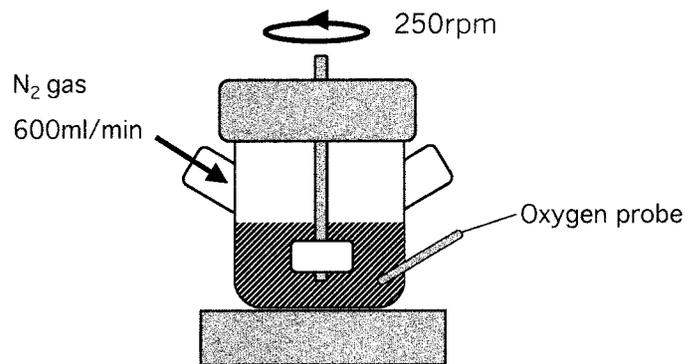


Figure 2. Test system used for oxygen releasing kinetics of NRC measured by oxygen electrode.

2.3 摘出ラット肝臓を用いた灌流実験系

Wistar rat (雄, 7~9 週齢, 200~250 g) から肝臓 (湿重 15-20 g) を摘出した. Fig. 3に示したように, 門脈にカニューレしたチューブから肝臓に送液し, 下大静脈から排出する灌流系を構築した. この系に灌流液, H-NRC及びN-NRC (いずれも25) を灌流した. ファイバー型微小酸素電極 (OxyLab Oxford Optronix, UK) を摘出した肝臓に直接尖刺し, 経時的に肝組織内の酸素濃度を計測した. また, ガルバニル型酸素電極を用い, 下大静脈肝臓出口における灌流液中の溶存酸素濃度も同時に計測した.

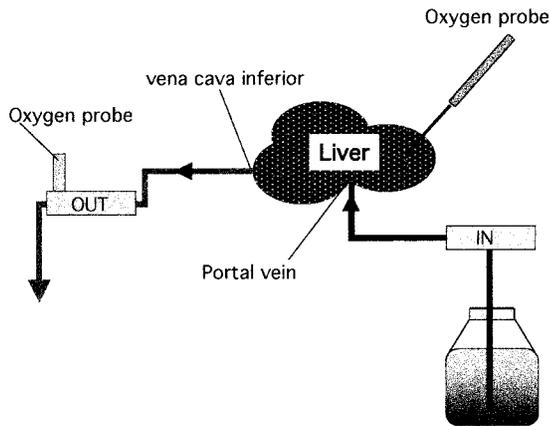


Figure 3. Schematic diagram of a perfusion experiment for the evaluation of oxygen transport efficiency of h-NRC.

2.4 肝組織エネルギー荷分析方法

肝を摘出後、直ちに液体窒素で急速に凍結した後、肝臓の辺縁部 (n=3) と中心部 (門脈-下大静脈辺縁部; n=3) に分け、アデニンヌクレオチド抽出時まで -80 で保存した。凍結保存した肝組織は、およそ8等分以上に粉碎し、湿重量で0.5~1.0 gを目安に量り取り、液体窒素で十分冷却した乳鉢に速やかに移した。乳鉢内で液体窒素下に粉砕し、液体窒素がなくなり次第抽出液 (1 mM EDTA-2 Na/6% HClO₄ 水溶液) 10 mlを加え、さらに混合してアデニンヌクレオチドを抽出した。この抽出液を遠心 (3,000 rpm, 20 min, 4) し、変性タンパク質を除去した。得られた上清から2.0 mlを分取して、これに等量の中和剤 (0.48 M K₂CO₃水溶液) を添加してpHを6.5±0.5の範囲にした。氷冷下で1時間放置した後、沈渣を遠心 (3,000 rpm, 20 min, 4) で除去して得られた上清をクロマトディスク (0.45 μm, クラボウ) でろ過した。これを高速液体クロマトグラフィ (HPLC) 測定用のサンプルとした。HPLCの条件は、以下の通りである。ポンプ: CCPS (TOSOH社製), カラム: Spelcosil LC-T-18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm), カラム温度: 25 , 移動相: 0.22 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.9) /5% メタノール/2.5 mM 硫酸水素テトラブチルアンモニウム, 流速: 0.8 mL/min, 検出器: UV-8020 (TOSOH社製), 検出波長: 260 nm, オートサンプラー: AS-8020 (TOSOH社製), データ処理装置: Chromatocorder 21 (TOSOH社製)。AMP, ADP, ATPの定量結果より、エネルギー荷 (EC; Energy charge) を(2)式により算出した。

$$EC = \frac{([ADP]+2[ATP])}{2([AMP]+[ADP]+[ATP])} \quad (2)$$

3. 実験結果

3.1 高酸素親和性NRCの特性

灌流液, N-NRC及びH-NRC溶液をスピナーフラスコに入れ、窒素ガス通気に伴う溶液酸素濃度変化を酸素電極で測定し、各試料液中の酸素分圧の変化としてFig. 4に示した。灌流液では、

飽和酸素 (約150 mmHg) の95%が消失するのに要した時間は、約20分であった。灌流液中の溶存酸素はおよそ50分で消失した。N-NRC及びH-NRCでは、溶媒に溶存した酸素に加え、ヘモグロビンに結合した酸素が酸素分圧に応じて徐々に放出されるため、溶存酸素の減少経過は灌流液に比べて遅くなった。いずれのタイプのNRCにおいても全溶存酸素の消失に要する時間はおよそ150分であった。このことは、酸素親和性が異なってもNRCが結合できる酸素量は変わらないことを示している。しかし、窒素ガス通気開始後早い段階の溶存酸素濃度が比較的高く保たれている領域では、酸素親和性の高いH-NRCの方がN-NRCよりも溶存酸素が速やかに低下した。飽和酸素の95%が消失するのに要した時間は、H-NRCにおいて約60分、N-NRCにおいて約100分であった。このことは、酸素分圧が高い領域ではH-NRCが酸素を放出しにくいことを示唆している。

3.2 NRCの酸素放出速度

Fig. 4の酸素分圧減少曲線において、ある酸素分圧の時点の傾き (時間微分値) をとると、それはその酸素分圧における酸素減少速度となる。灌流液においては、酸素減少速度は式 (1) に従うので、(1) 式のCに酸素分圧を代入することで、その酸素分圧における酸素減少速度が得られる。N-NRC及びH-NRC溶液においては、(2) 式に示すようにNRCからの酸素供給がある分だけ、酸素減少速度は小さくなる。

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C_0 - C) - (OSR)_{NRC} \quad (3)$$

ここで、OSRはNRCの酸素供給速度 (Oxygen Supply Rate) である。従って、(1) 式と(3) 式の差が、NRCによる酸素供給速度と考えることができる。Fig. 4の曲線から、各酸素分圧におけるN-NRC及びH-NRC溶液の酸素減少速度を求め、同一酸素分圧における灌流液のみの溶液における酸素減少速度との差を求めた。その結果、Fig. 5に示すような曲線が得られた。図示されるように、N-NRCの方がいずれの酸素分圧においても酸素供給速度が高かった。最大の酸素供給速度を与える酸素分圧は、N-NRCが65 mmHg, H-NRCが55 mmHgとなり、H-NRCの方が低酸素分圧側に若干シフトした。

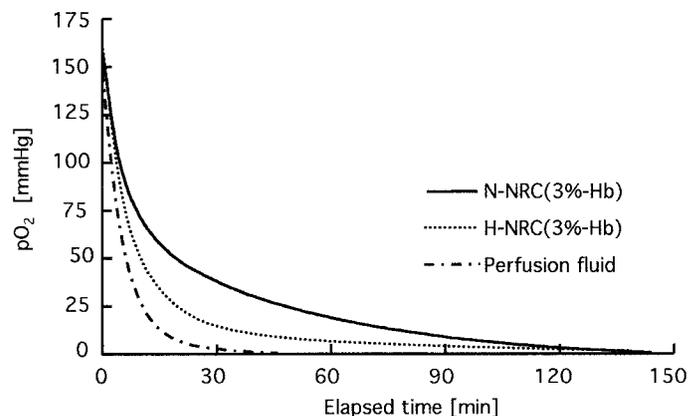


Figure 4. Changes in the oxygen partial pressure in the spinner vessel.

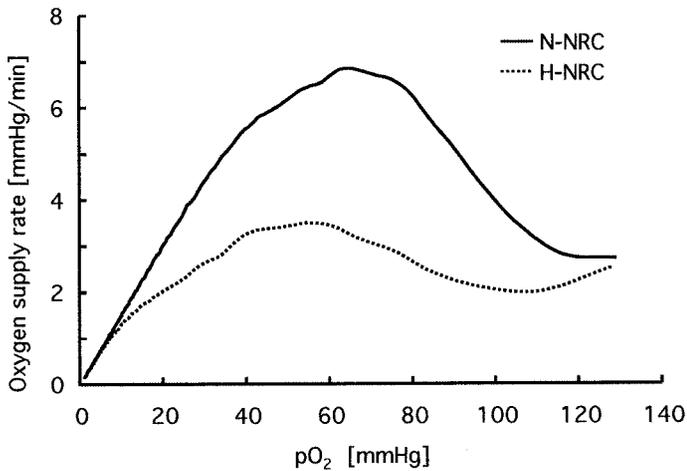


Figure 5. Oxygen supply rate calculated by oxygen releasing kinetics of H-NRC and N-NRC.

3.3 摘出ラット肝灌流時の組織内酸素濃度の変化

肝組織内及び下大静脈出口での酸素濃度の変化をFig. 6に示した。ラット肝臓に9.4 ml/minの流速でH-NRCの灌流を開始し、その後、流速を段階的に4 ml/minまで下げた。この間、組織中の酸素濃度は約5 mmHgを維持しており、灌流速度に大きく依存することはなかった。一方、下大静脈出口での酸素濃度は、流速を小さくするに従い、1 mmHg以下まで徐々に低下した。続いて、灌流液をN-NRCに切り替え、さらに灌流速度を9.4 ml/minにもどしたところ、顕著かつ速やかに組織中及び下大静脈出口における酸素濃度の上昇が認められ、いずれの測定ポイントでも10 mmHg以上にまで酸素濃度が回復した。灌流速度を遅くするといずれの測定ポイントでも酸素濃度が顕著に低下した。

摘出肝臓に流速9.4 mL/minでN-NRC及びH-NRC溶液の灌流を行い、下大静脈肝臓出口の酸素分圧と乳酸値を測定した (Table 1)。灌流開始5分でN-NRC溶液中の酸素分圧は10.0

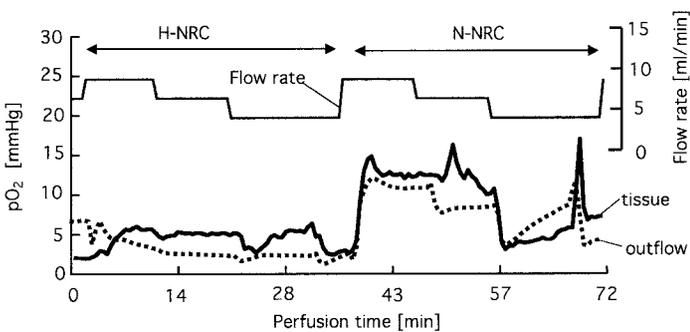


Figure 6. Changes in the oxygen partial pressure of the peripheral of isolated liver circulated with H-NRC and N-NRC. The isolated liver was circulated at 25 and the oxygen partial pressure was observed by the fiber-type (tissue) and galvanic-type (outflow) oxygen electrode.

mmHg, H-NRC溶液中では2.3 mmHgになった。灌流開始後10～15分では、N-NRC溶液中の酸素分圧が12.2～13.8 mmHg, H-NRC溶液中では1.5～1.4 mmHgとなり安定した。この間の乳酸値は、N-NRCでは5～6 mg/dL, H-NRCで6～8 mg/dLであった。一方、酸素消費は、灌流開始後5～10分でおよそ1.1 μmol/min/g (N-NRC溶液)に達し、灌流開始後10～15分で0.77 μmol/min/gに低下した。H-NRC溶液では、灌流開始後5～10分でおよそ1.2 μmol/min/gに達し、灌流開始後10～15分で0.92 μmol/min/gに低下した。酸素消費は、H-NRCの方がわずかに高い値を示したが、灌流開始以降N-NRCの方が肝組織酸素測定部位及び下大静脈肝臓出口の酸素分圧を高く維持することができ、生成乳酸量も低くなった。

Table 1. Oxygen tension and lactate concentration in the perfusate of isolated liver.

| Perfusion time [min] | pO ₂ (outflow) [mmHg] | | Lactate conc. [mg/dL] | | O ₂ consumption [mmol/min/g] | |
|----------------------|----------------------------------|-------|-----------------------|-------|---|-------|
| | N-NRC | H-NRC | N-NRC | H-NRC | N-NRC | H-NRC |
| 0 | 29.7 | 35.5 | 14 | 9 | 0.70 | 0.17 |
| 5 | 10.0 | 2.3 | 6 | 8 | 1.09 | 1.19 |
| 10 | 12.2 | 1.5 | 5 | 6 | 1.06 | 1.23 |
| 15 | 13.8 | 1.4 | 5 | 7 | 0.77 | 0.92 |

3.4 肝組織のエネルギー荷

N-NRC及びH-NRC溶液を灌流した直後の肝臓 (辺縁部と中心部) のアデニンヌクレオチド (AMP, ADP, ATP) 含量をHPLC分析した。Table 2にアデニンヌクレオチドの分析結果及びエネルギー荷 (EC) を示した。肝臓の辺縁部におけるECは、N-NRCで0.71, H-NRCで0.62であった (p<0.1)。H-NRCにおいては、N-NRCに比べて、ATP量が約30%減少し、AMP量が約30%増加していた。肝臓の中心部におけるECは、N-NRCで0.69, H-NRCで0.70であり、有意差は認められなかった。しかし、H-NRCにおいては、N-NRCに比べて、ATPとAMPが若干増加する傾向があった。

Table 2. Energy charge in isolated liver perfused with N-NRC and H-NRC.

| Analytical region | Perfusate | [μmol/g-wet] | | | Energy charge |
|-------------------|-----------|--------------|-------------|-------------|---------------|
| | | AMP | ADP | ATP | |
| Peripheral | N-NRC | 0.51 ± 0.14 | 0.60 ± 0.13 | 1.72 ± 0.30 | 0.71 ± 0.06 |
| | H-NRC | 0.66 ± 0.09 | 0.54 ± 0.10 | 1.24 ± 0.13 | |
| Central | N-NRC | 0.53 ± 0.19 | 0.66 ± 0.06 | 1.55 ± 0.07 | 0.69 ± 0.04 |
| | H-NRC | 0.51 ± 0.13 | 0.73 ± 0.16 | 1.69 ± 0.24 | |

Values are the mean ± S.D. (compared by students t-test)

4. 考察

赤血球（酸素運搬体）は、人間の体内の組織へ酸素を有効に運ぶために優れた機能を持っている。現在開発が進められている人工酸素運搬体は、より効率的に酸素を運ぶための機能をリポソーム化した製剤に凝縮させている。それは、ヘモグロビンの酸化を防ぐ技術⁸⁾や、リポソームの血管内での寿命を延ばす技術^{9,10)}、ヘモグロビンの酸素親和性を制御する技術等である。これらの技術は、赤血球の持つ機能を人工酸素運搬体制剤の中で再現するためのものであった。最近では、坂野上らが積極的にNRCの酸素親和性をコントロールし、酸素親和性の高いNRCで置換されたラットの脳が低酸素呼吸下においてcytochrome-b5の酸化状態を保つのに有利であったことを示した。さらに低酸素呼吸下にある組織においては、NRCからの酸素供給は静脈血中のヘモグロビン酸素化度の余裕に依存しており、NRCのp50には依存していないと結論付けた¹¹⁾。ただ、これは巨視的な酸素挙動を見たものであり、酸素親和性の異なるNRCからの酸素放出を直接とらえているわけではない。

本研究では、酸素親和性が異なる人工酸素運搬体H-NRCを調製し、酸素放出挙動について通常的人工酸素運搬体N-NRCと比較した。H-NRCは、スピナーフラスコを使用したin vitroの実験において、窒素ガス通気による酸素分圧減少経過がN-NRCとは明らかに異なっていた（Fig. 4）。N-NRCでは酸素分圧が25 mmHg以下になるのに約50分を要したが、酸素分圧が0 mmHgになるまでに要する時間はおよそ150分であった。これに対しH-NRCでは、N-NRCよりも急激に酸素分圧が低下した。これは酸素分圧が高い範囲では、H-NRCからの酸素放出が少ないことを意味しており、酸素親和性の差が現れている。酸素分圧が25 mmHg以下になるのに要する時間は約20分であるが、その後の酸素分圧の減少は緩やかになり、0 mmHgになるのに要する時間はおよそ150分であり、N-NRCと同等であった。このことから、酸素含有量はNRCの酸素親和性の影響を受けず、Hbの量に規定されることを示している。Fig. 5に示されるように、H-NRCの酸素放出速度は、いずれの酸素分圧においてもN-NRCより低いが、酸素分圧の影響が少なく比較的安定している。

Fig. 6にみられるように、H-NRCはN-NRCに比べて余分な酸素を放出しないので、組織中を流れる灌流液中の酸素濃度を上昇させる効果は低いと考えられる。Fig. 7にFig. 6から算出したNRCの酸素飽和度の経時変化を示したが、H-NRCの酸素飽和度は肝組織測定部位において約40%で、下大静脈肝臓出口では10%に達した。一方、N-NRCの酸素飽和度は肝組織測定部位と下大静脈肝臓出口とともに約20%前後と大きく変化することはなかった。肝臓入口時の酸素飽和度がH-NRC、N-NRCともに90%以上であったことから肝組織測定部位までにH-NRCはおよそ50%が、N-NRCではおよそ70%の酸素が放出されていたことになる。その後、肝組織測定部位から下大静脈肝臓出口まではH-NRCは30%の酸素が放出されたことになる。しかし、N-NRCではその間の酸素放出量はわずかであった。

Table 1にNRC灌流時の灌流液中の生成乳酸量及び酸素消費量を示した。N-NRCは、H-NRCよりわずかに生成乳酸量が低

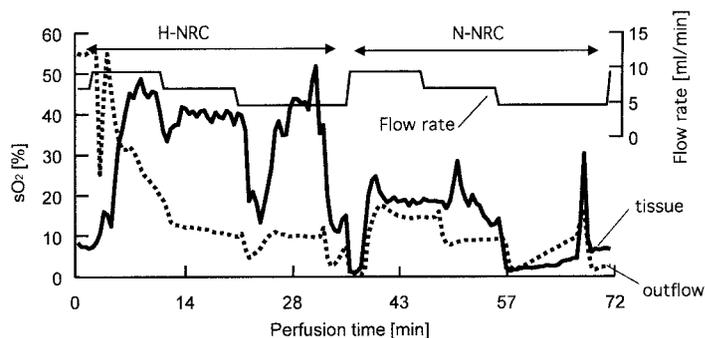


Figure 7. Change in the oxygen saturation of H-NRC and N-NRC circulated in the isolated liver.

The isolated liver was circulated at 25 and the oxygen partial pressure was observed by the fiber-type (tissue) and galvanic-type (outflow) oxygen electrode.

くなる傾向を示し、逆に酸素消費はH-NRCの方がわずかに高い結果となった。これは、それぞれのNRC中のHbに結合している酸素量が同じであるから、H-NRCの方が、酸素放出速度が小さい分だけ、肝組織酸素測定部位までの肝細胞に酸素を供給することなく、酸素飽和度40%を維持し、その後肝組織酸素測定部位から下大静脈肝臓出口までに、さらにHbに結合する残りの酸素30%を放出したと考えられる。一方、N-NRCは、比較的酸素分圧が高いところで酸素を放出できることから、肝組織酸素測定部位までにHbに結合する酸素の70%近くをすでに放出しており、その結果、灌流液中の溶存酸素濃度が高くなり、摘出肝臓全体に酸素が供給できたと考えられる。この結果は、肝組織のエネルギー荷の分析結果にも裏付けされる（Table 2）。つまりN-NRCは、辺縁部及び中心部ともにエネルギー荷は高く維持され、一方、H-NRCは、辺縁部においてエネルギー荷が優位に低くなった。このことは、H-NRCにおいて目的とする酸素供給部位以外には酸素を供給することなく、H-NRC内に酸素を保持し、目的とする部位で酸素を放出する製剤にできる可能性がある。したがって、H-NRCの酸素飽和度（Fig. 7）の結果を考えると、H-NRCは目的とする酸素供給部位までに酸素を放出することなく、より抹消へ酸素を運ぶのに適している製剤であると考えられる。

5. 結論

NRCは酸素親和性を制御することにより、単なる人工酸素運搬体としてだけでなく、酸素輸送システムとしての利用も可能であると考えられる。NRCの直径は200 nmと赤血球よりも小さいので、赤血球が到達しにくい虚血部位への酸素輸送システムとしてH-NRCが機能するものと思われる。今後は、適切な虚血モデルを構築し、虚血部位へのH-NRCの酸素供給特性を明らかにしたい。

Reference

1. Usuba A, Miyazawa M, Motoki R, Sakaguchi K, Suzuki K,

- Kamitani T, et al. Oxygen transport capacity and hemodynamic effect of newly developed artificial blood "Neo Red Cells (NRC)". *Int J Artif Organs* 1993;16:551-6.
2. Ogata Y, Goto H, Sakaguchi K, Suzuki M, Ohsaki K, Suzuki K, et al. Characteristics of neo red cells, their function and safety: in vivo studies. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994;22:875-81.
 3. Ogata Y, Goto H, Kimura T, Fukui H. Development of neo red cells (NRC) with the enzymatic reduction system of methemoglobin. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1997;25:417-27.
 4. McGarrity MJ, Er SS, Hsia JC. Hemoglobin-based blood substitutes: characterization of five pyridoxal 5'-phosphate derivatives of hemoglobin. *J Chromatogr* 1987;419:37-50.
 5. Hsia JC, Er SS. Quality control of hemoglobin-based blood substitutes. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1988;16:105-11.
 6. Sekiguchi S, Ito K, Kobayashi M, Ototake N, Kosuda M, Kwon KW, et al. Preparation of virus-free pyridoxylated hemoglobin from the blood of HBV or HTLV-I healthy carriers. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1988;16:113-21.
 7. Benesch RE, Benesch R, Renthall RD, Maeda N. Affinity labeling of the polyphosphate binding site of hemoglobin. *Biochemistry* 1972;11:3576-82.
 8. Ohki N, Kimura T, Ogata Y. The reduction of methemoglobin in Neo Red Cell. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1998;26:477-85.
 9. Yoshioka H. Surface modification of haemoglobin-containing liposomes with polyethylene glycol prevents liposome aggregation in blood plasma. *Biomaterials* 1991;12:861-4.
 10. Chang TM, Lister C, Nishiya, Varma R. Immunological effects of hemoglobin, encapsulated hemoglobin, polyhemoglobin and conjugated hemoglobin using different immunization schedules. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol* 1992;20:611-8.
 11. Sakanoue J, Tamura M, Nakai K, Sakuma I, Kitabatake A. Redox states of cerebral tissues of rats substituted by the liposome-encapsulated hemoglobin. *Adv Exp Med Biol* 1999;471:27-33.

編集後記

本号では、大変喜ばしいことに原著論文を3報掲載することができました。人工血液の展開は、国からの大型助成や複数の企業が製造を開始したこともあり、益々活発に進むことが期待され、本学会の役割も益々重要になるでしょう。本号の発行は

少し遅れましたが、続いて4号の発行が予定されております。投稿された論文は速やかに印刷できますので、是非会員の皆様の積極的な御投稿をお願いします。

(武岡真司)

投稿規定

本誌は、血液代替物開発研究に貢献する論文、関連する情報、学会会員のための会報、学会諸規定等を掲載するが、形式にはこだわらず創意ある投稿を広く集める。本誌への投稿者は本学会会員であることが望ましいが、投稿を希望する者は誰でも投稿することが出来る。原稿掲載の採否は編集委員会が決定する。原著論文について、他誌に既発表あるいは投稿中の論文は掲載しない。

執筆規定

ワープロを用いフロッピーによる投稿を原則とする。ただし、手書き原稿による投稿でも受け付ける。欧文による投稿を歓迎する。

- 1) 原稿はワープロを用いて作成し、使用したソフト名を記載してフロッピーにより提出すること。その際、ハードコピー4部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。オリジナルのソフトおよびテキストファイル形式でも保存し提出すること。
- 2) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著者名、全著者所属、英文著者名、英文所属、ついで筆頭著者の住所、英文住所を記入する。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。
- 3) 総説、原著、および報告については、第2頁以降に和文抄録、Keywords

- (英文で6個程度)を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること。英文抄録は英文ワープロを用いて、別の「ABSTRACT」ファイルとしてハードコピーとともに提出しても構わない。
- 4) 句読点はコンマ(,)ピリオド(.)とする。
 - 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbol フォントを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名称は大文字で書きはじめること。
 - 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μ m, L, mL, μ L, mol, g, mg, μ g, ng, pg, fg, N/10などを用いる。
 - 7) FigureとTable: 引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は全て英文とすること。本文ハードコピー上に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。
 - 8) 文献: 本文に引用した順序に番号を付け、文中では⁽²⁾, ^(3,5), ^(1, 4-6)などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名。論文題名。誌名西暦発行年; 巻数: 頁~頁。とし、誌名の省略は医学中央雑誌またはIndex Medicus に準拠する。単行本の場合は全著者名。題名。編集者名。書名。発行地: 発行書店, 年号; 頁~頁。の順

とする。

1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
2. 砂本順三, 岩本 清, リポソームの調製, 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編, リポソーム, 東京: 南江堂, 1988;21-40.
3. Fowler SA, Andracki M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22:27-42.
4. Reichert CM, Kelly VL, Macher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985; 111-60.
- 9) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
- 10) 既発表の図表, その他を引用, 転載する場合には, あらかじめ著作権所有者の許可を得ること。また, 掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

掲載料は無料とし、論説、総説、原著、報告等については別刷り30部を贈呈する。それを越える分についての費用は著者の負担とする(およそ1部100円)。カラー写真掲載・アート紙希望などの場合は、著者の実費負担とする。

編集委員会

武岡真司(委員長), 池淵研二, 津田良夫, 仲井邦彦, 福島昭二, 堀之内宏之, 宮尾秀樹, 村田満, 渡辺真純

日本血液代替物学会 会誌

発行 日本血液代替物学会

編集・制作「人工血液」編集委員会

印刷 株式会社 研恒社

人工血液 vol.11(3) 2003年11月28日発行

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL(03)5363-3493 FAX(03)5363-3499

〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1

早稲田大学理工学部65-208室

TEL(03)5286-3217 FAX(03)3205-4740

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

TEL(03)3265-8961 FAX(03)3264-1995