

平成 22 年 6 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19300164

研究課題名（和文）人工赤血球流体のリガンド反応ダイナミズムの生理的意義と
リガンド治療剤への応用研究課題名（英文）Artificial Red Cells: Physiological Importance of the Ligand
Reaction Dynamism and the New Application for Ligand Therapy

研究代表者

酒井 宏水（SAKAI HIROMI）

早稲田大学・理工学術院・准教授

研究者番号：70318830

研究成果の概要（和文）：

ヘモグロビン(Hb)を用いる人工酸素運搬体のうち、化学的修飾を加えた非細胞型のHb溶液の投与では、血管収縮による血圧亢進を引き起す副作用が知られている。原因は、血管弛緩因子である内因性のNOやCOを捕捉すること、また酸素を速やかに放出するために、血管の自動調節機能が働くことである。対して、細胞型のHb小胞体(HbV)ではこの副作用はみられない。そこで、リガンド(ガス分子)反応ダイナミズムを調べたところ、HbVではリガンド反応が遅延された。その機序は、粒子内の濃厚Hb溶液によって形成されるガス拡散障壁と、細管内流動における側方拡散の遅延の二つであることが明らかになり、細胞型構造の生理学的意義が明らかになった。他方、HbVの新しい応用を検討するため、外因性COをHbVに結合させて出血性ショック状態のラットに投与した。蘇生後の全身的な再灌流傷害に対し、COが細胞保護効果を呈し、また投与したCOは意外と速やかに解離し呼気として体外に排気され、CO毒性と思われる兆候は見られなかった。人工赤血球のリガンド治療剤としての可能性を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

Chemically modified hemoglobin (Hb) solutions as artificial O₂ carriers show vasoconstriction and hypertension presumably due to the high affinity for endogenous NO and CO as vasorelaxation factors, and due to the faster O₂-release that induces autoregulatory vasoconstriction. On the other hand, cellular-type Hb-vesicle (HbV) does not induce such side effects. Herein we analyzed the reactions of ligand gaseous molecules by physicochemical techniques, and found out that HbV shows much slower reactions and it is due to the intracellular gas diffusion barrier induced by a concentrated Hb solution, and the retarded lateral diffusion of HbV when it flows in a narrow tube. In addition, we tested HbV as an exogenous CO carrier because endogenous CO is cytoprotective. After inducing hemorrhagic shock, rats were resuscitated with CO-bound HbV. It showed cytoprotective effect at reperfusion, and CO was dissociated rapidly and exhaled through the lung. No symptom related to toxicity of CO was detected. The results imply the possibility of artificial red cells for a new ligand therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：人工臓器工学、人工赤血球

1. 研究開始当初の背景

赤血球は高濃度ヘモグロビン(Hb)溶液(35g/dL)を細胞膜で覆った微粒子(長径8 μ m)である。生命の進化の過程で赤血球は細胞核を捨て、酸素運搬の役割に特化し、パラシュート状に変形して毛細管内を流動する。血中に最も多く存在する蛋白質がHbであり、多様な変異Hbも含め、結晶構造(R, T状態)、ヘムポケットの微細環境、リガンド(O₂, CO, NO)結合解離とAllosteric因子の関与は、極めて詳細に解明された。然し、これは「希薄な溶液系の現象」に過ぎず、マクロな赤血球粒子について、内部に存在する高濃度Hb溶液の存在状態(溶液粘弾性, 分子間相互作用)や、リガンドの結合解離ダイナミクスの*in situ*解析、更には赤血球の分散する流体としての解析は十分とは言えない。その主な原因は、(a) 脆弱な赤血球は剪断応力で容易に溶血、また比重が大きいため経時的に沈降し、正確な測定が困難、(b) 赤血球は多成分複合体である、(c) 35 g/dL以上の高純度高濃度Hb溶液が得られない、(d) 赤血球の物性値の調節は極めて困難、等である。

近年、体内で微量に産生される内因性NO、COの情報伝達分子(例えば血管内皮由来弛緩因子、抗炎症作用など)としての有用性、逆に過剰産生の弊害も明らかにされ(Suematsu et al., JCI 1998;101:604-12; Otterbein et al., Nat Med. 2000;6:422-8; Stamler et al., NEJM 2003; 349:402-5)、赤血球流体(血液)との反応機構の詳細解析が求められている。申請者が確立したHb蛋白質精製技術、及びそれを基に分子集合科学の応用として開発した我国独自の人工赤血球(Hb小胞体)を用いれば、本物の赤血球では不可能であった測定が可能になる。Hb小胞体は、リン脂質小胞体の内部に高純度高濃度Hb溶液(35 g/dL)を内包させたナノ粒子である。粒子径(250 nm)は赤血球(8 μ m)よりも小さいが、力学的強度に優れる(Sakai et al., *Bioconjugate Chem.* 2000;11:425-32)。Hb小胞体の物性値は自在に制御できるので、各種疾患に適応した人工赤血球の創製が可能、また構造と機能の相関が明らかになれば、本物の赤血球について構造と機能の生理学的意義が議論できる等、学術的興味は尽きない。更に、最近では内因性NO、COに留まらず、ガス吸入などによる外因性のNO、COの効能も報告され(Frostel, Zapol et al., *Circulation* 1991; 83:2038-47; Motterlini et al., *Circ Res*

2002;90: E17-24; Mayr et al., *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:354-60)、人工赤血球をNO、COの運搬体として積極的に活用した静注用リガンド治療剤としての効能が期待されている。

2. 研究の目的

A. 申請者が確立したHb精製技術、及び人工赤血球(Hb小胞体)を用い、本物の赤血球では不可能であった測定を実施する。Hb小胞体は、リン脂質小胞体の内部に高純度高濃度Hb溶液(35 g/dL)を内包させた粒子である。粒子径(250 nm)は赤血球(8 μ m)よりも小さいが、力学的強度に優れる。更に物性値が自在に制御できる、テイラーメード人工赤血球が可能になる。赤血球或は人工赤血球を含有する循環血液は、微視的にはヘテロな分散流体として挙動し、流体と血管壁の間でリガンド(O₂, NO, CO)の授受が行われる。従って「生体システム」に迫るため、流体の物性値解析と微小血管内でのリガンド結合解離の速度論的解析を実施する。微小モデル血管を用いた解析により人工赤血球の分散する「流体」とリガンドの反応速度論的解析を可能とする。微粒子物性値と投与効果の相関から、微粒子分散流体のリガンド反応ダイナミズムの生理的意義を明らかにする。

B. 予備的検討として人工赤血球にCOを結合させてラットに静注したところ、COはO₂の200倍の結合力であるが意外と速やかに解離する、血行動態、呼吸機能に障害を与えないことが明らかになった。類推の域を出ないが、COが血管壁平滑筋グアニル酸シクラーゼに作用して血管拡張と、血流改善をもたらす？ 或は、活性化好中球に存在するヘム蛋白質:NADPH-オキシダーゼのヘム活性部位にCOが結合すれば、活性酸素の産生が抑制され、炎症や虚血再灌流障害における細胞障害を抑制することが期待できる。モデル動物を用いて血行動態を観察し、COの効果とその機序の詳細解明から、新しいリガンド治療法として確立させる。

3. 研究の方法

人工赤血球(ヘモグロビン小胞体: HbV)の調製は既報に従った。ストップフロー-ラピッドスキャン分光法に用いるHbVについては、粒子径ならびに内包Hb濃度を変化させたも

のを数種類調製した。また、COを結合させたHbVは、COガスをHbV分散液に通気することで調製した。

希薄溶液系における配位子反応速度の計測は、ストップフロー-ラピッドスキャン分光法を用いた。デオキシ型の各種HbVおよびHbの希薄溶液と、NOまたはCOが溶解した溶液を瞬時に混合し、Soret帯のスペクトル変化から反応速度を計測し、見かけの速度定数を算出した。そして、粒子径および内包Hb濃度との相関について考察した。

濃厚溶液系における配位子反応速度の計測には、ガス透過性のある人工細管(内径25 μm)を用いた。HbVあるいはHb溶液、赤血球分散液を10 g/dLとし、これを中心速度1 mm/sで流動させた。人工細管を脱酸素雰囲気におくことによりHbの脱酸素過程が、またNOあるいはCO雰囲気におくことによりこれらの配位子の結合過程が観察出来る。微細流動距離1-10 cmにおける顕微吸光度スペクトルを測定し、Q帯の変化から反応率を算出した。

COを結合したHbVの投与試験は、Wistar系ラットを用いて行なった。Sevoflurane麻酔下、頸動脈より循環血液量の50%を脱血しショック状態とし、15分後に等量の蘇生液を投与し、血行動態と血液ガス組成を6時間観察した。その後、血液生化学パラメータ(AST, ALT, LDH)ならびに摘出組織について3-nitrotyrosine免疫抗体染色を行なった。比較として、酸素を結合したHbV, Hbを含有しない空の小胞体(EV)、COまたは酸素を結合したラット赤血球を投与した。

4. 研究成果

【平成19年度】

Hbはリガンド(ligand = 配位子)として酸素を可逆的に結合・解離するだけでなく、別のリガンドとして一酸化炭素(CO)、或は一酸化窒素(NO)を強力に結合する。COは意外と容易に解離する条件もある。人工赤血球として開発されて来たHb小胞体(HbV)の製法、保存法、輸血代替としての効能、安全性に至るまで、リガンド反応の制御が強く関わっている。欧米で開発が進んでいる分子状Hb溶液の投与で観察される血管収縮と血圧亢進は、HbVでは回避されることが明らかになっているが、これは内因性のNO或はCOがHbによって捕捉されるか否かの特性が要因と考えられている。そこで、平成19年度には、ストップフロー・ラピッドスキャン分光法からHbVのガス分子との反応速度について解析したところ、高濃度Hb溶液を粒子内に封入することによってNO結合が遅延され、脂質二分子膜は、ガスの拡散の障壁にはならないことが解

った。ガス拡散のシミュレーションから、もともと結合の速いNOが粒子内に拡散してくる際に、急速に外側の高濃度Hb溶液に結合するため、粒子内部へのNO拡散の遅延(障壁)になることが結論できた。赤血球は粒子内のHb濃度が高く、また粒子径を大きくすることでNO, COの反応を遅延させており、この赤血球構造の生理的意義がHbVの設計に活かされていると結論できた(成果論文: *J. Biol. Chem.* 2008, *Biochim. Biophys. Acta* 2008)。

【平成20年度】

COは毒性の高いガスであるが、生体内で産生される微量のCOの生理的役割(有用性)が認知されている。そこで、我々は、COが配位した人工赤血球(Hb小胞体: HbV)を、出血性ショック状態に陥ったラットに投与し、COの細胞保護効果について検討した。COガスをHbV分散液に通気し、CO-HbVを調製した。同様に、ラット洗浄赤血球を処理したCO-RBCを調製し、通常酸素を結合したO₂-HbV, O₂-RBCと比較した。更に、Hbを内包しない空の小胞体 (Empty vesicles, EV)の投与も検討した。ラット頸動脈から循環血液量の50%を脱血し、出血性ショック状態とした。15分後に上述の蘇生液を投与した。いずれの蘇生液の投与でも、血圧、血液ガス組成が速やかに回復したが、EV群のみ、3, 6時間後に血圧が低下した。全例が生存し、COの毒性に起因する兆候は一切認められなかった。出血性ショックからの蘇生は全身的な再灌流傷害を引起し、血中ALT, AST, LDHは、O₂-HbV群, O₂-RBC群, EV群で上昇した。しかし、CO-HbV群, CO-RBC群では有意に低い値を示した。血中HbCO量は6時間後には3%に低下し、同時にCOは呼気中に排気され、CO-HbV, CO-RBCともに、COを放出した後、酸素運搬体として機能した。活性酸素(O₂⁻)とNOが反応しONOO⁻を生じ、これが組織の3-nitrotyrosine化を誘起するが、抗3-nitrotyrosine抗体による免疫染色では、CO結合体の投与による酸化的ストレスの低下を示唆した。今回の実験結果から、活性酸素産生に関与するヘム酵素にCOが作用して、虚血再灌流傷害を低減している可能性があり、詳細を検討する必要がある。蘇生初期は酸素よりも循環血液量の回復が先決であり、人工赤血球の新しい使用法を示唆する(成果論文: *Shock* 2009)。

【平成21年度】

Hbに化学的修飾を加えた非細胞型のHb溶液の投与では、血管収縮による血圧亢進を引き起こす。この原因は、血管弛緩因子であるNOやCOを捕捉すること、また酸素を速やかに放出するために、血管の自動調節機能が働くためと考えられている。対して、細胞型のHb小胞体(HbV)ではこの副作用はみられない。

リガンド反応ダイナミズムの詳細を調べるため、既にストップフロー法による解析を行い、細胞型HbVではガス反応が遅延されることを確認したが、赤血球よりも反応は速かった。希薄条件(0.003 g/dL)に限定される測定法であることが原因と考え、最終年度ではガス透過性のある微小細管(内径25 μm)を用い、実質的な濃度(10 g/dL)のHbを含有する各種溶液 [Hb、重合Hb (PolyHb)、HbV、赤血球 (RBC)] を1 mm/sの中心流速で灌流させ、Hb溶液のガス反応率を顕微可視吸収スペクトルにより計測した。細管をNOあるいはCOガスが溶解した水溶液に浸漬した場合、deoxy状態のHb、PolyHbは、HbVおよびRBCよりも速くガスを結合し、またHbVとRBCは同等の結合速度であった。細管を窒素雰囲気中に曝した場合、酸素を結合したHbとPolyHbは、HbVおよびRBCよりも速い酸素放出を示した。細管内における粒子の拡散挙動をNavier-StokesおよびMaxwell-Stefan式を用いてシミュレーションしたところ、微小なHb (6 nm径)では、側方拡散が速く流体の攪拌が促進されるが、粒子径の大きいHbV (250 nm) ではそのような速い拡散はみられなかった。この側方拡散の違いが、ガス反応性の違いを生じていると考えられる。このように、リガンド反応ダイナミズムの解析から、Hb小胞体の安全性を裏付ける結果が得られた (成果論文: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2010)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計32件)

1. H. Sakai, N. Okuda, A. Sato, S. Takeoka, E. Tsuchida. Hemoglobin encapsulation in vesicles retards NO- and CO-bindings and O₂-release when perfused through narrow gas-permeable tubes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298, H956-H965 (2010, March). (査読あり)
2. J. A. Plock, N. Rafatmehr, D. Sinovic, Y. Harder, H. Sakai, E. Tsuchida, A. Banic, D. Erni. Hemoglobin vesicles improve wound healing and tissue survival in critically ischemic murine skin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H905-910 (2009, Spt). (査読あり)
3. H. Sakai, M. Okamoto, E. Ikeda, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Histopathological changes of rat brain after direct injection of hemoglobin-vesicles (oxygen carriers) and neurological impact in an intracerebral hemorrhage model. *J. Biomed. Mater. Res.* 90A, 1107-1119 (2009, Sept). (査

読あり)

4. H. Sakai, A. Sato, S. Takeoka, E. Tsuchida. Mechanism of flocculate formation of highly concentrated phospholipid vesicles suspended in a series of water-soluble biopolymers. *Biomacromolecules* 10, 2344-2350 (2009, Aug). (査読あり)
5. H. Sakai, A. Sato, N. Okuda, S. Takeoka, N. Maeda, E. Tsuchida. Peculiar flow patterns of RBCs suspended in viscous fluids and perfused through a narrow tube (25 μm). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H583-H589 (2009, Aug). (査読あり)
6. T. Sato, H. Sakai, K. Sou, O. Glatter, E. Tsuchida. Static structure and dynamics of hemoglobin vesicles (HbV) developed as a transfusion alternative. *J. Phys. Chem. B.* 113, 8418-8428 (2009, June). (査読あり)
7. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicles and red blood cells as carriers of carbon monoxide prior to oxygen for resuscitation after hemorrhagic shock in a rat model. *Shock* 31, 507-514 (2009, May). (査読あり)
8. H. Sakai, Y. Seishi, Y. Obata, S. Takeoka, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Fluid resuscitation with artificial oxygen carriers in hemorrhaged rats: Profiles of Hb-vesicles degradation and hematopoiesis for 14 days. *Shock* 31, 192-200 (2009, Feb.). (査読あり)
9. E.F. Verdu, P. Bercik, X.X. Huang, J. Lu, N. Al-Mutawaly, H. Sakai, T.A. Tompkins, K. Croitoru, E. Tsuchida, M. Prude, S.M. Collins. The role of luminal factors in the recovery of gastric functions and behavioral changes after chronic *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295, G664-G670 (2008, Oct). (査読あり)
10. H. Sakai, A. Sato, P. Sobolewski, S. Takeoka, J.A. Frangos, K. Kobayashi, M. Intaglietta, E. Tsuchida. NO and CO binding profiles of hemoglobin vesicles as artificial oxygen carriers. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 1441-1447 (2008, Oct.). (査読あり)
11. H. Sakai, A. Sato, K. Masuda, S. Takeoka, E. Tsuchida. Encapsulation of concentrated hemoglobin solution in phospholipid vesicles retards the reaction with NO, but not CO, by intracellular diffusion barrier. *J. Biol. Chem.*

283, 1508-1517 (2008, Jan). (査読あり)

12. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers: Present situation and future vision. *J. Intern. Med.* 263, 4-15 (2008). (査読あり)

13. 佐藤 敦、酒井 宏水、武岡 真司、土田 英俊. 各種代用血漿剤に分散させたヘモグロビン小胞体(人工赤血球)とその血液混合系のレオロジー特性. *日本ヘモレオロジー学会誌* 10, 3-11 (2007). (査読あり)

14. H. Sakai, A. Sato, S. Takeoka, E. Tsuchida. Rheological properties of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) suspended in a series of plasma substitute solutions. *Langmuir* 23, 8121-8128 (2007, July). (査読あり)

ほか

〔学会発表〕(計94件)

連名、ポスターを含む

1. H. Sakai, A. Sato, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Hemoglobin vesicles as artificial oxygen carriers: Interactions with ligand molecules in the production process and in blood circulation. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China. (口頭)

2. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Hb-vesicles as artificial oxygen carriers: Interactions with ligand molecules in the production process and in blood circulation. / 2007 Joint Congress of the 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs (JSAO) and The 2nd Meeting of the International Federation for Artificial Organs (IFAO) / October 28-31, 2007 / Osaka (口頭)

3. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hb-Vesicle: A Cellular Hb-Based Oxygen Carrier that Fulfills the Physiological Roles of the RBC Structure / ISOTT 2008 (International Society on Oxygen Transport to Tissue) / Sapporo Prince Hotel / August 3-7, 2008 (口頭)

4. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hemoglobin-vesicles as O₂- and CO carriers / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008. (口

頭)

5. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Physicochemical characteristics of Hb-Vesicles as RBC substitutes / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009 (口頭)

ほか

〔図書〕(計3件)

1. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicle, a cellular artificial oxygen carrier, that fulfills the physiological roles of the red blood cells structure. *Adv. Exp. Med. Biol.* 662 (Oxygen Transport to Tissue XXXI) 433-438 (2010)

2. H. Sakai, K. Sou, E. Tsuchida. Hemoglobin vesicles as a transfusion alternative. *Methods Enzymol.* 465 (Liposomes Part G) 363-384 (2009).

ほか

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 配位子置換型酸素輸液剤
発明者: 酒井宏水ほか
権利者: (財)生産開発科学研究所
種類: 公開特許公報
番号: 特開 2007-269665
出願年月日: 2006. 3. 30
国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

www.waseda.jp/prj-artifblood/index-ja.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 宏水 Hiromi Sakai

早稲田大学・理工学術院・准教授

研究者番号: 7 0 3 1 8 8 3 0

(2) 研究分担者(平成19年度)

小林 紘一 Koichi Kobayashi

慶應義塾大学・医学部

研究者番号: 8 0 0 5 1 7 0 4

(3) 連携研究者(平成20-21年度)

小林 紘一 Koichi Kobayashi

慶應義塾大学・医学部

研究者番号: 8 0 0 5 1 7 0 4