

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656485

研究課題名（和文） 膜乳化法を用いた新規低毒性人工赤血球の開発

研究課題名（英文） Development of a novel artificial red blood cell via membrane emulsification technique

研究代表者 伊藤大知

(ITO TAICHI)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：50447421

研究成果の概要（和文）：

再生医療、特に組織工学分野において、体外での3次元組織構築と組織移植は究極の目標である。このためには培養組織中に十分な酸素を供給する人工赤血球が必要不可欠である。本研究では、膜乳化技術・非侵襲的化学反应技術、動物細胞の培養技術の融合により、粒径が1~5 μm 付近で粒度分布が狭い、革新的な人工赤血球とその量産技術の開発を行う。本人工赤血球では、①サイズ制御によるエンドサイトーシス低減によって、細胞毒性が格段に低減し、②ウシ由来ヘモグロビン(Hb)を用いてコスト・材料供給安定性・酸素運搬特性が格段に向上し、③スケラブルな膜乳化法の応用により将来大量生産供給が可能になる。膜工学を軸に分野横断的にブレークスルーを実現し、従来の人工赤血球の問題群を克服することを目標とした。

本研究課題では、当初に挙げた各項目をほぼ100%実現した。まず市販Hbがメト化により失活しているため、新鮮なウシ血液からHbを抽出し、SDS-PAGEとUV-vis測定により、メト化率2%以下でHbを抽出した。これを用いて、10wt/v%の超高濃度Hbの膜乳化法を検討した。Hb単独では膜へのファウリングも大きく、また様々な界面活性剤を用いても安定なエマルションが得られなかったが、アルブミン1~20wt/v%と10wt/v%Hbを混合して乳化することによって、粒径が4 μm の均一エマルション作製に成功し、その後にグルタルアルデヒド架橋することによって、Hb粒子の大量作製に成功した。酸素解離曲線測定によりP50の値は13mmHg程度となった。抽出Hbの値は19mmHgとなり、6mmHg程度低濃度側にシフトし、これは架橋Hbの既往の報告と良く一致する。さらにHepG2のディッシュ培養下で、MTT assayとLive/Dead染色を行い、Hb溶液に比べて高濃度でも毒性が発現しないことを証明した。

研究成果の概要（英文）：

Construction of three-dimensional tissue in vitro and its implantation are an ultimate goal in tissue engineering. For this purpose, an artificial oxygen carrier is necessary to supply enough oxygen to regenerative tissues. In this research, we fabricated a new oxygen carrier which diameter is between 1 and 5 μm and has a narrow size distribution by the combination of membrane emulsification, non-invasive chemical reaction, and animal cell culture. The oxygen carrier achieved low cytotoxicity of cells by the reduction of endocytosis, high oxygen capacity, and low cost by the use of bovine hemoglobin (Hb). In fact, we achieved all the above-mentioned points. We extracted a fresh and active Hb from bovine blood by 98 % purity, which were confirmed by SDS-PAGE and UV-vis. We successfully emulsified 10 wt% of Hb by preventing the fouling of the membrane by addition of BSA, which emulsion size was ca. 4 μm . Subsequent crosslinking by glutaraldehyde brought a new oxygen carrier which P50 was 19mmHg. The toxicity of the carriers to HepG2 was lower than that of the same concentration of Hb.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：膜分離、再生医療、膜乳化、人工赤血球、ヘモグロビン

1. 研究開始当初の背景

再生医療（組織工学）分野において、体外での3次元組織構築と組織移植は究極の目標である。このためには培養組織中に十分な酸素を供給する人工赤血球が必要不可欠である。

現在までに開発されてきた人工酸素運搬体としては Hb ベースの運搬体、例えば Hb をリポソームに封入したタイプ、Hb を架橋したタイプ、Hb に PEG 修飾を施したタイプが存在する。また PFC（パーフルオロカーボン）を封入したミセルも開発されてきている。しかしながら虚血性疾患治療を目標としてきたため、サイズが 200nm 程度以下であり、胎児肝細胞などに適用すると、毒性が高いことが報告されている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、膜乳化技術（膜工学）・非侵襲的化学反应（バイオマテリアル）、膜透過評価技術（膜工学）の融合により、粒径が 1 μm 付近で粒度分布が狭い、革新的な人工赤血球とその量産技術の開発を行う。本人工赤血球では、①サイズ制御によるエンドサイトーシス低減よって、細胞毒性が格段に低減し、②ウシ由来ヘモグロビンとビニルモノマー材料を用いてコスト・材料供給安定性・酸素運搬特性が格段に向上し、③スケーラブルな膜乳化法の応用により将来大量生産供給が可能になる。膜工学を軸に分野横断的にブレークスルーを実現し、従来の人工赤血球の問題群を克服する。

3. 研究の方法

(1) 膜乳化と架橋

膜乳化法により Hb 封入粒子の作製を行った。膜乳化装置は内圧式マイクロキットを用い、連続相にはトリグリセロール (TGCR) 1% 含有ケロシンを用いた。分散相には、Hb を 0.1, 1, 5, 10% で PBS に溶解させた溶液・Hb の PBS 溶液とキトサンの酢酸溶液の混合溶液・Hb10%溶液に BSA を 5, 10, 15, 20% で溶解させた

溶液を用いた。また、使用した SPG 膜の細孔径は 3 μm 、膜乳化時の圧力は臨界圧より 10 ~ 20 kPa ほど高い 50 kPa 程度に設定した。分散相の溶液を約 3 mL とし、1 時間膜乳化を行った。膜乳化中は、各時間での乳化液の観察を行った。膜乳化の終了後、連続相にグルタルアルデヒド (GA) を 1 mL 添加し、2 時間攪拌して架橋し、粒子化させた。得られた溶液を遠心分離にてエタノール・ヘキサンで洗浄、純水に媒介させたのち、凍結乾燥した。これらのサンプルを凍結乾燥後、SEM 画像を撮影した。

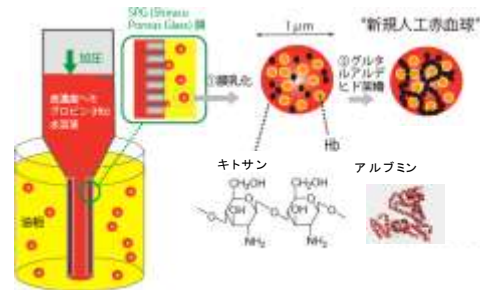


図1 膜乳化プロセスと架橋プロセス

(2) 細胞毒性試験

ヒト肝がん細胞株である HepG2 を 96well プレートに播種し、2 日後に MTT assay を行った。対照実験として、Hb 濃度が同濃度になる Hb/PBS 溶液を用いた。

さらに HepG2 をガラスボトムディッシュに播種し、2 日後に Live/Dead 染色を行って共焦点顕微鏡で観察した。

(3) 酸素解離曲線の測定

Hemox-analyzer (TCS Scientific, USA) を用いて、酸素解離曲線を測定した。酸素分圧を変化させながら、酸素濃度をクラーク電極で決定し、Hb の oxy 型と deoxy 型の比率を可視光吸収から分光学的に決定できる。酸素解離曲線から、Hb の酸素飽和度が 50% となる P50 と Hill 曲線にフィッティングした際の n の値を決定した。

4. 研究成果

(1) 粒子の作製

Hb の膜乳化写真を図 2 に示す。Hb 単独ではエマルションが分散不安定で 1 時間程度著しく合一してしまう。BSA を添加することによって、エマルションが著しく安定し、均一な膜乳化が可能になった。キトサンを添加した場合は膜ファウリングが悪化して均一なエマルションが得られなかった。

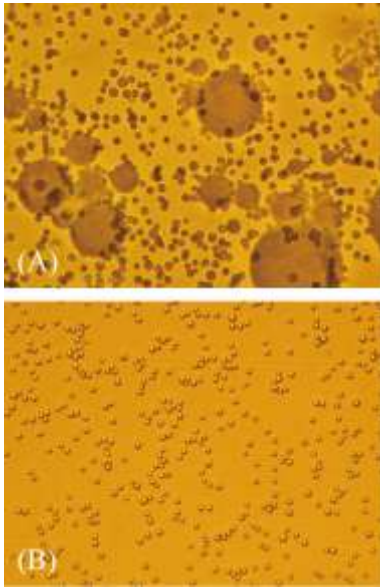


図 2 Hb エマルション (A)Hb 10%のみ (B)Hb+BSA 各 10%

さらにグルタルアルデヒドで架橋、洗浄を行うことによって、図 3 に示す電子顕微鏡写真のように、粒度分布が揃った、Hb/BSA 粒子が得られた。

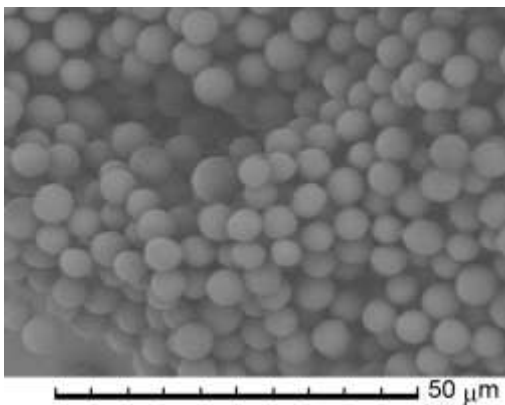


図 3 Hb/BSA 粒子の電子顕微鏡写真

(2) 細胞毒性

播種した HepG2 に本酸素キャリアを添加して、Live/Dead 染色をした結果を図 4 に示す。赤色で染まる死細胞は全く見られず、緑色の蛍光を示す生細胞のみ観察された。

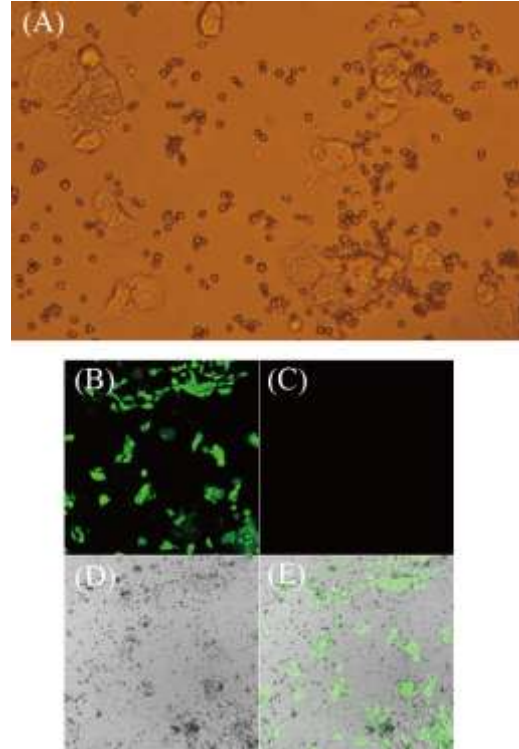


図 4 Live/Dead assay の結果 (A)倒立顕微鏡鏡 (B)CalceinAM 染色 (C)EthD1 染色 (D)共焦点光学像 (E)マージ画像

(3) 酸素解離曲線

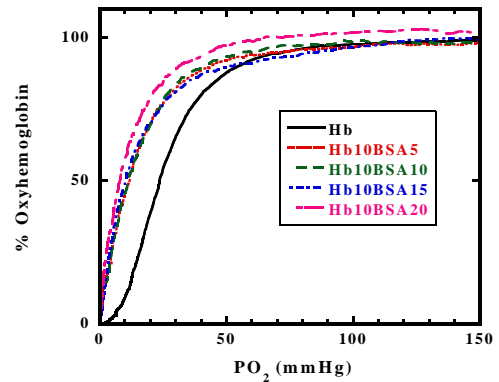


図 5 酸素解離曲線
Hemox-Analyzer にて測定した酸素解離曲

線、及び P50 と n の値を示す。Hb と BSA の比率が異なると P50 の値と n は変化すること、また既往の架橋型 Hb の同様に、共同性を示す n の値は低下することが示唆された。

表 本研究の P50 及び n の値

	PolyHeme	Hemopure	OxyVita	Liposome encapsulated Hb (LEH)	Human Blood	This work
Hb source	Human	Bovine	Bovine	Human	Human	Bovine
Hb content (g/dL)	10	12-14	6	10	12-17	10
P ₅₀ (mmHg)	20-22	40	5.95	32	27	8.08-11.60
Hill coefficient	1.5	1.2	1.3	2.2	2.8	1.20-1.37
MetHb	< 5%	< 10%	3.7%	< 3%	< 0.5	~ 10%

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)

[学会発表] (計 7 件)

(1) injectable な医用ハイドロゲルの材料開発—腹膜癒着・腹膜播種・がん免疫療法・再生医療への応用 伊藤大知 情報協会招待講演 秋葉原 2012 年 12 月 18 日

(2) Preparation of uniformly-sized microspheres of hemoglobin and albumin as oxygen carriers by the Shirasu porous glass membrane emulsification technique, Yao-Tong Lai, Mayu Sato, Yukimitsu Suzuki, Kazuki Akamatsu, Shin-ichi Nakao, Sakai Yasuyuki, Taichi Ito, Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay, Ichijo Hall, Yayoi Auditorium, The University of Tokyo, 2012 年 12 月 10 日 36

(3) ヘモグロビンをを用いた SPG 膜乳化法による新規人工酸素運搬体の開発 Yao-Tong Lai・佐藤真優・赤松憲樹・中尾真一・酒井康行・伊藤大知 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 仙台国際センター 宮城 2012 年 11 月 26-27 日 PY31

(4) Preparation of monodispersed poly(Methacryloxypropyl tris(trimethylsiloxy) silane) microspheres via SPG membrane emulsification technique Yao-Tong Lai, Kazuki Akamatsu, Shin-ichi Nakao, Yasuyuki Sakai, Taichi Ito 化学工学会 第 44 回秋季大会 東北大学川内北キャンパス 宮城 2012 年 9 月 19-21 日

(5) SPG 膜乳化法によるヘモグロビンベース新規人工酸素運搬体の開発 Lai Yao-Tong, 佐藤真優・赤松憲樹・中尾真一・酒井康行・伊藤大知 第 11 回日本再生医療学会総会

パシフィコ横浜 2012 年 6 月 14 日 D-5-71

(6) 膜乳化法を用いた人工赤血球の開発 佐藤真優・鈴木幸光・赤松憲樹・中尾真一・酒井康行・伊藤大知 膜シンポジウム 2011 沖縄 2011 年 11 月 18-19 日 208

(7) Development of hemoglobin-based oxygen carriers via SPG membrane emulsification technique Yao-Tong Lai, Mayu Sato, Kazuki Akamatsu, Shin-ichi Nakao, Yasuyuki Sakai, Taichi Ito 日本膜学会第 34 年会 早稲田大学西早稲田キャンパス 63 号館 2012 年 5 月 9 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤大知 (ITO Taichi)

東京大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：50447421

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

赤松憲樹 (AKAMATSU Kazuki)
工学院大学・工学部・准教授
研究者番号：50451795

酒井康行 (SAKAI Yasuyuki)

東京大学・生産技術研究所・教授
研究者番号：00235128