

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860121

研究課題名(和文)一酸化炭素結合ヘモグロビン小胞体の多機能型蘇生剤としての有用性評価

研究課題名(英文) Carbon monoxide-bound hemoglobin-vesicles as a novel resuscitative fluid with multiple effects

研究代表者

田口 和明 (TAGUCHI, Kazuaki)

崇城大学・薬学部・助教

研究者番号：90621912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：一酸化炭素(CO)は強力な抗酸化作用・抗炎症作用に加え、抗菌作用を有している。我々は、ヘモグロビン小胞体(HbV)にCOを結合させたCO結合型HbV(CO-HbV)を作製し、CO-HbVが細菌感染症及び多臓器不全に対して有効であるかについて検討した。その結果、敗血症モデルである盲腸結紮穿孔モデルマウスにCO-HbVを投与したところ、HbV投与群と比較して生存率が向上した。加えて、HbVは大量出血に伴う肺障害を抑制し、CO-HbVは急性膵炎に伴う多臓器不全を抑制した。以上の結果より、CO-HbVは抗菌作用と全身性の多臓器保護効果を有する新規蘇生剤としての可能性を十分に秘めていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Carbon monoxide (CO) has potent anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-virus effects. We prepare a CO-bound hemoglobin-vesicles (CO-HbV), and evaluated the possibility that CO-HbV has a potential to suppress both infection and multi-organ failure. As a result, CO-HbVs administration increased the survival rate in cecum ligation and puncture model mice, a sepsis model, compared to HbV administration. In addition, HbV as well as freshly packed RBC was less predisposed to result in a post-transfusion lung injury than stored packed RBC. Furthermore, CO-HbV also ameliorated multi-organ injuries (liver, kidneys, lungs and pancreas) induced by severe acute pancreatitis in mice. Taken together with these results, CO-HbV has the potential for use in the treatment of massive hemorrhage with anti-infection and cytoprotective effects.

研究分野：医療薬学

キーワード：一酸化炭素 ヘモグロビン リポソーム

1. 研究開始当初の背景

不慮の事故や手術に伴う大量出血時には、赤血球製剤輸血が施行される。このような輸血が必要となる患者の多くは重症度が高く、侵襲や低栄養による影響で著しく免疫能が低下しており、易感染状態に陥っている。さらに、大量出血時は循環血流量を維持することが出来なくなる結果、臓器灌流障害（臓器低酸素状態）が引き起こされる上、赤血球輸血後には急激な臓器再灌流により活性酸素の爆発的産生や炎症反応の亢進が起こり、組織の虚血再灌流傷害が惹起される。そのため、赤血球輸血後には、「細菌感染症」と「多臓器不全」が生命を脅かす二次的な全身障害として医療現場で問題視されている。近年、一酸化炭素 (CO) は病態生理学的に中心的な役割を担う生理活性物質であることが明らかとされ、医療ガス分子候補として国内外で臨床応用が試みられており（「二次性肺高血圧症合併慢性閉塞性肺疾患患者に対する低濃度一酸化炭素吸入療法に関する臨床研究」など）、CO の臨床応用の動きは加速化している。CO の生理活性作用は多岐に渡っており、強力な抗酸化作用・抗炎症作用に加え、幅広い抗菌スペクトルを有することも報告されている。これらのことを総合的に考え合わせると、CO を医療ガスとして大量出血時の蘇生の際に併用することで、輸血後の細菌感染症や多臓器不全に対する予防及び治療効果が期待できると考えられる。しかしながら、ガス分子である CO の生体内での制御は容易でない。そこで、リン脂質膜にヘモグロビンを高濃度に封入し赤血球代替物製剤として開発中であるヘモグロビン小胞体 (HbV) が大量出血時に蘇生剤と CO 供与体を兼ね備えることが可能であると考えた。HbV は HbV 溶液中に数分間の CO バブリングという、短時間かつ簡便な方法で CO 結合型 HbV (CO-HbV) を作製することが出来る上、蘇生剤としての有用性は十分に実証されている。このような背景より、CO-HbV は利便性の高いユニークな新規蘇生剤として、大量出血後の細菌感染症及び多臓器不全罹患率の低下に寄与すると予想される。そこで本研究は、輸血後の二次的な全身障害（細菌感染症、多臓器不全）の予防（治療）効果を兼ね備えた新規蘇生剤として CO-HbV の実用化の可能性を追求する。

2. 研究の目的

本研究では、未だ有効な治療（予防）法が確立していない赤血球輸血後の細菌感染症と多臓器不全を克服すべく、CO-HbV の治療効果（蘇生作用、抗菌活性・臓器保護作用）を検証し、革新的な新規蘇生剤としての有用性について *in vivo* で評価する。

3. 研究の方法

(1) 敗血症モデルマウスの作製と CO-HbV の有用性評価

C57BL6 マウスを腹部開腹し、盲腸の結紮を行い、18G の注射針で 1 箇所穴を空けることで盲腸結紮穿孔モデルマウスを作製し、6 時間後に、HbV (1000 mgHb/kg)、CO-HbV (1000 mgHb/kg) を静脈内投与した。

(2) 出血性ショックモデルラットの作製と多臓器不全への影響

左大腿動脈より全血液量の 40～50% の脱血を行い、血圧を 40 mmHg 以下に 1 時間維持した後に、各サンプルを用い蘇生させた。

(3) コリン欠乏エチオニン添加 (CDE) 食誘発急性膵炎モデルマウスの作製

BALB/cN マウスに CDE 食を 3 日間給餌することで CDE 食誘発急性膵炎モデルマウスを作製した。CDE 食開始 1 日後に生理食塩水、HbV (1000 mgHb/kg)、CO-HbV (1000 mgHb/kg) を尾静脈内投与し、評価に用いた。

4. 研究成果

まずはじめに、CO-HbV の抗菌効果を評価するために、臨床状態を良く反映している敗血症モデルマウス（盲腸結紮穿孔モデルマウス）に、HbV (コントロール) または CO-HbV を投与し、生存率を評価した。その結果、HbV 投与群と比較して、CO-HbV 投与群において生存率が向上する傾向が確認された (図 1)。この結果より、CO-HbV は輸血後の二次的な細菌感染症の治療を兼ね備えた新規蘇生剤となり得る可能性が示唆された。

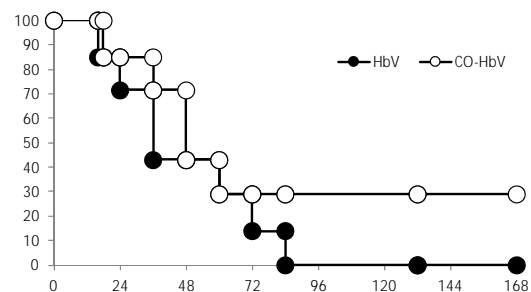


図 1 敗血症モデルマウスにおける生存率の比較

また、大量出血時における臓器保護効果を評価するために輸血時に最も発症し、有効な治療法が存在しない輸血関連急性肺傷害 (TRALI) モデルラットの作製を試みた。その結果、保存赤血球 (PRBC-28) 輸血後 6 時間において肺浮腫や肺傷害が惹起されるモデルの作製に成功した。一般的に、TRALI は輸血後 6 時間までに発症することが知られており、臨床状態を良く反映した TRALI モデルラットと考えられる。そこで本モデルを用い、HbV、新鮮赤血球製剤 (PRBC-0)、PRBC-28 の多臓器不全への影響について検討した。その結果、輸血 6 時間後までの生存率は、PRBC-28 群 < PRBC-0 群 < HbV 群の順であった。また、気管支肺胞洗浄液のエバンスブルー

一漏出度及びタンパク濃度と肺 Wet/Dry 重量比は、PRBC-28 群において PRBC-0 群と比較して増加したが、HbV 群では PRBC-0 群と同程度であった (図 2)。肺組織ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 染色及び 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) 染色においては、PRBC-28 群で MPO と 8-OHdG の肺への蓄積が観察されたが、PRBC-0 群及び HbV 群ではこれらの集積は確認されなかった。そのため、肺への好中球集積と酸化ストレスが肺障害に關与する可能性が示唆された。以上より、HbV は CO を付加していない状態でも出血性ショック時に起こり得る TRALI の惹起を抑制すると考えられた。

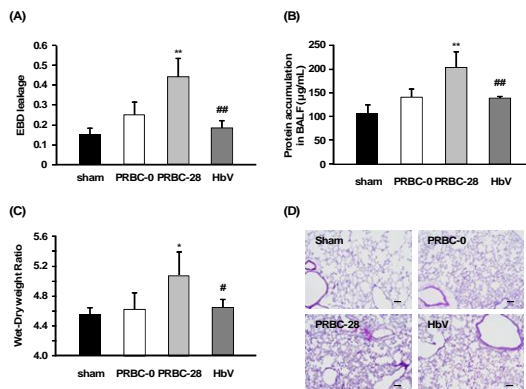


図 2 TRALI モデルラット蘇生後の肺障害パラメーターの変動。(A)エバンスブルー漏出量、(B) BALF 中タンパク濃度、(C) Wet/Dry 重量比、(D) 肺組織像 (HE 染色)

最後に、HbV では抑制できない多臓器不全を CO-HbV が抑制できるかを検証するために、急性肺炎に伴う多臓器不全に対する HbV と CO-HbV の有効性を評価した。その結果、出血性ショック時の多臓器不全とは異なり、急性肺炎に伴う多臓器不全 (脾臓、肝臓、腎臓、肺) に対して HbV は保護効果を示さなかった (図 3-6)。一方で、CO-HbV 投与群においては上述した臓器に対して劇的な障害の抑制を示した (図 3-6)。また、保護メカニズムを解明すべく炎症性サイトカインの定量、各臓器における好中球の浸潤、ニトロチロシンの沈着を確認したところ、急性肺炎時における CO-HbV の多臓器保護効果は、CO の抗酸化・抗炎症作用に起因していると考えられた。

以上の結果を総合して考えると、CO-HbV は抗菌作用と全身性の多臓器保護効果を有する創薬候補 (蘇生剤) であり、未だ有効な治療 (予防) 法が確立していない赤血球輸血後の細菌感染症と多臓器不全を克服すべく、革新的な新規蘇生剤としての可能性を十分に秘めていると考えられた。

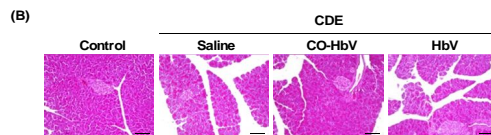
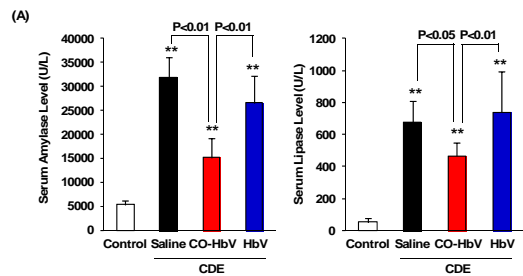


図 3 CDE 食誘発急性肺炎モデルマウスにおける膵障害評価。(A) 血清アミラーゼとリパーゼ、(B) 膵組織像 (HE 染色)

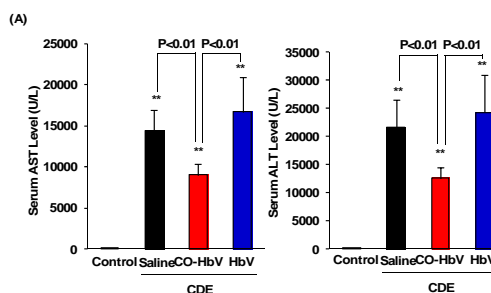


図 4 CDE 食誘発急性肺炎モデルマウスにおける肝障害評価。(A) AST と ALT 値、(B) 肝組織像 (HE 染色)

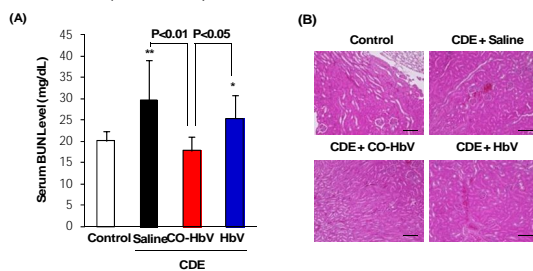


図 5 CDE 食誘発急性肺炎モデルマウスにおける腎障害評価。(A) BUN、(B) 腎組織像 (HE 染色)

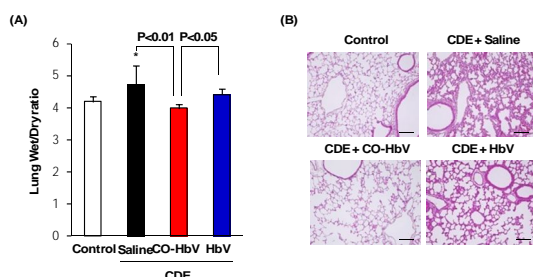


図 6 CDE 食誘発急性肺炎モデルマウスにおける肺障害評価。(A) Wet/Dry 重量比、(B) 肺組織像 (HE 染色)

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4件)

Nagao S, Taguchi K, Miyazaki Y, Wakayama T, Chuang VT, Yamasaki K, Watanabe H, Sakai H, Otagiri M, Maruyama T. Evaluation of a new type of nano-sized carbon monoxide donor on treating mice with experimentally induced colitis. *J Control Release*. 査読有, 2016; 234:49-58.
doi: 10.1016/j.jconrel.2016.05.016.

Tokuno M, Taguchi K, Yamasaki K, Sakai H, Otagiri M. Long-term stored Hemoglobin-vesicles, a cellular type of hemoglobin-based oxygen carrier, has resuscitative effects comparable to that for fresh red blood cells in a rat model with massive hemorrhage without post-transfusion lung injury. *PLoS One*. 査読有, 2016;11(10):e0165557.
doi: 10.1371/journal.pone.0165557.

Nagao S, Taguchi K, Sakai H, Yamasaki K, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T. Carbon monoxide-bound hemoglobin vesicles ameliorate multiorgan injuries induced by severe acute pancreatitis in mice by their anti-inflammatory and antioxidant properties. *Int J Nanomedicine*. 査読有, 2016;11:5611-5620.
doi: 10.2147/IJN.S118185

Taguchi K, Nagao S, Yamasaki K, Sakai H, Seo H, Maruyama T, Otagiri M. Biological responsiveness and metabolic performance of liposome-encapsulated hemoglobin (Hemoglobin-vesicles) in apolipoprotein E-deficient mice after massive intravenous injection. *Biol Pharm Bull*. 査読有, 2015;38(10):1606-16.
doi: 10.1248/bpb.b15-00420.

[学会発表](計4件)

Nagao S, Taguchi K, 他、Therapeutic application of a new type of nano-sized carbon monoxide donor in colitis model mice. 2016 Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition 2016/7/17-20 (Washington, USA)

得能正裕、田口和明、他、ヘモグロビン小胞体蘇生が輸血関連急性肺障害に与える影響、第22回日本血液代替物学会年次大会 2015/10/22-23 熊本大学薬学部宮本記念館コンベンションホール(熊本市中央区)

永尾 沙理、田口 和明、他、炎症性腸疾患に対する一酸化炭素結合型ヘモグロビン小胞体の有用性評価、日本薬剤学会第30年会 2015/5/21-23 長崎ブリックホール(長崎県長

崎市)

田口和明、他、病態モデル動物におけるヘモグロビン小胞体の体内動態と安全性評価、第21回日本血液代替物学会年次大会 2014/12/8-9 中央大学(東京都文京区)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田口 和明 (TAGUCHI Kazuaki)
崇城大学・薬学部・助教
研究者番号：90621912