

内97-22

早稲田大学大学院理工学研究科

博士論文概要

論文題目

Oxygen Coordination Dynamics
of Artificial Red Cells and Their Oxygen Coordination
(人工赤血球における酸素配位動力学)
とその
Dynamics

申請者

川合 宣行

Noriyuki Kawai

応用化学専攻・高分子化学研究

1997年11月

血液は各種の内因性および外因性物質の運搬、体内組織循環の恒常性保持など、多様な機能を備えており「動く臓器」と呼ばれている。血液の機能代替を考える場合、多様な機能すべての置換を計ることは、現在到底不可能と云わねばならない。最重要の血液機能である赤血球の酸素輸送機能の代替は、実現の可能性が極めて高くその一部は現在臨床試験最終段階にある。しかし、代替物投与による末梢毛管部位でのNO(血管弛緩因子)捕捉、投与代替物の体内代謝などにまだ多くの課題を残している。

投与酸素運搬体の体内挙動に関する従来研究は、赤血球とヘモグロビン(Hb)の酸素の結合解離に限られていた。最近、修飾Hbのような人工酸素輸送体が出現するようになり、形態上これらを細胞型(cellular)、非細胞型(acellular)に大別している。前者では粒径、被覆膜厚、小胞体内Hb濃度、小胞体分散系の溶液粘度、酸素親和度などを制御でき、非細胞型とはこれら物性が大きく相違する。こうした人工赤血球を試料として用いることで初めて、酸素配位動態の支配因子を確定することが可能となる。申請者はこれらの人工赤血球の試料と酸素結合の動力学測定から、赤血球と比較し酸素配位動態を明らかにすることを目指している。in vivo試験で得られた心拍出量や血圧、血液ガスパラメータなど全身的循環動態と、微小循環系の多点計測結果などをin vitroでシミュレーションし、人工赤血球の性能評価を可能とする点に本研究の意義がある。

本論文は7章より構成されている。第1章では、人工赤血球の意義と分類、そして研究開発動向について整理した。現在展開されている人工赤血球は、1) 非細胞(acellular)型、2) 細胞(cellular)型、3) 全合成型に分類される。人工赤血球に要求される項目を整理し、現在に至る開発経緯と今後の課題についてまとめた。

第2章は、赤血球の酸素運搬動態と酸素配位動力学測定法についての記述である。赤血球による酸素運搬過程には、1) 外気-肺-肺胞-血液、2) 血漿-赤血球膜-Hb、3) 赤血球-血管壁-組織細胞など、種々の酸素拡散過程が存在する。これらは対象となる系の大きさと条件が異なるため、個別に物理化学的、あるいは化学工学的取扱いが必須となる。また、酸素拡散挙動と組織との相互情報交換によるhomeostasisの成立についても述べた。さらに、酸素結合解離曲線、stopped flow、flash photolysisに代表される、酸素配位動力学の最新の測定法をまとめた。

第3章では、acellular型、cellular型人工赤血球の合成法および溶液物性の比較についてまとめている。前者の例として、Hbの α_{99} Lys間をフマル酸で架橋した分子内架橋Hb(XLHb)を合成、更にモノメトキシポリエチレングリコール(PEG)をXLHbの表面Lys残基に結合させたPEG-XLHbも合成した。各々の直径は5 nm、

28 nm、溶液粘度は1.0 cP、5.9 cP(生理条件下、Hb濃度10g/dL)であった。また、cellular型として直径0.2 μ mのHb小胞体を調製、赤血球(直径8 μ m)と比較すると、溶液粘度は各々3.6 cP、4.0 cPであった。均一孔径のフィルター透過測定では、各々の粒径に対応した透過度が得られた。酸素親和度 P_{50} の値はXLHb; 31 Torr、PEG-XLHb; 20 Torr、Hb小胞体; 28 Torr、赤血球; 27 Torrである。Hb小胞体は、共封入させるアロステリック因子によって酸素親和度を任意値に制御可能である。

第4章は、前章で述べた様に合成したacellular、cellular型人工赤血球について、その酸素結合解離の動力学を整理、さらに拡散過程の数式化によりシミュレーションを行い、その相違について考察した内容である。

まず、酸素分圧の迅速定量のために、亜鉛ポルフィリンを結合させたアルブミンを調製、酸素濃度に対応して減少する発光寿命を酸素プローブとして利用した。酸素分圧の異なる2液を瞬時に混合するstopped flow装置を改良し、混合後一定時間経過後の発光寿命が測定できるstopped flow-laser flash photolysis法を開発、酸素運搬体の酸素結合解離過程を測定可能にした。

deoxy状態の人工赤血球と酸素濃度37.8 Torrの酸素プローブ溶液を混合すると、XLHbでは約100ms後までに酸素結合が終了したのに対し、Hb小胞体では100-2000 msの間で徐々に酸素結合が進行する様子が観測された。更に、異なる酸素親和度に調節したHb小胞体では、100-2000 ms間の酸素結合速度の相違が観測され、酸素親和度の要素である酸素解離速度定数(k_{off})が内水相領域における酸素の促進輸送に影響を与えることが示された。また、Hb小胞体の酸素解離反応における酸素濃度変化は2段階過程を示し、脂質二分子膜近傍の酸素解離過程と内相の拡散過程に分けられる。赤血球では、更に顕著な酸素拡散の遅延効果が観測された。これは、赤血球の大粒径(8 μ m)に起因する内相Hb層の増大、単位Hb当たりの脂質膜表面積の減少によるものである。これらの挙動を、酸素拡散過程の数式化及びコンピュータを用いてシミュレートすることができた。このプログラムを用いて、酸素動力学を支配する要因を整理、制御するための指針を得た。

第5章では全合成ヘム類(リピドヘム)を利用した2種類の酸素運搬体について、その合成と酸素配位挙動について記述している。Hbの酸素結合席であるプロトヘムをリピドヘムで、グロビンタンパクが形成する疎水環境をリン脂質小胞体の二分子膜層間で代替したヘム内包リン脂質小胞体を対象に、酸素結合席近傍の分子環境に応答する酸素配位挙動について解析した。この系では、酸素の配位過程が二分子膜の分子運動の影響を受けて変化することを見いだした。リン脂質のゲル-液晶相転移温度(Tc)以下では、酸素結合速度定数(k_{on})は $6.6 \cdot 10^7 M^{-1}s^{-1}$ とベンゼン中の値($6.2 \cdot 10^7 M^{-1}s^{-1}$)と同程度の値を示したが、Tc以上では $1.4 \cdot 10^7$

$M^{-1}s^{-1}$ と低下した。これはリン脂質のアシル鎖の分子運動が酸素配位を立体的に遮蔽しているためと考察された。すなわち、ヘムの分子構造を変えずにマトリックスである脂質分子集合体の組成を変化させることにより、酸素親和度が制御可能となった。

リピドヘムをヒト血清アルブミンに取り込ませた系の調製法を確立。アルブミン1分子にリピドヘム8分子を取り込んだアルブミン-ヘムを合成した。生理条件下(37°C, pH7.4)において、酸素親和度 P_{50} は30 Torr(ヒト血液; 27 Torr)であり、HSAとHb4量体の分子量はほぼ同等(65 kD)であるから、Hbと比較して約2倍の酸素結合が可能となった。酸素結合解離速度定数は $k_{on} = 2.4 \cdot 10^8 M^{-1}s^{-1}$, $k_{off} = 3.2 \cdot 10^3 s^{-1}$ であり、Hb(R状態)の値($3.3 \cdot 10^7 M^{-1}s^{-1}$, $13 s^{-1}$)に比較して大きい。これは、Hbではグロビンのヘムポケット内にヘムが挿入されており、ヘム近傍の酸素が移動できる空間が制限されているのに対し、アルブミン-ヘムではアルブミン表面にリピドヘムが吸着している構造であるため、酸素結合解離の自由度が高いためと考察される。

第6章では、人工赤血球の酸素動態をin vitroで評価するため、肺-血管-組織循環モデルを用いて酸素分布のシミュレーションを行う。血流中での条件に近付けるため、人工赤血球溶液を循環させ、hollow fiber moduleを用いて気-液(肺)、液-液(組織)間ガス交換により酸素移動を行う。酸素動態の測定は、Hbの可視吸収スペクトル変化及び酸素電極による濃度定量を併用する。流速(心拍出量)、管径(大動脈-毛細管)、溶液濃度、粘度、酸素分圧等の調節により血流モデルにおける酸素運搬動態を予測する。

第7章は、人工血液の将来展望である。赤血球の持つ酸素配位動力学は、Hbと比較して粒子サイズが大きく、酸素の授受が遅い点が特徴である。acellular型より優れているcellular型人工赤血球に、さらにこうした酸素動態特性を与える方法を検討する。加えて、全合成系人工赤血球において、酸素結合席を立体障害性置換基などによって遮蔽し、酸素結合解離速度定数を赤血球と同程度に抑制したヘム誘導体の合成についても具体的な提案をしている。

(以上)