

ヘモグロビン系人工酸素運搬体を用いた 抗血栓性材料の開発

藤井 聡* , 藤井 ひとみ**, 富樫 廣子***
吉岡 充弘***, 佐久間 一郎*, 仲井 邦彦****
佐藤 洋****, 北畠 顯*, 劔物 修**

はじめに

一酸化窒素 (NO) には血管拡張作用や血小板凝集抑制作用がある。赤血球代替物として開発中の粒子の小さなヘモグロビン (Hb) は分子中のヘムが NO をトラップする結果、血管収縮や血小板凝集を増強する可能性がある¹⁾。著者らは Hb の β 鎖 SH 基をニトロソ化した SNO-Hb を作成し、血管収縮を抑制しながら酸素を運搬する物質を開発してきた。SNO-Hb は NO の血小板凝集抑制作用により無修飾 Hb に比べ血小板に対する好ましくない作用が少ないことが期待される。さらに修飾 Hb の特質は、血管内ステント、心臓外科手術における体外循環、人工血管のコーティング等に臨床応用出来る可能性も大きい。

血小板と血栓

早い血流では内皮細胞障害後の血小板の粘着や凝集が血栓形成に重要な役割を果たす。動脈硬化を基盤としてプラークの破裂、内皮下組織のコラーゲンの露出と病的血栓の発現に血小板は深く関与し²⁾、不安定狭心症や急性心筋梗塞などの急性冠症候群や脳梗塞の発生機序に貢献する。また、血小板は代用臓器や人工臓器の人工材料表面と接触して刺激され粘着・凝集反応を起こす。血栓形成の初期過程に接着分子を介した血管内皮、血小

板、白血球等の相互作用が重要な役割を果たしている。例えば、血小板 β_3 インテグリンである II b/III a は活性化血小板において構造が変化し、フィブリノゲン結合部位が発現し、その結果血小板同士が結合する。II b/III a に対する抗体は急性冠症候群の血小板血栓の予防に有効である。これは血栓形成過程に細胞接着機構が重要であることを示唆する。一方、細胞接着分子の一つである P-セレクトインは血小板の α 顆粒や血管内皮細胞の Weibel-Palade 小体の顆粒膜に存在する膜糖蛋白で、血小板がトロンビンや活性酸素の刺激により活性化されると速やかに細胞表面に発現し、白血球膜上の Sialyl Lewis^x 糖鎖をリガンドとして接着能を発揮する。従って、II b/III a や P-セレクトインは血小板活性化のマーカーとしても使用されている³⁾。

赤血球代替物としての修飾ヘモグロビンの開発

著者らは Hb を利用した赤血球代替物¹⁾を開発してきた。NO は内皮で産生され、抗血栓作用を有し、血小板の guanylate cyclase を活性化させ細胞質内 cGMP 濃度を上昇させることにより血小板凝集・粘着を抑制する⁴⁾。血漿蛋白質は血管グラフトのコーティングに用いられる⁵⁾。しかし Hb は NO をその分子内に容易にトラップし不活化する結果、血小板の活性化を増強する可能性がある⁶⁾。Hb には NO 放出能を付加でき⁷⁾、またポリエチレングリコール (polyethylene glycol, PEG) は分子バリアーを形成して人工材料に抗血栓性を付加できることが知られている⁸⁾。そこで NO 放

*北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学

** 同 侵襲制御医学
*** 同 機能薬理学
**** 同 環境保健医学

出能を付加した Hb 修飾体, PEG を付加した Hb 修飾体, その両方を付加した Hb 修飾体を作成した. 作成された Hb 系酸素運搬体の構造と, 血小板に与える影響を図 1 にまとめた.

S-ニトロソ化しポリエチレングリコール鎖を結合させた Hb の作成

Hb としてヒトまたはウシ赤血球より Hb を抽出して膜成分を除去した stroma free Hb を調整し, 透析後使用した⁶⁾. S-ニトロソ化しポリエチレングリコール鎖を結合させた Hb の作成は Nakai らの方法⁷⁾にて作成した.

フローサイトメトリーによる活性化血小板の検出

血小板 β_3 インテグリンと細胞接着分子である P-セレクチンに注目し, Hb が血小板活性化をもたらすか, また修飾された Hb は血小板活性化作用がより少ないかについて検討した. 健常ヒト多血小板血漿 (platelet rich plasma, PRP) を Hb 及びその修飾体とインキュベートした. 活性化された血小板表面に発現された P-セレクチンを, FITC 蛍光標識した抗 P-セレクチン抗体 (CD62P) とフローサイトメトリーを用いて, 直接的に活性化血小板を測定した³⁾. PAC-1 は IIb/IIIa に対するモノクローナル抗体で, 静止状態の IIb/IIIa にはほとんど結合せず, 活性化された IIb/IIIa へののみ

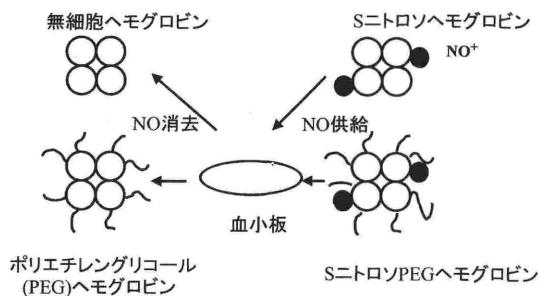


図 1 血管内におけるヘモグロビン系酸素運搬体による NO 作用の障害と Sニトロソヘモグロビンによる代償の概念. Hb は NO をその分子内に容易にトラップし不活化する結果, 血小板の活性化を増強する可能性がある. NO 放出能を付加した Hb は NO 放出により血管を拡張しながら酸素を供給する可能性がある. また PEG を付加した Hb は分子バリアーを形成して抗血栓性を追加できる可能性がある.

結合する. すなわち, 構造変化を受けた IIb/IIIa 上のフィブリノゲン結合部位を認識する. PAC-1 もフローサイトメトリーを用いて活性化血小板を直接的に測定した⁹⁾. フローサイトメトリーでは体温を想定した 37°C に比較して低体温を想定した 22°C で血小板への PAC-1 および CD62P の結合が増大していた (図 2). 以下, 低体温を想定し

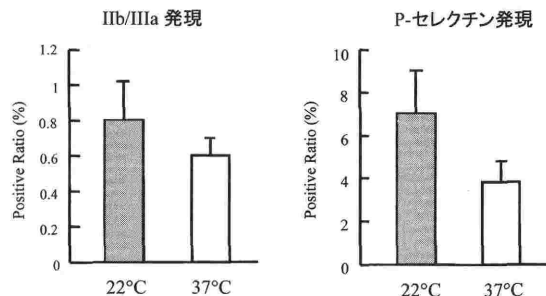


図 2 血小板 IIb/IIIa 発現 (左) と P-セレクチン発現 (右) は低体温に相当する 22°C では体温に相当する 37°C に比べ大きい. (Fujii H, et al. Thrombosis Research 100 : 519-528, 2000)

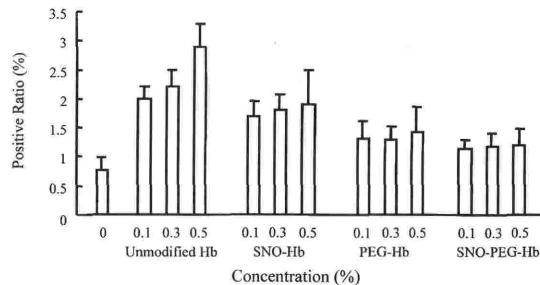


図 3 Hb とその修飾体の血小板 IIb/IIIa 発現への影響 (Fujii H, et al. Thrombosis Research 100 : 519-528, 2000)

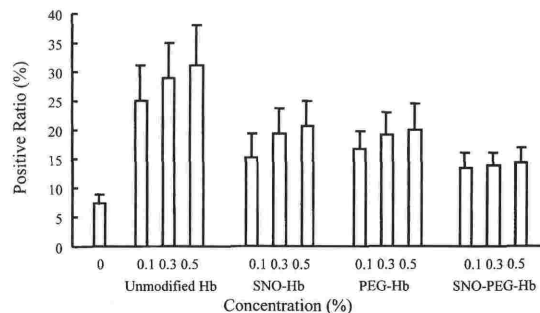


図 4 Hb とその修飾体の血小板 P-セレクチン発現への影響 (Fujii H, et al. Thrombosis Research 100 : 519-528, 2000)

て実験は22℃で行った。対照群に比較して、Hb投与群で血小板へのPAC-1とCD62Pの結合が亢進した。SNOHb投与群、PEGHb投与群、SNO-PEGHb投与群ではPAC-1とCD62Pの結合の上昇はHb投与群に比べ軽度であった(図3, 図4)。

人工材料表面への血小板の粘着・凝集

ガラス板、コラーゲンをコーティングしたガラス板への血小板の粘着・凝集に対するHbとその修飾体の影響も検討した^{5,10)}。ガラス板に対する血小板の粘着・凝集の測定には、ガラス板、及びコラーゲンでコーティングしたガラス板にHbまたはその修飾体を塗布、乾燥させた後、健常ヒトPRPを加えガラス板、及びコラーゲンでコーティングしたガラス板に対する血小板の粘着及び凝集を顕微鏡で観察した。イメージはコンピュータに保存し、画像解析装置により定量評価した。ガラス板及びコラーゲンでコーティングしたガラス板に対する血小板の粘着・凝集についてみると、Hbは有意に血小板の粘着及び凝集を抑制した。また、SNOHb、PEGHb、SNO-PEGHbではHbよりもその効果が大きかった(図5, 図6)。

体温と血小板の活性化

体温を想定した37℃に比較して、低体温を想定した22℃で血小板の活性化が増大していた。また、Hb投与により血小板機能が変化することが示唆された。血小板が低体温で活性化する機序は不明であるが、現象としてはFaradayらの報告と一致する⁹⁾。周術期における血栓性合併症^{11,12)}に低体温に関連した血小板の活性化が寄与する可能性を示している。一方、心血管系手術でみられる出血性合併症¹³⁾には、血小板の関与は少ないと考えられる。

S-ニトロソ化しポリエチレングリコール鎖を結合させたHbの特徴

血栓周囲ではトロンビンが活性化されており、また糖尿病では酸化ストレスが増大し、活性酸素が豊富に存在する。トロンビンおよび活性酸素は血小板を活性化させる。したがって、Hb修飾体を人工赤血球として用いた場合、血栓形成要因、糖尿病、または有意な動脈狭窄が存在する可能性の高い高齢者場合にはHbがもたらす血小板活

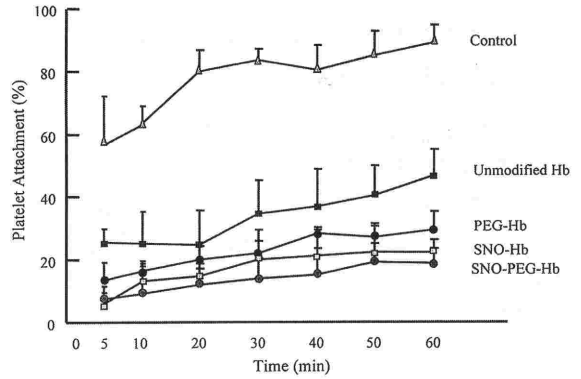


図5 ガラス板への血小板の粘着・凝集に対するHbとその修飾体の影響。(Fujii H, et al. Thrombosis Research 100 : 519-528, 2000)

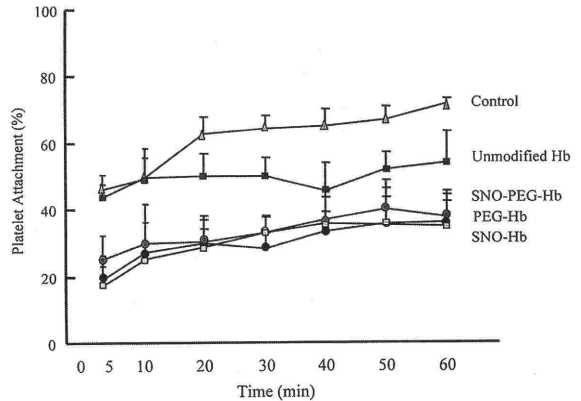


図6 コラーゲンでコーティングしたガラス板への血小板の粘着・凝集に対するHbとその修飾体の影響。(Fujii H, et al. Thrombosis Research 100 : 519-528, 2000)

性は、脳梗塞や心筋梗塞を誘導する可能性が考えられる。酸素運搬体の適応は健常人のみならず種々の病態生理下で使用されることを念頭に置いて、副作用の少ない材料を開発する必要がある。SNO-Hbは血小板活性化を抑えながら、血管内腔側からNOで血管を拡張させながら酸素を供給するので脳梗塞や心筋梗塞で局所的に治療に使える。NOには抗炎症作用もあり、SNO-Hbはこれらの作用を通して安全な酸素運搬体となる可能性がある。

ヘモグロビン系人工酸素運搬体を用いた 抗血栓性材料の開発

今回の検討では無修飾 Hb もガラス板やコラーゲンに対する血小板の粘着・凝集を抑制した。人工材料の血栓形成のメカニズムとして、血液との接触反応により瞬時的に材料表面への血漿蛋白の吸着が起こり、吸着蛋白の種類で、その後起こる血小板の粘着凝集の程度がきまり、材料の化学組成、表面組成、表面構造により血漿蛋白との吸着様式がきまると考えられる。Hb 由来の陰性荷電はガラス板に陰性荷電を与えて血小板の吸着作用を弱めたと考えられる。PEG-Hb は長鎖 PEG を有するという構造的特徴による物理的な血液成分の付着抑制作用がある。PEG は親水性でガラス板には吸着しにくく、PEG-Hb の疎水性の Hb 部分でガラス板についていたと思われ、Hb と PEG-Hb ではガラス板についた Hb の量が異なった可能性がある。Hb 自身にも血球成分の粘着を抑制する作用が報告されている¹⁴⁾。さらに NO 放出能を付加した Hb 修飾体は NO の血小板に対する好ましい抑制作用¹⁵⁾により、分子バリアーとしての作用を持つ PEG を付加した Hb 修飾体では PEG の分子バリアー効果により無修飾 Hb に比較して血小板に対する好ましくない作用が少ないと考えられる。更に、その両方を付加した Hb 修飾体は血小板活性化作用がより少ないと考えられた。また、ガラス板、コラーゲンをコーティングしたガラス板への血小板の接着に対する修飾 Hb の影響も顕著であったことから、修飾 Hb は血管内ステント、心臓外科手術における体外循環サーキット、あるいは人工血管のコーティング等に臨床応用出来る可能性が大きいことが示された。

おわりに

NO を付加した Hb 修飾体は NO の血小板凝集抑制作用により、分子バリアーとしての作用を持つ PEG を付加した Hb 修飾体では PEG の分子バリアー効果により、無修飾 Hb に比べ血小板に対する好ましくない作用が少ないと考えられる。両方を付加した Hb 修飾体は血小板活性化作用がより少ない可能性があると考えられた。修飾 Hb の人工酸素運搬体としての特質は、血管内ステント、心臓外科手術における体外循環、人工血管のコー

ティング等に臨床応用出来る可能性も大きく将来性が期待できる。

文 献

- 1) 小山 薫, 宮尾英樹: 血液代替物開発の現況. 循環制御 22: 356-360, 2001
- 2) Ross R: Atherosclerosis-an inflammatory disease. N Engl J Med 14: 115-126, 1999
- 3) Knight CJ, Panesar M, Wright C, et al: Altered platelet function detected by flow cytometry. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17: 2044-2053, 1997
- 4) Myers PR, Minor RL, Guerra R Jr., et al: Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resembles S-nitrosocysteine than nitric oxide. Nature 345: 161-163, 1990
- 5) Maalej N, Albrecht R, Loscalzo J, et al: The potent platelet inhibitory effects of s-nitrosated albumin coating of artificial surfaces. J Am Coll Cardiol 33: 1408-1414, 1999
- 6) Nakai K, Ohta T, Sakuma I, et al: Inhibition of endothelium-dependent relaxation by hemoglobin in rabbit aortic strips: Comparison between acellular hemoglobin derivatives and cellular hemoglobins. J Cardiovasc Pharmacol 28: 115-123, 1996
- 7) Nakai K, Togashi H, Yasukohchi T, et al: Preparation and characterization of SNO-PEG-hemoglobin as a candidate for oxygen transporting material. Int J Artif Organs 24: 322-328, 2001
- 8) Deible CR, Petrosko P, Johnson PC, et al: Molecular barriers to biomaterial thrombosis by modification of surface proteins with polyethylene glycol. Biomaterials 20: 101-109, 1999
- 9) Faraday N, Rosenfeld BA: In vitro hypothermia enhances platelet GPIIb-IIIa activation and P-selectin expression. Anesthesiology 88: 1579-1585, 1998
- 10) Olorundare OE, Simmons SR, Albrecht RM: Cytochalasin D and E: effects on fibrinogen receptor movement and cytoskeletal reorganization in fully spread, surface-activated platelets: a correlative light and electron microscopic investigation. Blood 79: 99-109, 1992
- 11) Rinder CS, Bonan JL, Rinder HM, et al: Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion. Blood 79: 1201-1205, 1992
- 12) Frank SM, Beattie C, Christopherson R, et al: Unintentional hypothermia is associated with postoperative myocardial ischemia. Anesthesiology 78: 468-476, 1993
- 13) Woodman RC, Harker LA: Bleeding complications associated with cardiopulmonary bypass. Blood 76: 1680-1697, 1990
- 14) Freischlag J, Backstrom B, Kelly D, et al: Blood and peritoneal neutrophil (PMN) adherence in rabbits: the effects of hemoglobin, peritoneal fluid, and infection. J Surg Res 38: 635-640, 1985
- 15) Inbal A, Gurevitz O, Tamarin I, et al: Unique antiplatelet effects of a novel s-nitrosoderivative of a recombinant fragment of von Willebrand factor, AR545C: in vitro and ex vivo inhibition of platelet function. Blood 94: 1693-1700, 1999