

近赤外分光法を用いたヘモグロビン系人工酸素運搬体の評価 酸素親和性の影響

超分子分光研究分野 坂野上 淳

人工酸素運搬体，ウシヘモグロビンポリエチレングリコール架橋体（PEG-Hb）の生体組織における酸素運搬機能を血液置換ラットと近赤外分光法を用いて検討した．酸素親和性の異なる 2 種類の PEG-Hb により置換されたラットの脳はともに酸化状態を保ち，低酸素呼吸下においては酸素親和性の高い PEG-Hb が酸化状態を保つのに有利であった．

1 はじめに

低酸素呼吸下における血液中ヘモグロビンの酸素親和性に関しては諸説があり，例えば Lenfant ら [5] は高地順応において 2, 3-DPG および P_{50} (50 % 酸素飽和を与える酸素分圧) の増加を報告する一方，Eaton ら [2] は低酸素下においてラット血液の P_{50} の低下が生存率を上げたとしている．今回，酸素親和性を变化させたウシヘモグロビンポリエチレングリコール架橋体により血液置換されたラットを用い，近赤外分光法により脳内チトクロームオキシダーゼ酸化率を求め呼吸酸素濃度との関係を検討した．

2 実験

2.1, polyethyleneglycol-conjugated hemoglobin (PEG-Hb) の作製

ウシ赤血球から取り出したヘモグロビンを Benesch ら [1] の方法により分子量約 3000 のポリエチレングリコール (DEAC-30HC, NOF Co.) で架橋した．アロステリック因子として PLP を添加し酸素親和性に变化を持たせた．今回の実験に用いた 2 種類の PEG-Hb 水溶液のヘモグロビン濃度は 5 %， P_{50} はそれぞれ 20, 40 Torr であった (図 1)．

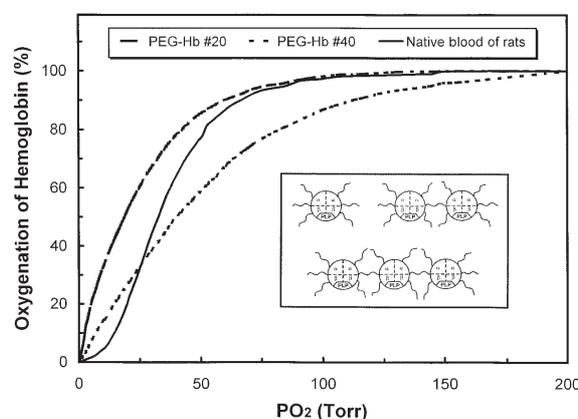


図 1 PEG-Hbs およびラット血液の酸素解離曲線．順に，# 20 (PLP/Hb = 0, P_{50} = 19.5 Torr)，# 40 (PLP/Hb = 2.5, P_{50} = 40.5 Torr)，およびラット血液 (P_{50} = 36.5 Torr) である．挿入図は PEG-Hb の概念を表す．PEG チェーンはアミノ基を介してヘモグロビン表面の Lys 残基に結合し，1 量体から 3 量体が混在している．

2.2, 近赤外分光法によるラット血液置換モデルにおける PEG-Hb の評価

オスの Wistar ラットを麻酔下において固定したのち大腿静脈から PEG-Hb を注入すると同時に大腿動脈から脱血し最終的に 80 % の血液を PEG-Hb に置換したモデルを作製した．生理学的パラメータとして全身血圧，動静脈血中酸素分圧を測定した．分光測定には光源として回転円盤と 4 種のフィルターを組み合わせた USP430B (UNISOKU Co.) を用い 4 波長の吸光度から全ヘモグロビン量，ヘモグロビン酸素化率およびチトクロームの酸化率を求めた [3, 4]．血液置換後，呼吸酸素濃度 (F_{iO_2}) を徐々に減

少させ、その影響が上記の定量におよぼす影響を調べた。コントロール実験としてPBSで体内ヘモグロビンを等量にしたモデル (normal model) を作製した。

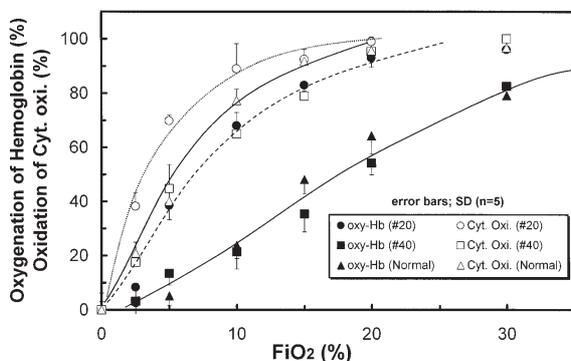


図2 血液置換後の呼吸酸素濃度変化に対する脳内ヘモグロビン酸素化率とチトクロームオキシダーゼ酸化率の変化。

3 結果と考察

図2にFiO₂に対する脳内ヘモグロビン酸素化率およびチトクロームオキシダーゼ酸化率を示した。#40とnormalラットがFiO₂ = 17%で約50%のヘモグロビンが脱酸素化されるのに対し、#20ではFiO₂ = 7%であった。静脈血中の酸素分圧と脳内ヘモグロビンの酸素化率のプロットは各PEG-Hbと赤血球の酸素解離曲線を反映していた(図略)。これは脳内ヘモグロビンは主に静脈血を反映するからである。チトクロームの還元においても#20は低酸素呼吸下において#40とnormalラットよりFiO₂の低い領域までチトクロームが酸化型を維持した。これは#20の解離曲線が他の2つより低圧側にシフトしているため動脈血の酸素飽和度が高く、酸素供給量に余裕があったためだと考えられる。ま

た、低酸素呼吸下では静脈血酸素分圧の低下(venous hypoxia)が起こり組織に酸素が渡されたと考えられる。

図3に脳内ヘモグロビンの酸素化度とチトクロームの酸化率の関係を示した。2種類のPEG-Hb(#20, #40)およびラット赤血球は同一の傾向を示し、酸素化ヘモグロビンが60%以下でチトクロームオキシダーゼは徐々に還元された。すなわち組織の酸化率は静脈血中のヘモグロビン酸素化度の“余裕”に依存しており、血液の酸素親和性には依存していない。これは組織内ミトコンドリアの酸素親和性がヘモグロビンより遙かに強いためである。

以上から、PEG-Hbによる血液交換実験においては酸素親和性が高い(P₅₀が低い)ヘモグロビンで置換されたラットが低酸素下で生き延びることが示唆された。この現象はラマやヒト胎児など低酸素下で生きる一部の哺乳動物で観察されるものである。ただし、循環器系の変化(心拍数、血圧等)を伴う運動中あるいは脱血ショック下においてはこの限りではない。

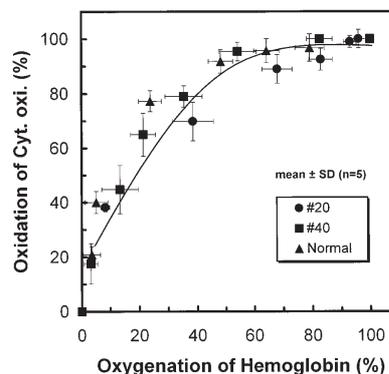


図3 脳内ヘモグロビン酸素化率とチトクロームオキシダーゼ酸化率の関係。

[参考文献]

- [1] Benesch RE, Benesch R, Renthall RD, Maeda N. *Biochemistry* 11: 3576 (1972).
- [2] Eaton JW, Skelton TD, Berger E. *Science* 183: 43 (1974).
- [3] Hazeki O, Tamura M. *Adv Exp Med Biol* 248: 63 (1989).
- [4] Hoshi Y, Hazeki O, Kakihana Y, Tamura M. *J Appl Physiol* 83(6): 1842 (1997).
- [5] Lenfant C, Torrance J, English E, Finch CA, Reynafarje C, Ramos J, Faura J. *J Clin Invest* 47: 2652 (1973).