

- Totally Synthetic Oxygen-Carrier under Physiological Conditions. *Chem Lett* **1992** : 1325-1328 (1992)
- 10) Komatsu T, Ando K, Kawai N, et al : O₂-Transport Albumin : A New Hybrid-Haemoprotein Incorporating Tetraphenylporphinatoiron(II) Derivative. *Chem Lett* **1995** : 813-814 (1995)
 - 11) Tsuchida E, Takeoka S : Stabilized Hemoglobin Vesicles. Artificial Red Cells, Materials, Performances and Clinical Study as Blood Substitutes, Tsuchida E (ed), pp35-64, John Wiley & Sons, Chichester (1995)
 - 12) Sakai H, Hamada K, Takeoka S, et al : Physical Properties of Hemoglobin Vesicles as Red Cell Substitutes. *Biotechnol Prog* **12** : 119-125 (1996)
 - 13) Sakai H, Takeoka S, Park SI, et al : Surface modification of hemoglobin vesicles with poly(ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem* **8** : 23-30 (1997)
 - 14) Tsuchida E, Komatsu T, Arai K, et al : Self-Assembled Lipidporphyrin Bilayer Vesicles. Microstructure and Dioxygen Binding in Aqueous Medium. *Langmuir* **11** : 1877-1884 (1995)
 - 15) Izumi Y, Sakai H, Hamada K, et al : Physiologic Responses to Exchange Transfusion with Hemoglobin Vesicles as an Artificial Oxygen Carrier in Anesthetized Rats : Changes in Mean Arterial Pressure and Renal Cortical Oxygen Tention. *Critical Care Medicine* **24** : 1869 (1996)
 - 16) Komatsu T, Muramatsu Y, Kuronuma A, et al : Oxygen Transporting Ability of Lipidheme Microspheres as a Totally Synthetic Red Cell Substitutes. *Artif Organs Today* **5** : 207-215 (1996)
 - 17) Sakai H, Tsai AG, Kerger H, et al : Subcutaneous Microvascular Responses to Hemodilution with Red Cell Substitute Consisting of Polyethyleneglycol-modified Vesicles Encapsulating Hemoglobin. *J Biomed Materials Res* **40** : 66-78 (1998)
 - 18) FDA Approves Artificial Blood for Use in Dogs, *FBR News*, 8, February (1998)

微小循環動態の観測と赤血球代替物の評価

Efficacy of Red Cell Substitutes in Microcirculation

酒井 宏水¹⁾, マルコス・インタグリエッタ²⁾, 土田 英俊¹⁾

Hiroki Sakai¹⁾, Marcos Intaglietta²⁾, Eishun Tsuchida¹⁾

1. 緒言

心臓から伸びる大動脈は末梢で分岐して細動脈になり、更に網状の毛細血管に分岐する。毛細血管は合流して細静脈となり、大静脈を経て心臓に戻る。顕微鏡でしか見ることができない微小血管中の血液循環を微小循環(Microcirculation)という。血液循環の主目的がホメオスタシス、つまり全身の各組織細胞に対する物質供給と代謝物の除去であるならば、微小循環こそ循環系で最も本質的な役割を担う部位である。今日ではあらゆる病態の根底に微小循環の障害が深く関わっていると認識されている。微小循環には形態と機能のいずれの面においても器官特異性があり、全てを一律に論じることはできない。しかしある一部位の直接観測によって得られる情報(血流速度、血管径、血球数、酸素分圧勾配、管壁透過性など)を数値化し、心拍量や血液ガスパラメータなど全身反応と連動させることで、薬物投与に対して急性から慢性の薬理効果や代謝過程も分析でき、人工血液全般の開発において不可欠の評価基準になりうる。

赤血球代替物の投与が他の薬物投与と異なる点は、血液の大半を置き換えるくらいの大量投与を前提としていることであり、生体にも与える影響は大きい。代替物は赤血球と同様に末梢組織に酸素を運ぶのであるから、全身反応と共に組織の血流動態(Microhemodynamics)を動的比較することは機能評価のために重要である。酸素結合と解離の速度は、形態上、赤血球よりも代替物のほうが迅速であることが物理化学的に明らかになっているにも拘わらず、体内では複雑な生理作用のため酸素輸送能が赤血球と同じにはならない場合が多い。この意味でも、末梢組織で何が起きているのか、血球成分の鮮明画像から正確に情報を得ることが求められる。

本報では、そのような観点からまず赤血球代替物を投与した場合の微小循環動態について報告例をまとめた。また、微小循環動態を決定しうる部位として、毛細血管に入る手前の抵抗血管(小動脈、細動脈)の動態(収縮、弛緩)が重要である。抵抗血管収縮因子を整理し、赤血球代替物の設計に際し重要と思われる点について述べる。

2. 微小循環動態の観測法

ヒトの身体の微小循環を測定する方法としては、近赤外線を利用するレーザードップラー血流計が良く知られている^{1,2)}。プローブを皮膚または臓器表面に密着させ、その部位の血流を測定する。血管系を直接見ることができない定性的手法であるが、欧州では診断用に比較的広く用いられている。また、Capillaroscopy(毛細管顕微鏡検査)では、唇、または爪根部の爪溝に近い部位を顕微鏡観察すると血球の流れが観測でき、末梢循環障害(播種性血管閉塞症、糖尿病)の診断に使われる³⁾。

動物実験系では、毛細管だけでなく細動静脈も観測するために、微小循環動態の観測部位としては主に齧歯類の腸間膜や骨格筋、頬袋、提睾筋、耳、皮弁など当然の事ながら麻酔と侵襲を伴う測定が一般的で、脳(cranial window)や摘出臓器、肺表面、眼底の毛細管などを観測する方法も良く知られている。しかし麻酔は循環器系の神経性調節に変化をもたらす。無麻酔でしかも侵襲を与えない方法としては、コウモリの翼を透過光で顕微鏡観察する特異な例があるが⁴⁾、条件に恵まれた場合の話である。一方で、齧歯類の背部皮膚に直径1cmの硝子窓を取りつける方法が今のところ最も日常的に実験できる無麻酔の手法と思われる⁵⁻⁷⁾。硝子窓の取り付け自体は侵襲を伴うが、数日間での影響が無くなる。また、実験は無麻酔下に行う。

そこでIntagliettaらが開発した微小循環動態の鮮明画像を得るための手法の一つを紹介する。Hamsterは皮膚に弾力性があり、つり上げても余裕がある上に皮膚が薄いため、片側の皮膚を切り抜いて取りつけた硝子窓を通して透過光での実体顕微鏡観測が可能である⁸⁾(Fig.1)。細動脈、細静脈および毛細管中を流れる血球が極めて鮮明に観測できる(最近では小動脈と小静脈も観測可能となった(後述))。頸動静脈に挿管し、これを頸部皮下経路で背部から取り出し、頸動脈からの採血と血圧測定、頸静脈からの試料投与が可能となる。微小循環動態はCCDカメラ搭載顕微鏡にて解析する。赤血球速度、血管径変動、血流速度、有効毛細管密度、血管内及び組織酸素分圧、そのほか毛細管壁透過性、白血球接着、酸素輸送のメカニズム解析など、全身反応と対応させて種々の情報を解析することができる¹⁰⁻¹³⁾(Fig.2)。

1)早稲田大学理工学総合研究センター高分子化学研究室, Department of Polymer Chemistry, Advanced Research Institute, Waseda University, 2)カリフォルニア大学サンディエゴ校生体工学部, Department of Bioengineering, University of California, San Diego.

早稲田大学理工学総合研究センター高分子化学研究室, 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1, Department of Polymer Chemistry, Advanced Research Institute, Waseda University, 3-4-1 Ohkubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan.
論文受付1998年7月9日。

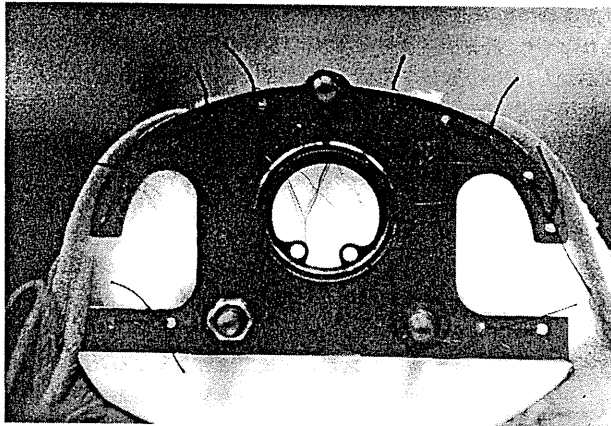


Fig.1 Dorsal skinfold chamber in a Syrian golden hamster used to visualize microvessels in the subcutaneous tissue. A pair of largest vessels are small artery (diameter, ca. 150 μm) and small vein (350 μm).

具体的に測定法を述べると、血管径は画像剪断法(Digital video image shearing monitor)にて、赤血球速度はフォトダイオード-cross-correlation法によって赤血球通過によって変化するコントラスト(明暗)をもとに測定、血流速度(Q, nL/s)は、血管径(D)と赤血球流速(V)から式: $Q=V/R_v \cdot \pi \cdot (D/2)^2$ より算出。 R_v は血管中心の血流速度と血管全体の血流速度の比である。有効毛細管密度(Functional capillary density)は、選定視野の毛細管数を数え前値とし、操作後赤血球が通過している毛細管数を前値に対する相対値として算出する。血管内、および組織酸素分圧 pO_2 の測定は、燐光色素(bovine albumin/Pd-meso-tetra(4-carboxyphenyl) porphyrin複合体)の燐光寿命の pO_2 依存性を利用する。静脈内投与した燐光色素は時間とともに組織細胞間質にまで浸透する。燐光はXeパルス光(30 Hz)により励起、 pO_2 測定部位はスリットで自在に制限する。燐光はフォトマルチplierにて検出、消光曲線を一次指数関数として外挿、Stern-Volmer式から pO_2 を算出する。この方法は、赤血球代替物などの投与物の評価だけでなく、微小循環動態の生理学的実験や、腫瘍組織の循環動態¹⁴⁾の観測などにも使用されている。

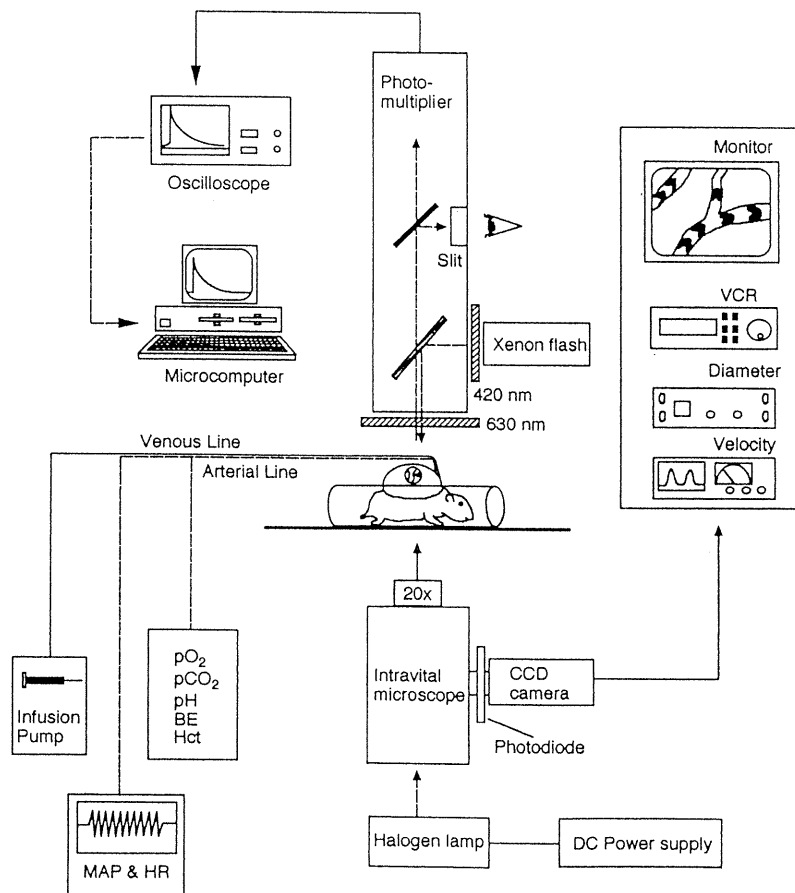


Fig.2 Schematic diagram of a system used to measure hemodynamic parameters and oxygen tensions in microcirculation.

3. 赤血球代替物の微小循環動態

3.1. Hb小胞体

筆者らは上述のhamster modelを用いpolyoxyethylene(POE)で表面を修飾したセル型のHb小胞体(Hb=10 g/dL, P_{50} =32 Torr, in 5% albumin)の80%交換輸血を実施, 投与の効果について顕微鏡下, 血管形状, 血管内および組織酸素分圧, 血流動態を解析し, 非修飾型のHb小胞体系と比較した³³⁾. 血圧, 心拍数, 血液ガス全てにおいて両群共に安定した値を示し, 比較のalbumin投与群よりも勝っていた. POE修飾系は血管内がHbの吸収で全て暗く写っていることから, 小胞体は凝集しておらず, 血漿相に分散していた. 一方, 未修飾群は, 毛細管内および細静脈内で凝集体が観測された(Fig.3). 特に細静脈内など流速の遅い部位では, 凝集体の大きな塊が確認された. 血流速度, 有効毛細管密度, 酸素分圧共にPOE修飾群が非修飾群に比較して極めて高い値を推移した. 従ってPOE修飾による凝集抑制が皮下微小循環に不可欠である. しかし, POE修飾群でも交換前に比較して血液流量が徐々に低下し, 酸素分圧も劣っていた. 本実験では細動脈(径60 μ m以下)の血管収縮は特に認められないことから, 観測組織の血流はもっと上流の抵抗血管(後述)などで支配されていることを示唆した.

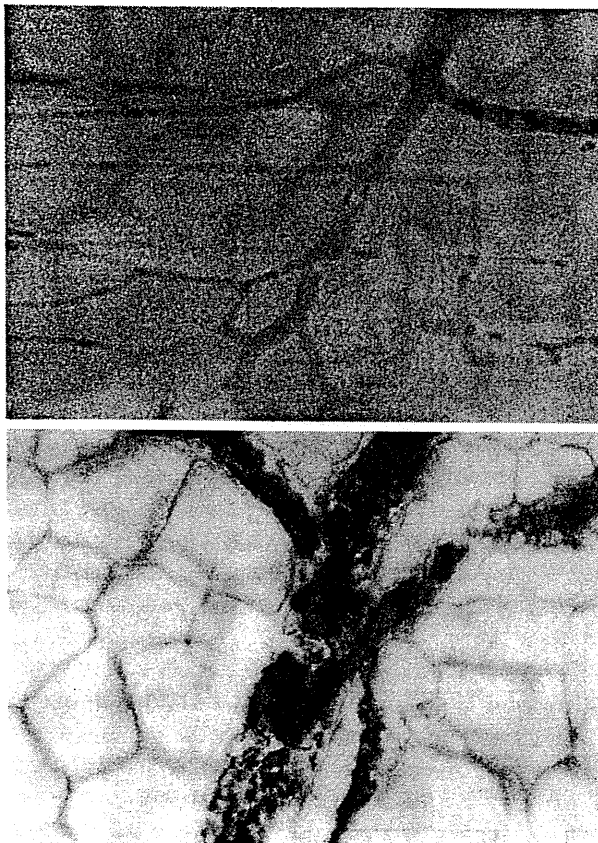


Fig.3 Micrographs of microvasculature after 80% exchange with POE-HbV/HSA and unmodified HbV/HSA. (top) Microvasculature are blackened owing to the homogeneous distribution of POE-HbV in the plasma phase. (bottom) The aggregates of HbV forms blocks in collecting venules.

ラット摘出肝臓灌流中の微小循環の動態は, 末松らによって検討された^{34,35)}. 肝細胞ミトコンドリア内NADHの蛍光強度(450nm)の観測から, Hb小胞体が組織を酸素化していることが確認された. 肝臓中ではhemoxygenaseが産生する一酸化炭素(CO)が, 血管弛緩因子として血管内壁のIto細胞に作用する. HbAoの投与では, Disse腔にHbが侵入しHbの代謝亢進によるbilirubin排泄の亢進, またCOが血中Hbに捕捉され, 血管抵抗が20%増大し, 同時に類洞の不連続的狭小化と流動停止領域が確認された. 一方でセル型のHb小胞体では, 粒径が0.25 μ mと大きいためDisse腔に侵入せず, そのようなことが起こらない.

米国海軍研究所のRudolphらは, 兎眼球脈絡膜の毛細管内血流動態を蛍光色素投与による血管造影法で解析している. 陸軍研究所の試料 α XLHbでは血流が低下するのに対し, それをリボソームで包んだLEH型では, 血流が維持され, 有効毛細管密度が正常値を示した. これは血管内皮由来弛緩因子の捕捉に関する結果と考えられ, カプセル化の有用性が明らかである. しかし本実験法では, 組織の形態学上の問題のため, 毛細管が見えるのみで, 上流の細動脈や小動脈が観測できず, 血流低下が何によるのか説明に欠ける.

3.2. 非セル型ヘモグロビン

現在欧米では7社が臨床試験を進めている段階であるが, 微小循環を詳細に検討している例は意外と少ない. 直接観測している報告例, あるいは, 間接的に微小循環に関する知見を得ている報告例も含め以下に紹介する.

(a) α 鎖間架橋Hb (Baxter, 米国陸軍研究所)

Hb分子内の α サブユニット間をbis(3, 5-dibromosalicyl)fumarate (DBBF)で架橋した分子内架橋Hbは, 当初Baxter Healthcare社とLetterman 陸軍研究所との共同で応用研究が進められた. しかしその後両者は分断し, 陸軍研究所の α XLHbとBaxterのDCLHb (HemAssist)が共存している.

米国陸軍研究所の α XLHbの微小循環動態観測は, Intagliettaらが上述の無麻酔ハムスターモデルで最初の実施している^{15,16)}. 高度交換輸血試験では, 交換率の上昇につれ, 有効毛細管密度および毛細管内赤血球速度が低下し, 対照のdextranと比較しても有意に低い値を示した. これについて考えられる理由は, 血管内皮由来弛緩因子(NO)の捕捉による血流の低下だけでなく, 非セル型のHb溶液は酸素放出速度が速いため, 細動脈で酸素感受性の自動調節機構が働いた, 或いは低粘度溶液との大量交換で血管壁の剪断応力が低下してNOを含むEDRF産出量が減少し血管収縮が起こり下流の血流が低下した(後述), ものと推論している.

BaxterのDCLHb(HemAssist)に関しては, Messmer(独)らが同様の無麻酔ハムスターモデルで検討している¹⁷⁻¹⁹⁾. 少量の投与(5 mL/kg)で1時間以上の血圧上昇と心拍数の低下, 酸素電極で測定した組織酸素分圧は僅かな低下を認めた. 数分間の細動脈(内径41 μ m)の収縮を認めているが, これが数時間の血圧上昇に寄与しているとは考えにくい. 40%交換輸血後は, 血圧上昇と投与30分後に血流の増大, 組織酸素分圧の僅かな低下, 細静脈内の接着白血球数の増大を示し活性化されているものと考えられる. 出血ショックモデルの蘇生試験では, DCLHb投与群は細動静脈径に

変化は無く、血流速度、組織酸素分圧も自己血投与群には劣るものの、デキストラン群よりは高い値まで回復した。

(b) glutaraldehyde重合-牛Hb (Biopure)

Biopure社が開発したglutaraldehyde重合牛Hbの溶液²⁰⁾(Hb=13 g/dl, P_{50} =30~35 mmHg, oncotic pressure=25~30 mmHg)を用いた高度交換輸血(Hct<4%)では、羊で血圧上昇および肺血管抵抗の増加が認められ²¹⁾、犬では血圧上昇は僅かであるが心拍出量の低下と末梢血管抵抗が増大する²²⁾。ラット高度交換輸血(Hct<3%)および出血ショック蘇生モデルでは^{23, 24)}、脳内灌流速度の増大により酸素消費量が維持されるが、これは全身末梢血管抵抗が増大し、脳への血液が増大したものと考えられる。また摘出腎臓の灌流試験では²⁵⁾血流および形態を維持し、何等副作用を認めていない。しかし脳虚血モデル兔への投与では血管収縮の為に逆に梗塞部位が拡大するとも報告され²⁶⁾、効果が疑問視されている。臨床試験では、腹部大動脈手術前の血液希釈に用いた場合(3mL/kg)²⁷⁾、血圧と末梢血管抵抗の増大、心拍出量と酸素運搬量/消費量の低下など良い結果が得られていない。獣医学領域でも人工血液は注目されており²⁸⁾、極く最近になって獣医学領域の使用に限りFDAより許可され、1998年に商品名Oxyglobinとして13g/dL濃度の溶液(二年間棚置き保存可能)の販売を開始した²⁹⁾。

(c) polyoxyethylene結合ヘモグロビン (味の素-Apex)

味の素のpolyoxyethylene結合ヘモグロビン(PHP, 現在はApexが開発)に関しては、西、木田が各臓器灌流試験結果の詳細を本誌にまとめているので、そちらを参照して頂きたい³⁰⁾。一酸化窒素(NO)は血管内皮由来弛緩因子(EDRF)以外に、末梢神経の伝達物質としての役割も知られている。PHP投与による血圧上昇の原因は、EDRFとしてのNO捕捉だけでなく、血管調節神経系への影響も検討する必要があるとしている。

これとは別に、Mackenzieらは出血ショック犬モデルで投与直後に肺動脈圧上昇を示し³¹⁾、同時に赤血球が凝集することを認めている。赤血球凝集は、末梢循環の低下を引き起こすと推察している³²⁾。筆者らが合成したPOE結合Hb(POE鎖の結合様式が多少異なる)も、血液と混合したときに赤血球凝集惹起を認めているが、これはPOE鎖の高い排除体積効果によると考えられる。混合比が高いときにこの現象が顕著であることから、投与量に限界があると思われる。

その他、Somatogen社やBucciらが開発している分子内架橋Hbの投与においても、血圧上昇が認められ、臓器により血流分布が変化すること(肝、腎、腸は低下、脳と心臓は増加)がマイクロファイバー法などによって明らかとされている。しかしどの実験系においても血管系のどの部位が作用して血流を制御しているのか、具体的に示した例が無い。

4. 抵抗血管の重要性

微小循環に血液が到達する前の小動脈および細動脈で血流血圧の半分以上が低下する(Fig.4)。この血管は抵抗血管(resistance vessels)と呼ばれ^{36, 37)}、壁が比較的厚く平滑筋が発達し血管運動神経支配も豊富である。血管抵抗はアドレナリン作動性血管収縮、

平滑筋で直接作用する代謝性、オータコイド性収縮等によって制御され³⁸⁻⁴⁰⁾、血管内径が変化して血流血圧が調節されるとする機序があり、下流の微小循環動態を支配する極めて重要な部位である。小静脈或いは細静脈は組織を循環してきた血液の集約だけでなく血液貯蔵の役割を果たし、容量血管(capacitive vessel)とも呼ばれる。太さの異なるこれら微小血管が、アドレナリン作動薬、pH, EDRF, 代謝条件に対して異なった反応を示し、特に抵抗血管でその感受性が強いことが知られている⁴¹⁻⁴⁴⁾。抵抗血管の部位が比較的体内の奥深くにあり、また中途半端な大きさであるため、これらの知見は、microradiographyや摘出血管を用いるなど、麻酔と侵襲を伴う実験から得られたものである。当然、過去の赤血球代替物を投与後の微小循環動態の研究で抵抗血管径と血流を同時に無麻酔下、直接観測している例はまだ無かった。

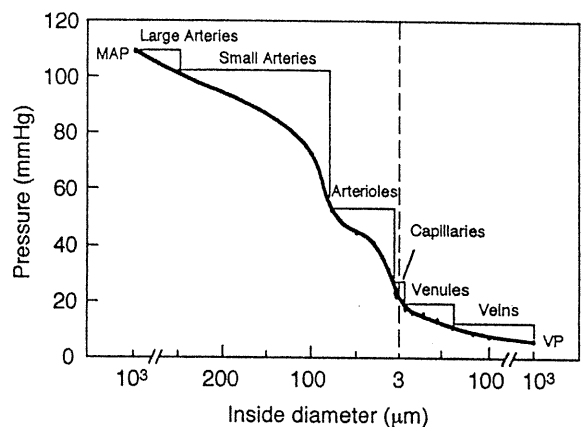


Fig.4 Pressure drop across the vascular system in the hamster cheek pouch. MAP, mean arterial pressure; VP, venous pressure (cited from Davis et al, *Am. J. Physiol.* 250, H291, 1986)

上述のhamster背部皮下微小循環動態の観測法は、無麻酔下非侵襲条件下で実体顕微鏡観察ができる最適の方法である³⁷⁾。硝子窓枠は通常太い血管を避けて装填していたため、細動脈径はせいぜい60μmであった^{18, 33, 45)}。赤血球代替物を投与した場合に、観測範囲で血管径の変化があまり無くても血流が著しく低下することがあり、観測範囲外のより大きな血管の動態が重要と考えられた。そこで窓枠をこの太い血管上に装填し、小動脈(A_0 , 径, $156 \pm 23 \mu\text{m}$)と小静脈(V_0 , $365 \pm 64 \mu\text{m}$)の観察を可能とした⁴⁶⁾(Fig.1)。これらの血管は、人体のcircumflexa scapulaの支流に相当する。皮膚が薄く、照射光の透過性が高いため、血管径だけでなくフォトダイオード法による血流測定も可能なことが本法の最大の利点である。

まず8%濃度ヒト血漿アルブミン溶液(HSA)で80%の血液希釈を行ったところ、血流速度は一樣に低下し続け、前値の20%以下となった。各血管($A_{0,1,2,3,4}$, $V_{C,L,0}$)の変動は部位によって異なり、 A_0 , V_0 はそれぞれ約35%、30%も収縮したのに対して、逆に細動脈は弛緩する傾向が認められた(Fig.5)。 A_0 の著しい収縮は血圧の維持に、また容量血管である V_0 の収縮は、皮膚から主要臓器に血

液を再分配させることに寄与していると考えられる。細動脈は弛緩することで血流を促進しようとするが、上流の血管収縮による供給量低下のため必要量を満たすことができず、完全に低酸素状態に陥った。洗浄赤血球をHSAに分散させたRBC/HSA群では、そのような血管収縮の傾向は認められず、血流は維持され高い組織酸素分圧を示した。二つの溶液の物理的相違は酸素含有量だけでなく、粘度にもある。血管壁に作用するずり応力は粘度に影響される。HSAが血管内皮弛緩因子産生量を低下させ、血管収縮させたとも考えられる(後述)。この簡単な実験から明らかなように、抵抗血管の変動が顕著であり赤血球代替物の評価に極めて重要な意味を示すと考えられる。

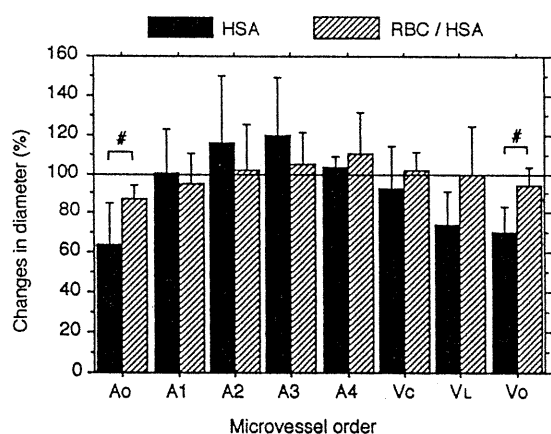


Fig.5 Heterogeneous diameter changes of microvasculature in conscious hamster dorsal skinfold preparation after 80% hemodilution with 8% human serum albumin (HSA) and washed RBCs suspended in HSA (RBC/HSA) with hemoglobin concentration of 10%. Baseline diameters (in μm); A_0 (ca. 150); A_1 (50); A_2 (20); A_3 (10); A_4 (8); V_c (30); V_L (80); V_0 (350). Values are mean \pm standard deviation. # significant difference ($p < 0.05$).

非セル型赤血球代替物である修飾Hb溶液を投与した場合の代表的な副作用は、血圧の上昇である^{47,48}。修飾Hb溶液の血管内皮由来弛緩因子：NOに対する親和性が著しく高いためこれを捕捉し、弛緩抑制するとする説が最も有力である⁴⁹。摘出血管の収縮に関しては報告例があるが、意外にも無麻酔下、具体的に血管収縮部位を示している報告はなかった。我々の試験例では、独自に合成した $\alpha\alpha$ -XLHb溶液をhamsterに少量投与(350 mg/kg)した直後から血圧上昇が認められた(Fig.6)。また上述の小動脈(径, 150 μm)が20%程度の著しい収縮を示した。その下流の細動脈(径, 60 μm 以下)には径の顕著な変化は認められなかった。対照のアルブミン投与ではこのような反応は全く見られなかった。

予期した通り、この抵抗血管が血圧と下流の血流制御に影響を与えていることが明らかとされた。現在、筆者らはこの抵抗血管に注目し、構造と物性の異なる各種赤血球代替物を投与した場合の動態を比較検討している。

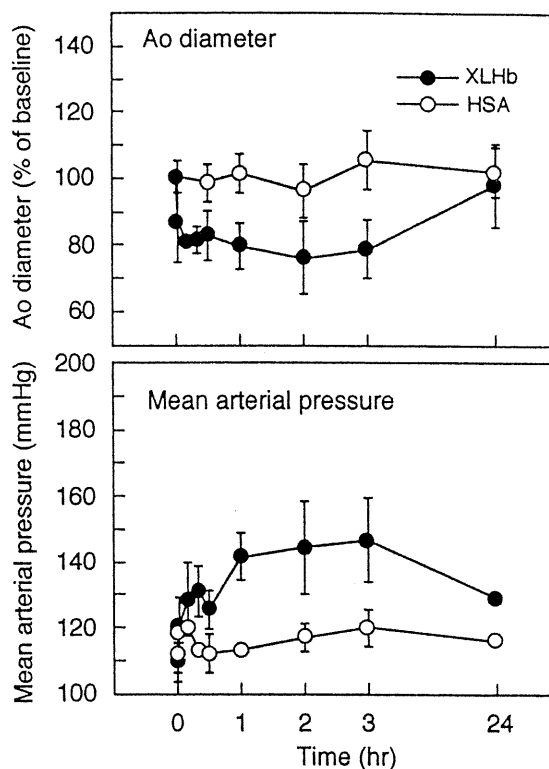


Fig.6 Changes of A_0 diameter and mean arterial pressure after 10% volume toploading of intramolecular crosslinked hemoglobin (5%-XLHb) and albumin (5%-HSA).

5. 血管収縮のメカニズム

5.1. 血管内皮由来弛緩因子：一酸化窒素捕捉による血管収縮とその他の要因

NOはHbに対する親和性が極めて高く、COの1500倍、 O_2 の30万倍である⁵⁰。OxyHbはNOが存在すると直ちに結合してHbNOとなり、すぐ酸化されてMetHbとなる。修飾Hbの投与に際し上述の血圧異常上昇や^{47,48}、血管床への血小板の沈着などの副作用⁵¹が認められている。修飾Hb(特に分子内架橋Hb)は赤血球と比較すると極めて小さいので血管内平滑筋近傍に接近でき、NOを捕捉し弛緩機能が低下する。このとき、血小板内のグアニレートサイクラーゼの活性も低下し血小板凝集が促進される。血管収縮は末梢循環を阻害し、十分量の酸素が組織へ供給されなくなる。

Hbの毛細管内皮細胞透過性は、アルブミンに比較して100倍大きい。従って投与した架橋Hbは次第に内腔から血管外に漏出する。NO合成酵素は血管内皮細胞だけでなく、神経系や筋肉系など体の至る部位に存在するので、漏出HbがNOを捕捉して他の副作用を示す可能性を否定できない。事実、臨床試験でも明らかとされた修飾Hb投与後の食道括約筋の蠕動運動の異常⁵²⁻⁵⁴、腸管平滑筋の異常は、NO捕捉に関連していると考えられている。一方でNO捕捉による血圧上昇の性質を逆に利用し、敗血症患者に見られる過剰NO産生による血圧低下の際、NO捕捉剤として修飾

Hbを投与して昇圧する方法^{55,56)}, 血液透析や大動脈手術の際は血圧安定化剤に用いることが検討されているが^{57,58)}, その効果については疑問視もされている。

一方、直径約0.2~0.5 μ mのカプセル構造をしているHb小胞体では血管外漏出はなくまた平滑筋まで接近できずNO結合反応は抑制され、血圧の異常上昇は起こらない。実際、兎大動脈断片を用いたin vitro試験では、架橋Hbに比較して活性度が100分の1程度と低く、赤血球と同等であることが仲井、Rudolphらによって確認されている^{59,60)}。

α 架橋Hb(XLHb)による血管収縮と血圧上昇が、EDRFとしてのNO捕捉反応に依るだけでなく、アドレナリンやendothelinが関与している事が報告された⁶¹⁻⁶³⁾。XLHbの昇圧効果は、中枢神経系ではなく末梢血管系で引き起こされている。XLHbは、norepinephrine, phenylephrine, clonidineの昇圧効果を強める効果があり、このことは末梢血管系の α -受容体の感受性を増強していることを示している。XLHbの昇圧効果は、 α_1 遮断薬のprazosin, α_2 遮断薬のyohimbine投与で低下する。また、proendothelinがendothelinになる反応を抑制するphosphoramidonの投与でも昇圧効果が低下する。これらのレセプターの詳細な部位や機構についてはまだ検討が必要と思われるが、一般的に抵抗血管の部位にアドレナリンレセプターが比較的多く存在していることが知られているので⁶⁴⁾, この部位が下流の微小循環を支配していると考えられる。Hbのグロビン鎖の断片(peptide)が昇圧効果を示すとも報告され⁶⁵⁾, 純度や代謝過程も影響すると考えられる。

ここ数年、赤血球代替物を投与した際の血管収縮の原因について他にも幾つかの説が報告され、単純なNO-Hb捕捉反応だけではもはや説明ができなくなってきている。以下に血管収縮とそれによる微小循環の悪化を起し得る要因を抵抗血管との関連から議論した。理想とする赤血球代替物の分子設計に役立てればと思う。

5.2. 酸素依存性の血管収縮

血液循環量は、組織の酸素代謝に必要な酸素を十分量供給するように維持されている。血液中の酸素溶解量が増大すると、血管収縮や有効毛細管密度が低下する⁶⁶⁻⁷⁰⁾。この血管収縮は、血管内皮由来弛緩因子であるprostacyclin産生量が低下したことによっても考えられている。最近、内皮酸素センサー系の存在が明らかにされた。cytochrome P450酵素がアラキドン酸カスケードを活性化させ、収縮剤であるヒドロキシアラキドン酸を産生する⁷¹⁾。組織への酸素供給が過剰になるとそれを抑制しようとして血管収縮により血液供給量を低下させる。

非セル型修飾Hb溶液またはセル型のHb小胞体からの酸素放出は、赤血球に比較して極めて迅速である。このことは、窒素置換した亜ニチオン酸溶液と高速混合後のHbのオキシ体からデオキシ体に変化する時のスペクトルシフトの測定(stopped-flow法)から明らかである(Fig.7)⁷²⁾。この速度の相違は形態の相違に由来する。赤血球の場合は酸素分子は粘稠なHb溶液内を拡散し、更に酸素溶解度の低い血漿相の障壁を拡散して目的の血管壁に到達する⁷³⁾。一方、血漿相に均一に分散したHb溶液の場合、血漿相の障壁は無いため、酸素を迅速に放出する。Hellumsらも人工血管を作成してこのことを確認している⁸⁾。Hb小胞体は赤血球と同様の

セル型構造ではあるが、粒径が小さく(250 nm)比較的均一分散しているため酸素放出は速い。酸素親和度が低い(P_{50} が大きい)ほど酸素放出は速いので、全ての修飾HbはストローマフリーHbよりも速いという事になる。このような赤血球よりも速い酸素放出は利点のように思われるが、酸素の促進輸送に対して血管内皮は酸素過多と判断して血管収縮を招来するという説が有力視されている⁷⁴⁻⁷⁶⁾。

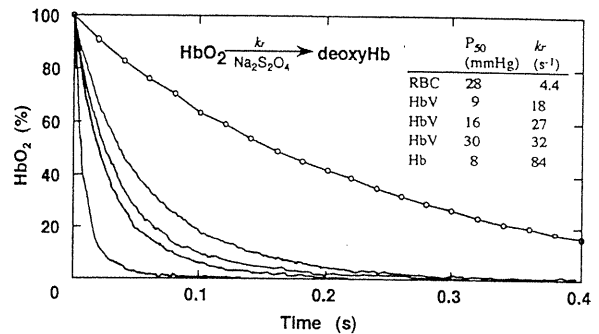


Fig.7 Time courses of oxygen release by RBC, Hb-vesicles(HbVs), and HbA0, measured with a stopped-flow method, mixing an air equilibrated Hb containing sample (Hb, 10 μ M) and deoxygenated sodium dithionite solution (50 mM), r.t., in 50 mM phosphate buffered saline (pH 7.4). From top to bottom: RBC, HbV (P_{50} =9, 16, and 30 mmHg), and HbA0. The curve of human RBC was cited from Vandegriff & Olson (J. Biol. Chem. 259: 12619,1984.).

Hbの酸素放出速度以外に、酸素結合解離平衡反応に基づいた血管収縮の理論もある。赤血球膜の透過性を上げる工夫により inositol hexaphosphateなどのアロステリック因子を内部に導入すると、赤血球内のHb酸素親和度が低下、酸素結合解離曲線が右側シフトする。結果として酸素飽和度のA-V較差を増大させ酸素放出量を増大させるとする理論である。この右側シフトさせた赤血球の投与試験では、血圧が一定のもと心拍出量が低下、酸素供給量の過剰のために血管収縮し末梢血管抵抗が増大した⁷⁷⁻⁷⁹⁾。この場合組織酸素供給は正常に保たれており、末梢血管抵抗の増大は血流の低下以外、何等不都合を意味している訳ではない。酸素放出が迅速な赤血球代替物を投与した時に過剰反応となれば問題である。

低酸素親和度Hb小胞体(P_{50} =53 mmHg)を用いて交換輸血を行い、hamster背部下皮微小循環の測定を行ったところ、直径50 μ m以下の細動脈が多少弛緩するにも拘わらず、血流は低下した。しかしながら、上流の直径150 μ mの動脈は著しく収縮した。この小動脈が下流の微小循環を制御していることが明らかである。酸素結合解離曲線をhamster血液と比較すると、この小動脈部分の通常の酸素分圧60 mmHgにおいて、Hb小胞体の曲線の傾きのほうが赤血球の場合よりも大きい。従ってこの部位でHb小胞体のほうが赤血球よりも酸素を多量に放出しやすいことになり、血管収縮を引き起こしたとも考えられる。一方で、高酸素親和度Hb小

胞体 ($P_{50}=16 \text{ mmHg}$) は高い血流を維持する傾向を示した⁷²⁾。

これらの結果は、酸素運搬体を設計する上で重要な事を示している。赤血球は実は酸素放出、結合が極めて非効率になるような巨大粒子構造をしている。そして赤血球は微小循環系に到達するまでは酸素を放出しないように酸素結合解離曲線が調節されている。赤血球代替物の場合、右側シフトは必ずしも微小循環を維持して組織を十分に酸素化するわけではない。各々の赤血球代替物に各々の症例に対応した最適の酸素親和度が存在すると思われる。赤血球のような巨大な粒子にしない限り酸素放出速度を赤血球と同等にすることは難かしいが、最近、合成ヘムの酸素結合部位にキャップを取り付けることで酸素放出を遅くすることが試されており、興味深い⁸⁰⁾。

5.3. 血管壁上の剪断応力と血管内皮弛緩因子

血液の流れそれ自体が血管弛緩を導く信号である⁸¹⁾。血液流速の増大につれ、血管径が大きくなることが多く報告されている⁸²⁾。この血流依存の血管弛緩は内皮依存性で、NO或いはprostacyclinにより誘導される^{83, 84)}。血管内皮上での剪断応力が血管を弛緩させていることが報告された。剪断応力は簡単に $8 \cdot \eta \cdot V_m / D$ として表せる。ここで V_m は平均赤血球速度、 η は粘度、 D は血管径を示す。抵抗血管の部位で特に剪断応力が高く、EDRF活性が高いことがGriffithらにより報告されている⁸⁵⁾。通常の代用血漿での血液希釈は血液粘度を低下させ、結果的に剪断応力が低下する。例えば50%血液希釈をすると粘度は約半分になるが、血流速度は2倍にはならない。剪断応力を維持するには、粘度を維持しなければならない。高分子量デキストランを併用して粘度を高めることにより、末梢循環が維持されたことがIntagliettaらによって確認された^{86, 87)}。血液よりも粘度の低い非セル型の修飾Hb溶液は、低剪断応力のために血管収縮を引き起こす可能性がある⁸⁸⁾。粘度を血液と同等にするのであれば、高分子量Hb均一溶液系、或いはHb小胞体などの懸濁溶液系となる。しかし高分子量体は赤血球凝集を引き起こす可能性もあり、注意を要する。

5.4. 赤血球から放出されるATPが末梢血流を制御する

ヒト赤血球は、僅かながらadenosine 5'-triphosphate(ATP)を放出する。ATPは、末梢循環系の内皮表面のレセプターに結合すると、強力な血管弛緩剤であるNOとprostacyclinを放出する⁸⁹⁾。Ellsworthらは、赤血球のATPの産生量が低 P_{O_2} 及び低pHの条件で増大することを明らかにした⁹⁰⁾。この環境は、酸素輸送が不十分な部位、或いは通常末梢部位に相当する。直径 $140 \pm 60 \mu\text{m}$ の抵抗血管に相当する小動脈内にATPを局所投与すると血管弛緩と下流への血流量の増大を認めている。私見では、ATPを静脈内投与した場合、著しい低血圧が認められたので、局所的な作用が必要と思われる。赤血球はATPを放出して自ら進む道を作っているかのようである。Hbを用いた赤血球代替物の殆どの場合、赤血球からHbを精製する段階で解糖系を含む全酵素系を除去している。従って血管弛緩剤であるATPの放出量は血液交換率が高くなるに連れて低下する。Hb精製の過程で敢えて酵素系を除外しないようにすれば⁹¹⁾、Met Hb還元酵素系が機能するだけでなく、同様に血管弛緩剤ATP放出を維持できる可能性がある。

Feolaらは、ATPで分子内架橋した後、o-adenosineで分子間結合

させた修飾Hbを開発した⁹²⁾。従来のglutaraldehydeやDBBF架橋型と比較して投与後の炎症反応(過酸化水素、過酸化脂質、Anaphylatoxin, thromboxane産生量)と腎毒性が軽減された⁹³⁾。ラット出血ショックモデル蘇生試験では、血圧上昇も認められず、返血した場合よりも組織酸素分圧が高い⁹⁴⁾。架橋剤のATP, adenosineが末梢で血管弛緩剤として働き、末梢循環を促進しているためと推論している。

5.5. 補体活性の影響

Anaphylatoxinは血液中に異物が侵入したり炎症反応が起こったときに補体が活性化されて産生される、薬理活性ペプチドである。第3補体が分解してC3aが産生されると、平滑筋が収縮したり、マスト細胞からhistamineが放出されて毛細管透過性が亢進する。C3aまたはhistamineを投与すると、両者とも細動脈を収縮させることがhamsterで確かめられている⁹⁵⁾。別のanaphylatoxin: C5aは、血小板を活性化させて血管収縮作用があるthromboxane A_2 放出を促進する。

非セル型の修飾Hb溶液では、アナフィラキシー様反応が過去に多数報告されたが、これは赤血球膜成分や内毒素などが残存して精製が不十分のときに起こったものと現在では理解されている⁹⁶⁾。Fluosol-DAや、臨床試験中の癌治療用liposome製剤の投与後に、アナフィラキシー様反応による血小板数減少とthromboxane A_2 産生亢進が認められ^{97, 98)}、Hb小胞体が補体活性を示すことも米国海軍研究所から報告された⁹⁹⁻¹⁰¹⁾。¹¹¹Inラジオラベルした血小板の動態は、Hb小胞体投与後に肺と肝臓に一過性に集簇し肺動脈圧と体動脈圧の上昇の原因となったあと、血中に戻る¹⁰²⁾。末梢血管抵抗が増大したことから、血管収縮の可能性もある。補体活性を抑制するには、高純度物質を用いること、抗炎症剤のprednisolone, indomethacin、或いは補体受容体を投与することが方法として挙げられる¹⁰³⁾。膜成分のリン脂質親水部に抗リン脂質抗体が結合することが補体活性の原因であることも米国海軍研究所から報告されているので¹⁰⁴⁾、Hb小胞体表面をpolyoxyethylene(POE)で覆うのも、血漿蛋白との相互作用を低下させて補体活性を低減させる有効な方法と考えられる。POEがHb小胞体分散液のレオロジー特性に寄与していることは早稲田グループとテルモ社によって示されている。テルモ社のネオレッドセルをヒト血漿と混合したときのanaphylatoxin測定から、補体活性が無いことが報告されている¹⁰⁵⁾。しかし補体活性は動物種によって異なること、個人差があることなどもあり、多角的に検討する必要がある。補体活性を呈しやすいラットでPOEにより補体活性低減がみられたことについては、先般の第7回国際血液代替物学会において米国海軍研究所グループ(Dr. Phillip)から報告があった。

5.6. 活性酸素種と血管活性

血管内皮細胞はxanthine dehydrogenase/oxidaseを有し、活性酸素種を放出するが¹⁰⁶⁾、内皮細胞内のsuperoxide dismutaseやcatalase等によって失活される。細胞内の活性酸素種濃度が低いときにはcyclooxygenaseが活性化され、それにより生じたsuperoxide(O_2^-)が内皮からのprostacyclin産生に関与し、血管弛緩を誘発することが幾つかの組織で確認されている。しかし、活性酸素種の濃度が高

すぎるとNOが失活, またアラキドン酸カスケードが抑制されて prostacyclin産生量が低下する. 更にはこれらの酵素系を破壊することがあるが, thromboxane A₂ synthetase のみ耐性を示し, 全体的に血管収縮の方向に傾く^{107, 108}. 同時に活性酸素種は過酸化物を生じ, これも酵素系に悪影響を与える. 通常, prostaglandin(弛緩剤)とthromboxane A₂(収縮剤)の産生量の間, またNOと活性酸素種の産生量の間平衡関係が成り立っており, 末梢の血液循環を制御している.

Hb利用赤血球代替物の共通の課題として, 血流中での比較的速度いメト化の問題が挙げられる. OxyHbは生理条件下徐々にメト化する. 酸素親和度が低い(P₅₀が大きい)ほどメト化が速くなるというジレンマがある. この際ヘム中心鉄から電子が一つ酸素に移動し, superoxide(O₂⁻)を生起する. これが更に不均化反応或いは superoxide dismutaseによって過酸化水素(H₂O₂)を生起する. Hbのサブユニット4個の一部が酸素化しているとき, つまり末梢や静脈を循環中にMetHb生成が促進される^{109, 110}. MetHbが更に変性するとヘムや鉄イオンを遊離するが, これらがFenton反応によるH₂O₂からのhydroxy radical(OH[•])発生を促進する¹¹¹. 活性酸素種は不飽和脂質過酸化などの細胞毒性も誘発する. またoxyHbが直接H₂O₂と反応し, 更に毒性の高いフェリルHbを生成する¹¹². 修飾Hb投与後に過酸化脂質が著しく増大したことが報告されている¹¹³. 虚血再灌流障害では, O₂とNOが反応してperoxy-nitrite(ONOO⁻)を産生, プロトン化で容易にOH[•]を生じ, 極めて強い細胞毒性を示す¹¹⁴.

培養血管内皮細胞にHbAoやααXLHbを添加すると, ストレス蛋白のhemeoxygenaseの活性増加¹¹⁵, 内皮細胞内のヘム濃度と乳酸脱水素酵素が増大し, 細胞に損傷が加えられていることが示された¹¹⁶. 鉄イオン捕捉剤deferoxamineの添加で低減されることから, Hbのメト化とヘムの分解による活性酸素の生成が原因とされている. また, Hbをラットに投与した後, 肺のhemeoxygenaseとferritinが増加することから, hemeが内皮細胞に取り込まれていることが示唆された¹¹⁷. Hbをカプセル化したHb小胞体ではHbと内皮細胞の直接的な接触を防ぐため, 細胞毒性が軽減されることが期待される. 更にメト化の進行を抑制させれば, 酸素運搬能の延長化だけでなく, 細胞毒性や血管収縮性を示す活性酸素種産生量を低下させることができる.

赤血球内にはcytochrome b₅, NADPH-flavinなどの還元酵素系, glutathioneとascorbic acidによる直接還元系, 及びsuperoxide dismutaseやcatalaseなどの活性酸素失活系が存在する. これら赤血球内に本来存在する酵素系をそのまま用いることはメト化とO₂産生の抑制する為の一つの方法である¹¹⁸. しかしHb精製過程(加熱滅菌など)でこれらの酵素は変性除去される. 非セル型Hbは血流中で, 赤血球膜中の還元酵素や赤血球から滲出するascorbic acid等の還元剤と直接反応してある程度酸化が抑制されるか¹¹⁹, 投与量が多い場合は限界があると思われる. 更に向上させるためにcatalaseやsuperoxide dismutaseを直接Hbと共有結合させて活性酸素種生成量を低減させることができる¹²⁰. セル型のHb小胞体の場合は, 所定量の還元剤や酵素を封入してメト化を抑制できる^{110, 121}. これらの方法は, 代替物自体からの活性酸素種生成の抑制, さらには虚血再灌流障害の時に生成する活性酸素の消去にも有効に作用すると考えられる.

6. 終わりに

血液に最も多く含まれる蛋白質であるHbはX線構造解析された最初の蛋白質であり, またアロステリック効果も早くから明らかにされたように, 最も詳細に研究されてきた蛋白質の一つである. そして今, 赤血球代替物の研究が盛んな中, Hbの生理作用も恐らく他の蛋白質よりも極めて明瞭になったと思われる. Hbを利用した赤血球代替物の構想が生まれた時には, この生理作用の多くはまだ明らかにされていなかった. 本物の血液とそっくりなものを造る必要は無いが, 満足できる機能を有する赤血球代替物が誕生するには, 血液の機能と微小循環により維持される生体のホメオスタシスを十分に理解した上で, 分子設計することが必要である.

謝辞

本研究推進にあたり, 実験協力と積極的な御討論を頂いたDr. S. Takeoka, Dr. H. Hara, Dr. A. G. Tsai(UCSD), Dr. M. Suematsu(慶大医)の各位に感謝する. 本研究の一部は, 厚生科学研究費高度先端医療研究事業(人工血液開発研究分野)によって行われた.

参考文献

1. Fagrell B, Intaglietta M. Microcirculation: its significance in clinical and molecular medicine. *J Intern Med* 1997;241:349-62.
2. Riva C, Ross B, Benedek GB. Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. *Invest Ophthalmol* 1972;11:936-44.
3. Brulisauer M, Bollinger A. Measurement of different human microvascular dimensions by combination of videomicroscopy with Na-fluorescein (NaF) and indocyanine green (ICG) in normals and patients with systemic sclerosis. *Int J Microcirc Clin Exp* 1991;10:21-31.
4. Slaaf DW, Reneman RS, Wiederhielm CA. Pressure regulation in muscle of unanesthetized bats. *Microvasc Res* 1987;33:315-26.
5. Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA. A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 1979; 18:311-8.
6. Endrich B, Asaishi K, Götz A, Messmer K. Technical report - A new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med* 1980;177:125-34.
7. Intaglietta M, Johnson PC, Winslow RM. Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res* 1996;32:632-43.
8. Page TC, Light WR, McKay CB, Hellums JD. Oxygen transport by erythrocyte/hemoglobin solution mixtures in an in vitro capillary as a model of hemoglobin-based oxygen carrier performance. *Microvasc Res* 1998;55:54-64.
9. Intaglietta M. Whitaker Lecture 1996: microcirculation, biomedical engineering, and artificial blood. *Ann Biomed Eng* 1997;25:593-603.
10. Intaglietta M, Tompkins WR. Microvascular measurements by video image shearing and splitting. *Microvasc Res* 1973;5:309-12.
11. Intaglietta M, Silverman NR, Tompkins WR. Capillary flow

- velocity measurements in vivo and in situ by television methods. *Microvasc Res* 1975;10:165-79.
12. Torres Filho IP, Intaglietta M. Microvascular Po₂ measurements by phosphorescence decay method. *Am J Physiol* 1993;265 (Heart Circ Physiol 34):H1434-8.
 13. Kerger H, Torres Filho IP, Rivas M, Winslow RM, Intaglietta M. Systemic and subcutaneous microvascular oxygen tension in conscious Syrian golden hamsters. *Am J Physiol* 1995;2671 (Heart Circ Physiol 37):H802-10.
 14. Torres Filho IP, Leuning M, Yuan F, Intaglietta M, and Jain RK. Noninvasive measurement of microvascular and interstitial oxygen profiles in a human tumor in SCID mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2081-5
 15. Tsai AG, Kerger H, and Intaglietta M. Microcirculatory consequences of blood substitution with $\alpha\alpha$ -hemoglobin. In: *Blood substitutes, Physiological basis of efficacy*. (Ed. by Winslow RM, Vandegriff K, and Intaglietta M.) pp.155-74, Birkhäuser, Boston, 1995.
 16. Tsai AG, Friensenecker B, Sakai H, Kerger H, Intaglietta M. The mechanism of tissue oxygenation and the design of oxygen carrying plasma expanders. In: *Advances in blood substitutes: industrial opportunities and medical challenges*. (Ed. by Winslow RM, Vandegriff K, and Intaglietta M.) pp.189-206, Birkhäuser, Boston, 1995.
 17. Nolte D, Botzlar A, Hecht R, Csapo C, Menger MD, Messmer K. Diaspirin crosslinked hemoglobin: elevation of effects on the microcirculation of striated muscle. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 1994;22:587-92.
 18. Nolte D, Botzlar A, Pickelman S, Bouskela E, Messmer K. Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb™) on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster: a study on safety and toxicity. *J Lab Clin Med* 1997;130:314-27.
 19. Nolte D, Steinhauser P, Pickelman S, Berger S, Härtl R, Messmer K. Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb™) on tissue oxygen tension in striated skin muscle: An efficacy study in the hamster. *J Lab Clin Med* 1997;130:328-38.
 20. Vlahakes GJ, Lee R, Jacobs Jr. EE, LaRaia PJ, Austen WG. Hemodynamic effects and oxygen transport properties of a new blood substitute in a model of massive blood replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;100:379-88.
 21. Lee R, Neya K, Svizzero A, Vlahakes GJ. Limitations of the efficacy of hemoglobin-based oxygen carrying solutions. *J Appl Physiol* 1995;79:236-42.
 22. Standl TG, Reeker W, Redmann G, Kochs E, Werner C, Shulte am Esch J. Haemodynamic changes and skeletal muscle oxygen tension during complete blood exchange with ultrapurified polymerized bovine haemoglobin. *Intensive Care Med* 1997;23: 865-72.
 23. Waschke K, Schrock H, Albrecht DM, Van Ackern K, Kuschinsky W. Local cerebral blood flow and glucose utilization after blood exchange with a hemoglobin-based O₂ carrier in conscious rats. *Am J Physiol* 1993;265 (Heart Circ Physiol 34): H1243-8.
 24. Waschke KF, Albrecht DM, Van Ackern K, Kuschinsky W. Autoradiographic determination of regional cerebral blood flow and metabolism in conscious rats after fluid resuscitation from haemorrhage with a haemoglobin-based oxygen carrier. *Brit J Anaesth*. 1994;73:522-8.
 25. Willinger CC, Schramek H, Pfaller K, Joannidis M, Deetjen P, Pfaller W. Ultrapure polymerized bovine hemoglobin improves structural and functional integrity of the isolated perfused rat kidney. *Renal Physiol. Biochem* 1995;18:288-305.
 26. Chu D, Oglivly CS. Isovolemic hemodilution with purified and polymerized bovine hemoglobin in a rabbit model of focal cerebral ischemia. *Chinese J Physiol* 1997;40:63-9.
 27. Kasper SM, Walter M, Grune F, Bischoff A, Erasmii H, Buzello W. Effects of a hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC-201) on hemodynamics and oxygen transport in patients undergoing preoperative hemodilution for elective abdominal aortic surgery. *Anesth Analg* 1996;83:921-7.
 28. Maxson AD, Gigler U, Sweeney CR, Tomasic M, Saik JE, Donawick WJ, Cothran EG. Use of a bovine hemoglobin preparation in the treatment of cyclic ovarian hemorrhage in a miniature horse. *J Am Vet Med Assoc* 1993;203:1308-11.
 29. Biopure homepage. <http://www.oxyglobin.com>.
 30. Nishi K, Kida Y. Effects of hemoglobin-based oxygen-carrying artificial blood substitutes on the circulatory system. *Artif Blood* 1994;2:82-93.
 31. Sprung J, Mackenzie CF, Barnas GM, Williams JE, Parr M, Christenson RH, Hoff BH, Sakamoto R, Kramer A, Lottes M. Oxygen transport and cardiovascular effects of resuscitation from severe hemorrhagic shock using hemoglobin solutions. *Crit Care Med* 1995;23:1540-53.
 32. Alonzoana GLG, Elfath MD, Mackenzie C, Gregory LC, Duh SH, Trump B, Christenson RH. In vitro interference of the red cell substitute pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene with blood compatibility, coagulation, and clinical chemistry testing. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997;11:845-50.
 33. Sakai H, Tsai AG, Kerger H, Park SI, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E, and Intaglietta M. Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with a red cell substitute consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J Biomed Mater Res* 1998;40:66-78.
 34. Suematsu M, Kashiwagi S, Sano T, Goda N, Shinoda Y, Ishimura Y. Carbonmonoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205: 1333-7.
 35. Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T. Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 1998;101:604-12.
 36. Whitmore RL. *Rheology of the circulation*. Pergamon Press,

Oxford, 1968.

37. Davis MJ, Ferrer PN, Gore RW. Vascular anatomy and hydrostatic pressure profile in the hamster cheek pouch. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1986;250:H291-303.
38. Meininger, G.A., Fehr, K.L., and M.B. Yates. Anatomic and hemodynamic characteristics of the blood vessels feeding the cremaster skeletal muscle in the rat. *Microvasc Res* 1987;33: 81-97.
39. Ohyanagi M, Nishigaki K, Faber JE. Interaction between microvascular α_1 - and α_2 -adrenoreceptors and endothelium-derived relaxing factor. *Circ Res* 1992;71:188-200.
40. Fenger-Gron J, Mulvany MJ, Christensen KL. Intestinal blood flow is controlled by both feed arteries and microcirculatory resistance vessels in freely moving rats. *J Physiol Lond* 1997;498: 215-24.
41. Faber JE. In situ analysis of α -adrenoreceptors on arteriolar and venular smooth muscle in rat skeletal muscle microcirculation. *Circ Res* 1988;62:37-50.
42. Hirata S, Ninomiya I. Nonuniform effects of sympathetic nerve and alpha-receptor blockade on internal diameter of small arteries in the rabbit ear. *Clin Hemorheol* 1982;2:229-41.
43. Leech CJ, Faber JE. Differential sensitivity of venular and arteriolar alpha-adrenergic receptor constriction to inhibition by hypoxia: role of receptor subtype and coupling heterogeneity. *Circ Res* 1996;78:1064-74.
44. Griffith TM, Edwards DH, Davies RL, Henderson AH. The role of EDRF in flow distribution: a microangiographic study of the rabbit isolated ear. *Microvasc Res* 1989;37:162-77.
45. Kerger H, Tsai AG, Saltzman DJ, Winslow RM, Intaglietta M. Fluid resuscitation with O₂ vs. non-O₂ carriers after 2 h of hemorrhagic shock in conscious hamsters. *Am J Physiol* 1997; (Heart Circ Physiol 41): H525-37.
46. Sakai H, Hara H, Tsai AG, Tsuchida E, Johnson PC, Intaglietta M. Changes in resistance and capacitance vessels during hemorrhagic shock and resuscitation in conscious hamster model. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* in press.
47. Schultz SC, Grady, B, Cole F, Hamilton I, Burhop K, Malcolm DS. A role for endothelin and nitric oxide in the pressor response to diaspirin cross-linked hemoglobin. *J Lab Clin Med* 1993;122: 301-308.
48. Keipert PE, Gonzales A, Gomez GL, Macdonald VW, Hess JR, Winslow RM. Acute changes in systemic blood pressure and urine output of conscious rats following exchange transfusion with diaspirin-crosslinked hemoglobin solution. *Transfusion* 1993;33:701-8.
49. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs HA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991;43: 109-42.
50. Sakai H, Tsuchida E. Physiological roles of messenger molecules (NO, CO). *Chemistry* 1996;51:62-3.
51. Olsen SB, Tang DB, Jackson MR, Gomez ER, Alaya B, Alving BM. Enhancement of platelet deposition by cross-linked hemoglobin in a rat carotid endarterectomy model. *Circulation* 1996;93:327-32.
52. Murray JA, Ledlow A, Launspach J, Evans D, Loveday M, Conklin JL. The effect of recombinant human hemoglobin on esophageal motor function in humans. *Gastroenterology* 1995; 109:1241-8.
53. Chakder S, Rosenthal GJ, Rattan S. In vivo and in vitro influence of human recombinant hemoglobin on esophageal function. *Am J Physiol* 1995;268(Gastrointest Liver Physiol 31): G443-50.
54. Conklin JL, Murray J, Ledlow A, Clark E, Hayek B, Picken H, Rosenthal G. Effects of recombinant human hemoglobin on motor functions of the opossum esophagus. *J Pharmacol Exp Therap* 1995;273:762-7.
55. Bone HG, Schenarts PJ, Booke M, McGuire R, Harper D, Traber LD, Traber DL. Oxalated pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate normalizes the hyperdynamic circulation in septic shock. *Crit Care Med* 1997;25:1010-8.
56. Rhea G, Bodenham A, Mallick A, Przybelski R, Daily E. Vasopressor effects of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in critically ill patients. *Crit Care Med* 1996;24:A39.
57. Poli de Figueiredo LF, Mathru M, Solanki D, Macdonald VW, Hess J, Kramer GC. Pulmonary hypertension and systemic vasoconstriction may offset the benefits of acellular hemoglobin blood substitutes. *J Trauma* 1997;42:847-56.
58. Swan SK, Halstenson CE, Collins AJ, Colburn WA, Blue J, Przybelski RJ. Pharmacological profile of diaspirin cross-linked hemoglobin in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1995;26: 918-23.
59. Nakai K, Ohta T, Sakuma I, Akama K, Kobayashi Y, Tokuyama S, Kitabatake A, Nakazato Y, Takahashi TA, Sekiguchi S. Inhibition of endothelium-dependent relaxation by hemoglobin in rabbit aortic strips: comparison between acellular hemoglobin derivatives and cellular hemoglobins. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;28:115-23.
60. Rudolph AS, Sulpizio A, Hieble P, MacDonald V, Chavez M, Feuerstein G. Liposome encapsulation attenuates hemoglobin-induced vasoconstriction in rabbit arterial segments. *J Appl Physiol* 1997;82:1826-35.
61. Gulia A, Rebello S. Role of adrenergic mechanisms in the pressor effect of diaspirin cross-linked hemoglobin. *J Lab Clin Med* 1994; 124:125-33.
62. Sharma AC, Gulati A. Yohimbine modulates diaspirin crosslinked hemoglobin-induced systemic hemodynamics and regional circulatory effects. *Crit Care Med* 1995;23:874-84.
63. Gulia A, Sen AP, Sharma AC, Singh G. Role of ET and NO in resuscitative effect of diaspirin cross-linked hemoglobin after hemorrhage in rat. *Am J Physiol* 1997;273(Heart Circ Physiol 42):H827-36.
64. Ohyanagi M, Nishigaki K, Faber JE. Interaction between microvascular α_1 - and α_2 -adrenoreceptors and endothelium

- derived relaxing factor. *Circ Res* 1992;71:188-200.
65. Moisan S, Harvey N, Beaudry G, Pascale F, Burhop KE, Drapeau G, Rioux F. Structural requirements and mechanism of the pressor activity of Leu-Val-Val-hemorphin-7, a fragment of hemoglobin β -chain in rats. *Peptides* 1998;19:119-31.
 66. Pries AA, Heide J, Ley K, Klotz K-F, Gaehtgens P. Effect of oxygen tension on regulation of arteriolar diameter in skeletal muscle in situ. *Microvasc Res* 1995;49:289-99.
 67. Lindbom L, Tuma RF, Arfors KE. Influence of oxygen on perfused capillary density and capillary red cell velocity in rabbit skeletal muscle. *Microvasc Res* 1980;19:197-208.
 68. Messina EJ, Sun D, Koller A, Wolin MS, Kaley G. Increases in oxygen tension evoke arteriolar constriction by inhibiting endothelial prostaglandin synthesis. *Microvasc Res* 1994;48:151-60.
 69. Jackson WF, Duling BR. The oxygen sensitivity of hamster cheek pouch arterioles. *Circ Res* 1983;53:515-25.
 70. Detar R, Bohr DF. Oxygen and vascular smooth muscle contraction. *Am J Physiol* 1968;214: 241-4.
 71. Harder DR, Narayanan J, Birks EK, Francois Liard J, Imig JD, Lombard JH, Lange AR, Roman RJ. Identification of a putative microvascular oxygen sensor. *Circ Res* 1996;79:54-61.
 72. Sakai H, Hara H, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Microvascular responses to hemodilution with Hb-vesicles as red cell substitutes: Influence of oxygen affinity. *Am J Physiol* (submitted).
 73. Vandegriff KD, Olson JS. Morphological and physiological factors affecting oxygen uptake and release by red blood cell. *J Biol Chem* 1984;259:12619-27.
 74. Vandegriff KD, Winslow RM. A theoretical analysis of oxygen transport: A new strategy for the design of hemoglobin-based red cell substitutes. in *Blood Substitutes: New Challenges*, Winslow RM, Vandegriff KD, Intaglietta M (eds.), Birkhäuser, Boston, 1996, pp. 124-31.
 75. Biro GP, Anderson PJ, Curtis SE, Cain SM. Stroma-free hemoglobin: its presence in plasma does not improve oxygen supply to the resting hindlimb vascular bed of hemodiluted dogs. *Can J Physiol Pharmacol* 1991;69:1656-62.
 76. Johnson PC, Richmond K, Shonard RD, Toth A, Pal M, Tischler ME, Lynch RM. Oxygen delivery regulation: implications for blood substitutes. in *Blood Substitutes: Physiological Basis of Efficacy*, Winslow RM, Vandegriff KD, Intaglietta M (eds.), Birkhäuser, Boston, 1995, pp. 175-86.
 77. Liard JF, Kunert MP. Hemodynamic changes induced by low blood oxygen affinity in dogs. *Am J Physiol* 1993;264 (Regulatory Integrative Comp Physiol. 33):R396-401.
 78. Kunert MP, Liard JF, Abraham DJ. RSR-13, an allosteric effector of hemoglobin, increases systemic and iliac vascular resistance in rats. *Am J Physiol* 1996;271(Heart Circ Physiol 40):H602-13.
 79. Kunert MP, Liard JF, Abraham DJ, Lombard JH. Low-affinity hemoglobin increases tissue PO_2 and decreases arteriolar diameter and flow in the rat cremaster muscle. *Microvasc Res* 1996;52:58-68.
 80. Collman JP, Herrmann PC, Fu L, Eberspancher TA, Eubanks M, Boitrel B, Hayoz P, Zhang X, Brauman JI, Day VW. Aza-crown-capped porphyrin models of myoglobin: studies of the steric interactions of gas binding. *J Am Chem Soc* 1997;119:3481-9.
 81. Kamiya A, Togawa T. Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in canine carotid artery. *Am J Physiol* 1980;239 (Heart Circ Physiol 28):H14-21.
 82. Pohl U, Herlan K, Huang A, Bassenge E. EDRF-mediated, shear-induced dilation opposes myogenic vasoconstriction in small rabbit arteries. *Am J Physiol* 1991;261(Heart Circ Physiol 28): H2016-23
 83. Frangos JA, Eskin SG, McIntire LV, Ives CL. Flow effects on prostacyclin production in cultures human endothelial cells. *Science* 1985;227:1477-9.
 84. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow induced release of endothelium derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250 (Heart Circ Physiol):1145-9.
 85. Griffith TM, Edwards DH, Davies RL, Henderson AH. The role of EDRF in flow distribution: a micrographic study of the rabbit isolated ear. *Microvasc Res* 1989;37:162-77.
 86. Wit C, Schäfer C, Bismarck P, Bolz SS, Pohl U. Elevation of plasma viscosity induces sustained NO-mediated dilation in the hamster cremaster microcirculation in vivo. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 1997;434:354-61.
 87. Tsai AG, Friesenecker B, McCarthy M, Sakai H, Intaglietta M. Increased viscosity during extreme isovolemic hemodilution lowers vascular resistance. *Ann Biomed Eng* 1997;25:S-14.
 88. Tsai AG, Friesenecker B, Sakai H, Kerger H, Intaglietta M. Biophysical criteria for microcirculatory efficacy of blood substitutes. in *Present and future perspectives of blood substitutes*, Ed. by E. Tsuchida, Elsevier, 1998 (in press).
 89. Corr L, Burnstock G. Analysis of P_2 -purinoceptor subtypes on the smooth muscle and endothelium of rabbit coronary artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;23:709-15.
 90. Ellsworth ML, Forrester T, Ellis CG, Dietrich HH. The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *Am J Physiol* 1995; 269(Heart Circ Physiol 38): H2155-61.
 91. Ogata Y, Okamoto T, Suzuki K, Kamitani T. The development of neo red cells (NRC) with enzymatic reduction system of the methemoglobin. *Artif Blood* 1994;2:62-6.
 92. Simoni J, Feola M, Tran R, Buckner M, Canizaro PC. Biocompatibility of hemoglobin solutions. II. The inflammatory reaction of human monocytes and mouse peritoneal macrophages. *Artif Organs* 1990;14:98-109.
 93. Feola M, Simoni J, Tran R, Canizaro PC. Nephrotoxicity of hemoglobin solutions. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1990; 18:233-49.
 94. Simoni J, Simoni G, Newman G, Feola M. An improved blood substitute: in vivo evaluation of its hemodynamic effects. *ASAIO*

- J 1996;42:M773-82.
95. Mahler F, Intaglietta M, Hugli TE, Johnson AE. Influences of C3a anaphylatoxin compared to other vasoactive agents on the microcirculation of rabbit omentum. *Microvasc Res* 1975; 9:345-56.
 96. Kaca W, Roth R. Activation of complement by human hemoglobin and by mixtures of hemoglobin and endotoxin. *Biochim Biophys Acta* 1995;1245:49-56.
 97. Watanabe M, Ohyanagi H, Saitoh Y. Experimental study on anaphylactic effects by Fluosol-DA. *Jpn J Artif Organs* 1988;17: 1513-22.
 98. Laing RBS, Milne LJR, Leen CLS, Malcom GP, Steers AJW. Anaphylactic reactions to liposomal amphotericin. *Lancet* 1994; 344:682.
 99. Abudullah F, Whiteford M, Ovadia P, Neville LF, Rudolph AS, Grillo S, Rabinovici R. Effect of liposome encapsulated hemoglobin on serum triglyceride, total cholesterol, LDL and HDL cholesterol measurements. *Lipids* 1997;32:377-82.
 100. Szebeni J, Wassef NM, Spielberg H, Rudolph AS, Alving CR. Complement activation in rats by liposomes and liposome-encapsulated hemoglobin: evidence for anti-lipid antibodies and alternative pathway activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:255-63.
 101. Rabinovici R, Rudolph AS, Vernick J, Feuerstein G. Lyophilized liposome encapsulated hemoglobin: evaluation of hemodynamic, biochemical, and hematologic responses. *Crit Care Med* 1994; 22:480-85.
 102. Phillips WT, Klipper R, Frense D, Rudolph AS, Javors M, Goins B. Platelet reactivity with liposome-encapsulated hemoglobin in the rat. *Exp Hematol* 1997;25:1347-56.
 103. Szebeni J, Wassef NM, Hartman KR, Rudolph AS, Alving CR. Complement activation in vitro by the red cell substitute, liposome-encapsulated hemoglobin: mechanism of activation and inhibition by soluble complement receptor type 1. *Transfusion* 1997;37:150-9.
 104. Szebeni J, Wassef NM, Rudolph AS, Alving CR. Complement activation in human serum by liposome-encapsulated hemoglobin: the role of natural anti-phospholipid antibodies. *Biochim Biophys Acta* 1996;1285:127-30.
 105. Sakaguchi K, Miyauchi Y, Suzuki K, Takahashi A. Effects of the neo red cell on the blood coagulation system and the complement system. *Jpn J Artif Organs* 1991;20:620-5.
 106. Davies MG, Hagen PO. The vascular endothelium. A new horizon. *Ann Surg* 1993;218:593-609.
 107. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250(Heart Circ Physiol 19):H822-7.
 108. Katusic ZS, Vanhoutte PM. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol* 1989;257 (Heart Circ Physiol 26):H33-7.
 109. Lavy A, Zhang L, Rifkind JM. Hemoglobin: a source of superoxide radical under hypoxic conditions. *Oxy-radicals Mol Biol Pathol Proc Upjohn-UCLA Symp* 1988:11-25.
 110. Takeoka S, Sakai H, Kose T, Mano Y, Seino Y, Nishide H, Tsuchida E. Methemoglobin formation in hemoglobin vesicles and reduction by encapsulated thiols. *Bioconjugate Chem* 1997;8: 539-44.
 111. Puppo A, Halliwell B. Formation of hydroxyl radicals in biological systems: does myoglobin stimulate hydroxyl radical formation? *Free Radic Res Commun* 1988;4:415-22.
 112. Alayash A, Fratantoni JC, Bonaventura C, Bonaventura J, Bucci E. Consequences of chemical modification on the free radical reactions of human hemoglobins. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298:114-20.
 113. Biro GP, Ou C, Ryan-McFarlane C. Oxyradical generation after resuscitation of hemorrhagic shock with blood or stroma-free hemoglobin solution. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 1995;23:631-45.
 114. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991;266:4244-50.
 115. Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K, Eaton JW, Vercellotti GM. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9285-9.
 116. Motterlini R, Foresti R, Vandegriff K, Intaglietta M, Winslow RM. Oxidative-stress in vascular endothelial cells exposed to acellular hemoglobin solutions. *Am J Physiol* 1995;269(Heart Circ Physiol 38):H648-55.
 117. Balla J, Nath KA, Balla G, Juckett MB, Jacob HS, Vercellotti GM. Endothelial cell heme oxygenase and ferritin induction in rat lung by hemoglobin in vivo. *Am J Physiol* 1995;268(Lung Cell Mol Physiol 12):L321-7.
 118. Ogata Y, Okamoto T, Suzuki K, Kamitani, T. The development of the Neo Red Cells(NRC) with enzymatic reduction system of the methemoglobin. *Artif Blood* 1994;2:62-6.
 119. McGown EL, Lyons MF, Marini MA, and Zegna A. Reduction of extracellular methemoglobin by erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1990;1036:202-6.
 120. D'Angillo F, Chang TMS. Reduction of hydroxyl radical generation in a rat hindlimb model of ischemia-reperfusion injury using crosslinked hemoglobin-superoxide dismutase-catalase. *Artif Cells Blood Substitute Immobilization Biotechnol* 1997;25: 163-80.
 121. Sakai H, Takeoka S, Seino Y, Tsuchida E. Suppression of methemoglobin formation by glutathione in a concentrated hemoglobin solution and in a hemoglobin vesicle. *Bull Chem Soc Jpn* 1994;67:1120-5.

酸素輸液の現状

Current States of Oxygen Infusion

武岡 真司*・土田 英俊*

Key words
 酸素輸液, 人工赤血球, 赤血球代替物, ヘモグロビンヘモグロビン小胞体, 全合成ヘム

はじめに

ヒトからヒトへの同種血輸血では, AIDSや肝炎,あるいは未知のウイルス感染, 血液型不適合やGVHD (Graft Versus Host Disease) などの抗原感作の危険性(リスク)が指摘され, そのリスクを低下させるために高感度の検出法や高性能の除去技術, そして確実な血液(血液成分)の保存法の開発などが急速に進展している。しかし, 細心の注意を払ってもリスクがゼロにならない限り, 輸血に関わる事故は避けられず, 日本よりも輸血体制の整備が遅れている大多数の国では更に高リスクの状況にある。緊急災害の場合に際し, 何時でも何処でも血液型に関係なく必要量を即時に安全供給できる人工血液(血液代替物)が常備されている救護体制の実現のためには, 酸素輸液(赤血球代替物)の開発が重要な優先課題となっている¹⁾。

1. 酸素輸液の特徴と臨床動向

現在開発されている酸素輸液は, (1)ヘモグロビン(Hb)を利用した酸素輸液, (2)全合成系酸素輸液の二つに大別される(図1)。(1)は更に非細胞型の修飾ヘモグロビンと細胞型のヘモグロビン小胞体の二つに分けられる。また, (2)はパーフルオロカーボン乳剤と全合成ヘムに分けられる(図1)。現在, 各種の修飾Hbとパーフルオロカーボン乳剤が欧米にて臨床試験段階にある。残りは前臨床段階にあるものの, その高い性能が次世代系として期待されている。

1) 修飾ヘモグロビンの分子設計

修飾Hbは, 現在のところ分子内架橋Hb, 重合Hb, 高分子結合Hbの3種類に分類できる(図1)。高純度に精製したヘモグロビンをそのまま投与した場合, 酸素親和度が極端に高いため効率よく酸素を運搬できず, また速やかに腎から排泄されるため血中滞留時間が短いどころか, 重篤な腎毒性を招来する。これは, 赤血球中にある酸素親和度調節因子(アロステリック因子)の消失と, 四つのサブユニット(α , β , α , β)から構成されるHb四量体の二量体($\alpha\beta$)への解離が原因である。従って, Hb構造の一部を化学修飾あるいはアミノ酸配列を変えて酸素親和度を調節し, 二量体解離を防止して更に分子量を大きくすれば, 上記の問題は解決できるとの考えが, 修飾Hb設計の基本となっている。

2) 原料ヘモグロビンの培養による供給

Hbの原料として, 期限切れのヒト赤血球から精製したヒトHb, ウシHb, あるいは菌体に産生させたりコンビナントHb(rHb)が使用されている²⁾。ヒトHbでは安全性が確認された期限切れヒト赤血球の安定確保が課題となる。ウシHbは, 狂牛病の病原体であるプリオンを完全に不活性化, あるいは除去する技術が伴わなければ使用され難い。遺伝子組替大腸菌あるいは酵母菌などを培養させてrHbを工場にて生産する方法は期待度が高いものの, エンドトキシンなどの菌体由来不純物の完全な除去とコストの大幅な低下が課題となっている。最近, 遺伝子組替タバコなどの植物にヒトHbを生合成させる技術が報告され, 安全なHbを安価に大量合成する方法として今後の展開が期待される³⁾。

* Shinji Takeoka, Eishun Tsuchida: 早稲田大学理工学総合研究センター高分子化学研究室 Department of Polymer Chemistry, ARISE, Waseda University

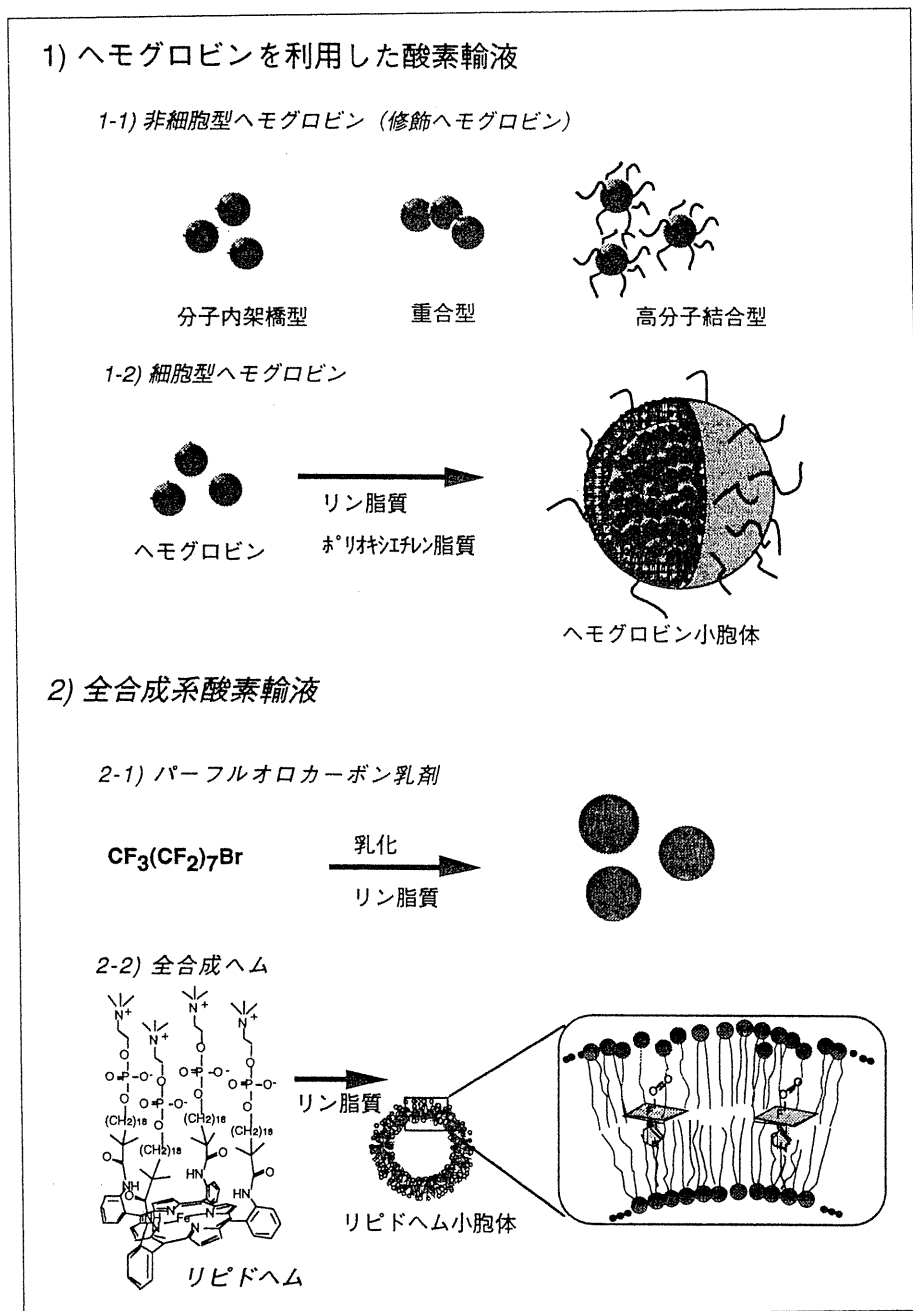


図1 酸素輸液の分類

3) 修飾ヘモグロビンの臨床試験動向

Baxter社がHemeAssist™として開発した分子内架橋Hbは、2本のHb α鎖99番目のLys間をフマル酸架橋させたもので⁴⁾、単純な修飾構造であるため均一性が保証でき、簡便に量産できる点が長

所である。本製剤投与による血圧亢進作用は以前より指摘されていたが、これをヘモグロビン治療薬と位置づけ、量産プラントを建設して大規模な臨床試験を欧米にて展開した。しかし、外傷に対する輸血代替療法において、従来法よりも死亡率

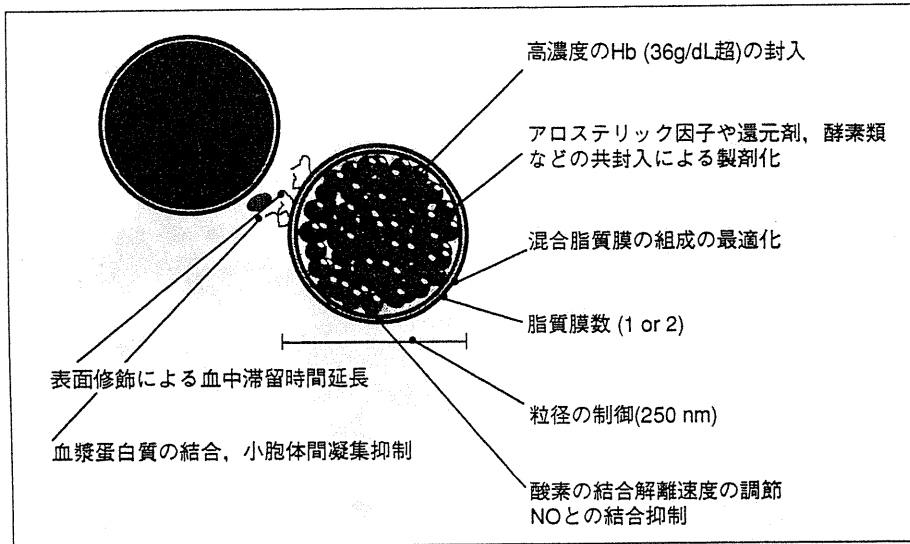


図2 細胞型ヘモグロビンの特徴

が高くなったため、現在臨床試験が中止されている。

遺伝子組替技術を用いて培養菌体に生産させた rHb は、Somatogen Inc.社によって Optro™として具体化された²⁾。ヒト Hb のアミノ酸配列の一部を変換して二量体への解離防止と適当な酸素親和度が実現されている。第 1 相臨床試験では投与直後に 50 mmHg まで一過性の血圧上昇が起これ、軽い嚥下障害、吐き気や嘔吐などが訴えられ、食道や胃腸に変形が認められた⁵⁾。これらの症状は全て Hb 分子が平滑筋部位まで拡散し血管弛緩因子である NO を捕捉する作用に関連しているものと考えられている。

最近 Baxter 社は上記の Hb 分子由来の副作用を解決するために、Somatogen 社を買収し、Hb 分子間の架橋体や、ヘムポケットの空間を狭くしてヘムと NO との結合を抑制した新しい Hb 分子の合成にリコンビナント技術の利用を検討している。

他方、重合 Hb では、グルタルアルデヒドにてヒト Hb を分子間架橋した PolyHeme™ が Northfield Laboratories 社より開発され⁶⁾、同様の方法で架橋されたウシ Hb は Biopure 社より Hemopure™ として開発されている⁷⁾。また O-ラフィノースにて分子間架橋した Hemolink™ が Hemosol 社により開発され¹¹⁾、臨床試験段階にある。特に Biopure 社が開

発した Oxyglobin™ (Hemopure™ より低純度体) は獣医領域での使用に限定して、本年 FDA により認可され上市されている⁷⁾。これらは、分子量が 64 kD から 512 kD の範囲内に入るように分画されており、長期安定保存が可能、血中滞留時間が長い点が特長である。また、血管収縮作用も大幅に抑制されている。外傷や術中に急性出血した患者に投与した臨床試験の報告は文献 8) を参照されたい。

生理活性度の低いポリエチレングリコール (PEG) を Hb に結合させた高分子結合 Hb では、ウシ Hb に結合させた型が Enzon 社から PEG-Hemoglobin™ として⁹⁾、ヒト Hb に結合させた型が Apex 社より PHP™ として開発されている¹⁰⁾。血中滞留時間が長く血管収縮作用が低い点は重合型と類似しているものの、比較的高い膠質浸透圧と溶液粘度が本製剤の特徴となっている。

4) 細胞型ヘモグロビン小胞体

赤血球と類似構造の細胞型 Hb 小胞体は、高濃度 (>36g/dL) の精製 Hb をリン脂質二分子膜にて包み込んだ構造であるため、Hb 分子を利用する諸問題の解決が見込まれる (図 2)¹¹⁾。現在、効率の高い製造法の確立と物性向上に大きな進歩が認められ¹²⁾、Rudolph らは薬理・生理・病理作用について基礎知見を集積¹³⁾、共に臨床試験に進む

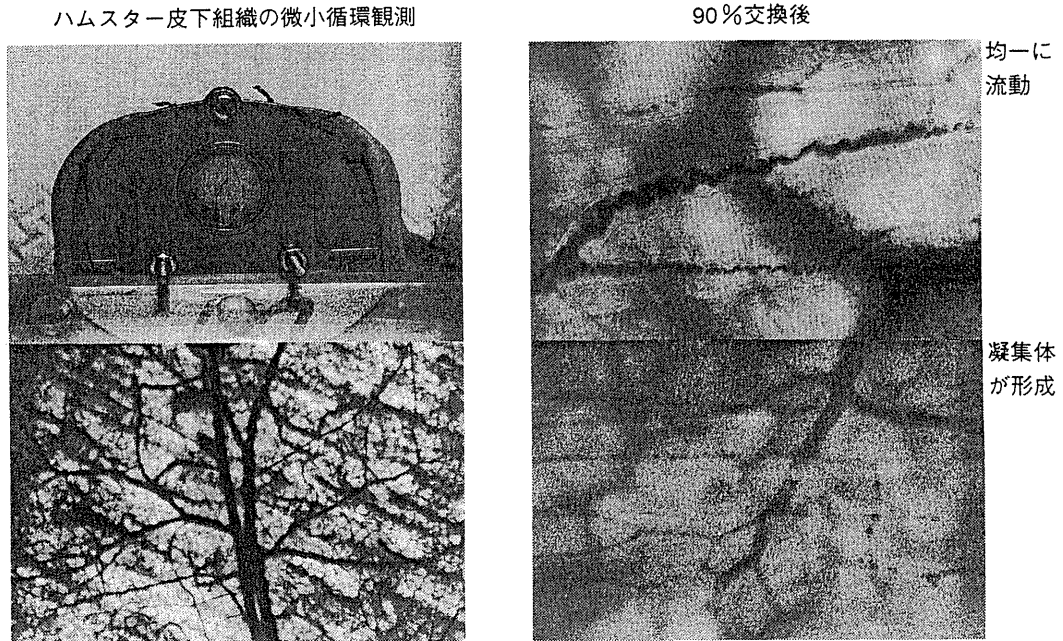


図3 微小循環観測によるPEG結合Hb小胞体の循環動態の相違

べく準備を進めている。

例えば血管断片を用いた試験では、Hb分子と比較してHb小胞体は100分の1の低い血管収縮度を示すことが明らかにされている¹⁴⁾。また、摘出肝臓にHb溶液を灌流させると、Hb分子は類洞(孔径100~150nmの篩板状内皮を持つ血管)を透過して、血管弛緩因子である一酸化炭素を捕捉するために血管収縮が認められる。他方、粒径220nmのHb小胞体では殆ど認められず、細胞、非細胞型の相違が明確にされた²⁶⁾。

出血ショック蘇生や交換輸血試験においてHb小胞体は良好な酸素運搬能を示す結果が得られている。酸素運搬能のないアルブミン溶液のみの投与では70%以上の交換率の達成は不可能であるが、Hb小胞体では90%以上の交換率でも殆どのラットが生存した¹⁶⁾。更に、PEG鎖にて表面を修飾した系では血流中での凝集が効果的に抑制され、血管抵抗の低下および末梢循環動態の改善が微小循環動態の観測から明確に認められた(図3)¹⁷⁾。

5) 全合成系ヘム酸素運搬体

1983年、世界で始めて合成ヘムを用いた新しい全合成系の酸素運搬体が我々のグループにより開発された¹⁸⁾。これは酸素を可逆的に吸脱着するヘ

ム誘導体(リピドヘム)をリン脂質二分子膜小胞体の二分子膜疎水場に包埋して、水中で安定に機能発現できる様にした全合成系である。リン脂質二分子膜小胞体の利用以外にも、栄養輸液として臨床使用されている油滴小球体の界面活性剤としてリピドヘムを用いた系¹⁹⁾、あるいはリピドヘムだけで二分子膜を構築する系、また、遺伝子組替技術を用いて製造されたりコンビナントアルブミンにこれを担持させたアルブミン-ヘムもヘモグロビンに匹敵、あるいはそれを超える酸素輸送能力を持つことが見出されている²⁰⁾。100%合成物から構成されているので工場生産でき、感染の心配がない、凍結乾燥粉末にて長期保存可能、高い酸素運搬能が実現可能、分子集合系であるため表面修飾や還元系の導入が可能である点が特長とされる。

2. 血液代替物の将来展望

有用蛋白質や酵素を遺伝子組替技術を用いて菌体に産生させる方法論は今後も益々活発になり、ヘモグロビンの酸素親和度の任意値への調節や様々な分子間架橋体がリコンビナント方式で得られるようになるであろう。バイオマスを利用した

Hbの合成技術は今後のキーテクノロジーとなろう。

更には造血幹細胞の培養やクローン技術を用いることにより、赤血球そのものを生合成させることが出来るようになるであろう。この場合、緊急時の使用には適さないものの、待機手術や慢性貧血患者への使用には極めて有効と思われる。

輸血の際の感染や副作用の心配が無く、長期間保存可能な酸素輸液が実現されれば、血液事業や医療の進歩に貢献するばかりでなく、医療体制の整備されていない国や地域の医療福祉の向上や、更に癌や脳卒中、心筋梗塞の治療改革など、その波及効果は計り知れない。

引用文献

- 1) E. Tsuchida : Introduction : overview and perspectives, In : Artificial Red Cells (E. Tsuchida, ed.), John Wiley, New York, 1995, 1-20. 土田英俊, 酒井宏水 : 血液代替物の展開。医学のあゆみ, 172 : 99 - 104, 1995. 土田英俊, 武岡真司 : 赤血球代替物の最新動向。医学のあゆみ, 177 : 151-154, 1996.
- 2) Tsai AG, Friesenecker B, McCarthy M, *et al.* : Increased viscosity during extreme isovolemic hemodilution lowers vascular resistance. Ann. Biomed. Eng. 25 : S14, 1997.
- 3) Dieryck W., Pagnier J., Poyart C., *et al.*, Human haemoglobin from transgenic tobacco, Nature, 386 : 29-30, 1997.
- 4) Przybelski RJ, Daily EK, Kisicki JC, *et al.* : Phase I study of the safety and pharmacologic effects of dapsirin cross-linked hemoglobin solution. Crit. Care Med. 24 : 1993-2000, 1996
- 5) Murray JA, Ledlow A, Launspach J, *et al.* : The effects of recombinant human hemoglobin on esophageal motor function in humans. Gastroenterology 109 : 1241-1248, 1995
- 6) Gould SA, Moss GS : The clinical development of human polymerized hemoglobin as a blood substitute. World J. Surgery 20 : 1200-1207, 1996
- 7) <http://www.biopure.com/>
- 8) Adamson JG, Bonaventura BJ, Er SS, *et al.* : Production, characterization, and clinical evaluation of Hemolink, an oxidized raffinose cross-linked hemoglobin-based blood substitute, In : Red Cell Substitutes : Basic Principles and Clinical Applications, (Rudolph AS, Rabinovici R, Feuerstein GZ, eds.), Marcel Dekker, New York, 1998, 335-351
- 9) Song D, Olano M, Wilson DF, *et al.* : Comparison of the efficacy of blood and polyethylene glycol-hemoglobin in recovery of newborn piglets from hemorrhagic hypotension : effect on blood pressure, cortical oxygen, and extracellular dopamine in the brain. Transfusion 35 : 552-558, 1995
- 10) Iwashita Y : Hemoglobin conjugated with Polyoxyethylene, In: Artificial Red Cells (Tsuchida E, ed.), John Wiley, New York, 1995, 151-176
- 11) Tsuchida E, Takeoka S, Stabilized hemoglobin vesicles, In : Artificial Red Cells (Tsuchida E, ed.), John Wiley, New York, 1995, 35-64
- 12) Sakai H, Hamada K, Takeoka S, *et al.* : Physical properties of hemoglobin-vesicles as red cell substitutes. Biotechnol. Prog. 12 : 119-125, 1996
- 13) Rabinovici R, Phillips WT, Feuerstein GZ, *et al.*, Encapsulation of hemoglobin in liposomes, In : Red Cell Substitutes : Basic Principles and Clinical Applications, (Rudolph AS, Rabinovici R, Feuerstein GZ, eds.), Marcel Dekker, New York, 1998, 263-286
- 14) Sakai H, Hamada K, Takeoka S, *et al.* : Functional evaluation of hemoglobin- and lipidheme-vesicles as red cell substitutes. Polym. Adv. Technol. 7 : 639-644, 1996
- 15) Goda N, Suzuki K, Naito M, *et al.*, Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver : topographic bases for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. J. Clin. Invest. 101 : 604-612, 1998
- 16) Sakai H, Takeoka S, Park SI, *et al.* : Surface modification of hemoglobin vesicles with poly(ethyleneglycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. Bioconjugate Chem. 8 : 23-30, 1997
- 17) Sakai H, Tsai AG, Kerger H, *et al.* : Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with red cell substitute consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin, J. Biomed. Materials Res. 40 : 66-78, 1998
- 18) Tsuchida E, Komatsu T : Synthetic hemes, Methods Enzymol., 231 : 167-193, 1994
- 19) Kobayashi K, Tsuchida E, Nishide H : Totally synthetic hemes : Their characteristics and oxygen-carrying capacity in dogs, In: Artificial Red Cells (Tsuchida E, ed.), John Wiley, New York, 1995, 93-116
- 20) Tsuchida E, Ando K, Maejima H, *et al.* : Properties of and oxygen binding by albumin - tetra phenylporphyrinatoiron(II) derivative complex. Bioconjugate Chem. 8 : 534-538, 1997



人工血液

輸血技術の確立は、医療や福祉に大きな貢献をしてきた。しかし、ウイルス感染や抗原感作などがまだ課題として残されている。大規模災害時など、緊急時に対応できる安全な人工血液の供給体制は、わが国の近未来医療に期待される姿でもある。ここでは人工血液の現状を紹介する。

Eishun TSUCHIDA
早稲田大学理工学総合研究センター

—分子集合科学の成果—

電子をまとめて動かす

しばらく前は「人工血液」*1というと皆腹をかかえて笑い転げ、そんなことはできっこないと一刀両断にされたものです。筆者の場合、実は、高分子錯体の多電子移動を研究課題にしており、同時に複数の電子を動かすことを考えていました。「電子は一つずつ動くもの」というのが普通の理解となっていました。自然界の化学反応をみていると、どうも電子一つが動いて新しい物質が誕生する例はほとんどないと言ってもよいくらいで、多少矛盾を感じていました。

そこで多電子を一度に動かすことができるなら反応系を大きく変えられるのではないかと発想をするようになりました。最近では一段階で、4電子を動かすことができるようになり、化学反応は確かにこれまでと随分違って見えるようになりました。もちろん、電子はマイナスの電荷をもちますので、電子同士が極端に近づくことはできません。観測上、同時に動くように見えますが、ナノ秒とかピコ秒の単位で時間のずれがあるのです。

そう考えていくと、化学工業での高温・高圧の必要条件も変わってくるようになります。

他方、植物や動物の生理、生命の根源、私たちの精神生活の諸問題、あるいは神経伝達の仕組みも、その詳細のすべてが、現在は化学反応の世界として理解されてきています。したがって、当然、多電子移動、あるいは電子移動の阻止がまず取り上げられるべきです。実際そうした方向に科学的理解は

土田 英俊

進んできています。

電子の移動を阻止すると…

例えば、ヒトヘモグロビンの酸素結合席であるポルフィリン錯体部を単離しても、水の中で酸素を結合させることは絶対にできません。その理由は、簡単に電子移動が起こって、酸素が配位できる場を保つことができなくなるからです。

しかし、電子移動を阻止する雰囲気分子構造をつくると、空気に被曝するだけでポルフィリンの水溶液は赤い色に変わります。これはヘモグロビンが酸素を結合した場合と同じ吸収スペクトルをもつからです。

こうしたことは、今から15年くらい前に、筆者のところで詳しくわかってきて、興味をお持ちの医学の先生方と協力して、現在までこの領域の研究推進を図ることになりました。

血液の重要性

わが国のように輸血システムが完備した国は世界にいくつもあります。多くは輸血センターの組織もなく、病院ごとに輸血を実施する場合がほとんどです。それに、栄養状態の悪いところでは、人命を救う唯一の方法は輸血ということになります。

その血液について、まず考えなくてはならないのは、酸素を輸送する役割（つまり酸素を運ぶ赤血球の役割）を果たすことができる代替物が可能となれば、それがいわゆる「人工血液」の誕生となることです（表1）。

▶表1 酸素輸液（血液代替物・人工血液）に要求される性能

- 十分な酸素運搬能 ($P_{50}=20\sim 40$ Torr)
- 適当な膠質浸透圧や溶液粘度 (4.5 cP 以下)
- 適当な血中滞留時間 (12時間以上)
- 長期貯蔵が容易 (室温で1週間, 4℃保存で1年以上)
- 材料各成分の低毒性
- 代謝や排泄が可能
- ウイルスやエンドトキシンの非検出

2種類の人工赤血球

現在、人工赤血球には、ヒトヘモグロビンを利用する方法と、合成物を用いる方法があります¹⁾。

ヒトヘモグロビン利用の人工赤血球

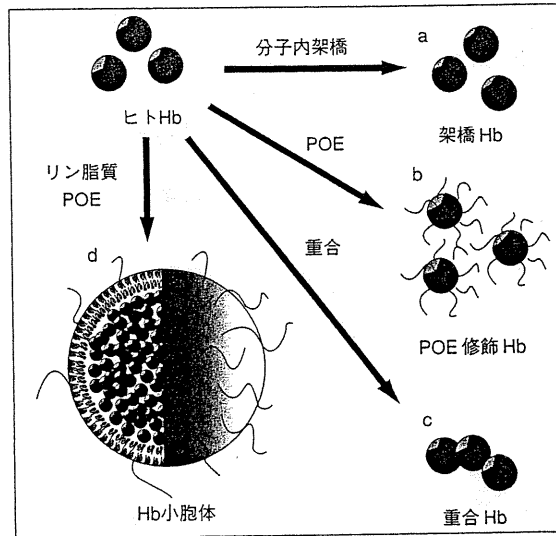
ヒト赤血球から取り出したヘモグロビン (Hb) をサブユニット²⁾に分解させないための補強 (図1a)、あるいは、高分子の髭を生やして安定度を高める (図1b)、さらにはいくつかを連結してやる (図1c)、などの方法で加工したもの (修飾ヘモグロビン) が対象とされています。ヘモグロビンを単独で投与しても、すぐに腎臓から排泄されてしまうので、血中滞留時間を延長する方法として利用されます。

ほかに、大きさは赤血球とかなり異なりますが、小球 (vesicle) の中にヘモグロビンを詰め込む方法があります (図1d)³⁾。これが、実は最も期待をかけられているヘモグロビン小胞体 (HbV) なのです。

合成人工赤血球

もう一つの考え方は、ヘモグロビンのような生体由来の原料を使用しないで、酸素の結合場所だけをもつ分子を用いる方法です。

例えば、ヘモグロビンの酸素結合席として知られている「プロトポルフィリンIX」の誘導体 (通称リピドハム: Lh) を用いるのです (図2)。



◀図1 ヒトヘモグロビン利用の人工赤血球

ヒトヘモグロビン利用の人工赤血球

一酸化炭素化で精製する

まず赤血球を洗って、一酸化炭素を接触させると簡単に結合し、カルボニル化ヘモグロビンができますが、安定度が非常に高くなるので加工に便利です。

酸素化ヘモグロビン (HbO₂) が60℃で変性するのに対して、一酸化炭素型 (HbCO) になると75℃までの耐性があるので⁴⁾、加熱処理によるウイルス不活化などの感染防御操作が可能です。精製も簡単で、ほとんど全量のヘモグロビンが回収できます。もちろん、この純粋ヘモグロビンは化学的・物性的に何ら本物と違いはないわけで、当然、酸素を再結合する能力も変わりありません。この場合、最終加工が終わってから、脱カルボニル化してデオキシ型に戻して保存し、利用に

*1 1997年度厚生科学研究に初めて「人工血液」が取り上げられた。人工赤血球, 人工血小板, 人工免疫の3項目にわたる内容が決定されている。

*2 機能発現の単位である蛋白質が複数成分から構成されているとき、その成分をサブユニットという。ヘモグロビンは、二つのα鎖と二つのβ鎖の合計4個のサブユニットの集合体である。

*3 赤血球に含まれているヘモグロビンは、一般に濃度35%である。実際、人工赤血球 vesicle を35%濃度に造粒することは困難を伴うが、現在では具体化する過程が確立されている。

*4 一酸化炭素化したヘモグロビンからのCOの完全除去は、普通、容易ではない。しかし、特定波長光を照射下で処理する方法で、割に簡単に数分間で酸素と置換したヘモグロビン vesicle に調製することができる。このプロセスは他の領域へも十分活用ができるものである。