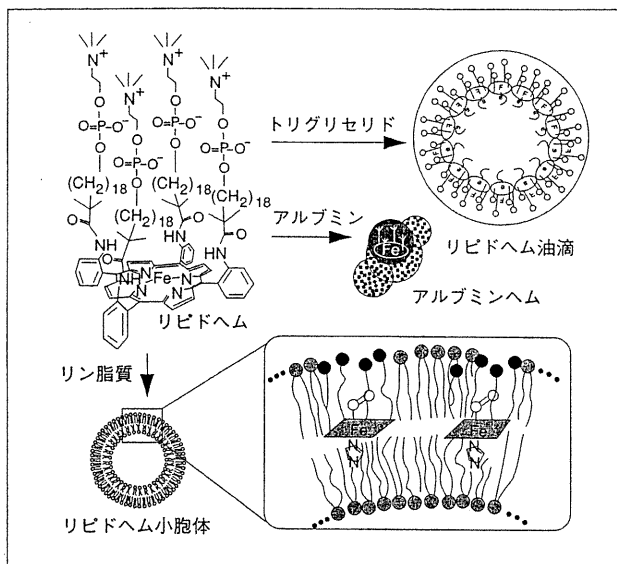
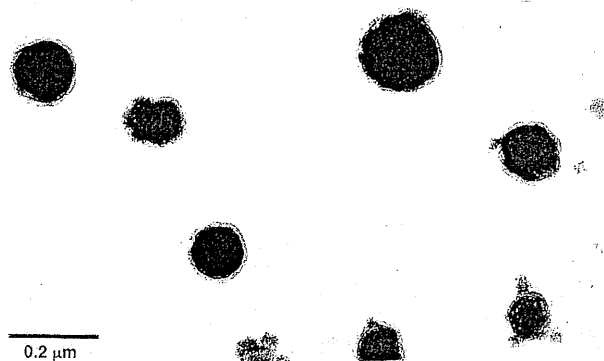


▶図2 全合成人工赤血球



▶図3 人工赤血球 薄い皮が見える。



供します。

小胞体の“皮を剥ぐ”

もう一つ重要なことですが、“皮”を被せた粒 (vesicle) を作る場合、例えば、リン脂質集合体の被膜ですと何層かの厚みがあります。少量のリン脂質は栄養になりますが、ある量を超えると免疫系の混乱を起こすので、当然許容量があるわけです (図3)。

2lを超えるという大量投与例では、免疫系の混乱は必至です。したがって、どうしても“1枚皮”にしなければなりません。リン脂質分子集合体は、分子に2層膜⁵⁾を形成しますが、これだけである強度をもちますので、特殊フィルターを透過させて2分子層被膜1枚だけにします。

コラム：白い血液

以前、ミルクのような白い「人工血液」の開発が話題になったことがある。フロロカーボンの水相分散液で、米国では引き続き改良が継続されている。

1977年頃日本でも白い人工血液の猿 (ヒビ) への投与実験が行われた。一番の欠点は酸素輸送能力が十分でなく、必要量の1/3～1/5程度のため、酸素デントの中に置かなければならなかった。

vesicleの表面加工

体内投与に際し、血液と接触して起こる凝集などの変化は困ります。これを防ぐには表面修飾が有効です²⁾。

赤血球膜の表面には情報分子としての糖質が結合しており、血液型を決めたり、毛管中を変形して移動する時の情報伝達の役割を果たしているのです。そして抗体反応に影響されずに血液中を泳ぎ、期待される役割 (酸素輸送) を果たすという意義があります。

人工赤血球の保存と利用は？

着色ビンでの冷凍保存 (-80℃) では、2年以上変化ありません。凍結乾燥した粉末は、インスタントコーヒーのように所定量の水を加えて振盪するだけで、人工血液として利用できるのです (図4)。

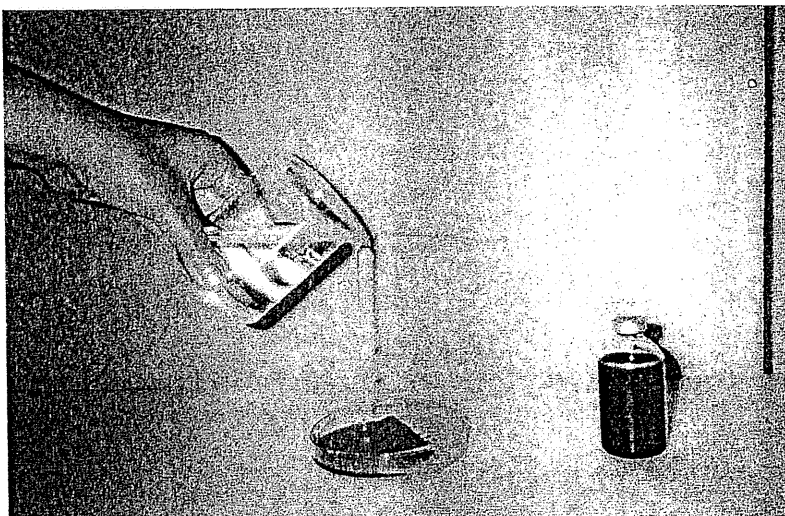
このように、ヘモグロビン vesicle の利用価値はかなりはっきりしてきました。粘度や膠質浸透圧は調整容易です。また、酸素親和度も調節可能です。

修飾ヘモグロビンの応用

修飾ヘモグロビンの投与は、急激な血圧上昇をもたらす副作用があるので、従来、輸血代替には不向きとされました。

これは、血管内皮分泌の弛緩因子 (NO：生理活性分子) が捕捉されるため血管収縮が起こり、血圧上昇の要因となるのです。しかし、この効果を逆に出血性ショック時の昇圧剤に利用する「ヘモグロビン治療薬」としての

▶ 図4 人工赤血球の粉末
所定量の水を加え振盪するだけで酸素輸液となる（インスタントコーヒーの操作に類似）。



応用も考えられています³⁾。

微小循環とダイナミズム

毛管を流れる赤血球は、変形して血球径より小さい毛細管を通り抜けていきますが、交通渋滞時の車列のように不規則に動いています。

このような微小循環動態は、侵襲を加えることなく光ファイバー^{*6}で経皮的に観測できます。ビデオ撮影、映像を電気信号に変えて、デジタル解析もできます（図5）。体の各部を同時測定して、それが心拍量や呼吸とどう関係するか、あるいは体の場所による投与物の分布などの違い、全体の恒常性調節との関連も含めて動的議論をすることができます。

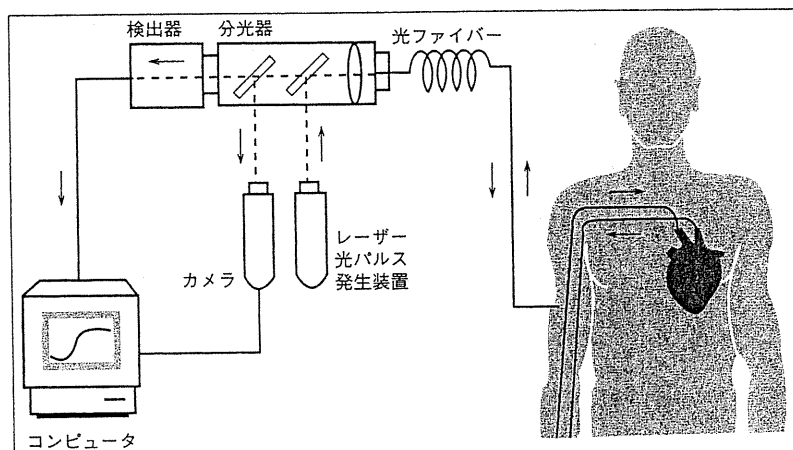
面倒なのは、それらの計測データを変換するソフトの問題で、現在、私たちはそれを持っていないので、国内の企業研究陣や米国の研究者とも交流しながら推進を図っているところです。これには人工物を入れたときの評価はもちろん、毒性や代謝のほかにも体内の変化などのさまざまな評価項目があり、直接的には人工血液を体に入れた瞬間からホメオスタシスにどう影響するかをみることができます⁴⁾。

こうした意味で、微小循環（microcirculation）の観測はきわめて重要な評価過程と考えています。

全合成系の構造

蛋白質を使わない酸素輸送

小球（vesicle）にしたヘモグロビン



▲ 図5 血流動態を観測する仕組み
患者に苦痛を与えることなく、光ファイバーによって、毛細血管の血流量変化や移動する血球成分を顕微観察できる。映像を数値解析し、薬物の効果などを瞬時に評価できる。

の投与について述べてきましたが、それとは別に、グロビンのような蛋白質を一切含まない酸素輸送系も誕生しています（図2参照）。

リビドヘム（Lh：鉄リビドポルフィリン）を小胞体を形成する分子集合体の成分として混合すると、構造がよく似ているため安定度の高い共集合体が構成できます⁵⁾。また、このリビドヘム自体が両親媒性分子ですから、簡単に自分たちだけで集合した小球を作ることにもできます（図7参照）^{6,7)}。この場合は構成分子のすべてが酸素を結合できますので、酸素輸送量は、 $10^3 \sim 10^4$ 倍という大きな違いがでます⁸⁾。

最近の興味ある話題に、血清アルブ

*5 リン脂質の形成する2分子層膜

リン脂質のような両親媒性分子は、水相系で分子集合により、親水基を外に向けた分子2層膜を形成する。この球状中空の分子集合体はリン脂質小胞体とも呼ばれ、よく細胞膜のモデル、あるいは内相に薬物を取り込ませた DDS（drug delivery system）としても利用される。

*6 光ファイバー（photo-fiber）

最近、臨床試験などにおいて、薬物投与時の影響を直ちに直接画像観測、あるいはその経時的変化を数値解析する試みも検討されるようになり、microcirculation法と呼ばれる、光ファイバーを用いた外科的侵襲のない動的観測や解析が可能になりつつある。光ファイバーを用いてレーザー光を照射したり、あるいは毛管を流動している血球や物質系の移動・変化など、微小循環動態を直接に経時的観測することはきわめて重要な情報を与える。これを数値情報に変換して評価するのである。

コラム：粒 (vesicle) の大小でこんなことが…

0.2～0.25 $\mu\text{m}\phi$ 程度の人工小球 (vesicle) にヘモグロビンを詰めた場合と、ヘモグロビン (サブユニット4個) に架橋あるいは修飾、さらにまた、重合させたポリヘモグロビンとの効果を比べると、平衡定数が100倍違う。

血管は、常時弛緩するために、内臓から常時ニトロキサイド (NO) が放出され弛緩が図られている。これは、主にリラックス状態を保つための重要な信号であるが、単分子のヘモグロビンでは、赤血球と違って非常に分子径が小さいため内皮に接近しやすく、ヘモグロビンはNOと結合 (酸素とはめかえ) してしまうために、NO濃度が減少してしまう。すると、血管は瞬間的に収縮し、血圧が上昇する。ボランティアの若い男女のテスト例 (60名) では、10ml以内の投与で血圧が180～220 Torrに上昇する結果となった。

人工赤血球 (0.25 $\mu\text{m}\phi$) のように粒が大きくなると、このような現象はない。

ミンの利用があります⁹⁾。ヒトアルブミンの役割は近年多くが明らかになってきています。運び屋としての特徴もありますので、小型化したリポドームをアルブミン分子の中に導入し包接させた系が考えられました。すると、アルブミン1分子当たりヘム8個が入るのです。ヘモグロビンとアルブミンの分子量は両方ともほぼ同じで6.5kDです。ヘモグロビンはサブユニット四つからできており、酸素分子4個を結合できます。しかしアルブミンにヘム8個が入ると、分子量当たりヘモグロビンの2倍量の酸素を運べる計算になります。このアルブミンヘムは、毒性も低く、代謝されやすいといった特性が、動物実験で確認されています (図6)。

このアルブミンヘムもまた、インスタントコーヒーに似た粉末を簡単に作ることができ、所定量の蒸留水を添加して振り混ぜるだけで機能回復ができますから、将来は常時棚へ備蓄しておいて、必用に応じ溶解使用する、という姿になるでしょう。重要点は「血液型がない」ので誰にでも投与でき、緊急に際し面倒な手続きはいりません。ただ投与すればよいのです。

リポドボルフィリン集合体

成分の全部がリポドボルフィリンだけでできている vesicle の構造は、図7のようになっています。鉄ボルフィリ

ンが並んでいますが、鉄と鉄は、分子間相互作用が起らない距離に配置されています。自発的にそういう配置になるわけです。電子顕微鏡写真では、黒い線が入っているように見えます。

この vesicle は直径0.2 $\mu\text{m}\phi$ の大きさで、外側層に1万個、内側層に6200個ほどが配置されていますので、同じ数の酸素分子が結合して輸送されることを意味します。換言しますと、この場合、投与濃度を非常に少なくすることができます。

栄養輸液への応用

現在、通常栄養輸液として市販されている注射薬は白色の生理塩水溶液ですが、これは界面活性剤で保護されている非常に小さな脂肪小球 (トリグリセリド) が使われています。リポドームは両親媒性の分子ですから、混在すると自発的に脂肪球の外層に配置して、たいへんきれいな酸素輸液を構成します。つまり、リポドームを界面活性剤の代わりに利用した、酸素輸液が可能になったのです。

この系は牛乳のような白色ですが、空気にふれて赤い色に変わります。これで所定量の酸素を運ぶことができます。

血流中での半減期の調節

血流中における全合成系人工赤血球の半減期は、この例では12時間くらいです。これは、調整条件を少し変え7～24時間の間で調節できます。永久に体内にあるわけではありません。

こうした代替物は役割が終わったら

▶図6 アルブミンヘムの投与効果

ラットの全血液量の70%をアルブミン5%溶液で置き換えると、血圧も組織内酸素量も低下する。さらに40%脱血した状態で、アルブミン溶液を投与(40%)しても死亡するが、アルブミンヘム溶液を投与(40%)すると、血圧が元に戻るだけでなく、酸素量もかなりの状態まで回復する。

できるだけ早く代謝系に入ってくれたほうがよいわけです。健康体であれば、骨髄からどんどん新しい細胞が誕生してくるのですから。緊急の用だけを足すという意味では、この半減期の調節は非常に大切なことでしょう。

凝固系への影響はあるか?

人工赤血球が凝固系へどう影響するのかは、まだ研究の継続段階ですが、現在のところ問題はなさそうです。動物実験の場合には遠隔で3~4週間を観測して、ほとんど影響ないという結果を得ています。

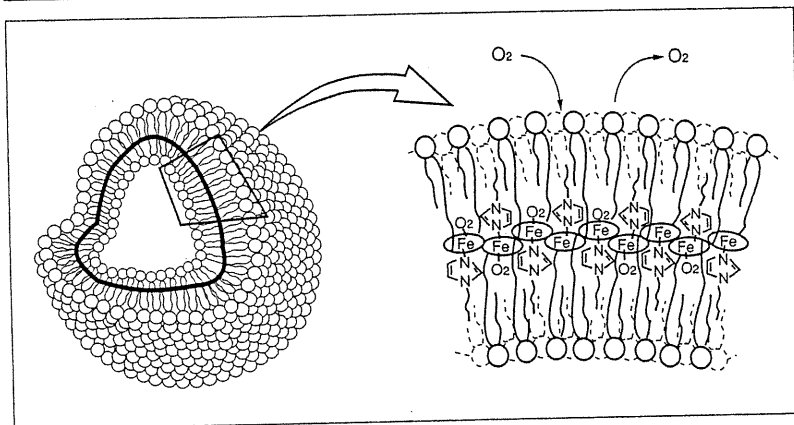
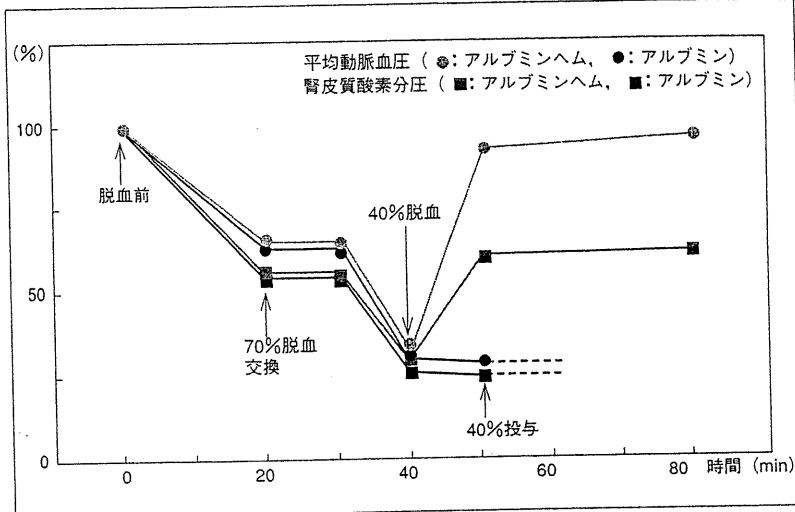
また、凝固系の能力が低下し、交換輸血時にカニューレシヨン部位からの出血が止まらなくなる現象もありません。現在では技術も向上し、特殊な場合以外は凝固系の充進も低下もみられなくなっています。

危機管理用備蓄としての人工血液

人工血液は、重要領域ということで、米国でも特に国防省関係の機関が関与しています。

人工血液は、ヒトヘモグロビンそのものを利用するのか、それともヘモグロビンを細胞型粒子として投与すべきか、未だ解決すべき課題として残されています。それとも量産供給が容易で感染の危険がまったくない、全合成系を採用するのかは、早い決断が必要になります。

わが国でも例えば、地震などの緊急事態により100~200万人という大勢が輸血を必要とする緊急状況に至った



▲図7 リポドポリリンだけからできている vesicle の構造

とき、わが国の現状では対応のしようがありません。したがって、人工血液の開発については、日常的医療への対応としての重要度だけではなく、緊急時に対応する危機管理という意味でも、国家的見地からの対策として考える必要があるのは自明のことでしょう。

また、栄養が十分行き届いて文化的生活に慣れた人たちがばかりを対象にするのではなく、もっと国際的に広い視野での必要も対象とすべきとする、強い要請もあります。

文献

1. Tsuchida E. Artificial red cells, materials, performances and clinical study as blood substitutes. Chichester: John Wiley & Sons, 1995.
2. Sakai H, 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 1996; 8: 23-30.

3. Malcolm DS, et al. Characterization of the hemodynamic response to intravenous disaspirin cross-linked hemoglobin solution in rats. Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol 1994; 22: 91-107.
4. Izumi Y, et al. Physiological responses to exchange transfusion with

hemoglobin vesicles (HbV) as a artificial oxygen carrier in anesthetized rats. Crit Care Med 1996; 24: 1869.

5. Tsuchida E, et al. Polymerized liposome/lipidheme as oxygen transporter under physiological conditions. Macromolecules 1989; 22: 2103-7.
6. Tsuchida E, et al. Self-assembled lipidporphyrin bilayer vesicles. microstructure and dioxygen binding in aqueous medium. Langmuir 1995; 12: 1877-84.
7. Komatsu T, et al. Lipidheme/micro-

sphere. A new totally synthetic oxygen-carrier under physiological conditions. Chem Lett 1992; 1325-8.

8. Komatsu T, et al. Oxygen transporting ability of lipidheme microspheres as a totally synthetic red cell substitute. Artif Organs Today 1996; 5: 207-15.
9. Komatsu T, et al. O₂-transport albumin: A new hybrid-haemoprotein incorporating tetraphenylporphyrin (II) derivative. Chem Lett 1995; 813-4.

||||| **新刊・好評図書のご案内** |||||

麻酔に関するナースはもちろん、ドクターの方にも

麻酔とその周辺診療

—サポートとナーシングの実際—

福井医科大学教授 後藤 幸生 編著



主な内容

- 周術期麻酔前進管理
- 手術部外での麻酔管理と看護
- ティ・サージャリーでのナーシング
- 救急外来におけるナーシングの要点
- 集中治療部管理面でのナースの役割
- 麻酔科外来診療のサポートとナーシング

近年医学の臨床部門では統合的診療が求められています。中でも麻酔科診療は、漸進的立場からコントロールする分野なので、実践に基づいた広い知識が必要です。本書は、『ナースのための麻酔・蘇生学』をこの時代の要請に応え、新進気鋭の新執筆陣が全面的に書き改められました。

▶ B5判 333頁 136図 ▶ 定価 (本体 4,300円+税)

卒業研修マニュアル・臨床実習に最適な一冊!

麻酔蘇生科 研修マニュアル

福井医科大学教授 後藤 幸生 編



主な内容

- 麻酔・蘇生学と麻酔科医
- 術前の評価と前投薬
- 特殊状態の患者の麻酔
- 麻酔開始までの準備・点検
- 脊椎麻酔と硬膜外麻酔
- 伝達麻酔
- 全身麻酔の導入法
- 気管内挿管法
- ……
- ……

本書は、これから麻酔科の研修を始めようとする方や各科から研修にきたローテイト研修医の要望に応じられるよう、麻酔学から一歩進展した麻酔蘇生学の極めて広範な知識と技術を、できるだけ簡潔に2色刷りで読み易く解説した卒業研修マニュアルです。忙しい時でも辞書的に読め、学生の臨床実習にもおおいに役立つ書としてお勧めします。

▶ 四六倍判 414頁 113図 ▶ 定価 (本体 8,253円+税)

南山堂 〒113-0034 東京都文京区湯島4丁目1-11 TEL 03-5689-7856 FAX 03-5689-7857
<http://www.so-net.ne.jp/medipro/nanzando/> E-mail: nanzan-e@magical3.egg.or.jp

分子集合を利用した人工血液

土田 英俊*

Artificial blood based on molecular assembly

For substitution of oxygen transporting ability in blood stream, artificial red cells have been widely developed for recent years. Since the role of the other blood components can be replaced by synthetic molecules (chemical reagents), the realization of artificial O₂-infusion leads to complement of the artificial blood based on the present transfusion techniques.

This review describes the recent topics of the development of artificial red cells, especially on hemoglobin (Hb) based materials and totally synthetic lipidhemes. The Hb vesicles (HbV, cellular type) with appropriate O₂-binding ability have several advantages in comparison to the acellular types such as crosslinked Hb. The results of animal tests clearly represented the *in vivo* oxygen delivery by HbV. On the other hand, molecular assemblies of synthetic lipidhemes act as O₂-carrier under physiological conditions. More recently, albumin-heme hybrid has also been developed as a new type of the O₂-infusion series.

Eishun Tsuchida*

key words : artificial blood, artificial red cells, oxygen-infusion, hemoglobin vesicles, lipidheme system, albumin-heme

血液成分のうち酸素輸送の役割を担う赤血球以外については、現在なんらかの代替物が存在しているので、酸素輸送体が具体化すれば現行の輸液利用技術と併せ、いわゆる人工血液が完成する(表1)。長期保存可能な人工血液がパックや粉末として棚置きで常備されており、緊急時にいつでもどこでもその必要量を供給できる体制の確立は、近い将来の医療現場に望まれる姿であろう。

確かに輸血技術が整って以来、健康人からの献血による輸血用血液の確保とその備蓄、さらには成分採血の普及や血漿分画製剤の利用が市民の医療福祉の向上に大きく貢献してきたことは周知のとおりである。しかし、ウイルス感染(AIDSや肝炎など)、非溶血性発熱反応、GVHD (graft versus host disease) など抗原感作への対応はまだまだ重

要課題として残されている。これが献血に際しての煩雑な検査と厳重な管理、自己血輸血や造血因子補強に注力せざるをえない現状を招来している。わが国の場合、輸血システムが完備されているので、平常時の対応には余裕があるともいえるが、災害時や各種の事故に際して、必ず必要となる緊急輸血に備えて、感染の心配がなく血液型に関係なく投与できる人工血液の常備は、国家的見地からも危機対応の重要施策といえる。このような背景から近年、赤血球代替物の開発が国内外で強力に推進されてきている¹⁾。

最終的には、酸素輸送を障害なく代替できる完全無害の全合成系人工血液(酸素輸液)の普遍的供給が望ましいが、現行輸血システムとの関連からヒトヘモグロビン(Hb)を利用する方法を先行させようとしている。筆者は永年にわたって分子集合科学を利用したヒトHb利用系と全合成系の人

工赤血球(図1)を展開してきているので、最近の動向も含めてここに紹介したい。

* Department of Polymer Chemistry, Advanced Research Institute for Sci. & Eng. Waseda University, 3-4-1 Okubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555 早稲田大学理工学総合研究センター, 高分子研究室
Offprint requests to : Prof. Eishun Tsuchida, Ph. D.

表 1 血液の成分とその代替物

血 漿 (55%)		血 球 (45%)			
蛋白質	電解質	糖 質	赤血球	白血球	血小板
アルブミン	(Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ ,	脂 肪	ヘモグロビン		
グロブリン	Mg ²⁺ , Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ ,				
フィブリノーゲン	HPO ₄ ²⁻)				
その他					
代替物	血漿増量剤	脂肪乳剤	人工赤血球	抗生物質	人工血小板
	デキストラン	ブドウ糖輸液		ワクチン	
	修飾澱粉			抗ウイルス剤	
	抗生物質				
	ワクチン				
	人工免疫				

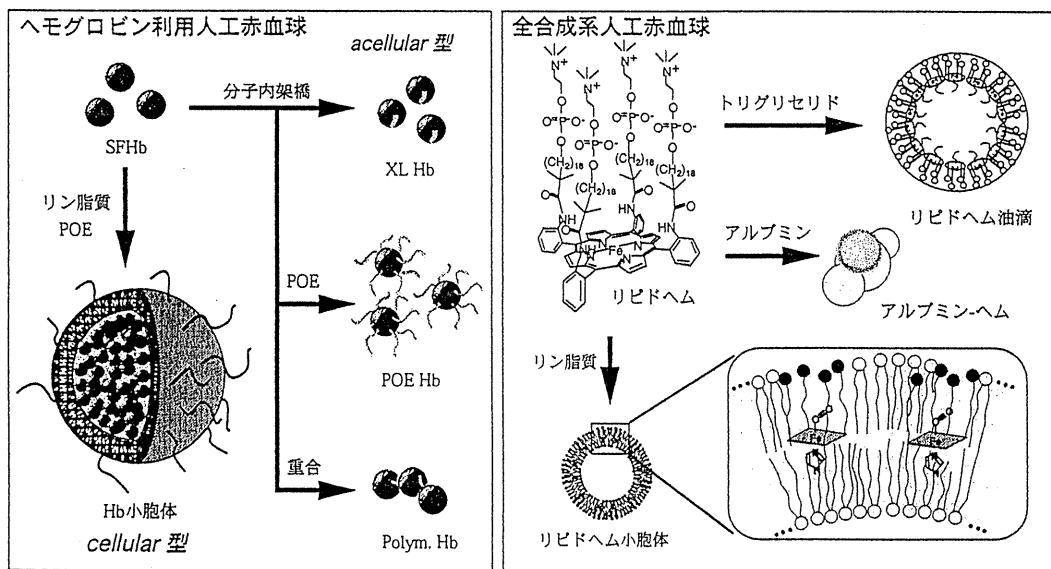


図 1 ヘモグロビン利用型と全合成系人工赤血球

人工赤血球の分類, 構造, 機能

現在, 臨床応用を目指して研究開発されている酸素輸液を大別すると, パーフルオロケミカル乳剤, Hb 利用系, それに全合成系の 3 種類である. なかでも米国をはじめ, もっとも期待がかけられているのが Hb 利用の赤血球代替物である. 赤血球膜を完全に除去したストローマフリー-Hb (SFHb) は, すべての人に共通で凝固系阻害もないが, 静注すると Hb はサブユニットの二量体に解離して腎から短時間で流出するため, 酸素輸送の役割を果たすことができない.

また, Hb 製剤時に酸素親和度調節成分(2, 3-ジホスホグリセリン酸, DPG)が除去されるため

に, 酸素親和度が高くなる. しかも, 血液と同じ Hb 濃度(16 g/dl)では膠質浸透圧が上昇するので, そのままの投与は到底困難である. このため Hb の分子内架橋, あるいは高分子結合 Hb や重合 Hb の形にして血中滞留時間の延長がはかられてきた.

(1) 修飾ヘモグロビン (acellular 型)

DPG の代わりにピリドキサル-5'-リン酸 (PLP) を結合させて酸素親和度を調節したヒト SFHb に, ポリオキシエチレン (POE) など水溶性高分子の複数個を直接に共有結合させて得た高分子結合 Hb では, 腎排泄が抑えられて血中滞留時間が延長する²⁾. また, PLP 結合 SFHb をグルタ

表 2 HbV, LhV, AlbH 溶液の特徴と赤血球との比較

Parameters	HbV/albumin	LhV	AlbH	RBC
Diameter (μm)	0.25 \pm 0.08	0.03	0.005	ca. 8
P ₅₀ (Torr)	34	40	30	28
[Hb] (g/dl)	10	—	—	12~17
[heme] (mM)	6.2	5~10	6.2	7.4~10.5
[Lipid] (g/dl)	5.71	17~35	—	1.8~2.5
O ₂ release (ml/dl)	6.1	5.6	3.5	5.5~7.7
metHb (%)	<3	0	0	<0.5
HbCO (%)	<2	0	0	<5
Viscosity (cP at 230 s ⁻¹)	3.7	3.8	1.3	4~5
Osmolarity (mOsm)	300	300	300	ca. 300
Oncotic pressure (Torr)	20	25	25	ca. 25
pH	7.4	7.4	6.8~7.5	7.2~7.4
Density (g/cm ³)	1.0336	1.01	1.01	1.05

ルアルデヒドで架橋すると、いわゆる重合 Hb が得られるが分子数が低減するため、膠質浸透圧を低く (Hb: 15 g/dl で 20 Torr) 保つことができる³⁾。

この場合、溶液粘度も低く、高濃度 Hb 溶液としての投与も可能となる。そのほか、ジアスピリンを用い分子内架橋させた Hb は構造の明確さの点ですぐれており、酸素親和度 (P₅₀: 28 Torr) も良好⁴⁾、最近では直接にヒト赤血球からではなく遺伝子工学的に培養菌体に Hb を産生させた、いわゆるリコンビナント Hb も注目されるようになってきた⁵⁾。

このような修飾 Hb 系はそのすぐれた性能と保存安定度が確認されており、臨床第 III 相試験が終了した例 (米国) もある。しかし、膠質浸透圧や粘度の増大に起因する投与限界量の存在、化学修飾に伴う Hb の変性、血流中での比較的早いメト化など、Hb が小胞に包まれている赤血球の生化学的意義を再認識させられる問題が生じてきている。最近では、この効果を逆に昇圧剤として利用、あるいは脳卒中後遺症や、心筋梗塞、腫瘍の治療などへの応用にも、焦点が当てられている。

(2) ヘモグロビン小胞体 (cellular 型人工赤血球, HbV)

HbV は、高濃度 Hb (ca. 38 g/dl) をリン脂質小胞体の内相へ封入し、毛管流動と細網内皮系捕捉を考慮して粒径を 200 nm ϕ に揃えた、いわゆる細胞型の人工赤血球である⁶⁾。もちろん、酸素親和

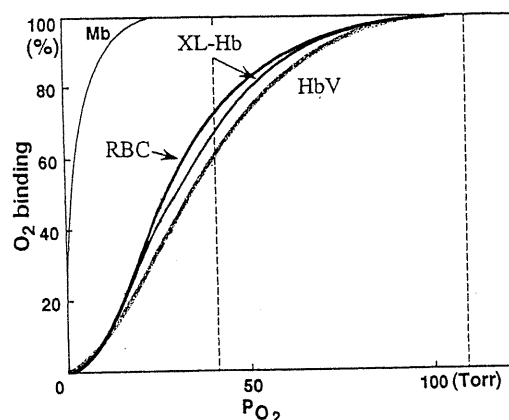


図 2 HbV の酸素結合解離曲線

度は PLP 添加により適切値 (P₅₀: 27~39 Torr, n: 1.7~2.7) に調節している。調製過程で重要な点は、高純度 Hb の精製、ウイルス不活化処置、さらに粒径制御である。現在では一酸化炭素結合 Hb では物理化学的安定度がきわめて高くなる特徴を利用した加熱処理法が確立されている⁷⁾。精製 Hb の SDS-PAGE と IEF のパターンからは、他の膜成分や水溶性蛋白質が完全に除去されていることが確認できる。HbA₀ やその他の Hb の等電点もまったく変化なく、純度 99.5% の Hb 溶液が得られている。

このほかにも、バルボウイルス除去のためのペンベルグマイクロ孔膜 (BBM) を利用した、ウイルス不活性化法も確立されてきている⁸⁾。HbV の調製は extrusion 法により行われ、孔径 0.2 μm までの特殊フィルターを通過させながら粒径を制御し

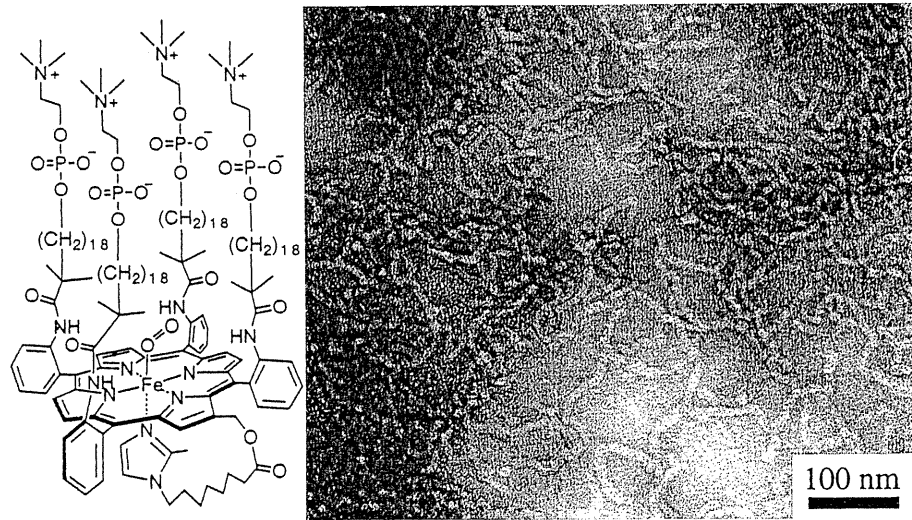


図3 リピドヘムの化学構造とそれからなる繊維状の酸素錯体の電顕写真

ていく。

また、HbVの膠質浸透圧は1 Torr以下で、これは分子 10^4 個以上のHbが一つの袋(赤血球)に閉じこめられている効果にほかならない。この場合、膠質浸透圧の値はアルブミンやデキストランを添加するだけで任意に調節することができる。しかし、HbVをそのままアルブミン溶液に分散させると、アルブミンとの相互作用により凝集を惹起することがあるが、表面をポリオキシエチレン(POE)で修飾すると、これは完全に抑制できる⁹⁾。

表面修飾法は容易で、たとえばHbV分散液に合成糖脂質やPOE脂質を添加するだけで、自発的に共集合現象により外表面に取り込まれ、小胞体の表面修飾が完了する。表面修飾がない場合には部分凝集が起こり、特にずり速度が低い領域で高い粘度を示すが、これもPOE修飾により血液とほぼ同程度の値に保つことができる。

また、HbVは当初長期保存した場合の形態安定度の問題を残していたが改良が進み、トレハロースを共存させた系を乾燥粉末化する技術など、注目すべき進歩が確立されている(表2)¹⁰⁾。

HbVの酸素結合解離曲線をみると、PLPの作用によりその酸素運搬効率は赤血球よりも高い値を示すことがわかる(図2)。すなわち、ヒト赤血球と比較した場合、同濃度では肺-末梢組織間において、HbVのほうがもっと多くの酸素を輸送で

きるのである。

(3) リピドヘム集合体(全合成系人工赤血球)
他方、リン脂質類似構造置換基をもつ鉄リポドポルフィリン誘導体(リピドヘム, Lh)を小胞体膜の2分子層間に分散配向させると、生理条件下で可逆的に酸素吸脱着できる合成系人工赤血球(生理塩溶液, 38°C, 大気下)(リピドヘム小胞体, LhV)となる¹¹⁾。最小粒子径は30 nmφまで調製可能、凍結乾燥した粉末は適量の水を添加して容易に再生ができる。この分散液は蛋白質をまったく含まない純人工物なので、将来的には無菌雰囲気での化学プラントで安全に大量生産と安価供給が可能である。

酸素親和度(P_{50} : 30~40 Torr (37°C))は、赤血球の値(P_{50} : 27 Torr)とほぼ同等に調整でき、肺-末梢組織間の酸素運搬効率は約25%となる。酸素結合速度(k_{on} : $10^7 M^{-1} s^{-1}$)は、ヘム部自体が膜成分として機能するため、赤血球の値にくらべて 10^3 倍速い¹²⁾。各種の物理化学測定から配位酸素の電子構造はHbと同様であることが明確にされている。

さらに興味深いことは、これらLhが水中で自己集合してLhのみから構成されている分子集合体(小胞体型: 粒径100 nmφ)を形成することである¹³⁾という事実にある。もちろん、この場合も酸素の可逆的吸脱着が可能で、粒子一つあたり



図4 赤色のヒトアルブミン-
ヘム複合体(AlbH)溶液

1.5×10^5 モル(ヘムと同モル数)の酸素分子を結合できる。

ごく最近、分子内に軸塩基配位子のイミダゾールを共有結合したLh誘導体が合成され、それが水相系で幅10 nmの繊維を形成、さらにこれが酸素を可逆的に結合解離する大変興味深い実験結果も得られている(図3)¹⁴⁾。

Lhは両親媒性分子であるので、これを界面活性剤としてダイズ油を乳化して得たLh油滴小球(LhM: 粒径200 nm ϕ)は、栄養輸液と同様の構造をもつ¹⁵⁾。酸素吸着席であるLhが油滴小球表面を被覆している構造をとり、処方や粒径制御により酸素溶解量は任意に調節可能、たとえば赤血球の2倍量に相当する高濃度酸素輸液の調製もできる。

ヒト血清アルブミン(HSA)に疎水性のLhを効率よく結合させた複合体(アルブミン-ヘム, AlbH)は、自然界には存在しないまったく新しい酸素輸液で、これが生理条件下で酸素を可逆的に運搬できることが明らかにされた(図4)¹⁶⁾。アルブミン1分子あたりヘム8分子までを包接できる、包接ヘムの数に係わりなく、その結合数によらず、高次構造、等電点など、HSAの物理化学的特徴にはまったく変化がない。また、酸素の結合能も一定値を保つ。

現在、急速に進展してきているリコンビナントHSA(r-HSA)にヘムを結合させた系の酸素運搬能力も、HSA系と比較して遜色のないことがすでに実証されており、新しい全合成系酸素運搬体としての期待が集まっている。

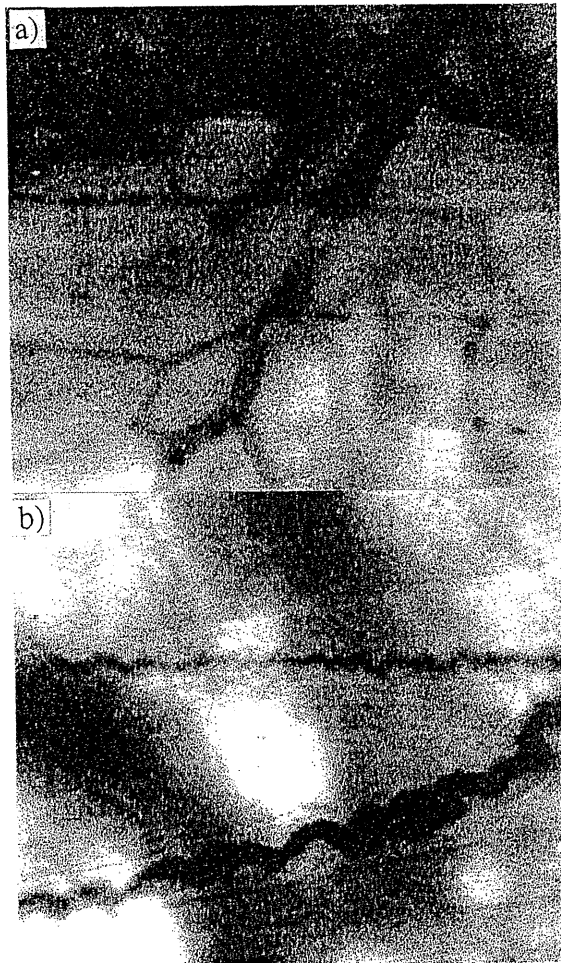


図5 非麻酔ハムスターを用いた80% HbV交換
投与試験における毛細血管の顕微観察

人工血液の臨床試験

Hb利用系(ヘモグロビン利用治療剤)についての前臨床評価はすでに最終段階にきている。修飾Hbを投与すると、その後の血圧異常亢進が避けられない問題として残る。これは小さなHb分子が血管内皮細胞の接合部位を通過した後、平滑筋近傍にまで接近し、血管弛緩因子であるNOを捕捉するためである¹⁷⁾。HbVではこのような投与直後の急激な血圧上昇は、まったく認められていない。

また、摘出肝臓にHbVを灌流して、画像システムによりNADHの酸素代謝の亢進を蛍光消光挙動として観測すると、酸素が組織内を輸送される様子が確認できる。これに対して、修飾Hb溶液の

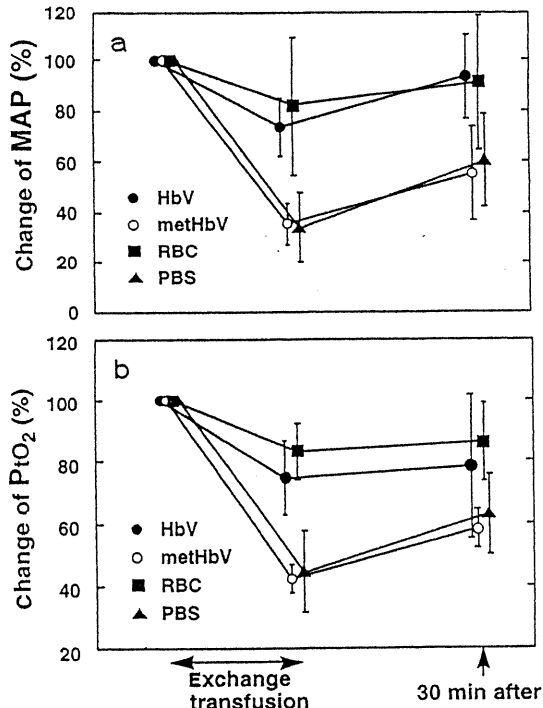


図 6 麻酔ラットを用いた40%HbV 交換投与試験の結果
a : MAP. b : PtO₂

場合は灌流圧が急激に上昇し、血管収縮が認められている。肝臓の毛細血管は類洞様の構造であり、径150 nm程度の孔が壁面に開いているので、修飾Hbはこれを容易に通過して漏出、そこで肝臓血管における弛緩因子(CO)を捕捉して、血管収縮を起こすためである¹⁸⁾。

無麻酔ハムスターの背部皮下組織血管の微小循環動態の顕微鏡観察からは、血管径の変化、血流速度、組織の酸素分圧との相関が明らかにされている¹⁹⁾。HbV投与の場合は、血管全体に均一分散している様子がわかる(図5 a)。一方、表面修飾をしていないHbV群では毛細血管、および細静脈内で凝集体が観測される(図5 b)。毛細血管ではそれが赤血球を追いかけるように流動することから、ずり速度の小さい赤血球後部で凝集が生起すると推測されている。

リン酸緩衝生理塩水溶液(PBS)に分散させたHbV(Hb濃度(10 g/dl), 酸素親和度(P₅₀):32 Torr)を麻酔ラットに交換輸血(40%)し、末梢組織(腎皮質)の酸素分圧や平均動脈圧(MAP)の推

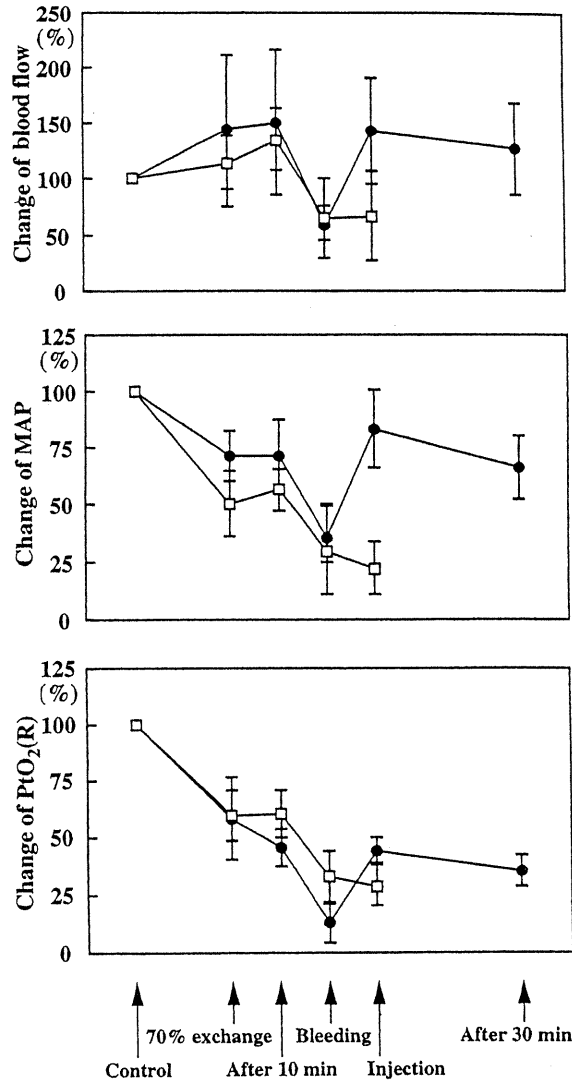


図 7 麻酔ラットを用いた70%Alb 交換投与+40%AlbH 投与試験の結果
● : AlbH. □ : Alb

移を観測すると、計算上だけでなく実際にヒト血液と同等の酸素輸送量を示す(図6)²⁰⁾。PBS群やmet Hb群では交換後のMAPは交換前の35%まで低下、左腎皮質酸素分圧にも同様の傾向を認めているのに対し、HbV群では75%値を維持、同Hb濃度の洗浄赤血球(RBC)群とほぼ同様な結果を示している。さらに、交換輸血90%以上の試験では、血圧、末梢酸素分圧、心拍量ともにRBC群と同様に安定した推移を示し、生存率は100%である⁹⁾。

HbVを50%交換輸血したラットについて、30

日後の臓器病理所見は正常、血栓形成もまったく認められず、95%交換輸血でも全例の生存が確かめられている。肝臓の網内皮系に一過性の貯留を認めるが、安全性はきわめて高い。残された課題は、最終的に網内皮系への取込みが飽和された後、エンドトキシンや感染に対する免疫機能が十分に作動するかどうかであり、現在検討が進められている。肝脾機能は重要で、投与後脾臓における貪食能亢進は認められるものの、肝機能の異常例は少ない。

全合成系人工赤血球の前臨床試験も実施されている。30%脱血ショック犬へのLhV投与試験では、いったん低下した混合静脈酸素分圧は投与後確実に上昇するので、これが有効な酸素運搬体として作動していることが確認された²¹⁾。LhM分散液を用いた同様の試験でも同等の結果が得られており、ヘムの血中滞留時間は12時間、急性毒性も認められず、Lh濃度に対応した*in vivo*酸素運搬量が実測されている²²⁾。血中脂質濃度はLhM分散液投与直後に上昇するが、24時間後にはほぼ投与の前値に回復しており、注入された脂肪が体内で円滑に処理されていることを意味している。

また、過度の出血ショックラットへAlbHを投与すると、確実に救命できる実験事実が報告されている。酸素結合能をもたないアルブミンを投与しただけでは30分以内に全例が死亡するのに対して、AlbH投与群では血圧の上昇、血液ガスパラメーターの回復など、酸素運搬を明確にあらわす結果が得られている(図7)。

人工赤血球開発の展望

米国では、加工調製が容易かつ経済的で、代謝系も比較的はっきりしている分子内架橋型Hbの開発に集中した推進がはかられており、一部はすでに臨床第III相試験を終了、製造プラント完成を待って明年(1998年中)に上市を予定している。リコンビナントHb系、分子間架橋型Hb系でも臨床試験が進行中で、世界的需要をにらんだ量産設備の具体化が進められている。

また、酸素の物理的高溶解量を利用したパーフルオロカーボン乳剤も、脳や心臓の低温手術にお

ける利用など、新用途に向けて検討が継続されている。わが国でも上述したように、HbV系について前臨床最終評価試験成績をまとめる段階にある。

一方では、自己血輸血やerythropoietin投与による赤血球増殖などの進展に伴い、現行輸血体制の変革も議論されるようになりつつあるが、当面はHb利用系赤血球代替物の促進が優先することになる。その場合、細胞(cellular)型か非細胞(acellular)型かの選択が重要な意味をもつことになるが、用途に応じたそれぞれの使いわけが有効で、おのおののもつ効能を最大限に発揮させることに重点をおく考えもある。また将来は、これらヒト由来のHbを用いる代替物展開よりも、赤血球に近い酸素輸送能力を十分発揮できる、全合成系が重要との認識が強まってきており、現在その推進が加速されつつある。

1997年9月7~10日(4日間)、第7回血液代替物国際会議(The 7th International Symposium on Blood Substitutes-Tokyo 1997)が東京で開催された。現在急進しているHb利用系人工赤血球の臨床試験結果も含めた、最新的话题を中心に議論が集中、この領域に国際的関心が集まっていることを明示している。

文 献

- 1) Tsuchida E(ed.): Artificial red cells, materials, performances and clinical study as blood substitutes. John Wiley & Sons, Chichester, 1995.
- 2) 岩下研二: 酸素運搬機能を発現. 化学 43: 440-441, 1981.
- 3) Sehgal LR, Moss GS: Preparation and *in vitro* characterization of polymerized pyridoxalted hemoglobin. Transfusion 23: 158-162, 1983.
- 4) Malcolm DS: Characterization of the hemodynamic response intravenous disaapirin cross-linked hemoglobin solution in rats. Biomater. Artif. Cells Immobil. Biotechnol. 22: 91-107, 1994.
- 5) Gerber MJ, Stetler GL, Templeton D: Chap.10 Recombinant human hemoglobin designed for use as an oxygen delivering therapeutic. Artificial red cells, materials, performances and clinical study as blood substitutes.(ed. Tsuchida E), John Wiley & Sons, Chichester, 1995, p 188-197.
- 6) Tsuchida E, Takeoka S: Chap.3 Stabilized hemoglobin vesicles. Artificial red cells, materials, performances and clinical study as blood substitutes.(ed. Tsuchida E), John Wiley & Sons, Chichester,

- 1995, p 35-64.
- 7) Sakai H, Takeoka S, Yokohama H, Seino Y, Nishide H, Tsuchida E : Purification of cobcentrated hemoglobin using organiac solvent and heat treatment. *Protein Expr. Purif.* 4 : 563-569, 1993.
 - 8) Sekiguchi S, Abe T : 1998, (paper in prep).
 - 9) Sakai H, Takeoka S, Park S, Kose T, Nishide H 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, 1996.
 - 10) Sakai H, Hamada K, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E : Physical properties of hemoglobin vesicles red cell substiutes. *Biotechnol. Prog.* 12 : 119-125, 1996.
 - 11) Tsuchida E, Nishide H : Hemoglobin model-artificial oxygen carrier composed of porphinatoiron complexes. *Top. Curr. Chem.* 132 : 64-99, 1986.
 - 12) Tsuchida E, Komatsu T, Babe T, Nakata T, Nishide H, Inoue H : Amphiphilic porphinatoirons having steroid groups and their oxygen-adduct formation in an aqueous medium. *Bull. Chem.Soc. Jpn.* 63 : 2323-2327, 1987.
 - 13) Tsuchida E, Komatsu T, Arai K, Yamada K, Nishide H, Fuhrhop J-H : Self-assembled lipidporphyrin bilayer vesicles : Microstructure and dioxygen binding in aqueous medium. *Langmuir.* 11 : 1877-1884, 1995.
 - 14) Komatsu T, Yanagimoto T, Furubayashi Y, Wu J, Tsuchida E : Bimoleculcular fibers made of lipidporphyrinato-zinc(II) and-iron(II) with an intramolecular coordinated axial imidazole. 1998, (submitted).
 - 15) Komatsu T, Matsubuchi E, Nishide H, Tsuchida E : Lipidheme/microsphere : A new totally synthetic oxygen-carrier under physiological conditions. *Chem. Lett.* 1992 : 1325-1328, 1992.
 - 16) Komatsu T, Ando K, Kawai N, Nishide H, Tsuchida E : O₂-transport albumin : A new hybrid-haemoprotein incorporating tetraphenylporphinatoiron(II) derivative. *Chem. Lett.* 1995 : 813-814, 1995.
 - 17) Sakai H, Hamada K, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E : Functional evaluation of hemoglobin- and lipidheme-vesicles as red cell substitutes. *Polym. Avd. Tech.* 7 : 639-644, 1996.
 - 18) Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E 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.
 - 19) Sakai H, Tsai AG, Kerger H, Park SI, Takeoka S et al. : Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with red cell subbstitute consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J. Biomed. Materials Res.* 40 : 66-78, 1998.
 - 20) 小松晃之, 松淵永里子, 西出宏之, 土田英俊, 渡辺真純・他 : 人工赤血球(リピドヘム)による in vivo 血流中での酸素運搬. *人工臓器* 21 : 299-303, 1992.
 - 21) Izumi Y, Sakai H, Hamada K, Takeoka S, Yamahata T et al. : Physiologic responses to exchange transfusion with hemoglobin vesilces as an artificial oxygen carrier in anesthetized rats : Changes in mean arterial pressure and renal cortical oxygen tention. *Critical Care Medicine* 24 : 1869, 1996.
 - 22) Komatsu T, Muramatsu Y, Kuronuma A, Nishide H, Tsuchida E et al. : Oxygen transporing ability of lipidheme microspheres as a totally synhetic red cell substitutes. *Artif. Organs Today* 5 : 207-215, 1996.

酸素輸液の開発動向

土田英俊 酒井宏水

●修飾ヘモグロビン系の酸素輸液の臨床試験はほぼ明らかになってきているが、問題も残している。これに対しヘモグロビンやリポドヘム小胞体が具体化してきている。

*

キーワード：修飾ヘモグロビン、ヘモグロビン小胞体、リポドヘム小胞体、酸素輸液、人工血液

■酸素輸液への期待

輸血システムの確立により普遍的に輸血用血液が常備されるようになり、医療の進展に大きな貢献をしてきたが、問題点も指摘されている。輸血に伴う感染（HBV, HCV, HIV, ATLV）の確率は、献血液の厳重な検査と管理によって数十万分の1にまで低下しているものの、未知のウイルスも考えると感染の可能性を完全には否定できない。赤血球の保存期限は合成保存液 MAP によって改善され、一時期6週間まで延長されたが、保存期間中の低温繁殖性細菌の混入が問題となり、結局3週間に戻った経緯がある。また、同種血輸血には同種免疫抗体の出現や重い輸血合併症〔移植片対宿主疾患（graft versus host disease : GVHD）〕の危険性がまだ残る。

手術中輸血開始の目安である血液 Hb 濃度 10 g/dl を 7 g/dl へ見直し、低温無輸血手術、自己血輸血の推奨と血液希釈、エリスロポエチン（赤血球造血因子）投与による術前貯血が一般的になってきている。これらの方法は条件に恵まれた場合の話で、緊急時など症例によっては不可能である。1 回当りの採血量は 400 ml になったが、若年者の

減少により健康献血者総数は高齢化に伴い低下しつづけている。献血液の有効利用を目的として酵素で血液型物質を切除して O 型赤血球のみとする方法は有力で、現在臨床試験が進行中である¹⁾。

また、polyoxyethylene を赤血球表面に導入して型物質をマスキングする方法や、光増感法で血液中の HIV を不活化する方法も検討されている。しかし、これらも同種血輸血と同様に保存期限があること、保存中の汚染、信仰上の理由での輸血拒否、災害時の緊急需要に対し大量供給ができない

サイドメモ

一酸化窒素 (NO) と酸素輸液

1998 年度ノーベル生理・医学賞は、細胞内で産生される一酸化窒素 (NO) が情報伝達物質として作動することを解明した 3 博士 (Furchgott, R. F., Ignarro, L. J. and Murad, F.) に与えられた。NO 合成酵素は、L-アルギニンを L-シトルリンに変換する過程で NO を生成し、これがヘム蛋白質グアニレートシクラーゼと結合することで、神経伝達、血小板凝集抑制、血管弛緩、気道平滑筋弛緩、生体防御などの生理機能を発揮させる役割を果たしている。

実は NO は酸素輸液にも密接な関係がある。Hb に対する親和度がきわめて高いため、修飾 Hb の投与にさいしてみられる副作用（末梢循環障害、血圧亢進、血小板沈着、食道蠕動の異常など）は NO の捕捉反応に起因していると考えられている。一酸化炭素 (CO) もヘムオキシゲナーゼによるヘム代謝過程で産生され、肝では血管弛緩因子として作動していることが明らかにされている。CO も Hb に対する親和度が高く、この場合も修飾 Hb は CO を捕捉し、類洞血管の狭小化を引き起こし、結果として灌流圧が上昇する。一方で、直径約 0.2 mm の Hb 小胞体では赤血球に近い構造をしているため、NO および CO の結合反応は抑制される。この細胞型酸素輸液は現在、日本で臨床試験を開始するための準備が進められている。

Recent progress in oxygen infusion
Eishun TSUCHIDA and Hiromi SAKAI : 早稲田大学 理工学
総合研究センター

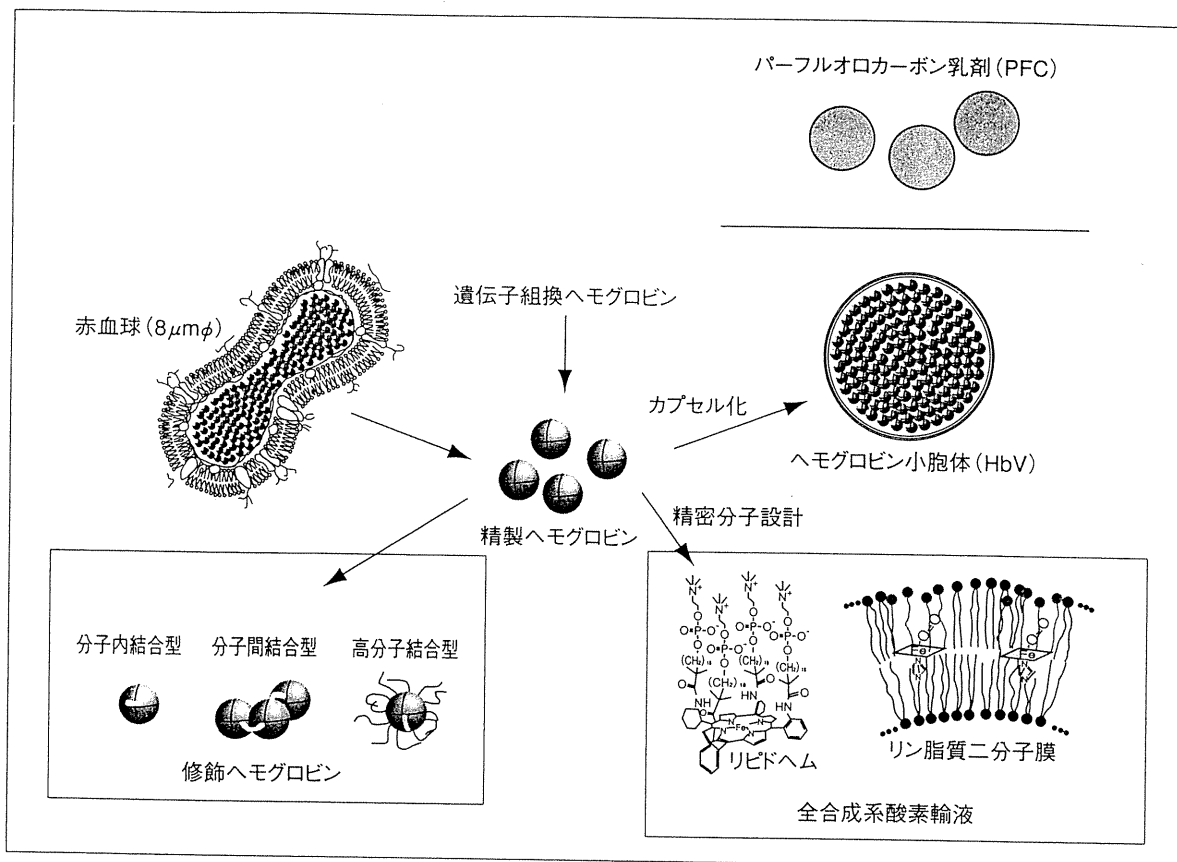


図1 酸素輸液の開発動向

点にも問題が残る。

このため、血液型に関係なくいつでも即応できる代替物に対する期待が大きくなってきている²⁾。わが国が血液製剤を大量に輸入している現状と厚生省の積極的な姿勢は人工血液開発研究を促進することになった。酸素輸液に要求される項目は、膠質浸透圧、溶液粘度などの数値も含め、基本的には血液と同等に挙動すること、構成成分の毒性が低く、大量投与後も代謝や排泄が可能なこと、ウイルスやエンドトキシンがないことである。

■修飾ヘモグロビンを用いる酸素輸液の臨床試験

1. 歴史的背景と最近の動向

ヘモグロビン (Hb) を用いた酸素運搬体の開発は1898年に von Stark が、また1916年に Selland と Minot が粗製 Hb をヒトに投与したことにはじまる。1945年以降、精製ヒト Hb の多くの投与試験がなされたが、血圧亢進、腎毒性、溶血、短い血中滞留時間が問題となった。Rabiner らは Hb 精製工程での赤血球膜成分除去率向上により毒性低

減に成功した。Hb のサブユニットが解離し糸球体尿細管内で一部変性不溶化して腎障害をもたらすが、Bunn らは Hb の分子内架橋により解離を防止し、腎障害の低減にはじめて成功した (1967)。また pyridoxal 5'-phosphate や 2, 3-diphosphoglyceric acid の結合による酸素親和度の低下などの重要な発見があった。これらを契機に、高純度 Hb の精製単離、酸素親和度の調節、血中滞留時間延長などに研究目標が絞られた³⁾。

修飾 Hb は現在6社が臨床試験を進めている。これは当然、出血ショック蘇生以外の目的 (術前血液希釈、体外循環、鎌形赤血球貧血病、卒中、臓器保存、昇圧剤、一酸化炭素中毒、癌治療、液体換気、獣医学など) も考えられていること、また輸血システムの整備が遅れ、輸血用血液が慢性的に不足している途上国の大きな需要が市場動機となっている (図1, 表1)。

2. 非セル型酸素輸液の開発グループ

① polyoxyethylene 修飾 pyridoxalated ヒト Hb……味の素が開発した polyoxyethylene (POE)

表 1 修飾 Hb などに関する最近の臨床試験結果

O ₂ -infusion TM ; Corporation	composition	indications	clinical trial	remarks
PHP ; Apex Bioscience Co.	pyridoxylated human Hb conjugated with POE	septicemia	III	RBC aggregation? high oncotic pressure
HemAssist ; Baxter Healthcare Co.	human Hb intramolecularly cross-linked with bis (3, 5-dibromosalicyl) fumarate	hypotension Hemodilution	III (suspended)	vasoconstriction---> high mortality
Optro ; (Somatogen, combined to Baxter, 1998)	recombinant crosslinked Hb in <i>E. coli</i>	hemodilution Erythropoiesis (AIDS)	II I, II	development of other types : oligomer Hb, low NO affinity
Hempure ; Biopure Co. (Oxyglobin)	glutaraldehyde-polymerized bovine Hb	hemodilution (veterinary use)	III	possibility of Mad cow disease FDA approved in Feb. 1998
PEG-Hb ; Enzon Co.	bovine Hb conjugated with POE	radiosensitization of tumor	II	seeking for a partnership possibility of Mad cow disease
Hemolink ; Hemosol Co.	o-raffinose-polymerized human Hb	trauma hemodilution	II ---> III	wide Mw distribution
PolyHeme ; Northfield Lab.	glutaraldehyde-polymerized human Hb	trauma	III	leading company after Baxter
Oxygent ; Alliance Pharm.	emulsified perflubron	hemodilution cardiopulmonary bypass	II ---> III II	flu-like symptom
Oxyfluor ; HemaGen/PFC	emulsified perfluorodichlorooctane	cardiopulmonary bypass	II	complement activation
Perftoran ; Perftoran Sci.	emulsified perfluorocarbon with proxanol	hypovolemia		small particle size (30 nm) and low turbidity. O ₂ solubility is 1/5 of human blood. approved by Russian Ministry of Public Health for sale and industrial output (1997).

修飾 pyridoxal 化ヒト Hb (略称: PHP) は、分子量約 110,000, 酸素親和度が 21~24 mmHg の赤色溶液である⁴⁾。maltose 添加で凍結保存, 粉末化保存が可能である。膠質浸透圧は血液と同等に調節できる。90%血液交換後のイヌは 1 年以上障害なく生存した。血中滞留時間は約 40 時間, 半分は細網内皮系に捕捉され, 残り半分は尿として排出される。出血ショックイヌモデルでは投与直後に肺動脈圧亢進と赤血球凝集も認められ, 末梢循環低下も考えられる。腎, 肝機能に異常は認められないが, 数カ月間空胞が残る。味の素は, アメリカ特許取得 (1986), FDA の臨床第 I 相試験の認可 (1992) を得た後, Apex Bioscience 社 (New Jersey) が継承 (1994) して臨床試験を進めている。投与量 100 mg/kg では顕著な障害や毒性は認めない。

敗血症時に多量放出される NO が血管弛緩に働き低血圧と組織灌流の低下をもたらすが, Apex 社は PHP を NO 捕捉剤として使用し血圧上昇を認めるので, この用途の特許を取得している⁵⁾。現在第 III 相試験が進行している。昇圧剤 catecholamine よりも副作用が低いのが特徴である。

② $\alpha\alpha$ 鎖間分子内架橋ヒト Hb (DCLHb) ……Hb 分子内の $\alpha\alpha$ 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 社と Letterman 研究所との共同で応用研究が進められた経緯がある。Baxter 社の DCLHb (HemAssistTM) は, おもに NO 捕捉による体動脈血圧と肺動脈圧の異常亢進が明らかとなった。この血圧亢進を出血ショック時に少量投与で血圧回復できないかとの観点から, 臓

器によっては組織灌流の改善を利点としていたが、臨床結果はかならずしも所期の効果を上げなかったため、再試験に入っている。HemAssist ([Hb]: 10 g/dl, 膠質浸透圧: 40 mmHg) の臨床第 I 相試験 (1992) は、最大 100 mg/kg までの投与で血圧亢進、腹痛、乳酸脱水酵素量の増大のほか重大な副作用を認められないとし、第 II 相試験を開始 (1993)⁶⁾。血液透析および大動脈手術では血圧安定化に寄与した。イギリスでは敗血症患者に投与して過剰生成 NO の捕捉により昇圧、延命に成功した。1996 年 6 月には第 III 相試験の認可を受け、200 人もの心臓手術患者に試された。抗原性はないが⁷⁾、副作用として、代謝により血尿、bilirubin による皮膚の黄変、amilase と lipase 濃度上昇が認められた。ごく最近まで欧米で行われた第 III 相試験 (重症外傷出血患者に対する投与試験) では、通常の緊急治療 (生理塩水投与) 群と比較して生存率に有意差を認めず、1998 年 9 月に試験継続を断念した。Baxter 社は後述の Somatogen 社を併合し、recombinant-Hb 系の開発を進めている。

③ **Glutaraldehyde 重合-ウシ Hb**……Biopure 社が開発した HemopureTM は glutaraldehyde 重合ウシ Hb 溶液 ([Hb]: 13 g/dl, P₅₀: 30~35 mmHg, oncotic pressure: 25~30 mmHg) である。精製工程で未反応 Hb を除去しているが、Creutzfeldt-Jacob 病 (狂牛病) を引き起こす prion の完全除去の保証がない。癌組織の酸素富化をめざした治療も試行中である。Biopure 社は、Upjohn 社と提携して Hemopure の品質を向上させ、臨床試験を開始、最高 45 g (350 ml) 投与で、血尿はなく半減期 20 時間、エリスロポエチンの倍増が認められている。鎌形赤血球貧血症患者の第 I 相および第 II 相試験 (0.6 g/kg) では、とくに副作用を認めていない⁸⁾。腹部大動脈手術前の血液希釈に用いた場合 (3~9.2 ml/kg)⁹⁾、脳の血流は維持されるが、血圧と末梢血管抵抗の増大、心拍出量と酸素運搬量/消費量の低下などが報告されている。ここ 2~3 年以内に FDA の認可を得ることを目標としている。動物臨床でもウマの出血ショックに試されたが、腹部異常や心拍出量の低下が認められた。イヌの高度交換輸血では比較の HES 群と酸素輸送量に有意の差がなく、また脳虚血モデル (ウサギ) へ

の投与では血管収縮のため逆に、梗塞部位が拡大するなどの副作用も報告されている。しかし、ごく最近になって獣医学領域での使用が FDA により認可 (1998 年 2 月) され、商品名 OxyglobinTM, 13 g/dl 濃度の酸素輸液が棚置きで 2 年間安定として現在市販が開始されている。

④ **Polyoxyethylene 修飾ウシ Hb**……Polyoxyethylene (POE) を結合したウシ Hb を Enzon 社が開発 ([Hb]=5.5 g/dl, P₅₀: 10 mmHg, Mw: 123,000) している。味の素の PHP と類似物質であるが、精製に Hb 表面電荷の相違を利用するアニオン交換樹脂分画法を用い特許取得に成功した。膠質浸透圧の上昇を考慮して味の素が Hb 当り POE 鎖 8 本の修飾に抑えたのに対し、Enzon では 12 本までを導入し、膠質浸透圧は 120 mmHg ([Hb]: 5.5 g/dl) に達する¹⁰⁾。新しい精製法を採用し血尿排出は 1% 以下、腎毒性が低減され、長い血中滞留時間 (ウサギ: 半減期 43 時間) を示すこと、また抗原性の低いことが利点となっている。Biopure 社と同様、ウシ Hb を使用し原料調達に問題はないが、きわめて小さく (Mw: 21 kDa) 熱にも安定な prion の完全除去ができていないかが鍵となる。高い膠質浸透圧はよくないとされてきたが、POE-Hb の血液量増大効果のため 50% 交換輸血後の脱血ショックでも血圧低下を示さず、適応によっては有利に働く。血圧亢進は血管内皮弛緩因子の捕捉以外に高い膠質浸透圧に基づく血液量増大が原因とも考えられる。ブタの 80% 交換輸血モデル、出血ショックからの蘇生モデルでは良好な成績が得られているものの、酸素親和度 P₅₀: 10 mmHg は他社製品に比較して著しく高く、本当に十分量の酸素を放出できるのか、酸素運搬と血漿増量のどちらがおもに効果を発揮しているのか疑問が残る。また、腸間粘膜毛細管からの滲出と炎症反応を副作用として認めている。POE-Hb を腫瘍部を酸素化して放射線感受性を高める試薬としての研究を進め¹¹⁾、臨床第 I 相試験を終了、8.33 ml/kg まで投与した。第 II 相試験を実施し、約 20 名の癌患者の放射線治療を試みた。Enzon 社はこれらの技術を導入する企業を探している (1998)。

⑤ **recombinant Hb (rHb)** ……Somatogen 社 (Baxter 社に併合) はヒト遺伝子で大腸菌 (*E. Coli*)

に導入して rHb を開発 (Optro™, rHb 1.1) した¹²⁾. β 鎖 Asn-108 を Lys にすることで酸素親和度を低下 (29 mmHg), α 鎖間を glycine で架橋して Arg (141 α_1) GlyVal (1 α_2) とし, Hb 分子がサブユニットの二量体に解離せず血中滞留時間は HbAo よりも長く, 腎毒性もないとされる. 大量生産プロセスの確立, 遺伝子による産生法の効率化, *E. coli* と反応副生物の完全除去などが, 現在における製造工程の問題であるが, 濃縮を含め工程経費の切り下げが必要である. ラットへの少量投与 (1 g/kg) では HemAssist と同様に NO 捕捉による血圧亢進と末梢血管抵抗の増大, とくに肝, 腎, 腸への血流が低下するものの, 心臓と骨格筋への血流は増大する. 1991 年より Optro の臨床試験を開始, 1994 年からは Eli Lilly 社と共同開発を開始した. 第 I 相試験の結果, 食道括約筋内の神経伝達系 NO を Hb が捕捉して括約筋弛緩を抑制, 食道の蠕動運動に異常をきたし, 痙攣性嚥下困難と胸痛の副作用が起こることが報告された¹³⁾. 他社の修飾 Hb 系の臨床試験でも胸部不快感は報告されており, NO 捕捉に起因する Hb に共通の機序と考えられる. 1995 年からは第 II 相試験を実施し, 末期腎臓病患者や貧血患者に 100 g まで投与している. エリスロポエチン産生亢進による造血促進効果はごく少量の Optro 投与でみられ, AIDS 治療薬 Azidothymidine の副作用軽減になる. Optro は HemAssist と同様に血圧亢進や血管外漏出があるので, Optro を架橋して四量体としたりオリゴマー Hb を菌体に産生させる技術を開発し, 動物投与した結果では血圧亢進が Optro に比較して低減する [第 7 回血液代替物学会 (東京)]. また, ヘムポケット空間の制御で NO の親和度を低くする方法も進んでいる¹⁴⁾. Somatogen 社は, Baxter 社に併合されたが (1998), rHb の技術が今後主力になると考えられる.

⑥ o-raffinose で分子間架橋したヒト Hb……

Hemosol 社はヒト Hb を o-raffinose で重合した型の修飾 Hb (Hemolink™) として開発した. 現状は分子量分布が広く血中滞留時間に影響するので, 最適値に分子量を制御する必要がある. 50% 血液交換で血液凝固に影響はなく, 67% 出血ショック蘇生では血圧亢進が認められるものの, 2 週間以

上生存した. 皮下微小循環動態は血液と同等に回復する. 摘出腎灌流液として用いた場合, 再吸収および糸球体濾過値が増大¹⁵⁾ した. また, 腎虚血モデルへの投与でも, 対照のアルブミン投与と比較して Creatinin と BUN 濃度が低く, また組織構造も保全されており, 腎機能維持に有効である¹⁶⁾. Hemosol 社は, CellCare 社と提携 (1994) して幹細胞から赤血球を培養する技術開発を開始, 期限切れ赤血球に代わる Hb 供給源として期待される. Hemolink の臨床試験は 1995 年にカナダで開始. 33 人のボランティアに最高 600 mg/kg を投与, 血圧亢進などを認めたが, 低分子成分の除去により改善されたとして, 手術, 外傷, 緊急時の臨床試験の適用を実施している. ヨーロッパでの臨床試験は, Fresenius A. G. 社と提携して実施, イギリスでの第 II 相試験の終了 (1998 年 10 月) を発表した. 12 名の整形外科患者に最高 500 ml 投与, 重篤な副作用はなく, 1,500 ml まで増大させた試験を計画. 続いて第 III 相試験を開始したいとしている.

⑦ ヒト pyridoxalated Hb を glutaraldehyde で重合……Northfield 社 (Canada) は pyridoxalated Hb を glutaraldehyde で重合した Hb 溶液 (Poly-Heme™) を開発している ([Hb]: 10 g/dl, P_{50} : 28~30 mmHg, Mw: 150,000)¹⁷⁾. ヒトの完全血液交換 (Hct < 1%) 後も血流動態が維持され続ける dextran 希釈でも [Hb]: 3 g/dl までは酸素消費量が維持される. Northfield 社が 1989 年に他社に先がけて開始した臨床第 I 相試験では, 30 人のボランティアに最高 63 g (1 ユニット強) を投与したところ, 6 週間できわだった副作用 (血圧亢進, 血管収縮, 発熱, 腎毒性など) は認められなかったという. 第 II 相試験は 23 人の外傷患者に最高 300 g (6 ユニット) 投与, 約 40% の血液が交換され, 血圧亢進などの副作用がとくにないことが論文に述べられている¹⁸⁾. 現在はアメリカで第 III 相試験を開始しており, また Pharmacia & Upjohn AB と提携してヨーロッパ (イギリス, ドイツ, スウェーデン) での試験も計画されている.

■ヘモグロビン小胞体

1. ヘモグロビン小胞体開発の背景と動向

Hb が本来赤血球膜に包まれている理由は, ①

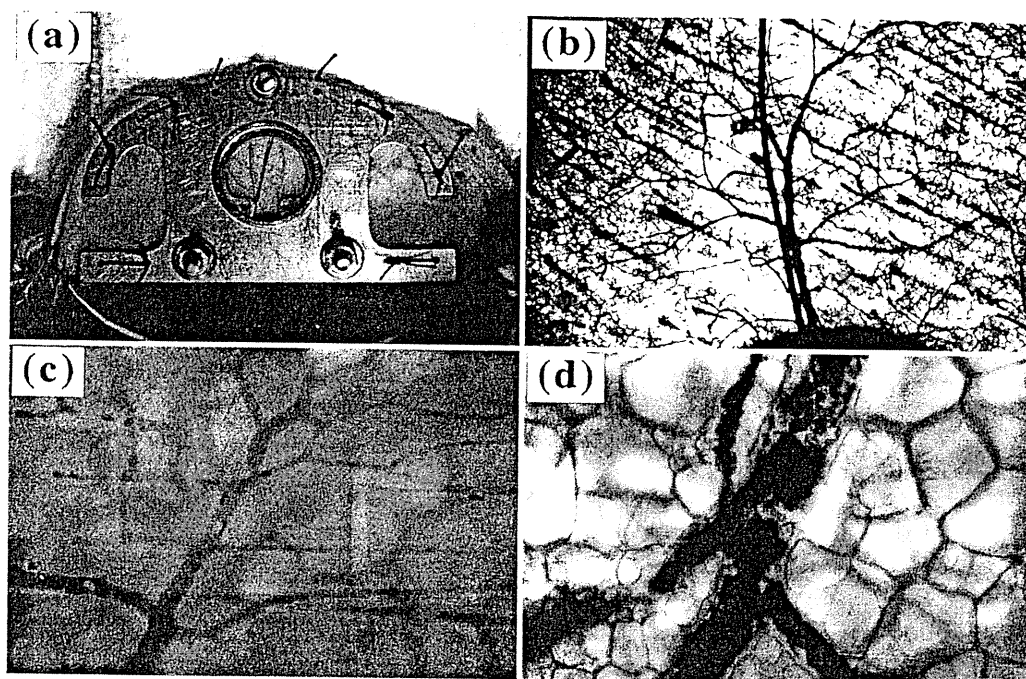


図2 Hb小胞体で全血の80%を交換したときの皮下微小循環動態の解析
 a: ハムスター背部皮下微小循環観測モデル, b: 透過型顕微鏡観測の視野, c: 80%交換輸血
 した後, POE修飾Hb小胞体は毛細管内に均一分散している, d: 一方で未修飾Hb小胞体は細
 静脈内に凝集体を形成し, 血流の障害となる.

35%濃厚Hb溶液の高い粘度と膠質浸透圧の抑制, ②本来毒性を有するHbの逸脱の抑制, ③Hb機能を維持するための各種リン酸, 解糖・還元酵素系の保持, 加えて, ④この分散系は血液と同じ非ニュートン流体で, 体内循環, とくに末梢血管において特色あるrheology流動と生理作用を示す.

このように, 本来の血液のrheology特性を考えれば, Hb分子を直接分散させた溶液として扱う困難よりは, ある粒径の小胞体とすべきことは容易に想像できる. 生体成分であるリン脂質が単独で小球構造の分子集合体を形成する特徴の利用は, 初期においてすでにDjordjevicとMiller(1977)が(リン脂質/コレステロール/脂肪酸)からなるHb小胞体を検討した¹⁹⁾. Hb小胞体の利点は, ①ヒトHbをそのまま利用できる, ②粘度や膠質浸透圧, 酸素親和度を適当な値に調節できる, ③体内滞留時間延長が可能となる, などである.

粒径制御と, 二分子層膜で高濃度Hb溶液を包接する方法は長らく課題とされていたが, 高純度高濃度Hb溶液を用い, またExtrusion法の採用により内包Hb濃度約35%, 薄膜で構成される安定な高性能Hb小胞体の成功は重要である²⁾. ウイル

ス不活化と滅菌も60~70℃での短時間の加熱処理, それに小胞化処理を一酸化炭素化Hb(HbCO)を用いることも有効である. HbCOは最終工程で光照射でオキシヘモグロビン(HbO₂)に変換できる. また, pyridoxal phosphateやinositol hexa phosphateなどのアロステリック因子添加による酸素親和度制御(範囲: 9~60 mmHg)も利点の1つである. NOF(日本油脂社)は不飽和脂質を膜成分に添加し重合安定化を詳細に検討し, 凍結保存や粉末化が可能な系を実現したものの²⁰⁾, 代謝時間が問題となった. polyoxyethylenel(POE)結合リン脂質を導入させる表面修飾は, 小胞体凝集抑制にきわめて有効である. テルモ社は日本血液代替物学会の前臨床評価委員会に試料を提供し, 学術研究機関との共同でPOE修飾Hb小胞体(NRC)の評価試験を実施し, この成果は公式に認められている. また, アメリカ海軍研究所(NRL, Washington DC)で展開されているトレハロースを添加した粉末保存系も実現しているが²¹⁾, 小胞体粒子内のHb濃度はまだ低く, 造粒法ではわが国の技術が優れている.

2. Hb 小胞体の酸素輸送能と代謝過程

Hb 小胞体の動物投与試験の成績は、イヌ/ウサギ/ラットなどに高度交換輸血をした場合でも異常なく、循環動態の保持が確認された。ラットの90%交換輸血試験では、POE 修飾系で心拍出量増大が見られ末梢血管抵抗も低い。また、組織酸素分圧も向上する²²⁾。無麻酔下 hamster の皮下微小循環動態は、POE 修飾 Hb 小胞体系 ([Hb]: 10 g/dl, P₅₀: 32Torr, in 5%albumin) の80%交換輸血後、血管内の小胞体は凝集がまったくなく、血漿相に均一分散している²³⁾ (図2)。他方、未修飾群は細静脈や毛細管内など流速の遅い部位で凝集体の塊状物や紐状が確認されている。血流速度、有効毛細管密度、組織酸素分圧ともに POE 修飾系が未修飾系に比較してきわめて高い値をとり、実用的には POE 修飾による凝集抑制と低粘度が皮下微小循環に不可欠であることを示している。

^{99m}Tc 標識をつけた未修飾系 Hb 小胞体をウサギに投与した後の体内分布観測 (NRL) は、20 時間後でも血液中に 34%、肝に 16%、骨髄に 13%、脾に 10%、腎に 2% の残留となっている²⁴⁾。ほとんどが細網内皮系に捕捉代謝され、各臓器重量は 2 週間以内に回復する。脾と肝は投与 2 時間後に細胞内に空胞を形成しはじめ、24 時間後に最大値を示すが、壊死や肝炎症状はみられない。腎糸球体および肺毛細管内で小胞体による閉塞部位が認められる。また、細網内皮系が飽和した場合の感染抵抗の低下はエンドトキシン投与試験から明らかになっており²⁵⁾、投与量と投与のタイミングが問題となる。しかし、Hb 小胞体は POE 修飾により血中滞留時間が延長されるので、その影響の低減が期待される。テルモ社の POE 修飾 Hb 小胞体 (NRC) に関し、¹⁴C 標識をつけた inulin を小胞体に共存させ、また ¹⁴C-リン脂質を膜成分に混合した NRC を投与して体内動態をみている²⁶⁾。30 ml/kg の投与で血中半減期は 32 時間、しだいに脾、肝、骨髄に移行し、3 日目に最大値を示すが、7 日以内に完全分解される。脂質成分は脂肪細胞に移行する。代謝速度は投与総量の影響を大きく受けるので、Hb 小胞体構成においてできるだけ少ない脂質量で、多くの Hb を内包させて投与総量を低下させる技術が必要である。近年の造粒工

程の工夫によってこれが可能となっているので、代謝の問題点は解決できる。

3. 血管拡張物質としての一酸化窒素と一酸化炭素の役割

NO は Hb に対する親和性がきわめて高く、CO の 1,500 倍、O₂ の 30 万倍である。OxyHb は NO が存在するとただちに結合して HbNO となり、ついですぐに酸化され metHb となる。修飾 Hb 投与にさいし血圧異常亢進や、血小板の血管床沈着などの副作用が認められている²⁷⁾。修飾 Hb (とくに分子内架橋 Hb) は赤血球と比較するときわめて微小なので、血管内膜の平滑筋近傍に接近できるため、NO を捕捉し血管弛緩機能が低下する。このとき、血小板内のグアニレートシ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度はアルブミンに比較して 100 倍大きい。したがって、投与した架橋 Hb はしだい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身体の各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、修飾 Hb 投与後の食道括約筋、腸間平滑筋の異常は NO 捕捉に起因すると考えられている。しかし、他方で NO 捕捉による血圧亢進の性質を逆に利用し、敗血症時にみられる過剰 NO 産生による血圧低下のさい、修飾 Hb 投与による昇圧の効果が認められ、NO 捕捉剤として投与する方法が検討されているが、効果を疑問視する意見も強く、まだ確立されていない。

直径約 0.2 μm の小胞構造の Hb 小胞体では血管外漏出はまったく観測されず、平滑筋まで接近できないので、NO 結合反応は抑制され、血圧異常亢進の生起はない。実際、ウサギ大動脈断片を用いた *in vitro* 試験²⁸⁾ では、架橋 Hb に比較して活性度が 1/100 程度と低いため、赤血球と同等であることが確認されている。

肝臓では hemeoxygenase 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。末松らは摘出肝灌流中の微小循環動態を検討し²⁹⁾、HbAo の投与では Disse 腔に Hb が