

- without hypertension by nitric oxide scavenging. *J. Biomed. Mater. Res.* 64A, 257–261.
- (5) Russo, S. M., Pepe, J. Y., Donohue, S., Cable E. E., Lambrecht, R. W., and Bonkovsky, H. L. (1995) Tissue distribution of zinc-mesoporphyrin in rats: relationship to inhibition of heme oxygenase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272, 766–774.
- (6) Tsuchida, E., Komatsu, T., Ando, K., Kumamoto, S., and Nishide, H (1995) Synthesis and O₂-binding properties of tetraphenylporphyrinatoiron(II) derivatives bearing a proximal imidazole covalently bound at the β-pyrrolic position. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 1995, 747–753.
- (7) The synthetic details and spectroscopic data of the porphyrins can be obtained from the Supporting Information.
- (8) Tsuchida, E., Komatsu, T., Arai, K., and Nishide, H. (1993) Synthesis and dioxygen-binding properties of double-sided porphyrinatoiron(II) complexes bearing covalently bound axial imidazole. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 2465–2469.
- (9) (a) Collman, J. P., Brauman, J. I., Collins, T. J., Iverson, B. L., Lang, G., Pettman, R. B., Sessler, J. L., and Walters, M. A. (1983) Synthesis and characterization of the “Pocket” porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 3038–3052. (b) Collman, J. P., Brauman, J. I., Iverson, B. L., Sessler, J. L., Morris, R. M., and Gibson, Q. H. (1983) O₂ and CO binding to iron(II) porphyrins: a comparison of the “Picket Fence” and “Pocket” porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 3052–3064.
- (10) Tsuchida, E., Komatsu, T., and Yanagimoto, T. (2000) Molecular environment effect on O₂-binding to lipidporphyrinatoiron(II) complexes in aqueous media, *J. Porphyr.* 4, 81–87.
- (11) The eff force field simulation was performed using an Insight II system (Molecular Simulations Inc.). The structure was generated by alternative minimizations and annealing dynamic calculations from 1,000 K to 100 K.
- (12) Severinghaus, J. W. (1966) Blood gas calculator. *J. Appl. Physiol.* 21, 1108–1116.
- (13) Sawicki, C. A., and Gibson G. H. (1977) Properties of the T State of Human Oxyhemoglobin Studied by Laser Photolysis. *J. Biol. Chem.* 252, 7538–7547.
- (14) Sharma, V. S., Schmidt, M. R., and Ranney, H. M. (1976) Dissociation of CO from Carboxyhemoglobin. *J. Biol. Chem.* 251, 4267–4272.
- (15) Steinmeier, R. C., and Parkhurst, L. J. (1975) Kinetic Studies on the Five Principle Components of Normal Adult Human Hemoglobin. *Biochemistry* 14, 1564–1573.

BC049859M

第12節 人工赤血球

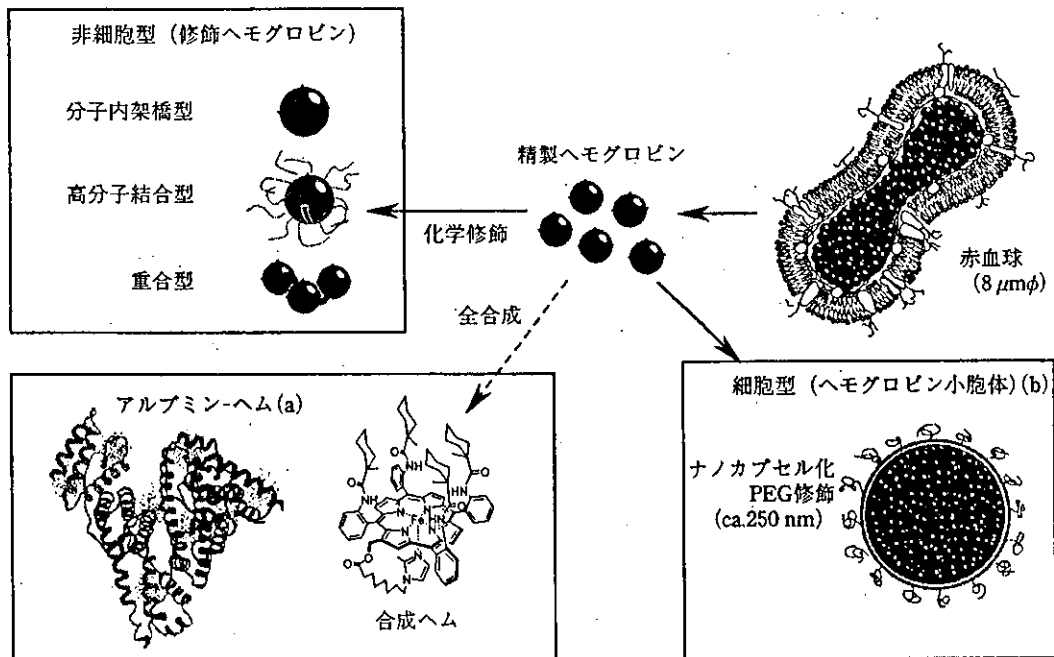
1. 酸素輸液の必要性

輸血システムの確立により、輸血用血液が普遍的に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。輸血にともなう感染の確率は、核酸増幅法など献血液の厳重な検査と管理によって著しく低下してはいる。だが、未知の感染源の可能性も考えると、完全に零とはいえない。加えて赤血球の保存期限はわずか3週間である。献血1回当たりの採血量は400 mlになったが、人口の高齢化にともない健康な献血者総数は低下しつづけている。わが国のように自然災害が危惧される場合、緊急需要に対応した大量保存は重要な国家

的施策でもある。血液型に関係なく要請に即応して、いつでもどこでもただちに供与できる、酸素輸液(人工赤血球)の出現が強く期待されている(図1)。

2. ヒトヘモグロビン小胞体の構成

酸素輸液の開発は歴史的には粗製ヘモグロビン(Hb)の投与(1916年)に始まる。現在は修飾Hb(分子内架橋型、重合型、高分子結合型など直接Hbを加工)の臨床試験が進行中である。しかし、修飾Hb溶液系では血管収縮による血压亢進、代謝異常、軽度の神経毒性など、赤血球とかけ離れた構造に起因する副作用が指摘されている。Hb



精製ヘモグロビン利用の非細胞型(a)と細胞型(b)のヘモグロビン小胞体、また合成ヘム誘導体を利用するアルブミン-ヘムが開発されている。

図1 酸素輸液の開発動向

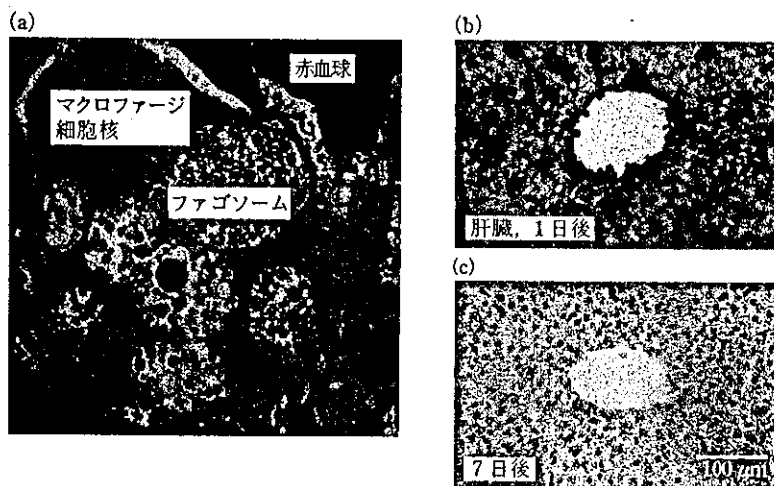
が赤血球内にある理由は、①35%濃厚Hb溶液の高い粘度と膠質浸透圧の抑制、②本来毒性を有するHbの逸脱の抑制、③Hb機能維持のための各種リン酸などエネルギー分子、解糖ならびに還元-酵素系の保持である。また、④血液(血球分散系)は非ニュートン流体で、体内循環とくに末梢血管内における、特色ある流動形式と生理作用の特性を示す。赤血球構造を考えると、Hbを無害なカプセルに入れた細胞型のHb小胞体が有効である¹⁾。粒径制御とリン脂質が構成する2分子膜で高濃度Hb溶液を被覆する課題は、筆者らによって達成された。高純度高濃度の精製Hb溶液を用い、またextrusion法の採用により、Hb溶液(濃度35%以上)がほぼ1枚膜に包まれた、Hb小胞体の製造に成功した。ウイルス不活化と滅菌の困難も、Hbに一酸化炭素(CO)を結合して安定化させ60~70℃の加熱で完了した。最終段階で光照射励起により、酸素を結合したHbO₂に変換する。またアロステリック因子を共存させて、酸素親和度の制御(9~60 Torr)ができる。Poly(ethyleneglycol)(PEG)結合脂質を粒子表面に配置して、小胞体粒子間の凝集抑制と分散安定度向上の効果を観測し、この表面修飾過程を動力学的に明らかにし、溶液のまま室温にて2年以上保存

できる系が構築されている。

3. ヘモグロビン小胞体の投与試験

Hb小胞体の動物投与試験では、90%超の高度交換輸血の場合でも、循環動態保持が確認されている^{2),3)}。小胞体表面をPEG修飾すると、小胞体凝集を抑制でき、粘度と膠質浸透圧はほぼ血液と同等の非ニュートン流体になる。80%交換輸血における皮下微小循環動態の検討では、血管内を流動するPEG修飾Hb小胞体に凝集は認められず、血漿相に均一分散している⁴⁾。他方、未修飾群は細静脈や毛細管内で凝集体が観測されている。血流速度、有効毛細管密度、組織酸素分圧ともにPEG修飾系が、未修飾の系に比較しきわめて高い値に推移し、PEG修飾が不可欠であることが確認できた。

Hb小胞体の安全性についても明らかになっている。Hb小胞体は最終的に脾、肝に移行するが、食食細胞に捕捉されたHb小胞体は7日以内に分解消失することが、組織病理学的に確認されている⁵⁾(図2)。細網内皮系の食食機能は変動するが、可逆的であり、一過性で血液生化学的検査の結果



(a) Hb小胞体投与1日後のラット脾臓マクロファージの透過型電子顕微鏡写真。食胞(ファゴソーム)中にHb小胞体の粒子が多数認められる。この後3日目には消失する。(b)(c) Hb小胞体投与後のラット肝臓の抗ヒトHb抗体染色後の顕微鏡写真。色の濃い部分がヒトHbの存在部位。投与1日後では多量のHbの存在(Kupffer細胞内)が認められるが、投与7日後にはほとんど消失、蓄積を認めない。

図2 ヘモグロビン小胞体の代謝過程

からも臓器の異常は認められていない。

修飾 Hb 投与に際し血圧の異常亢進や、血管床への血小板沈着などの副作用が認められている。これは NO との高い親和性に起因する。とくに分子内架橋 Hb はきわめて小さい(7 nm)ため、血管内平滑筋近傍に接近し、内皮細胞由来 NO を捕捉し、血管弛緩機能を低下させる。血管収縮は末梢循環と組織酸素化を阻害する。他方、直径 250 nm の Hb 小胞体では血管外漏出はなく、また血管平滑筋まで接近せず、NO 結合反応は抑制され、血管収縮も血圧亢進も起こらない⁶⁾。

肝臓中では hemeoxygenase が産生する一酸化炭素(CO)が、血管弛緩因子として作用する。摘出肝灌流実験では、Hb 溶液は Disse 腔に侵入し、Hb の代謝異常による bilirubin 排泄の亢進、また CO が血中 Hb に捕捉され 20% の血管抵抗増大を示し、同時に類洞の不連続的狭窄と流動停止領域の存在を確認している。他方、Hb 小胞体は Disse 腔に侵入できないため、この現象は生起しない^{7), 8)}。

4. ヘムタンパク質系酸素輸液

他方、全合成型の酸素輸液の開発も進んでいる^{9), 10)}。血清アルブミン(Mw. 66.5 kD)は血漿タンパク質の約 70% を占める単純タンパク質であり、コロイド浸透圧の維持、各種内因性物質・薬物の運搬、血液 pH の調整などの役割を果たしている。わが国では世界に先駆けて、遺伝子組み換えヒト血清アルブミン(rHSA)の、世界初の上市を間近に迎える状況にある。筆者らはこのアルブミンの非特異的多分子結合能を利用し、rHSA に酸素配位能を有するヘム誘導体を包接させる方法により、新しいアルブミン-ヘム(合成ヘムタンパク質)の創製に成功した。アルブミン-ヘムは、①完全合成系酸素輸液であり、感染の危険性がまったくない、②一切のヒト(および動物)由来の血液資源を必要としない、③酸素親和度(P_{50})はヘム構造の調整により調節可能、④アルブミンが血管内皮を透過しないため、NO 捕捉にともなう血管収縮・血圧亢進は惹起されない、などの優れた特徴をもつ。すでに酸素輸液としての酸素結合能、溶液物性、血液適合性が実証されており、安全性

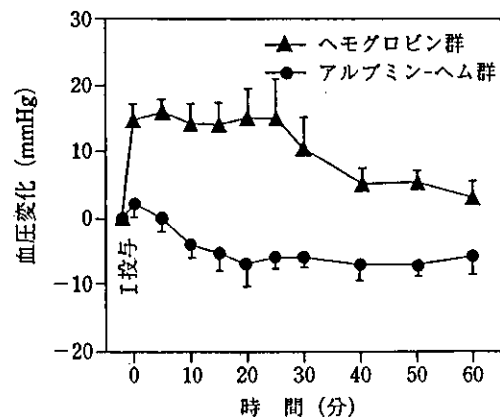
と効果の解明を中心とした前臨床評価試験が進められている。

アルブミン 1 分子当たり結合するヘムの数は最大 8、これは Hb の 2 倍に相当する。包接の駆動力は疎水性相互作用であるため、結合後もアルブミンの二次構造や表面電荷に変化はないと考えられてきた。だが、ごく最近 S. Curry (Imperial College) らは、脂肪酸包接 rHSA の X 線結晶構造解析に初めて成功し、基質結合後の rHSA は幅 8 nm から 9 nm へ膨張することを明らかにした¹¹⁾。この発見はヘムが rHSA 内部に包接されると、分子レベルで構造変化が誘起されることを示唆しており、酸素配位特性の変化とも関連して、アルブミン-ヘム結晶構造の解明が待たれている。

また酸素配位結合部位であるヘムの化学構造(酸素配位座近傍置換基、分子内軸塩基など)を変化させた一連の誘導体群が合成され、rHSA 包接体とした系について、ヘム構造と酸素配位能の相関が定量的に明らかにされている^{12), 13)}。

アルブミン-ヘムの NO 親和度は O_2 親和度の 7.6×10^6 倍と高いが¹⁴⁾、体内へ投与しても、非細胞型 Hb に見られる血管内皮からの漏出、NO 捕捉にともなう血圧亢進は認められない(図 3)。これはアルブミンの表面電荷が負に帯電していることに起因する。

さらにアルブミンの Cys³⁴ をビスマレイミド誘導体で架橋する方法により、アルブミン二量体が



ヘモグロビン投与ではただちに血圧が上昇するが、アルブミン-ヘムではそのような現象は認められない。

図 3 アルブミン-ヘム溶液をラットに投与した後の血圧変化

合成され、それにヘム16分子が結合されたアルブミン-ヘム二量体¹⁵⁾も完成している。この10wt%水溶液はコロイド浸透圧を生理条件に保った条件で、血液の1.3倍量の酸素を溶解できる。

5. おわりに

酸素輸液の研究は、このようにこの20年間で具体的対象物についての物性と動的機能の相関が詳しく解明できるようになっている。①型物質や感染源をまったく含まない、②浸透圧や粘度などの溶液物性が血液と同等に調節可能、③毒性がきわめて低く、ヒト血液換算で2~3 lit. 投与の場合でも安全かつ代謝可能、④長期保存(室温, 2年間)と安価供給が可能などの特性を有する、酸素輸液の実現が間近とあってよい。

【参考・引用文献】

- 1) E. Tsuchida, ed. : Blood substitutes, present and future perspective. Elsevier, Amsterdam, (1998).
- 2) Y. Izumi, et al. : *Crit Care Med*, **24**, 1869-1873 (1996).
- 3) H. Sakai, et al. : *Bioconjugate Chem*, **8**, 23-30 (1997).
- 4) H. Sakai, et al. : *J. Biomed Mater Res*, **40**, 66-72 (1998).
- 5) H. Sakai, et al. : *Am. J. Phathol*, **159**, 1079-1088 (2001).
- 6) H. Sakai, et al. : *Am. J. Physiol Heart Circ Physiol*, **279**, 908-915 (2000).
- 7) N. Goda, et al. : *J. Clin. Invest*, **101**, 604-612 (1998).
- 8) T. Kyokane, et al. : *Gastroenterology*, **120**, 1227-1240 (2001).
- 9) E. Tsuchida, et al. : *Bioconjugate Chem*, **8**, 534-538 (1997).
- 10) T. Komatsu, et al. : *Bioconjugate Chem*, **10**, 82-86 (1999).
- 11) S. Curry, et al. : *Nature Struc. Biol*, **5**, 827-835 (1998).
- 12) T. Komatsu, et al. : *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **74**, 1695-1702 (2001).
- 13) T. Komatsu, et al. : *Bioconjugate Chem*, **13**, 397-402 (2002).
- 14) T. Komatsu, et al. : *Bioconjugate Chem.*, **12**, 71-75 (2001).
- 15) T. Komatsu, et al. : *Macromolecules*, **32**, 8388-8391 (1999).

<土田 英俊/武岡 真司/小松 晃之/
酒井 宏水>

日本表面科学会創立25周年記念
新訂版・表面科学の基礎と応用

発行日 2004年 6月 22日 初版第1刷発行
編者 日本表面科学会「新訂版・表面科学の基礎と応用」編集委員会
発行者 吉田 隆
発行所 株式会社 エヌ・ティー・エス
〒113-8755 東京都文京区湯島2-16-16
TEL:03(3814)3511(代表) 03(3814)9151(営業部)
<http://www.nts-book.co.jp/>
制作 編集室 アイ・ティ・オー
印刷 ショウドウ・イープレス株式会社
製本 牧製本印刷株式会社

©日本表面科学会 他,2004
ISBN4-86043-051-4 C3050
落丁・乱丁本はお取り換えいたします。無断複写・転写を禁じます。
定価はケースに表示してあります。

酸素輸送合成ヘム蛋白質“アルブミン-ヘム”の創製と酸素輸液の展開

小松 晃之・土田 英俊

早稲田大学 理工学総合研究センター

1. はじめに

ヒト血清アルブミン (HSA) は 血液のコロイド浸透圧調節に加え、種々の内因性・外因性物質を結合・輸送する役割を担う血漿蛋白質である。もし、この HSA にヘモグロビン (Hb) の酸素輸送能を付与することができれば、人工酸素運搬体 (酸素輸液) としての利用価値はきわめて高く、例えば救急医療現場における救命措置への適用を考えただけでも、その絶大な有用性が容易に想像できる。

我々は HSA の非特異的多分子結合能に着目し、一連の近位塩基結合型ヘム (Figure 1) を遺伝子組換え HSA に包接させた人工のヘム蛋白質“アルブミン-ヘム (rHSA-heme)”を合成、それが生理条件下で Hb と同じように酸素を吸脱着できる酸素運搬体として機能する (酸素輸液となる) こと明らかにした¹⁻⁶⁾。ヘムはアルブミン 1 分子当たり最大 8 分子まで包接可能。得られた rHSA-heme 溶液の粘度、コロイド浸透圧、等電点はヘムの結合数によらず一定で、ヒト血液との適合性も高い⁷⁾。また、酸素親和性はヘムの化学構造を変化させることにより調整できるなどの利点もある^{5, 6)}。本報では、rHSA-heme の特徴と、それを利用した酸素輸液の展開について、最新的话题を紹介したい。

2. 酸素結合能

赤色の rHSA-heme 水溶液は室温で 2 年以上保存可能な安定度の高い製剤である。窒素雰囲気下における rHSA-heme 水溶液の可視吸収スペクトルパターンは、活性中心であるヘムが Fe (II) 5 配位高スピン錯体であることを示し、これは Hb の deoxy 体に相当する。そこへ酸素を通気すると速やかに酸素錯体 (oxy 体) が形成され、その酸素結合解離は可逆的に観測できる。赤外吸収、共鳴ラマン、磁気円偏光二色性スペクトルから、酸素配位錯体の電子状態を詳細に解析した²⁾。十数種類のヘム誘導体を対象に行った立体構造と酸素結合能の相関解明から、4 つのシクロヘキサノイル基を有するヘムを包接した rHSA 複合体が、最も安定な酸素錯体を形成できることを明らかにした⁵⁾。酸素親和性 (P_{50}) は 30~36 Torr で赤血球 (P_{50} : 27 Torr) に近く、酸素錯体半減期 (τ_{50} : 9 hr) はミオグロビンの値に匹敵する。

3. 生体内投与後の血圧変化と微小循環動態

近年、修飾 Hb を利用した赤血球代替物が欧米を中心に具体化されてきているが、血管内皮弛緩因子である一酸化窒素の捕捉に伴う血圧亢進の回避が課題となっている⁸⁻¹⁰⁾。rHSA-heme の一酸化窒素親和性を測定したところ、

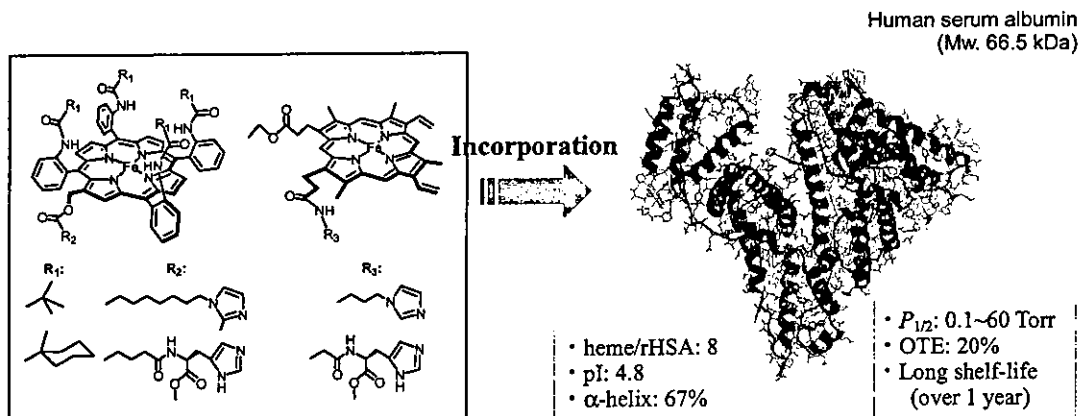


Figure 1 Synthetic hemes and simulated structure of rHSA-heme hybrid.

Hb より 9 倍高いことが明らかとなった⁴⁾。つまり、rHSA-heme 分子が内皮細胞を透過して平滑筋近傍まで到達すると、瞬時に一酸化窒素を結合し、血管収縮を誘発する可能性がある。しかし予想に反し、rHSA-heme 溶液を静注したラットでは、血圧上昇は全く観測されなかった (Figure 2)¹¹⁾。rHSA-heme 溶液投与後の腸間膜細動脈径、細静脈径、血流速度にも変化は認められない。この理由はアルブミンの表面電荷にあると推察している。アルブミンは Hb に比べ等電点が低く (pI: 4.8)、内皮細胞を取り囲む基底膜との間に負電荷どうしの静電反発を生じるため、その血管内皮透過性は Hb の約 1/100 と低い。従って rHSA-heme の場合、投与後の急激な血圧上昇がないと考えられる。

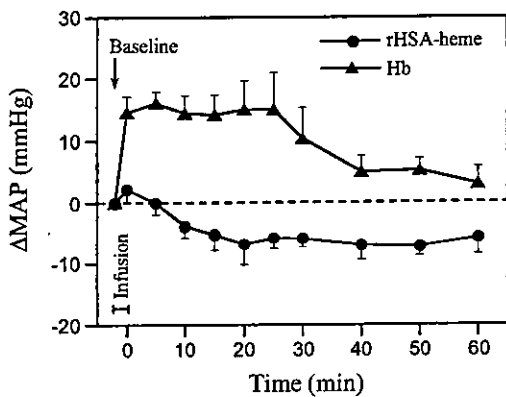


Figure 2 Changes of mean arterial pressure (MAP) after administration of rHSA-heme solution in anesthetized rats.

4. 脱血ショックモデルにおける生体内酸素輸送

麻酔下ラット脱血ショックモデルを作成し、rHSA-heme の *in vivo* 酸素運搬能を定量した¹²⁾。まず全血液量の 70% を rHSA で希釈後、さらに全血液量の 30% を脱血、直ちに同量の rHSA-heme または rHSA を静注し、投与 2 時間後までの血液ガス、循環系パラメーター、腎皮質酸素分圧 ($PtO_2(R)$) を測定した。平均血圧 (MAP) は 30% 脱血後には 25-38% まで減少、rHSA 群ではそのまま回復を認めることなく、投与 30 分以内に全例が死亡した (Figure 3)。一方、rHSA-heme 群では、投与直後に初期値の 70% (脱血前値の 87%) まで上昇、本

製剤が血圧回復に有効であることが明らかとなった。 $PtO_2(R)$ は 30% 脱血直後に 60-77% まで低下。rHSA のみの投与では回復は見られなかったが、rHSA-heme 群では、投与直後に 95% (脱血前値の 115%) まで上昇し、2 hr 後でもその値は維持された。

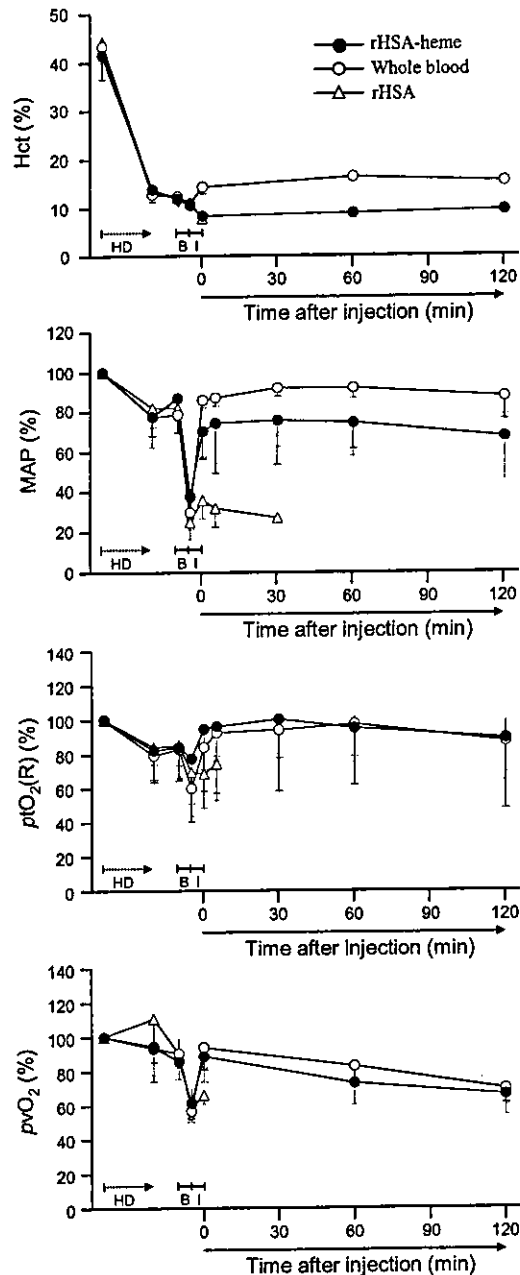


Figure 3 Changes of Hct, mean arterial pressure (MAP), renal cortical O_2 -tension ($PtO_2(R)$), venous blood O_2 -tension (PvO_2) after administration of rHSA-heme solution in anesthetized rats. HD: hemodilution with rHSA, B: 30% bleeding, I: sample infusion.

5. アルブミン-ヘム二量体

rHSA の Cys-34 を 1,6-ビスマレイミドヘキサンの選択的に架橋した rHSA 二量体を調製し、それに 16 分子の heme を包接させた rHSA-heme 二量体も合成している¹³⁾。rHSA-heme 二量体水溶液は、コロイド浸透圧を生理的条件下に保ちながら、ヒト血液を上回る量の酸素を結合できる酸素輸液である。rHSA 二量体の MALDI-TOF 質量分析スペクトルには、明瞭な分子イオンピーク (m/z 132,741) が観測され、二量体の形成が確認された。rHSA の二次構造、表面電荷は架橋後も変化せず、rHSA 5.0 wt%溶液のコロイド浸透圧 (19 Torr) と同じ値を有する rHSA 二量体溶液の濃度は、8.5 wt%と決定された。さらに、rHSA 二量体の血中半減期 (16 hr) は rHSA に比べ 2 倍に延長することも明らかにしている。

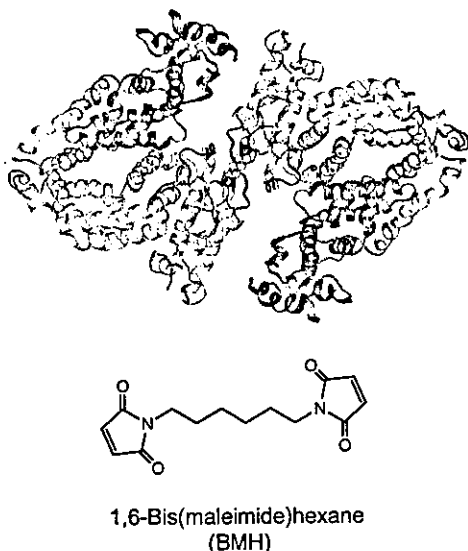


Figure 4 Simulated structure of cross-linked rHSA dimer with BMH.

6. まとめ

アルブミン-ヘム製剤は、生体内で安全に酸素を運搬できる完全合成系酸素輸液である。原料を生体物質に依存していないため、感染の心配は全くない。もちろん血液型フリーなので、いつでもどこでも交差試験なしに直ちに体内へ投与することのできる赤血球代替物となる。

現在、我々はさらなるアルブミン新物質群の開発を展開している。アルブミン二量体で得られた基礎知見を拡張し、構造明確なアルブミン多量体を合成。ヘムとの複合化により超高濃度酸素輸送系が具体化できる。また、ヘムをアルブミンに共有結合で強固に固定したヘム結合アルブミンや、遺伝子組換え技術により産生したヘムポケットを持つアルブミンに天然のヘムを結合させたアルブミン-ヘム錯体も創製し、その機能評価を進めている。

【文献】

1. T. Komatsu, K. Hamamatsu, J. Wu, et al., *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 82-86.
2. E. Tsuchida, T. Komatsu, Y. Mastukawa, et al., *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 797-802.
3. E. Tsuchida, T. Komatsu, K. Hamamatsu, et al., *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 46-50.
4. T. Komatsu, Y. Matsukawa, E. Tsuchida, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 71-75.
5. T. Komatsu, Y. Matsukawa, E. Tsuchida, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 397-402.
6. A. Nakagawa, T. Komatsu, N. Ohmichi, et al., *Chem. Lett.* **2003**, *32*, 504-505.
7. Y. Huang, T. Komatsu, A. Nakagawa, et al., *J. Biomed. Mater. Res.* **2003**, *66A*, 292-297.
8. T. M. S. Chang. *Art. Cells Blood Subs. Immobil. Biotechnol.* **1997**, *25*, 1-24.
9. E. Tsuchida E. Perspectives of blood substitutes. In: Tsuchida E, editor. *Blood Substitutes: Present and Future Perspectives*. Lausanne: Elsevier Science; 1998. p 1-14.
10. J. E. Squires, *Science* **2002**, *295*, 1002-1005.
11. E. Tsuchida, T. Komatsu, Y. Matsukawa, et al., *J. Biomed. Mater. Res.* **2003**, *64A*, 257-261.
12. T. Komatsu, H. Yamamoto, Y. Huang, et al., *J. Lab. Clin. Med.* **2004**, *135*, submitted.
13. T. Komatsu, K. Hamamatsu, E. Tsuchida, *Macromolecules* **1999**, *32*, 8388-8391.

【輸血医療のトピックス】
人工血液（人工赤血球）の開発動向

武岡真司*

キーワード◎人工血液 人工赤血球 ヘモグロビン小胞体 機能と安全性評価

【はじめに】

われわれは常にウイルスの猛威に曝されており、血液事業も大きな影響を受けている。わが国では、平成9年度から厚生科学研究 高度先端医療研究事業「人工血液開発分野」が設置され、人工赤血球、人工血小板、人工抗体の3部門に分かれた本格的な研究展開が進められてきた。人工血液は、現行の輸血用血液製剤を補完し、安全な製剤の安定供給の観点から、21世紀の医療の進歩に大きな影響を与えうると期待されている。わが国においても、人工血液の製品化に向けた研究開発の促進が国の基本方針（平成14年7月24日衆議院厚生労働委員会決議、医薬品・医療機器の安全対策の推進に関する件）となっている。

本稿では、実現が見えてきた人工赤血球に焦点を絞るが、この実現により、①緊急時に血液型を選ばずに輸血ができ、②HIV、肝炎やその他、未知のウイルスも含めたウイルスや細菌の感染症の心配がなく、③大量備蓄可能であるので大震災などの災害時などにも即応が可能、などが期待される。



*たけおか・しんじ：早稲田大学理工学部助教授。平成3年早稲田大学大学院理工学研究科博士課程修了（工学博士）。平成2年日本学術振興会特別研究員。平成3年早稲田大学理工学部助手。平成5年同専任講師。平成8年現職。主研究領域／高分子化学、分子集合科学、人工血液、薬物運搬体。

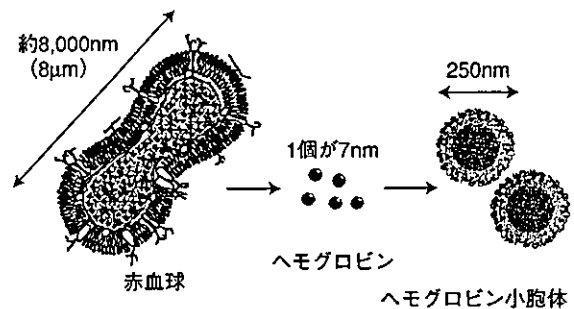


図1 赤血球から精製したヘモグロビンによるヘモグロビン小胞体の構築

【I. 人工赤血球開発の現状】

人工赤血球として、パーフルオロカーボン乳剤や修飾ヘモグロビンなどが検討され、臨床使用されてきたが、機能や安全性の観点から満足できるものではなかった。現在わが国を中心に研究が進められている、高濃度ヘモグロビンをリン脂質の二分子膜で包み込んだ、赤血球と類似のヘモグロビン小胞体 (hemoglobin vesicles; HbV) (図1)が最も安全度が高く、実用が期待されている^{1,2)}。現段階では期限の切れた献血血液由来のヘモグロビンの有効利用が進められているが、将来的にはヘモグロビンは遺伝子組換え体を利用されるであろう。

赤血球からのヘモグロビン精製時に血液型を決める型物質やヘモグロビン以外の蛋白質、ウイルス(もし含まれたとしても)が、加熱やフィルター処理で完全に除去される。安定なリン脂質膜で包み直すため、室温で2年間の液状保存

表1 ヘモグロビン小胞体の規格

項目	規格値
粒径 (nm)	240 ~ 280
P ₅₀ (torr)	27 ~ 34
Hb (g/dl)	10.0 ± 0.4 (8.6 ± 0.4*)
総脂質 (g/dl)	4.6 ~ 5.4 (5.3 ~ 5.9*)
Hb/ 総脂質 (g/g)	1.6 ~ 2.1
PEG-脂質 (mol%)	0.3
metHb (%)	< 3
HbCO (%)	< 2
粘度 (cP at 230s ⁻¹)	2 ~ 3 (3 ~ 4*)
晶質浸透圧 (mOsm)	300
膠質浸透圧 (torr)	0 (20*)
pH (37°C)	7.4
エンドトキシン (EU/ml)	< 0.1
無菌試験	検出なし

* 20%遺伝子相換えヒト血清アルブミン製剤と混合後
PEG: ポリエチレングリコール

(赤血球製剤では採血後3週間の冷蔵保存)が保証されており、乾燥粉末ではさらに長期間の保存が可能であるため、人工物の大きな長所とされている。

ヘモグロビン小胞体は、筆者の所属する早稲田大学理工学総合研究センター土田英俊名誉教授の研究グループと慶應義塾大学医学部小林絃一教授、末松 誠教授の研究グループを中心とした共同研究(厚生労働科学研究費補助金による)が中心となって進められており、民間会社との連携によって、製剤化と早期の臨床試験着手を目指している。

II. ヘモグロビン小胞体の機能と安全性評価

ヘモグロビン小胞体制剤の物性規格を表1にまとめた。ヘモグロビンがカプセル化されているため膠質浸透圧はほとんどゼロである。赤血球が生食に分散した状態と考えていただきたい。したがって、膠質浸透圧の調節が必要となる場合には(遺伝子相換え)ヒト血清アルブミ

ンなどと併用となる。粒径は250nmに厳密に調節されており、赤血球の約1/30程度であるので、梗塞部位の透過など赤血球にはない機能が期待できる。

酸素親和度は、アロステリック因子、ピリドキサール5'-リン酸(PLP)の共封入によって適当値に調節可能である。脂質類の成分組成や含量には工夫が施されており、常温で2年間液状保存³⁾、血流中での溶血の回避と適度な血中滞留時間(ヒトでは3日程度の子測)、血小板や補体の活性化の回避など、従来の小胞体における課題が解決できている。

以下に、現在までに結果が得られているヘモグロビン小胞体に関する評価試験成績を簡単に紹介する。主にラットやハムスターを用いた試験であるが、基本的な安全性と酸素輸送効果は十分確認できている。また、現在、霊長類を用いた安全性試験が進行している。

酸素運搬効果をみるためのラット全血液量の90%をアルブミン単独で交換した場合には、70%交換辺りから血圧と腎皮質酸素分圧の低下が顕著となって死亡したが、ヘモグロビン小胞体をアルブミン溶液に分散させた系で90%交換した場合には、血圧、腎皮質酸素分圧共に維持された⁴⁾。ヘモグロビン小胞体のアルブミン分散液によるハムスター80%交換輸血試験では、非侵襲に測定した皮下微小循環系の組織酸素分圧は、交換前の60~70%に低下するものの、対照アルブミン投与群よりも5倍以上の値が維持されていた⁵⁾。さらには、修飾ヘモグロビンに認められる抵抗血管の収縮と血圧亢進は全く認めなかった。これは、ヘモグロビン小胞体は血管を透過しない大きさであるので、血管内皮由来弛緩因子である一酸化窒素への影響はほとんどないと考えられている⁶⁾。

ラット25%^{99m}Tc標識ヘモグロビン小胞体負荷試験では、血中半減期はほぼ35時間程度であった。ヘモグロビン小胞体は、主として肝臓のクッパー細胞と脾臓のマクロファージに捕捉

され、老廃赤血球などの代謝と同様の経路をたどるものと考えられる。

ラット 20ml/kg 負荷投与試験により、細網内皮系での代謝過程、血液生化学検査を実施したところ、肝臓と脾臓の重量は一過性に増大し、貪食細胞に取り込まれたヘモグロビン小胞体は、1週間後にはほとんど消失した。肝機能・腎機能には特に異常を認めず、リパーゼは有意な一過性の亢進を示したが、アミラーゼには変動は認められなかった⁷⁾。代謝過程で、脂質成分、特にコレステロールが血清中に出現し、7日後には正常値に戻った。

さらに、ラット (10ml/kg/日) での 14 日間の反復投与ならびにその後の 14 日間生存試験では、全例 (14 例) 生存し、体重も増加し続け、生化学検査では脂質成分とリパーゼの一過性の亢進以外には変動を認めず、14 日後には正常値に戻った⁸⁾。

代謝臓器である肝臓では、ヘモグロビンでは内因性一酸化炭素を消去し、ビリルビンの過剰生成と胆汁分泌機能の低下を招来したが、ヘモグロビン小胞体ではそのような作用を認めなかった^{9,10)}。

ヘモグロビンは、自動酸化や活性酸素との反応によってヘム鉄が 2 価から 3 価に酸化 (メト化) すると、酸素を結合できなくなる。メト体は Fe³⁺ イオンを遊離し、これがフェントン反応を誘導してヒドロキシラジカルの発生を触媒する。ところが、ヘモグロビン小胞体の場合、ヘモグロビンは脂質二分子膜で被覆されているため、活性酸素が関連する反応はヘモグロビン小胞体の外へ影響を及ぼさないことが *in vitro* 試験で確認されている¹¹⁾。細網内皮系にて代謝されたヘモグロビン小胞体由来の鉄の動態に関しては、今後の研究が待たれるところであろう。

まとめ

人工赤血球は、救急救命における輸血療法の補完を当面の目標としており、役目が終われば

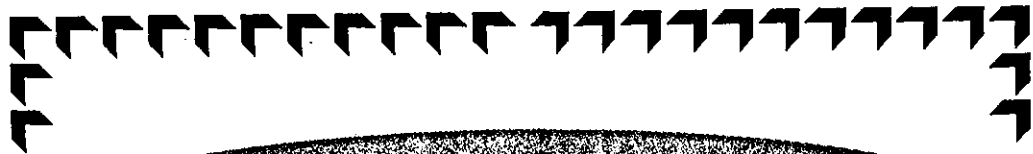
比較的すみやかに代謝臓器で代謝され、生合成される自身の赤血球と置き換わる。また、遺伝子組換えアルブミンにヘム誘導体を複合させたアルブミン-ヘムは、膠質浸透圧ももった酸素運搬体であり、ヘモグロビン小胞体よりも小さな粒子径などの特徴を活かした新しい酸素療法などへの適用も期待されている²⁾。また、人工血小板も慶應義塾大学医学部池田康夫教授の研究グループで最先端の研究が行われており、*in vivo* 成績が得られつつある¹²⁾。

このように、人工赤血球、人工血小板は、わが国では主に厚生労働科学研究補助金にて研究が進められているが、これはわが国の近未来医療への貢献はもとより、安全な血液が不足している多くの国に対しても大きな国際貢献となりうる。民間で行うには採算性も重要であるが、まずは長期的そして全人類的な視野に立った開発を期待したい。

文 献

- 1) 土田英俊, 酒井宏水, 武岡真司他: 酸素輸液 (人工赤血球). 医学のあゆみ 2003; 205: 558-566.
- 2) 土田英俊, 宗慶太郎, 酒井宏水他: 酸素輸液 (人工赤血球) の安全度と体組織への酸素供給. 麻酔 2003; 52 (増): S55-S66.
- 3) Sakai H, Tomiyama KI, Sou K, *et al*: Poly (ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconjug Chem* 2000; 11: 425-432.
- 4) 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. *Bioconjug Chem* 1997; 8: 23-30.
- 5) Sakai H, Takeoka S, Wettstein R, *et al*: Systemic and microvascular responses to hemorrhagic shock and resuscitation with Hb vesicles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H1191-H1199.
- 6) Sakai H, Hara H, Yuasa M, *et al*: Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H908-H915.
- 7) Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, *et al*: Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothe-

- lial system. *Am J Pathol* 2001 ; 159 : 1079—1088.
- 8) 厚生労働科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業 臨床応用可能な人工赤血球の創製に関する研究 (総括研究報告書) (研究代表者: 土田英俊) (H12-医薬-009). 平成12年度~14年度.
- 9) Wakabayashi Y, Takamiya R, Mizuki A, *et al* : Carbon monoxide overproduced by heme oxygenase-1 causes a reduction of vascular resistance in perfused rat liver. *Am J Physiol* 1999 ; 277 : G1088—G1096.
- 10) Kyokane T, Norinizu S, Taniai H, *et al* : Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver. *Gastroenterology* 2001 ; 120 : 1227—1240.
- 11) Takeoka S, Teramura Y, Atoji T, *et al* : Effect of Hb-encapsulation with vesicles on H₂O₂ reaction and lipid peroxidation. *Bioconj Chem* 2002 ; 13 : 1302—1308.
- 12) 武岡真司, 岡村陽介, 土田英俊, 池田康夫: 血小板代替物の担体設計から Drug Local Delivery の可能性. 日本血栓止血学会誌 2004 ; 15 : 21—26.
-

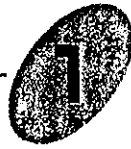


周術期輸液の最前線

編集 宮尾秀樹

埼玉医科大学総合医療センター
麻酔科教授

真興交易(株)医書出版部



酸素輸液の展望

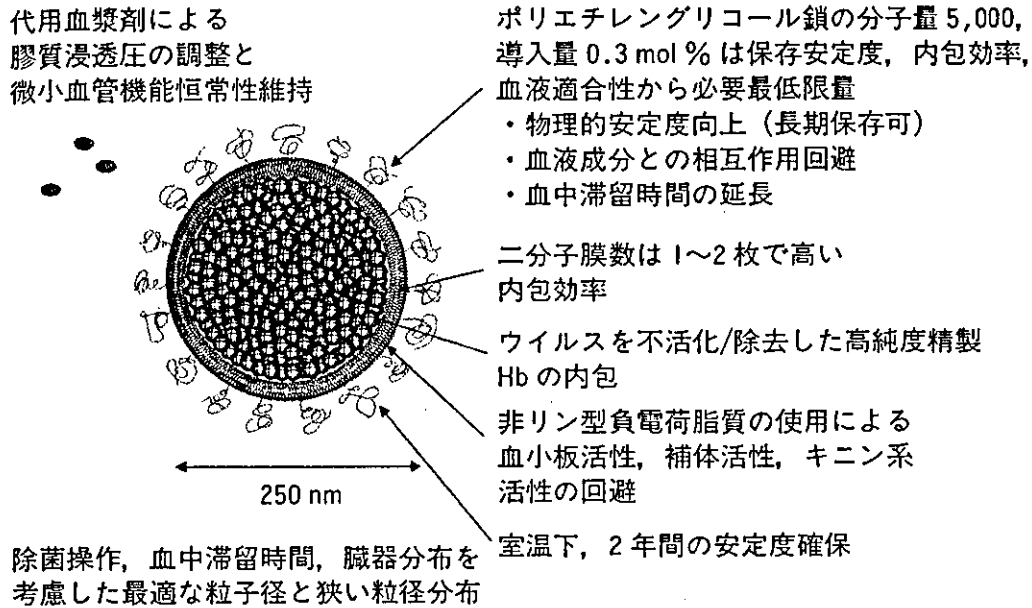
1) 小胞体型人工赤血球の開発動向

① 人工赤血球の必要性

事故や手術時に大量の血液が消失した場合には、輸液の補充によって循環血液量を維持するか、輸血によって酸素も補充する措置がその出血量や状況に応じて選択される。しかし、献血血液による同種血輸血では感染のリスクが否定できず、自己血輸血では利用できる状況が制限されている。したがって、酸素輸液（人工赤血球）の開発は必要であり、最新の科学技術の進歩と共にその製剤化技術、有効性や安全性の評価技術および医療上の適応などに関する研究が加速的に進展している。人工赤血球は、①血液型を選ばずに輸血ができ、②HIV、肝炎やその他未知のウイルスなどによる感染症の心配がなく、③備蓄が可能であるため即時に大量供給が可能である。さらに④品質が保証された安全な製剤供給の観点から、現行の輸血用血液製剤を補完し、21世紀医療の進歩に大きな影響を与え得るものと期待されている。

② 人工赤血球の開発の現状

酸素輸液としては、パーフルオロカーボン乳剤や修飾ヘモグロビン（Hb）などさまざまな種類が検討されてきたが、赤血球と類似の構造をもつ高濃度



図① Hb 小胞体の特徴.

Hb をリン脂質二分子膜で包み込んだ Hb 小胞体 (図①) が, 最も安全度の高い製剤として開発が進められている^{1,2)}. 現段階では期限の切れた献血血液由来の Hb の有効利用が進められているが, 将来的には Hb は遺伝子組換え体が利用されるであろう. Hb 精製時に血液型を決める型物質や Hb 以外のタンパク質, ウイルス (もし含まれたとしても) が除去され, 安定なリン脂質膜で包み直すため室温で 2 年間の保存が可能であり, 人工物の大きな長所となっている.

③ ヘモグロビン小胞体の性状と評価

Hb 小胞体の製造については, 膜構成脂質と Hb 分子の精密な集合制御技術と膜処理やガス交換技術の組合せによって, 現実的な量産体制が構築されつつある. 製剤の物性規格を表①にまとめた. 赤血球と同様, 膠質浸透圧はほとんどゼロである. 膠質浸透圧の調節が必要な場合にはアルブミン製剤

表① Hb 小胞体の規格

項目	規格値
粒径 (nm)	240~280
P ₅₀ (torr)	27~34
[Hb] (g/dl)	10.0±0.4 (8.6±0.4 ^{a)})
[総脂質] (g/dl)	4.6~5.4 (5.3~5.9 ^{a)})
[Hb]/[総脂質] (g/g)	1.6~2.1
[PEG-脂質] (mol %)	0.3
metHb (%)	<3
HbCO (%)	<2
粘度 (cP at 230 s ⁻¹)	2~3 (3~4 ^{a)})
晶質浸透圧 (mOsm)	300
膠質浸透圧 (Torr)	0 (20 ^{a)})
pH (37°C)	7.4
エンドトキシン (EU/ml)	<0.1
無菌試験	検出なし

^{a)}: 20% アルブミン製剤と混合後.

(将来的には遺伝子組換えヒト血清アルブミン) などの代用血漿剤を併用する。粒径は 250 nm と赤血球の約 1/30 であるので、虚血部位の酸素化など赤血球にはない機能が期待できる。通常の遠心分離 (4,000 g, 6 min) では赤血球は沈殿するが、Hb 小胞体は沈殿しない。赤血球と分離できる利点の反面、血液分析に影響を及ぼすので高分子の添加や超遠心分離操作 (50,000 g, 20 min) で沈殿させる³⁾。また、酸素親和度はアロステリック因子、ピリドキサル 5'-リン酸の共封入により赤血球と同様の値に調節されている。脂質類の成分組成には特別な工夫が施されており、常温で 2 年間液状保存を可能とし⁴⁾、血流中での溶血の回避と適当な血中滞留時間、補体・血小板・白血球への影響がほとんどない⁵⁾ など、従来のリポソーム製剤で指摘さ

れてきた課題が解決されている。当然のことながら、ウイルスの不活化と除去が製造工程に組込まれ、無菌試験、エンドトキシンやパイロジェンなどの試験にも合格した製剤となっている。

高折⁶⁾はHb小胞体の安全性と有効性を検討するための動物試験項目を細かく提示しており、それに従った試験が厚生労働科学研究で進められている。現在までに得られている評価試験の概要を示す。主にラットやハムスターを用いた試験であるが、基本的な安全性と酸素輸送効果は十分確認できている。また、現在霊長類を用いた安全性試験が進行している。

ラット 25% ^{99m}Tc 標識 Hb 小胞体負荷試験では、血中半減期は 35 時間程度であった。Hb 小胞体は主として肝臓のクッパー細胞と脾臓のマクロファージに捕捉され、老廃赤血球などの代謝と同様の経路をたどるものと考えられる。ラット 20 ml/kg 負荷投与試験により細網内皮系での代謝過程、血液生化学検査を実施したところ、肝臓と脾臓の重量は一過性に増大し、貪食細胞に取り込まれた Hb 小胞体は 1 週間後にはほとんど消失した。また、血液生化学検査を詳細に行ったが、リパーゼやコレステロール値の一過性の有意な亢進以外の変動は認められなかった⁷⁾。ラット 40% 血液交換・長期生存試験では、ヘマトクリット値は 7 日後に前値に復し⁸⁾、ラット (10 ml/kg/day) で 14 日間の反復投与ならびにその後の 14 日間生存試験では、全例 (14 例) 生存し体重も増加し続けた。生化学検査では脂質成分とリパーゼの亢進以外には変動を認めず、14 日後には正常値に戻った⁹⁾ ことから、きわめて安全度の高い製剤であることが明らかとなった。活性酸素によって Hb はフェリル体やメト体となって酸素結合能を失い鉄イオンが遊離するが、Hb 小胞体はこれらを閉じ込めたまま、赤血球と同様に主として脾臓で代謝されるため安全性が高いものと考察される¹⁰⁾。肝臓の微小循環動態観察では、Hb をそのまま投与すると内因性 CO の消去による類洞血管の収縮、ビリルビンの過剰生成と胆汁分泌機能の低下が認められたが、Hb 小胞体ではそのような作用は観測されなかった^{11,12)}。しかし、類洞内のクッパー細胞

がHb小胞体を捕捉すると肥大して一過性に類洞血管の狭小化をきたす、また、貪食細胞の機能飽和による生体防御機構の低下が懸念されるため、適正投与量が存在することが示唆された。

酸素運搬効果をみる動物実験の結果を以下に紹介する。ラット40%脱血ショック・同量投与による回復試験では、生理食塩液、メトヘモグロビン小胞体分散液と比較して有意な酸素運搬効果を確認し、これは同Hb濃度の赤血球分散液と同等であった¹³⁾。また、ラット全血液量の90%をHb小胞体のアルブミン分散液で交換した場合には、血行動態、血液ガスパラメータ、組織酸素分圧ともに維持され、アルブミン溶液で交換した場合と比較して顕著な有効性を示した¹⁴⁾。ハムスターの血液量の80%をHb小胞体のアルブミン分散液で交換して皮下微小循環動態を非侵襲に観測したところ、組織酸素分圧は脱血前の60~70%まで低下したものの、対照アルブミン投与群での5倍以上の値が維持されていた¹⁵⁾。また、修飾Hbに認められる抵抗血管の収縮と血圧亢進の現象は全く認めなかった¹⁶⁾。現在、試料の安全性とともに有効性も証明し得る動物モデルとして、ビーグル犬の脾摘後50%の脱血によりショックを作成し、1時間経過した後に蘇生液としてHb小胞体のアルブミン分散液を投与するモデルを検討している。

④ 人工赤血球の適用と展望

Hb小胞体は現在、実施企業でGLP (good laboratory practice) による非臨床試験、GMP (good manufacturing practice) 製造体制の準備が進められている¹⁷⁾。また、本邦に適した臨床試験のためのプロトコルの検討も過去の人工酸素運搬体の臨床例や課題を参考に進められている¹⁸⁾。当面、希釈式自己血輸血、希少血液型患者での一般輸血の代替、あるいは予測せざる手術時出血への代用血漿剤と併用した単回での投与などを目標としており、救急用途への拡大が考えられている。その際には、現行の赤血球濃厚液の使

用がガイドライン¹⁸⁾に即した人工赤血球の使用ガイドラインが必要となるであろう。さらには腫瘍の酸素化による放射線治療効果の促進、赤血球が通過できない狭窄部も通過できるサイズをもつ酸素運搬体による組織の酸素化、人工心肺を用いた体外循環回路の充填液としての輸血の代替、人工呼吸器でも改善しない重い肺障害に適用する液体換気用の酸素富化膜などの適応が検討されている。また、パルスオキシメータなどのモニターや血液生化学検査では項目によっては影響がでると推測されるため、装置やプログラムの改良も必要であろう。安全で有効な小胞体型人工赤血球が臨床現場で使用され、救命に役立つ日が1日も早くくることを願う次第である。

文 献

- 1) 土田英俊, 酒井宏水, 武岡真司, 他 : 酸素輸液 (人工赤血球). 医学のあゆみ 2003 ; 205 : 558-66
- 2) Tsuchida E: Blood Substitutes -Present and Future Perspectives. Amsterdam, Elsevier, 1998
- 3) Sakai H, Tomiyama K, Masada Y, et al: Pretreatment of serum containing hemoglobin vesicles (oxygen carriers) to prevent their interference in laboratory tests. Clin Chem Labor Med 2003 ; 41 : 222-31
- 4) Sou K, Endo T, Takeoka S, et al: Poly(ethylene glycol)-modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of poly(ethylene glycol)-lipid into the vesicles. Bioconjugate Chem 2000 ; 11 : 372-9
- 5) 阿部英樹, 藤原満博, 東 寛, 他: リポソームと補体系との相互作用. 人工血液 2003 ; 11 : 151-9
- 6) 高折益彦: 人工血液としての条件. 人工血液 2002 ; 10 : 28-35
- 7) Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, et al: Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers-Influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. Am J Pathol 2001 ; 159 : 1079-88
- 8) 研究代表者 土田英俊: 厚生労働科学研究費補助金 医薬安全総合研究事業「臨床応用可能な人工赤血球の創製に関する研究」(H 12-医薬-009) 平成 12 年度~14 年度 総括研究報告書
- 9) Sakai H, Yamamoto M, Masada Y, et al: Exchange-transfusion with Hb-vesicles suspended in recombinant human