

### (3) COを用いない製造方法

血液透析の際に使用する種々の透析膜（ダイアライザー）を脱酸素工程に利用することを試みた。その結果、トリアセテート製中空糸内にアルブミン-ヘムを流し、密閉ハウジング内の中空糸の外側（本来透析液が灌流するスペース）に加湿したN<sub>2</sub>ガスをフローしながら、濃縮された量だけ連続して透析液を補充する定容量限外濾過を行うことによって製造工程を低酸素状態（0.1 Torr未満）で維持することができることを見出し（Fig. 6.）、アルブミン-ヘムをデオキシ体として製造することに成功した。デオキシ体の保存安定性を評価した結果をTable 2.に示した。現在のところ、室温保存で6箇月の保存安定性が確認されており、メト化率も初期値と比較して全く変化しないことが明らかとなった。さらに継続して安定性を評価中である。

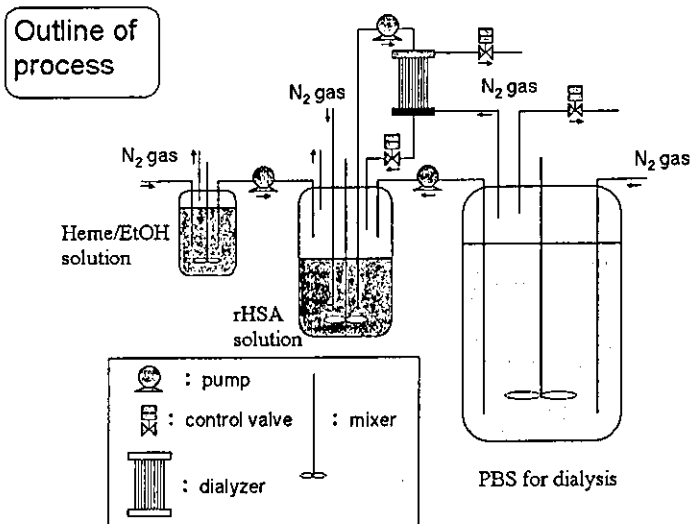


Fig. 6. Manufacturing process of deoxy form under nitrogen atmosphere using blood dialyzer.

Table 2. Stability of deoxy form albumin-heme at room temperature for 6 months.

	Initial	After 6 months
Appearances	good	good
P <sub>50</sub> (Torr)	34.7	34.7
[rHSA] (%)	5.08	5.35
[Albumin-heme] (mM)	2.75	2.77
Met conversion (%)	1.07	1.08
Viscosity (cP)	1.16	1.16
pH	7.13	7.14
[FeP]/[Alb]	3.3	3.4
UV λ <sub>max</sub> (nm)	CO	426.5
	Oxy	424.5
	Deoxy	443.0

### (4) 具体的製剤例

当社は、無菌充填、無菌の液-粉キット注射製剤等の製造を得意としていることもあり、通常のガラスバイアル充填製剤の

みならず、Fig. 7.に示したような凍結乾燥粉末製剤、さらにFig. 8.に示したような凍結乾燥粉末と溶解液のキット製剤としての開発を検討している。災害等に備えた長期備蓄には保管スペースあるいは安定性の維持の面から極めて優れた形態であると思われる。



Fig. 7. Examples of filling product in glass vial left: solution preparation, right: freeze-dried powder.

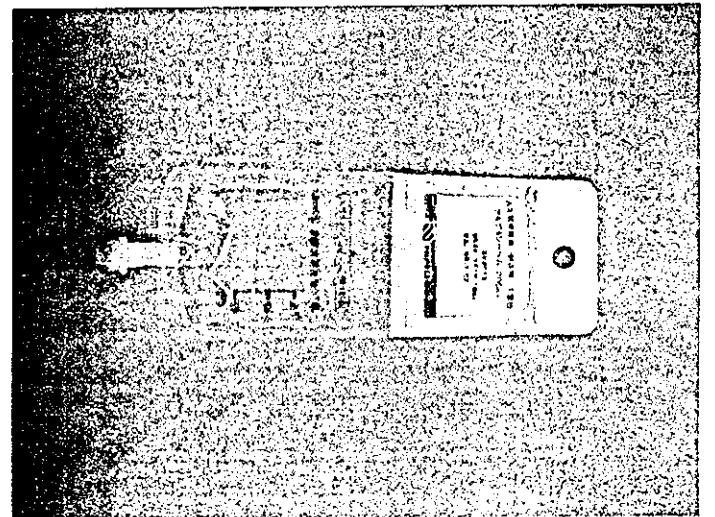


Fig. 8. Example of kit product consists of freeze-dried powder and solvent for injection.

### (5) 脱血交換モデルを用いた薬効評価

既に様々な動物評価を行っているが、その中からラットの脱血交換モデルを用いた薬効評価結果を紹介する。

Fig. 9.に実験操作の概略を示した。7~9週齢のWistar系雄性ラット（体重282.3~335.4 g）をウレタン麻酔下に1群5匹として使用した。呼吸数は気管内に挿管したカニューレを熱感知用センサーに接続して測定し、脱血交換開始から呼吸停止までの時間を生存時間とした。血圧は、左大腿動脈内にカテーテルを留置し、圧トランスデューサを介して測定した。被験薬と

の脱血交換輸注は、右総頸動脈より3 mL/kg/min の速度で脱血すると同時に被験薬を右大腿静脈から同速度で投与して行った。ヘマトクリット値は脱血交換開始後10ないし15分間隔で右外頸静脈より採取した血液を用いて測定した。rHSA 及びアルブミン-ヘム投与群のヘマトクリット値から、時間-血液希釈率曲線を作成し、血液希釈率 =  $100 \times e^{-0.00410 \times \text{時間}}$  (相関係数0.999) の式を得た。本式を用い、生存時間及び平均血圧測定時点の血液希釈率を算出した。なお、直腸温は実験終了まで  $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$  に維持した。

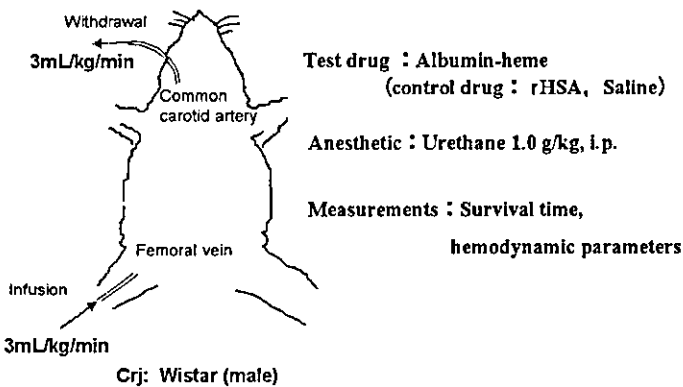


Fig. 9. Rat exchange transfusion model.

Fig. 10.に最大血液希釈率および平均血圧の推移を示した。図には示していないが、ヘマトクリット値はrHSA及びアルブミン-ヘムの脱血交換輸注により経時的に低下し、群間に差は認められなかった。アルブミン-ヘム投与群 (生存時間  $45.46 \pm 1.51$ 分) は、生理食塩液投与群 (生存時間  $21.48 \pm 0.71$ 分) 及びrHSA単独投与群 (生存時間  $32.07 \pm 1.15$ 分) に比べて有意な延命効果を示し、最大血液希釈率を有意に上昇させた。

アルブミン-ヘム投与群の平均血圧は、生理食塩液投与群およびrHSA投与群に比べ有意に高値を示し、血圧維持効果が認められた。

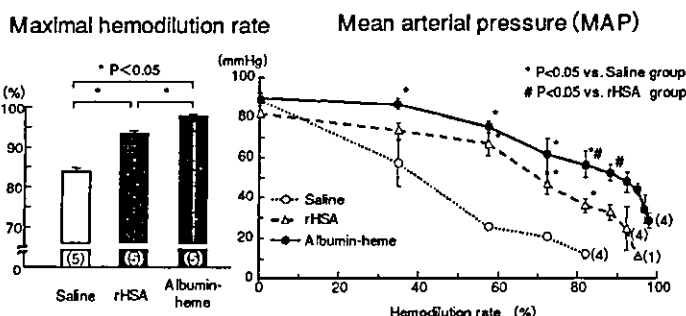


Fig. 10. Mean arterial pressure and hemodilution rate during exchange transfusion by albumin-heme, rHSA and saline in urethanized rats. The data represent means  $\pm$  SEM of 4-5 rats. Figures in parenthesis show No. of animal survived.

以上の結果から、酸素結合能を有するアルブミン-ヘムは、酸素結合能を持たないrHSAと比較し、血液希釈に伴う呼吸・循環器系変化を遅延させ、明らかな延命効果を示したことから、生体内で酸素運搬能を発揮しているものと考えられた。

## 2. 遺伝子組換えヘモグロビン (rHb)

早稲田大学、慶應義塾大学の研究グループは、ポリエチレングリコールで表面修飾を施した生体適合性の高いリボソーム中にヒト血液由来のヘモグロビンを内封した細胞型の人工酸素運搬体 (Hb-V) の開発に永年に亘って取り組んでいる。このリボソーム封入型人工酸素運搬体は、非カプセル型の持つ問題点を克服できるものとして既に多くの成果が報告され<sup>12,16)</sup>、実現の可能性という意味において他を一歩リードした製剤であり、早期の臨床治験開始が望まれている。当社も、(株)オキシジェニクス (早稲田大学、慶應義塾大学のリボソーム封入型人工酸素運搬体を開発することを目的として設立されたバイオベンチャー企業) とともにこのリボソーム封入型人工酸素運搬体の開発を共同で行っている。

しかし、ヒト血液 (献血) から抽出した精製ヘモグロビンを使用する点で、感染の危険性や供給量の問題は完全には解決されておらず、ヘモグロビンを遺伝子組換え体に置き換えることも今後の展開として極めて重要であると考えている。

rHbの開発に関しては、既に幾つかの事例が報告されている。いずれもHbの二量体への解離を防止するための架橋体であるが、非細胞型 (非カプセル化) 製剤であるため、修飾Hbで認められる副作用を回避出来ずに開発が中止となっている。Baxter 社がHemeAssist™として開発した分子内架橋Hbは、2本のHb a鎖99番目のLys間をフマル酸架橋したものである。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が高くなったため、臨床試験が中止された<sup>19)</sup>。さらに遺伝子組換え技術を用いて培養菌体に発現させたrHbは、Somatogen Inc. 社によってOptro™として具体化された。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性が実現されている。臨床第I相試験では、投与直後に一過性の血圧上昇が起り、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<sup>20)</sup>。これらの症状はすべてHb分子が血管平滑筋部まで拡散し、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。

一方、我々の今日に至る様々な共同研究の結果、熊本大学の組換え蛋白質製造技術とグループ (株)バイファ) の組換え蛋白質開発・製造ノウハウを融合させることで、全く新たに遺伝子組換えヘモグロビンを開発する目処が得られた。カプセル化技術は早稲田大学と慶應義塾大学の永年の共同研究から、既にその製造技術が確立されており、これらの技術をそのまま応用することでリボソーム封入型遺伝子組換えヘモグロビン (rHb-V) が実現に近づいたことになる。

(1) rHbの発現方法

熊本大学で開発された大腸菌における高発現・高コピーベクターであるpBEXベクター（特願2003-1885）をFig. 11.に示した。このベクターに予め合成しておいたヘモグロビン $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の遺伝子を組み込み、大腸菌で4量体のヘモグロビンとして発現させることに成功した。

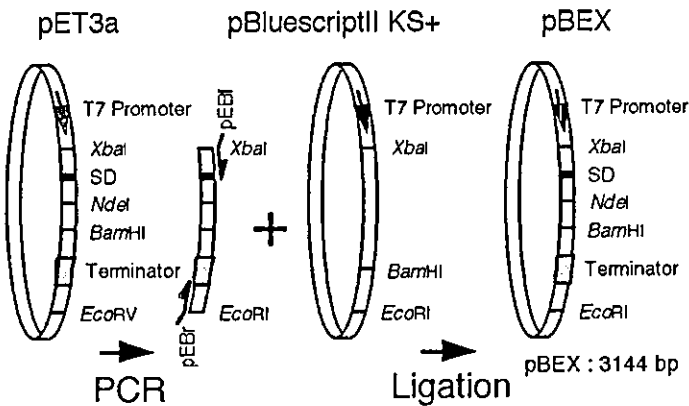


Fig. 11. New pBEX vector with superior character for high expression and copy in colon bacillus.

大腸菌の場合は、ヒトとコドンの使用頻度が異なるため、蛋白質のcDNAをそのまま用いても大量発現できない場合がある。そこで、あらかじめ大腸菌のコドン使用頻度にあわせて最適化した遺伝子を試験管内で全合成した。この方法により、既に多くのヘム蛋白質の大量発現に成功している。ヘモグロビンの場合、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖に対応する遺伝子（Fig. 12.）をそれぞれ別個に合成し、ベクターにつなぎ込む（Fig. 13.）。これらのベクターは強力なT7プロモーターを共通に有しているため、rHbの大量発現が可能となる。

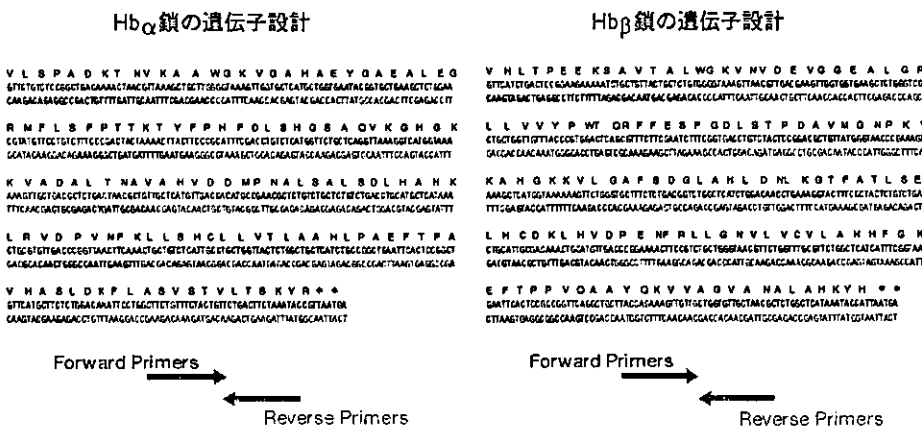


Fig. 12. Synthetic cDNA of hemoglobin  $\alpha$  and  $\beta$  chain with codon sequence adapted to colon bacillus.

培養条件をTable 3.に示したが、この条件で培地1 L当たり、g単位のrHbの発現が可能となっている。

Table 3. List of culture condition employed

Host : Colon Bacillus strain BL21 Gold (DE3)
Culture medium: Terrific Broth
Culture temperature: 30°C
Revolution of shaking: 120rpm
Additive: hemin or aminolevulinic acid

(2) rHb発現の確認

Fig. 14.及び15.に、得られたrHbのnative-PAGE及びマスマクトルの測定結果をそれぞれ示した。これらの結果から発現した蛋白質が確かにヘモグロビンと同一の分子量であるとともに $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖が1 : 1の比率からなる四量体であることが示唆された。現在、構造の詳細検討並びに特性解析を行うとともに、大量製造へ向けた準備を進めている段階である。

Fig. 16.には、秋田県大館市で拡張中の当社の注射剤製造工場の概観を示した。現在、この無菌製剤工場に隣接して人工酸素運搬体の製造工場を設置する作業を進めている。

おわりに

以上述べた人工酸素運搬体は、当社ニプロ、(株)オキシジェニクス、早稲田大学、慶應義塾大学及び熊本大学との共同研究で事業化に向けた開発が進められており、30年来蓄積された大学での基盤技術研究の成果が現実の医薬品（人工酸素運搬体）として輸血代替治療やその他様々な治療分野で使用される日がすぐそこに迫ってきている。

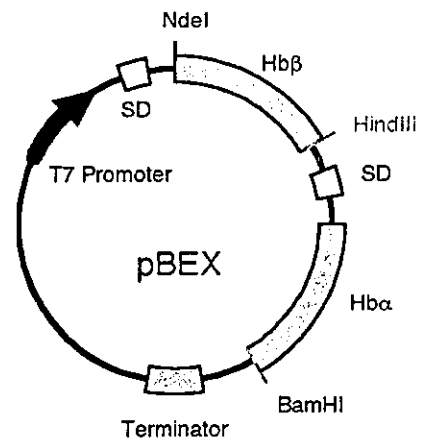


Fig. 13. Our original pBEX vector for co-expression of  $\alpha$  and  $\beta$  chain in colon bacillus.

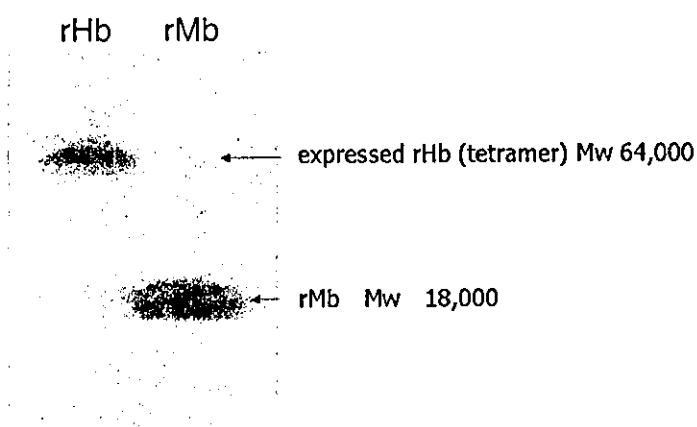


Fig. 14. Identification of expressed rHb (tetramer) by native-PAGE.



Fig. 16. External appearance of pharmaceutical factory in NIPRO  
New facilities for the production of artificial oxygen carriers will be constructed in this factory.

#### 参考文献

1. Tsuchida E. Is there a need for blood substitutes in the new millennium and what should we expect in the way of safety and efficacy?. *Artif Cell Blood Substit Immobil Biotechnol* 2000;28:v-xii.
2. Chang TMS. *Blood Substitutes: Principles, Methods, Products, and Clinical Trials*. Basel, Karger 1997.
3. Tsuchida E, Komatsu T, Matsukawa Y, Hamamatsu K, Wu J. Human serum albumin incorporating tetrakis(o-pivalamido)phenylporphinato-iron(II) derivative as a totally synthetic O<sub>2</sub>-carrying hemoprotein. *Bioconjugate Chem* 1999;10:797-802.
4. Komatsu T, Hamamatsu K, Tsuchida E. Cross-linked human serum albumin dimers incorporating sixteen (tetraphenylporphinato)iron(II) derivatives: synthesis, characterization, and O<sub>2</sub>-binding property. *Macromolecules* 1999;32:8388-8391.

Calculated Mw : 15257.4 ( $\alpha$  chain)  
15998.3 ( $\beta$  chain)

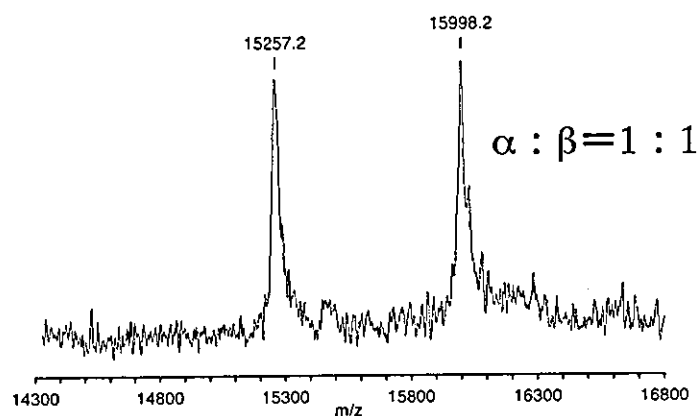


Fig. 15. MALDI-TOF-MS spectrum of expressed rHb.

5. Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E. Kinetics of CO and O<sub>2</sub> binding to human serum albumin-heme hybrid. *Bioconjugate Chem* 2000;11:772-776.
6. Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E. Reaction of nitric oxide with synthetic hemoprotein, human serum albumin incorporating tetraphenylporphinatoiron(II) derivatives. *Bioconjugate Chem* 2001;12:71-75.
7. Komatsu T, Okada T, Moritake M, Tsuchida E. O<sub>2</sub>-binding properties of double-sided porphyrinatoiron(II)s with polar substituents and their human serum albumin hybrids. *Bull Chem Soc Jpn* 2001;74:1695-1702.
8. 小林薫, リコンビナントアルブミンの開発. *人工血液* 2000;8:1-5.
9. 甲斐俊哉, 土田英俊, 小林紘一. アルブミンヘムの開発と酸素輸液への応用. *人工血液*2002;3:86.
10. Tsuchida E, Komatsu T, Matsukawa Y, Nakagawa A, Sakai H, Kobayashi K, Suematsu M. Human serum albumin incorporating synthetic heme: red blood cell substitute without hypertension by nitric oxide scavenging. *J Biomed Mater Res* 2003;64A:257-261.
11. Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E. Effect of heme structure on O<sub>2</sub>-binding properties of human serum albumin-heme hybrids: intramolecular histidine coordination provides a stable O<sub>2</sub>-adduct complex. *Bioconjugate Chem* 2002;13:397-402.
12. Takeoka S, Sakai H, Terase K, Nishide H, Tsuchida E. Characteristics of Hb-vesicles and encapsulation procedure. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994;22:861-866.
13. Sakai H, Takeoka S, Yokohama H, Seino Y, Nishide H, Tsuchida E. Purification of concentrated hemoglobin using

- organic solvent and heat treatment. *Protein Expr Purif* 1993;4:563-569.
14. Sakai H, Hamada K, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E. Physical properties of hemoglobin vesicles as red cell substitutes. *Biotechnol Prog* 1996;12:119-125.
  15. Naito Y, Fukutomi I, Masada Y, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Abe H, Hirayama J, Ikebuchi K, Ikeda H. Virus removal from hemoglobin solution using Planova membrane. *J Artif Organs* 2002;5:141-145.
  16. Fukutomi I, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Sakai K. Carbonylation of oxyhemoglobin solution ( $\text{HbO}_2 \rightarrow \text{HbCO}$ ) using a membrane oxygenator. *J Artif Organs* 2002;5:102-107.
  17. Sou K, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. Poly(ethylene glycol)-modification of the phospholipids vesicles by using the spontaneous incorporation of poly(ethylene glycol)-lipid into the vesicles. *Bioconjugate Chem* 2000;11:372-379.
  18. Sakai H, Tomiyama KI, Sou K, Takeoka S, Tsuchida E. Poly(ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconjugate Chem* 2000;11:425-432.
  19. Przybelski RJ, Daily EK, Kisicki JC, Mattia-Goldberg C, Bounds MJ, Colburn WA. Phase I study of the safety and pharmacologic effects of diaspirin cross-linked hemoglobin solution. *Crit Care Med* 1996;24:1993-2000.
  20. Murray JA, Ledlow A, Launspach J, Evans D, Loveday M, Conklin JL. The effects of recombinant human hemoglobin on esophageal motor functions in humans. *Gastroenterology* 1995;109:1241-1248.

# ヒト赤血球由来ヘモグロビンによるヘモグロビン小胞体の開発と酸素輸送としての医療応用

## Development and clinical application of hemoglobin vesicles as an oxygen carrier using hemoglobin derived from human red blood cells

高木智史 大村光代 太田勝次 須賀裕子 松浦昭宏

Eugene Satoshi Takagi, Mitsuyo Ohmura, Katsuji Ohta, Yuko Suka, Akihiro Matsuura

### 和文抄録

日本赤十字社より供与された期限切れヒト赤血球より精製，ウイルス除去したヘモグロビンをリポソーム脂質二重膜に内包したヘモグロビン小胞体 (HbV) は，ヒト赤血球と比較し粒径は約1/30と小さいが，同等の酸素運搬能を有することがHbVの物理化学実験および種々の実験モデルにおいて証明された。また従来のリポソーム処方の問題とされる血小板活性化，肺臓や腎臓への蓄積等の生体不適合の問題もないことが判明し，さらにラット，サルを用いた安全性試験においても特記すべき副作用は見られなかった。これらHbVの生体内における機能と安全性の評価より，産学協同の国家プロジェクトとして臨床応用を目指した開発が鋭意進行中である。

### Abstract

Hemoglobin vesicle (HbV) is prepared by encapsulating virus-free hemoglobin, which is purified from outdated human red blood cells (RBCs) provided from Japanese Red Cross, into liposome with a phospholipid bilayer membrane. HbV with its diameter approximately one-thirtieth smaller than that of RBC is proved to be effective as an oxygen carrier comparable to human red blood cells as evidenced by various physicochemical and pharmacological experiments. Animal studies also demonstrated that HbV was biologically conformable without platelet activation, accumulation in pulmonary and renal tissues and so on, which have been recognized as problems of conventional liposomes, and that HbV caused no notable adverse effect in safety studies using rats and monkeys. Judging from these evidences, the development of HbV aiming at its clinical application is intensively in progress as a national project by industry-university cooperation.

### Keywords

hemoglobin vesicle, liposome, human hemoglobin, resuscitation, exchange transfusion, safety study

1980年代より早稲田大学理工学部の土田，武岡らによって始められた人工酸素運搬体（ヘモグロビン小胞体；HbV）の開発は，1990年代に慶應義塾大学医学部の小林，末松らがさらに参画し，処方の最適化，製剤規格の設定がなされ，効果・安全性も確認された。2002年より両大学からstart-upした株式会社オキシジェニクスも加わり，これまで両大学の共同研究で蓄積された膨大な技術，データを基に医薬品としての実用化に向けた舵取りがなされた。すなわち，HbVの形状，ヘモグロビン純度等の物性データ，安全性，体内滞留性，体内動態，酸素運搬能

等の生物学的データより，単回投与での救命救急の酸素輸液としての実用化の目途が立ったと判断された。本総説ではHbVの概略と医療応用に向けた最近の知見について述べる。

### 1. HbVの概念

ヒト赤血球の直径は約8 $\mu$ mであり，直径が4 $\mu$ mの毛細血管内を變形して通過し，末梢組織でのガス交換を司る。ヒト赤血球の寿命は約120日と言われているが，老化するに従って赤血球膜のintegrityは失われ，變形能は低下する。一方HbVは日本

NAT検査した献血液も感染症のリスクは少ないと考えるべきです。表現をもっと明確に、「感染の心配が無い」とされたら如何でしょうか。

赤十字社より供与された期限切れヒト赤血球から精製したヘモグロビンを内包した脂質二重膜構造から成る小胞体で、変形能は有さないが直径250nmと赤血球の約1/30と小さいために毛細管内をスムーズに通過できる (Fig. 1.)<sup>1,2)</sup>。HbVの内水相のヘモグロビン濃度は35 g/dL、脂質被膜厚は5-10nmとヒト赤血球とほぼ同等である。HbVは膜糖鎖を有していないため、ヒト赤血球で懸念される血液型不適合の問題もなく、また包含するヘモグロビンは熱処理によりウイルスを不活性化・除去しているため<sup>3,4)</sup>、HIVや肝炎等の感染症のリスクが現行の輸血と比較し非常に少ない。さらにはヒト赤血球が4℃においても保存期間は最長21日間に対し、HbVは室温で1年以上の保存が可能である<sup>1,5)</sup>。

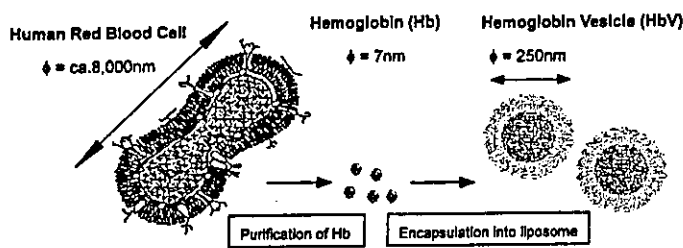


Fig. 1. Schematic representation of hemoglobin vesicle (HbV) prepared from human red blood cells

一方、ヘモグロビンの分子内架橋体や重合体、あるいはヘモグロビン表面に高分子を結合させた修飾ヘモグロビンの開発は米国を中心に行われており、その内のいくつかは臨床試験が進行している<sup>6,9)</sup>。しかしながら粒径が数nmと微小であり、またヘモグロビンが露出していることから、fenestrationを通しての血管外への漏出やヘモグロビンにより一酸化窒素 (NO) がトラップされた結果生じると考えられる血管収縮等の副作用が問題となっている。それに比較してHbVは、先に述べたように直径が大きく、また赤血球同様ヘモグロビンは脂質膜に内包されているためこのような副作用の懸念はない。

## 2. HbVの機能

人工酸素運搬体としてのHbVの最も、且つ唯一の機能は酸素運搬能である。HbVの酸素飽和度が50%時の酸素分圧 ( $P_{50}$ ) は27-34 Torrであり、ヒト赤血球の $P_{50}$  26-28 Torrと非常に近似している<sup>1,10)</sup>。実験動物におけるHbVの効果はラットおよびイヌで確認されている。

1) ラット50%出血モデル：麻酔下ラットの右総頸動脈より50%の血液 (ca. 28mL/kg) を1 mL/minの速度で7-8 minかけて抜き、15分放置後遺伝子組み換え型ヒト血漿アルブミン (rHSA) に分散したHbV、あるいはrHSAを出血量と同量、右総頸静脈より右心房へ挿入したカテーテルより5分間かけて投与し、非処置群と比較した。輸血を全く施さなかった非処置群では8例全例が死亡したのに対し、rHSA単独群では処置6時間後の死亡率は25% (2/8)、HbVでは0%であった (Fig. 2.)<sup>11)</sup>。

このことよりHbVは、非処置やrHSA単独投与を上回る蘇生効果を示し、効率的な酸素運搬能が示唆された。

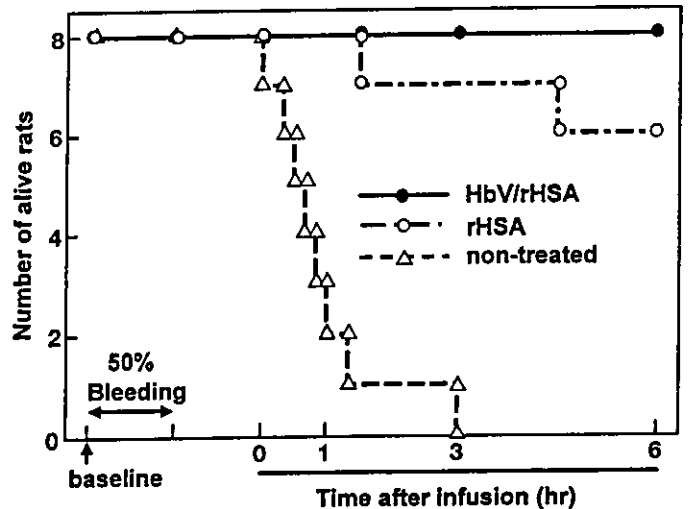


Fig. 2. Resuscitation by hemoglobin vesicle (HbV) in Wistar rats subjected to 50% hemorrhage shock.

Infusion of HbV suspended in recombinant human serum albumin (rHSA) or rHSA was started at 15 min after the 50% bleeding, and then mortality was recorded for 6 hrs. The non-treated group did not receive a resuscitative fluid during the hemorrhage. Eight rats were used for each group. (cited from Crit Care Med 2004;32:539-545)

2) ラット90%交換輸血モデル：麻酔下ラットの右総頸動脈より2 mL/minの速度で血液を抜き、同時に右頸静脈より右心房へ挿入したカテーテルを通して同速度でHbV (rHSAに分散) あるいはrHSAを投与し、90%の交換輸血となるまで継続した。rHSA群では、交換輸血に伴い顕著な血圧低下ならびに腎皮質酸素分圧低下が見られたのに対し、HbV群では血圧および腎皮質酸素分圧とも低下は見られず、また心拍数、下腹大動脈血流量、血液ガス分析値等も良好に維持された (Fig. 3.)<sup>1,12,14)</sup>。このことからHbVは優れた酸素運搬能を有することが示唆された。

3) 体内有効HbV：カニクイザルにHbV 10 mL/kg静脈内投与し、血漿中のHbV由来の総ヘモグロビンおよび非メト化ヘモグロビンを測定した。両ヘモグロビンとも経時的に低下したが、非メト化ヘモグロビンの消失半減期は約15時間と見積もられ、救命救急臨床に十分なポテンシャルを有していることが判明した<sup>15)</sup>。

## 3. HbVの生体適合性

リボソーム処方大きな問題点の一つとして、血小板を活性化し、凝集を惹起することがあげられる。これはリボソームの脂質二重膜の構成成分に関係する。HbVでは血小板を活性化さ

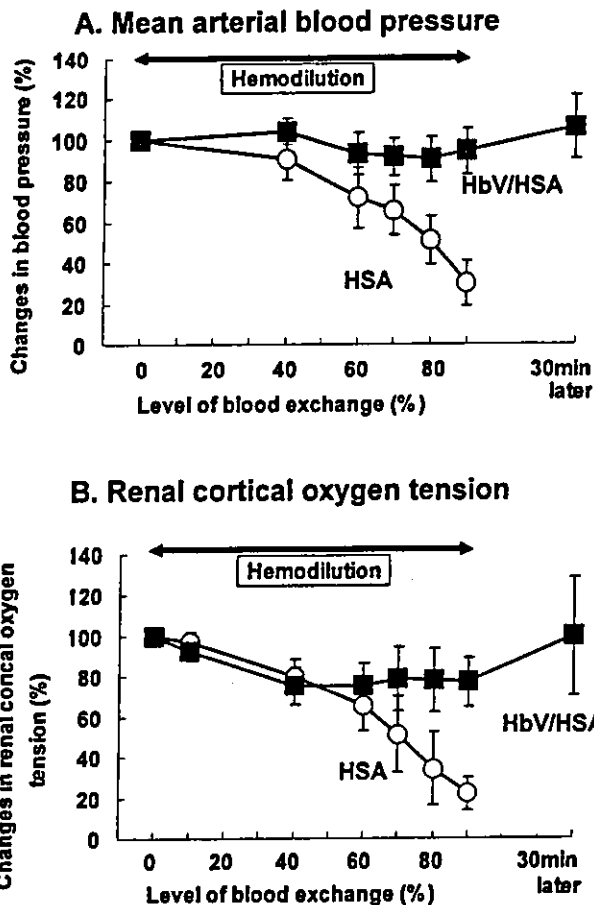


Fig. 3. HbV preserved arterial blood pressure and renal cortical oxygen tension depressed in Wistar rats subjected to 90% exchange transfusion

Ninety percent of estimated total circulating volume of blood (56 mL/kg) was exchanged with 5% human serum albumin (HSA, n=6) or HbV suspended in HSA (HbV/HSA, n=6) at 2mL withdrawal/infusion cycles at a rate of 2mL/min. Blood pressure was monitored by a pressure transducer connected to a catheter inserted into the common carotid artery. Renal cortical oxygen tension was measured by a needle polarographic oxygen electrode placed in the cortex of the left kidney. (cited from ASAIO Journal 1997;43:289-297, Bioconjugate Chem 1997;8:23-30, Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol 1997;25:357-366)

せない新脂質成分として 1,5-dipalmitoyl-L-glutamate-N-succinic acid (DPEA) を配合し、ラットおよびカニクイザルにおいてその有用性が実証された。すなわちラットにおいて各種リボソームを 2 mL/body の投与量で投与し40分後の静脈血中の血小板数を測定した結果、他の一般的なリボソーム成分構成では血小板が約20-50%減少したのに対し、HbVでは全く減少を示さなかった<sup>10)</sup>。カニクイザルにHbV 5, 10, 20 mL/kgの単回静脈投与後の血小板数は、投与後2週間にわたって背景値内で推移し、また出血時間の変動も殆ど認められなかった (Fig. 4)<sup>10)</sup>。更には一般的なリボソームがトラップされることが知られている肺臓、および修飾ヘモグロビンの毒性が見られ

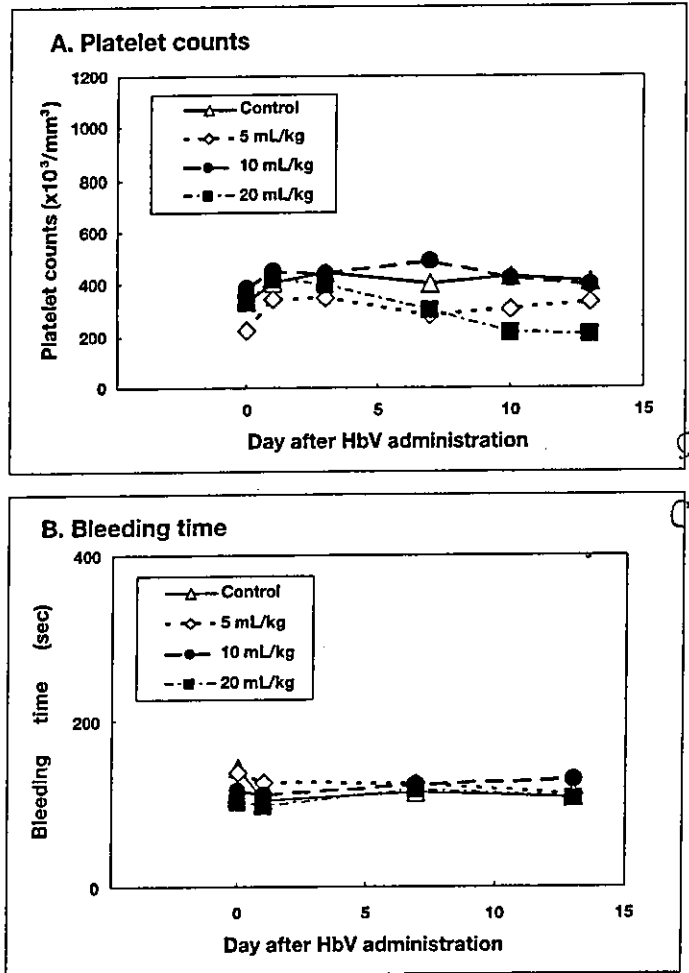


Fig. 4. Platelet counts and bleeding time in rats treated with single HbV administration in cynomolgus monkeys.

Intravenous infusion of HbV was carried out at doses of 5, 10, and 20 mL/kg (5 mL/min), and then venous platelet count and bleeding time according to Simplate method were measured. Three animals were used for each group.

る腎臓の試験終了後の組織剖検においても、HbV 5, 10, 20 mL/kgの投与による変化は特に認められなかった<sup>10)</sup>。以上より、HbVの生体適合性については問題ないと判断される。

#### 4. HbVの安全性および生体内運命

Wistar系雄性ラットにHbVを20 mL/kgの投与量で尾静脈より投与した結果、脾臓の重量(比体重)の増加、血清アルブミンの減少等が見られたがいずれも軽微であった。血清中コレステロールは経時的に増加し、投与2日後に最高値となり、その後漸次減少し1週間後には前値に復した (Fig. 5)<sup>10)</sup>。他には特筆する変化は認められなかった。

カニクイザルにHbVを5, 10および20 mL/kgの投与量で単回静脈内投与し、投与後の血漿中のHbV由来ヘモグロビン(HbV-Hb)濃度推移を2週間にわたって観察した。いずれの投与においても血漿中のHbV-Hbは経時的に低下し、最終消失





## ▶ 第11回日本血液代替物学会

## 人工血液がもたらす未来の救急医療像を模索

血液に代わる機能を持つ血液代替物(人工血液)の開発が1980年以降活発に行われている。酸素運搬体である人工赤血球については海外で既に臨床使用されている製剤もあり、わが国でも研究が積極的に進められているが、いまだ臨床応用には至っていない。札幌市で開かれた第11回日本血液代替物学会(会長=札幌北橋病院・川村明夫理事長)のシンポジウム「血液代替物の臨床応用」(司会=千葉大学大学院救急集中治療医学・平澤博之教授、慶應義塾大学内科学・村田満講師)では、臨床使用の可能性を期待させる動物実験の成果が報告された。

## ～パーフルオロカーボンによる液体換気療法～

## 通常の人工呼吸で対応できない重症呼吸不全に光明

酸素および二酸化炭素を多く溶解できるフッ素化合物の液体であるパーフルオロカーボン(PFC)は血液代替物として研究されながらもいまだ臨床使用されていないが、近年では新しい利用法として液体換気療法への応用が注目されている。千葉大学大学院救急集中治療医学の松田兼一講師は、液体換気療法の現状と可能性について報告。「臨床応用には課題が多いものの、近い将来には救急医療において必要不可欠な治療法になるだろう」と述べた。

## 肺洗浄、肺拡張効果で肺酸化能を促す

液体換気療法の試みは古く、第一次世界大戦で毒ガスに曝露した兵士の肺洗浄の研究から始まり、1962年の高圧下でのマウスの沈溺実験で本格化。現在は水よりもはるかに高い酸素・二酸化炭素溶解度を有するPFCで肺を満たす、全く新しい人工呼吸法が検討されている。PFCによる肺洗浄と、虚脱に陥った肺にPFCが容易に浸透することで肺の拡張とそれによる肺コンプライアンスおよび肺シャントの改善、肺胞内での好中球集積抑制で炎症性サイトカインによる情報伝達の遮断が期待でき、通常の人工呼吸では対応できない重症呼吸不全に対しても肺酸化能が向上すると考えられている。

1989年には乳幼児の呼吸不全に対する臨床試験が初めて実施され、専用呼吸器を用いるtotal liquid ventilation(TLV)に代わり、肺内にPFCを充填したうえで従来の酸素ガスを用いた人工呼吸を行う、専用機を必要としないpartial liquid ventilation(PLV)が臨床試験の本流となり、95年から欧州で複数行われた多施設臨床試験で急性呼吸促進症候群に対する有効性が実証された。

一方、2000年に北米と欧州の56施設

## ～人工赤血球を用いた人工心肺充填液～

## 新生児の心臓手術への応用目指し検討中

人工赤血球は血液型の不適合による免疫性の副作用、血液中に潜在する肝炎ウイルスやHIVによる感染の問題を回避できる利点がある。慶應義塾大学心臓血管外科の山崎真敬氏は「輸血に頼らざるをえない新生児への開胸手術での人工心肺装置に人工赤血球を使うことで、臓器への酸素供給が十分に行われるとともに、感染の危険を防ぐことができる」と述べた。

## 欠点である半減期の短さを逆利用

新生児への心臓手術の成績は大きく向上しているが、体重3kgの新生児の循環血液量は200mL程度であり、このような低体重の患者に対して近年の人工心肺装置を使用した場合、無輸血充填では充填量が限界まで少なくなったとしても運転中に血液が希釈されるため、臓器への適正

な酸素供給が保証されなくなるとの問題が残っている。このため、新生児に対しては輸血血液を充填せざるをえないが、これには感染のリスクがある。山崎氏らはこのジレンマを解決する手段として、ナノテクノロジーの産物であるヘモグロビン(Hb)小胞体(Hbを小胞に封入した人工赤血球)に注目。「短時間の血液希釈なら輸血に代わってHb小胞体で補えるのではないかと」の仮説を立て、人工心肺充填液の研究を重ねている。

現段階の人工赤血球は半減期が30時間程度と短いのが欠点だが、人工心肺稼働中に生ずる血液希釈状態は数時間程度であり、同氏は「その数時間だけ血液として酸素を運搬する役割を果たし、その後、速やかに代謝されるのなら、Hb小胞体は小児の開心術が抱える問題を解決に導く」と説明。同氏はラットを用いて慢性人工心肺モデルを作製。体重400gのラットの循環血液量は22mLであり、人工心肺にはHb小胞体を用いた充填液を30mL充填し、新生児への人工心肺使用に近い状況で検討を開始した。

その結果、術前の人工心肺中のヘマトクリット値(血液に対して血球成分が占める割合)は43%だが、運転中は希釈されて12%にまで減少した。しかし、Hb小胞体がラットの各臓器への酸素供給を補っていることが確認されており、術後のラットの行動に術前との差異は認められな

## ～人工赤血球による40%血液交換～

## ラットは犠牲死させるまで生存

早稲田大学理工学総合研究センターは慶應義塾大学呼吸器外科と共同で、輸血システムを補完する人工赤血球の実現を目指しており、「ヘモグロビン(Hb)小胞体分散液が赤血球と同等の酸素運搬機能を有する最有力の物質系」と提案している。同センターの酒井宏水助教授は、Hb小胞体による血液交換の可能性を検討。ラットで循環血液の40%を交換して回復過程を見た実験では、全例とも犠牲死させるまで生存していたと報告した。

同助教授らはラット40匹について、Hb小胞体をアルブミンに分散させた溶液、またはアルブミン単独の溶液で脱血を繰り返す、臨床現場で想定される血液交換率40～50%を考慮して、ラット循環血液の40%を交換。14日後までの血液学的・血液生

## 次世代医療に不可欠な人工血液開発

緊急医療に必要不可欠となる血液代替物としての酸素輸液(人工赤血球)は、次世代医療の重要な課題に位置付けられており、長期間備蓄できる安全で血液型不適合の心配のない人工赤血球がいつでも供給できるようになれば、災害医療対策が大きく進展する。また、人工赤血球は赤血球よりも小粒径で粘度も低いことから、体組織や臓器の酸素化に有効であり、術前血液希釈液、体外循環や移植を含めた臓器保存灌流液、梗塞部位への酸素供給液、組織再生のための人工臓器細胞培養液などに期待されている(図)。

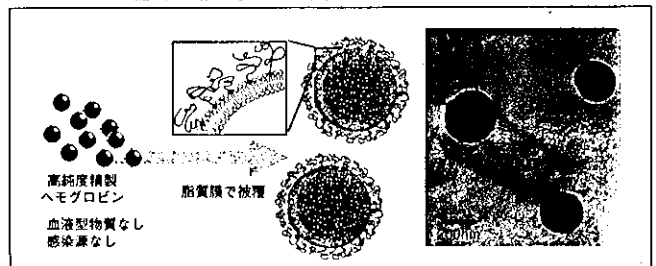
また、酸素供給が絶たれると最も早く障害を受ける海馬についても術前、術後7日目で神経細胞の脱落などの病理学的変化は認められず、肺、肝、腎などについても特に異常はなかった。

以上から、同氏は「ラット慢性人工心肺モデルでの人工赤血球使用は技術上の問題もなく、人工心肺装置で人工赤血球を安全に使用し可能性が示唆された」と述べ、「今後は低酸素状態下の脳領域での検討を重ねることで効果を証明し、大動物、さらには臨床応用につなげていきたい」と展望した。

化学的検査と臓器の重量測定、組織病理学的検討を行った。

その結果、両群ともにヘマトクリット値は7日後に完全に回復し、1～3日後に脾臓肥大が見られた。特にHb小胞体投与群で顕著であったが、いずれも7日後には完全に正常値に復した。同助教授は「原因はHb小胞体の捕捉分解だけではなく、ラットに特有の脾内造血の亢進が考えられ、これがヘマトクリット値の急速な回復に貢献した」と推測している。Hb小胞体投与群では14日後に肝と脾にわずかにヘモデジリン沈着が認められたが、血液生化学的検査では鉄/ビリルビン濃度や肝機能のメーカーに異常はなかった。同助教授は「Hb小胞体が老化赤血球と同様に速やかに分解され、排泄あるいは再利用されているようだ」と見ている。

〈図〉人工赤血球として期待されるヘモグロビン小胞体



(提供: 酒井宏水助教授)

医療

外科手術などで輸血を受ける患者は、全国で年間百万人を超える。献血血液への高精度検査の導入で、ウイルス感染の恐れは極めて小さくなったが、人為的なミスや副作用などが各地で起きてくる。しかも、そうした危険を排除すべき医療現場の対策にはかなりの濃淡がある。安全をめぐる輸血医療の現状をレポートする。

■各地で起る事故 千葉 県茂原市の公立長生病院。昨年、手術中のO型の女性患者にA型を輸血し、女性は数時間後に死亡した。手術前の検査で誤って同姓の男性患者から採血、その血液型で取り寄せた血液を輸血していた。宮崎大病院でも今年三月、吐血したO型の男性患者がA型を輸血された後に死亡した事故が起きている。

極めて初歩的なミスの「A B O型不適合」輸血。だが、実は珍しいことではない。全国の三百床以上の病院を対象にした日本輸血学会の調査では、一九九九年までの五年間に二〇〇の病院で発生。死亡率は一〇%前後とされる。免疫反応などによる副作用も患者にとって脅威だ。

血液型はA B OやR hだけではなく、細かく見ると四百種類以上あるとされる。A B Oが同じでも、それ以外の血液型に対する抗体(不規則抗体)があると発熱やじんましん、呼吸困難などが起きることがある。

慶応大病院が三年分の輸血患者を調べたところ、急性の副作用だけで患者の六%前後に発生。大半が軽症だったが、重症例もあった。全国の医療機関から日本赤十字社への報告でも、死に至ることもある。

血液型不適合で副作用



副作用を防ぐため輸血前に念入りに検査(東京都文京区の都立駒込病院)

輸血の安全道半ば

「輸血関連急性肺障害(TRL A L I)」が過去六年間に疑い例も含め百件に上った。細菌感染の危険もある。二〇〇〇年春、慈恵医大付属病院内で血小板の輸血を受けた男性がショック状態に陥り死亡。病院側は「血小板に混入していた肺炎球菌が原因」と結論付けた。皮膚の表面など

輸血による急性副作用発生状況(慶応大病院の院内調査)(患者ベースの発生率)

Table with 4 columns: Year (2000, 01, 02), Blood Patients, Side Effects, and Incidence Rate.

(血液製剤別の発生率)

Table with 5 columns: Component (Platelets, Fresh Plasma, Red Blood Cells, Autologous Blood), and 4 rows of incidence rates.

いるが、日本の実態はよく分かっていない。防止は努力次第。こうした危険は「輸血用血液の正しい保管や輸血前検査の徹底など、医療機関側の努力で防げ

減らぬ人為ミス 現場の対策に差

手厚い体制を敷く。患者の血液は数十種類の不規則抗体を調べ、適合する血液を選択。実際に輸血と患者の血液を少量混ぜてみる「交差適合試験」も一回ごとに行う。検査や報告書の作成は複数人のスタッフで、輸血後は急性副作用の有無を必ず各診療科から報告させる。

大阪府岸和田市の市立岸和田市民病院(三百五十床)はこの規模の病院には珍しく輸血用血液の管理を薬剤部から検査部に移し、発注から保管、検査、手術室などへの出庫までを一任化。携わる人員を少なくしてミス発生の危険を減らす狙いだ。詳細な輸血療法マニュアルも作成し、責任医師と院内の「輸血療法委員会」がならみを利用させる。

「意見、情報をファクス(06-7595-2420)か電子メール(hyou@takyo.nikkei.co.jp)でお寄せください。お住まいの都道府県や年齢、職業、性別もお寄せ添えてください。」

「厳密に温度管理すべき」赤血球を食品と同じ冷蔵庫で保管していた「新鮮凍結血」も問題だ。慶応大と早稲田大の研究グループは人工赤血球を開発中。ヒトの赤血球の中に詰まっているたんぱく質「ヘモグロビン」を人工の脂質膜で包んだ構造で、この膜を通して酸素をやりとりする。犬の実験では、四割を人工赤血球に置き換えても異常なかった。

普及する「自己血」 人工血液の開発も

副作用などのリスクを極限まで小さくしようと、新たな輸血医療も登場している。普及しつつあるのが、手術前に患者本人から採取した血液を使う自己輸血。天皇陛下の前立腺がんの手術でも使われ、日本輸血学会の認定施設では昨年、手術の三五%が自己輸血だけで行われた。ただ、「きちんとした管理のもとに行わないと、かえって危険」(都立駒込病院の比留間部長)。

「自己血」(厳密に温度管理すべき)赤血球を食品と同じ冷蔵庫で保管していた「新鮮凍結血」も問題だ。慶応大と早稲田大の研究グループは人工赤血球を開発中。ヒトの赤血球の中に詰まっているたんぱく質「ヘモグロビン」を人工の脂質膜で包んだ構造で、この膜を通して酸素をやりとりする。犬の実験では、四割を人工赤血球に置き換えても異常なかった。

▼輸血副作用 輸血による副作用が疑われ、医療機関が日赤に報告する症例は毎年増え続けており、2003年は感染症も含め1606件に上った。最も多いのは「じんましんなど」の554件。呼吸困難など重い全身症状が出る「アナフィラキシー(様)反応」と、

それに血圧低下を伴う症例も計336件あった。ただ、医療現場では副作用が疑われても「主治医が処置するだけのケースが多い」(関係者)という。日赤への報告は多くても実数の6分の1程度との推計もあり、全国の実態ははっきりしない。

# Fake blood may save thousands of lives

From Leo Lewis  
in Tokyo

AFTER 25 years of false dawns and setbacks, a Japanese professor claims to have cracked one of medical science's greatest challenges by producing entirely synthetic red blood cells.

The development takes Professor Eitshun Tsuchida and his group of biochemists at Waseda University, Tokyo, to the very forefront of an intensely competitive global race. Researchers believe that one day it could remove the need for human blood donors.

Talking exclusively to *The Times*, Professor Tsuchida described the sight of the world's first litre bottle of synthetic blood as "beautiful" and something he is delighted to bring to humanity. He is working on a process that could mass produce the blood and, having proved its effectiveness and safety on monkeys and rats, will shortly begin testing it on human volunteers.

Mark Vickers, a consultant haematologist at the University of Aberdeen and member of the British Society of Haematology, advised caution. "Anything is possible, but people have been working at this for many, many years," he said. "Synthetic haemoglobins have turned out to have all sorts of

unpredictable side effects in clinical trials. If it's good, it's great, but there is a long way to go down the line yet."

The product, which remains the subject of round-the-clock laboratory trials, has several huge advantages over the real thing. It is not blood-type specific so can safely be given to any patient; it does not need screening for disease or contamination; and it can be stored at room temperature for up to two years. Normal blood, by contrast, must be refrigerated and destroyed after two to three weeks.

"Can you imagine its value in emergency situations?" Professor Tsuchida said. "Ambulances or any first aid vehicle could carry around the artificial blood without complicated storage mechanisms, knowing that they could instantly inject it into anyone who needed a transfusion."

Academic researchers and private companies across the world have been trying for decades to create a viable alternative to using human blood in transfusions and surgical operations. The standard blood donation process relies on the constant goodwill and generosity of the public and carries a variety of potential health hazards for the recipients.

The Waseda team is one of many research groups



Professor Tsuchida in his laboratory at Waseda University, and below with a bottle of synthetic blood. "Can you imagine its value in emergencies?" he said

looked as though the blood might be transparent like the albumin," Professor Tsuchida said. "But the red colour is symbolically so important. For scientists it is the physical sign that oxygen is being absorbed and transported, the whole purpose of blood."

Although clearly excited by the potential of his invention, Professor Tsuchida has learnt to be cautious in predicting the future of artificial blood. He believes that it could be some time before it is used for anything other than emergencies. While he is now fully confident that the science itself has been cracked, he stops short of saying that his dream of artificial blood for all transfusions will soon be reality.

He admits that it currently costs about £57,000 to gener-

ate a litre of artificial blood, and that it could take a long time before mass production methods bring that figure down to more manageable levels.

He also worries that as well as creating a demand for artificial blood, Japan's rapidly ageing population may present its own hurdles. The blood demand created by longer life spans and a burgeoning number of over-50s is rising by nearly 10 per cent every year, while the number of donors falls. All this creates a desperate need for artificial blood, said Professor Tsuchida. The problem now was money.

"Japan as a country has realised that it will soon not be able to pay its medical bills," he said. "Artificial blood may just cost too much."



based compound heme — also produced in a laboratory — is added, the finished product is capable of absorbing oxygen at precisely the same rate as real blood. To the joy of its creators, the artificial blood is a rich, dark red.

There was a stage where it

worldwide devoted to artificial blood. British, Japanese and American researchers have already produced artificial cells using human hemoglobin, but the Waseda effort is so far the only one to use entirely synthetic materials.

Professor Tsuchida's secret is to synthesise the protein albumin using yeast as the basic material and as an alternative to hemoglobin — a breakthrough that solves the critical problem that hemoglobin molecules are simply too small to be injected directly.

On the northern island of

Hokkaido a partner factory is using Professor Tsuchida's process to churn out around four tons of albumin a day, enough for about 1,000 litres of artificial blood. "There is no magic here," he said. "This is just a phenomenon of molecular assembly." When the iron-

# NEWTON SPECIAL

## SFではない!

# 驚異の近未来

## マンモス復活/人工視覚/電子ペーパー/

網膜のそばに電極を埋めこんで失明患者に光を取りもどそうという、SFの世界のような研究が、その実現に向かって着実に歩を進めている。開発担当者によると、早ければ2010年ごろには「人工視覚システム」が製品化されるという。

近縁種のゾウの卵子を利用して、シベリアの永久凍土の下に眠るマンモスを復活させようとする研究者もいる。にわかには信じがたい話だが、近年のクローン技術の進展をみればあながち絵空事とはいえなくなってきた。

今月号のNEWTON SPECIALでは、近未来に実現しそうなテクノロジーのうち、革新的で思わずおどろかされる研究や、私たちの生活を大きくかえる可能性を秘めた研究の数々を紹介する。研究者たちが追い求める夢に耳を傾けながら、近未来の社会をのぞいてみよう。

協力

**入谷 明**

近畿大学生物理工学部教授

**小澤素生**

株式会社ニテック 人工視覚研究所所長

**満洲邦彦**

東京大学大学院情報理工学系研究科教授

**鈴木隆文**

東京大学大学院情報理工学系研究科特任講師

**太田健一郎**

横浜国立大学教授・水素エネルギー協会会長

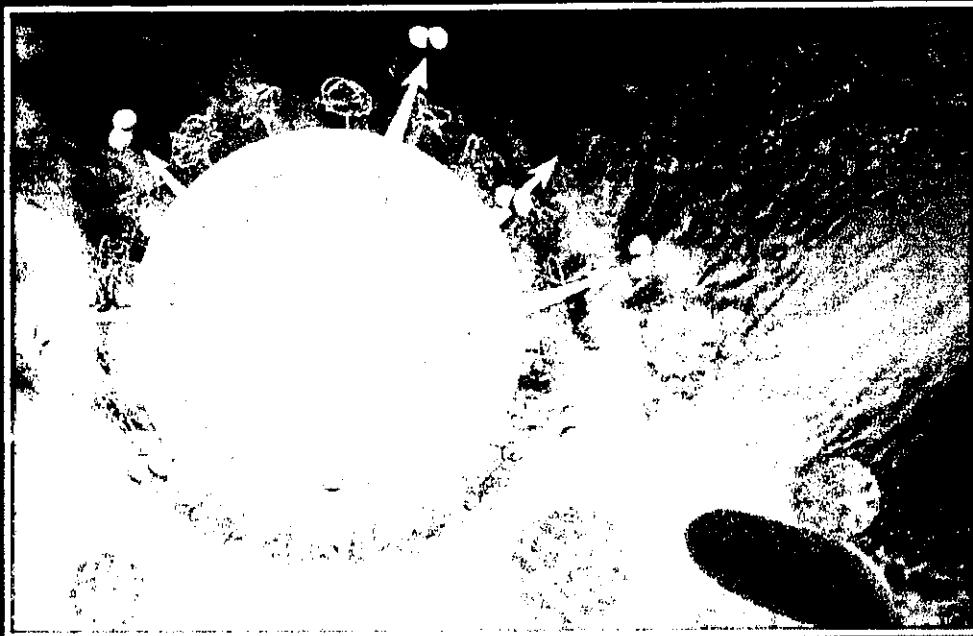
**日本原子力研究所**

**箕浦秀樹**

岐阜大学大学院工学研究科教授

# テクノロジー

着るコンピューター／進まない光



開発が進む人工赤血球。長期保存が可能で感染の心配もなく、輸血用血液の不足を補う画期的なテクノロジーである。

**土田英俊**

早稲田大学名誉教授

**酒井宏水**

早稲田大学理工学総合研究センター教授

**小松晃之**

早稲田大学理工学総合研究センター教授

**武田展雄**

東京大学工学部航空宇宙工学科教授

**吉田 司**

岐阜大学大学院工学研究科助手

**塚本昌彦**

神戸大学工学部電気電子工学科教授

**檀上英利**

公明3興株式会社電子部事業推進部長

**山本 学**

東京理科大学基礎工学部電子応用工学科教授

**長谷川洋作**

財団法人 未来工学研究所所長

# 「人工赤血球」で慢性的な輸血用血液の不足を補う

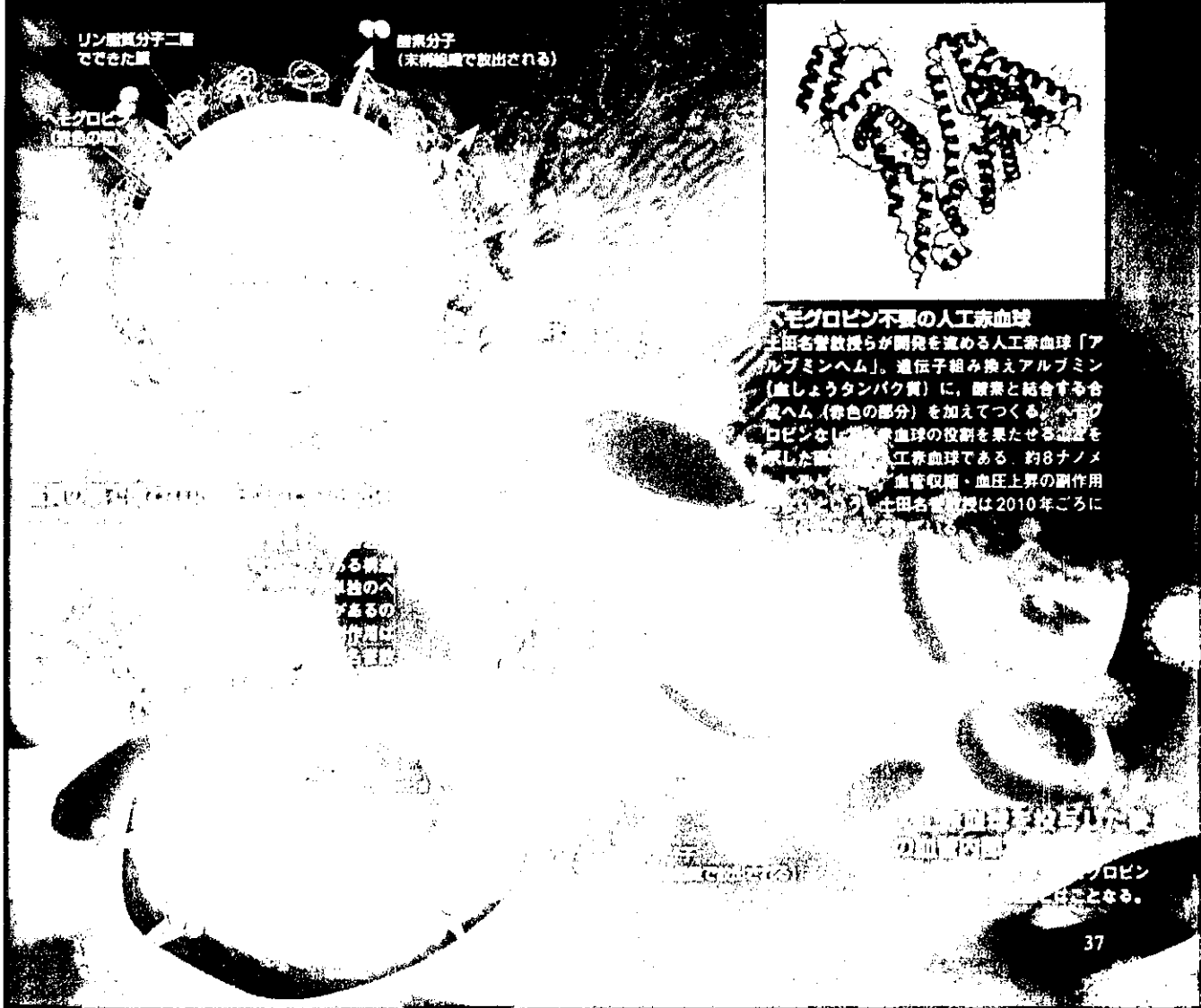
工場で大量合成できる輸血用の「人工赤血球」。そんなおどろくべき技術の実現が近づいてきた。

少子高齢化の進行とともに輸血用血液の不足が懸念されている。血液の保存は3週間までしかできない。そのため、つねに献血をつのらなくてはならないのが現状だ。しかし人工赤血球なら年単位の長期保存が可能で、感染の心配もなく、血液型を気にする必要もない。

では人工赤血球とはどのような物質なのだろうか？ 生体の赤血球の内部には、酸素を運ぶ「ヘモグロビン」が詰まっている。「しかしヘモグロビン単体を使うと副作用が出てしまいます」。そう語るのは、人工赤血球の開発を進める早稲田大学の土田英俊 名誉教授だ。アメリカでは、ヘモグロビンを重合させたり、別の高分子を結合させるな

どして血圧上昇などの副作用を克服する試みが行われたが、うまくいかなかった。そこで土田名誉教授らが開発したのが、3万個ほどのヘモグロビンを脂質膜でおおった直径約250ナノメートルの「ヘモグロビン小胞体」である。ヘモグロビン小胞体はすでに霊長類で安全性が確認され、製造装置の基本設計も終わっている。ヘモグロビン小胞体は現在、期限切れの血液からヘモグロビンを高純度に単離して製造しているが、人工合成も可能だ。

土田名誉教授らは、ヘモグロビンを必要としない「アルブミンヘム」という大きさ約8ナノメートルの完全合成型人工赤血球の開発も進めており、こちらも副作用の問題をクリアしているという。数年後にはこれらの人工赤血球が医療の現場に大きな恩恵をもたらすことが期待される。



リン脂質分子二層でできた膜

酸素分子 (末梢組織で放出される)

ヘモグロビン (赤色の部分)



### ヘモグロビン不要の人工赤血球

土田名誉教授らが開発を進める人工赤血球「アルブミンヘム」。遺伝子組み換えアルブミン(血しょうタンパク質)に、酸素と結合する合成ヘム(赤色の部分)を加えてつくる。ヘモグロビンなしで赤血球の役割を果たせる構造を実現したのがこの人工赤血球である。約8ナノメートルと小さいため、血管収縮・血圧上昇の副作用がほとんどないという。土田名誉教授は2010年ごろに臨床試験を予定している。

人工赤血球の製造装置