

### 3. EFFICACY AND SAFETY OF SNO-PEG-Hb

#### 3.1 Vasoactivity of SNO-PEG-Hb

Systemic administration of unmodified Hb resulted in a hypertensive reaction, which result is in agreement with previous reports<sup>7,8</sup>. In contrast, SNO-Hb did not raise blood pressure, suggesting that NO released from SNO-Hb may have compensated for NO scavenging by the heme in SNO-Hb. Since PEG-Hb also caused no significant increase of blood pressure, PEG-modification itself may also contribute to avoidance of Hb-induced hypertension, probably because the extravasation of Hb molecules and the resultant NO scavenging in the vessel walls is critical for Hb-induced vasoconstriction<sup>9</sup>. Pegylation effectively prevents the extravasation of Hb molecules. SNO-PEG-Hb showed reduced hypertensive activity like that of SNO-Hb (Fig. 3).

The release of NO from SNO-Hb was reported to be accelerated in the presence of low molecular weight thiols such as glutathione and a trace amount of copper ions<sup>6</sup>. Since both components should be present in blood plasma, we assumed that the half-life of NO bound to PEG-Hb in the plasma might be very short. We measured the half-life of Hb-bound NO as shown in Figure 4. The present data indicated that the plasma residence time was not so short. One possible reason for this might be the very low concentration of free copper ion in plasma. Finally, these findings suggested that SNO-PEG-Hb was a slow-releasing agent for NO.

#### 3.2 Oxygen Transporting Capacity

The oxygen transporting capacity of SNO-PEG-Hb was evaluated using a hemorrhagic shock model in rats by monitoring the redox state of cytochrome oxidase reduction of cerebral tissues, in which a near-infrared spectroscopy

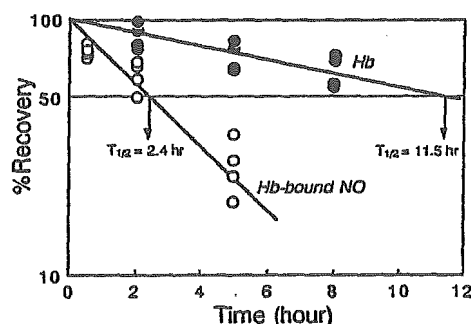
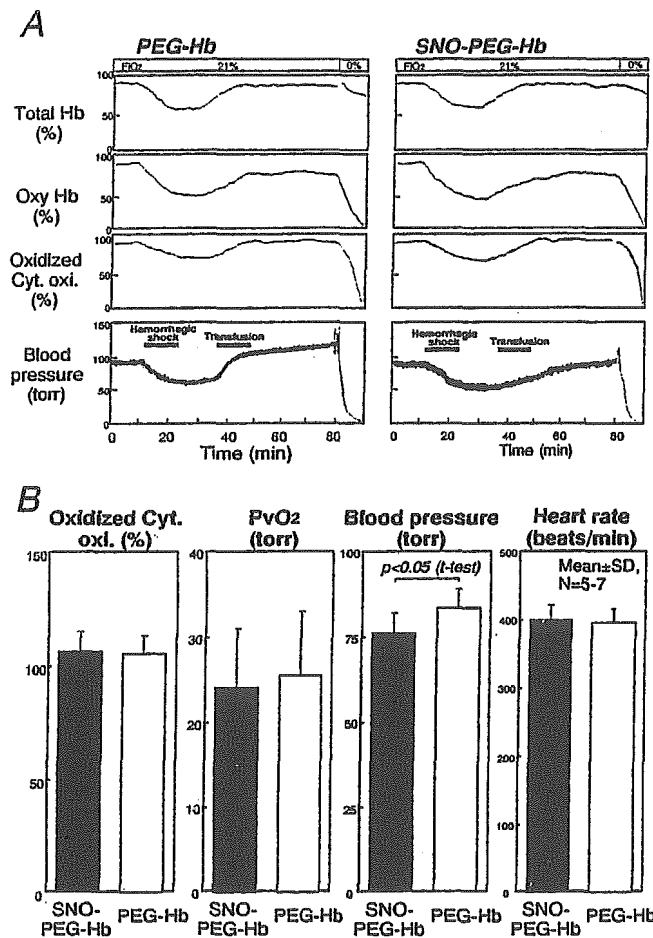


Figure 4 Plasma retention of NO (open circles) and heme (closed circles) of SNO-PEG-Hb in the circulation of rats after a bolus injection at 125 mg/kg.

was used<sup>10</sup>. After blood was removed (up to 30%) from anesthetized male Wistar rats under 21% O<sub>2</sub> ventilation, saline, PEG-Hb or SNO-PEG-Hb (5% Hb solution) was isovolumetrically infused. The pO<sub>2</sub> in the cervical vein and arterial blood pressure were monitored throughout the experiments. The intravenous infusion of SNO-PEG-Hb and PEG-Hb restored oxy-Hb, total-Hb, and cytochrome oxidase reduction levels of cerebral tissues (Fig. 5). This suggested that SNO-PEG-Hb could supply enough oxygen to the brain, like PEG-Hb. During the Hb infusion, PEG-Hb could quickly restore blood pressure, while this recovery was slower after the infusion of SNO-PEG-Hb. This suggested that SNO-PEG-Hb causes vasodilation as an NO donor.



**Figure 5** The redox status of cytochrome oxidase in the rat brain after hemorrhagic shock and Hb infusion. (A) Typical tracings; (B) Comparison at the end of Hb infusion. The duration of hemorrhage and transfusion was indicated by bars. The relative change against the value obtained during the resting period is indicated in some figures.

### 3.3. Safety Characteristics

Safety evaluation of SNO-PEG-Hb was performed in a volume overload experimental model using rats. Unmodified Hb, PEG-Hb and SNO-PEG-Hb were infused into male Wistar rats at 1.15 g/kg body weight (5% Hb solution). Bovine serum albumin was used as the control. Blood samples were obtained 1, 3, 7 and 14 days after administration. Plasma aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine were assayed, and the liver and kidney were removed, fixed with

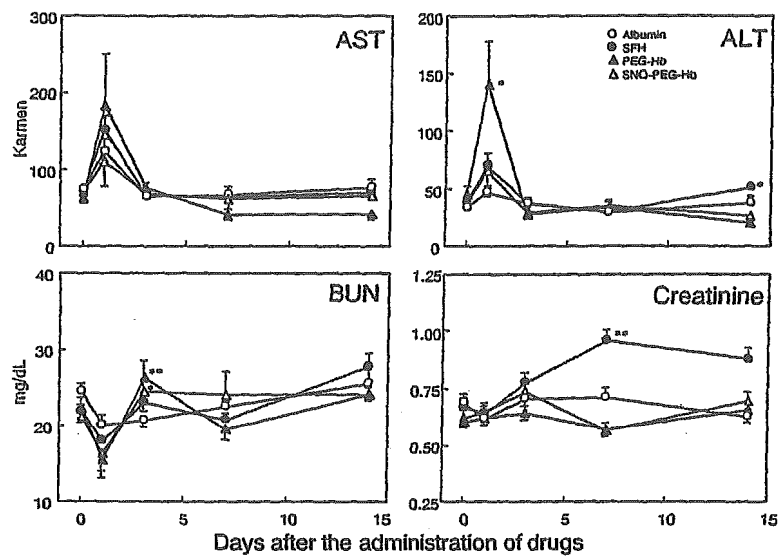


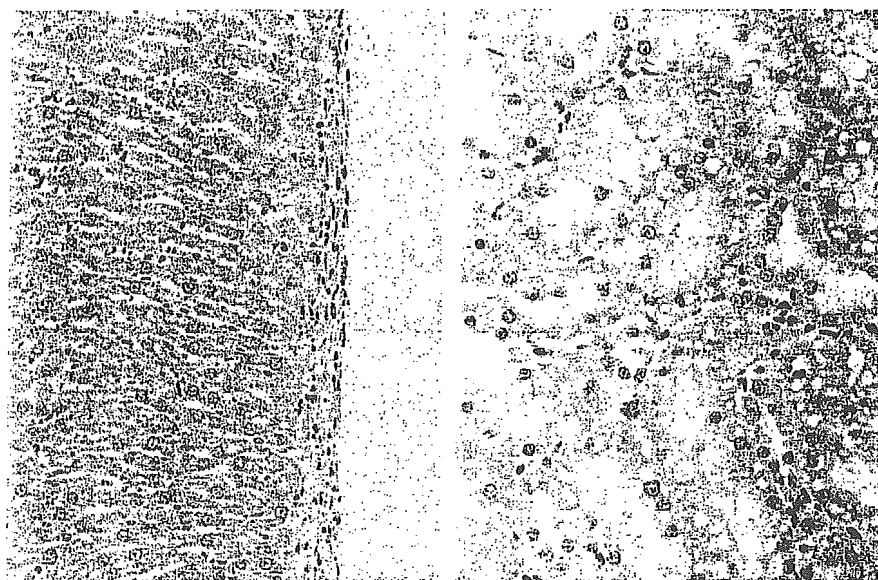
Figure 6 Changes in AST, ALT, BUN and creatinine after the administration of Hb solutions (1.15 g/kg, Hb 5% solution) into male Wistar rats. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of 7-13 animals. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  vs albumin control by ANOVA followed by the Fisher PLSD test.

Table 1. Histopathological observation of the liver and kidney 7 days after the Hb administration into rats

Drugs	Albumin	Hb	PEG-Hb	SPEG-Hb
Number of animals observed	8	8	8	9
<b>Liver</b>				
Focal capsulitis	4	3	5	3
Focal fibrous thickening of the capsule	3	3	5	4
Granuloma in the capsule	0	0	1	0
Focal necrosis	0	0	0	0
Fatty droplets in the hepatocytes	0	0	1	0
<b>Kidney</b>				
Vacuolization of the proximal tubular epithelium	0	0	8	8
Red (hemoglobinogenous) casts	0	2	0	0
Focal basophilic changes and atrophy of the renal tubules	1	2	1	1
Cellular infiltration in the interstitium	0	0	1	0
Pyelitis	0	0	1	0

formaline and stained for histopathological examination. All protein solutions induced transient increases in AST and ALT, and a decrease in BUN (Fig. 6). The most remarkable increase in ALT was observed with PEG-Hb, while SNO-PEG-Hb showed the smallest increase. These changes in AST and ALT returned to the baseline at 3 days postinfusion. Histological examinations of the liver supported these biochemical observations (Table 1). In kidneys, unmodified Hb caused red casts immediately after the administration and increased the plasma creatinine level at 7 days postinfusion, suggesting that unmodified Hb was nephrotoxic. PEG-Hb and SNO-PEG-Hb caused vacuole formation in the proximal tubular epithelium. Cellular infiltration in the interstitium was observed in the PEG-Hb group, while this change was rare in the SNO-PEG-Hb group. Renal function, as evaluated by BUN and creatinine, was, however, normal in both Hb groups. These findings suggested that two pegylated Hb derivatives induced some transient stress with regard to hepatic and renal functions, but it seemed to be well tolerated.

The most remarkable observation in the histology was the vacuolization in the proximal tubular epithelium of the kidneys in the animals transfused with the two pegylated Hb products (Fig. 7 for histology of rats treated with SNO-PEG-Hb). A similar phenomenon has been reported by Matsushita et al.<sup>11</sup>, who showed that a PEG-Hb product caused vacuole formation in the epithelium of the canine kidney, without any pathological features of renal ischemic changes and the regeneration of the tubules. They demonstrated that these



*Figure 7* Light microscopic examination of liver (left, x 66) and kidney (right, x 100) of rats treated with SNO-PEG-Hb at 7 days postinfusion. Hematoxylin and eosin stain.

vacuoles included iron, possibly derived from the Hb product, based on the data of elemental X-ray microanalysis and ferric iron staining. Other substances such as dextran, hydroxyethyl starch, sucrose and mannitol have been also shown to cause vacuolization without any disturbance in renal functions. These reports suggest that the vacuolization reflects the degradation process of artificial materials in the proximal tubule cells.

#### 4. IMPLICATION OF S-NITROSOTHIOLS

There is increased interest in NO in the body as a result of its formation by a variety of cell types as endothelial cells, platelets, neutrophils, and smooth muscle cells. The redox and chemical states of NO are critical in the diverse physiological and pathophysiological events induced by NO. One mechanism by which NO alters the biological function is through formation of S-nitrosothiols; there is increasing evidence that s-nitrosylation plays a large role in regulation of key enzymes and transcription factors. For example, the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) has been shown to be reversibly regulated by S-nitrosylation<sup>12</sup>. S-nitrosylation of  $\alpha$ 1-protease inhibitor ( $\alpha$ PI), a major serine protease inhibitor protein in human plasma, gives a novel function to the protein; SNO- $\alpha$ PI exhibits remarkable cytoprotective effects in ischemia-reperfusion injury<sup>13</sup>. NF- $\kappa$ B is one of several transcription factors that display redox-sensitive DNA binding, and S-nitrosylation of its redox-sensitive cysteine-62 residue has been shown to inhibit NF- $\kappa$ B-dependent transcription<sup>14</sup>. Recently, several active transporting systems of RNSO-bound NO into live cells beyond the cell membrane have been reported<sup>15,16</sup>. The specific enzyme for GSNO degradation has been also identified as glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase, and this enzyme is evolutionally conserved from bacteria to humans<sup>17</sup>. Even though the total picture of the biology of RSNO is still unknown, these findings suggest the presence of an active regulatory system for RSNO metabolism, and that RSNO-bound NO may play essential roles in NO biology in health and disease. SNO-PEG-Hb can deliver not only oxygen but also NO to the tissues with oxygen requirements. Such delivered NO may contribute to regulate the above key enzymes and transcription factors. Considering that SNO-PEG-Hb will be applied to physiopathological situations such as ischemic disease and inflammation, further characterization of SNO-PEG-Hb as a tool for oxygen therapeutics should be encouraged.

#### 5. CONCLUSION

We have developed a new Hb derivative that can deliver and release oxygen and NO-group molecules in the periphery. This product might be a valuable

oxygen carrier as a tool for oxygen therapeutics.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants from the Ministry of Education, Science and Culture (No. 09557125, 11694229, 11557112), and the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan for Research on Advanced Medical Technology. We thank J. Sakanoue for his assistance in measuring the oxygen supply in the rat brain, and A. Aida and Y. Shimahara for their experimental assistance.

## REFERENCES

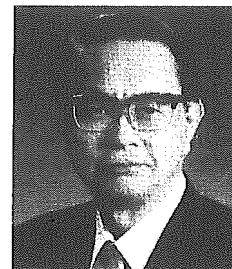
1. Nakai K, Sakuma I, Satoh H, Kitabatake A. Vascular activities of hemoglobin-based oxygen carriers: relationship between vasoconstrictive activity and endothelial permeability. In: Kitabatake A, Sakuma I. (eds). *Recent Advances in Nitric Oxide Research*. Tokyo: Springer-Verlag Tokyo; 1998. p. 33-45.
2. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler J. *S*-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 1996; 380:221-226.
3. Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, et al. Blood flow regulation by *S*-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 1997; 276:2034-3037.
4. Pawloski JR, Swaminathan RV, Stamler JS. Cell-free and erythrocytic *S*-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation. *Circulation* 1998; 97:263-267.
5. Nakai K, Hiroko T, Yasukohchi T, Sakuma I, Fujii S, Yoshioka M, et al. Preparation and characterization of SNO-PEG-hemoglobin as a candidate for oxygen transporting material. *Int J Artif Organs* 2001; 24:322-328.
6. Akaike T, Inoue K, Okamoto T, Nishino H, Otagiri M, Fujii S, et al. Nanomolar quantification and identification of various nitrosothiols by high performance liquid chromatography coupled with flow reactors of metals and Griess reagent. *J Biochem* 1997; 122:459-466.
7. Keipert PE, Gonzales A, Gomez CL, MacDonald VW, Hess JR, Winslow RM. Acute changes in systemic blood pressure and urine output of conscious rats following exchange transfusion with diaspirin-crosslinked hemoglobin solution. *Transfusion* 1993; 33:701-708.
8. Rioux F, Petitclerc E, Audet R, Drapeau G, Fielding RM, Marceau F. Recombinant human hemoglobin inhibits both constitutive and cytokine-induced nitric oxide-mediated relaxation of rabbit isolated aortic rings. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24:229-237.
9. Nakai K, Ohta T, Sakuma I, Akama K, Kobayashi Y, Tokuyama S, et al. Inhibition of endothelium-dependent relaxation by hemoglobin in rabbit aortic strips: Comparison between acellular hemoglobin derivatives and cellular hemoglobins. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 28:115-123.
10. Hoshi Y, Hazeki O, Kakihana Y, Tamura M. Redox behavior of cytochrome oxidase in the rat brain measured by near-infrared spectroscopy. *J Appl Physiol* 1997; 83:1842-8.
11. Matsushita M, Yabuki A, Chen J, Takahashi T, Harasaki H, Malchesky PS, et al. Renal effects of a pyridoxalated-hemoglobin-polyoxyethylene conjugate solution as a blood substitute in exchange transfusions. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 1988; 34:280-283.
12. Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS. Activation of the cardiac calcium release channel

- (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 1998; 279:234-237.
13. Ikebe N, Akaike T, Miyamoto Y, Hayashida K, Yoshitake J, Ogawa M, et al. Protective effect of S-nitrosylated  $\alpha$ 1-protease inhibitor on hepatic ischemia-reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295:904-911.
  14. Marshall HE, Stamler JS. Inhibition of NF- $\kappa$ B by S-nitrosylation. *Biochemistry* 2001; 40:1688-1693.
  15. Li X, Rose G, Dongre N, Pan H-L, Tobin JR, Eisenach JC. S-nitroso-l-cysteine releases norepinephrine in rat spinal synaptosomes. *Brain Res* 2000; 872:301-307.
  16. Ramachandran N, Root P, Jiang XM, Hogg PJ, Mutus B. Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 97:9539-9544.
  17. Liu L, Hausladen A, Zeng M, Que L, Heitman J, Stamler JS. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* 2001; 410:490-494.

## 臨床応用可能な酸素輸液（人工赤血球）の 創製に関する研究

土田 英俊

(早稲田大学 理工学総合研究センター)



土田英俊 (つちだ えいしゅん)

昭和38年早稲田大学大学院理工学研究科卒。昭和48年同大学教授。永年にわたって高分子科学の新領域、高分子錯体の体系確立に尽力、活性中心となる金属錯体部の電子過程はそれを取り巻く分子環境に支配されることを見出し、これを電子過程制御と機能物質創製に関する研究に結びつけた。

政府関連機関各種審議会委員のほか、国際分子錯体会議名誉会長（1999年～）を歴任。Avogadro-Minakata賞（イタリア化学会、1995年）、日本化学会学術賞（1986年）、高分子学会高分子科学功績賞（1991年）、その他に紫綬褒章（1998年）を受賞。

赤血球は直径約 $8\mu\text{m}$ の中窪み円盤状粒子であり、酸素を結合できる蛋白質ヘモグロビン（Hb）の高濃度溶液（約35%）を赤血球膜に内包した構造をもつ。血液はアルブミンとグロブリンを溶解した生理塩水溶液（血漿）に赤血球が分散（40～55 vol%）した粘弾性溶液の非Newton流体である。粒子状成分としては、このほかに白血球（ $0.4\sim 1$ 万個/ $\text{mm}^3$ ）、血小板（ $14$ 万～ $44$ 万個/ $\text{mm}^3$ ）が含まれている。血液は、体組織の全細胞の呼吸を補償する酸素供給をはじめ、各種栄養の運搬、また二酸化炭素等老廃物の運搬、感染（細菌、ウイルス）を防ぐ機能を果たすと同時に、体内の膠質浸透圧を均一に保持する役目も果たす。出血ショックからの回復には、循環血液量の補給と同時に体組織内の全細胞の呼吸を満足する酸素供給（輸液）が必要となる。この代替技術として酸素輸液（人工赤血球）の開発が進み、いわゆる修飾Hbの臨床試験が実施されてもいるが副作用も指摘され<sup>1)</sup>（図1）、まだ実用の域には達していない。往時は赤血球構造の生理的意義の理解が不十分のためか、研究着手から30年経過した現在でもまだ投与できる対象は実現していない。人工赤血球開発の重要度はわが国でも最近では十分に認識され、厚労科学研究（高度先端医療開発研究：人工血液開発分野）、その他として推進されるようになり、ヘモグロビン小胞体、アルブミンヘム、リポドヘム小胞体などが漸く臨床試験に向け具体化してきた。ここでは、代表例に焦点を絞って、安全度と効能について最近の成果を議論したい。

本稿は、第40回日本人工臓器学会大会（2002年10月、北海道）での教育講演内容をまとめたものです。

■ 酸素輸液（人工赤血球）の重要性 1950年以降我国輸血システムの確立につれ、輸血用血液が普遍的に常備されるに至り、戦後の医療進展に大きく貢献したことは紛れもない事実である。しかし、肝炎やエイズなど輸血に伴う感染も問題視されるようになり、献血々液の厳重な検査と管理が強調され、被害を最小限に留めることに成功している。とくに核酸増幅法（NAT検査）の採用の効果は多大である。しかし、狂牛病や西ナイル熱、それに未知の感染源の可能性もあり、完全からは未だ距離があるとされている。加えて赤血球の保存期限は採血後わずかに3週間、それに過誤を含め血液型不適合の医療事故もある。輸血回避のため、術中輸血開始目安のHb濃度10（g/dl）の低減、自己血輸血の推奨と血液希釈、赤血球造血因子（EPO）投与による術前貯血も普及してきてはいるが、症例によっては適用できない。他方、献血1回当たりの採血量は400mlになったが、人口の高齢化に伴って健康献血者の総数は低下し続けている。わが国のように地震などの自然災害が危惧される場合、緊急需要に対応した大量供給ができることは重要な国家的施策でもあり、血液型に関係なく要請に即応して何時でも何処でも必要量を直ちに供与できる、汎用型の酸素輸液出現が強く期待されているところである。

■ 赤血球構造の意義 酸素輸液（人工赤血球）開発の歴史は、輸血史の一駒でもある。第二次大戦後に精製ヒトHb関連の投与例が多く実施されたが、血圧亢進、腎毒性、出血、それに極めて短い滞留時間が問題であった。Hb精製工程における血球膜成分の除去が毒性低減につな



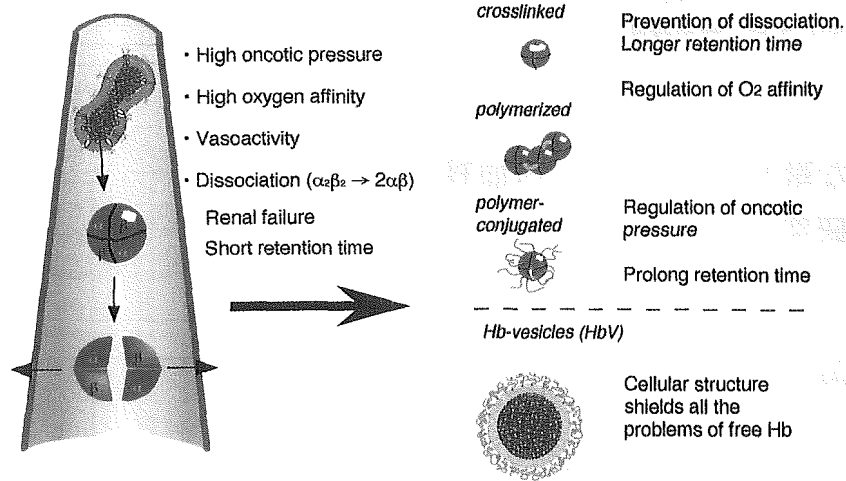


図 1 酸素輸液の開発

ヘモグロビン分子利用の生理的問題点とその回避。

がるとの解明 (Rabiner, 1967) に続き、投与後血流中の  $\alpha_2\beta_2$  から  $2(\alpha\beta)$  への解離が糸球体での濾過に際し、尿細管内で Hb の変性不溶化による腎障害を招来するが、分子内架橋による Hb 解離防止が腎障害低減に有効 (Bunn, 1967), また allosteric 因子とされる “pyridoxal 5'-phosphate”, “2,3-diphosphoglyceric acid” の共存が酸素親和度低下に関与することの発見 (Benesch, 1967) もあり、これらを契機とする高純度 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ることになった。

最近では、直接分子を加工した修飾 Hb (分子内架橋型, 重合型, 高分子結合型) などを対象にした臨床試験が推進されたが、全般としては投与の修飾 Hb が血管内皮細胞由来の弛緩因子 NO を吸着するために生起する血管収縮 (血圧亢進), また代謝異常や軽度の神経性副作用の指摘もあり、いずれもがすべて赤血球とかけ離れた構造が原因となることが明らかにされた。Hb が赤血球内に限定される理由は、① 35% 濃厚 Hb 溶液の高い粘度と膠質浸透圧の抑制, ② 本来毒性のある Hb 逸脱の抑制, ③ Hb 機能維持のための各種リン酸などエネルギー分子, 解糖一ならびに還元一酵素系の保持の役割もある。また、④ 血液 (血球分散系) は非 Newton 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 (ホメオスタシス) が特性である。これら赤血球本来の構造と機能の知見からは、小胞体 (細胞型) 構造であれば無害で投与妥当との結論が容易に想像できたはずである<sup>2,3)</sup>。70 年代初めに Djordjevic (Univ. Illinois, Rush Presbyterian Med. Center) らは、リン脂質小胞体に Hb を内包した “Synthetic Erythrocyte” の研究を開始したが<sup>4)</sup>、粒径制御など調製の困難さ、血漿蛋白質との相互作用に起因する凝集阻

止に十分な手段を得なかったために具体化しなかった。結果論ではあるが、比較的製造容易な修飾 Hb 類の展開に集中した努力が今日に至っており、実はこれが 30 余年を経る現在まで、安全に体内に投与できる酸素輸液の出現しなかった理由と考えてよい。新しい分子科学に立脚する基礎知見の確立からはかけ離れた既存製造技術と近視眼的な経済効果の思い込みから、新しい方法論の採用を躊躇したのが理由であろう。換言すれば、確立されている従来技術の組合せでの開発にこだわり過ぎたため、赤血球構造の意義を単に修飾 Hb で克服できるとの錯覚に陥ったと言えるのではないか。結果として、予期せぬ副作用に遭遇して頓挫を招いたと言ってもよい<sup>5)</sup>。

■ ヘモグロビン小胞体の構成 リン脂質二分子膜で高濃度 Hb 溶液を被覆する技術と、とくに毛細血管を容易に通過できる粒径の制御, また血中分散安定度向上は、高分子と分子集合の科学に立脚した工夫 (1980 年代) を組込んで漸く筆者のグループが完成させた (表 1)。高純度 (99.99% 以上) 高濃度の精製 Hb 溶液, extrusion 法の採用により, Hb 溶液 (濃度 35% 以上) を包んだ小胞体として得られ<sup>6-8)</sup>, Synthetic erythrocyte の問題点を解決した。献血由来の期限切れ赤血球から精製した濃縮 Hb 利用で感染源は無い建前であるが<sup>9)</sup>、精製に際して Hb に一酸化炭素 (CO) を結合させ安定化を計り, 65°C の加熱と膜処理の組合せで安全処理を完了<sup>9,10)</sup>。最終段階で光照射励起によって酸素を結合した  $HbO_2$  に変換。アロステリック因子を添加して酸素親和度の制御 ( $P_{50} = 27 \sim 32$  Torr) ができる。ポリオキシエチレン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

**Table 1** Physicochemical characteristics of HbV suspended in 5% albumin (HSA).

parameters	HbV/HSA	human blood (RBC)	Analytical method
diameter (nm)	220-280	8000	Light scattering method
P <sub>50</sub> (Torr)	27-34 <sup>a</sup>	26-28	Hemox Analyzer
[Hb] (g/dl)	10±0.5	12-17	CyanometHb method
[Lipid] (g/dl)	5.3-5.9	1.8-2.5 <sup>b</sup>	Molibuden-blue method
[Hb]/[Lipid] (g/g)	1.6-2.0	6.7 <sup>c</sup>	—
[PEG-DSPE] (mol%)	0.3	—	<sup>1</sup> H-NMR
metHb (%)	<3	<0.5	CyanometHb method
viscosity (cP) <sup>d</sup>	3.7	3-4	Capillary rheometer
osmolarity (mOsm)	300	ca. 300	(suspended in saline)
oncotic press. (Torr)	20	20-25	Wescor colloid osmometer
pH at 37°C	7.4	7.2-7.4	pH meter
Endotoxin (EU/mL)	<0.1	—	LAL assay
Pyrogen	Free	—	rabbit pyrogen test

<sup>a</sup>adjustable, <sup>b</sup>total cell membrane components. <sup>c</sup>weight ratio of Hb to total cell membrane components, <sup>d</sup>at 230 s<sup>-1</sup>.

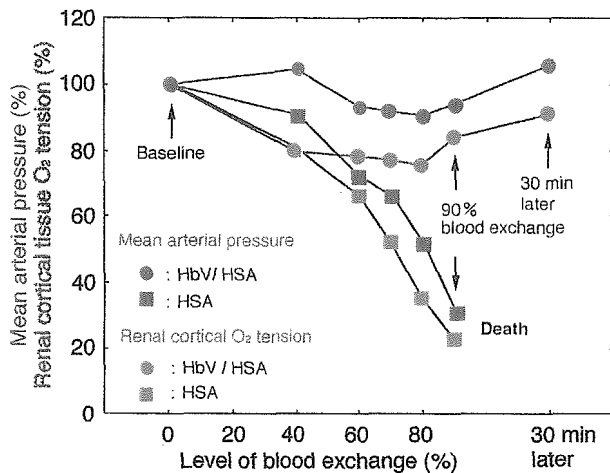


図2 ヘモグロビン小胞体による交換輸血試験

アルブミン (HSA) 5%溶液で全血液量の90%を置換すると血圧も組織内酸素量も低下し、直ちに死亡する。これに対して Hb 小胞体/HSA で置換した場合は、初期値をほぼ維持し生存。

測<sup>11)</sup>、この表面修飾過程を動力的に明らかにし、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<sup>12)</sup>。この新しい観点からのプロセスエンジニアリングによる製造工程の効率化を課題として研究を重ね、パイロットプラントの基本設計を完了している。

■ ヘモグロビン小胞体の安全度と機能 Hb 小胞体の動物投与試験は、交換輸血法で循環血液量の90%超過の交換でも循環動態保持が確認されている<sup>13-16)</sup> (図2)。Hb 小胞体生理塩溶液の膠質浸透圧は零なので、血液交換率が高い場合には当然、血漿増量剤添加が必要となる。5%アルブミン (生理条件) に分散させた場合の膠質浸透圧は20 Torr (血液は20~25 Torr)<sup>17)</sup>、小胞体表面の修飾により

小胞体凝集の抑制可能、粘度と浸透圧はほぼ血液と同等の非 Newton 流体になる。無麻酔下ハムスターの80%交換輸血における皮下微循環動態の検討から、微小血管内を流動するポリオキシエチレン修飾 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が<sup>18,19)</sup>、表面未修飾の Hb 小胞体では細静脈や毛細管内など、流速が比較的遅い部位で凝集体が観測されている。血流速度、有効毛細管密度、組織酸素分圧共に表面修飾系が未修飾系に比して極めて高い数値として推移することからも、表面修飾不可欠が解明された。また、出血ショックの蘇生液としての評価もほぼ終了し<sup>20)</sup> (図3)、赤血球と同等の酸素運搬機能が実証されている。40%の血液を急速交換した後の生存試験では、約1週間後には赤血球量は正常値にまで回復している。

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が、これは NO との高い親和度に起因すると考えている<sup>1)</sup> (図4, 5)。修飾 Hb (とくに分子内架橋 Hb, 粒径 7 nm) は、赤血球 (8 μm) と比較すると極めて小さく、血管内皮細胞層を透過して血管内平滑筋近傍に到達し、内皮細胞が産生する 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を阻害し、組織へ十分量の酸素が供給されなくなる。他方、直径 250 nm の Hb 小胞体では平滑筋まで接近できず 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ことがハムスター等の皮下微循環観測モデルで確認されている<sup>21)</sup>。

肝臓中では肝実質細胞にある hemoxygenase がヘムを分解する。実はこの際に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 細胞に作用することが初めて明確に示された。末松らは摘出肝灌流中の微小循環動態を検討し (図6)、類洞血管の孔 (穿孔篩: fenestra-

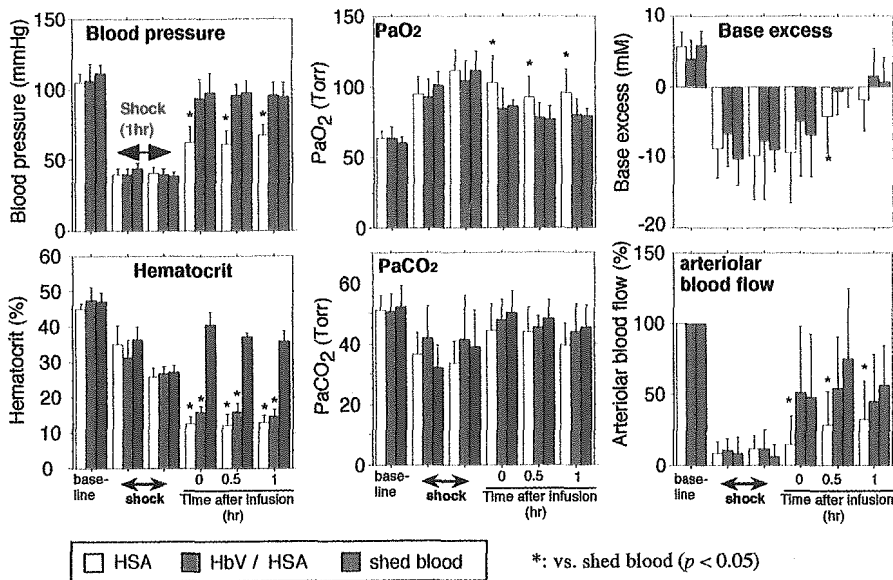


図3 ヘモグロビン小胞体による出血ショック蘇生試験

無麻酔下、ハムスター循環血液量の50%を脱血後、さらに徐々に脱血して血圧を40 mmHgに1時間維持。その後、Hb小胞体をアルブミン(HSA)に分散させたHbV/HSA, HSA単独, または脱血液を投与。ショック状態では代償機能により過呼吸となり、動脈血酸素分圧の上昇と二酸化炭素分圧の低下がみられる。HbV/HSA投与後では血圧、血液ガス組成ともに脱血液の投与と同等。細動脈血流も回復傾向にある。すべてのパラメータは、HSA単独投与群に比較して有意に優れている。

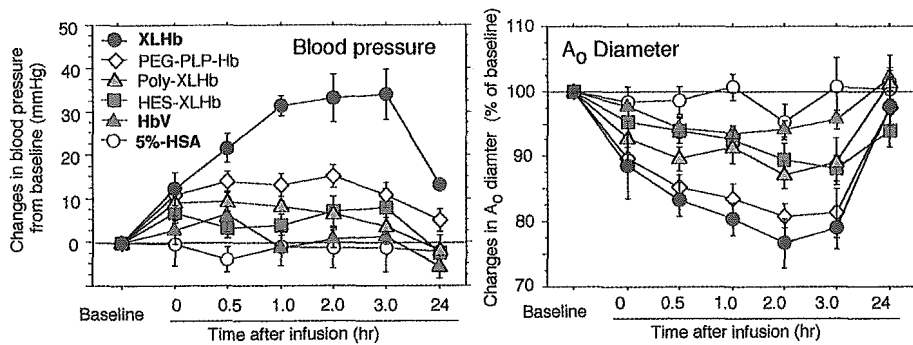


図4 粒径の異なる酸素輸液投与による抵抗血管の収縮と血圧亢進

ハムスターに無麻酔条件下、酸素輸液を7 ml/kg投与し、血圧および抵抗血管(A<sub>0</sub>, 158±21 μmφ)の動態を非侵襲的に観測した。酸素輸液: 分子内架橋Hb(XLHb, 粒径7 nm), PEG結合Hb(PEG-PLP-Hb, 22 nm), glutaraldehyde重合Hb(Poly-XLHb, 47 nm), ヒドロキシエチルスターチ(HES)担持型(HES-XLHb, 68 nm), およびPEG修飾Hb小胞体(HbV, 224 nm)。XLHbの投与後著しい血圧亢進(30 mmHgの上昇)を示し、同時に抵抗血管A<sub>0</sub>の収縮(初期値の76%)も認められた。修飾Hbの粒径の増大に伴ってこの変化幅は減少し、PEG-PLP-Hb群, Poly-XLHb群, HES-XLHb群での血圧亢進はそれぞれ12, 9, 6 mmHgに留まった。他方、HbV群では変化はほとんどない。

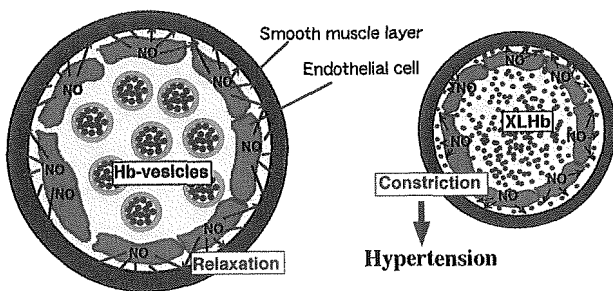


図5 修飾ヘモグロビン投与による血管収縮

図4で観測された血管収縮の有無は、粒子径相違に基づく血管内皮透過性の差に起因する。血管内皮層を透過した小粒径のHbは内皮細胞由来弛緩因子(NO)が平滑筋に到達する前に捕捉され、これが血管収縮につながる。他方、Hb小胞体では、NO捕捉反応は抑制され、血管収縮は生起しない。

tion, 孔径約100 nm)よりも小さい修飾Hb(7 nm)は、これを容易に通過してDisse腔に侵入して肝実質細胞で代謝され、bilirubin排泄の亢進と同時にCOを放出するが、

CO親和性の高い血中Hbに捕捉され、結果として20%の血管抵抗増大と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小胞体では粒径が250

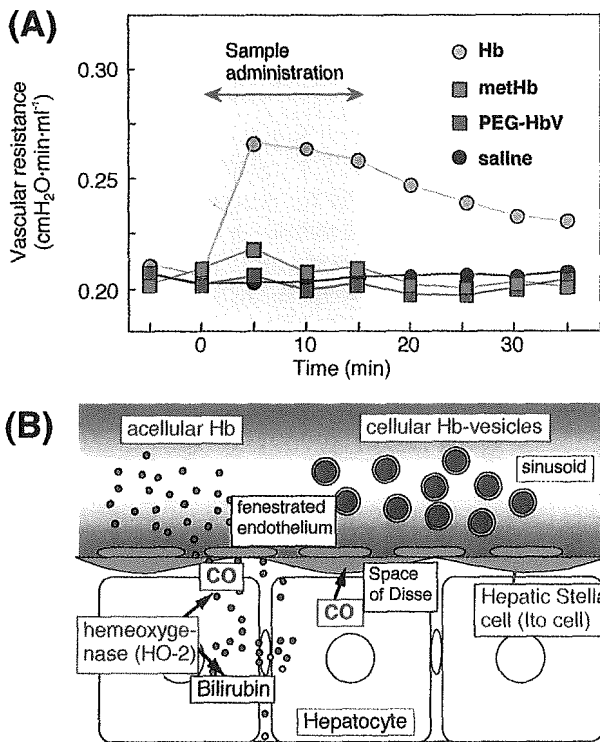


図 6 肝の微小循環動態とヘモグロビン代謝

(A) 精製 Hb 溶液で摘出肝を灌流すると灌流圧が上昇するが、Hb 小胞体と metHb の場合は灌流圧上昇はしない。このことは (B) のように説明できる。Hb 分子は類洞血管の孔 (fenestration) を通って Disse 腔に容易に拡散し、heme は肝実質細胞の hemeoxygenase-2 により代謝され、ビリルビンと CO に分解する。本来 CO は、類洞血管を覆う Ito 細胞に血管弛緩因子として作用するが、Disse 腔で Hb に捕捉され弛緩作用低下のため、灌流圧増大に繋がると理解される。他方、Hb 小胞体は篩孔より大きいので通過せず、CO を結合しないため、肝臓の微小循環はほとんど低下しない。metHb では、Disse 腔に拡散するが CO を結合しないため変化なし。この結果は、肝臓における CO の役割解明に重要な発見となった。

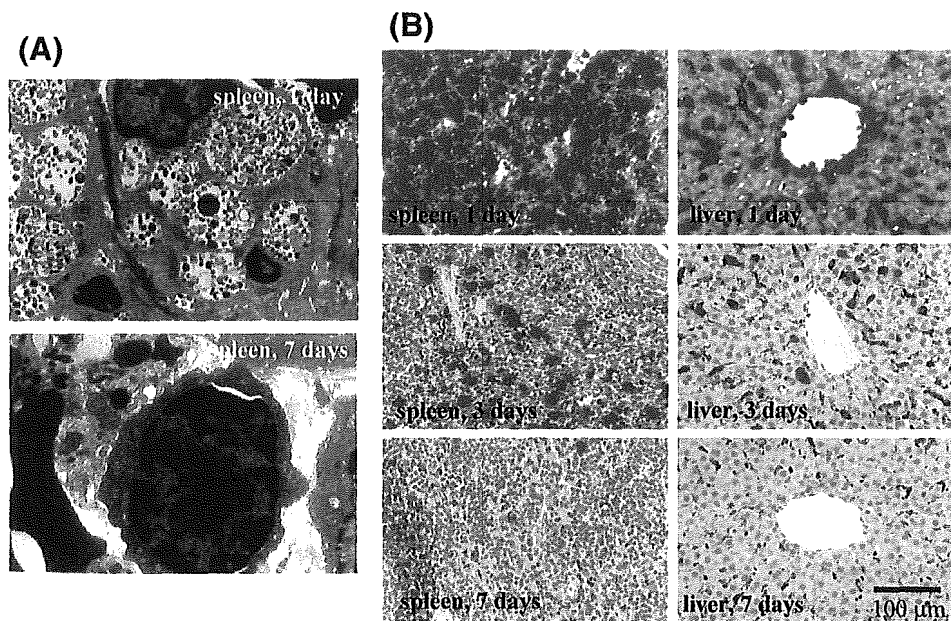


図 7 ヘモグロビン小胞体の代謝過程

(A) Hb 小胞体投与 1 日後のラット脾臓 macrophage の透過型電子顕微鏡写真。食胞 (phagosome) 中に Hb 小胞体の粒子が多数認められる。7 日後には消失。(B) Hb 小胞体投与後のラット肝臓、脾臓組織の顕微鏡写真。抗ヒト Hb 抗体染色による赤染はヒト Hb の存在部位を示す。投与 1 日後で多量の Hb の存在を認めるが、7 日後にはほとんど消失、蓄積はまったく認めない。

nm と大きいので、類洞血管の孔を透過出来ず肝実質細胞に到達しないので、この現象は生起しない。この間灌流圧は一定値に保たれている<sup>22,23)</sup>。

投与された Hb 小胞体は、最終的に貪食細胞が多く存在する脾、肝、骨髄など、いわゆる細網内皮系 (RES) に移行することが同位元素修飾した Hb 小胞体の体内動態の

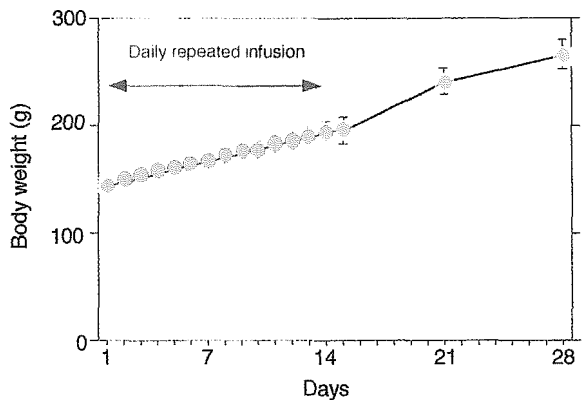


図 8 ヘモグロビン小胞体の反復投与試験

ラットに Hb 小胞体を 14 日間連続投与 (10 ml/kg/day×14 days) 後、全例が 2 週間生存した。体重は略々直線的に増加し続ける。ラットの循環血液量は 56 ml/kg なので、総投与量 (140 ml/kg) はその 2.5 倍に匹敵。

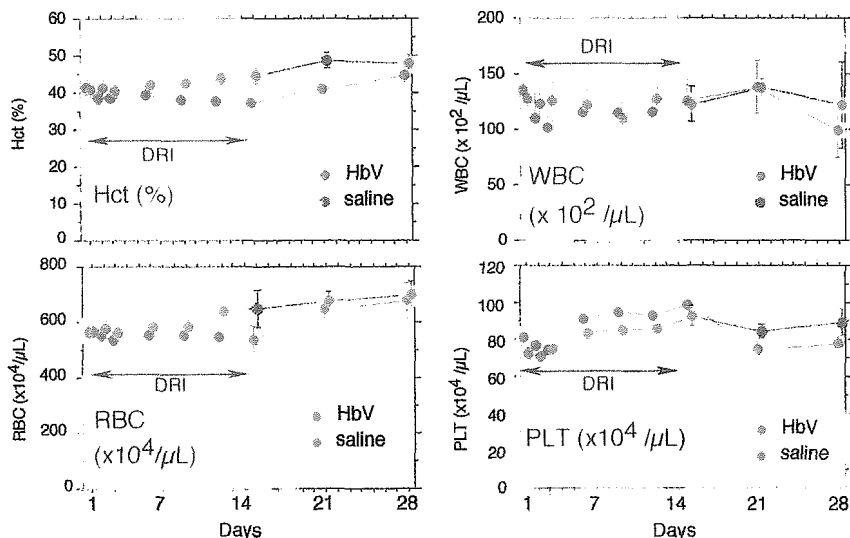


図 9 ヘモグロビン小胞体の反復投与試験における血液学的検査

図 8 の実験において血球数を測定した結果、ヘマトクリットは投与期間中に低下する傾向があるが、反復投与終了後 2 週間すると回復する。血小板数、白血球数著変なし。

観測から解明され、RES 機能への影響と Hb 小胞体の構成成分の代謝確認も実施された。これらの詳細検討は、貪食細胞に捕捉された Hb 小胞体が 7 日以内に分解消失<sup>24)</sup> (図 7)、また脾臓重量も一過性増大を示すが 7 日後には正常値に戻り、血液生化学検査でも異常値は認められていない<sup>25)</sup>。老化赤血球の代謝経路と同様と考えている。また、安全度確認のための反復投与試験 (投与量 10 ml/kg/日を 14 日間投与) では、循環血液量の実に 2.5 倍もの Hb 小胞体分散液を投与したが、体重は増加し続け (図 8, 9)、血液生化学的、組織病理学的検討でも顕著な副作用がなく、Hb 小胞体の成分が速やかに代謝される過程が結果として得られ、安全度が極めて高い製剤であることが証明されている。

■ おわりに 酸素輸液の研究は、最近の 30 年間に具体的対象物について物性と動的機能の相関が解明されるようになってきている。修飾 Hb を用いる酸素輸液の研究は臨床試験の段階にまで至っているが、各種副作用の問題が提起されている。現時点での結論は赤血球同様の被覆膜をもつ構造物 (Hb 小胞体) が理想とされている<sup>26)</sup>。今回は割愛したが、別途の展開として、リポドヘムとリン脂質の共集合の小胞体 (空玉: 脂質小胞体の膜部分にリポドヘムを配置させた系) さらに r-アルブミンに担持された TPP-誘導体あるいは PPIX 誘導体についても毒性がない酸素運搬機能が実証されている (図 10)<sup>27,28)</sup>。酸素輸液は赤血球に比較して体内寿命が短いので短期間の利用 (5 日以内) に限られるが、健常動物 (ラット) の場合には投与のみで存命し得ること、また早い時間にショック状態から回復が

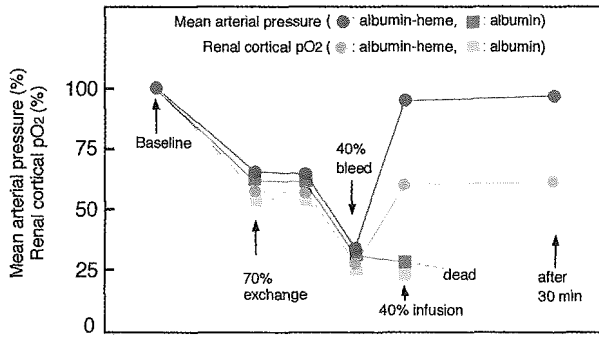


図 10 アルブミン-ヘム投与による出血ショックからの蘇生

アルブミン5%溶液で全血液量の70%を置換すると、血圧も組織内酸素量も低下する。さらに40%脱血した場合、アルブミン溶液の投与だけでは死亡するが、アルブミン-ヘム複合体(70%脱血交換後と同じヘム濃度)を投与すると血圧が元に戻るだけでなく、酸素量も初期値の60%程度まで回復する。これはアルブミンに8分子のヘム(ヘモグロビンの2倍に相当)が結合しているため、ヘム濃度が70%脱血交換後の1.4倍量に増大するためである。脱血前の値を100%として換算。

表 2 人工赤血球の適応症例

輸血代替	期待されている新しい適応
1. 出血ショック蘇生液	1. 虚血部への酸素供給(心不全/脳障害/呼吸不全)
2. 術中出血の補充	2. 腫瘍組織酸素化による抗腫瘍液
3. 術前血液希釈	3. 体外循環回路(人工心肺)充填液
4. 急性貧血	4. 組織再生医学における培養細胞への酸素供給 (肝, 脾, 心筋, 骨髄, 骨, 皮膚, 血管など)
5. 稀少血液型患者への輸血	5. 移植用臓器灌流液(肝, 腎, 脾, 腸, 心, 肺など)

可能であるなど、近未来の酸素輸液としてさまざまな適応が期待される<sup>29,30)</sup>(表2)、詳細は他の機会に譲りたい。

第40回日本人工臓器学会「教育講演」に招聘いただきました。大会長の川村明夫先生(札幌北極病院)に心より感謝申し上げます。本研究成果は、厚生労働科学研究費補助金により推進された。ここに記して謝意を表する。

#### 文 献

- 1) Tsuchida E, ed.: Blood Substitutes, Present and Future Perspective. Elsevier, Amsterdam, 1998
- 2) Tsuchida E: Necessity of blood substitutes in the new millenium and points to consider in the way of safety and efficacy. *Artif Cell Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 28: v-xii, 2000
- 3) Chang TMS: Blood Substitutes: Principles, Methods, Products, and Clinical Trials. Basel, Karger, 1997
- 4) Djordjevich L, Miller IF: Lipid encapsulated hemoglobin as a synthetic erythrocyte. *FASEB Proc* 36: 567, 1977
- 5) Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J, Mallory MN, Rodman Jr G: Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock. *JAMA* 282: 1857-1864, 1999
- 6) Takeoka S, Ohgushi T, Sakai H, Nishide H, Tsuchida E: Preparation conditions of human hemoglobin vesicles covered with lipid membrane. *Artif Organs Today* 3: 129-136, 1993
- 7) Sakai H, Takeoka S, Yokohama H, Seino Y, Nishide H, Tsuchida E: Purification of concentrated Hb using organic solvent and heat treatment. *Protein Expression Purif* 4: 563-569, 1993
- 8) Takeoka S, Ohgushi T, Terasa K, Ohmori T, Tsuchida E: Layer-controlled hemoglobin vesicles by interaction of hemoglobin with a phospholipid assembly. *Langmuir* 12: 1755-1759, 1996
- 9) 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* 5: 141-145, 2002
- 10) Fukutomi I, Sakai H, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E, Sakai K: Carbonylation of oxyhemoglobin solution using a membrane oxygenator. *J Artif Organs* 5: 102-107, 2002
- 11) Sou K, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E: Poly (ethylene glycol)-modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of poly (ethylene glycol)-lipid into the vesicles. *Bioconjugate Chem* 11: 372-379, 2000
- 12) Sakai H, Tomiyama K, Sou K, Takeoka S, Tsuchida E: Poly (ethyleneglycol)-conjugation and deoxygenation enable long term preservation of hemoglobin vesicles as oxygen carriers. *Bioconjugate Chem* 11: 425-432, 2000
- 13) Izumi Y, Sakai H, Hamada K, Takeoka S, Yamahata T, Kato R, Nishide H, Tsuchida E, Kobayashi K. Physiologic responses to exchange transfusion with hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carriers in anesthetized rats. *Crit Care Med* 24: 1869-1873, 1996
- 14) Sakai H, Takeoka S, Park SI, Kose T, Izumi Y, Yoshizu A, Nishide H, Kobayashi K, Tsuchida E: Surface modification of polyethyleneglycol and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem* 8: 23-30, 1997
- 15) Kobayashi K, Izumi Y, Yoshizu A, Horinouchi H, Park S, Sakai H, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E: The oxygen carrying capability of hemoglobin vesicles evaluated in rat exchange transfusion models. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 25: 357-366,

1997

- 16) Izumi Y, Sakai H, Takeoka S, Kose T, Hamada K, Yoshizu A, Horinouchi H, Kato R, Nishide H, Tsuchida E, Kobayashi K: Evaluation of the capabilities of a hemoglobin vesicle as an artificial oxygen carrier in a rat exchange transfusion model. *ASAIO J* **43**, 289-297, 1997
- 17) Sakai H, Yuasa M, Onuma H, Takeoka S, Tsuchida E: Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: objective comparison between cellular and acellular types. *Bioconjugate Chem* **11**: 56-64, 2000
- 18) Sakai H, Tsai AG, Kerger H, Park SI, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E, Intaglietta M: Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with red cell substitutes consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J Biomed Mater Res* **40**: 66-78, 1998
- 19) Sakai H, Tsai AG, Rohlf s RJ, Hara H, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Microvascular responses to hemodilution with Hb-vesicles as red cell substitutes: Influences of O<sub>2</sub> affinity. *Am J Physiol* **276** (Heart Circ Physiol **45**): H553-H562, 1999
- 20) Sakai H, Takeoka S, Wettstein R, Tsai AG, Intaglietta M, Tsuchida E: Systemic and microvascular responses to the hemorrhagic shock and resuscitation with Hb-vesicles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**: H1191-H1199, 2002
- 21) Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Molecular dimensions of Hb-based O<sub>2</sub> carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension in conscious hamster model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**: 908-915, 2000
- 22) Goda N, Suzuki K, Naito S, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T, Suematsu M: Distribution of heme oxygenase isoform in rat liver: topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* **101**: 604-612, 1998
- 23) Kyokane T, Norimizu S, Taniai H, Yamaguchi T, Takeoka S, Tsuchida E, Naito M, Nimura Y, Ishimura Y, and Suematsu M: Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver. *Gastroenterology* **120**: 1227-1240, 2001
- 24) Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, Ideka E, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E: Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: Influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. *Am J Pathol* **159**: 1079-1088, 2001
- 25) Sakai H, Tomiyama K, Masada Y, Takeoka S, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E: Pretreatment of serum containing hemoglobin vesicles (oxygen carriers) to prevent their interference in clinical laboratory tests. *Clin Chem Lab Med* **41**: 222-231, 2003
- 26) Takeoka S, Teramura Y, Atoji T, Tsuchida E: Effect of Hb-encapsulation with vesicles on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaction and lipid peroxidation. *Bioconjugate Chem* **13**: 1302-1308, 2002
- 27) Tsuchida E, Komatsu T, Hamamatsu K, Matsukawa Y, Tajima A, Yoshizu A, Izumi Y, Kobayashi K: Exchange transfusion with albumin-heme as an artificial O<sub>2</sub>-infusion into anesthetized rats: physiological responses, O<sub>2</sub>-delivery, and reduction of the oxidized heme sites by red blood cells. *Bioconjugate Chem* **11**: 46-50, 2000
- 28) 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* **64A**: 257-261, 2003
- 29) Kobayashi K, Komatsu T, Iwamaru A, Matsukawa Y, Watanabe M, Horinouchi H, Tsuchida E. Oxygenation of hypoxia region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic hemes. *J Biomed Mater Res* **64A**: 48-51, 2003
- 30) Erni D, Wettstein R, Schramm S, Contaldo C, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Leunig M, Banic A: Normovolemic hemodilution with hemoglobin-vesicle solution attenuates hypoxia in ischemic hamster flap tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**: 2003 (in press)

## 酸素輸液(人工赤血球)

土田英俊 酒井宏水 武岡真司 宗 慶太郎 小林絃一

◎酸素輸液(人工赤血球)の安全度と効能が具体的に明らかにされ、これが臨床医療に変革をもたらすのも間近である。

**Key word** : 輸血代替, 全身管理, 酸素輸液, 血液希釈, 出血ショック蘇生

赤血球は直径約  $8\mu\text{m}$  の中窪み円盤状粒子であり、酸素を結合できる蛋白質ヘモグロビン(Hb)の高濃度溶液(約 35%)が赤血球膜に包まれた構造をもつ。血液はアルブミンとグロブリンを溶解した生理塩水溶液(血漿)に赤血球などが分散(40~55vol%)した粘弾性挙動を示す非 Newton 流体である。粒子状成分は、このほか白血球( $0.4\sim 1$  万個/ $\text{mm}^3$ )、血小板( $14\sim 44$  万個/ $\text{mm}^3$ )が含まれている。血液は体組織全細胞の呼吸を補償する酸素供給をはじめ、各種栄養の運搬、また二酸化炭素ほか老廃物の運搬、外部から侵入する各種細菌やウイルスを防御する機能を果たすと同時に、体内の膠質浸透圧を均一に保持する役目も果たしている。

出血ショックからの回復には、循環血液量の補給と同時に体組織内の全細胞の呼吸を満足する酸素供給(輸液)が必要となる。この代替技術として人工赤血球(酸素輸液)の開発が進み、いわゆる修飾 Hb の臨床試験が実施されてもいるが、副作用も指摘され<sup>1)</sup>(図 1)、まだ実用の域には達していない。往時は赤血球構造の生理的意義の理解が不十分のためか、研究着手から 30 年近くが経過した現在でも、まだ投与できる対象は実現していない。わが国でも最近では人工赤血球開発の重要度が十分に認識され、厚労科学研究(高度先端医療開発研

究:人工血液開発分野)、その他として推進されるようになり、ヘモグロビン小胞体、アルブミン-ヘム、プロトヘム小胞体などとしてようやく臨床試験に向けた展開が具体化されてきている。本稿では代表例に焦点を絞り、安全度と効能について最近の成果を議論したい。

### 人工赤血球(酸素輸液)の重要性

1950 年以降、わが国輸血システムの確立につれ輸血用血液が普遍的に常備されるに至り、戦後の医療進展に大きく貢献したことは紛れもない事実である。しかし、肝炎や AIDS など輸血に伴う感染も問題視されるようになり、献血血液の厳重な検査と管理が強調され、被害を最小限に留めることに成功している。とくに核酸増幅法(NAT 検査)の採用は効果多大である。しかし、狂牛病や西ナイル熱、それに未知の感染源の可能性も心配で、完全からはまだ距離があるとされている。加えて赤血球の保存期限は採血後わずかに 3 週間、それに過誤を含め血液型不適合の医療事故もある。輸血回避のため、術中輸血開始目安の Hb 濃度  $10(\text{g}/\text{dL})$  の低減、自己血輸血の推奨と血液希釈、赤血球造血因子(EPO)投与による術前貯血などは、現在では外科的医療に必須の技術として定着してきてはいるが、症例によっては適用できない。他方、献血 1 回当たりの採血量は  $400\text{ml}$  になったが、人口の高齢化に伴い、健康献血者の総数は低下し続けている。わが国のように地震など自然災害が危惧される場合、緊急需要に対応した大量供給ができ

#### Oxygen infusion (artificial red cells)

Eishun TSUCHIDA<sup>1</sup>, Hiromi SAKAI<sup>1</sup>, Shinji TAKEOKA<sup>1</sup>, Keitaro SOU and Koichi KOBAYASHI<sup>2</sup>

早稲田大学理工学総合研究センター<sup>1</sup>, 慶應義塾大学医学部外科学教室<sup>2</sup>



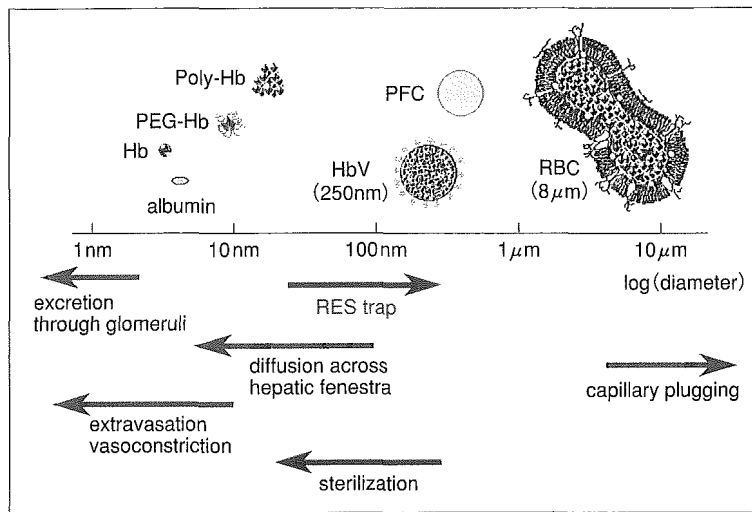


図 1 酸素輸液の開発  
ヘモグロビン利用の生理学的問題から酸素輸液としての最適粒径(200~400 nm φ)が予測できる。

ることは重要な国家的施策でもあり、血液型に関係なく要請に即応していつでもどこでも必要量をただちに供与できる、汎用型酸素輸液の出現が強く期待されているところである。

### 赤血球構造の意義

酸素輸液(人工赤血球)開発の歴史は輸血史のひとこまでもある。第二次大戦後に精製ヒト Hb 関連の投与例が多く実施されたが、血圧亢進、腎毒性、出血、それにきわめて短い滞留時間が問題であった。Hb 精製工程における血球膜成分の除去が毒性低減につながるとの解明(Rabiner, 1967)に続き、投与後血流中での  $\alpha_2\beta_2$  から  $2(\alpha\beta)$  への解離が糸球体での濾過に際し尿細管内で Hb の変性不溶化による腎障害を招来するが、分子内架橋による Hb 解離防止が腎障害低減に有効(Bunn, 1967)、また allosteric 因子とされる“2,3-diphosphoglyceric acid”, “pyridoxal 5'-phosphate”の共存が酸素親和度低下に関与することの発見(Benesch, 1967)もあり、これらを契機とする高純度 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ることになった。

最近では直接分子を加工した修飾 Hb(分子内架橋型、重合型、高分子結合型)などを対象にした臨床試験が推進されたが、全般としては投与の修飾

Hb が血管内皮細胞由来の弛緩因子 NO を吸着するために生起する血管収縮(血圧亢進)、また、代謝異常や軽度の神経性副作用の指摘もあり、いずれもがすべて赤血球とかけ離れた構造が原因となることが明らかにされた。Hb が赤血球内に限定される理由は、①35%濃厚 Hb 溶液の高い粘度と膠質浸透圧の抑制、②本来毒性のある Hb 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-酵素系の保持の役割もある。また、④血液(血球分散系)は非 Newton 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(ホメオスタシス)が特性である。これら赤血球本来の構造と機能の知見からは、小胞体(細胞型)構造であれば無害で投与妥当との結論が容易に想像できたはずである<sup>2,3)</sup>。

1970年代はじめに Djordjevic(Univ. Illinois, Rush Presbyterian Med. Center)らは、リン脂質小胞体に Hb を内包した“synthetic erythrocyte”の研究を開始したが<sup>4)</sup>、粒径制御など調製の困難さ、血漿蛋白質との相互作用に起因する凝集阻止に十分な手段が得られなかったため具体化しなかった。結果論ではあるが、比較的製造容易な修飾 Hb 類の展開に集中した努力が今日に至っており、実はこれが30余年を経る現在まで、安全に体内に投与できる酸素輸液の出現しなかった理由と考えてよ

表 1 ヘモグロビン小胞体の溶液物性(5%アルブミン(HSA)に分散)

parameters	HbV/HSA	human blood	analytical method
diameter (nm)	220~280	8,000	light scattering method
P <sub>50</sub> (Torr)	27~34 <sup>a</sup>	26~28	Hemox analyzer
[Hb] (g/dl)	10±0.5	12~17	cyanometHb method
[lipid] (g/dl)	5.3~5.9	1.8~2.5 <sup>b</sup>	molibuden-blue method
[Hb]/[lipid] (g/g)	1.6~2.0	6.7 <sup>c</sup>	—
[PEG-DSPE] (mol%)	0.3	—	<sup>1</sup> H-NMR
metHb (%)	<3	<0.5	cyanometHb method
viscosity (cP) <sup>d</sup>	3.7	3~4	capillary rheometer
osmolarity (mOsm)	300	ca. 300	(suspended in saline)
oncotic press (Torr)	20	20~25	Wescor colloid osmometer
pH at 37°C	7.4	7.2~7.4	pH meter
endotoxin (EU/ml)	<0.1	—	modified LAL assay
pyrogen	free	—	rabbit pyrogen test

<sup>a</sup>: adjustable, <sup>b</sup>: total cell membrane components.

<sup>c</sup>: weight ratio of Hb to total cell membrane components, <sup>d</sup>: at 230 s<sup>-1</sup>

い。新しい分子科学に立脚する基礎知見の確立からはかけ離れた既存製造技術と、近視眼的な経済効果の思い込みから、新しい方法論採用を躊躇したのが理由であろう。換言すれば、確立されている従来技術の組合せでの開発にこだわりすぎたため、赤血球構造の意義を単に修飾 Hb で克服できると錯覚したともいえる。結果として予期しない副作用に遭遇して頓挫を招くことになったといってもよい<sup>5)</sup>。

### ヘモグロビン小胞体の構成

リン脂質 2 分子膜で高濃度 Hb 溶液を被覆する技術と、とくに毛細血管を容易に通過できる粒径に制御、また血中分散安定度の向上は高分子と分子集合の科学に立脚した工夫を組み込むことでようやく著者らが完成させた(表 1)。高純度(99.99%以上)高濃度の精製 Hb 溶液、extrusion 法の採用により Hb 溶液(濃度 35%以上)を包んだ小胞体を得られ<sup>6-8)</sup>、synthetic erythrocyte の問題点を解決した。献血由来の期限切れ赤血球から精製した濃縮 Hb 利用で感染源はない建前であるが、精製の際 Hb に一酸化炭素(CO)を結合させて安定化をはかり、65°C の加熱と膜処理の組合せで安全処理を完了した<sup>9,10)</sup>。最終段階で光照射励起により酸素を結合した HbO<sub>2</sub>に変換した。アロステリック因子を添加して酸素親和度の制御(P<sub>50</sub>=27~32 Torr)ができる。ポリオキシエチレン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<sup>11)</sup>、この表面修飾過程を動力学の解明から、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<sup>12)</sup>。この新しい観点からのプロセスエンジニアリングによる製造工程の効率化を課題として研究を重ね、パイロットプラントの基本設計を完了している。

### ヘモグロビン小胞体の機能

医療現場、とくに救急医療や外科的手術において血液型不一致や感染の心配をせずに、いつでも要求に応じて投与できる輸血代替としての酸素輸液が求められている。この場合、酸素輸液の必須条件は、投与後の全身管理のおもな項目(循環動態やガス交換、それに末梢組織の酸素化)が輸血をした場合と同等に正常値に保たれることである。

#### 1. 血液希釈(hemodilution)

Hb 小胞体の動物投与(ラット)では交換輸血法で循環血液量の実に 90%超過の交換でも血圧が維持され、また血液ガス組成も腎皮質の酸素分圧も正常値範囲内の推移が確認されている<sup>13-16)</sup>(図 2)。つまり、術前血液希釈、術中出血分の補給、さらに人工心肺(ECMO)体外循環回路の補充液としての利用が期待できる。Hb 小胞体生理塩溶液の膠質浸透圧はゼロなので、血液交換率が高い場合には循環血液量を正常に維持するために当然、血漿増量剤添加が必要となる。たとえば、5%アルブミン(生理条件)に分散させた場合の膠質浸透圧は 20 Torr(血液は 20~25 Torr)<sup>17)</sup>、粘度もほぼ血

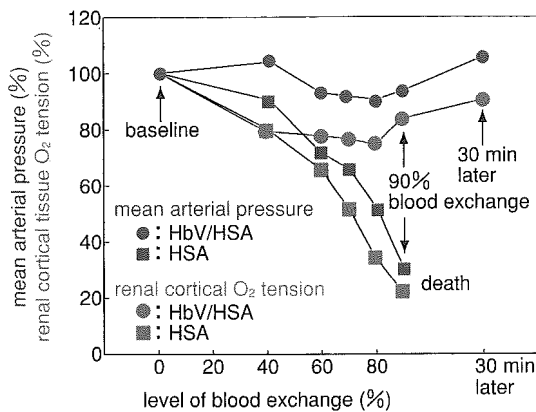


図2 ヘモグロビン小胞体による交換輸血試験

アルブミン(HSA)5%溶液で全血液量の90%を置換すると、血圧も組織内酸素量(腎皮質酸素分圧)も低下し、ただちに死亡する。これに対し(Hb小胞体/HSA)で置換した場合は、初期値をほぼ維持して生存できる。

液と同等の値を示す非Newton流体になり、循環動態の恒常性に寄与できる。

無麻酔下ハムスターの80%交換輸血における

皮下微小循環動態の検討から、微小血管内を流動するポリオキシエチレン表面修飾のHb小胞体は凝集を認めず、血漿相に均一分散しているが<sup>18,19)</sup>、表面未修飾のHb小胞体では細静脈や毛細管内など流速が比較的遅い部位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表面修飾系が未修飾系に比べてきわめて高い数値として推移する事実からも、表面修飾の不可欠が証明された。ハムスター有茎皮弁(skin flap)の虚血部の酸素化を期待する実験では、40%交換輸血を行うと組織酸素分圧に改善がみられている。

## 2. 出血ショックからの蘇生液

さらに、出血ショック時の蘇生液としても検討され(図3)<sup>20)</sup>、赤血球と同等の酸素運搬機能が実証された。無麻酔下ハムスターの循環血液量の50%を脱血後、さらに徐々に脱血して血圧を1時間40 mmHgに維持させてショック状態とし、その後、Hb小胞体をアルブミンに分散させて投与した。ショック状態では代償機能により過呼吸とな

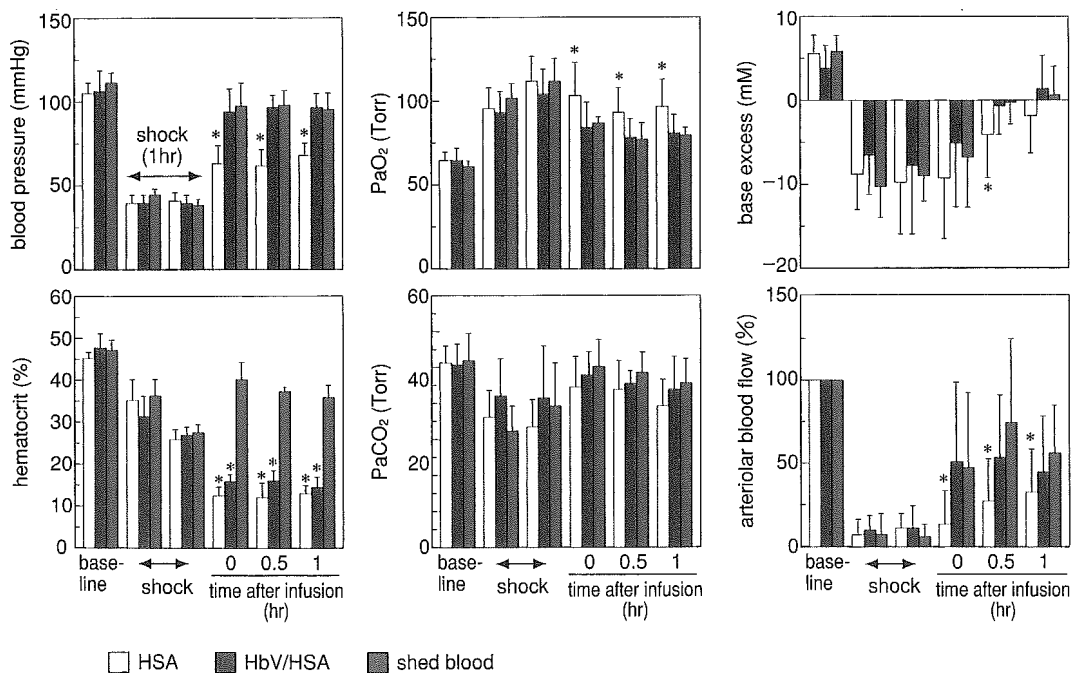


図3 ヘモグロビン小胞体による出血ショック蘇生試験

無麻酔下、ハムスター循環血液量の50%を脱血後、さらに徐々に脱血して血圧40 mmHgに1時間維持させる。その後、Hb小胞体をアルブミン(HSA)に分散させた(HbV/HSA)HSA単独、または脱血液を投与した。ショック状態では代償機能により過呼吸となり、動脈酸素分圧の上昇と二酸化炭素分圧の低下がみられる。(HbV/HSA)投与後では血圧、血液ガス組成ともに脱血液の投与と同等である。細動脈血流も回復傾向にある。すべてのパラメータでHSA単独投与群と比較して有意に優れている。(\* $p < 0.05$  vs. shed blood)。

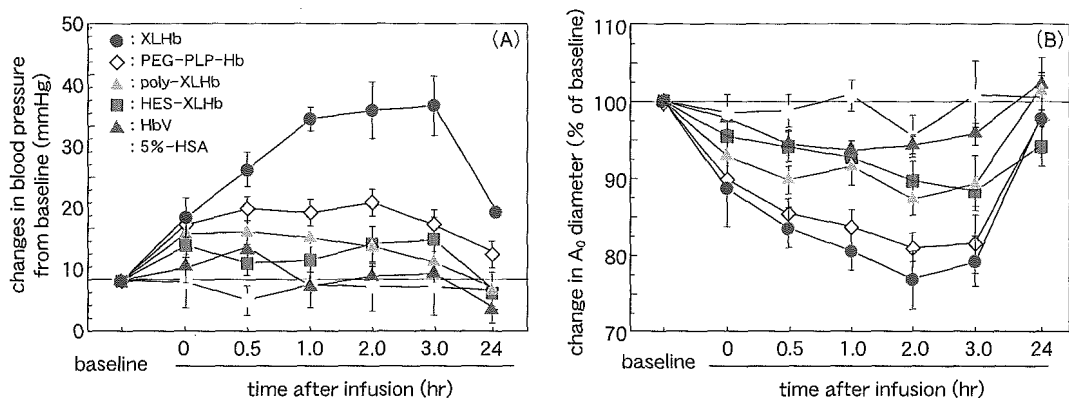


図4 粒径の異なる酸素輸液投与による抵抗血管の収縮(A)と血圧亢進(B)

ハムスターに無麻酔条件下、酸素輸液を7 ml/kg投与し、血圧および抵抗血管(A<sub>0</sub>, 158±21 μm φ)の動態を非侵襲的に観測。酸素輸液：分子内架橋 Hb(XLHb, 粒径 7 nm), PEG 結合 Hb(PEG-PLP-Hb, 22 nm), glutaraldehyde 重合 Hb(poly-XLHb, 47 nm), ヒドロキシエチルスターチ(HES)担持型(HES-XLHb, 68 nm), および PEG 修飾 Hb 小胞体(HbV, 224 nm)。XLHb の投与後著しい血圧亢進(30 mmHg の上昇)を示し、同時に抵抗血管 A<sub>0</sub> の収縮(初期値の 78%)を認めた。修飾 Hb の粒径の増大に伴いこの変化幅は減少し、PEG-PLP-Hb 群, poly-XLHb 群, HES-XLHb 群での血圧亢進はそれぞれ 12, 9, 6 mmHg になる。他方、HbV 群ではほとんど変化認めず、アルブミン(HSA)と同等である。

り、動脈血酸素分圧の上昇と二酸化炭素分圧の低下がみられるが、Hb 小胞体投与後では血圧、血液ガス組成ともに脱血液の投与と同等の回復が認められる。細動脈血流も回復傾向にある。すべてのパラメータでアルブミンを単独投与した場合と比較して有意に優れていた。

また、sevoflurane 麻酔下、ラットの循環血液量の 50% を脱血して 15 分後に Hb 小胞体をリコンビナントアルブミンに分散させて投与し、6 時間観察した。リコンビナントアルブミン投与群では 6 匹中 2 匹が死亡したのに対し、Hb 小胞体投与群では循環動態も血液ガス組成も共に脱血液の投与例と同等に推移し全例生存した。これらの結果は室温で備蓄可能な Hb 小胞体を緊急時に投与して、出血ショックの患者を蘇生させることができる可能性を意味している。

## ヘモグロビン小胞体の安全度

### 1. 血液適合性

臨床試験開始前にヒトを対象としてできる唯一の試験は、採血液との相互作用の検討である。上述のように、Hb 小胞体の粒子表面は PEG 修飾してあるので、血漿蛋白質との相互作用が低減され、凝集は生起せず、血液と同等の溶液粘度を示す。血小板の活性化の有無を RANTES とセロトニン

の放出量、PAC-1 の発現量の変動から検討し、活性化が生起しないことを確認している<sup>21)</sup>。カリクレイン-ニキンの活性化も粒子表面の陰性荷電への接触が引き金となるが、負電荷脂質成分の工夫により、この活性化を回避することに成功した。また、多核球の走化能への影響もないことを確認している<sup>22)</sup>。

### 2. 循環動態の恒常性

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が、これは NO との高い親和度に起因すると考えられる<sup>1)</sup>。ハムスター皮下微小循環系の抵抗血管径と血圧の変動を追跡した実験では、修飾 Hb(とくに分子内架橋 Hb, 粒径 7 nm)でもっとも抵抗血管径が収縮(およそ径の 78%)し、同時に顕著な血圧亢進を示した。血管収縮は末梢循環を障害し、組織へ十分量の酸素が供給されなくなる。粒子径が大きくなるにつれてこれらの変動の程度は弱くなり、直径 250 nm の Hb 小胞体では血管収縮も血圧亢進も起こらないことが確認されている<sup>23)</sup>(図 4)。Hb 小胞体の NO の結合速度定数をストップドフロー法で測定したところ、 $4.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  と判明し、これは分子状 Hb 溶液の結合速度定数( $3.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )よりも 1 桁遅いので、小胞体に濃度高く内包することで NO の結合はある程度抑制され