

図7 ヘモグロビン小胞体の代謝過程

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。蓄積は全く認めない⁴⁷⁾。

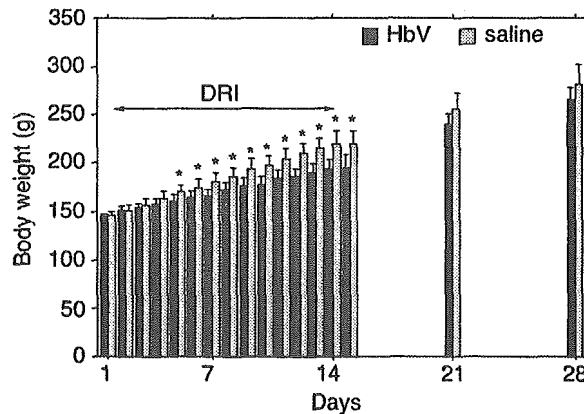


図8 ヘモグロビン小胞体の反復投与試験

ラットに Hb 小胞体を 14 日間連続投与 (DRI, 10 ml/kg/day × 14 days) 後, 2 週間全例生存した。体重は略々直線的に増加し続けた。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 倍に匹敵する。5 日以降, 生理食塩水投与群と比較して有意差が認められるが (*印), 21, 28 日では有意差はない。15 日目の剖検では肝脾重量と血中脂質濃度の一過性増大が認められたが, 血中ビリルビンや鉄の放出もなく, 細網内皮系のヘム代謝も許容範囲内であることが明らかとなった⁵⁰⁾。

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⁵⁰⁾ (図8)。

6 おわりに

酸素輸液の研究は、この30年間に具体的対象物についての物性と動的機能の相関が解明でき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最終段階にきてはいるが、各種副作用が問題提起となっている。結局は赤血球と同様な被覆膜を持つ構造 (Hb 小胞体) が理想であるとの結論に至ろうとしている。また、今回は割愛させていただいたが、別途の展開としてヘム-リン脂質誘導体を利用した、小胞体構造の自己集合体、さらにそのアルブミン担持体 (アルブミン-ヘム) についても同様の成功を確かめており、酸素運搬機能が実証されている⁵¹⁾。人工赤血球は赤血球と比べて体内寿命が短いので短期間の利用 (3日程度) に限られるが、血液型や感染源がなく、長期間保存できる点は赤血球の性能をしのいでいると言える。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可能であるなど、輸血代替としての利用はもちろん、さらに赤血球よりも小粒径である利点を生かした新しい適応 (梗塞部位の酸素化、抗腫瘍効果増強など) も提案されており、医療に著しい変革をもたらすことが期待されている。

謝辞

本研究は、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します。

文 献

- 1) E. Tsuchida (ed.), *Blood substitutes, present and future perspective*, Elsevier, Amsterdam (1998)
- 2) E. P. Sloan *et al.*, *JAMA*, **282**, 1857 (1999)
- 3) K. Burhop *et al.*, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, **32**, 353 (2004)
- 4) T. M. S. Chang, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **10**, 5 (1984)
- 5) 豊田忠之, *科学*, **35**, No. 1, 7 (1965)
- 6) A. D. Bangham *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **8**, 660 (1964)
- 7) L. Djordjevich *et al.*, *FASEB Proc.*, **36**, 567 (1977)
- 8) S. Takeoka *et al.*, *Artif. Organs Today*, **3**, 129 (1993)
- 9) H. Sakai *et al.*, *Protein Expression Purif.*, **4**, 563 (1993)
- 10) S. Takeoka *et al.*, *Langmuir*, **12**, 1755 (1996)
- 11) H. Sakai *et al.*, *Biotechnol. Progress*, **12**, 119 (1996)

- 12) K. Sou *et al.*, *Biotechnol Progress*, **19**, 1547 (2003)
- 13) Y. Naito *et al.*, *J. Artif. Organs*, **5**, 141 (2002)
- 14) I. Fukutomi *et al.*, *J. Artif. Organs*, **5**, 102 (2002)
- 15) H. Sakai *et al.*, *J. Biochem.*, **131**, 611 (2002)
- 16) L. Wang *et al.*, *Polymer Adv. Technol.*, **4**, 8 (1993)
- 17) K. Sou *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **11**, 372 (2000)
- 18) H. Sakai *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **11**, 425 (2000)
- 19) E. Tsuchida *et al.*, *Macromolecules*, **25**, 207 (1992)
- 20) T. Satoh *et al.*, *ASAIO J.*, **38**, 580 (1992)
- 21) K. Akama *et al.*, *Polymer Adv. Technol.*, **11**, 280 (2000)
- 22) H. Sakai *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **93**, 310 (2004)
- 23) Y. Izumi *et al.*, *Crit. Care Med.*, **24**, 1869 (1996)
- 24) H. Sakai *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 23 (1997)
- 25) K. Kobayashi *et al.*, *Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotechnol.*, **25**, 357 (1997)
- 26) Y. Izumi *et al.*, *ASAIO J.*, **43**, 289 (1997)
- 27) 酒井宏水ほか, *人工血液*, **12**, 44 (2004)
- 28) 山崎真敬ほか, *人工臓器*, **33**, S206 (2004)
- 29) H. Sakai *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **11**, 56 (2000)
- 30) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**, H2543 (2003)
- 31) H. Sakai *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **40**, 66 (1998)
- 32) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **276**, H553 (1999)
- 33) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283**, H1191 (2002)
- 34) A. Yoshizu *et al.*, *ASAIO J.*, **50**, 458 (2004)
- 35) H. Sakai *et al.*, *Crit. Care Med.*, **32**, 539 (2004)
- 36) P. Cabrales *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **288**, H1885 (2005)
- 37) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **288** (2005), 印刷中
- 38) D. Erni *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **284**, H1702 (2003)
- 39) C. Contaldo *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**, H1140 (2003)
- 40) S. Wakamoto *et al.*, *Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotechnol.*, **29**, 191 (2001)
- 41) T. Ito *et al.*, *Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotechnol.*, **29**, 427 (2001)
- 42) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **279**, H908 (2000)
- 43) H. Sakai *et al.*, *Polymer Adv. Technol.*, **7**, 639 (1996)
- 44) N. Goda *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **101**, 604 (1998)
- 45) T. Kyokane *et al.*, *Gastroenterology*, **120**, 1227 (2001)
- 46) K. Sou *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **312**, 702 (2005)
- 47) H. Sakai *et al.*, *Am. J. Pathol.*, **159**, 1079 (2001)
- 48) H. Sakai *et al.*, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **41**, 222 (2003)
- 49) H. Sakai *et al.*, *Biomaterials*, **25**, 4317 (2004)
- 50) H. Sakai *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311**, 874 (2004)
- 51) Y. Huang *et al.*, *ASAIO J.*, **50**, 525 (2004)

医療用マテリアルと機能膜

2005年5月31日 第1刷発行

監修 樋口亜紺 (T0445)
発行者 島 健太郎
発行所 株式会社シーエムシー出版
東京都千代田区内神田1-13-1 豊島屋ビル
電話 03(3293)2061
大阪市中央区釣鐘町1-1-1 大宗ビル
電話 06(4794)8234
<http://www.cmcbbooks.co.jp/>

[印刷 倉敷印刷株式会社]

© A. Higuchi, 2005

落丁・乱丁本はお取替えいたします。

本書の内容の一部あるいは全部を無断で複写(コピー)することは、
法律で認められた場合を除き、著作者および出版社の権利の侵害
となりますので、その場合には予め小社宛許諾を求めて下さい。

ISBN4-88231-503-3 C3043 ¥65000E

4. 酸素輸液（人工赤血球）の臨床応用

4.1 酸素輸液（人工赤血球）とその重要性

我が国では安全な輸血用血液が医療機関に常備され、国民の健康福祉に大きく貢献している。肝炎やエイズなど輸血に伴う感染もかつて大きな社会問題となったが、献血血液の厳重な検査と管理が強調され、常に被害を最小限に留める尽力により安全になってきている。特に核酸増幅法（NAT検査）の採用効果は多大であるが、Window Periodにおける検査漏れ、検査項目から外れる病原体の存在、それに未知感染源の存在の脅威にも常に曝されている。その他、赤血球の保存期限は採血後わずか3週間、血小板に至ってはわずか3日間である。それに過誤による血液型不適合の医療事故もある。赤血球輸血回避のため、術中輸血開始目安のヘモグロビン（Hb）濃度10 g/dLの低減、低温無輸血手術、また赤血球造血因子の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。献血1回当たりの採血量は400 mLになったが、人口の高齢化に伴い献血者総数は低下し続けている。

このような状況に鑑み、我が国では厚生労働科学研究・医薬安全総合研究事業として、「人工血液」の研究が推進されている。人工赤血球、人工血小板、人工抗体の3部門から構成され、現行の献血・輸血システムの問題点を克服するさまざまな試みが継続されている。

本稿では酸素輸液（人工赤血球）の話題に絞って概説する。急性出血ショック患者の蘇生には、一般的に循環血液量の補給（電解質輸液）が先決で、その後に体組織内の全細胞の呼吸を満足する酸素供給（赤血球輸血）、さらに血漿増量剤の投与による循環血液量の保持が必要とされる。このうち赤血球の酸素運搬機能を代替できる輸液（酸素輸液）はいまだ実現されていない。我が国のように地震など自然災害が危惧される場合、緊急需要に対応してもっぱら酸素を運搬する輸液製剤を安全に大量供給できることは重要な国家的施策でもある¹⁾。

歴史的には酸素溶解度の高いパーフルオロカーボン（FC）をリン脂質で乳化したFluosol-DAが我が国（ミドリ十字社）で開発され、米国FDAの認可（1990年）を受けた唯一の製剤であることは誇るべき事実でもある。しかし、用途が経皮経管冠動脈拡張術後の灌

流に制限された。実質的には相対的酸素溶解度が低いこと、形態の不安定度、肺胞膜表面の活性物質への影響、蓄積性の問題、それに必要量の酸素量が十分輸送できないなど用途が確定せず、生産を停止（1993年）した。

我が国ではその後、ヒトヘモグロビンを利用するHb小胞体²⁾が実現間近になってきている³⁾。また、アルブミンに合成ヘムを担持させた完全合成系の酸素輸液も具体的になってきているので、ここに紹介する。

4.2 ヘモグロビン小胞体

4.2.1 分子集合体としてのHb（ヘモグロビン）小胞体の構成

赤血球は直径約8 μm 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（分子量64,500）の高濃度溶液（約35%）を赤血球膜に被覆された構造をしている。膜で覆われている理由は、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類（エネルギー分子）、また解糖および還元一酵素系保持の役割もある。それに、④血液（血球分散系）は非Newton流体で、体内循環、特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）特性による。これら赤血球本来の構造と機能の関係が初めから解明されていれば、小胞体（細胞型）構造が無害投与の必要条件との結論が容易に想定できたはずである。

1960年代後半に両親媒性分子であるリン脂質が水相系で二分子膜を形成、これが小胞構造になること、1970年代初めにイリノイ大学のDjordjevichらは、リン脂質二分子層膜で覆った小胞構造“Synthetic Erythrocyte”の研究を開始した⁴⁾。ただし、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ので具体化しなかった。リン脂質二分子膜で高濃度Hb溶液を被覆する技術、特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の向上は、高分子科学と分子集合科学に立脚した工夫（1980年代）を組み込んで、ようやくHb小胞体として完成（図16.4.1）した。

高純度・高濃度Hb溶液（濃度35%以上）を脂質分子二層膜（厚さ5 nm）で被覆させた小胞体（平均

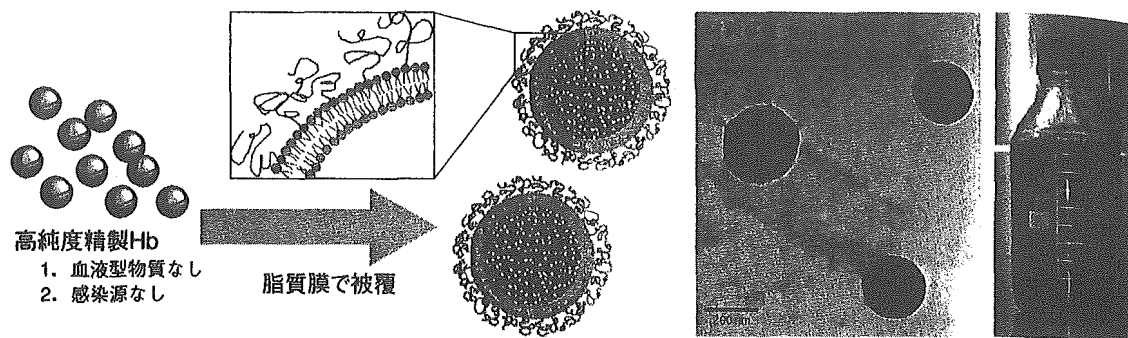


図 16.4.1 ヘモグロビン小胞体

高純度 Hb をリン脂質二分子膜で被覆。粒子表面はポリオキシエチレン鎖で修飾。右側の TEM 写真から、制御粒子径 (250 nm) と Hb が濃度高く充填されている様子がわかる。

粒径 250 nm) を可能とした²⁾。脂質成分と Hb が分子間相互作用 (2 次的相互作用: 疎水的相互作用、静電的相互作用、水素結合など) だけで形成されている分子集合体である。この粒子には 1 粒当たり 3 万個の Hb が濃度高く充填されている。原料 Hb は NAT 検査済みの献血血液の期限切れ赤血球由来で、精製に際し 60 °C の加熱処理 (pasteurization) とウイルス除去膜処理 (ultrafiltration) の組み合わせで、感染に対する安全を確保している⁴⁾。約 1500 本のポリオキシエチレン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が得られ⁵⁾、溶液のまま室温にて 2 年以上の保存が可能である⁶⁾。

4.2.2 輸血代替としての Hb 小胞体

Hb 小胞体粒子分散液は膠質浸透圧を持たないので、血液交換率が高い場合には循環血液量を維持するために、血漿増量剤の添加が必要となる。例えば、認可間近とされる 5% γ -Albumin (rHSA) 水溶液に分散させた場合の膠質浸透圧は 20 mmHg、粘度と浸透圧は血液とほぼ同等に調節、循環動態の恒常性に寄与する⁷⁾。Hb 小胞体の粒径は赤血球の約 1/30 と小さく、血漿中に均一分散できる。

Hb 小胞体の動物投与試験では、交換輸血法で循環血液量の 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を推移することを確認している。臨床現場で想定される最大の交換率 40% の交換輸血において、ラットは全例が生存し、ヘマトクリット (赤血球体積分率) が 1 週間で完全に回復する。Hb 小胞体は最終的に細網内皮系に捕捉され、安全に分解、排泄される⁸⁾。

したがって、臨床では術前血液希釈、術中出血分の補給、さらに胸部外科手術における人工心肺 (ECMO)

体外循環回路の補充液としての利用が十分に期待できる。特に小児患者の体外循環では、無輸血充填とした場合 (血漿増量剤の充填)、術中短時間の Hb 濃度低下が脳に後遺症を与え術後の知能発達に影響するとともにされており、Hb 小胞体を充填液として用いることの利点も期待できる。

出血ショック時の蘇生液としても検討され⁷⁾、赤血球と同等の酸素運搬機能を実証している。例えば、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 5% rHSA に分散させて投与し 6 時間観察する。rHSA 単独の投与では 8 匹中 2 匹の死亡に対し、Hb 小胞体の投与では、循環動態も血液ガス組成も脱血液の投与と同等に推移し、全例が生存 (図 16.4.2) できる⁷⁾。現在、ウサギやビーグル犬を用いた出血ショック蘇生試験も開始しており、概ね良好な成績が得られている。

これから Hb 小胞体が医療現場にて使用できるようになれば、特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し、同種血輸血の回避または必要量の低減が可能となることも示唆できた。

4.2.3 Hb 小胞体の安全度

① 循環動態の恒常性

欧米で開発が進められてきた Hb に化学的修飾を加えた形式 (分子内架橋、重合型、PEG 結合型) では、投与に際し血圧の異常亢進あるいは食道蠕動の運動障害など副作用が明らかとなり、開発中断を余儀なくされたものもある。これは NO の高い親和度に起因すると考えられる¹⁾。ハムスター皮下微小循環系の抵抗血管径と血圧変動の相関追跡では、修飾 Hb (特に分子内架橋 Hb、粒径 7 nm) で抵抗血管径が最大収縮とな

り、同時に顕著な血圧亢進を示す。血管収縮は末梢循環を障害し、組織へ十分量の酸素供給が疎外される。粒子径が大きくなるにつれこれらの変動値は小さくなり、直径 250 nm の Hb 小胞体では血管収縮も血圧亢進も生起しないことが確認されている。現在のところ、分子状の修飾 Hb は、血管内皮細胞層を透過し血管内平滑筋近傍に到達、内皮細胞が産生する NO を捕捉するので、血管弛緩機能が低下する。直径 250 nm の Hb 小胞体では赤血球と同様に平滑筋までは到達できず血管内腔に留まるため、血管収縮も血圧亢進も起らない。

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 (Ito 細胞) に作用するのが明確に示された。摘出肝灌流中の微小循環動態の検討は、類洞血管の孔 (穿孔節: fenestration、孔径約 100 nm) よりも小さい修飾 Hb (7 nm) では、これを容易に通過し Disse 腔に侵入、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。CO 親和度の高い血中 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が観測されている。他方は Hb 小胞体は粒径が 250 nm と大きいので、類洞血管孔を透過できず肝実質細胞に到達しないためこの現象は生起せず、この間灌流圧は一定値に保たれる (図 16.4.3)。

この結果は臓器移植の際に Hb 小胞体を灌流液として安全使用できることも意味し、摘出から移植までの所要時間を延長できる。移植臓器を従来よりも遠隔地に運搬が可能となる。

②体内動態と代謝過程

酸素輸液の投与は血液量の大半を置換する大量投与も前提となるので、成分の体内動態と代謝過程の詳細検討が必要となる。これまでの検討では、投与 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) への移行が同位元素 (^{99m}Tc) 修飾した Hb 小胞体の体内動態観測から解明され⁹⁾、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 (図 16.4.4) し¹⁰⁾、また脾臓重量も一過性増大を示すものの 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ないので、老化赤血球の代謝経路と同様と考えられる。また、40 % の血液を急速交換した後の生存試験 (ラット)

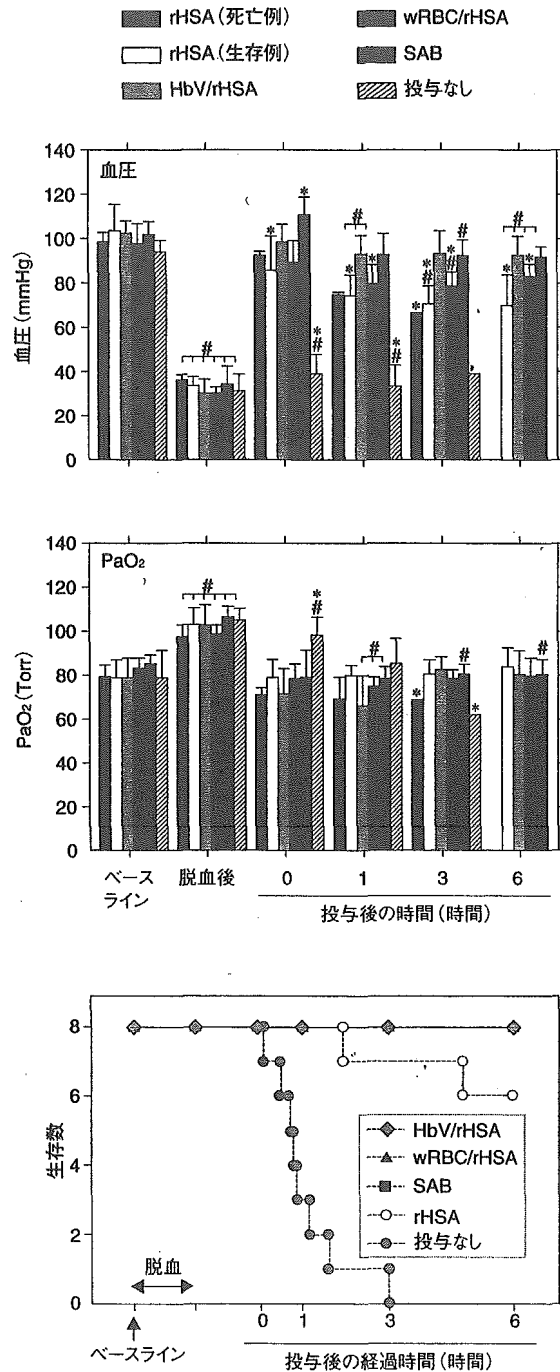


図 16.4.2 ヘモグロビン小胞体による出血ショック蘇生試験

#p < 0.05 vs baseline

*p < 0.05 vs the HbV/rHSA group

Sevoflurane 吸入麻酔下、ラット循環血液量の 50 % を脱血、15 分経過後、Hb 小胞体を rHSA に分散させて投与。ショック状態では血圧低下、代償機能により過呼吸、動脈血酸素分圧 (PaO₂) の上昇、pH と塩基余剰の低下が観測できる。蘇生液の投与がないと全例が死亡。rHSA 群は 8 匹中 2 匹が死亡、HbV/rHSA 群は全例生存。

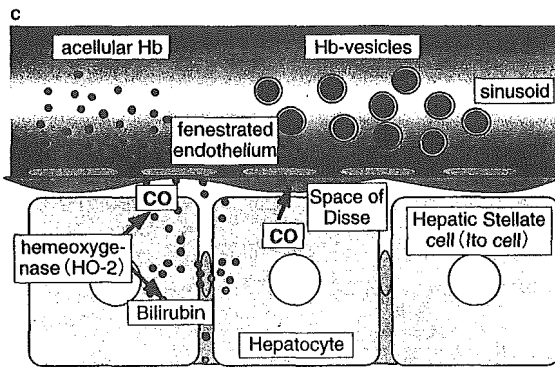
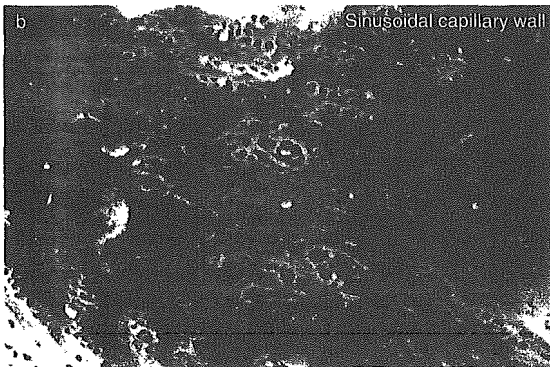
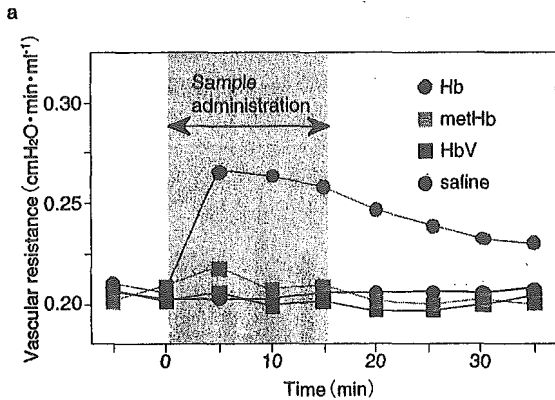


図 16.4.3 肝の微小循環動態と Hb 代謝

a : 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 の場合には灌流圧上昇はない。
 b : 肝類洞血管には無数の孔 (fenestration) が開いている。
 c : Hb 分子はこの孔を通過して Disse 腔に拡散、ヘムは肝実質細胞の hemeoxygenase-2 により代謝され、ビリルビンと CO を排泄。
 CO は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が低下し、灌流圧が増大。Hb 小胞体は孔より大きいので通過なし、CO 結合なしのため肝臓の微小循環低下はほとんどない。また metHb は Disse 腔に拡散するが CO 結合がないため変化なし。

では、約 1 週間後には赤血球量は正常値に回復していることから¹⁰⁾ Hb 小胞体成分は造血に有効利用されていると想定され、詳細検討中である。

新薬非臨床試験の場合、安全度確認の項目として、GMP 基準での製造試料について齧歯類とその他の動物を対象とした反復投与試験がある。予備的にラットに対して Hb 小胞体の反復投与試験 (投与量 10 mL/kg/日を 14 日間投与) を実施、循環血液量の 2.5 倍の分散液を投与したが、体重は継続して増加を続け、血液生化学的、組織病理学的検討でも顕著な副作用はなく、結果として Hb 小胞体成分が速やかに代謝される過程が得られ、安全度がきわめて高い製剤と証明されている¹¹⁾。

4.2.4 低酸素領域への酸素輸送

ヒト赤血球の酸素親和度 (P₅₀: 酸素が 50% 結合飽和するときの酸素分圧) は、37℃ で約 28 Torr である。全身の酸素消費量は、動脈血酸素分圧 (110 Torr) と静脈血酸素分圧 (40 Torr) の間の酸素飽和度較差

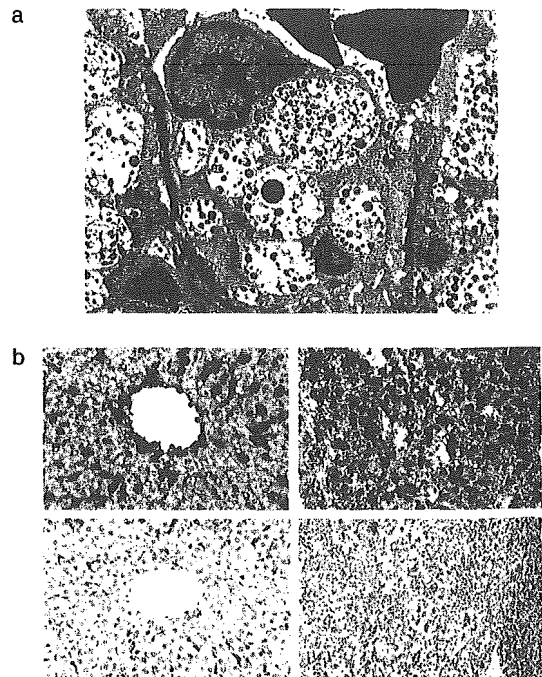


図 16.4.4 ヘモグロビン小胞体の代謝過程 (b : 口絵 50 参照)

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 小胞体粒子を多数認める。7 日後にはほとんど消失。
 b : Hb 小胞体投与後のラット肝臓 (左)、脾臓 (右) 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。7 日後にはほとんど消失、蓄積はまったく認めず。

(A-V 較差、ヒト赤血球の場合は 25 % 程度) と Hb 濃度、それに心拍出量の積として算出される。赤血球から精製単離した Hb の P_{50} は 8 Torr 程度と低く、静脈血酸素分圧 (40 Torr) では酸素放出は生起しない。また、Hb を利用する人工酸素運搬体の P_{50} も、赤血球と同等あるいはそれ以上に調節すべきと考えられてきた。

正常組織であればこの理論が成立する。しかし、血管性障害により十分な血流が行き届かない組織 (虚血性領域) の場合、血流速度も組織酸素分圧も極度に低下しており、動脈血はこの領域に到達する前に酸素を放出してしまう。つまり、酸素親和度を赤血球よりも大きく (P_{50} 値を小さく) すれば、虚血性領域に到達してからの酸素放出可能と考えた¹²⁾。このとき赤血球よりも小粒径の人工赤血球 (250 nm 径) は血漿中に均一に分散しているので、赤血球では届かない狭窄部を経由して到達できる。

この仮説の下では、これまでにハムスター有茎皮弁虚血モデルにおいて、高酸素親和度 Hb 小胞体 (P_{50} : 15 Torr) での血液希釈により虚血領域の酸素分圧が有意に上昇できることが証明された¹³⁾。した

がって、輸血代替としての利用以外に酸素治療剤としての適応症、例えば脳や心筋など虚血領域の酸素化、腫瘍組織の酸素化など、低酸素領域へ選択的な酸素ターゲティングとして利用できる。Hb 小胞体の酸素親和度はアロステリック因子により自在に調節できるので、各々の適応にふさわしい P_{50} を有するテーラーメイド人工赤血球が可能となる。

4.3 アルブミン-ヘム

4.3.1 酸素を輸送できる赤色のアルブミン

他方、Hb をまったく利用しない完全合成系酸素輸液の開発も進んでいる。血清アルブミン (Mw. 66.5 kD) は血漿蛋白質の約 70 % を占める単純蛋白質であり、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が、我が国では世界に先駆けて組替ヒト血清アルブミン (rHSA) の大量発現に成功しており、世界初の上市を間近に控えている。年間 100 万バイアルの生産ラインの稼働体制も整い、血漿増量剤としてだけでなく、各種製剤の基材としての活用にも国際的注目が集まっているので、このアルブミンの非特異的多分子結合能を利用して、rHSA に酸素配位能を有するヘム誘導体を包接させ、従来類例のない新しい合成ヘム蛋白質「アルブミン-ヘム」が創製できる (図 16.4.5)^{14,15)}。

アルブミン-ヘムは、①完全合成系酸素輸液であり、感染の危険性がなく、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。また、③ 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 捕捉に伴う血管収縮・血圧亢進は惹起されない、などの多くの優れた特長を持つ。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も進められている。

4.3.2 構造と酸素結合能

アルブミン 1 分子当たり結合するヘムの数は最大 (8 個/分子) であり、これは Hb の 2 倍に相当する。ヘムの結合定数は $1.2 \times 10^6 \sim 1.3 \times 10^4 (M^{-1})$ 、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 2 次構造や表面電荷に変化はない。しかし、1998 年インペリアルカレッジの Curry らが、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 へ膨張することが明らかにされた¹⁶⁾ (図 16.4.6)。この発見はヘムが rHSA 内部に包接されると数 nm の範囲では微細な構造変化が誘起されることを示唆しており、酸素配位

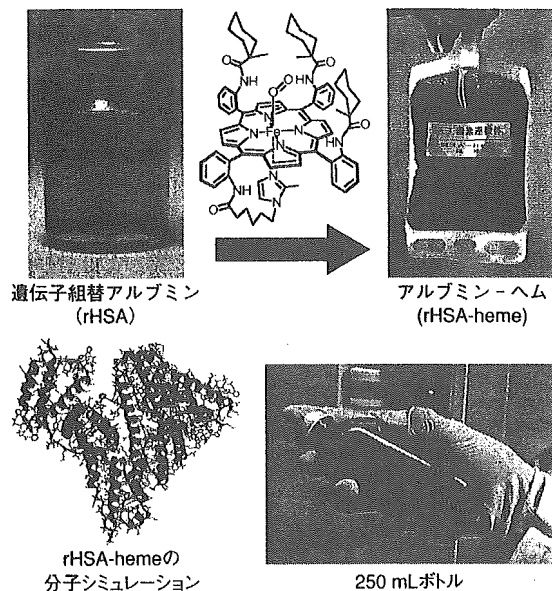


図 16.4.5 アルブミン-ヘム

組替ヒト血清アルブミンに合成ヘムを包接させたアルブミン-ヘムは、酸素輸送のできる血漿蛋白質となる。最大 8 分子のヘムを包接させても、アルブミンの構造、物性、表面電荷は変化なし。酸素輸送能はヒト赤血球と同等、2 年以上棚置き保存も可能。アルブミン-ヘムの生理食塩水溶液は Hb を一切必要としない完全合成系酸素輸液。

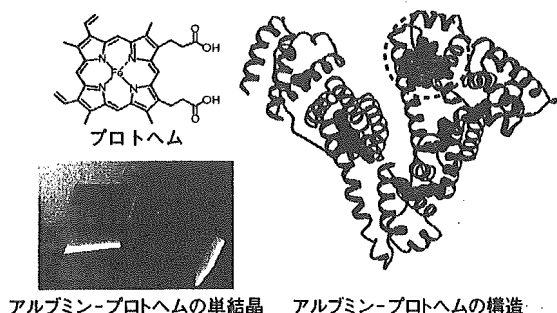


図 16.4.6 アルブミン-プロトヘムの単結晶の写真と分子構造（口絵 51 参照）

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¹⁶⁾。Hb と同じヒスチジン残基を軸塩基としたモデルの場合、非常に安定な酸素錯体が観測できる点は大変興味深い¹⁶⁾。

4.3.3 体内酸素輸送能

アルブミン-ヘム水溶液の血液適合性は高く、全血液と混合してもヘムの解離・転移を起こさない。また、赤血球数、白血球数、血小板数のみならず血液凝固系パラメーターにも変動がないことが確認されている。溶液安定度は高く、室温で2年間以上の保存も可能である。

一方、アルブミン-ヘムもヘム蛋白質であるから、NO 親和度は O_2 親和度の 7.6×10^6 倍と高いが、それを体内へ投与しても、Hb 製剤にみられる血管内皮からの漏出、NO 捕捉に伴う血圧亢進はまったく認められなかった（図 16.4.7）¹⁷⁾。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ためと考えられており、本製剤の最大の利点である。

このようなアルブミン-ヘムの特徴を巧みに利用すると、閉塞部位への効率の高い酸素供給も可能となる。一般に悪性腫瘍は放射線療法や化学療法に抵抗を示すが、その原因として腫瘍組織内低酸素細胞 (hypoxic cell) の存在がある。細胞の異常増殖は新生血管の生成が追いつかない湿潤性腫瘍細胞では十分な血流および酸素化が得られず、それが上記療法の妨げとなっている。アルブミン-ヘムを腫瘍組織の患部近傍へ投与し、腫瘍組織内低酸素細胞の酸素化を試みた。アルブ

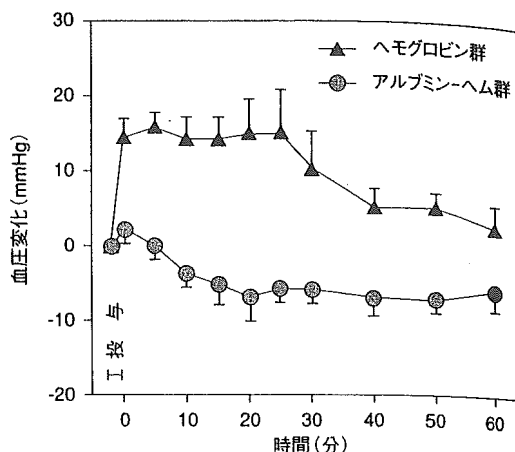


図 16.4.7 アルブミン-ヘム投与後の血圧の変化
分子状 Hb 溶液をラットに静注、瞬時に血圧亢進が生起。Hb が血管内皮誘導弛緩因子 (NO) を捕捉するため。しかし、同条件でアルブミン-ヘム溶液を投与しても血圧値に変化はない。アルブミン分子は等電点 (pH_i 4.8) で分子雰囲気負帯電のため、Hb に比べ血管透過性が低いことに起因。

ミン-ヘム投与により患部の酸素分圧は投与前の 2.5 倍に増大¹⁸⁾。これは従来報告の Hb 製剤による処置に比べ格段に高い値、粒子径の小さいアルブミン-ヘムが腫瘍内部へ容易に到達できるためと考えられる。今後、抗癌剤治療や放射線治療との併用により、酸素輸液投与による抗癌作用の増強効果が期待されている。

生体内へ投与され酸素輸送の役割を終えた合成ヘムは肝臓で捕捉され、緩慢代謝に入ること最近明らかになった。安全度の高いアルブミン-ヘム製剤を出血ショックからの蘇生液として利用する評価実験が、ラット、ビーグル犬を用い進行している¹⁹⁾。

4.3.4 アルブミン-ヘムの新展開

分子化学的手法を駆使した新しいアルブミン-ヘムの展開も進んでいる。アルブミンが還元型 Cys を 1 つ (Cys³⁴) しか持たない特徴に着目して、アルブミン分子を上手に連結すると、構造明確なアルブミン二〜四量体が合成できる²⁰⁾。カラム分離により単離された二、三、四量体は MALDI-TOF 質量分析からその分子量が正確に決定され、間違いなくアルブミンが繋がったクラスター構造であることが示されている。アルブミン四量体にヘム 32 分子を結合したアルブミン-ヘム四量体の 20 wt % 水溶液は、コロイド浸透圧を生理条件に保ったまま、血液の 2.6 倍量の酸素を溶解できる酸素輸液となる。

ごく最近、アルブミンに天然のプロトヘムを包接させたアルブミン-プロトヘム錯体の X 線結晶構造解析

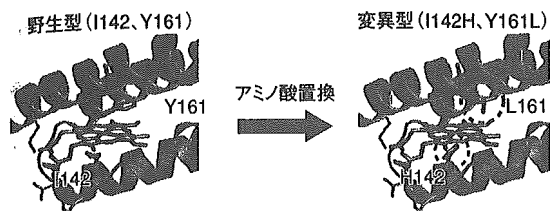


図 16.4.8 組替アルブミン変異体 - プロトヘム (口絵 52 参照)

プロトヘムアルブミンのサブドメイン IB に包接のようにヘム面直下の軸配位を Ile-142 を His に変換し、軸配位 Tyr-161 を疎水性の Leu に変換すると、Hb のヘムポケットと類似の分子空間構成、酸素との結合を可能にする。プロトヘムを用い、水中、室温下で酸素錯体を確認した初めての例 (2005 年)。

に成功し、プロトヘムがサブドメイン IB 内に Tyr-161 との軸配位結合およびプロピオン酸側鎖と 3 つの塩基性アミノ酸残基 (R114, H146, K190) 間との静電的相互作用により固定が明らかにされ (図 16.4.8)²¹⁾、アルブミンのプロトヘム結合サイトは疎水性アミノ酸残基から構成されているので、ヘム鉄の配位圏内に近位塩基 (His) を導入すれば、Hb のヘムポケットと同様なナノ分子空間が構築できるとの着想から、ヘム鉄に最も近い距離にあるアミノ酸残基イソロイシン 142 (I142) を選定し、遺伝子組替法によりこれらをヒスチジン (His) へ変換、さらに軸配位のチロシン 161 (Y161) をロイシン (L) に変換、得られた rHSA (mutant) にプロトヘムを包接、アルブミン-プロトヘムを得る。アルゴン雰囲気下で中心鉄 (III) を還元すると、Hb のデオキシ体によく似た可視吸収スペクトルが得られた²²⁾。これはイミダゾールが 1 つ結合した Fe (II) 5 配位高スピン錯体の形成を示しており、H142 が中心鉄に軸配位が解明され、これに酸素通気により速やかに酸素錯体型へと移行する。また一酸化炭素に接触させると、安定なカルボニル錯体が得られ、そのスペクトルパターンも carbonyl Hb と類似を確認した。これは天然のプロトヘム利用で、水中、室温で安定な酸素錯体が形成の初めての例である。

4.4 おわりに

本稿で紹介した人工赤血球の開発とは別に、最近の試みとして、血液幹細胞に各種サイトカインを作用させ、赤血球のみを選択的に増殖させる新技術も明らかにされ期待されている。投与量確保に至っていないのが実情で、ただし人工赤血球は、赤血球の体内寿命 (120 日) に比較してきわめて短い (3 日程度) ため短時間の使用に限られるが、血液型や感染源がなく、長

期間保存できる点は赤血球の性能を凌いでいる。輸血代替としての利用はもちろん、移植臓器灌流液、組織再生時の細胞呼吸への酸素供給、さらに赤血球よりも小粒径である利点を生かした新しい適応 (虚血性領域の酸素化、抗腫瘍効果増強など) も提案され、近未来の医療に著しい変革をもたらすものとの予告とみることも可能であろう。

【謝辞】本研究は厚生労働科学研究 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業) として推進された。早稲田大学および慶應義塾大学の大勢の研究者の御尽力に対し、ここに記して謝意を表する。

文献

- 1) Kobayashi K, et al: Artificial Oxygen Carrier, Its Front Line. Springer-Verlag, Tokyo, 2005
- 2) Tsuchida E: Artificial Red Cells. Wiley, Chichester, 1998
- 3) Djordjevich L, et al: Lipid encapsulated hemoglobin as a synthetic erythrocyte. FASEB Proc 36: 567, 1977
- 4) Sakai H, et al: Purification of concentrated hemoglobin using organic solvent and heat treatment. Protein Expr Purif 4: 563-569, 1993
- 5) Sou K, 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 11: 372-379, 2000
- 6) Sakai H, et al: Poly(ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. Bioconjugate Chem 11: 425-432, 2000
- 7) Sakai H, et al: Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. Crit Care Med 32: 539-545, 2004
- 8) Sakai H, et al: Acute 40 % exchange transfusion with Hb-vesicles (HbV) suspended in recombinant HSA solution: Degradation of HbV and erythropoiesis in rat spleen observed for 2 Weeks. Transfusion (in press)
- 9) Sou K, et al: Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. J Pharmacol Exp Ther 312: 702-709, 2005
- 10) Sakai H, et al: Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: Influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. Am J Pathol 159: 1079-1088, 2001
- 11) Sakai H, et al: Physiologic capacity of reticuloendothelial system for degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days. J Pharmacol Exp Ther 311: 874-884, 2004
- 12) Sakai H, et al: Oxygen Releasing of Hb-vesicles with different P_{50s} from Occluded Arteriole in Hamster Skinfold Window Model. Am J Physiol Heart Circ Physiol 288: H2897-H2903, 2005

- 13) Contaldo C, et al: New generation of hemoglobin-based oxygen carriers evaluated for oxygenation of critically ischemic hamster flap tissue. *Crit Care Med* **33**: 806-812, 2005
- 14) Tsuchida E, et al: Human serum albumin incorporating tetrakis(o-pivalamido)phenylporphyrinatoiron(II) derivative as a totally synthetic O₂-carrying hemoprotein. *Bioconjugate Chem* **10**: 797-802, 1999
- 15) Komatsu T, et al: Effect of heme structure on O₂-binding properties of human serum albumin-heme hybrids: Intramolecular histidine coordination provides a stable O₂-adduct complex. *Bioconjugate Chem* **13**: 397-402, 2002
- 16) Curry S, et al: Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding site. *Nat Struct Biol* **5**: 827-835, 1998
- 17) Tsuchida E, et al: Human serum albumin incorporating synthetic heme: red blood cell substitute without hypertension by nitric oxide scavenging. *J Biomed Mater Res* **64A**: 257-261, 2003
- 18) Kobayashi K, et al: Oxygenation of hypoxia region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic hemes. *J Biomed Mater Res* **64A**: 48-51, 2003
- 19) Komatsu T, et al: Exchange transfusion with synthetic oxygen-carrying plasma protein "albumin-heme" into an acute anemia rat model after seventy-percent hemodilution. *J Biomed Mater Res* **71A**: 644-651, 2004
- 20) Komatsu T, et al: Physicochemical characterization of cross-linked human serum albumin dimer and its synthetic heme hybrid as an oxygen carrier. *Biochim Biophys Acta* **1675**: 21-31, 2004
- 21) Zunszain P, et al: Crystal structural analysis of human serum albumin complexes with hemin and fatty acid. *BMC Struct Biol* **3**: 6, 2003
- 22) Komatsu T, et al: Dioxygenation of human serum albumin having a prosthetic heme group in a tailor-made heme pocket. *J Am Chem Soc* **126**: 14304-14305, 2004
(土田英俊、酒井宏水、小松晃之、小林絨一)

先端医療シリーズ 37

人工臓器・再生医療の最先端

発行 2005年11月28日 初版第1刷 ©

編集主幹 許 俊鋭・斎藤 明・赤池敏宏

編集委員 西田 博・澤 芳樹・浅原孝之・清水達也

発行者 代表取締役 寺田弘司

株式会社寺田国際事務所／先端医療技術研究所

〒171-0031 東京都豊島区目白 2-16-19

池袋若林ビル 11F

電話 03-5957-1180 FAX 03-5957-1182

E-mail:kterada@t3.rim.or.jp

<http://www.t3.rim.or.jp/~kterada/>

印刷 株式会社ブレインズ・ネットワーク

(無断複写・転写を禁ず)

ISBN4-925089-45-5 C3047

定価 9,800 円(税込)

Printed in Japan

輸血製剤への新しい取り組み：人工赤血球

■輸血代替の必要性

わが国では安全な輸血用血液が医療機関に常備され、国民の健康福祉に大きく貢献している。肝炎やAIDSなど輸血感染症も大きな社会問題となったが、献血血液の厳重な検査と管理が強調され、常に被害を最小限にとどめる努力がなされており、特に核酸増幅法（NAT検査）採用は多大の効果があつた。しかし、ウィンドウ期の問題や、検査項目から外れる病原体、それに未知感染源の脅威に常に曝されている。その他、赤血球の保存期限は採血後わずか3週間、血小板に至っては3日である。過誤による血液型不適合の医療事故もある。赤血球輸血回避のため、術中輸血開始目安のHb濃度10g/dlの低減、低体温無輸血手術、赤血球造血因子投与による術前貯血も普及してきているが、症例によっては適用できない。献血1回当たりの採血量は400mlになったが、高齢化少子化に伴い献血者総数の低下が問題と成っている。このような状況に鑑み、厚労科学研究 医薬安全総合研究事業として、「人工血液」研究が推進されており、人工赤血球、人工血小板、人工抗体の3部門が展開され、現行の献血・輸血システムの問題点克服のためにさまざまな試

みがなされてもいる。

本稿は人工赤血球の話題に絞った概説である。急性出血ショック患者の蘇生には、一般的には循環血液量の補給（電解質輸液）が先決で、その後に体組織の全細胞呼吸を満足する酸素供給（赤血球輸血）となる。各種電解質輸液やコロイド輸液製剤に加え組換えアルブミン（rHSA：近く認可の見込）投与が行われる。しかし、感染や血液型不適合の心配のない酸素輸液が赤血球代替物として利用されるようになろう（現在未認可）。緊急需要に対応のため、酸素輸液の大量供給は重要な国家的施策でもある。このような状況下、漸く人工赤血球：（ヘモグロビン（Hb）小胞体）が実現間近に成っているのを、紹介したい¹⁾。

■ヘモグロビン小胞体の構成

図1に人工赤血球（Hb小胞体）の概略を示す。高純度・高濃度Hb溶液（濃度35%以上）を脂質2分子層膜で包んだ小胞体（平均粒径250nm）¹⁾。原料HbはNAT検査済み献血の期限切れ赤血球由来である。精製に際し60℃の加熱処理（pasteurization）とウイルス除去膜処理（ultrafiltration）の組み合わせで、感染対策として安全性確保。ポリオキシエチレン鎖で小胞

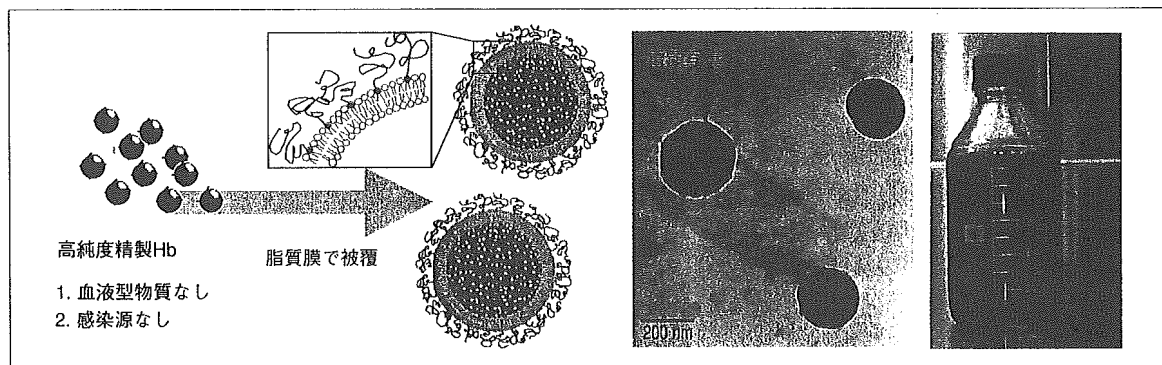
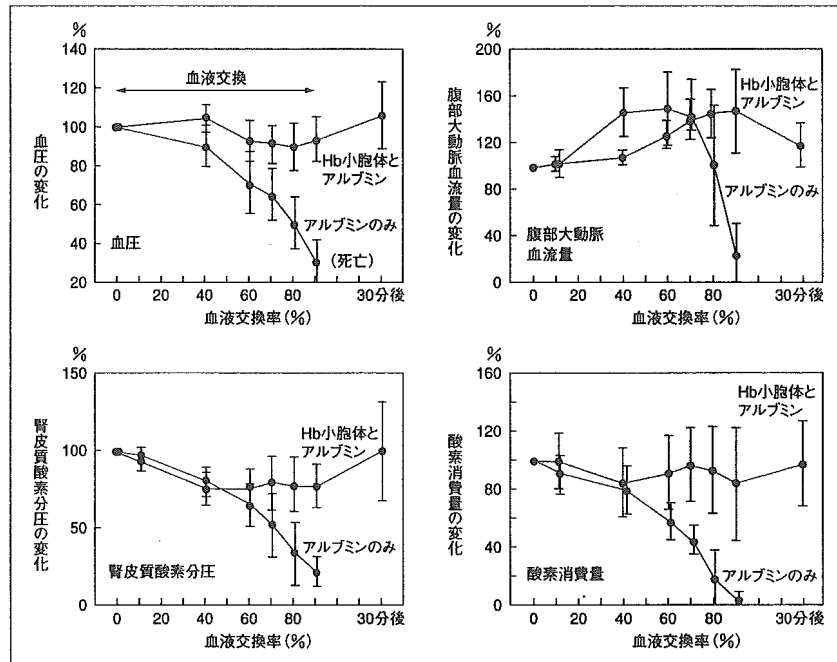


図1 ヘモグロビン小胞体

期限切れ赤血球より精製単離した高純度Hbをリン脂質2分子層膜で被覆した小胞体表面はポリオキシエチレン鎖で修飾（親水性）されている。透過型電顕写真から、制御された粒子径（250nm）と、内相にHbが濃度高く包含されている様子がわかる。

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5%溶液で全血液量の90%を置換すると、血圧、腎皮質酸素分圧、心拍出量、酸素消費量も極度に低下し、30分以内に全例が死亡、これに対しHb小胞体とアルブミン(5%)では90%置換(交換輸血方式)の場合、初期値をほぼ安定に維持、全例生存。(文献2, 3)より引用)



体表面修飾は凝集抑制と分散安定度向上が得られ、溶液のまま室温下に2年以上の保存が可能。Hb小胞体粒子分散液は膠質浸透圧を持たないので、血液交換率が高い場合には循環血液量維持に、血漿増量剤添加が不可欠となるが、認可間近とされる5%rHSA溶液に分散させた場合、膠質浸透圧は20mmHg、粘度と浸透圧は血液とほぼ同等となり、循環動態の恒常性に寄与。また、Hb小胞体粒径は赤血球の約1/30と小さく、血漿中に均一分散する。

■ヘモグロビン小胞体による酸素輸送効果

Hb小胞体が使用可能となれば、緊急輸血時における血液型不一致や感染の心配なく、いつでも必要に応じて投与でき、同種血輸血の回避、または必要量の低減が可能となる。すでにHb小胞体の動物投与試験から、呼吸管理の主項目である循環動態やガス交換、それに末梢組織の酸素化が、輸血の場合と同等の正常値

保持が明らかにされている。

1. 術前、術中血液希釈液としての利用

Hb小胞体の動物投与試験は、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、腎皮質の酸素分圧も正常値を推移する確認が得られている²⁻⁴⁾(図2)。また、臨床現場で想定される最大の交換率40%の交換輸血においてもラットは全例が生存し、ヘマトクリット値が1ヵ月で完全に回復する。また、Hb小胞体は最終的に細網内皮系に捕捉され、安全に代謝分解、排泄され⁵⁻⁶⁾、臨床では術前血液希釈、術中出血分の補給、さらに体外循環回路の補充液としての利用が期待できる。特に小児患者の体外循環では、無輸血充填とした場合(血漿増量剤の充填)、術中での短時間のHb濃度低下が脳に障害を与え、術後の知能発達に影響すると懸念されており、Hb小胞体を充填液として用いる利点も期待でき

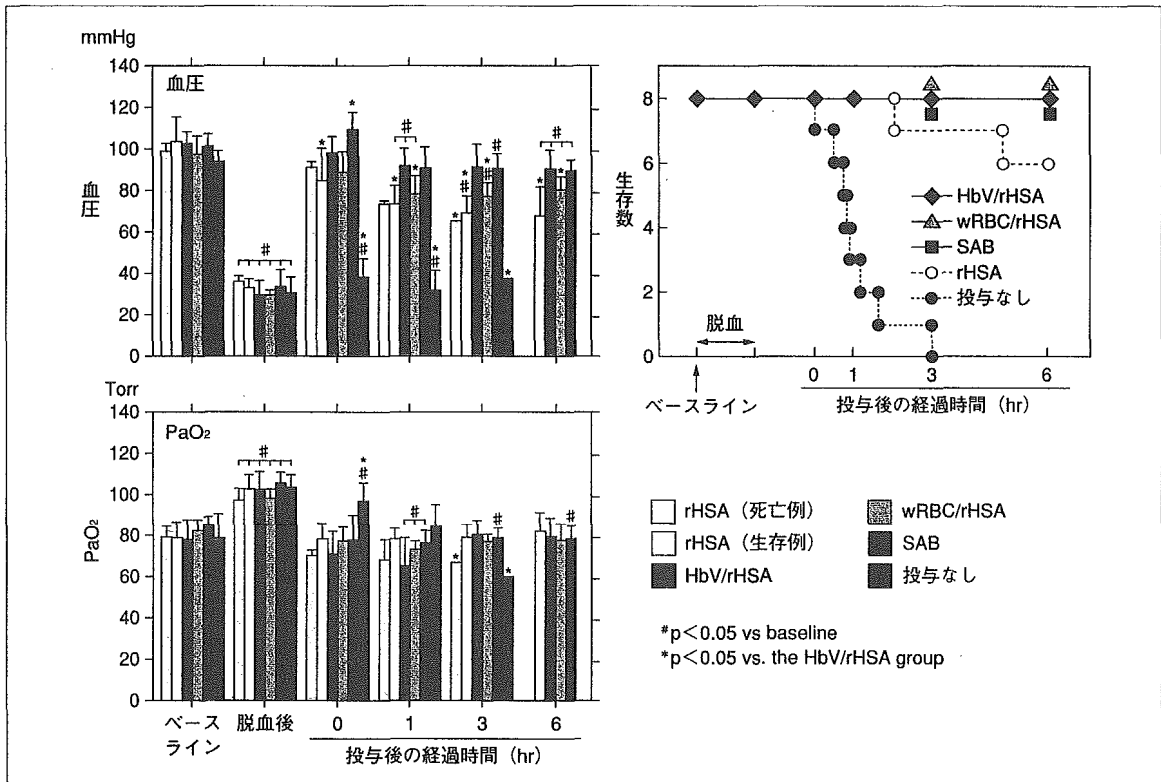


図3 ヘモグロビン小胞体による出血ショック蘇生試験

セボフルラン吸入麻酔下、ラット循環血液量の50%を脱血し15分経過後、Hb小胞体をrHSA溶液に分散させたHbV/rHSA、rHSA単独、脱血液（SAB）、または洗浄赤血球をrHSAに分散させた（wRBC/rHSA）溶液を投与、ショック状態では血圧の低下、代償機能により過呼吸となり、動脈血酸素分圧（PaO₂）の上昇、pHと塩基余剰の低下がみられた。HbV/rHSA投与後では血圧、血液ガス組成ともに脱血液（SAB）の投与と同等である。すべてのパラメータでrHSA単独投与群に比較して有意に優れている。蘇生液の投与がないと全例が3時間以内に死亡。rHSA群は8匹中2匹が死亡、HbV/rHSA群、wRBC/rHSA群、SAB群では全例が生ずる。（文献7）より引用）

る。

2. 緊急時の利用：出血ショック蘇生液

出血ショック時の蘇生液としても検討され⁷⁾、赤血球と同等の酸素供給機能が実証されている。例えば、セボフルラン麻酔下、ラットの循環血液量の50%を脱血して15分後にHb小胞体の5% rHSAに分散系を投与した6時間観察では、rHSA単独の投与8匹中2匹の

死亡に対し、Hb小胞体投与例では循環動態も血液ガス組成も脱血液の投与と同等に推移し全例が生ずる⁷⁾ (図3)。現在、兎やビーグルを用いた出血ショック蘇生試験も開始されているが、おおむね良好な成績が得られている。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、出血ショック患者が蘇生出来ることを示唆している。

表1 期待される人工赤血球の適応症例

輸血代替	その他の期待される値
1. 出血ショック蘇生液 2. 術中出血液の補充 3. 術前血液希釈 4. 体外循環回路（人工心肺）充填液 5. 急性貧血 6. 希少血液型患者への輸血 7. 輸血拒否患者への投与	1. 虚血部への酸素供給（心不全/脳障害/呼吸不全） 2. 腫瘍組織酸素化による抗腫瘍液 3. 組織再生における培養細胞系への酸素供給の重要度* 4. 移植用臓器灌流液（肝, 腎, 膵, 腸, 心, 肺など）

*注釈：組織再生は、医療技術の革新、さらに新しい産業の創製に繋がるので、国際的に注目が集まっている分野である。皮膚、神経、脳細胞、血管、軟骨、骨、その他などの再生には、培養系に十分な酸素供給が必要である。特に肝、腎、心など酸素消費量が多く、しかも、三次元的環境構築が必要な大型の臓器あるいは組織再生には、細胞培養の過程で人工赤血球による灌流と、それによる細胞の酸素呼吸が満足されることが不可欠であることが知られるようになってきている。世界に先駆けたわが国の新技術として展開、発展させる必要があると考える。

■おわりに

人工赤血球の原料として現在は、献血血液由来のHbを再生しているが、献血液に頼らずに組替体Hbを原料とする方法も計画されている。また、別の試みとして近年、血液幹細胞に各種サイトカインを作用させ、赤血球のみを選択的に増殖させる新技術も報告されてはいるが⁸⁾、まだ十分に投与量確保の見通しに至っていない。本稿で紹介した人工赤血球の特徴としての注意点は赤血球の体内寿命（120日）に比較してきわめて短い（3日程度）ため、短時間の使用に限られる。しかし、血液型や感染源がなく、長期保存できる利点は現行の輸血性能を凌ぐともいえる。輸血代替としての利用は勿論、移植臓器灌流液、組織再生過程での細胞への酸素供給、さらに赤血球の直径の1/30の小粒径である点を生かした新しい適応（虚血性領域の酸素化、抗腫瘍効果増強など）も提案されており^{9, 10)}（表1）、次世代医療に著しい変革をもたらすことは間違いない。

（注）本稿内容は早大・理工総研と慶大・医・総合医科研の協同による展開であるが、協力研究者名、文献など省略している。

【文献】

1) Sakai H, et al : Hemoglobin-vesicles (HbV) as artificial oxygen

carriers. In : Kobayashi K, et al. Artificial Oxygen Carrier, Its Front Line. Springer, Tokyo, pp 135-168, 2005
 2) Sakai H, et al : Surface modification of hemoglobin vesicles with poly (ethyleneglycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. Bioconjugate Chem 8 : 23-30, 1997
 3) Izumi Y, et al : 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
 4) Sakai H, et al : Microvascular responses to hemodilution with Hb-vesicles as red cell substitutes : Influences of O₂ affinity. Am J Physiol Heart Circ Physiol 276 : H553-H562, 1999
 5) Sakai H, et al : Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers : Influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. Am J Pathol 159 : 1079-1088, 2001
 6) Sakai H, et al : Physiologic capacity of reticuloendothelial system for degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days. J Pharmacol Exp Ther 311 : 874-884, 2004
 7) Sakai H, et al : Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. Crit Care Med 32 : 539-545, 2004
 8) Giarratana M, et al : Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. Nature Biotechnol 23 : 69-74, 2005
 9) Contaldo C, et al : Improved oxygenation in ischemic hamster flap tissue is correlated with increasing hemodilution with Hb vesicles and their O₂ affinity. Am J Physiol Heart Circ Physiol 285 : H1140-H1147, 2003
 10) Sakai H, et al : Oxygen releasing of Hb-vesicles with different P_{50s} from transiently occluded arteriole in hamster window model. Am J Physiol Heart Circ Physiol 288 : H2897-H2903, 2005

〈検印省略〉

麻酔科診療プラクティス	定価(本体 13,000 円+税)
18. 周術期の輸液・輸血療法	
2005年11月15日 第1版第1刷発行	編 著 = <small>たかさき まゆみ ゆげ おさふみ</small> 高崎 真弓・弓削 孟文 <small>いなだ えいち いわさき ひろし</small> 稲田 英一・岩崎 寛
	発行者 = 浅井 宏 祐 発行所 = 株式会社 文 光 堂
	〒113-0033 東京都文京区本郷7-2-7 電話 東京 (03)3813-5411(代) 東京 (03)3813-5478 (営業部直通)
	印刷所 = 広研印刷株式会社
乱丁・落丁の際はお取り替えます	
© 高崎真弓・弓削孟文・稲田英一・岩崎 寛, 2005 Printed in Japan	
ISBN4-8306-2824-3	

・本書の複製権・上映権・譲渡権・公衆送信権(送信可能化権を含む)は、株式会社文光堂が保有します。

・JCLIS <(株)日本著作出版権管理システム委託出版物>

本書の無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつど事前に、(株)日本著作出版権管理システム(電話 03-3817-5670, FAX 03-3815-8199, e-mail: info@jcls.co.jp)の許諾を得てください。

Hemoglobin Vesicles as a Molecular Assembly: Characteristics of Preparation Process and Performances as Artificial Oxygen Carriers

Hiromi Sakai, Keitaro Sou, Shinji Takeoka,
Koichi Kobayashi* and Eishun Tsuchida

*Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda
University, Tokyo, Japan*

**Department of Surgery, School of Medicine, Keio University, Tokyo,
Japan*

IMPORTANCE OF CELLULAR STRUCTURE

Physicochemical analysis has revealed that the cellular structure of RBCs may not be effective for the facilitated O_2 releasing and binding of Hb molecules in comparison with a homogeneous Hb solution (Vandegriff and Olson, 1984; Page *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 2003a); however, nature has selected this cellular structure during its evolution. Historically, Barcroft *et al.* insisted that the reasons for the Hb encapsulation in red blood cells were: (1) a decrease in the high viscosity of Hb and a high colloidal osmotic pressure; (2) prevention of the removal of hemoglobin from the blood circulation; and (3) preservation of the chemical environment in the cells such as the concentration of phosphates (2,3-DPG, ATP, etc.) and other electrolytes (Tsuchida *et al.*, 1995). Moreover, during the long history of the development of Hb-based O_2 carriers (HBOCs) many side effects of molecular Hb have become apparent, such as the dissociation of tetrameric Hb

subunits into two dimers ($\alpha_2\beta_2 \rightarrow 2\alpha\beta$) that may induce renal toxicity, and entrapment of gaseous messenger molecules (NO and CO) inducing vasoconstriction, hypertension, reduced blood flow and tissue oxygenation at microcirculatory levels (Goda *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 2000a), neurological disturbances, and the malfunctioning of the esophageal motor function (Murray *et al.*, 1995). These side effects of molecular Hb would imply the importance of the cellular structure.

The pioneering work of the Hb encapsulation was performed by Chang (1991) using a polymer membrane. After Bangham and Horne (1964) had reported that phospholipids assemble to form vesicles in aqueous media, and that they encapsulate water-soluble materials in their inner aqueous interior, it was quite reasonable to use such vesicles for the Hb encapsulation. Djordjevic and Miller (1977) prepared a liposome-encapsulated Hb (LEH) composed of phospholipids, cholesterol, fatty acid etc. The Naval Research Laboratory showed the remarkable progress of LEH (Rudolph

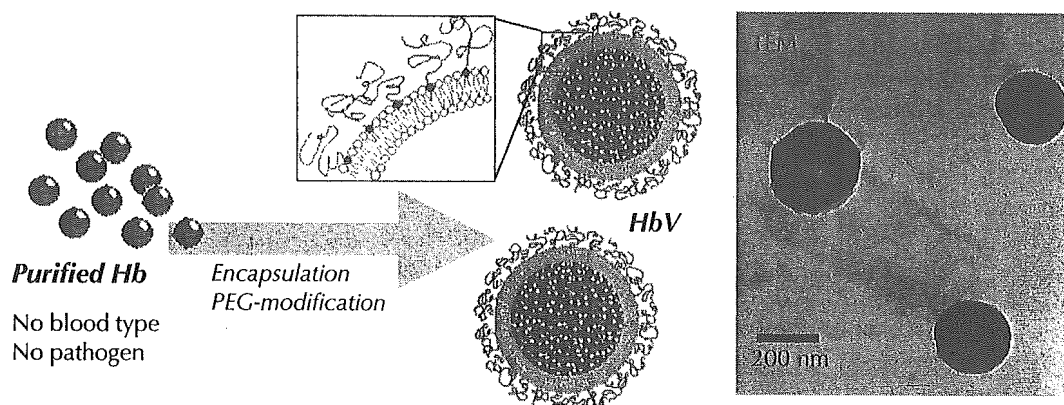


Figure 44.1 Hb vesicles (HbV, diameter ca. 250 nm) are prepared from ultra-pure Hb obtained from outdated RBC. One particle contains about 30 000 Hb molecules. The surface of one HbV is modified with about 6000 polymer chains of PEG that ensure the dispersion stability of HbV during storage and during circulation in the bloodstream. The transmission electron micrograph (TEM) clearly demonstrates the well-regulated particle size and high Hb content within the vesicles. See color plate 22.

et al., 1991). What we call Hb vesicles (HbV) with a high-efficiency production process and improved properties have been established by Tsuchida's group based on the nano-technologies of molecular assembly and precise analyses of the pharmacological and physiological aspects (Tsuchida, 1998; Figure 44.1). The *in vivo* studies of HbV have revealed O₂ transporting efficiency comparable to that of RBCs (Izumi *et al.*, 1996, 1997; Kobayashi *et al.*, 1997; Sakai *et al.*, 2004a; Yoshizu *et al.*, 2004), safety in terms of blood compatibility (Ito *et al.*, 2001; Wakamoto *et al.*, 2001), the importance of the particle size and the cellular structure of HbV (Goda *et al.*, 1998; Sakai *et al.*, 2000a), and prompt degradation in the reticuloendothelial system (Sakai *et al.*, 2001, 2004b, 2004c, 2004d), all of which make us confident about advancing to the further development of HbV. The joint collaborative partnership of academia (Waseda and Keio Universities), a biotechnology venture company (Oxygenix, Inc., Tokyo) and a corporation (Nipro Co., Osaka) is aiming for clinical trials of HbV within a few years.

In this chapter we scientifically summarize the characteristics of the preparation process of HbV based on the sciences of molecular assembly to induce their excellent performances. It should be emphasized that the components of HbV, lipids and Hb assemble to form a functional nanoparticle through secondary binding forces (hydrophobic interaction, Coulombic force, hydrogen bond, van der Waals force).

PREPARATION OF HEMOGLOBIN VESICLES

Virus inactivation and removal during hemoglobin purification

The primary advantage of artificial O₂ carriers should be no fear of infectious disease derived from human blood. In Japan, the donated blood is strictly inspected by the nucleic acid amplification test (NAT). However, it is necessary also to introduce procedures to inactivate and remove viruses during the process of Hb purification from outdated RBC in order to guarantee the utmost safety from infection, based on the unforgettable tragedy of HIV transmission due to the distribution of non-pasteurized plasma-derived products. In our purification process, virus inactivation was performed by pasteurization at 60°C for 10 hours – the same conditions for the pasteurization of human serum albumin (Sakai *et al.*, 1993; Fukutomi *et al.*, 2002). This process can be introduced by utilizing the stability of carbonylhemoglobin (HbCO). The thermograms of HbCO indicated a denaturation temperature of 78°C, which is much higher than that for oxyhemoglobin (64°C) (Sakai *et al.*, 2002a).

The virus inactivation efficiency was evaluated by the Hokkaido Red Cross Blood Center (Abe *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2002). The Hb solution spiked with vesicular stomatitis virus (VSV) was treated at 60°C for 1 hour under a CO atmosphere. VSV was inactivated at > 6.0 log₁₀ without methHb