

## 目 次

# 人工血液

第7巻 第2号 1999年6月

総説	赤血球代替物性能評価の方法の開発と臨床試験 .....	濱崎直孝	35
	ヘモグロビンと一酸化窒素との相互作用を考慮した		
	ヘモグロビン系酸素運搬体の設計 .....	佐久間一郎	40
原著	マイクロウェーブによる超短時間高温加熱処理がヘモグロビン に与える影響.....	木村哲寛	45
学会報告			
	IBC's 6th Conference on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics .....	平山順一	49
	「厚生省高度先端医療研究事業：人工血液開発研究 分野：公開シンポジウム」に参加して .....	村田満	53
海外文献紹介			
	人工血液開発の最近の動向 .....	平山順一	54

## Contents

# ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 7 No. 2 June, 1999

<i>Review: Erythrocyte Function: Essence of the Artificial Cell</i>	Naotaka Hamazaki	35
<i>Design of Hemoglobin-based Oxygen Carrier Considering Interactions between Hemoglobin and Nitric Oxide</i>	Ichiro Sakuma	40
<i>Original Article:</i>		
<i>Influence of High-Temperature Short-Time Heat Treatment by Microwave Heating on Hemoglobin .....</i>	Tetsuhiro Kimura	45
<i>Report: IBC's 6th Conference on Blood Substitutes .....</i>	Junichi Hirayama	49
<i>Open Symposium on Artificial Blood .....</i>	Mitsuru Murata	53
<i>Topics: Overview on the Recent Development of Artificial Blood</i>	Junichi Hirayama	54

## 第6回日本血液代替物学会年次大会 テーマ「血液代替物の臨床応用への前進」

I 会期：1999年9月10日（金）・11日（土）

II 会場：京王プラザホテル 〒160-8330 東京都新宿区西新宿2-2-4  
Tel : 03-3344-0111  
Fax : 03-3345-7475（期間のみ）

### III プログラム

#### 1. 会長シンポジウム（司会 池田康夫／慶應義塾大学医学部内科）

「血液代替物開発研究のUp-date, 1999年」

- (1) 人工酸素運搬体（土田英俊／早稲田大学理工学部高分子化学）
- (2) 血小板代替物（西谷孝子・村田 満／慶應義塾大学医学部内科）
- (3) 遺伝子組換え人血清アルブミン（小林 薫／吉富製薬（株）創薬研究所生物医薬研究部）
- (4) 人工抗体（黒澤良和／藤田保健衛生大学総合医科学研究所免疫学研究部門）

#### 2. 特別講演

- (1) Cellular effects of blood viscosity and shear stress and the design of blood substitute  
Marcos Intaglietta(Department of Bioengineering,UCSD, USA)

##### (2) 演題未定

Alan S. Rudolph(Defense Advanced Research Projects Agency, USA)

- (3) Fibrinogen-coated albumin microcapsules

Jan Wouter ten Cate, MD(Center for Hemostasis, Thrombosis, Atherosclerosis and Inflammation Research, The Netherlands)

- (4) 微小循環動力学から見た人工血球の設計原理

末松誠（慶應義塾大学医学部医化学）

- (5) 集中治療医学における輸血をめぐる話題（仮題）

平澤博之（千葉大学医学部救急部）

#### 3. シンポジウム「人工酸素運搬体－臨床応用に向けて」

司会：小林紘一（慶應義塾大学医学部呼吸器外科）

池淵研二（北海道赤十字血液センター）

# 赤血球の機能と人工赤血球

## Erythrocyte Function: Essence of the Artificial Cell

濱崎 直孝

*Naotaka Hamasaki*

### 1. はじめに

酸素は我々にとって必要不可欠なもので、酸素が無ければ我々は生存できないが、酸素が必要以上に我々の体内に供給されても生体にとっては障害になる。必要最小限の酸素が必要なときに瞬時に供給されることが生体にとっては不可欠なことで、酸素が余る状態(過剰供給)では、酸素は細胞毒になり生体にとっては不都合な事なのである。一般世間では、余裕のないギリギリの遣り繰りを自転車操業と言って、必ずしも好ましい状態ではないとしているが、生体への酸素の供給に関しては自転車操業が最適なのである。我々のからだには酸素を自転車操業で供給する仕組みが存在し、その重要な部分を担っているのが赤血球である。

赤血球は直径が約 $8\mu$ のドーナツ型をした非常に特殊な細胞で、柔軟性に富み、その直径より狭い毛細血管の隙間をアーバーのように形態を変化させながら通過して体の隅々まで酸素を運搬できるようになっている。しかも、赤血球が体内を循環するスピードは速く、肺を通過するのは安静時で0.7秒、激しい運動時には0.3秒である<sup>1)</sup>。このような特殊な機能を維持するために、赤血球は核、小胞体やミトコンドリアなどすべての細胞内小器官を消失し極度に分化したと考えられる。赤血球はこのように高度に分化し、極度に簡素化されているので、赤血球の酸素運搬機能をある程度代行し得る人工的な化合物が開発されており、それらを緊急事態に利用しようという試みが行われている。

ここでは、人工ではない天然の赤血球の機能発現の仕組みを概略し、人工赤血球の開発に従事しておられる方々の開発の一助になればと考えている。

### 2. 赤血球の概要

赤血球は血液のほぼ半分の体積を占める主要な血液成分であり、平均的な日本人の体内では約 $2 \times 10^{13}$ 個の赤血球が速いスピードで循環していることになる。赤血球中には非常に高濃度(約300mg/mL)のヘモグロビンが含まれており、一回体内を循環すると100mLの血液当たり理想気体状態で約5mLの酸素が肺から組織へ運搬されることになる<sup>2)</sup>。少しでも蛋白質を取り扱う実験をした経験があれば約300mg/mLの蛋白質濃度は如何に高濃度で粘稠

度が高いかが推測できると思うが、このような高粘稠度の環境では赤血球中心部周辺でヘモグロビンから遊離した分子状酸素が組織へと拡散することは容易なことではない。ミリ秒の短時間に赤血球から組織へ酸素を効率よく拡散させるためには、赤血球中のヘモグロビンを攪拌する必要があり、赤血球自身の直径よりも狭い毛細血管の隙間を、赤血球がその形を変形させながら循環するのは、高濃度のヘモグロビンを攪拌するには都合が良く、非常に効率的・合目的にできていると感心させられる。

変形能に富み、細い毛細血管を素早く透過できる赤血球のこのような機能を支えているのが赤血球膜蛋白質である。赤血球の寿命はヒトの場合は120日、マウスは40日といろいろな動物で異なるが、マウスからゾウまで、それぞれの体内を約20万回循環するとその動物の赤血球寿命が尽きることは共通している<sup>3)</sup>。これは赤血球が狭い隙間を繰り返し潜り抜け循環している間に受ける激しい“ずり応力”が原因で赤血球膜蛋白質に破綻が起こり赤血球の変形能が低下し脾臓で捕捉され循環系から除かれると考えられており、動物種が違っても赤血球が約20万回体内を循環すると赤血球膜の破綻がくることを示唆している。核や小胞体を消失している赤血球は蛋白質の合成が出来ないので、破綻をきたした蛋白質を修復することもできず寿命が尽きると思われる。貧血のなかに、赤血球の寿命が短くなる溶血性貧血という病氣があるが、膜蛋白質の異常が、その重要な原因の一つであることが、だんだんと明らかになりつつある。細胞膜蛋白質は大別すると脂質二重層の表層に存在する表在性膜蛋白質群(Peripheral Membrane Proteins)と脂質二重層に埋もれている内在性膜蛋白質群(Integral Membrane Proteins)に大別できる。赤血球膜蛋白質にも表在性膜蛋白質群と内在性膜蛋白質群とが存在し、それらが全てうまく機能することにより赤血球は体内を循環できることになる。

赤血球の代謝系も酸素を効率よく運搬できるように分化している。赤血球の解糖系は独特であり解糖系側路の2,3-DPG合成経路の活性が著明に高く、他の細胞よりも約1,000倍も高濃度の2,3-DPGを含んでいる。2,3-DPGはヘモグロビンに作用して末梢で酸素がヘモグロビンから遊離しやすいように働いている<sup>4)</sup>。酸素に常に曝されるヘモグロビンはヘモグロビン分子が酸化されないよ

うな機構を分子内に持っているが、それに加えて、酸化されたヘモグロビンを還元する酵素系も赤血球代謝系には含まれている。細胞内小器官が全て存在していないので赤血球の主要な代謝系は解糖系であり、ATPは解糖系でのみ作られる。ATPは内在性膜蛋白質の $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ポンプや表在性膜蛋白質のスペクトリンなどに利用され、赤血球の形態や変形能が維持される。

### 3. ヘモグロビンの機能と2,3-DPG(2,3-diphosphoglycerate)

成人ヒトのヘモグロビンは $\alpha$ グロビン鎖と $\beta$ グロビン鎖がそれぞれ2本づつ会合しているテトラマーである。各グロビン鎖は分子内にヘムを持ち分子状の酸素を脱着している(酸素と結合したり、酸素を解離する)。4本のグロビン鎖はお互いに連携があり(ヘム間相互作用)、酸素分圧が低い状態では酸素と解離しやすく、酸素分圧が高い状態では酸素と結合しやすいアロステリックな性質を持っている。それゆえに、ヘモグロビンは肺で酸素と速やかに結合し、末梢では各組織へ容易に酸素を解離・供給することができる。ヘモグロビンのこのような性質をさらに増強する作用を持つのが解糖系側路で合成される2,3-DPGである。精製したヘモグロビンの酸素解離曲線と赤血球の酸素解離曲線とが一致しない現象は昔から周知の事実であったが、その原因が2,3-DPGであることが1960年代後半になってChanutinら<sup>5)</sup>、Beneschら<sup>6)</sup>によって明らかにされた。図1にヘモグロビン溶液と赤血球内に含まれる状態でのヘモグロビンの酸素解離曲線を示す。pH、温度、塩濃度を生理的状態に合わせて描いた曲線であり、曲線(1)はヘモグロビン溶液の、曲線(2)は赤血球の酸素解離曲線である。肺胞内酸素分圧は約100mmHgであり、末梢の酸素分圧を約35mmHgとすれば、図1の(a)または(b)が、それぞれ単位ヘモグロビン溶液または赤血球が体内を一循環した場合に組織へ運んだ酸素量(酸素運搬量)になる。正常の血液100mL中には標準状態で約20mLの酸素が含まれおり、図1で(b)に相当する酸素量は約4.6mLになる。赤血球に含まれないヘモグロビン溶液の酸素解離曲線(1)の(a)に相当する酸素量は約2.1mLである。ヘモグロビンが赤血球中に含まれ

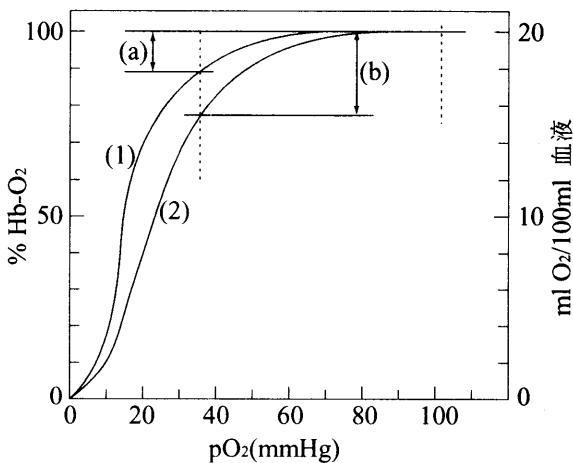


図1 Hb溶液と赤血球の酸素解離曲線。Hemox溶液中における正常ヘモグロビン(1)と赤血球(2)の酸素解離曲線(37°C)。測定はHemox-Analyzer(Technical Consulting Service, PA, USA)で行った。

ると酸素運搬量が約2倍に増加することになる。この原因是2,3-DPGがデオキシヘモグロビンに可逆的に結合しヘモグロビンの酸素解離曲線を右方へ移動させるためである<sup>5-7)</sup>。

赤血球を4°Cで保存しておくと保存赤血球の酸素解離曲線は新鮮赤血球の曲線に比較して左方に移動し赤血球の酸素運搬量が低下していく(図2)。保存3週目の赤血球の酸素解離曲線はヘモグロビン溶液の酸素解離曲線とほとんど変わらなくなる。これは赤血球の保存期間に赤血球中の2,3-DPGが減少するためであり、保存赤血球の酸素運搬能は新鮮赤血球の約半分にまで低下していることを意味している。逆に、赤血球中の2,3-DPGを増加させると赤血球の酸素運搬能は上昇し、2,3-DPGを増加させた赤血球を虚血モデルマウスに輸血すると虚血性脳障害が防止される<sup>8)</sup>。ここに

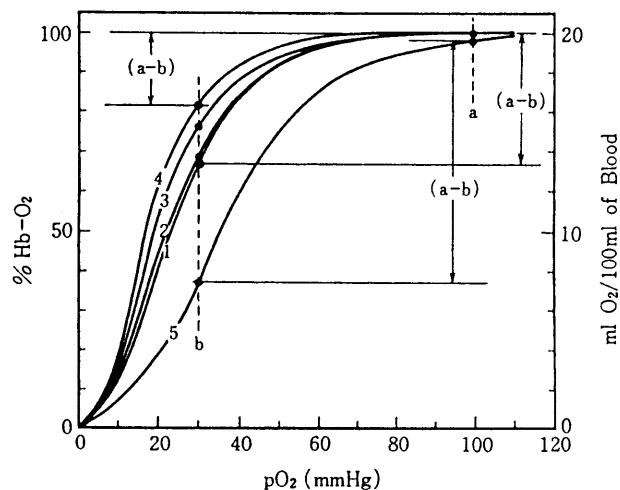


図2 保存につれて変化する赤血球の酸素解離曲線。曲線1. 新鮮血の酸素解離曲線; 曲線2. 保存1週目のCPD赤血球の酸素解離曲線; 曲線3. 保存2週目のCPD赤血球の酸素解離曲線; 曲線4. 保存3週目のCPD赤血球の酸素解離曲線; 曲線5. 保存2週目のCPD赤血球中2,3-DPGを増加させたのちに酸素解離曲線を描いたもの。

述べた2,3-DPGの影響は赤血球の代謝系が赤血球の酸素運搬機能を調節している事象である。次に述べる、炭酸デヒドラターゼ・ヘモグロビン・バンド3蛋白質の協調作用も酸素を適切に組織へ運搬すべく高度に分化した事象である。ヘモグロビンについてのさまざまな分子機序については、ヘモグロビンについての特集号が1987年に蛋白質・核酸・酵素から出版されており、今でも充分に有用であるので参照して頂きたい<sup>9)</sup>。

### 4. 赤血球による酸素の運搬：炭酸デヒドラターゼ・ヘモグロビン・バンド3蛋白質の協調作用

文頭でも述べたが、酸素は我々にとって必要不可欠なものだが、酸素の過剰供給は細胞毒になる。酸素供給過剰で起こした医原病の典型が未熟児網膜症である。我々のからだには酸素供給過剰を防止し必要最小限度量だけ供給する仕組みが存在しており、赤血球で酸素を運搬する限り組織への酸素の過剰供給は決して起

こらないことになっている。個々の細胞や組織の活動状況の変化に直ちに対応して、分別的に個々の細胞への酸素の供給量を調節し供給する仕組みを赤血球は備えている。だから、赤血球で酸素を運搬している限り、細胞あるいは組織にとって必要十分な酸素量だけしか酸素を運搬せず決して酸素の過剰供給は起こらない機構ができている。赤血球内に含まれる炭酸デヒドラターゼとヘモグロビン、それに、赤血球膜のバンド3蛋白質(アニオントランスポーター)の三者が巧妙かつ密接に連携してその仕組みを作り上げている<sup>10)</sup>。図3を用いてその概略を説明する。

動脈系から毛細血管に入った赤血球はその狭い間隙を変形しながら循環する。細胞や組織での代謝の結果発生した炭酸ガスは拡散し毛細血管を循環している赤血球内に入る。赤血球に入った炭酸ガスは赤血球内の炭酸デヒドラターゼの働きで炭酸に変換され(図3、反応1)，産生された炭酸は直ちに重炭酸イオンと水素イオンに解離する(図3、反応2)。赤血球内の重炭酸イオンは赤血球膜のバンド3蛋白質(アニオントランスポーター)の働きで赤血球の外へ排出され、同時に、血漿中の塩素イオンが赤血球内へ透過される(図3、反応3)。この塩素イオンの移動は昔から"Chloride Shift"として知られているものである。このアニオンの交換輸送反応で赤血球内の炭酸が塩酸へ変換されることになる。弱酸である炭酸が強酸の塩酸に変換されたことで赤血球内は酸性に傾き、その結果、オキシヘモグロビンから酸素が解離し組織へ酸素が供給される。ヘモグロビンの置かれている環境が酸性に傾くことでオキシヘモグロビンから酸素が解離する現象をボア効果(Bohr

Effect)と言う。赤血球内を酸性に傾けた水素イオン(H<sup>+</sup>)は酸素が離れたヘモグロビン(デオキシヘモグロビン)に吸収され赤血球内のpHは元に戻り、酸素のヘモグロビンからの解離は止まる(図3、反応4)。

以上が、炭酸デヒドラターゼ、ヘモグロビン、赤血球膜バンド3蛋白質(アニオントランスポーター)三者の連携による組織への酸素供給システムである。即ち、赤血球が酸素を供給するように働き出す引き金は細胞で產生される炭酸ガスであり、炭酸ガスを発生している細胞にのみ、その発生量に比例して酸素を供給することになるわけである。イオン化された炭酸(重炭酸イオン)を血漿中の塩素イオンと交換に赤血球外へ運び出す"Chloride Shift"の程度がそれぞれの細胞(または組織)の代謝活性を示す指標であり、それ故に、"Chloride Shift"を媒介する赤血球膜に存在するバンド3蛋白質は"Metabolic Sensor"とも言える。上記のシステムが作動している赤血球で酸素が運搬されている限り、休止状態の図3左側の細胞よりも代謝が活性化している右側の細胞へより沢山の酸素が供給されることになる。細胞で产生している炭酸ガス量によって供給される酸素量が定められるので、赤血球は細胞が必要としている量の酸素を供給でき、過剰な酸素の供給は決して起こらない。純粋な酸素を強制的に血漿中に溶かし込んで組織へ酸素を供給しようとする場合は(上述の未熟児網膜症を起こした場合など)、酸素分圧差のみで酸素が拡散するので、図3における左右の細胞の区別はできず、左の細胞には酸素の過剰供給が、右の細胞には酸素の供給不足が起こると考えられる。

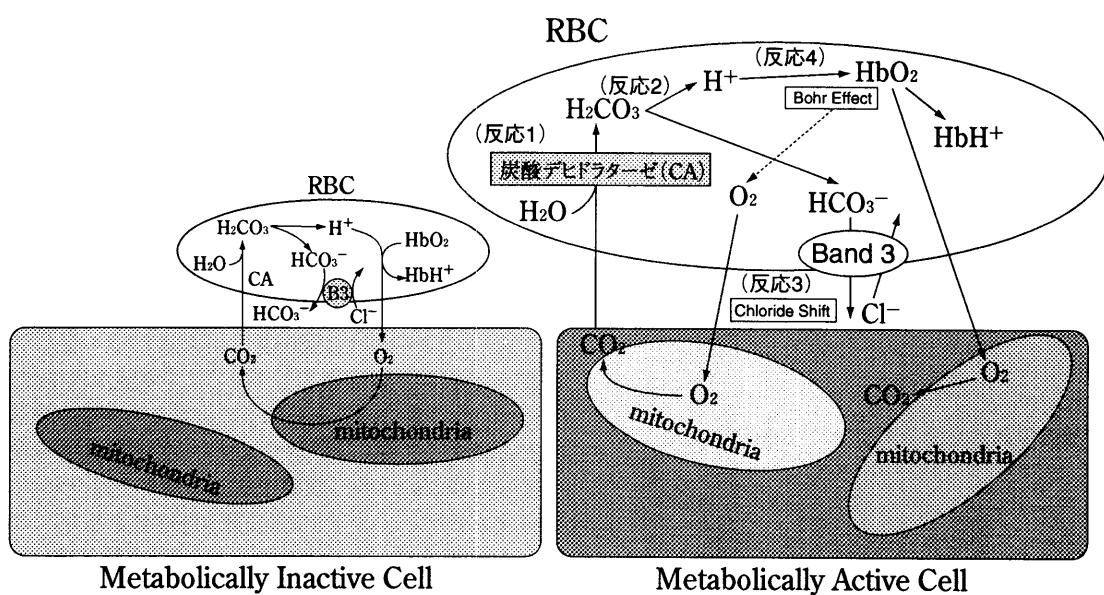


図3 赤血球による過剰酸素供給防止システム。赤血球による組織への酸素供給システムでヘモグロビン、炭酸脱水酵素(炭酸デヒドラターゼ)、バンド3蛋白質が相互作用をすることで、組織への必要最小限度の酸素量を供給するようになっている。肺胞では、呼気に炭酸ガスが排出されることが引き金となって図中の各反応が逆に働き、効率的に酸素がヘモグロビンに結合できるようになっている。

## Peripheral

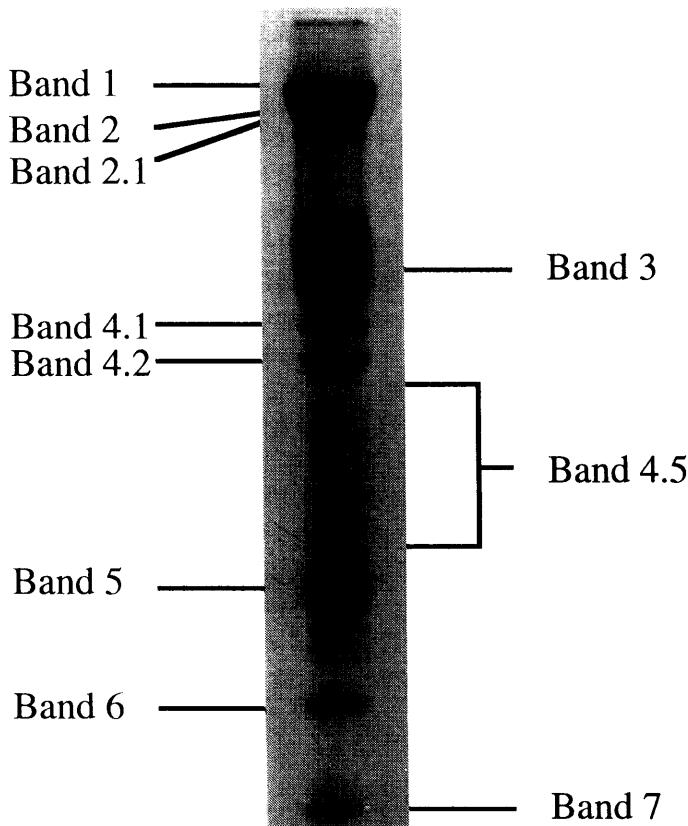


図4 赤血球膜蛋白質のポリアクリルアミド電気泳動像。

### 5. 酸素の運搬で果たしている赤血球膜蛋白質の役割

細胞膜は脂質二重層に蛋白質が埋もれ、細胞膜の外側表面には枝状の糖鎖が脂質や蛋白質と結合する形で存在している。赤血球膜も基本的には同じ構造を持っているが、赤血球が組織を形成していない遊離細胞であるので、組織を形成している細胞の膜と違って構成成分の局在が無く、赤血球のどの部分をとっても、ほぼ同じ構成成分でできているのが一つの特徴である。表在性膜蛋白質群は、脂質二重層には埋もれていないが細胞膜の内側面に存

## Integral

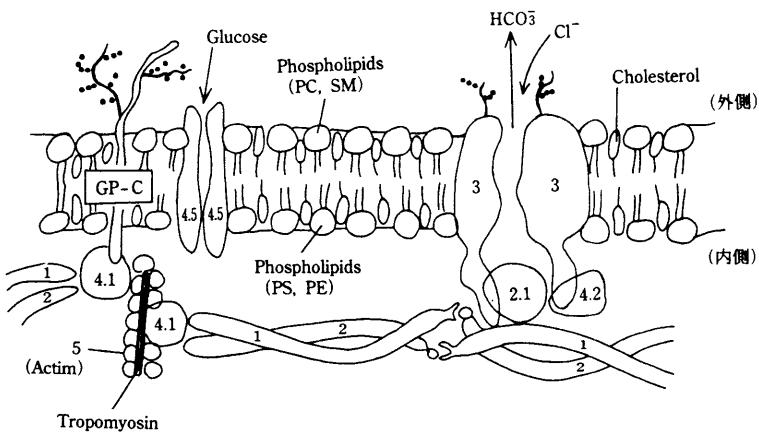


図5 赤血球膜の模式図(縦断面図)。スペクトリンが赤血球内側に網目を張り巡らした状態で裏打ちし、それを、アクチン、バンド4.1蛋白質、グリコホリーンCが強化している。脂質二重層へ繋ぎ止める拠点はバンド3蛋白質の細胞質ドメインである。その連係にはアンキリン(バンド2.1蛋白質)、バンド4.2蛋白質が関係している。図の番号はそれぞれ赤血球膜蛋白質番号(図4の番号)を意味している。脂質二重層を構成しているリン脂質には内外で組成が異なり、内側にはPhosphatidyl serine(PS)とPhosphatidyl ethanolamine(PE)が多く、外側にはPhosphatidyl choline(PC)とSphingomyelin(SM)が多い。中性脂質としては遊離コレステロールが大部分を占める。

在している蛋白質で「裏打ち蛋白質」とも呼ばれている。赤血球以外の細胞では細胞の外側にも類似の蛋白質群が存在していることもある。赤血球を低張溶液で破裂させ内容物を外に出しても、これら表在性膜蛋白質群が赤血球膜内側面に存在している限り、ドーナツ型をした独特の赤血球形態は保たれている。しかし、表在性膜蛋白質群は赤血球膜から除くと、赤血球膜はもはやその形態を保つことはできなくなり、内外が反転した小さな胞体(内外反転膜: Inside-out-vesicle)を形成する。このようなことから、表在性膜蛋白質群は赤血球の形態を維持するには必須のものであることが明らかになり「細胞骨格蛋白質(Cytoskeleton)」とも呼ばれている。この蛋白質群に属する蛋白質はスペクトリン、アンキリン、バンド4.1蛋白質、バンド4.2蛋白質、アクチンなどがある。図4にSDSポリアクリルアミド電気泳動法(SDS-PAGE)を用いて、分子量の違いを利用して分離した赤血球膜蛋白質を示す。赤血球膜蛋白質は分子量の大きい蛋白質から番号を付けて呼ぶ場合もあり、aとbの二種類があるスペクトリンはバンド1蛋白質(aスペクトリン)、バンド2蛋白質(bスペクトリン)、アンキリンはバンド2.1蛋白質、アクチンはバンド5蛋白質と呼ばれている。これらの蛋白質が図5の模式図のような状態で内在性膜蛋白質と結合する型で赤血球膜を内側から裏打ちしている。バンド6蛋白質は解糖系酵素(GA3PDH)でバンド3蛋白質と緩く結合した状態で赤血球膜に存在しているが、細胞骨格蛋白質として作用しているとは考えられていない。

内在性膜蛋白質群は脂質二重層を構成する脂質と疎水結合で結

合し膜に埋もれている蛋白質の総称である。赤血球膜蛋白質の内在性膜蛋白質としてはグリコホリン(A, B, C), バンド3蛋白質(アニオントransporter)やバンド4.5蛋白質(グルコースtransporter)などがある。バンド3蛋白質の細胞質内ドメインは細胞骨格蛋白質を赤血球膜内側に繋ぎ止める役割を担っており、グリコホリンCは細胞骨格蛋白質群裏打ちネットワーク構造を安定化している。このような表在性膜蛋白質群と内在性膜蛋白質群との協調が正しく行われてはじめて赤血球の変形能が保たれ体内を順調に循環できる仕組みになっている。裏打ち蛋白質ネットワークが機能を發揮するためにはエネルギーが必要で、そのエネルギーは解糖系で產生されるATPである。赤血球内ATPが低下すると赤血球の形態がドーナツ型から金糸状に変化し、ついには、球状になって溶血を起こすのは、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaseが作用しなくなり赤血球内イオンのバランスが壊れ、また、裏打ち蛋白質ネットワークがエネルギー不足で正常に機能しなくなるからである。静止状態の形態が変化するだけでなく、動的状態での変形能も低下して自身の直径よりも狭い間隙を潜り抜けるのに時間がかかるようになり赤血球寿命が短くなる<sup>11,12</sup>。

## 6. おわりに

赤血球はヘモグロビンを包む袋と考えられがちであるが、ヘモグロビン、細胞質酵素群(炭酸デヒドラターゼや解糖系の諸酵素)、代謝産物(ATP, 2,3-DPGなど)や赤血球膜など赤血球の全ての構成成分が相互に協調しながら機能を発揮している。酸素の供給と炭酸ガスの排出は別々に独立した反応で行われているわけではなく、表裏一体をなすもので、その仕組みのお蔭で、代謝が亢進して酸素を多く必要とする細胞・組織と代謝が亢進していない細胞・組織とを、赤血球は効果的に区別する事ができ、代謝が亢進している細胞へはより多くの酸素が供給されることになる。現在、人工赤血球や人工ヘモグロビンの開発が行われているが、その際は、単に、アロステリックな性質を持つヘモグロビン代替物の開発を試みるだけでなく、"Metabolic Sensor"を持つような人工赤血球(または、人工ヘモグロビン)を開発する必要がある。

## 文献

- 1) Wieth JO, Andersen OS, Brahm J, Bjerrum PJ, Borders Jr CL. Chloride-bicarbonate exchange in red blood cells: Physiology of transport and chemical modification of binding sites. *Phil Trans R Soc Lond* 1982;B299: 383-99.
- 2) 濱崎直孝. 保存赤血球の機能についての定量的考察. 日本輸血学会雑誌 1985;31: 103-9.
- 3) Landaw SA. Factors that accelerate or retard red blood cell senescence. *Blood Cells* 1988;14: 47-59.
- 4) 濱崎直孝. 赤血球中の血色素—赤血球代謝と血色素の協同作用—. 蛋白質核酸酵素 1987;32: 542-8.
- 5) Chanutin A, Curnish RR. Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1967;121: 96-102.
- 6) Benesch R, Benesch RE. The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1967; 26: 162-7.
- 7) Duhm J, Gerlach E. Metabolism and function of 2,3-diphosphoglycerate in red blood cells. In: Greenwalt TJ, Jamieson GA, eds. *The Human Red Cell in vitro*. Grune & Stratton: New York · London, 1973; 111-52.
- 8) Kimura H, Hamasaki N, Yamamoto M, Tomonaga M. Circulation of red blood cells having high levels of 2,3-bisphosphoglycerate protects rat brain from ischemic metabolic changes during hemodilution. *Stroke* 1995; 26: 1431-7.
- 9) 血色素の分子生理と分子病理. 米山良昌編. 蛋白質核酸酵素. 東京: 共立出版, 1987; 32: 臨時増刊号.
- 10) Hamasaki N, Okubo K. Band 3 protein: Physiology, function and structure. *Cell Mol Biol* 1996; 42: 1025-39.
- 11) 濱崎直孝. 赤血球の膜蛋白質は何をしているのか. 生物と化学 1995; 33: 566-74.
- 12) 高桑雄一, 稲葉睦. 赤血球膜骨格. 藤井寿一, 高桑雄一編. 赤血球. 東京: 医学書院 1998; 81-92.

# ヘモグロビンと一酸化窒素との相互作用を考慮したヘモグロビン系酸素運搬体の設計

## Design of Hemoglobin-based Oxygen Carrier Considering Interactions Between Hemoglobin and Nitric Oxide

佐久間一郎<sup>1)</sup>, 仲井邦彦<sup>2)</sup>, 富樫廣子<sup>3)</sup>, 坂野上淳<sup>4)</sup>, 藤井聰<sup>1)</sup>, 吉岡充弘<sup>3)</sup>, 佐藤洋<sup>2)</sup>, 北畠顯<sup>1)</sup>  
*Ichiro Sakuma<sup>1)</sup>, Kunihiko Nakai<sup>2)</sup>, Hiroko Togashi<sup>3)</sup>, Jun Sakanoue<sup>4)</sup>, Satoshi Fujii<sup>1)</sup>, Mitsuhiro Yoshioka<sup>3)</sup>,  
Hiroshi Sato<sup>2)</sup>, Akira Kitabatake<sup>1)</sup>*

Hb系人工酸素運搬体(HBOC)は、欧米で一部のものが第三相臨床試験を終了し、獣医向けにはすでに臨床応用されている。しかし、Hbの一酸化窒素(NO)不活化作用に起因すると考えられる昇圧、腹痛、血小板凝集亢進等の副作用が危惧される。われわれはこれらの回避を目的としてHbβ鎖のSH基をニトロソ化したS-ニトロソHb(SNO-Hb)の利用、さらにHb分子の巨大化を企図し、新たな分子創製・機能評価を行ってきた。通常Hbは生体内でNO消去剤として作用し、血圧上昇と血小板凝集亢進をきたすが、SNO-Hbは生体内でNOを放出し、供与体として作用することが明らかとなった。また、長鎖ポリエチレン glycol(PEG)修飾を行ったPEG-HbではNO消去はほとんど認められず、SNO-PEG-HbはむしろNO供与剤として作用する可能性が示された。これらの分子を基材としたHBOCではNO消去による副作用が回避され、臨床的に有用な可能性がある。さらに、新規パーカーフルオロカーボン創製の可能性がある。

Cell free hemoglobin(Hb) derivatives developed as Hb-based oxygen carrier(HBOC) are potent vasoconstrictors and can also enhance platelet aggregation in vivo due to their nitric oxide(NO) scavenging action. Recently, S-nitrosohemoglobin(SNO-Hb) was shown to function as an NO-donor and may be a good candidate for HBOC. More recently, we developed a new long chain polyethylene glycol(PEG)-conjugated Hb, which possesses more desirable properties as an HBOC due to its large particle size. Platelet aggregation induced by ADP or collagen was significantly enhanced by stroma-free Hb compared with saline control, reversed by SNO-Hb and PEG-Hb, and was significantly inhibited by SNO-PEG-Hb. Thus, SNO-Hb and PEG-Hb would be clinically more desirable than stroma-free Hb because the formers are expected not to affect NO so much in vivo. Furthermore, SNO-PEG-Hb seems to be a unique HBOC that has anti-aggregating effects and NO releasing properties, and it would be clinically very valuable. Finally, we would like to refer to a possibility of manufacturing a new perfluorocarbon material. —Key words: Hemoglobin, Hemoglobin-based oxygen carrier, Nitric oxide, Polyethylene glycol, Platelet, Perfluorocarbon.

### 緒言

輸血時にクロスマッチの必要がなく、輸血後の肝炎やAIDS感染の心配もなく、また長期間保存可能な人工酸素供与体の開発が以前から進められてきた<sup>1,2)</sup>。さらに、臓器移植の際に摘出臓器に酸素を供給し、機能低下を防ぐことを目的としての人工酸素供与体の開発も進められている<sup>1,2)</sup>。これらのなかでも、ヘモグロビン(Hb)分子を改良したHb修飾体(表1)は、欧米で一部のものが第三相臨床試験を終了し、獣医向けにはすでに臨床応用されている。ところが最近、Baxter社がHemAssist<sup>TM</sup>を出血性ショック時の代替輸血製剤として第三相臨床試験に進めたところ、死亡例が多数出たため医薬品申請を中止し、同社はProjectからの撤退を表明した。

1998年Furchtgottら3名をその年のノーベル医学生理学賞に導いたガス状メディエーター、一酸化窒素(NO)は、血管内皮細胞から内皮由来弛緩因子(EDRF)として放出され、また非アドレナリン・非コリン作動性(NANC)神経の終末から分泌されて、血管や腸管平滑筋を弛緩し、さらに血小板凝集を抑制する。一方、Hb分子中のヘムはNOをトラップし、NOを消去する<sup>3)</sup>。以前よりHb修飾体の副作用として血管収縮や腸管収縮が知られており、さらに血小板凝集の亢進も懸念される。前述のHemAssist<sup>TM</sup>の問題は、NOとの相互作用による可能性があるのではないかとわれわれは考えている。

数年前より、われわれはNO消去に起因する副作用の解決策と

1)北海道大学医学部循環病態内科学, Department of Cardiovascular Medicine, Hokkaido University School of Medicine, 2)東北大大学院医学系研究科環境保健医学分野, Department of Environmental Health, Tohoku University Graduate School of Medicine, 3)北海道大学医学部機能薬理学, Department of Pharmacology, Hokkaido University School of Medicine, 4)北海道大学電子科学研究所超電子分光, Division of Biophysics, Research Institute for Electric Science, Hokkaido University.

北海道大学医学部循環病態内科学, 〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目, Department of Cardiovascular Medicine, Hokkaido University School of Medicine, N-15, W-7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan.

論文受付日 99年6月23日

して、Hb $\beta$ 鎖のSH基にNOが結合したS-ニトロソHb(SNO-Hb)を試作してきた。これらは酸素供与能を有するのみならず、NO消去作用が少なく、もしくはむしろNO供与体として作用することが明らかとなった。また、新たな長鎖ポリエチレンジリコール(PEG)修飾を加えることにより、HbはNO消去作用がより少なくなり、分子量増大の結果血中滞留時間の延長も期待されることから、理想的な人工酸素供与体の素材となる可能性がある。さらにこのPEG-HbのSNO体(SNO-PEG-Hb)では強力なNO供与作用が観察され、血管拡張作用を有するHb系人工酸素供与体の創製が期待される。

本稿では、Hb修飾体とNOとの相互作用を概説し、ついで人工酸素供与体の新たな素材としてのSNO-Hb、PEG-Hb、SNO-PEG-Hbに関するデータを紹介するとともに、今後のわれわれの人工酸素供与体に対する設計方針について言及したい。

### 1. 人工酸素供与体としての無細胞性Hb修飾体の設計

Hbは赤血球内に高濃度(5mM)で存在するが、このHbを赤血球から抽出し、膜成分を除き、種々の修飾を施すと無細胞性Hb系酸素運搬体(Hb-based oxygen carrier: HBOC)が得られる<sup>1,2,4)</sup>(表1)。Hbは $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖からなる4量体であり、Hb自体を投与した場合、 $\alpha$ 鎖・ $\beta$ 鎖間で解離し、腎臓からの排泄により血中から急速に除去され、Hb尿症・腎毒性を惹起してしまう。その解決策として、 $\alpha$ ・ $\beta$ 鎖間に架橋を導入した分子内架橋型Hbが合成された。また、ヒト赤血球内では、2,3-DPGが $\beta$ 鎖N末端と結合し、Hbの酸素親和性を低下させているので、2,3-DPGを有しないHBOCを人

工酸素供与体として機能させるためには、Hb $\alpha$ 鎖間のアスピリン誘導体による架橋形成や、 $\alpha$ 鎖のAsn-108b→Lysの置換による1本化などの分子修飾を加える必要があった。

Hb分子内架橋形成により血中滞留時間は多少延長するものの、半減期はまだ数時間である。半減期延長にはHbの分子量を大きくする必要がある。味の素はpyridoxal 5'-phosphateを2,3-DPG結合部位に配し、酸素親和性を低下させた後、Hb分子をポリエチレンジリコール(PEG)鎖で修飾した(PEG-Hb: 後にApexに売却)(表1)。その結果、半減期は10数時間以上まで延長した。また、Hb分子の巨大化にはHb分子間を重合する方法がある(分子間架橋型Hb)(表1)。

HBOCのもうひとつのタイプとしてはリポソーム包埋型Hbがある。このタイプはわが国ではテルモが開発中であり、酸素供与能に優れ<sup>5)</sup>、またサイズが大きく(180-240nm)、NO消去作用に基づく血圧上昇等の循環系の副作用もほとんどない。しかし、肝臓や脾臓でトラップされて破壊されることから、短期間の使用では問題はないと思われるが、長期間の使用では免疫機能への影響と臓器障害に関して懸念する向きもある。

### 2. Hb修飾体による血管収縮作用

血管内皮依存性の血管弛緩は、EDRFのほか、prostacyclin(PGI<sub>2</sub>)と内皮由来過分極因子(EDHF)によって制御されている<sup>6)</sup>。EDRFはNOであることが明らかとなっており<sup>7)</sup>、Hbを生体内に投与すると、ヘムにEDRFであるNOが捉えられ、内皮依存性の血管弛緩が抑制される結果、血管収縮が起こる<sup>8)</sup>。

表1 人工酸素運搬体としての無細胞性ヘモグロビン修飾体の開発進展状況

タイプ	開発主体	最近の動向
分子内架橋型	Baxter Healthcare社	心臓バイパス手術における同種血輸血の回避を適応として、分子内架橋型Hb「HemAssist™」の認可を欧州医薬品庁に申請するも効果が明確ではなく再申請を準備。しかし、外傷性ショックに対する応用の治験中に死亡率の増加が観察されたため臨床試験を中断し、HemAssist Projectからの撤退を1998年9月に表明。一方、買収したSomatogen社の組み換え技術を応用し、分子量の大きな、かつヘムとNOとの親和性を制御した新たなHb修飾体を開発中。
PEG-Hb	Apex Bioscience社	PHP(味の素PEG修飾Hb)を用いた敗血症患者における急性低血圧を対象とした臨床第Ⅱ相試験に成功し、第Ⅲ相を計画中。また、最近PHPのS-ニトロ化を企画中。
分子間架橋型	Northfield Laboratories社	出血性ショックに対し成人血液量の60%に相当する重合Hb「PolyHeme™」を投与する臨床第Ⅲ相試験の認可を1997年4月にFDAより取得。
	Biopure社	グルタルアルデヒド重合型「OXYGLO <sub>2</sub> BIN」が獣医領域ですでに医薬品認可。ヒト臨床では同じものを「HEMO <sub>2</sub> PURE」として臨床第Ⅱ相試験が進行中。

Hbによる昇圧反応は極めて少量で惹起される。たとえばラットでは分子内架橋型Hbを125mg/kg投与すれば最大昇圧反応が得られ、投与量を増加しても血圧はほとんど上昇しない<sup>9)</sup>。この際のHb濃度は0.16g/dLであり、一方、全血中の赤血球Hbの濃度は15g/dLである。このように1%程度の微量のHbが血管収縮を惹起するには、赤血球Hbとは異なるNO/EDRF消去の機序を考える必要があると考えられる。

ウサギ大動脈標本を用いてacetylcholine(ACh)によるEDRF反応を観察すると、Hbは濃度依存性に弛緩作用を抑制する。この血管収縮作用を各種HBOCで比較したところ、無細胞性Hbはほぼ同様の濃度反応曲線を示した<sup>10)</sup>。この濃度反応曲線はPEG-Hbでは若干右に移動し、リポソーム包埋型Hbと赤血球ではさらに右方移動した。しかし、Hb濃度0.1%以上では各無細胞性Hb間に差が認められず、in vivoにおける無細胞性Hbの強力な血管収縮作用を十分には説明できなかった。そこで各種HBOCを30分暴露した後、器官槽内のHbを洗浄除去し、EDRF反応を再検したところ、未修飾HbではEDRF反応が明らかに減弱し、PEG-Hbではわずかに減弱、リポソーム包埋型Hbと赤血球では弛緩反応が維持された。未修飾HbのEDRF抑制は濃度依存性であり、またEDRF反応は時間と共に回復し可逆的だった<sup>10)</sup>。同様な実験を2%ウシ血清アルブミン(BSA)および平均分子量73,000Daの2%デキストラン存在下で行うと、両分子はHbによるEDRF抑制を軽減した。以上の結果から、無細胞性Hbの血管収縮作用の機序として、Hbが内皮細胞層から血管平滑筋間に侵入し、そこでNO/EDRFを消去する可能性が示唆された(図1)。BSAなどのマクロ分子はHbの侵入を阻害するものと推察される。同様な結果は、ランゲルドルフ法によるラット心灌流実験でも得られた<sup>11)</sup>。

### Hb修飾体の血管内皮透過性

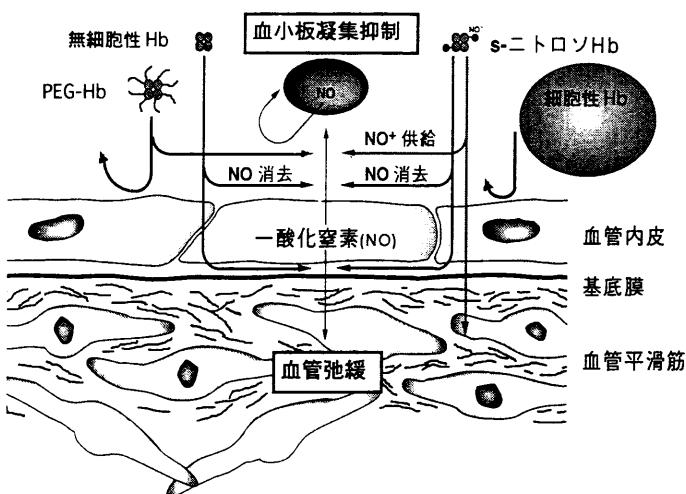


図1. 血管内におけるヘモグロビン(Hb)系酸素運搬体による一酸化窒素作用の障害とS-ニトロソヘモグロビンによる代償。  
PEG-Hb: polyethylene glycol-conjugated Hb.

Hbが血管内皮層から血管壁へ侵入する結果、血管収縮が惹起されるという仮説をさらに検証するため、HBOCの血管内皮透過性実験を行った<sup>12)</sup>。ウシ大動脈由来血管内皮細胞をコラーゲンフィルター上に単層培養し、培養細胞層上部から下部へ移動するBSAおよびHBOCを測定した。

その結果、HbとBSAの分子量はほぼ等しいにもかかわらず、未修飾Hbの透過速度はBSAの約2倍であった。分子内架橋型Hbでも透過性はBSAより高く、Hbの高透過性はdimerへの解離性によるものではなく、分子形状や荷電に影響されると考えられた。一方、PEG-Hbの透過性は低く、分子サイズの大きなHb修飾体ほど透過しにくいことが示された。PEG-Hbではアミノ基修飾のため荷電が変わり、より大きな分子として挙動することが報告されている<sup>13)</sup>。

本実験からも、Hbによる血管収縮作用の機序として、Hb分子が血管内皮層から血管壁に侵入することが重要であり、その程度は分子サイズに依存し、低分子ほど血管収縮作用の強いことが示唆された。実際、血中に投与された分子内架橋型Hbは速やかにリンパ液中に出現すると報告されており<sup>14)</sup>、Hb程度の分子サイズでは内皮細胞はバリアーとして完全には機能しないものと考えられる。また、分子内架橋型Hbと未修飾Hbはほぼ同等の血管収縮作用を示し、PEG修飾により昇圧作用は減弱するとされている<sup>15)</sup>。これらの報告は、Hb修飾体の血管収縮活性と血管内皮透過性が合致することを示唆する。

以上より、血中滞留時間が長く、かつNO消去による血管収縮作用の少ないHBOCとして、PEG化・重合化などにより分子サイズを大きくした素材の開発が進められるべきと考えられ、われわれはその方針でHBOCの分子設計を進めてきた。表1に示すように、分子量の小さいHBOCの治験が頓挫したものの、PEG修飾Hbや分子間架橋型Hbのように分子量の大きなHBOCの治験は予定通り進められ、さらにBaxter Healthcare社もHb分子の巨大化を企図している事実は、われわれの方針の妥当性を証明するものと思われる。

### 3. ヘモグロビン修飾体による血小板凝集増強作用

HBOCのNO/EDRF消去に基づく血圧上昇は持続的だが、上昇の程度はさほど著しくはない。従って、血圧上昇は副作用ではあるものの、出血性ショックなどではむしろ有用であるとも考えられる。また、エンドトキシンショックでは、誘導型NO合成酵素から產生される大量のNOにより著明な低血圧が生じるが、HBOCはNO消去により循環動態を回復させることができる<sup>7,8)</sup>。

HBOCの臨床試験時に発見された副作用に腹痛がある<sup>16)</sup>。これは、NANC神経由来で腸管平滑筋を弛緩するNOが、HBOCにより消去されるためと考えられ<sup>17)</sup>、食道括約筋弛緩の抑制、食道蠕動性収縮の亢進、胆管収縮などが認められている。

NOは血小板内のcGMPを上昇させ、血小板凝集・粘着を抑制する。そのため、HBOCは血小板凝集を増強する可能性がある<sup>18)</sup>。実際、Olsenらはラット頸動脈の内皮剥離モデルを用い、アメリカ陸軍製のcross-linked Hbを投与した場合、内皮剥離部への血小板集積が増強することを報告している<sup>19)</sup>。このNO/EDRF消去による血小板凝集の増強は、特に血小板凝集の亢進が病態に関与する

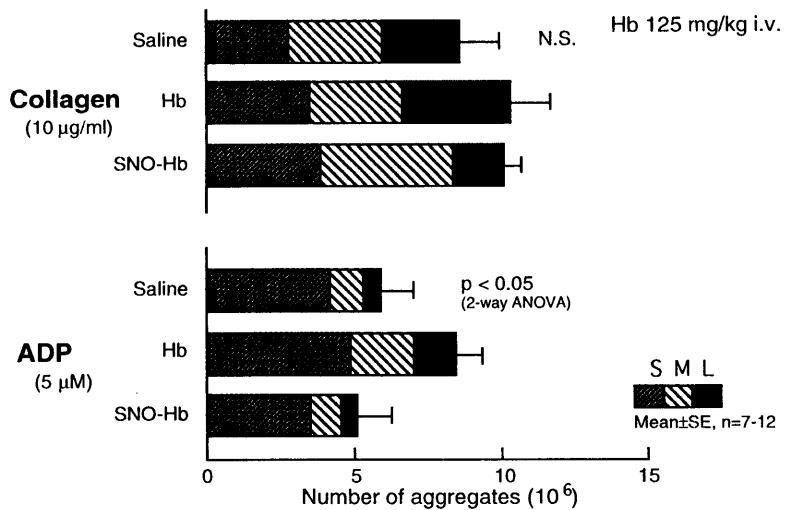


図2. Brown Norwayラットにstroma free hemoglobin(Hb)もしくはS-nitroso-Hb(SNO-Hb)を125mg/kg静注し、10分後に採取した血小板のADP 5μMおよびcollagen 10μg/mLによる凝集反応。多血小板血漿の血小板凝集はレーザー散乱光法により観察した。S: 小凝集塊、M: 中凝集塊、L: 大凝集塊。

(SNO-Hb)<sup>20</sup>の利用を考えた。SNO-Hbは、Hbβ鎖のSH基をニトロソ化したものであり、NO供与体としての性質を有する<sup>21</sup>。実際SNO-Hbを合成し、ラットに投与すると血圧上昇はHbと異なりわずかであり、またex vivoの血小板凝集が抑制された(図2)。最近、われわれはHb分子に長鎖PEG修飾を加え分子サイズを大きくしたPEG-Hbを作製し、さらにそれをS-ニトロソ化した新たな分子(SNO-PEG-Hb)を創製し(図3)，その性質・生理作用を検索した。それらは血中滞留時間が長く、またNO/EDRFをほとんど消去しなかった。また、SNO-PEG-HbはむしろNOの供与体として作用することがわかった。これらの性質は今までのHBOCとは異なるものであり、従来HBOCの臨床応用上問題となったNO/EDRF消去作用が回避されることから、PEG-HbやSNO-PEG-Hbは臨床上有用なHBOCとなる可能性がある。

#### 4. 今後の人赤血球・人工酸素運搬体開発の展望

HBOCの研究は、一部が体外循環用に欧州で医薬品申請する段階まで到達したものの、副作用により開発が頓挫している。我が国においても人工赤血球研究は、厚生省の科学研究事業に位置づけられ研究が進行中である。しかし、従来のHBOCではNO/EDRF消去に由来する血管収縮、腸管収縮さらに血小板凝集増強などの副作用が惹起され、新規の改良が必要と考えられた。その方策の一つとして、われわれはHBOCサイズの巨大化とS-ニトロソ化を企図し、推進してきた。昨今の海外でのHBOC開発状況(表1)を考慮した場合、この方針は概ね妥当であったと考えている。

今後、HBOCサイズの巨大化の方策として、Hb分子をSH基を介した重合の後にS-ニトロソ化した分子(図3)についても、その創製を企図し、研究を進める予定である。

また、人工酸素運搬体としては以前よりパーカルオロカーボン(PFC)製剤が開発されている。世界に先駆けて日本(ミドリ十字)で開発されたFluosol<sup>TM</sup>は、脂溶性のPFC溶解に用いるエマルジョンの問題により酸素供与能が低いことや、種々の副作用のため臨床応用は困難であった。

しかし、その後開発されたOxygent<sup>TM</sup>(Alliance Pharmaceutical社)は、エマルジョンの改良などにより現在臨床第三相にまで進んでいる。PFCはNO/EDRF消去をせず、また赤血球輸血代替のみならず、移植臓器保存液や造影剤への応用が期待される。われわれは最近、最新の乳化器を用いてエマルジョンを改良し、Oxygent<sup>TM</sup>以上にPFCの溶解度が高いPFC製剤を作成することに成功した。今後生体適合性の高いPFC入手できれば、臨床応用可能なPFC製剤が創製されると期待しており、研究を進めている。

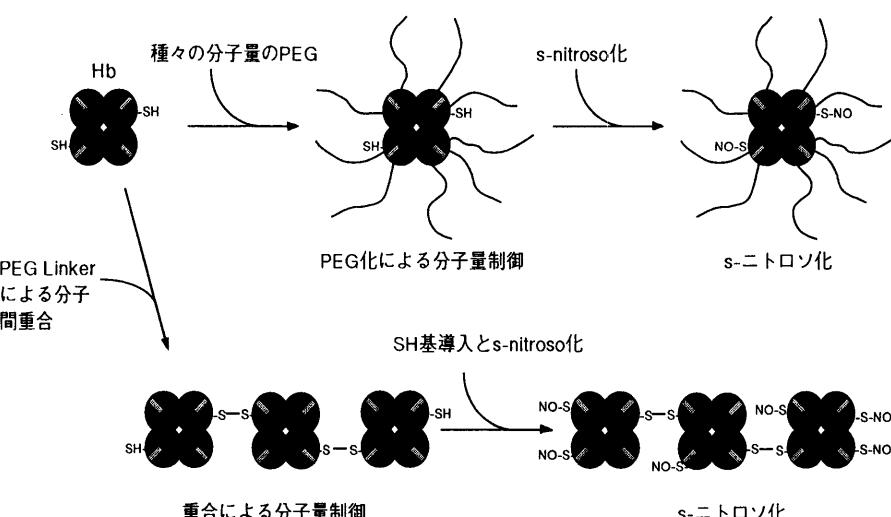


図3. 臨床応用が期待されるヘモグロビン系酸素運搬体の分子設計。上図: polyethylene glycolにより分子サイズを巨大化した後に、ヘモグロビンのβ鎖をS-ニトロソ化。下図: ヘモグロビンをSH基を介して重合した後にヘモグロビンβ鎖をS-ニトロソ化。

動脈硬化、脳梗塞、糖尿病などの患者へHBOCを投与する際に問題となり、しかも血小板は管腔内にあるので、HBOCのサイズを大きくしても回避できない可能性がある。

HBOCの分子設計上、NANC神経への作用や血小板凝集増強を回避する方法として、われわれはStamlerが提唱したS-nitroso-Hb

## 参考文献

1. 関口定美. 人工酸素運搬体としての人工血液の開発と臨床応用. 日本臨床 1997;55:2439-46.
2. 岩下雄二. 酸素運搬体臨床研究の現況. 人工臓器 1997;26:920-6.
3. Loscalzo J. Nitric oxide binding, the adverse effects of cell-free hemoglobins: What makes us different from earthworms. *J Lab Clin Med* 1997;129:580-3.
4. Tsuchida E. Introduction: Overview and Perspectives. In: Tsuchida E, ed. Artificial Red Cells. Materials, Performances and Clinical Study as Blood Substitutes. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1995;1-20.
5. Sakanoue J, Tamura M, Nakai K, Sakuma I, Kitabatake A. Redox states of cerebral tissues of rats substituted by the liposome-encapsulated hemoglobin. In: Eke A, Delpy DT, eds. Oxygen Transport to Tissue XXI. Plenum Press, 1999 in press.
6. 佐久間一郎, 深尾充宏, 北畠顕. EDHFと循環調節. 呼吸と循環 1996;44:605-13.
7. 佐久間一郎. 血管弛緩因子としてのNO. 実験医学 1991;9:1347-51.
8. Motterlini R, Vandegriff KD, Winslow RM. Hemoglobin-nitric oxide interaction and its implications. *Transfusion Med Rev* 1996; 10:77-84.
9. Malcolm DS, Hamilton IN, Schultz SC, Cole F, Burhop K. Characterization of the hemodynamic response to intravenous diaspisin crosslinked hemoglobin solution in rats. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994;22:91-107.
10. Nakai K, Ohta T, Sakuma I, Akama K, Kobayashi Y, Tokuyama S, Kitabatake A, Nakazato Y, Takahashi TA, Sekiguchi S. Inhibition of endothelium-dependent relaxation by hemoglobin in rabbit aortic strips: Comparison between acellular hemoglobin derivatives and cellular hemoglobins. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;28:115-23.
11. Nakai K, Usuba A, Ohta T, Kuwabara M, Nakazato Y, Motoki R, Takahashi TA. Coronary vascular bed perfusion with a polyethylene glycol-modified hemoglobin-encapsulated liposome, Neo Red Cell, in rats. *Artif Organs* 1998;22:320-5.
12. Nakai K, Sakuma I, Ohta T, Ando J, Kitabatake A, Nakazato Y, Takahashi TA. Permeability characteristics of hemoglobin derivatives across cultured endothelial cell monolayers. *J Lab Clin Med* 1998;132:313-9.
13. Iwashita Y. Pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate (PHP) as an oxygen carrier. *Artif Organs Today* 1991;1:89-114.
14. Bleeker WK, Van Der Plas J, Feitsma RIJ, Agterberg J, Rigter G, De Vries-Van Rossen A, Pauwels EKJ, Bakker JC. In vivo distribution and elimination of hemoglobin modified by intramolecular cross-linking with 2-nor-2-formylpyridoxal 5'-phosphate. *J Lab Clin Med* 1989;113:151-61.
15. Nolte D, Botzlar A, Pickelmann S, Bouskela E, Messmer K. Effects of diaspisin-cross-linked hemoglobin (DCLHb<sup>TM</sup>) on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster: A study on safety and toxicity. *J Lab Clin Med* 1997;130:314-27.
16. Viele MK, Weiskopf RB, Fisher D. Recombinant human hemoglobin does not affect renal function in humans: analysis of safety and pharmacokinetics. *Anesthesiology* 1997;84:848-58.
17. Rattan S, Rosenthal GJ, Chakder S. Human recombinant hemoglobin(rHb1.1) inhibits nonadrenergic noncholinergic (NANC) nerve-mediated relaxation of internal anal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272:1211-6.
18. Hogan JC, Lewis MJ, Henderson AH. In vivo EDRF activity influences platelet function. *Br J Pharmacol* 1988;94:1020-2.
19. Olsen SB, Tang DB, Jackson MR, Gomez ER, Ayala B, Alving BM. Enhancement of platelet deposition by cross-linked hemoglobin in a rat carotid endarterectomy model. *Circulation* 1995;93:327-32.
20. Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 1997;276:2034-7.
21. Pawlosky JR, Swaminathan RV, Stamler JS. Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation. *Circulation* 1998;97:263-7.

## 原著

# マイクロウェーブによる超短時間高温加熱処理が ヘモグロビンに与える影響

木村哲寛、島村京子、内山英樹、金田伸一、緒方嘉貴

## Influence of High-Temperature Short-Time Heat Treatment by Microwave Heating on Hemoglobin

Tetsuhiro Kimura, Kyoko Shimamura, Hideki Uchiyama, Shinichi Kaneda, Yoshitaka Ogata

人工酸素運搬体(Neo Red Cell: NRC)の原料となるHbのウイルス汚染による感染のリスクを低減するために、超短時間高温加熱処理(High-Temperature Short-Time Heat Treatment: HTSTH)をマイクロウェーブ加熱により行い、同処理がヘモグロビン(Hb)に及ぼす影響について検討した。超短時間加熱処理は、70-103℃の温度範囲で行い、加熱処理時間は、予備加熱時間が1.02sec、マイクロウェーブ照射時間が183msec、保持時間が1.9msecで、冷却時間を合わせるとすべての加熱処理時間は2.23secであった。この条件下では、処理温度90℃までの範囲で熱によるHb回収率の低下は認められず、また、熱による酸化(メトHb化)の進行も91℃加熱処理時で1.5%程度であった。さらに、Hbの熱安定性を確認するため、85℃及び88℃で加熱処理したHbを分光学的分析、陽イオン交換クロマト及び等電点電気泳動で分析した。その結果、分光学的分析においては、可視部及びソーレ帯共にスペクトルの変化は見られなかった。また、陽イオン交換クロマトではクロマトグラムに変化は見られず、等電点電気泳動の泳動パターンにおいてもHb由来のバンドに変化は見られないことを確認した。

To enhance safety margin against virus contamination of the artificial oxygen carrier(Neo Red Cell), we studied high temperature ultra short time heat treatment(HTSTH) of hemoglobin(Hb) and investigated influence of the treatment on Hb properties. The short time heat treatment was performed at various temperatures from 70 to 103℃. The duration of heat treatment consisted of pre-heating(1.02sec), microwave irradiation (183msec), peak temperature holding(1.9msec) and cooling(1.02sec), then the total heat treatment time was 2.23sec. Hb was not affected its yield and content of metHb with short time heat treatment at which temperature under 90℃. The denaturation of Hb under the heat treatment was confirmed by spectral analysis, cation exchange HPLC analysis and isoelectric focusing. Processing at 85℃ and 88℃ resulted no denaturation of Hb on each analysis.—Key words: Short-time heat, Hemoglobin, Methemoglobin.

### 1. 緒言

輸血医療に用いる血液が人由来である以上避けることの出来ない輸血副作用が存在する。血液中の感染性ウイルスについては、予防対策としてウイルスクリーニング検査が近年大変強化され、輸血によるウイルス感染のリスクは少なくなり、輸血医療の安全性はかなり高くなっている。しかし、現在のスクリーニング検査では避けることの出来ないウンドウピリオドの問題等からウイルス不活化/除去の技術が重要となってきている。さらにリンコンビナント製剤を含めたバイオ医薬品に対するウイルス除去に関するガイドラインが1997年ICHにより制定され<sup>1)</sup>、現段階では、血液製剤についてはこのガイドラインの適用範囲外である

が、血液製剤に対してもEUを中心に、より高い安全性が求められつつあり、我々が開発を行っている人工酸素運搬体Neo Red Cell(NRC)もその対象になると考えられる。NRCは、ウイルススクリーニング検査済みの血液を原料とするため、ウイルス汚染リスクは低いと考えられるが、製品のウイルス汚染による感染のリスクをより低減するために様々な方法を検討してきた。そして、NRC製造工程への導入に適する方法としてフィルターによるウイルス除去ならびに加熱によるウイルス不活化方法を選択した。フィルターによるウイルス除去については、すでにフィルターメーカーによって多くの知見が得られ、バリデーション可能なウイルス除去方法として確立されている。また、ウイルスの不活化

テルモ株式会社 研究開発センター, 〒259-0151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500. Terumo Corporation R&D Center, 1500 Inokuchi, Nakai-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa 259-0151, Japan.

論文受付 99年6月11日, 論文再受付 99年6月23日, 受理 99年6月26日

方法については、多くの研究機関によって様々な研究が行われ、種々の方法が提案されている<sup>2,4</sup>。しかし、NRCの原料であるHbの精製工程を考えると、比較的低温(60-70°C)で長時間加熱不活化する方法ではNative-Hbの熱変性の問題から不適当であり、また薬剤を用いた化学処理等の方法は添加物の安全性、除去等の必要性からHb精製工程への導入には適さない。そこで、インラインで連続的に処理を行える加熱による不活化方法として超短時間高温加熱処理(HTSTH)が可能なマイクロウェーブ加熱による処理を検討することとした。マイクロウェーブによるHTSTHは、ヒト血漿中のHIVを、血漿タンパク質を変性させることなく不活化させることができると報告されており<sup>5</sup>、NRC製造工程でのウイルス不活化が期待できる。本研究では、マイクロウェーブ加熱処理によりHbが受ける影響について検討した。

## 2. 材料および方法

### 2.1. マイクロウェーブ加熱処理装置

使用したマイクロウェーブ加熱処理装置Ultra Therm(Charm Bioengineering Inc. USA)の概要をFig.1に示した。これは、連続的に試料を定流量で、加熱処理する装置である。加熱処理時間は、試料の流速及びカートリッジコイル長を変えることによって調整が可能である。すなわち、試料の流速設定とカートリッジサイズ(コイル内容量)により、マイクロウェーブ照射部、温度保持部および冷却部の各パートを通過する時間が規定される。また、msec単位のピーク温度保持は、小容量の温度保持部の通過時間として与えられる。本研究で使用したカートリッジコイルは、コイルの長さが68.6cm、コイル径が2.38mmのものを使用し、試料の流速は60L/hrとした。加熱処理時間は、予備加熱時間が1.02sec、マイクロウェーブ照射時間が183msec、保持時間が1.9msecで、冷却時間を合わせるとすべての加熱時間がわずか2.23secであった。予備加熱温度は、約36-38°Cの範囲で、加熱処理温度は、70-103°Cの範囲で行った。

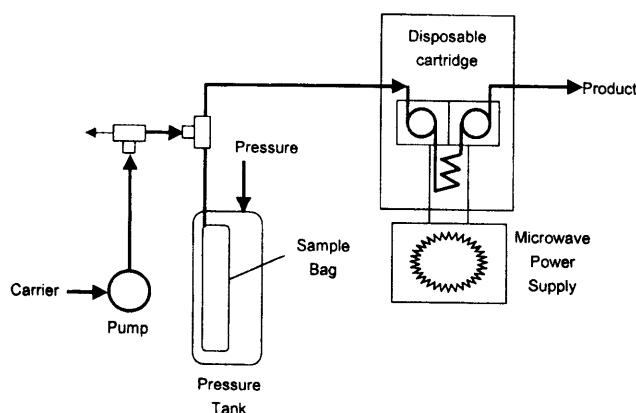


Fig.1 Flow diagram of the Ultra Therm System. Microwave heating was performed using the 5kW continuous flow Ultra Therm.

### 2.2. マイクロウェーブ処理用Hb溶液の調製及び加熱処理方法

Hb溶液は、赤血球をHb濃度が4%前後になるよう20mM NaHCO<sub>3</sub>に分散し、溶血し、調製した。溶血後の赤血球膜残差は、18,700×g、30minの遠心条件にて除去した。調製後Hb溶液

のpHは7.4であった。マイクロウェーブ加熱処理操作は、以下の方法に従った。つまり、キャリアーとして20mM NaHCO<sub>3</sub>を連続的に60L/hrの定流速で流し、目的温度に達した後、安定したところで、目的処理物であるHb溶液の入った加圧タンクのラインに切換え、各加熱処理温度毎にHb溶液を約50mL、マイクロウェーブ加熱処理した。また、85°Cおよび88°Cの両加熱条件については、それぞれ約3Lを処理した。

### 2.3. Hb回収率及びメト化率測定

マイクロウェーブ加熱処理後のHb回収率は、原子吸光分析法にてFe濃度を測定し、Fe濃度からHb濃度を算出することによって求めた。加熱処理によって生じたHb熱変性物は、遠心(48,200×g、20min)除去し、さらに0.2μmフィルターにて処理した。

Hbのメト化率は、シアンメトヘモグロビン法により測定した。

### 2.4. 分光学的測定によるHbの分析

マイクロウェーブ処理したHb(1.5%)を20mM リン酸緩衝液(pH7.4)にて4倍希釈し、分光光度計(MPS-2000: 島津製作所)にて可視部(460-700nm)の吸収スペクトルを記録した。さらに希薄なHbを調製し、同様にソーレ帯(360-480nm)について吸収スペクトルを記録した。

### 2.5. 陽イオン交換クロマトグラフによるHbの分析

マイクロウェーブ処理したHb(1.5%)を注射用蒸留水にて0.1%濃度になるよう希釈し、Mono-Sカラム(1.5×30mm)を装着したSMART System(アマシャムファルマシアバイオテク)にて分析した。希釈したHb(50μL)は、60mM NaClを含む40mM リン酸緩衝液(pH 5.8)で平衡化したMono-Sカラムに負荷し、100μL/minの流速でNaClの濃度を直線的に300mMまで増加して溶出した。溶出液は280nm及び415nmにて総タンパク質およびHbタンパク質をそれぞれモニタリングした。すべてのクロマト操作は4°Cにて行った。

### 2.6. 等電点電気泳動(IEF)によるHbの分析

Isoelectric focusing(IEF)はMultiphor II水平型電気泳動システム(ファルマシア)でAmpholine PAG plate(pHレンジ5.5-8.5)のゲルを用いて行った。ゲルを10°Cの水平な冷却板に置き、10mg/mLのサンプル2μLをゲル表面にアプライした。陽極泳動バッファーには0.4M HEPES、陰極泳動バッファーは0.1M NaOHを使用し、1600V、50mA、25Wで2時間30分泳動した。泳動後ゲルを固定液(11.5%(w/v)トリクロロ酢酸+3.45%(w/v)スルフォサリチル酸)で1時間固定した。その後脱色液(25%エタノール+8%酢酸)に5分以上浸した後、染色液(0.115%CBB R-250 in 脱色液)に移し、60°Cで10分間染色した後脱色を行った。

## 3. 結果

### 3.1. 超短時間高温加熱(HTSTH)によるHbへの影響

Hbへの影響は、HTSTH後のHb回収率と加熱処理後のメト化率を測定することにより確認した。90°Cまでの加熱条件では回収率98%以上であった。100°Cから103°Cの加熱処理温度範囲では、急

激なHb回収率の低下が認められたが、100°Cにおいても約75%の回収率が得られた。また、加熱処理によるHbのメト化変性は、加熱処理温度90°Cまではほとんど認められなかったが、100°C加熱処理時ではメト化率が約20%と進行した(Fig.2)。

加熱によるHbの状態変化に伴うスペクトル変化を確認する目的で、85°C及び88°Cにてマイクロウェーブ加熱処理したサンプルについて可視部及びソーレ帯の吸収スペクトルを確認した。加熱によるHb濃度の低下は見られたが、可視部及びソーレ帯共に、コントロール及び85°C、88°Cの各試料間でスペクトル変化は認められなかった(Fig.3)。

Hbの熱安定性を確認する目的で、85°C及び88°Cにてマイクロウェーブ加熱処理したサンプルについて陽イオン交換クロマトグラフィーによる分析及び等電点電気泳動を行った。陽イオン交換

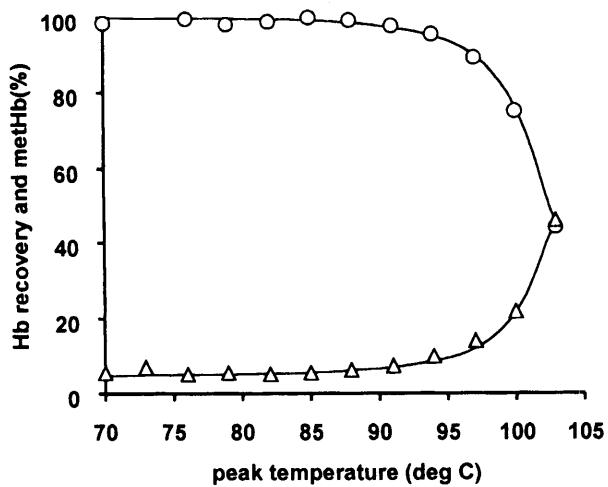


Fig.2 Hb recovery and metHb formation in microwave-heated hemoglobin solution. (○): Hb recovery measured by atomic absorption analysis, ( $\Delta$ ): metHb formation in microwave-heated hemoglobin solution measured by hemoglobin cyanide method.

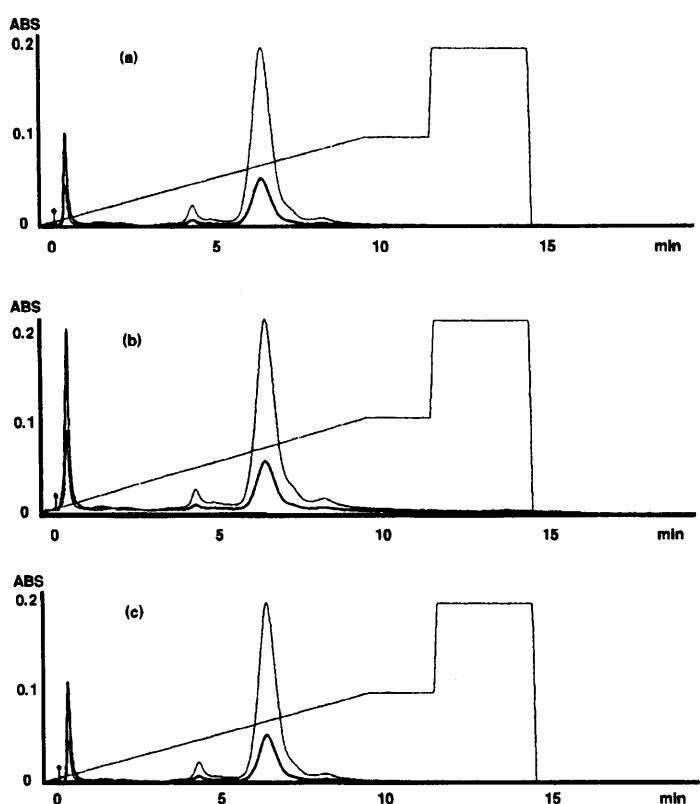


Fig.4 Cation-exchange HPLC analysis of microwave-heated hemoglobin solution. 0.1% hemoglobin solution (50 $\mu$ L) was applied to a column(1.5 $\times$ 30mm) of Mono-S(SMART system, Amersham Pharmacia biotech) equilibrated with 40mM phospahte buffer containing 60mM NaCl(pH 5.8) at 4°C. The column was eluted with a linear NaCl concentration gradient up to 300mM at a flow rate of 100 $\mu$ L/min. The effluents were monitored at 280nm(—) and 415nm(—). a: control hemoglobin solution. b: microwave-heated hemoglobin solution at 85°C. c: microwave-heated hemoglobin solution at 88°C.

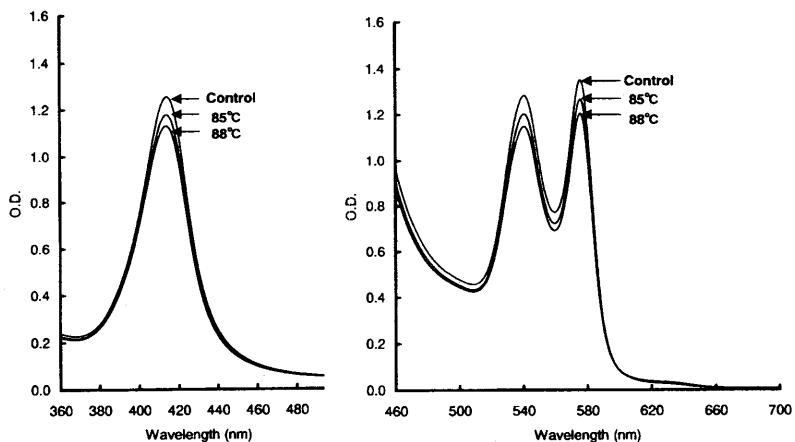


Fig.3 Comparison of the visible absorption spectrum of Hb solution before and after microwave heating.

クロマトグラフィー分析の結果、各ピークは主成分のHbA、微量成分であるHbA<sub>1c</sub>、HbA<sub>2</sub>が検出され、HbAピークのショルダーに部分酸化物のピークが検出された。コントロール、マイクロウェーブ処理したいずれの試料においても新たなピークおよび各成分組成の顕著な差は認められなかった(Fig.4)。Isoelectric focusing(IEF)の結果、各バンドは主成分であるHbAと微量成分であるHbA<sub>1c</sub>、HbA<sub>2</sub>およびHbAの部分酸化物( $\alpha_2^+\beta_2$ ,  $\alpha_2\beta_2^+$ )、metHbに相当し、PI7.0付近にHbのバンドが検出された。コントロール及び85℃、88℃の各試料間でバンドに全く変化は認められなかつた(Fig.5)。

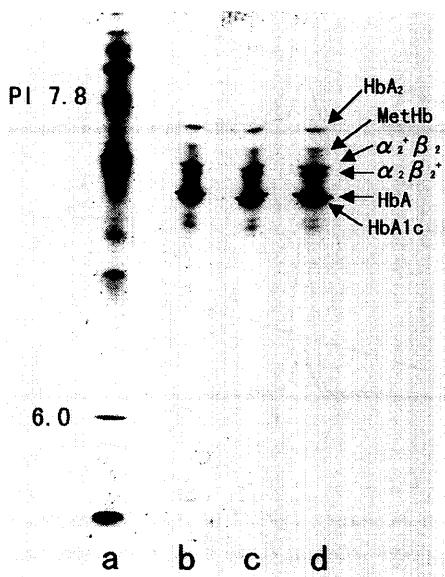


Fig.5 Isoelectric focusing(IEF) of the microwave-heated hemoglobin solutions on Ampholine plate gel. The isoelectric focusing was carried out at 10℃, and stained with Coomassie blue. Lane a: BIO-RAD IEF standard. Lane b: control hemoglobin solution. Lane c: microwave-heated hemoglobin solution at 85℃. Lane d: microwave-heated hemoglobin solution at 88℃.

#### 4. 考察

本研究で用いたマイクロウェーブ加熱処理装置は、ピーク時の温度保持時間2msecと短くすることによって、タンパク質などの有効成分を変性、不活性化させることなくウイルスを不活性化することを目的として開発されたものである<sup>5)</sup>。この原理は、生産物を高温短時間処理することにより、温度に対する反応速度変化がウイルスのそれよりも小さいタンパク質等の有効成分を変性、不活性化することなくウイルスを不活性化できることに基づくものである。

Hbは、変性した不安定化Hbの検出に熱安定性試験が用いられるなど、比較的熱耐性が高い。今回の実験結果では、Hb溶液を加熱処理した場合、加熱処理温度90℃までは98%以上のHbが回収されており、また、加熱処理後のHbのメト化進行は、加熱処理温度90℃まではほとんど認められず、95℃加熱処理時においてもメト化率が約10%程度であった。従って、これらの結果から加熱

処理温度90℃以下の条件においては、Hbの変性はほとんどなく、Hb精製工程に導入可能と考えられた。

一方、加熱によるHbの状態変化を分光学的に確認したところ、コントロール並びに85℃、88℃の各処理間で可視部及びソーレ帯の吸収スペクトルに全く変化が認められなかった。さらにHbの純度確認のため、異常Hbの検出や、Hb溶液の純度検定に汎用されている、陽イオン交換クロマトグラフィー並びにIEFによる分析を実施した。その結果、陽イオン交換クロマトグラフィーのクロマトグラムにはコントロール並びに85℃、88℃の各処理間で、全く変化は認めなかった。また、IEFの泳動パターンでも、Hb由来の各バンドには各処理間で差を認めなかった。以上のことから、Hbは今回用いたマイクロウェーブによるHTSTH処理によって熱変性することなく、Hb精製工程に導入可能な方法として期待される。

また、この装置は流速60L/hrで連続的に目的タンパク質溶液を処理できるため、処理時のHb濃度を4-5%程度とすると1.5-2時間の加熱処理で最終SFH(Hb=45%)を10L程度生産することが可能となり、実生産規模に対応できるものとして期待される。

今後は、このHbが安定に維持される温度領域においてウイルス不活性化の検討を進めて行くことになるが、ウイルスの不活性化効率は共存するタンパク質や電解質の濃度の影響も受けるとされており、Hbの活性、回収率を維持しつつ、必要十分なウイルスの不活性化を達成するための最適条件を検証していくこととする。

#### 5. 結論

ウイルス除去工程とは異なったウイルス不活性化方法を新たにNRC製造工程へ導入することを目的に、マイクロウェーブによる超短時間高温加熱処理を検討した。その結果、ウイルス不活性化方法加熱処理温度90℃以下でHbを変性することなく加熱処理が可能であった。また、その加熱処理温度範囲では、加熱処理によるHbのメト化進行は認められなかった。このことから新たなウイルス不活性化方法としてNRC製造工程に導入することが期待できる。

#### 参考文献

1. Recommended for adoption at step 4 of the ICH process on 5 March 1997 by the ICH steering committee. Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin. ICH harmonized tripartite guideline 1997.
2. Roger YD. Viral contamination of blood components and approaches for reduction of infectivity. Immunol Invest 1995;24: 25-48.
3. Girish NV. Inactivation and removal of blood-borne viruses. Transfusion 1995;35:367-70.
4. Gilles JG, Giambattista Mdi, Laub R, Saint-Remy JMR. Heating lyophilised factor VIII does not alter its recognition by specific antibodies. Vox Sang 1997;73:16-23.
5. Charm SE, Landau S, Williams B, Horowitz B, Prince AM, Pascual D. High-temperature short-time heat inactivation of HIV and other viruses in human blood plasma. Vox Sang 1992;62:12-20.

## 学会報告

# IBC's 6th Annual Conference on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics

北海道赤十字血液センター研究部 平山 順一

第6回Blood Substitutesの年次大会が1998年11月19-20日、米国ワシントンDC(ペンタゴンシティー)のRitz Carlton Hotelで開催された。比較的小さな会場ではあったが、米国企業関係者を中心に100名以上の参加者があり、会場では熱のこもった発表が繰り広げられた。日本からの参加者は筆者を含め5名であった。演題数は22題で、その他にポスターが数題あった。筆者にとって興味深かった演題をいくつか以下に述べる。

### • Polynitroxyl Hemoglobin (PNH): A Hemoglobin Product with Antioxidant and Anti-inflammatory Activity (Dr. Carle, et al, SynZyme Technologies)

化学修飾されたヘモグロビン(Polynitroxyl Hemoglobin, PNH)が抗酸化剤としての機能、すなわちスーパーオキシドや過酸化水素を消去する機能を有しているという発表があった。このような機能をもつヘモグロビン修飾体は患者へ投与された時の患者への酸素傷害を抑えることが期待される。発表では抗酸化剤としての能力および機能発現のメカニズムが示され、治療薬としての可能性が述べられた。

### • Vascular Activity of Unmodified Hemoglobin and S-nitroso Hemoglobin in Rats (Dr. Nakai, Tokyo Univ)

Sニトロソ化されたヘモグロビン修飾体についての報告があった。Sニトロソ化ヘモグロビンはNO<sub>x</sub>の供与体として機能することが知られており、血圧上昇を抑える可能性がある。ラットに投与された(125mg/kg)時の血圧上昇率は未修飾ヘモグロビンが40%であるのに対し、Sニトロソ

化ヘモグロビンがわずか10%だった。10%という値は血圧上昇としては小さいものであるし、場合によっては患者に有益であるとされた。

### • Clinical Development of RSR13, a Synthetic Allosteric Modifier of Hemoglobin (Dr. Gerber, Allos Therapeutic Inc)

RSR13という官能基で修飾されたヘモグロビン修飾体について報告された。この修飾体は酸素との親和性が低く、酸素濃度の低い組織では酸素が放出されるよう設計されている。ガンの放射線治療では治療すべき場所での酸素濃度が低ければ治療効果も低く、このようなケースでの活躍が期待されている。マウスを用いた実験では投与量依存的にガン細胞に対する放射線治療の効果が確認された。併せてフェーズ2の結果も発表された。

### • The Application of Recombinant Technology in the Discovery of Novel, Second Generation, Hemoglobin Therapeutics (Dr. Gorczynski et al, Baxter)

当学会の数ヵ月前にHemAssist計画が中止になったバクスター社は第二世代の血液代替物に焦点を合わせており、遺伝子組み換え技術により、患者の要求にピッタリあった酸素運搬体を作ることが可能であるとしている。一つの例として、Heme-pocketの構造を変化させることにより Nitric Oxideとの反応が遅くなったヘモグロビン組換体について発表があった。血管や胃腸の平滑筋に影響を与えずに酸素運搬体として機能していると述べられた。

### • Recent Development of Hemolink™ (Biro et al, Hemosol Inc)

Hemolink™(O-raffinoseで架橋されたヘモグロビン修飾体)に関して最近行われた安全性に関する結果の報告があった。ラットを用いた実験では血液の50%をHemolink™で置換しても腎毒性は見られず、外科的疾患をもつ患者16人に500mLのHemolink™を投与しても深刻な影響はなかったと報告された。

上述以外にも数種類の人工酸素運搬体についての報告があった。リポソーム型人工酸素運搬体についての報告はなかった。

材料として生物由来のヘモグロビンを用いる場合、ヒト由来の場合とウシ由来の場合がある。どちらがよいかという議論がほしかった。いずれにしても、病原体の除去もしくは不活性化は避けて通れないのでそのあたりの議論も今後期待したい。

筆者はこの分野の初心者である。現在、これほどまでに多種多様な人工酸素運搬体が存在すること、そしてそれが赤血球の代替というだけでなく酸素を運ぶ“薬”として位置づけられていることに大きな驚きを感じた。今後この分野がますます発展していくことを期待したい。

参考までにプログラムを掲載した。

**IBC's 6th Annual Conference on Blood Substitutes  
and Oxygen Therapeutics**  
**—Advancements Towards Clinical Use—**

*November 19-20, 1998 The Ritz-Carlton Pentagon City, Washington, DC*

*Thursday, November 19, 1998*

7:30	<b>Registration, Exhibit and Poster Set-Up, Breakfast Bakeries and Coffee</b>	11:30	<b>Blood Substitutes in Tumor Therapy</b> Mark DeWhirst, DVM, PhD, Professor, Department of Radiation Oncology, Duke University
8:30	<b>Introduction by Co-Chairpersons</b>  Maria S Gawryl, PhD, Vice President, Research and Development, Biopure Corporation	12:00	<b>Anesthesiology</b> Colin F MacKenzie, MD, Professor and Vice Chairman, School of Medicine Section, Chief, Anesthesiology, R Adams Cowley Shock Trauma Center, University of Maryland Medical Center
8:45	<b>Keynote Presentation - Public Health Implications and Rationale for Innovative Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics</b>  C Everett Koop, MD, ScD	12:30	<b>Military Perspective</b> Michael Fitzpatrick, LTC, PhD, Deputy Director, Armed Services Blood Programs Offices
9:45	<b>Summary Perspective: Blood Substitutes and Clinical Targets</b>  Harvey G Klein, MD, Chief, Department of Transfusion Medicine, Warren G Magnuson Clinical Center, National Institutes of Health	13:00	<b>Luncheon</b>
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Overview of Human Blood Supply</li><li>• Public Health Implications</li><li>• Substitutes and Oxygen Therapeutics - Overview of Potential Applications</li><li>• Epidemiologic Review - Supply, Imminent Demand, Current Safety</li><li>• Barriers to Implementation Economic, Medical, Political</li><li>• Review of Conference Objectives</li></ul>		<b>INDUSTRY UPDATES - LATEST PRE-CLINICAL AND CLINICAL DEVELOPMENTS</b>
10:30	<b>Refreshment Break, Exhibit and Poster Viewing</b>	14:15	<b>Current Development Status of PHP for the Treatment of Nitric Oxide-Induced Shock</b> Joseph DeAngelo, MS, Vice President of Research, Apex Bioscience, Inc Vipin K Garg, PhD, Vice President of Operations, Apex Bioscience, Inc
	<b>BASIC SCIENCE TO CLINICAL MEDICINE: THE CRITICAL LINK</b> <b>Sub-Issues and Opportunities for Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics</b>	14:45	<b>Hemoglobin-Based Blood Substitutes: Oxygen Carriers, Pressor Agents or Oxidants</b> Abdu I Alayash, PhD, Center for Biologics Evaluation and Research, US Food and Drug Administration
11:00	<b>Oncology and Tumor Oxygenation</b> Clinical Perspective  Emil Frei III, MD, Physician Emeritus, Dana-Farber Cancer Institute	15:10	<b>Clinical Development of RSR13, a Synthetic Allosteric Modifier of Hemoglobin</b> Michael J Gerber, MD, Vice President, Medical Affairs, Allos Therapeutics, Inc

15:35 ***Refreshment Break, Exhibit and Poster Viewing***

16:00 **Enhancement of Tissue Oxygenation by Intracellular Introduction of Inositol Hexaphosphate by Flow Electroporation of Red Blood Cells**

Vin Singh, MS, Manager, Cell Permeation Technology, EntreMed, Inc

16:25 **Blood and Blood Product Needs in Brazil**

Eliete Bouskela, MD, PhD, Professor, Laboratório de Pesquisas em Microcirculação, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil  
Mauricio Rocha e Silva, Professor, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brazil  
Rob Shorr, PhD, DIC, Managing Director, Diamond Investment Group Inc

17:00 ***Closing Remarks from Conference Co-Chairpersons***

17:05 ***Close of Day One***

*Friday, November 20, 1998*

7:00 ***Exhibit and Poster Viewing, Breakfast Bakeries and Coffee***

7:45 **Chairperson's Remarks**

Maria S Gawryl, PhD

Terri Clark

8:00 **Recent Development of Hemolink™**

George P Biro, PhD, MD, Vice President, Preclinical Science, Hemosol Inc; Professor, Department of Cellular and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Ottawa, Canada

FJ Lou Carmichael, PhD, MD, FRCP(C), Director of Clinical Trials, Hemosol Inc; Professor, Department of Anesthesiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Tronto, Canada

Wilfred Lieberthal, MD, Associate Professor, Boston University School of Medicine and Boston Medical Center

9:00 **Recent Progress in the Clinical Development of Oxygent™ (Perflubron Emulsion) as a Temporary Oxygen Carrier for Elective Surgery**

Peter E Keipert, PhD, Program Director, Oxygen Carriers Development, Alliance Pharmaceutical Corporation

**Perflubron Emulsion Oxygent™ Delays Blood Transfusion in Orthopedic Surgery: Results of a Multicenter Phase IIb Study**

Donat R Spahn, MD, Professor of Anesthesiology, University Hospital Zurich, Switzerland

9:45 ***Refreshment Break, Exhibit Poster Viewing***

10:15 **Polynitroxyl Hemoglobin(PNH): A Hemoglobin Product with Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity**

Carleton JC Hsia, PhD, President and Chief Executive Officer, SynZyme Technologies, L.L.C.

10:40 **Characterization of Hemoglobin Vasoactivity - An Update**

Timothy N Estep, PhD, Vice President, Research and Development, Hemoglobin-Therapeutics Division, Baxter Healthcare Corporation

**Clinical Update of the DCLHb Traumatic Hemorrhagic Shock Program**

Edward P Sloan, MD, MPH, Research Development Director, Department of Emergency Medicine, University of Illinois College of Medicine

11:40 **The Application of Recombinant Technology in the Discovery of Novel, Second Generation, Hemoglobin Therapeutics**

Richard J Gorczynski, PhD, Senior Vice President, Research and Development, Baxter, Hemoglobin Therapeutic Division

Douglas D Lemon, PhD, Scientist, Baxter, Hemoglobin Therapeutic Division

12:30 ***Lunch on Your Own***

13:45 **PolyHeme™: A Large Volume O<sub>2</sub>-Carrying Blood Replacement - An Update**

Richard DeWoskin, Chairman and Chief Executive Officer,

## 海外文献紹介

# 人工血液開発の最近の動向

## Overview on the Recent Development of Artificial Blood

北海道赤十字血液センター研究部 平山順一、阿部英樹、山田淑子

人工血液開発の動きについて、ニュースレター(Blood Weekly 等)の記事をもとにまとめてみた。

### 企業の場合

#### Hemosol社

英国では整形外科領域でHemolinkの臨床第2相試験の承認が発表された。

Hemosol社のJohn W Kennedyは、これはビッグニュースであり、今後ヨーロッパや北アメリカでの臨床試験拡大への幕開けであろうと述べた。英国の医薬管理機構が承認した臨床試験には18例の症例が登録され、うち12例は輸血のかわりにHemolinkの投与を受け、6例は通常の同種血輸血を受ける予定である。試験に参加する医療施設の承認が出しだい試験は開始される。

Hemolinkのような赤血球代替物はウイルス除去/不活化が可能であり、輸血時の交差試験が不要で、1年以上の保存が可能である。前臨床試験では大量投与で特別の毒性を認めず、Hemolinkの有する特別の化学構造とHemosol社の特別な製造工程も付加価値となり、通常の血液製剤より安全性の高い製品を提供できるとKennedyは述べた。英国での臨床試験はカナダでの第2相試験と異なり、術中および術後に輸血が必要と考えられた場合に、失血量分を投与し、より広範囲の外科症例を含む予定である。今回の試験用製剤はカナダ由来高純度精製ヒトヘモグロビンが使われている。

Blood Weekly, May 4, 1998

#### Northfield社

血液代替物PolyHemeの、外傷症例を対象とした臨床試験の成績の一部が発表された。重症外傷で入院した44例の症例（一部はショック状態であった）を2群に分け、1群には同意を得た後PolyHeme6単位までの投与を行い、他の1群には同種血輸血を実施した。この2群間で患者の体温、平均血圧、心拍数、クレアチニン値に差は認められなかった。21例中3例が1単位、2例が2単位、1例が3単位、3例が4単位、1例が6単位のPolyHemeの投与を受けたが、この薬剤に関連する重症の、あるいは予期せぬ副作用は認められなかった。PolyHemeの投与で同種血輸血必要量も抑えることが可能となり、PolyHeme6単位投与群ではその後さらに平均6.8単位の同種血輸血が実施されたが、対照群では10.4単位が必要であった。同種血がいかに安全になったとしても未だわずかにでもリスクがある以上、この同種血輸血必要量を減少させたことは臨床上大変有益であると研究者は述べている。また1960年代からこの製剤の開発研究に携わってきたMoss博士は、この論文は極めて画期的な、あるいは影響力の大きい論文であると紹介している。

この赤血球代替物はさらに外傷患者の初期治療の方針を根本的に変える可能性を秘めている。病院外で血液型検査、交差試験なしに救急救命士が患者に投与できる道を開くであろう。地方で交通事故に遭い、ヘリコプターで救命センターまで数時間も運ばれていた患者が、すぐにこの赤血球代替物の投与を受け、救命されることになる。また戦場や災害現場での外傷患者の出血の治療に非常に役立

つ。現在デンバー、カリフォルニア大学で臨床試験が継続され、17例の患者には10単位までのPolyHemeの投与が行われ、副作用は認められていない。PolyHemeは外科手術患者を対象とした臨床第3相試験も現在行われており、15-20ヵ所の医療センターで総数240例を目標に行われている。

PolyHemeは血液代替物の9つある候補の1つであるが、先を進んでいたBaxter社が98年7月末、期待はずれの結果のため臨床試験を中断することを発表した。ヘモグロビンを材料にした血液代替物は副作用を有し、腎機能障害、消化管障害、血圧上昇、心拍数減少などを惹起する。この毒性はヘモグロビン分子の構造に由来する。分子量が小さく(4量体)、血管壁を通過する時血管の緊張を調節しているNOをトラップし、血管が弛緩することを阻害する。このため血管が収縮し、血圧が上昇し、重要臓器への血流が減少する。Northfield社の製法ではヘモグロビン4量体をポリマー化し大きな分子にするため、循環血液中に残留できる。製造段階で出る小さな分子は除かれ、非常に大きな分子にポリマー化したものは免疫学的副作用が心配されるため取り除かれる。彼らの製法は期限切れ赤血球を集め、細胞を割り、ヘモグロビンを抽出し、ポリマー化するものなので、短い期間で大量に臨床試験用に製剤を準備することが可能であった。血液はHIV、肝炎などのスクリーニング検査を合格したドナーから得られ、さらに製造工程で洗浄、殺菌、化学薬品などを含んだ4つのウイルス不活化工程を含んでいる。

まとめとして、PolyHemeは20年間以上の研究の成果として、ウイルスフリー

で、交差試験が不要で、正常レベルのヘモグロビンを含有し、数年間保存できる製剤が開発されたと結んでいる。

ABC Newsletter, August 7, 1998

#### Biopure社

Biopure社とアメリカ食品医薬品局(FDA)は98年7月、手術時における赤血球代替物の安全性と効果を献血由来赤血球製剤と比較する第3相臨床試験の計画について合意した。Biopure社は、一番最初にFDAの認可を受けた動物用の血液代替物を開発した企業である。Biopure社は1ヵ月以内に、一般的な整形外科の待機手術におけるHemopure(商標;ウシヘモグロビンをグルタールアルデヒドで架橋した酸素運搬体)の、多施設での第3相臨床試験を開始すると、報道機関に語った(8/19/1998)。

この臨床試験は、一般的な整形外科の待機手術患者においてHemopureの安全性と効果を同種血輸血と比較し評価できるようにデザインされている。20以上の施設の600人以上の患者が登録されるだろう。その半分がHemopureを、残り半分が同種赤血球を輸血される。この試験では最高10単位までのHemopureの術中投与が認められており、術後28日間の管理が課されている。結果は、Hemopureと同種赤血球の効果対危険性を比較する統計的手法により評価される。この臨床試験はまた、統計的に有意な患者数でHemopureが安全かつ効果的に同種赤血球輸血を回避できることを明らかにするため、確実な最低基準を設定している。Hemopureを投与された患者の1/3以上は赤血球輸血を避けなければならず、Hemopure投与群でみられた重篤な副作用は同種赤血球投与群と同等かそれ以下でなければならぬ。

Biopure社のHemopure臨床開発計画は19項目の試験からなり、あるものは完了し、あるものは現在進行中である。それらの中には、今回のアメリカでの第3相臨床試験や、ヨーロッパで既に行われている心臓手術以外でのHemopureの術中使用を目的とした第3相臨床試験が含まれ、これらは中枢をなす試験である。Biopure社社長Carl Rauschは「我々の製品はかなりいい線を行っている。これまで350人以上の患者に、Hemopureに関連する重大な安全上の懸念を抱くことなく、使用されて

きた」と語った。

98年1月、Biopure社はイヌの貧血治療用赤血球代替物、Oxyglobin(ウシヘモグロビンをグルタールアルデヒドで架橋したもの)の販売許可をFDAから得た。Biopure社は現在全米の救急動物病院にOxyglobinを配布中であり、今年後半には全国の15,000人の獣医師達にも製品の販売を拡大する予定であると語った。Biopure社は米国におけるOxyglobinの使用目的の追加を求めており、ヨーロッパにおいては98年はじめに申請手続きを済ませている。

Biopure社の酸素運搬体、OxyglobinとHemopureは高純度の重合ヘモグロビンで無菌的であり、静注により使用される。両製品とも常温で安定であり、2年間の保存期間を持ち、使用に際し血液型を合わせる必要がない。「原料としてウシ赤血球を使っているため、ヘモグロビンは無限に低価格で入手できる」とBiopure社は語る。Biopure社では管理された畜牛を使い、詳細な出生記録と病歴をつけている。ウシ達にはタンパク質性の餌は与えられていない、と広報部は語る。Biopure社はOxyglobin製造のために、FDAにより認可を受けた十分管理された商業規模の製造が可能な施設を有している。この様な製造施設を建設し種々の確認をするには3年あるいはそれ以上の期間を要する」と、Biopure社は言っている。

Biopure社はまた、Hemopureの酸素運搬能について、他の有用性を探っている。例えば、脳卒中のような局所貧血の処置、抗ガン剤療法や放射線照射治療の補助的なものとして、またMRIの造影剤として等である。

ABC Newsletter, August 21, 1998

#### Baxter社

98年の9月16日Baxter社は、30数年間と何億ドルもの投資の末、ヒトヘモグロビンを使った血液代替物であるHemAssistの開発を放棄したと発表した。Baxter社報道発表によると、遺伝子工学的に造られたヘモグロビン分子を基礎とした第2世代の製品開発に研究を集中させることである。

98年4月にBaxter社は米国での外傷症例を対象とした臨床試験を中断した。その試験ではHemAssist投与群の死亡率がコントロール群の率を上回ったとされる(ABC

Newsletter;4/3/98)。HemAssist投与群では予想死亡率42.6%に対し実際には46.2%であったのに対し、コントロール群では17.4%と低かった。その2ヵ月後ヨーロッパでは重症外傷症例を対象とした臨床試験が、臨床的に明らかな効果が出せないと理由で、新規症例の登録を中止した(ABC Newsletter;6/5/98)。その際ロイター通信社に対し、ヨーロッパでの臨床試験では死亡率の増加は認めなかったが、臨床効果が統計的に出なかつたことが理由であると述べている(6/2/98)。ヨーロッパでは心臓外科手術患者を対象とした臨床試験を完了しているが、効果判定は十分できないとされていた。Baxter社の米国での150例の外科手術を対象とした進行中の試験も中断されていた。7月にBaxter社は、これまでの結果を評価するためHemAssistの全ての臨床試験を中止している最中であると発表していた。

9月16日の発表の中で、Baxter社は、HemAssistの臨床試験を再度やり直すのに必要な財源は第二世代の製品につぎ込んだほうがよりよいだろうとの決定がなされた、と語った(Baxter社は当初、HemAssistは1999年後半か2000年前半には米国とヨーロッパで販売許可を受けるだろうと予測していた)。

Baxter社の第二世代製品は遺伝子組換え技術を基にしている。「この様な次世代の製品は、様々な病態の患者がまさに必要としているヘモグロビン分子をあつらえることができる能力に依存している、と我々は感じている」とBaxterヘモグロビン治療開発部のThomas Schmitzは語った。Baxter社社長Harry Jansen Kramerは「次世代の製品に照準を合わせたことによって、患者の要求にピッタリあった酸素運搬体治療薬をより早く、より効果的に市場に送り出せることは喜ばしいことである」と語った。

AABB Weekly Report, September 18, 1998

#### その他

人工血小板に関する興味深い記事があつたので以下に記載する。

血小板代替物の止血効果が動物実験で確認された。

化学療法を受けた患者や自己免疫疾患

の患者にしばしば深刻な血小板減少症がみられる。現在、血小板減少症の治療としては同種血小板輸血が行われるが、抗血小板抗体の生成という深刻な欠点がある。これは難治性であり、さらなる血小板輸血が必要になり、輸血による副作用の可能性が高まる。

Dr. Levi と共同研究者達は血小板の代替物を開発した。ヒトアルブミンのマイクロカプセルであり、表面にフィブリノーゲンが固相化されている。

「このマイクロカプセルを静脈に投与することにより、抗血小板抗体や化学療法によって血小板減少症になったウサギの止血時間を正常な値に戻すことができ

ただけでなく、腹部の皮膚や筋肉の外科的な傷からの出血を減少させた」と Dr. Levi が語った。("Fibrinogen-Coated Albumin Microcapsules Reduce Bleeding in Severely Thrombocytopenic Rabbits" Nature Medicine, January 1999; 5(1): 107-111).

ウサギの静脈血栓のモデルを用いた実験において、マイクロカプセル投与による全身のいかなる場所でも血栓生成の可能性がなかったことを研究者達は確認した。

作用の機序に関しては、正常血液と血小板減少症の血液を用いた実験により、フィブリノーゲンでコートされたアルブミンカプセルと血小板の間の相互作用の

存在が証明された。

フィブリノーゲンでコートされたアルブミンカプセルが内皮細胞のマトリックスへの血小板の付着を促進し、比較的血小板が欠乏している血液中では血小板凝集の減少を補正したことを見出された。

フィブリノーゲンでコートされたアルブミンカプセルは血小板減少症状態での一次止血を改善する作用があり、やがては深刻な血小板減少症を患った患者の出血の予防と治療のための有望な薬になるだろうということをこの研究は示している。



日本赤十字社の血漿分画製剤は、善意の献血から創られています。

平成9年度 東京都内小・中学生「献血の絵」 小学生高学年の部・金賞  
大田区立入新井第四小学校6年 矢嶋 万由奈

日本赤十字社の  
血漿分画製剤

指クロスエイトM250 指クロスエイトM500 指クロスエイトM1000  
指赤十字アルブミン

日本赤十字社 〒105-8521 東京都港区芝大門1-1-3

文献請求先 日本赤十字社中央血液センター医薬情報部  
〒150-0012 東京都渋谷区広尾4-1-31 TEL.03-5485-6607

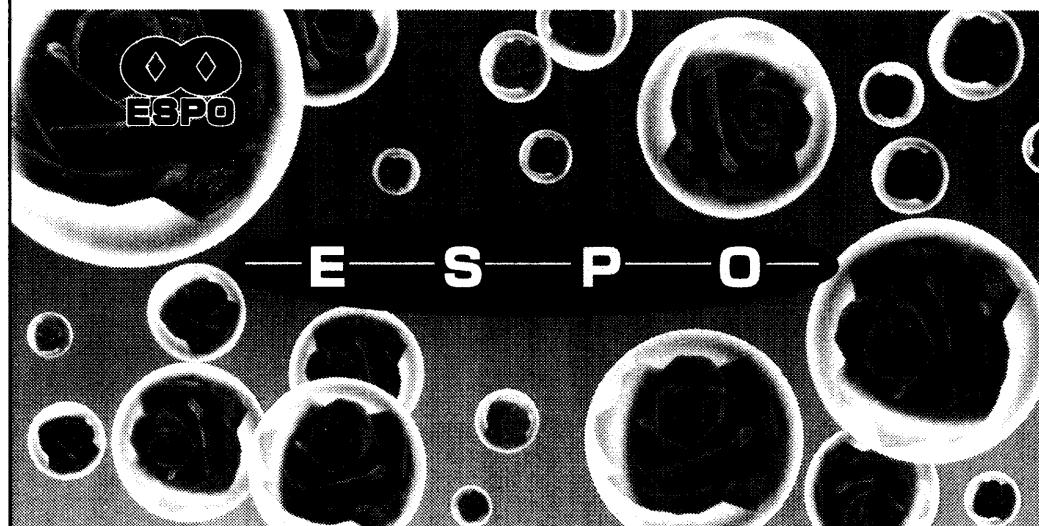
—ヒト エリスロポエチン製剤—

# エスボ® 皮下用

6000・9000・12000・24000

一般名:エポエチンアルファ(遺伝子組換え) ●薬価基準収載●劇薬●指定  
医薬品●要指示医薬品(注意—医師等の処方せん・指示により使用すること)

6000 9000 12000 24000



【禁忌】  
(次の患者には投与しないこと)  
本剤又は他のエリスロポエチン製剤に過敏症の患者。

三共株式会社  
販売元・資料請求先  
〒104-8286 東京都中央区日本橋三丁目五  
麒麟麦酒株式会社 製造元

効能・効果・用法・用量及び使用上の注意は添付文書をご覧下さい。

989(総)

## ●編集後記●

東京での年次大会の会告を掲載したこの号が予定より若干の遅れ程度で発刊でき、ほっとしております。この後1ヵ月後には抄録号が発刊されるため、なんとしてもその発刊と同時にはならないようと肝に命じていました。前号でご紹介いたしましたように編集を担当しています北海道赤十字血液センターでは所長の関口定美先生が1月に急逝され、以降しばらくセンター機能が麻痺しておりました。その中で雑誌「人工血液」を2号発刊し、また最近では7月2,3日と、関口先生が創設された北海道輸血シンポジウムの第11回を無事に終了することができ、本当にほっといたしました。血液センターの事情を話せば、今年は血液事業が大きく変換する年です。献血者のスクリーニング検査に核酸増幅検査という高感度検査が導入され、これまで全国77カ所にある血液センターが個々に実施していた検査スタイルが一部変更になり、核酸増幅検査に関しては全国2ないし3カ所に検体が集められ実施されるという形態に変わっていきます。大変費用と技術のかかる検査ですが、ウイルス感染症には抗原や抗体検査ではつかまらないウインドウ期が存在するため、ウイルスを核酸そのもので検出す

る体制をとることに決定しました。既に欧米では施行中であり、日本も遅れることは許されません。また血液製剤のウイルス不活性化も日赤本社内にプロジェクトチームが発足し、不活性化製剤の導入が検討されています。こうした中で今回の北海道輸血シンポジウムでは「輸血医療におけるリスク管理」をテーマに掲げ、活発に議論を展開しました。

さて前回の理事会で決定したことですが、雑誌の編集にも新しい体制が敷かれます。編集委員長を埼玉医科大学総合医療センター麻酔科の宮尾先生が、また編集事務局を慶應大学医学部呼吸器外科渡辺先生が担当されることになります。北海道赤十字血液センターが担当する号は今回が最終になります。会員の皆様には、これまで担当させていただきました4年間、いろいろとご迷惑をおかけしてきましたが、それでも備わった能力の範囲内ではできる限り頑張った積もりでしたので、どうかお許し願いたいと思います。今後ますます「人工血液」が会員の皆様方に貢献できることを祈っております。

## 投稿規定 Short Version

本誌は、血液代替物開発研究に貢献する論文、関連する情報、学会会員のための会報、学会諸規定等を掲載するが、形式にはこだわらず創意ある投稿を広く集める。本誌への投稿者は本学会会員であることが望ましいが、投稿を希望する者は誰でも投稿することが出来る。原稿掲載の採否は編集委員会が決定する。原著論文について、他誌に既発表あるいは投稿中の論文は掲載しない。

### 執筆規定

DTP (Macintosh)による編集作業によって作製するため、ワープロを用いフロッピーによる投稿を原則とする。ただし、手書き原稿による投稿でも受け付ける。欧文による投稿を歓迎する。

- 1) 原稿はワープロを用いて作成し、使用したソフト名を記載してフロッピーにより提出すること。その際、ハードコピー2部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。Macintosh以外を用いるときは、テキストファイル形式でも保存し提出すること。
- 2) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著者名、全著者所属、英文著者名、英文所属、ついで筆頭著者の住所、英文住所を記入する。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。

- 3) 総説、原著、および報告については、第2頁以降に和文抄録、Keywords (英文で6個程度) を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること。英文抄録は英文ワープロを用いて、別の「ABSTRACT」ファイルとしてハードコピーとともに提出しても構わない。
- 4) 句読点はコンマ(,)ピリオド(.)とする。
- 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbol フォントを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめること。
- 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μm, L, mL, μL, mol, g, mg, μg, ng, pg, fg, N/10などを用いる。
- 7) FigureとTable：引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は全て英文とすること。本文ハードコピー上に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。
- 8) 文献：本文に引用した順序に番号を付け、文中では2), 3-5), 1, 4-6)などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名、論文題名、誌名、西暦発行年；巻数：

頁～頁。とし、誌名の省略は医学中央雑誌またはIndex Medicusに準拠する。単行本の場合は全著者名、題名、編集者名、書名、発行地：発行書店、年号；頁～頁。の順とする。

1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
2. 砂本順三, 岩本 清. リボソームの調製. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編. リボソーム. 東京: 南江堂, 1988;21-40.
3. Fowler SA, Andracki M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22:27-42.
4. Reichert CM, Kelly VL, Macher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985;111-60.
- 9) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
- 10) 既発表の図表、その他を引用、転載する場合には、あらかじめ版権所有者の許可を得ること。また、掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

掲載料は無料とし、論説、総説、原著、報告等については別刷り30部を贈呈する。それを超える分についての費用は著者の負担とする(およそ1部100円)。カラー写真掲載・アート紙希望などの場合は、著者の実費負担とする。

### 編集委員会

●池淵研二（委員長）、武岡真司、友田燁夫、西出宏之、宮尾秀樹、山内紘一、渡辺真純●

## 日本血液代替物学会会誌

■発行 日本血液代替物学会

■編集・制作「人工血液」編集委員会

■印刷 株式会社 高山

## 人工血液 vol. 7 (2) 1999年6月30日発行

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL (03)5363-3806 FAX (03)5363-3493

〒063-0002 札幌市西区山の手2条2丁目

北海道赤十字血液センター内

TEL (011)613-6615 FAX (011)613-4131

〒113-0034 東京都文京区湯島1丁目1番地12号

TEL (03)3253-5311 FAX (03)3251-5339

再生紙を使用