

会 告

第15回日本血液代替物学会年次大会

大 会 長：堀之内宏久（慶應義塾大学医学部呼吸器外科准教授）

開催日程：平成20年10月23日（木） 24日（金）

開催場所：慶應義塾大学医学部信濃町キャンパス 北里講堂ほか

テ ー マ：血液代替物の開発戦略

登録受付：当日（事前受付なし）

参 加 費：会員10,000円 / 非会員 20,000円 / 学生 5,000円

○プログラム：

会長講演 堀之内宏久（慶應義塾大学医学部呼吸器外科 准教授）

教育講演 小林弘祐（北里大学大学院医療系研究科医療衛生学部医療工学科 教授）

シンポジウム「血液代替物の開発戦略」

24日（金）は英語でのセッションを予定しております。

○会期中の行事：

- ・理事会 10月23日（木）
- ・評議員会 10月23日（木）
- ・懇親会 10月23日（木）
- ・総会 10月24日（金）

大会事務局： 〒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

TEL: 03-5363-3806

FAX: 03-5363-3499

E-mail: horinouc@sc.itc.keio.ac.jp

学会のホームページにて、最新の情報、プログラム等を掲載していきます。併せてご確認、ご利用ください。
<http://www.blood-sub.jp/>

《合同開催》

The 6th Current Issues on Blood Substitute Research

会 長：小林統一（慶應義塾大学名誉教授）

開催日程：平成20年10月23日（木） 24日（金） 25日（土）

開催場所：慶應義塾大学学部信濃町キャンパス 北里講堂ほか

テ ー マ：1. 血液代替物開発の最前線

2. HBOCsと血管内皮の反応性

3. Gas carrier and Gas biology

参 加 費：30,000円（同伴 15,000円） / 学生 5,000円

第15回日本血液代替物学会年次大会に登録された方は当日参加可能です。

下記ホームページを参照してください。

<http://www.convention.co.jp/b-sub2008>

コルフィセン置換ミオグロビンによる人工酸素運搬体の分子設計

Molecular Design of the Novel Oxygen Carrier Based on Corrphycene-Substituted Myoglobin

根矢三郎, 星野忠次

Saburo Neya, Tyuji Hoshino

和文抄録

筋肉中の酸素貯蔵タンパク質であるミオグロビンを酸素運搬体へと機能変換し, 人工酸素運搬体として利用するために, ポルフィリン異性体分子を利用する新しい試みを行った. ミオグロビンのヘムを除去してポルフィリン異性体類で再構成すると, ポルフィセンとヘミポルフィセンでは酸素親和性を上昇したが, コルフィセンでは酸素親和性を低下した. コルフィセンはメソ位炭素原子が(2, 1, 0, 1)の様式で配列する「台形のポルフィリン」である. アルキル型鉄コルフィセンをふくむミオグロビンの酸素親和性は $P_{50} = 6.7$ mmHgであり, 分子周辺に電子吸引性置換基エトキシカルボニル基を導入すると酸素親和性は $P_{50} = 37$ mmHgまたは400 mmHgまで低下し, 十分な酸素運搬能を付与できた. ミオグロビンの酸素運搬体への機能変換は, コルフィセン分子の形状に由来し, 鉄原子は台形の金属ホール中で不安定となり分子平面から浮き出す. さらに, 鉄コルフィセンには短い鉄—ピロール結合があり, 電子吸引性置換基の影響を鋭敏に受ける. 今までにない酸素親和性制御因子を内在するコルフィセンは, ミオグロビンを利用した酸素運搬体を創製するための新しい機能性分子であると考えられる.

Abstract

The function of the myoglobin reconstituted with modified heme and novel porphyrin isomers were surveyed. Among the artificial prosthetic groups, only the iron complex of corrphycene was found to decrease effectively the oxygen affinity of myoglobin. Corrphycene is a novel porphyrin-like macrocycle with a trapezoidal tetrapyrrole. Introduction of electronegative substituents to the macrocycle further reduced the oxygen affinity to $P_{50} = 37$ mmHg. These observations demonstrate that corrphycene converts myoglobin from the oxygen storage protein to an oxygen carrier. A notable oxygen delivery capacity of the myoglobin was explained on the basis of the trapezoidal molecular shape of corrphycene that stabilizes the out-of-plane configuration of the iron atom. The unique properties of corrphycene suggest the potential utility of corrphycene-substituted myoglobin as a novel biological oxygen carrier.

Keywords

Artificial oxygen carrier, myoglobin, porphyrin isomers, corrphycene, oxygen affinity, iron spin state

はじめに

人工血液は人類にとって大きな夢である. 人工血液開発の歴史は古く, 今までにポルフィリン, フッ化炭素化合物およびヘモグロビンを利用した多くの人工酸素運搬体が提唱されている^{1,2)}. 人工血液には血液型を問わない, ウイルス感染がない, 長期保存ができるなど多くの利点があり, その実現に向けて努力が積み重ねられてきた. わが国では少子高齢化にともない献血人口が減少し, 人工血液の必要性はますます増大している.

しかし, ほとんどのものが臨床応用にまでは到らなかった. ところが, 1980年代に入りこの閉塞状況を打開する画期的な成果が現れた. 早稲田大学理工学部の土田・武岡らのグループはヘモグロビンをミクロカプセルであるリボソームに封入した優れた人工酸素運搬体を開発した. 1990年代には慶応大学医学部の小林・末松らや東海大学医学部の川口らによりリボソーム封入ヘモグロビンの処方が最適化され, 動物投与試験での安全性や効果が実証されてきた³⁻⁶⁾. 2000年以降になると, ヘモグロビン

千葉大学大学院 薬学研究院 薬品物理化学研究室 〒263-8522 千葉市稲毛区弥生町1-33 Department of Physical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Yayoi-cho 1-33, Inage-ku, Chiba 263-8522, Japan.

論文受付 2008年2月9日 論文受理 2008年4月1日

以外にヒト抗体⁷⁾やアルブミン^{8,9)}を用いるものも開発され、わが国の人工酸素運搬体の開発状況は世界の最先端にある。しかし、ミオグロビンを用いた人工酸素運搬体の可能性は検討されてこなかった。本総説では生物無機化学者の視点から、ミオグロビンを利用する新しい人工酸素運搬体創製の可能性を求めた研究例を紹介する。

1. ミオグロビンとは

ミオグロビンはヘモグロビンと同様に酸素分子と結合するタンパク質で、ヘモグロビンが肺から運んできた酸素を筋肉に貯蔵する役割をもつ。ヘモグロビンが2種類のサブユニットからなる四量体 $\alpha_2\beta_2$ (分子量64000)であるのに対して、ミオグロビンは単量体であり、分子量も17000とヘモグロビンの1/4である。ミオグロビンの立体構造はヘモグロビンサブユニットの立体構造と似る。ポリペプチド鎖に囲まれた疎水ポケット中にヘムが収まり、酸素はヘムに含まれる鉄原子に結合する。ミオグロビンはヘモグロビンと同様に酸素を結合する分子であるが、酸素運搬体ではない。それは、高い酸素親和性によりヘモグロビンから酸素を受け取り貯蔵する機能をもつからである。肺と末梢組織での酸素分圧の違いによりヘモグロビンは結合酸素の25-30%を末梢組織で放出するのに対して、ミオグロビンは1-2%しか放出しない。このためミオグロビンを実用的な酸素運搬体として使うことはできなかった。

ヘムの分子構造はFig. 1.に示すように、窒素原子をふくむ5員環のピロール分子が4分子集まった環状テトラピロールである。鉄原子はこの中心に収まっている。ちなみに、鉄は成人体内に4 gふくまれ、およそパチンコ玉1個に相当する重量である。その70%がヘモグロビンとミオグロビンのヘム鉄である。ミオグロビン酸素親和性は高く、生理的条件下での酸素親和性は $P_{50} = 0.7$ mmHgである。一方、末梢組織にあって4次構造がT状態のヘモグロビンでは $P_{50} = 30$ mmHgである(P_{50} 値が小さいほど酸素親和性が高い)。ミオグロビンの高い酸素親和性はヘムの分子構造に由来する。ミオグロビンからヘムを取り出して有機溶媒中でヘムだけを測定すると $P_{50} = 0.5-1$ mmHg程度の酸

素親和性となる。しかし、タンパク質のないヘムでは酸素結合後に鉄が直ちに酸化されてしまい可逆的な酸素結合はできない。タンパク質がもつ疎水的環境は可逆的な酸素脱着には必須である。

2. 化学修飾ヘムによるミオグロビン再構成

ミオグロビンの酸素親和性を変えるには、その補欠分子であるヘムの分子構造を改変する必要がある。この目的のために、ミオグロビンのヘム (= プロトヘム) をとりはずし、化学修飾した別種ヘムに入れ替える試みが数多くなされてきた。ヘムの入れ替えは次のように行われる。ミオグロビン水溶液に希塩酸を加えてpHを2.5に下げて、メチルエチルケトンを加えるとプロトヘムはメチルエチルケトン層に抽出される。水層にはアポタンパク質が残る。アポタンパク質を中性に戻して人工ヘムを加えると、人工ヘムが入ったミオグロビンができる。この方法でさまざまなヘムをふくむミオグロビンが再構成されてきた。天然ヘムにあるビニル基 -CH=CH₂をエチル基 -CH₂CH₃や水素原子 -Hに置換すると、ミオグロビンの酸素親和性はFig. 1.に示すように2 - 5 倍程度上昇する¹⁰⁾。また、ポルフィリン環に窒素1原子を入れたモノアザヘム (Fig. 1.) では酸素親和性は100倍あまり上昇する¹¹⁾。一方、ビニル基を電子吸引性のホルミル基 -CHOに変えると酸素親和性は1/3に低下するが¹⁰⁾、ミオグロビンの酸素親和性はヘモグロビンよりも依然として高いままである。一連の結果は、ポルフィリン分子の置換基変化やポルフィリン環への窒素原子導入を行ってもミオグロビンの酸素親和性はなかなか低下しないことを物語っている。

3. ポルフィリン異性体

ポルフィリンは一重結合と二重結合が共役した芳香族の大平面分子であり、溶液中では赤紫色を帯びている。ポルフィリン環にある4個のメソ位炭素は4つのピロールの間に介在する分子構造をもつ。メソ位炭素原子の位置と個数に着目すると、通常のポルフィリンは(1, 1, 1, 1)と表記できる。メソ位炭素原子は必ずしも(1, 1, 1, 1)のように配列する必然性はなく、場合によっては(2, 0, 2, 0)や(1, 0, 2, 1)などの配列も可能であろう。言い換えるなら、ポルフィリンを構成する4つのメソ位炭素と4つのピロール環の混ぜ合わせができる。この操作が可能であることに最初に気づいたのはドイツの有機化学者Vogelであった。彼は1986年にポルフィセンとよばれるポルフィリン異性体 (Fig. 2.) をつくりだした¹²⁾。これは自然界には類似構造のない全くの合成分子である。ポルフィセンではメソ位炭素原子が移動して(2, 0, 2, 0)の配列をとっている。メソ位炭素原子が移動しても二重結合の数は変わらず芳香族性が保たれ、ポルフィリン分子と同様にポルフィセンは平面構造をとる。しかし、光吸収特性は変化するためポルフィセン溶液は濃い青色となる。1986年以降、メソ位炭素とピロール環を並び替えが徹底的に試みられ、いくつかの異性体分子がつくられてきた¹³⁾。その中で安定に存在して鉄原子を取り込むことができるものはFig. 2.に示すポルフィリンを含めて、ポルフィセン、コルフィ

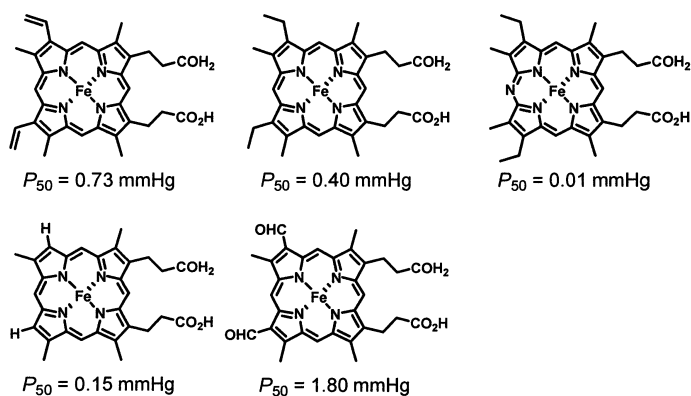


Fig. 1. Structure of natural porphyrin, protoheme with vinyl groups, and the related molecules. The P_{50} values represent oxygen affinities of the myoglobin containing the prosthetic group.

セン、ヘミポルフィセンの4分子だけである。

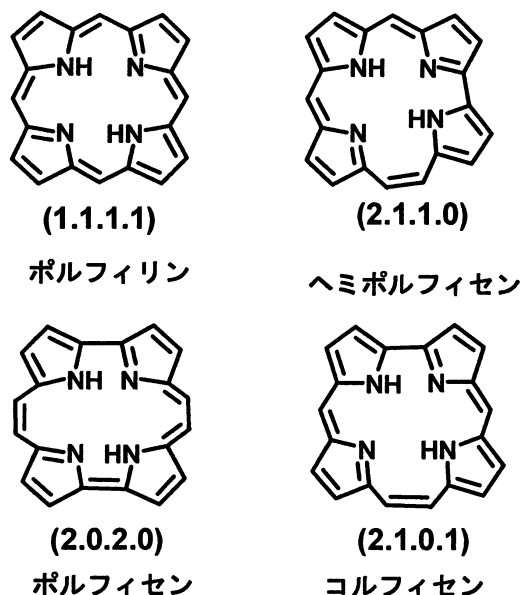


Fig. 2. Structure of the porphyrin isomers with modified tetrapyrrole array. The numerals in the parenthesis denote the number and position of the *meso*-carbons.

4. ポルフィリン異性体を組み込んだミオグロビンの機能解析

ポルフィリン異性体の分子構造はポルフィリンと酷似するので、当然ながら酸素運搬体の補欠分子としての性質に関心が寄せられた。しかし、人工物であるポルフィリン異性体がグロビンに取り込まれるのだろうか。その答はイエスである。今までに、ポルフィリンにつく置換基の大きさと位置を変えた多様な合成ヘムがミオグロビンに組み込まれてきたので^{14,15)}、グロビンはポルフィリン異性体も特異的に認識すると予想される。

私たちは鉄ヘミポルフィセン (Fig. 2.) がミオグロビンに導入できることをみつけた。機能測定を行うと、 $P_{50} = 0.04$ mmHgの結果を得た¹⁶⁾。この場合、天然ミオグロビン ($P_{50} = 0.7$ mmHg) に比べて20倍程度の酸素親和性増加となり、ミオグロビンの酸素親和性は下がらなかった。一方、林らは鉄ポルフィセン (Fig. 2.) をミオグロビンに組み込んで酸素親和性を測定した¹⁷⁾。その結果によると酸素親和性は $P_{50} = 0.005$ mmHgであり、酸素親和性は天然ミオグロビンより140倍も増加した。しかし、奇妙な形のポルフィリン異性体分子の結合によりグロビン構造が変化してヘム鉄に影響したとは考えにくい。なぜなら、分子形が異なるポルフィリン類をミオグロビンに組み込んでヘムとグロビンの分子間接触を極端に変化させても、グロビン全体の構造は天然ミオグロビンとほとんど変わらないからである^{18,19)}。むしろ、ヘム鉄を保持するポルフィリン環の変形効果が鉄原子に直接効いていると解釈される。すなわち、ポルフィリン異性体が鉄原子の電子構造変化を誘発したとするのが妥当である。鉄原子は金属ホールとよばれるポルフィリンのピロ

ール窒素4原子がつくる穴に入っている。ヘミポルフィセンやポルフィセンの金属ホールはポルフィリンに比べて狭い²⁰⁾。そのため鉄原子反応性は増加して、軸配位子である酸素分子と結合しやすくなると考えられている^{16,17)}。

5. 鉄コルフィセンをふくむミオグロビン

ミオグロビンの酸素親和性上昇は結合酸素の放出を妨げるので、酸素運搬体として使う場合には不利である。ミオグロビン機能を酸素貯蔵から酸素運搬へ変換するには、酸素親和性を下げ必要がある。上で述べたように、ポルフィセンやヘミポルフィセンの鉄錯体を使うとミオグロビンの酸素親和性は上昇する。それでは、ポルフィリン異性体分子 (Fig. 2.) のうち、コルフィセンを使うとどうだろうか。コルフィセンは、メソ位炭素1個がポルフィリン環の対角側に移動した分子で、メソ位の4炭素原子は (2, 1, 0, 1) の配列をとる。コルフィセンはテトラピロールが台形に並んだ「台形のポルフィリン」である。コルフィセンはFig. 3.に示すように、3つの代表的な方法で合成される。台形分子を構築するためには、その上底または下底部分を閉じるかによって2通りの経路がある。経路Aでは、ビピロール結合をもつテトラピロールを利用して、ホルミル炭素2原子をMcMurryカップリング法で結びつける^{20,21)}。経路Bでは、ジピロールエタンをもつジプロモテトラピロールを、金属銅によりUllmannカップリングにより閉環する²²⁾。経路Cでは、ジピロールエタンをもつテトラピロールを銅イオンで環化する²³⁾。これら3つの方法を比べると、私たちが開発した経路Cは脱水溶媒を使わず、嫌気条件も不要で、しかも反応時間が短く、コルフィセンの大量合成法に向いている。

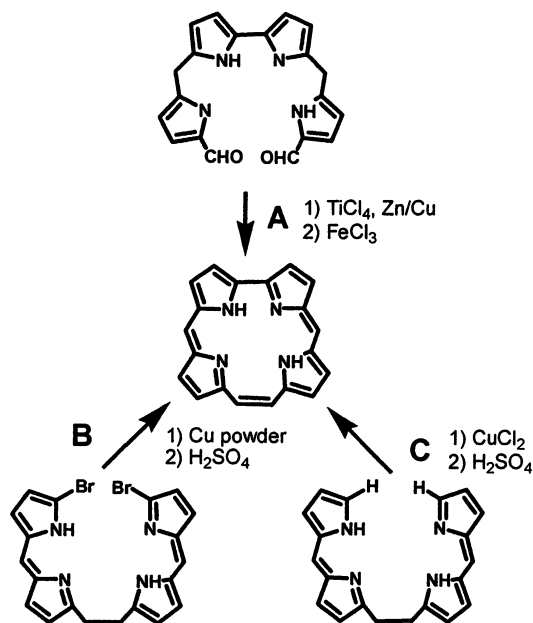


Fig. 3. Representative synthetic routes to corrphycene macrocycle.

鉄コルフィセンはミオグロビンと安定な複合体をつくった．コルフィセンをもつミオグロビンでは $P_{50} = 6.7 \text{ mmHg}$ となり，酸素親和性は天然ミオグロビンの1/10である．Fig. 2のポルフィリン異性体のうち，コルフィセンは酸素親和性低下を引き起こす唯一の分子であることが判明した²⁴⁾．この結果は，ミオグロビンの酸素親和性を遺伝子工学などの高価な方法によらず，有機化学的手段で下げられることを例証したもので，ミオグロビンを用いた廉価で実用的な酸素運搬体創製への糸口を与えるものである．

6. コルフィセンの分子構造

なぜポルフィセンだけがミオグロビンの酸素親和性を下げるのだろうか？その秘密は特異な分子形に潜んでいる．X線結晶構造解析によればポルフィセンは台形分子であり，鉄が収まる金属ホールも台形である²⁵⁻²⁷⁾．Fig. 4に示すように，鉄原子は台形の金属ホールに収まっているが中央部にはなく，台形の上底側に片寄っている．このため，上底のFe—N（ピロール）結合（ $2.048 \text{ \AA}$ ）は下底のFe—N（ピロール）結合（ $2.068 \text{ \AA}$ ）よりも短い²¹⁾．コルフィセンの平均Fe—N（ピロール）結合長（ $2.058 \text{ \AA}$ ）はポルフィリン（ $2.061 \text{ \AA}$ ）²⁸⁾とほぼ等しい．長短2種類のFe—N（ピロール）結合があることに加えてコルフィセンにはポルフィセンにはないもうひとつの特徴がある．それは鉄とピロール窒素原子がつくるN—Fe—N結合角度である．ポルフィリンでは正方形の金属ホールの中央に鉄原子があるためN—Fe—N角はすべて直角である．コルフィセンの金属ホールが台形なので，N—Fe—N角度は 75° ， 90° ， 115° ， 90° となる．この結果がコルフィセンの鉄原子の挙動に大きく影響する．鉄原子とピロール窒素との結合はシグマ結合とよばれる結合であり，四葉クローバ状に広がる鉄の $3d_{x^2-y^2}$ 電子軌道とその先にある窒素原子の非共有電子対との相互作用により生まれる（Fig. 5）．しかし，コルフィセンの台形金属ホール中の鉄原子ではこの相

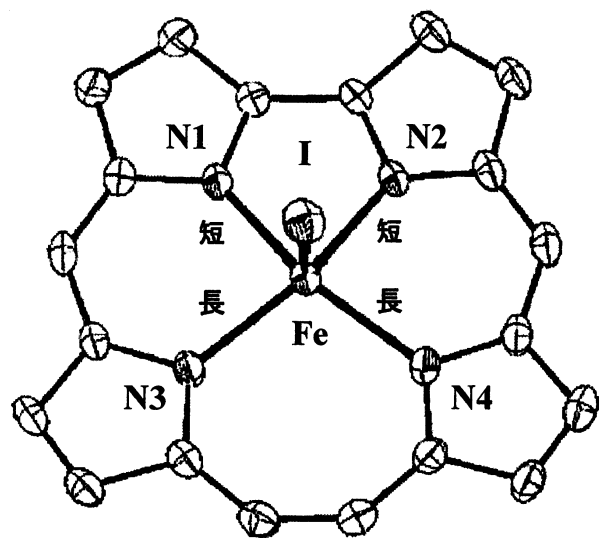


Fig. 4. X-ray crystallographic structure of the iodo complex of iron(III) corrphycene.

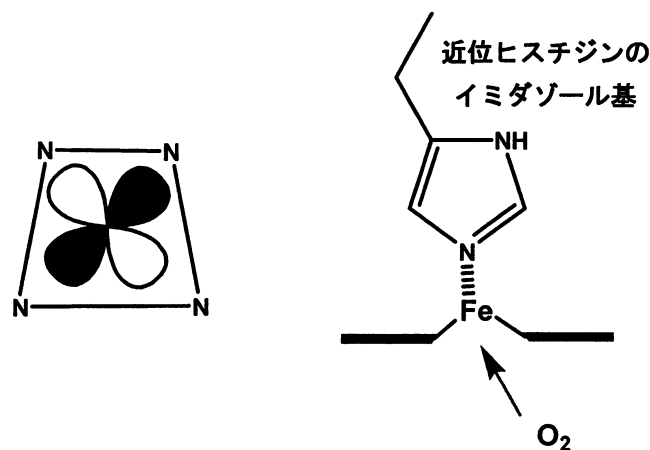


Fig. 5. Coordination interactions in the iron atom in corrphycene. The black-white lobes (left) show the $3d_{x^2-y^2}$ orbital of iron. The right panel corresponds to the side view of the corrphycene prosthetic group.

互作用がN—Fe—N結合角度が直角からずれることにより不安定化される．その結果，鉄原子は金属配位座に収まりにくくなる．ミオグロビンでは近位ヒスチジン残基のイミダゾール窒素原子がヘム鉄に配位結合する．鉄コルフィセンをミオグロビンに導入すると，鉄原子はイミダゾール環に引っ張られてコルフィセン平面から飛び出しやすくなっていると考えられる．

7. 酸化型の鉄コルフィセン・ミオグロビン複合体

鉄原子がコルフィセン平面から飛び出しやすいという上記仮説を実証するため，私たちはFe(III)原子をふくむ酸化型ミオグロビンで次の実験を行った．酸化型ミオグロビンはヘム鉄が酸化されているため酸素結合能はない．しかし，酸化型ミオグロビンを調べると，鉄原子の挙動について構造論的手がかりを得ることができる．

酸化型ミオグロビンでは酸素に代わりいくつかの陰イオンが結合する．アジ化ナトリウム NaN_3 を添加するとアジドイオン N_3^- （ $\text{N}^-=\text{N}^+=\text{N}^-$ 構造をもつ線形3原子イオン）はヘム鉄に強く結合する．一般に，鉄原子にはFe(II)やFe(III)などの酸化状態による区別に加えて，同じ酸化状態であっても電子配置の違いによる「スピン状態」とよばれる差異がある．Fig. 6.にはFe(III)の3d電子の電子配置を示す．鉄は原子番号26の元素であり，26電子は $1s^2 2s^2 3s^2 3p^6 3d^6 4s^2$ の電子配置をとる．鉄原子から3電子が抜けると第2鉄イオン（酸化鉄，Fe(III)）と表記する）になる．第2鉄イオンの電子配置は $1s^2 2s^2 3s^2 3p^6 3d^5$ である．Fig. 6.では活性に関与しない3p軌道までの電子を無視し，3d軌道にある5電子だけを示す．同じ第2鉄イオンでありながら，不対電子が5個の状態（高スピン状態）と1個の状態（低スピン状態）が生まれる．これがスピン状態による酸化鉄の区別である．鉄が高スピン状態と低スピン状態のどちらになるかは，ヘム鉄に結合する配位子によって決まり，フッ素イオン F^- や水分子が結合したミオグロビンの第2鉄は高スピン状態に，青酸イオン CN^- などが結合すると低スピン状態になる．ところ

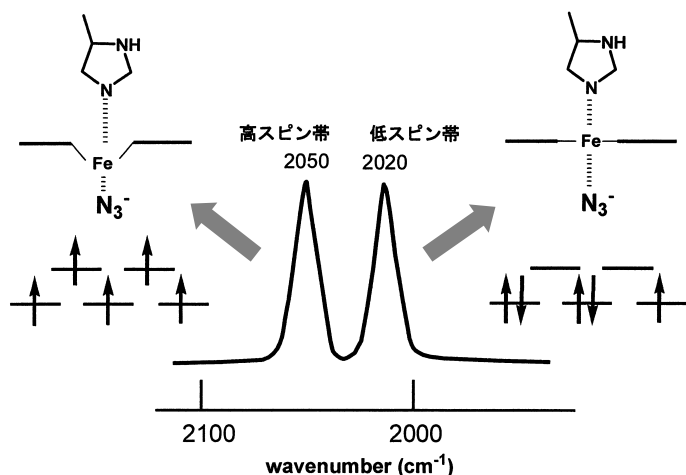


Fig. 6. Spin-state equilibrium of the Fe(III) and the infrared spectral bands of azide in myoglobin. The electron configurations of the high-spin and low-spin states are included. The infrared spectrum is only explanatory.

が、アジドイオン N_3^- では高スピン状態と低スピンの二つのスピン状態が共存する特異な状態が生まれる。この共存状態は「スピン平衡」とよばれ、ヘム鉄がポルフィリン平面内部にあるときは低スピン状態へ、鉄がポルフィリン平面から浮き上がると高スピン状態へ近づく。アジドイオンを結合させたミオグロビンの鉄原子ではこれら2状態が共存する (Fig. 6)。幾何学的には、高スピン=(鉄がポルフィリン平面から浮き出た状態)、低スピン=(鉄がポルフィリン平面内にある状態)である。このことから、スピン平衡解析によって鉄のポルフィリン環からの浮き上がりやすさを知ることができる。幸いなことに、スピン平衡は赤外線吸収スペクトルから容易に解析できる。赤外線吸収スペクトルではヘム鉄に配位したアジドイオンは1種類であるにもかかわらず、スピン平衡によって赤外吸収帯は2050 cm^{-1} (高スピン帯) と2020 cm^{-1} (低スピン帯) に分裂する。そのピーク面積から [高スピン]:[低スピン] の比率を知ることができる。天然ミオグロビンでは [高スピン]:[低スピン]=1:9あまりで、低スピン成分が圧倒的に多い。これはヘム鉄がポルフィリン平面内にあることを示している。一方、ポルフィセンをふくむミオグロビンでは、[高スピン]:[低スピン]=10:1となり、スピン平衡は高スピン側に片寄ることが判明した²⁸⁾。この結果は、鉄原子がコルフィセンの分子平面から浮き上がっているためである。生理的な還元型ミオグロビンでは鉄原子に近位ヒスチジンの窒素原子が結合している。ミオグロビンに酸素分子が結合するとき、鉄の結合は1つ増えてヒスチジン—鉄—酸素結合をもつ状態になる。このとき、鉄原子は酸素分子の方向に引き寄せられてコルフィセン平面内に落ち込む。しかし、コルフィセンの鉄はもともとヒスチジン側に引き寄せられやすく、酸素結合により平面内に落ち込みにくい。これが鉄コルフィセンをもつミオグロビンの酸素親和性低下のしくみである。

8. 分子設計したコルフィセンによる酸素親和性制御

上で述べたように鉄コルフィセンによりミオグロビンの酸素親和性は1/10に低下して $P_{50} = 6.7$ mmHgとなった²⁴⁾。しかし、生理的条件下で静脈血中のヘモグロビンの酸素親和性は $P_{50} = 30$ mmHgであり、鉄コルフィセンをもつミオグロビンの酸素運搬体としての機能はいまひとつである。そこで、私たちはミオグロビンの酸素放出能を上げるためにコルフィセンの分子設計を行った。その方針は単純であり、コルフィセン分子に電子吸引性をもつ官能基を導入することであった。このヒントとなったのは、ホルミル基-CHOを通常のパルフィリン環に導入するとミオグロビンの酸素親和性が低下するというSonoらの報告であった¹⁰⁾。コルフィセンにホルミル基を導入するのは難しいため、別の電子吸引基であるエトキシカルボニル基($-CO_2C_2H_5$)を用いた。Fig. 7.に示すように、これはカルボン酸エチルエステルに相当する官能基で、電気陰性度が大きい2個の酸素原子により強力な電子吸引効果がある。Fig. 7.のコルフィセンBでは台形底辺部にあるピロール環にエトキシカルボニル基がある。コルフィセンBをもつミオグロビンでは $P_{50} = 37$ mmHgが得られ、期待どおりに酸素親和性低下が誘起された²⁹⁾。電子吸引性の置換基が鉄の電子密度を下げてFe(II)をFe(III)に近い状態にするため酸素親和性が低下したためである。このミオグロビンが生理的条件下で結合酸素の30%あまりを放出できることを示し、補欠分子の分子設計によりミオグロビンに十分な酸素運搬性を持たせることができた。

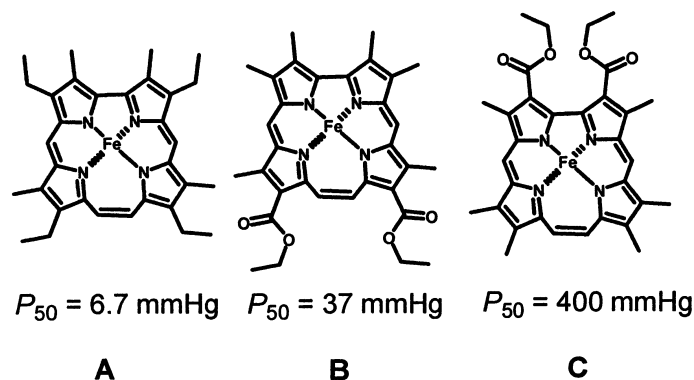


Fig. 7. Structure of the corroles used as the prosthetic group for myoglobin. The P_{50} values represent the oxygen affinities of the myoglobin containing the prosthetic group.

この結果をもとに、私たちはもうひとつのコルフィセン分子 (コルフィセンC, Fig. 7.) をつくった³⁰⁾。コルフィセンCは、コルフィセンBのテトラピロール台形下底部分にある2つのエトキシカルボニル基を台形上底部分に移した分子である。ポルフィリンではテトラピロールは正方形に配列しているので、このような官能基の移動は機能に影響しない。しかし、台形分子であるコルフィセンを補欠分子とする場合、官能基移動によりミオグロビンの性質は変わると考えられる。コルフィセンCをふくむミオグロビン酸素親和性を測定すると $P_{50} = 400$ mmHgとなり酸素親和性はさらに低下した³⁰⁾。コルフィセンCをふく

むミオグロビンの酸素親和性は天然ミオグロビンの1/430にすぎず、ヘモグロビンよりも酸素親和性が低い。生理的条件下でこのミオグロビンの酸素運搬能力を計算すると、それでも結合酸素の13%を末梢組織で放出できる。コルフィセンCが極端な酸素親和性低下をもたらす原因はなんだろうか。その鍵はやはりコルフィセン固有の分子構造にある。Fig. 4.に示すように、コルフィセン鉄原子は台形中央にはなく、台形上底部に近づいて位置する。そのため、エトキシカルボニル基の電子吸引効果はコルフィセンBよりもコルフィセンCでより強く表れる。つまり、コルフィセンCでは鉄原子の電子密度はいっそう低下するために、酸素親和性が大幅に減少する。コルフィセンBとコルフィセンCで得られる結果は重要である。コルフィセンの分子周辺につく電子吸引力置換基の数と場所を選べば、ミオグロビンの酸素親和性は自在に制御できる可能性を例証するからである。既知のミオグロビンの酸素親和性 P_{50} で、もっとも高いのはポルフィセン(0.005 mmHg)をもつ系で¹⁷⁾、もっとも低いのはコルフィセンC(400 mmHg)の場合である³⁰⁾。両者の比較から、ミオグロビンの酸素親和性は、補欠分子の骨格構造の再編成だけで8万倍も変動している。

9. まとめと展望

コルフィセンは新しい人工酸素運搬体設計のための新しい素材であることが判明した。コルフィセンは台形分子であり、そこに含まれる鉄原子の幾何学的安定性は低下して平面から浮き上がりやすい。さらに台形の金属ホール中で長短2種類のFe—N(ピロール)結合があり、分子周辺の置換基効果の影響が出やすい。これらはポルフィリンにはないコルフィセン特徴である。鉄コルフィセンを使えば、ミオグロビンの酸素親和性を低下させて十分な酸素運搬能を付与することができる。

ミオグロビンは腎臓に集積して障害をもたらすためそのままでは動物などに投与できず、臨床応用にはリポソームに封入するなどの工夫が必要であろう。また、鉄コルフィセン-ミオグロビンの酸素錯体は比較的不安定で、半減期1時間余りで自動酸化される。そのため天然ヘムにあるようなプロピオン酸基を導入して自動酸化を抑制する必要がある。さらに、コルフィセンの生体内での代謝についてはまだ未解明である。しかし、ミオグロビンを酸素貯蔵物質から酸素運搬体に変換できたことの意義は大きい。ミオグロビンは単量体であり、四量体のヘモグロビンに比べて構造的に安定であるばかりでなく、アロステリック効果やボア効果がないので有機リン酸やpHにより酸素親和性は変動しない。また、ミオグロビンは動物筋肉や心臓から大量に抽出できる。これまで遺伝子組換えによるミオグロビンのアミノ酸置換による酸素親和性制御も報告されているが³¹⁾、きわめて高価な方法である。天然ミオグロビンを利用し、有機合成で容易に得られるコルフィセンを天然ミオグロビンに組み込む方法は、ミオグロビンを酸素運搬体に利用するうえで大きな利点となる。また、鉄コルフィセン自身の酸素親和性は鉄ポルフィリンに比べて本質的に低いので、グロビンをふくまない人工酸素運搬体ができる可能性もある。コルフィセンに内在す

る酸素親和性制御因子を利用すれば新しい人工酸素運搬体創製への道は開かれるであろう。

謝 辞

本総説の発表機会をいただきました武岡真司先生(早稲田大学理工学学術院)に深謝します。川口章先生(東海大学医学部)には本内容についてご議論を賜りました。原稿に貴重なコメントをいただきました匿名の査読者に御礼申し上げます。本研究は文部科学省科学研究費(基盤研究(C)) #18590094)の支援のもとに行われました。

参考文献

1. Riess JG. Oxygen carriers(" blood substitute ")-----raison, d'être, and some physiology. *Chem Rev* 2001;101:2797-2919.
2. Kim HW, Greenburg AG. Artificial oxygen carriers as red blood substitutes: a selected review and current status. *Artif Organs* 2004;28:813-828.
3. 土田英俊, 酒井宏水, 武岡真司, 宗慶太郎, 小林紘一. 酸素輸液(人工血液). *医学のあゆみ* 2003;205:558-566.
4. 武岡真司. 分子集合科学を利用した人工血液の創製. *人工血液* 2005;13:136-147.
5. 高木智史, 大村光代, 太田勝次, 須賀裕子, 松浦昭宏. ヒト赤血球由来ヘモグロビンによるヘモグロビン小胞体の開発と酸素輸液としての医療応用. *人工血液* 2005;13:29-33.
6. Kawaguchi AT, Fukumoto D, Haida M, Ogata Y, Yamano M, Tsukada H. Liposome-encapsulated hemoglobin reduces the size of cerebral infarction in the rat: evaluation with photochemically induced thrombosis of the middle cerebral artery. *Stroke* 2007;38:1626-1632.
7. 黒澤良和. 血液代替物としての治療用ヒト抗体の開発. *人工血液* 2005;13:13-21.
8. 甲斐俊哉, 木田善規, 福富一平, 帆足洋平, 片山直久, 山本尚志, 大川裕紀, 弘津一郎, 佐藤誠. 完全人工型酸素運搬体の開発. *人工血液* 2005;13:34-41.
9. 小松晃之, 黄宇彬, 王荣民, 中川晶人, 山本尚志, 堀之内宏久, 小林紘一, 土田英俊. ポリ(エチレングリコール)修飾アルブミン-ヘム: 酸素輸送血漿増量剤としての溶液物性と機能. *人工血液* 2006;14:47-54.
10. Sono M, Smith PD, McCarty JA, Asakura T. Kinetic and equilibrium studies of the reactions of heme-substituted horse heart myoglobin with oxygen and carbon monoxide. *J Biol Chem* 1976;251:1418-1426.
11. Neya S, Kaku T, Funasaki N, Shiro Y, Iizuka T, Imai K, Hori H. Novel ligand binding properties of the myoglobin substituted with monoazaporphyrin. *J Biol. Chem* 1995;270:13118-13123.
12. Vogel E, Kocher M, Schmickler H, Lex J. Porphycene-a novel porphyrin isomer. *Angew Chem Int Ed Engl* 1986;25:257-259.

13. Vogel E. Porphyrinoid macrocycles: a cornucopia of novel chromophores. *Pure Appl Chem* 1996;68:1353-1360.
14. 根矢三郎, 舟崎紀昭. ミオグロビン内部のヘムのダイナミクス. *蛋白質核酸酵素* 1995;40:1115-1121.
15. 根矢三郎, 舟崎紀昭. アルキルヘム置換ミオグロビンの調製法. *生物物理* 1995;35:83-84.
16. Neya S, Imai K, Hori H, Ishikawa H, Ishimori K, Okuno D, Nagatomo S, Hoshino T, Hata M, Funasaki N. Iron hemiporphycene as a functional prosthetic group for myoglobin. *Inorg Chem* 2003;42:1456-1461.
17. Hayashi T, Dejima H, Matsuo T, Sato H, Murata D, Hisaeda Y. Blue myoglobin reconstituted with an iron porphycene shows extremely high oxygen affinity. *J Am Chem Soc* 2002;124:11226-11227.
18. Neya S, Funasaki N, Sato T, Igarashi N, Tanaka N. Structural analysis of the myoglobin reconstituted with iron porphine. *J Biol Chem* 1993;268:8935-8942.
19. Neya S, Funasaki N, Igarashi N, Ikezaki A, Sato T, Imai K, Tanaka N. Structure and function of 6,7-dicarboxyheme-substituted myoglobin. *Biochemistry* 1998;37:5487-5493.
20. Sessler JL, Brucker EA, Weghorn SJ, Kisters M, Schafer M, Lex J, Vogel E. Corrphycene: a new porphyrin isomer. *Angew Chem Int Ed Engl* 1994;33:2308-2312.
21. Aukauloo MA, Guilard R. The "etioporphycerin": synthesis and characterization of a new porphyrin isomer. *New J Chem* 1994;18:1205-1207.
22. Falk H, Chen QQ. On the chemistry of pyrrole pigments, XCVI. An efficient synthesis of corrphycenes. *Monatsh Chem* 1996;127:69-75.
23. Neya S, Nishinaga K, Ohyama K, Funasaki N. Synthesis of functionalized corrphycene by copper(II)-mediated cyclization. *Tetrahedron Lett* 1998;39:5217-5220.
24. Neya S, Nakamura M, Imai K, Funasaki N. Functional analysis of the iron(II)-corrphycene incorporated in the myoglobin heme pocket. *Chem Pharm Bull* 2001;49:345-346.
25. Ohgo Y, Neya S, Ikeue T, Takahashi M, Takeda M, Funasaki N, Nakamura M. Molecular structure of five-coordinated halide ligated iron(III)-porphyrin, porphycene, and corrphycene complexes. *Inorg Chem* 2002;41:4627-4629.
26. Ohgo Y, Neya S, Funasaki N, Nakamura M. (12,17-Diethoxycarbonyl-2,3,6,7,11,18-hexamethylcorrphycenato- $\kappa^4\text{N}$)-iodoiron(III)-chloroform solvate. *Acta Cryst* 2001;C57:694-695.
27. Sessler JS, Gebauer A, Vogel E. Porphyrin isomers. In: Kadish KM, Smith KM, Guilard R, eds. *The Porphyrin Handbook*. New York: Academic Press, 2000;2:1-54.
28. Neya S, Tsubaki M, Hori H, Yonetani T, Funasaki N. Unusual spin state equilibrium of azide metmyoglobin induced by ferric corrphycene. *Inorg Chem* 2001;40:1220-1225.
29. Neya S, Funasaki N, Hori H, Imai K, Nagatomo S, Iwase T, Yonetani T. Functional regulation of myoglobin by iron corrphycene. *Chem Lett* 1999;28:989-990.
30. Neya S, Imai K, Hiramatsu H, Kitagawa T, Hoshino T, Hata M, Funasaki N. Significance of molecular shape of iron corrphycene in a protein pocket. *Inorg Chem* 2006;45:4238-4242.
31. Springer BA, Sliger SG, Olson JS, Phillips Jr GN. Mechanism of ligand recognition in myoglobin. *Chem Rev* 1994;94:699-714.

人工血液のオーバービューと出血性ショックへの人工血液 経骨輸血による救命対策

Overview of Blood Substitutes and Resuscitation of Hemorrhagic Shock by an Intraosseous Transfusion with Liposome-encapsulated Hemoglobin Solution

木下 学⁽¹⁾, 庄野 聡^(1,2), 野上弥志郎⁽³⁾, 高瀬凡平⁽⁴⁾

Manabu Kinoshita⁽¹⁾, Satoshi Shono^(1,2), Yashiro Nogami⁽³⁾, Bonpei Takase⁽⁴⁾

和文抄録

大規模震災に対する備えは、最近、政府が提唱している‘国民の安心、安全’の観点からも、重要な課題である。このような大規模災害時には、多発外傷による出血性ショック患者が同時にしかも大量発生し、輸血用血液が極端に不足することが懸念される。人工赤血球はこれに対する根本的な解決策として、極めて魅力的な存在である。著者らは、プレホスピタルである災害現場にて出血性ショックの患者を如何に救命するかを念頭に、リポソーム内包型ヘモグロビン (liposomal hemoglobin: LHb) を経骨輸血することで重篤な出血性ショックに陥ったマウスの救命を検討した。その結果、LHbの経骨輸血では保存血のそれよりも高い救命率が得られ、出血性ショック患者のプレホスピタルでの救命に高い有用性が示唆された。人工赤血球の投与で、保存血輸血を凌駕する出血性ショックへの高い救命効果が示唆されたことは極めて意義深いものと考える。本稿では人工血液のオーバービューとともにLHbを用いた経骨輸血の有用性について述べる。

Abstract

In mass casualty environments resulting from massive disaster, numerous victims with multiple trauma and/or massive hemorrhage might occur simultaneously. Because serious shortage of blood for transfusion certainly might happen in such critical situations, efficient blood substitutes are needed and should be prepared. When we rescue the victims with hemorrhagic shock by fluid resuscitation, the peripheral vessels of their limbs usually collapse, resulting from massive blood loss. It is thereby very difficult to put catheter into these vessels. Alternative transfusion pathways, which do not collapse even in hemorrhagic shock, are needed to effective resuscitation. Therefore, we investigated the efficacy of transfusion with novel blood substitute, liposome-encapsulated hemoglobin: LHb, via intraosseous infusion pathway in severe hemorrhagic shock mice. As results, intraosseous resuscitation with LHb might be efficient in the resuscitation of host with hemorrhagic shock. Unexpectedly, the intraosseous resuscitation with washed RBC did not increase mouse survival. It is noteworthy that the transfusion with LHb that is a blood substitute practically might be more effective in the resuscitation of hemorrhagic shock than the conventional blood transfusion.

Keywords

blood substitute, hemoglobin-based oxygen carrier, intraosseous transfusion, liver immunity, host defense, Kupffer cells, phagocytosis

(1) 防衛医科大学校 免疫微生物学講座 〒359-8513 埼玉県所沢市並木3-2 Department of Immunology and Microbiology, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa-shi, Saitama 359-8513, Japan

(2) 防衛医科大学校 防衛医学講座 Department of Defense Medicine, National Defense Medical College

(3) 防衛医科大学校 外科学講座 Department of Surgery, National Defense Medical College

(4) 防衛医学研究センター 医療工学研究部門 Division of Biomedical Engineering, National Defense Medical College Research Institute

論文受付 2008年3月3日 論文受理 2008年6月2日

はじめに

医学に関する最近の進歩では、ここ数年の外科領域における鏡視下手術の進歩は目を見張るものがある。しかし、これは医学研究上の重要な発見などによる純粋な医学の進歩ではなく、工学系の進歩に寄与するところが大きい。むしろ、我々は優れたマシーンを如何に操縦するかに腐心しているかの如き印象さえ受ける。もっとも、このマシーンの特性を最大限に引き出すのは、やはり外科医であり、これが患者にとっては一番重要であることに変わりはないと思われるが、本稿のテーマである人工赤血球に関しても同様のことが言えるのではないだろうか。酸素運搬能にすぐれ、しかも生体内での異物反応が極限にまで抑えられている理想的な人工赤血球を造るためには、最先端のナノテクノロジーの進歩に依るところが極めて大きいと思われるが、その特性を十分に活かして患者を救命するには、やはり医師をはじめとする医療従事者の果たす役割が重要であると考ええる。当初、著者らはヘモグロビンをリン脂質の膜により、ナノレベルの粒子として内包する技術に驚きを禁じ得なかったが、その一方でこれら粒子の大量投与が生体に様々な反応を引き起こすであろうことを危惧したのも事実である。人工赤血球を用いて出血性ショックの患者を如何に救命すべきか、またその特性を活かす術はあるのか、著者らの最近の知見も含め概説したいと思う。

人工赤血球の必要性（国民の安全、安心の観点から）

最近、東海沖地震などの大規模震災に対する備えの必要性が論じられる機会が急速に増しつつある。今やこれらの大規模震災は発生の有無を問うのではなく、その発生時期が問われる傾向にある（“ifでなくwhen”）。さらには、事態の発生予測状況が一般的に考えられているよりもかなり深刻であろうことは危機管理を担当する諸機関では認識が一致するところである。我々が海外での紛争や災害状況などから知り得る情報を鑑みると、そこには幾つかの重大な懸念すべき事態を見出すことが出来る。このうち、我々が関係する諸問題としては、まず大量の重度外傷患者を如何に被災地域から救出搬送するかという点が挙げられ、これに関しては現在様々な協議がなされている。もう1つは、外傷患者への処置治療薬の不足という点が挙げられるが、中でも大量出血患者に対する輸血用血液の不足は想像をはるかに越えるものがある。輸血用血液の保存期間が比較的短いことや、血液型不適合の問題は事態をさらに困難なものにすると考えられる。現在の輸血用血液の準備供給体制では、突発的な大規模災害への対処は不可能であり、従来とは異なった新たな対策手段を講じる必要があることは明白である。このような状況に対する抜本的な解決策としては、人工的に赤血球に替わる酸素運搬体を開発する以外におそらく道はないだろうと著者らは考える。

救命医療の進歩と武力紛争

人類が戦争という殺戮を経験する度に人を救う医学が進歩して来たのは、誠に残念かつ不本意ながら皮肉にも真実である。

とくに救命救急医療に関してはそれが如実に現れている。なぜなら、戦時における重症戦傷病患者の救命治療にはその時代の最先端の医学知識と医療技術が、国家の命運を懸けて惜しみなく投入されるからである。過去2回の世界大戦や朝鮮戦争、ベトナム戦争の歴史がこれを証明しており、イラク戦争もまたその例に漏れないようである。しかし、今日のように救命救急医療が進歩した現在においても、大量出血を伴う重症の多発外傷は戦場における最も致死率の高い疾患病態の1つであることに変わりはない。このため米軍をはじめとする世界各国の軍隊やその医療機関が輸血に代わり得る代替物の研究開発に凌ぎを削っている。イラク戦争においては重症戦傷病患者の救急搬送およびその際の集中治療が劇的に変わりつつあるかの印象が垣間見れるが、そこに血液代替物のようなものがどのように介在するか、またしないのかは残念ながら全く漏れ聞こえてこない。いずれにせよ、著者らも、早稲田大学の土田英俊名誉教授が提言されるように、この種の血液代替物の研究開発が国家単位での極めて重要な喫緊の課題であるとの認識を共有している。

ヘモグロビンのNO消去作用と血管収縮

ヘモグロビンは2本の α 鎖（ $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ）と2本の β 鎖（ $\beta 1$ 、 $\beta 2$ ）からなる4量体の分子として存在する。そのまま血中に投与しても α 鎖と β 鎖の間が解離し、ハプトグロビンに結合後速やかに尿排泄されるため、半減期は2～4時間にも満たない。 α - α 鎖の間に架橋を施すことで半減期を延長させようとした分子内架橋型ヘモグロビンは、HemAssistとしてBaxter社が開発提供し、出血性ショック症例に対する第3相臨床試験まで進んだ¹⁾。しかし、第3相臨床試験の結果では生存率が対照の生理食塩水投与群より逆に低いという予想外の結果となった¹⁾。また、このような臨床試験の結果が出る以前から分子内架橋型ヘモグロビンの投与により、肺高血圧や血管収縮が認められることも指摘されていた^{2,3)}。

1998年、Furchgott R, Ignarro L, Murad Fらがノーベル賞を受賞したことで一躍世間に認知されるに至った一酸化窒素（NO）は、既に1920年代よりヘモグロビンと結合することが知られていた⁴⁾。NOは全身諸臓器の血管を弛緩させ血流を保たせるという生体にとって極めて重要な働きを担っているが、赤血球膜で内包されていない裸のヘモグロビンは、NOと結合しこれを消去（scavenge）することでNO自身が持つこの重要な働きを奪い去る致命的とも言える作用を持っていることが次第に明らかとなってきた。では生体はどのようにしてヘモグロビンに、必要とされる酸素運搬能を維持させつつ、NO消去作用を封じ込めたのであろうか？これを解決するために、生体はヘモグロビンをリン脂質の2重膜で包み込み、赤血球内に含有させるという手法を進化の過程で獲得したのではないだろうか。酸素を安全に運搬するために生体はヘモグロビンを利用し、さらにNOの生理作用を損なうことが無いように赤血球としてリン脂質の膜でこれを内包したと想像される。おそらく、このヘモグロビンとこれを内包する膜の存在は生命を維持するための酸素運搬に必須であり、この両者を持ち得なかった生命体は地球

上で酸素濃度が高くなるに連れ、進化の早い段階で淘汰されていったのではないだろうか。川崎医科大学の高折名誉教授が以前に本誌で述べられているように⁵⁾、著者らもこのような理由からヘモグロビンを内包する細胞型の人工赤血球が最も酸素運搬体として理想的ではないかと考えている。

重合ヘモグロビン

分子内架橋型ヘモグロビンの試みが挫折した原因の1つとして、そのヘモグロビン分子の大きさがほとんど遊離型の天然ヘモグロビンと変わらず極めて小さかったため、NO消去作用を誘導してしまったことが考えられた。そこでヘモグロビン分子を巨大化させるために分子間を架橋することでヘモグロビンを重合する試みがなされた。これが重合ヘモグロビンであり、現在、臨床治験を含め欧米などで盛んにその有効性に関する研究がなされている。重合ヘモグロビンにはウシのヘモグロビンを重合したものとヒトのヘモグロビンを重合したものとがある。ちなみに分子内架橋型ヘモグロビンのHemAssistはヒトヘモグロビンを使用していた。ウシ由来の重合ヘモグロビンとしては、Biopure社のHemopureに関して、心臓や肝臓領域の手術において幾つかの臨床検討がなされている^{6,7,8,9)}。さらに注目すべきは南アフリカ共和国において急性出血に対するHemopureの臨床使用が許可されたことである¹⁰⁾。その後の臨床使用についての報告では、極端な血圧上昇などの重篤な副作用に関する記載は見当たらないが、その16-24時間と言われる半減期に関するのか、Hemopureの投与後に極端な貧血が認められていることは注意すべき所見であろう¹¹⁾。

Hemopureに関して、著者らがとくに注目するのは大量に入手可能なウシのヘモグロビンを使用している点である。冒頭にも述べたように大規模震災等を念頭にした備蓄を考えた場合、膨大な量の人工赤血球が必要となってくる。ヒトに代わってウシのヘモグロビンが利用出来るのであれば、材料となるヘモグロビンの供給不足を払拭することが出来、その有用性は測り知れない程大きいと思われる。一方、ヒト由来の重合ヘモグロビンとしてはNorthfield社のPolyHemeがあり、幾つかの臨床報告が既になされている^{3,12,13)}。また現在、第3相臨床試験が行われており、その結果報告が待たれる¹⁴⁾。この両者はヘモグロビンがウシ由来かヒト由来かという大きな相違があるものの、構造的にはいずれもヘモグロビンを重合させたものであることに変わりはない。これら重合ヘモグロビンでは、ヘモグロビンとNOの結合が本当に阻害されているのであろうか？その豊富な臨床投与例の経験からも安全性、有効性に疑問を持つものではないが、ウシ由来の重合ヘモグロビンであるHemopureに関しては、体血管抵抗の上昇を認めたとの報告が幾つかあり^{9,15)}、これらはNO消去作用が完全には阻害されていない可能性を示唆させる。またヒトのヘモグロビンがウシのヘモグロビンより格段にNO消去作用が弱いとも考えにくいことから、ヒト由来の重合ヘモグロビンにおいても、NO消去作用が少なからず誘導される可能性も否定出来ないのではないだろうか？NOに関する今後のデータ集積が待たれる。

PEG化ヘモグロビン

NOの生体における重要性が認識されるに連れ、人工赤血球により引き起こされるNO消去作用の減弱化が、一層注目されるに至った。これに対しヘモグロビンを重合して分子量の巨大化を図るのではなく、ヘモグロビン分子をポリエチレングリコール(PEG)鎖で修飾することで、見かけ上のサイズを大きくする試みがなされている。このPEG化ヘモグロビンでは、半減期が10数時間にまで延長し、かつ基礎実験ではNO消去作用により誘導される血管収縮があまりないとの報告がある^{12,16)}。確かにPEG鎖を付けたことによって、血管壁への浸透がある程度阻害されることは予想される。しかし、ガス状物質でもある極小さな分子のNOがヘモグロビン表面にPEG鎖があるからといって、一体どの程度ヘモグロビンとの結合が妨げられるかは想像し難い。HemospanとしてSangart社が開発提供したPEG化ヘモグロビンに関して、最近第2相臨床試験の結果が報告されたが、これによると人体への重篤な副作用は認められないものの体血管抵抗の上昇作用は完全にはなくなっていないとの印象を受ける¹⁷⁾。しかしながら、PEG鎖を付けることで血中滞留時間が延長する現象は注目に値する。著者らはこのPEG鎖の改良から得られた知見が、本邦で研究開発されている細胞型ヘモグロビンにも応用されることを期待して止まない。

リポソーム内包型ヘモグロビン

欧米では、いわば裸のヘモグロビンを修飾することで何とか酸素運搬体として使おうとする試みが主流であり、前述のように既に幾つかの臨床治験もなされている。一方、本邦では、リン脂質の膜でヘモグロビンを内包した、いわば細胞型の酸素運搬体が臨床使用を目指し主に研究されている。現時点では早稲田大学理工学部と慶応大学医学部により開発されOxygenix社が製造しているHemoglobin-Vesicles(HbV)と、テルモ社が開発製造しているLiposomal hemoglobin(LHb)とがある。この両者には、酸化したメトヘモグロビンに対する還元酵素が温存されているか否かなど若干の相違はあるものの、基本構造はいずれもリン脂質の2重膜でヘモグロビンを内包したもので、大きさも約200 nmとほとんど同じであり、還元酵素が関与するヘモグロビンの酸化に関する点も含め、機能的にもあまり顕著な差はないと考えられる。もっとも、本総説では両者の差を論じるのではなく、むしろ共通点を強調して、これら酸素運搬体の臨床での有用な使用を論じることを主眼とし、機能的相違に関しては他の優れた研究論文、総説にこれを譲りたいと思う。

赤血球は中心部がやや凹んだ円盤状で、大きさは約 $8.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ とやや大きいですが、変形能に富み、細い毛細血管を素早く通過することが可能である。一方、リポソーム内包型ヘモグロビンは、いずれも本来の赤血球とは異なり変形能を持たない球形を呈しているが、直径が約200nmと小さいため毛細血管も通過可能とされている⁵⁾。末梢組織への酸素運搬能も著者らの検討も含め、生命を維持するには十分であると考えられる。NO消去作用であるが、著者らの血液交換実験では、ほとんど NO_3^- や NO_x の値は低下していなかった(論文査読中)。これは非常

に注目すべき所見であるが、残念ながら他の重合ヘモグロビンやPEG化ヘモグロビンの入手が困難なために、これらとの比較が出来ていない。翻って考えると、これは体血管抵抗上昇作用が少ないと主張されることが多いPEG化ヘモグロビンの比較対照試験が専ら重合ヘモグロビンや分子内架橋型ヘモグロビンに終始していることを指し示すものでもある¹⁸⁾。人工赤血球開発の総合的な発展を考えるとNO消去作用に関して、リポソーム内包型ヘモグロビンと重合ヘモグロビン、PEG化ヘモグロビンの3製剤の比較は極めて重要であると考え、さらに著者らの最近の研究では、 NO_3^- や NO_x の値のみならず、液体クロマトグラフィーを用いた精密な測定手法により、LHb投与後の NO_2^- 値の変動をみている。その結果、極端な低ヘモグロビン性ショックのマウスに対するLHb投与では、洗浄赤血球やアルブミンの投与とほとんど同じ血中 NO_2^- 値の推移を示し、NO消去作用が全く認められなかった(論文作成中)。PEG化ヘモグロビンを研究しているグループは、PEG化がヘモグロビンのもたらすNO消去作用や体血管抵抗上昇作用の抑制に重要であるとの主張をしばしば掲げるが、本来の赤血球にはこのようなPEG鎖はないにもかかわらず、ヘモグロビンのNO消去作用はほとんど認められない。著者らはやはり、ヘモグロビンを膜様構造で内包している構造自体が、NO消去作用の抑制に決定的に重要ではないかと推察している。

肝臓での異物貪食の重要性

生体は侵入する異物を複雑巧妙な免疫監視機構で抗原認識し、これを除外する機能を兼ね備えている。生体に投与されたリポソーム内包型ヘモグロビンも確実にこの免疫監視機構により認識され、貪食細胞に処理される。ここで重要なのは、従来より免疫学的研究の中心であった脾臓における貪食能の評価ではなく、肝臓における貪食能の評価であると考え¹⁹⁾。脾摘をした生体でも、肺炎球菌など一部の細菌種を除き、感染抵抗性が減弱しないことは、臨床的にもよく知られている。リステリアなどの細胞内寄生細菌では脾摘により生体の感染抵抗性が逆に増すこともある²⁰⁾。著者らはかつて、脾摘マウスの大腸菌感染では肝臓での細胞性免疫が亢進することで、生体は菌への抵抗性を代償することを明らかにしている²¹⁾。すなわち、脾臓は細菌異物に対する貪食処理などの生体防御にはあまり直接的に関与せず、むしろ免疫記憶が主役となる獲得免疫に関する生体防御に深く関与しているように思われる。このように細菌異物の排除には肝臓が決定的に重要であり、中でもクッパー細胞が直接の貪食に深く関与している^{19, 22)}。著者らはLHbによる血液交換実験で脾臓に大量のLHb貪食細胞を認めたが、むしろ肝臓のクッパー細胞が大量のLHbを貪食し増殖している現象に注目した(Fig. 1)。早稲田大学の酒井氏らも同様の報告をしているが²³⁾、これ程のクッパー細胞の顕著な増殖を認める疾患病態は他にあまりなく、かなりの予備能力を有する肝臓の貪食能がほぼ最大限に働いている可能性が危惧された。

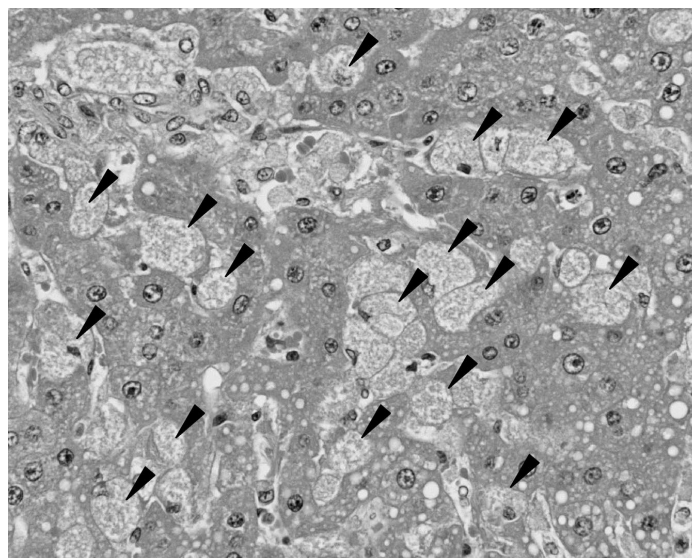


Fig. 1. Pathological findings of the liver in the LHB-transfused rats 48 hours after transfusion. Increased Kupffer cells are indicated by arrows.

侵襲後の免疫不全病態

最近の免疫学の著しい進歩に伴い、重度の侵襲が生体に加わると、著しい免疫不全病態が惹起されることが次第に明らかになってきた¹⁹⁾。著者らは、最も重篤な侵襲の1つである熱傷をマウスに作製すると、細胞性免疫や液性免疫が著しく障害される、いわゆる複合免疫不全の病態となり、これが熱傷後の感染を増悪しているとの報告をしてきた^{24, 25, 26)}。このような免疫機能の不全病態はとくに肝臓において顕著であり、これが生体全体の感染抵抗性の減弱化をもたらしていた。最近の研究では、熱傷後にはクッパー細胞の貪食能が減弱するとの知見も見出している(Fig. 2)。さらに興味深いことに、出血性ショックを作製したマウスを用いた極最近の研究でも、ほぼ同様な重篤な免疫不全病態が惹起されることを認めている。つまり、これは出血性ショック時の人工赤血球を大量に用いた蘇生では、クッパー細胞の著しい貪食機能不全を併発している可能性があることを示唆している。人工赤血球の半減期など生体内でのクリアランスに関する研究は、ほとんどが免疫機能が正常な状態での検討である。しかし、著者らが臨床応用を想定しているのは重篤な出血性ショック時の救命対策としてであり、このような病態下では人工赤血球の半減期もクッパー細胞の貪食機能不全により延長している可能性があるかと推察される。このことは、人工赤血球が貪食処理されずに血中にある程度長期に滞留することとなり、結果として、血中でのリポソームからのヘモグロビンの遊離といった新たな問題をも引き起こす可能性を懸念させるものでもある。いずれにせよ、人工赤血球による出血性ショック患者の救命は、生体にとって大量の異物を体内に投与するといった側面を持たざるを得ない。急速な進歩を遂げている侵襲免疫学を駆使した病態の解析とそれに基づいた免疫制御対策を、今後検討する必要があるのではないだろうか。

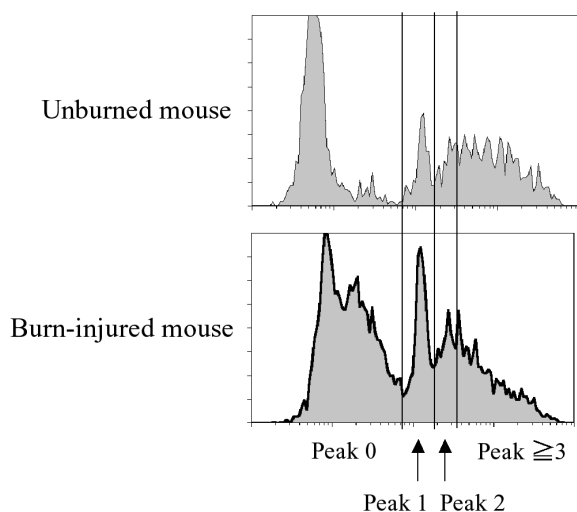


Fig. 2. Phagocytosis activity of Kupffer cells in the mice with and without burn injury. FITC-labeled microspheres were intravenously injected to the mice 3 days after burn or sham injury. After isolation of Kupffer cells, their phagocytosis activities were evaluated using FACS. The peaks of histogram correspond to Kupffer cells that contain no ingested microspheres (peak 0) and one (peak 1) two (peak 2) and more (peak 3) from left to right, respectively. Burned mouse showed increased peaks 0 and 1 but a decreased peak 3 compared to the unburned mouse.

出血性ショック患者への経骨輸液による蘇生

著者らは、あくまで人工赤血球を大規模災害時のプレホスピタルでの出血性ショック患者に対する救命蘇生処置に使用することを念頭に置いており、患者が後送された病院などの高次医療機関では、出来るだけ従来の輸血治療が現時点では望ましいと考えている。災害現場の混乱する最前線では、血液型に関係なく投与出来、クロスマッチが不要な人工赤血球は、その特長を十二分に発揮出来ると期待される。しかし、プレホスピタルの現場で、多発外傷により出血性ショックに陥った患者に対して、輸血用の末梢血管の確保は実際に可能であろうか？出血性ショック患者の末梢血管はおそらくは完全に虚脱しており、従って末梢での血管確保はほぼ間違いなく不可能である。いくら有用な人工赤血球をプレホスピタルのレベルで用意していても、投与ルートを確認出来ないのならば、全く意味がなくなってしまう。著者らは設備の整った手術室ではなく、専らプレホスピタルでの救命手段としての使用を目指していただに、このショック患者への投与ルートの確保、しかも救命士が施行可能で、かつ確実性の高い手段の開発という高いハードルを克服しなければ、実践的な運用への道は開けないと考えていた。一方、著者らの別の研究グループでは、プレホスピタルにおけるショック症例の輸液ルートの確保と蘇生を研究しており、彼らは大腿骨からの輸液経路を利用した救命蘇生を、家兎などの中動物を用いて盛んに研究していた。経骨輸液自体はプラスチック製のカテーテルが普及する以前に輸液製剤の持続的な投与ルートとして研究開発されていたが²⁷⁾、その後のプラスチック製留置針の発達に伴い、一見忘れ去られた存在となっていた。現

在では、血管確保がやはり困難な小児における輸液ルートとして、とくに緊急時に施行されるに留まっているようである²⁸⁾。しかし、米国などにおける広範な地域をカバーしなければならない救急医療の現場では、患者搬送に長い時間を要することもあり、経骨輸液 (intra-osseous transfusion) にも少なからず関心が払われ²⁷⁾、米軍でも戦場で兵士に対する緊急の救命蘇生処置の1つとして考えられているようである。

経骨輸液の投与経路

ヒトへの経骨輸液経路として成人では経胸骨が最も一般的である²⁷⁾。これは大腿骨などの四肢に比べより速やかに大循環系への移行が可能となるためではないかと著者らは考えているが、他にも大腿骨などを経路とした場合の脂肪塞栓の危険性も挙げられる。しかし臨床的に経骨輸液の必要性が高い小児の場合では、胸骨の発達が未熟で経骨輸液経路としては適さず、経大腿骨からの経路が専ら推奨されている。成人においても脛骨 (tibia) や大腿骨は経骨輸液経路の1つとして考えられており、実際に経骨輸液用の穿刺キットも存在する。今回はマウスを用いた実験モデルのため、小動物では大腿骨が最も経骨穿刺に適していたが、実験動物を大型化して行く途上では他の経骨経路も検討する余地が十分にあると思われる。

リボソーム内包型ヘモグロビンの経骨輸血

そこで著者らは、マウスを用いて大量出血によるショック状態を作製し、まずこれをアルブミンの経骨輸液により救命出来るかを研究した。8週齢20gのマウスから約0.7ccの血液を急速に脱血するとショック状態となり、尾静脈をはじめとする末梢静脈からの蘇生輸液の投与はまず不可能となる。この状態で膝窩部から大腿骨の長軸方向に23Gの注射針を刺入し (Fig. 3.)、

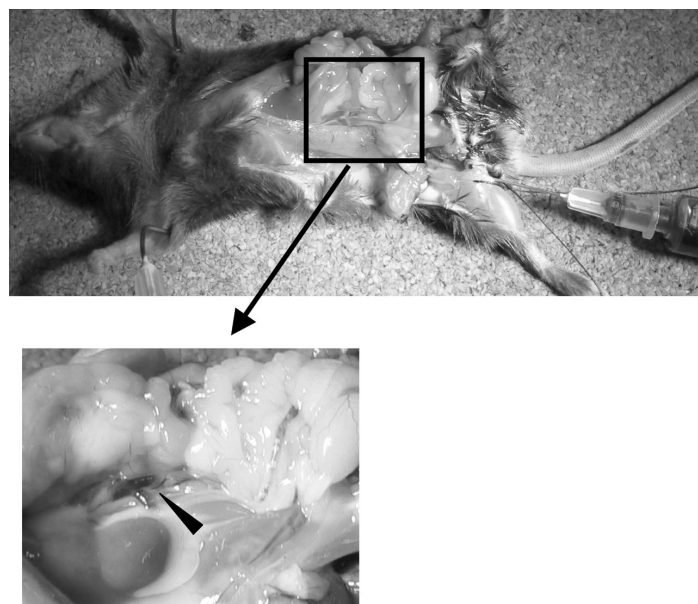


Fig. 3. Intraosseous injection to the mouse femur. ICG was injected to the mouse intraosseously. ICG was immediately observed in the inferior vena cava as indicated by arrow.

ここよりアルブミンを投与することで全例、救命蘇生することに成功した。経骨経路であってもアルブミン投与により100%救命蘇生が出来ることから、例えば大量の循環血液を喪失しショックに陥ったとしても、失った循環容量を補完さえすれば赤血球成分を補わなくても救命出来ることが示唆された。このことは、大規模災害時の大量出血によるショック患者の救命においても、止血が制御可能な症例に限った場合、大部分の症例で人工血液や保存血の輸血なしに初期の救命が可能で、しかも出血性ショックに陥り末梢血管が虚脱した症例においても経骨経路からの迅速かつ適切な輸液で救命が可能であることを推察させる。しかしながら、実際には多発外傷に伴う大量出血では完全な止血制御がプレホスピタルで成功し得ることは稀で、大部分は不完全な止血制御にならざるを得ないと予想される。そこで、脱血によりショックに陥ったマウスにおいて、一旦アルブミン輸液により救命蘇生させた後、さらに脱血を行なうことで再度出血性ショックの病態を作製し、これを如何に救命するかを検討した。その結果、僅か0.3ccでも再度脱血を行なうと、今度は幾らアルブミンを経骨輸液してもヘモグロビン濃度が極端に低下してしまうことから過半数以上を救命することが出来なかった (Fig. 4.)。そこでヘモグロビン濃度の上昇を期待して、リボソーム内包型ヘモグロビンであるLHbを経骨ルートから投与した。その結果、LHbの投与により顕著な救命蘇生効果が得られた (Fig. 4.)。このように人工血液を血管内投与だけでなく経骨投与しても致死的な低ヘモグロビン血症が救命されたことは注目に値する。著者らは、LHbが本来の赤血球に対し、どのぐらいの救命蘇生効果があるのかを検討するため、保存血を経骨輸血し救命効果を確認した。ところが、我々の予想に反し、期待していたようなヘモグロビン濃度の上昇や救命効果は、保存血による経骨輸血では認められなかった。著者らは同じ保存血を経静脈輸血した場合、速やかなヘモグロビン濃度の上昇と共に顕著な救命効果が得られることを確認している。すなわち、経骨投与ではLHbが輸液製剤と同様、速やかに骨内から循環血中へと流入し得るのに対し、保存血では骨内から循環血中

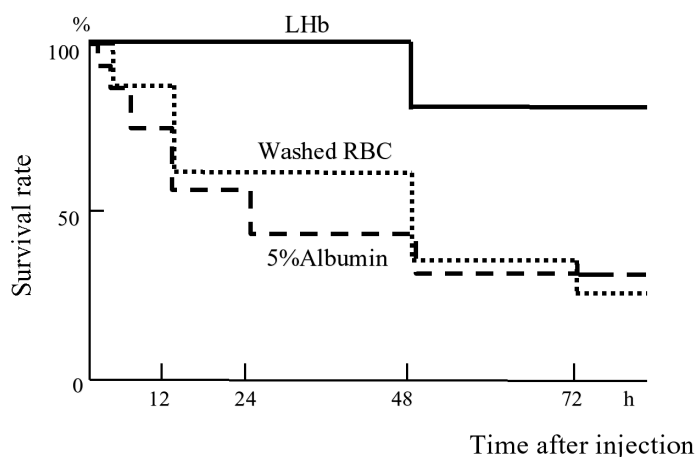


Fig. 4. The effect of intraosseous transfusion with LHb or washed RBC on the survival in the hemorrhagic shock mice.

ヘスムーズに流入しなかったことが考えられた。赤血球はあくまでもその大きな粒子サイズを流速の速い流中で変形させることにより、細い毛細血管を効率よく通過することが出来るよう精密に設計されたデザインになっているのではないだろうか。赤血球が造血組織である骨髄から循環血中へ流入するルートは存在するものの、骨内から急速に循環血中へと移動するには赤血球は元々デザインされておらず、その大きさが障害となっていることが推測される。LHbは粒子径が赤血球に比べ非常に小さく、形も球形を呈しているため、赤血球に比べ比較的容易に急速な骨内から循環血中への流入が可能となったのではないだろうか。

NO消去を伴わないリボソーム内包型ヘモグロビンの経骨輸血

最後にヘモグロビンを利用した人工酸素運搬体の開発に際し、最も重要で克服すべき課題であると考えられるNO消去作用について、著者らの最新の知見を紹介する。前述のようにヘモグロビンをリン脂質の2重膜で内包したりリボソーム内包型ヘモグロビンでは、膜で包まれていない、いわば裸の重合ヘモグロビンなどに比べてヘモグロビンが周囲のNOと接触する機会が圧倒的に減ることは容易に想像出来る。NOと接しない限りヘモグロビンはこれを消去出来ず、これがリボソーム内包型ヘモグロビンでNO消去作用をあまり認めない最大の要因であろうと著者らは考えている。実際に液体クロマトグラフィーを用いたマウス血中の NO_2^- や NO_3^- 、 NO_x の測定では、経骨経路からのLHb輸血に際し、いずれの因子もほぼ全く血中濃度の低下を認めなかった (Fig. 5に輸液1時間後の各因子の値を示す)。循環動態に影響を与えないような少量のLHb投与ではなく、致死的低ヘモグロビン性ショックから救命し得るほどの量 (循環血液量の約50%) のLHbを急速に投与しても、NO消去作用が全く認められなかったことは極めて興味深い所見である。

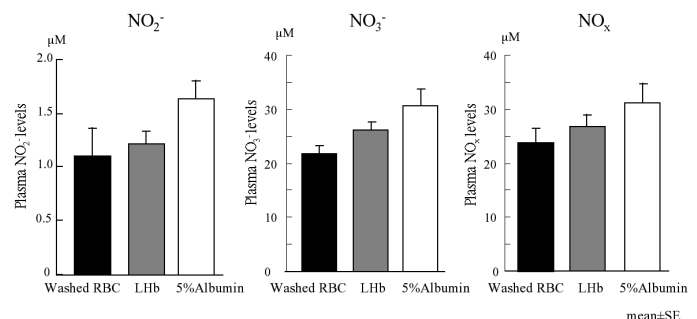


Fig. 5. Plasma NO_2^- , NO_3^- , and NO_x levels 1 hour after intra-osseous transfusion in the hemorrhagic shock mice.

おわりに

著者らをはじめ、これまでの人工血液に関する研究では、そのほとんどが如何に本来の赤血球がもたらす酸素運搬効果に近づけるかが目標であったように思われる。しかし、経骨輸血による救命蘇生は、初めて人工赤血球が本来の赤血球より優れて

いる側面を見出すことが出来た画期的な研究になったと思われる、この人工赤血球の特長を活かした臨床使用が大いに発展することを強く期待したい。最後に特筆すべき点が、今回の研究に関してもう1つある。脱血を2回施すことで作製したこのような重篤なショックモデル、すなわち初回の循環血液量減少性ショックを救命した後に、低ヘモグロビン血症による致死性ショックを再度作製し、これを人工赤血球で救命するモデルにおいて、LHb投与後の血中 NO_2^- や NO_3^- 、 NO_x 値の変動が全く認められなかったことである。重症のショックではNOの反応が変化する可能性も考慮する必要があるが、今回のNOに関する知見は、本邦で開発研究されたりボソーム内包型ヘモグロビンが、欧米で主に開発研究されている非細胞型の人工赤血球が（あくまでも理論的な考察からではあるが）宿命的に持つであろうNO消去作用を克服出来る可能性を示唆させ、その臨床での有用性を大いに期待させるものである。しかしながら、欧米の重合ヘモグロビンやPEG化ヘモグロビンが既に臨床的に投与され、その有用性に関する評価が数多く検討されていることは事実である。本邦においても、出来るだけ早い時期に臨床検討が開始されることを期待して止まない。

謝辞

本研究に多大なる御支援、御指導を頂きました、防衛医科大学 防衛医学研究センター 医療工学研究部門の石原雅之教授、外傷研究部門の斎藤大蔵教授、防衛医科大学 免疫微生物学講座の関修司教授、そして医用電子工学講座の菊地眞教授に深謝申し上げます。また、LHbを提供して頂きましたテルモ株式会社研究開発センターの金田伸一氏に深謝申し上げます。

参考文献

1. Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, et al. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trial. *Jama* 1999;282:1857-64.
2. Hess JR, MacDonald VW, Brinkley WW. Systemic and pulmonary hypertension after resuscitation with cell-free hemoglobin. *J Appl Physiol* 1993;74:1769-78.
3. Gould SA, Moore EE, Moore FA, et al. Clinical utility of human polymerized hemoglobin as a blood substitute after acute trauma and urgent surgery. *J Trauma* 1997;43:325-31;discussion 331-2.
4. Anson ML, Mirsky AE. On the combination of nitric oxide with haemoglobin. *J Physiol* 1925;60:100-2.
5. 高折益彦. 赤血球代替物の臨床応用をめざして. *人工血液* 2000;8:85-89.
6. Levy JH, Goodnough LT, Greilich PE, et al. Polymerized bovine hemoglobin solution as a replacement for allogeneic red blood cell transfusion after cardiac surgery: results of a randomized, double-blind trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124:35-42.

7. LaMuraglia GM, O'Hara PJ, Baker WH, et al. The reduction of the allogeneic transfusion requirement in aortic surgery with a hemoglobin-based solution. *J Vasc Surg* 2000;31:299-308.
8. Standl T, Burmeister MA, Horn EP, et al. Bovine haemoglobin-based oxygen carrier for patients undergoing haemodilution before liver resection. *Br J Anaesth* 1998;80:189-94.
9. Kasper SM, Walter M, Grune F, et al. Effects of a hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC-201) on hemodynamics and oxygen transport in patients undergoing preoperative hemodilution for elective abdominal aortic surgery. *Anesth Analg* 1996;83:921-7.
10. Bateman C. Hope for reducing SA's trauma deaths? *S Afr Med J* 2004;94:728-9.
11. Levien LJ. South Africa: clinical experience with Hemopure. *ISBT Science Series* 2006;1:167-173.
12. Johnson JL, Moore EE, Offner PJ, et al. Resuscitation of the injured patient with polymerized stroma-free hemoglobin does not produce systemic or pulmonary hypertension. *Am J Surg* 1998;176:612-7.
13. Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, et al. The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergent surgery. *J Am Coll Surg* 1998;187:113-20; discussion 120-2.
14. Moore EE, Cheng AM, Moore HB, et al. Hemoglobin-based oxygen carriers in trauma care: scientific rationale for the US multicenter prehospital trial. *World J Surg* 2006;30:1247-57.
15. Hughes GS, Jr., Antal EJ, Locker PK, et al. Physiology and pharmacokinetics of a novel hemoglobin-based oxygen carrier in humans. *Crit Care Med* 1996;24:756-64.
16. Winslow RM. Current status of blood substitute research: towards a new paradigm. *J Intern Med* 2003;253:508-17.
17. Olofsson C, Ahl T, Johansson T, et al. A multicenter clinical study of the safety and activity of maleimide-polyethylene glycol-modified Hemoglobin (Hemospan) in patients undergoing major orthopedic surgery. *Anesthesiology* 2006;105:1153-63.
18. Tsai AG, Cabrales P, Manjula BN, et al. Dissociation of local nitric oxide concentration and vasoconstriction in the presence of cell-free hemoglobin oxygen carriers. *Blood* 2006;108:3603-10.
19. 関修司. 肝臓の細胞性免疫および液性免疫両者による自然免疫応答と生態防御. *防衛医科大学校雑誌* 2006;31:133-147.
20. Kuranaga N, Kinoshita M, Kawabata T, et al. A defective Th1 response of the spleen in the initial phase may explain why splenectomy helps prevent a *Listeria* infection. *Clin Exp Immunol* 2005;140:11-21.

21. Ikuta S, Ono S, Kinoshita M, et al. Enhanced interferon-gamma production and bacterial clearance in the liver of splenectomized mice in the models of *Escherichia coli* injection or intestinal obstruction. *Shock* 2004;21:452-7.
22. Seki S, Habu Y, Kawamura T, et al. The liver as a crucial organ in the first line of host defense: the roles of Kupffer cells, natural killer (NK) cells and NK1.1 Ag+ T cells in T helper 1 immune responses. *Immunol Rev* 2000;174:35-46.
23. Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, et al. Physiological capacity of the reticuloendothelial system for the degradation of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;311:874-84.
24. Ami K, Kinoshita M, Yamauchi A, et al. IFN-gamma production from liver mononuclear cells of mice in burn injury as well as in postburn bacterial infection models and the therapeutic effect of IL-18. *J Immunol* 2002;169:4437-42.
25. Kinoshita M, Seki S, Ono S, et al. Paradoxical effect of IL-18 therapy on the severe and mild *Escherichia coli* infections in burn-injured mice. *Ann Surg* 2004;240:313-20.
26. Kinoshita M, Shinomiya N, Ono S, et al. Restoration of natural IgM production from liver B cells by exogenous IL-18 improves the survival of burn-injured mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol* 2006;177:4627-35.
27. Dubick MA, Holcomb JB. A review of intraosseous vascular access: current status and military application. *Mil Med* 2000;165:552-9.
28. 日本外傷学会外傷研修コース開発委員会. 外傷初期診療ガイドライン. 東京:へるす出版, 2005;48-49.

スパーサー (Extension arm) 導入により促進されるヘモグロビンの PEG修飾 : PEG結合数と物性値の相関

Extension Arm Facilitated PEGylation of Hemoglobin: Correlation of the Properties with the Extent of PEGylation

Li D, Manjula BN, Acharya AS.
Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, 10461, USA.

(紹介者) 中川晶人, 小松晃之, 土田英俊
Akito Nakagawa, Teruyuki Komatsu, Eishun Tsuchida

文献概要

紹介する文献は、ヘモグロビン (Hb) をポリ (エチレングリコール) (PEG) で修飾したPEG修飾Hb (PEG-Hb) に関する研究論文である。PEG修飾によるHbの毒性 (血管収縮) 回避効果が明らかにされて以来、PEG-Hbは非細胞型の人工酸素運搬体として、主に欧米や中国で研究開発が進められている。昨年北京で開催された第11回血液代替物国際会議 (the XIth International Symposium on Blood Substitutes) でも、PEG-Hb関連の研究報告が多数見られた。著者らは、自身が開発したExtension arm facilitated PEGylation protocol, すなわちスパーサー導入により促進されるPEG修飾法を用いてPEG-Hbを合成し、PEG結合数とPEG-Hbの構造、溶液物性、酸素親和性の相関を明らかにした (Sangart社が臨床試験を進めているPEG-Hb (Hemospan[®]) にも同じ方法が利用されている¹⁾)。

この方法 (Fig. 1.) では、まず分子量がHbの約 1 / 470である2-イミノチオランをHbのアミノ基と反応させる。これにより、イミノチオランがスパーサーとなって、Hb表面から少し離れた位置にメルカプト基が導入される。続いて末端にマレイミド基を有するPEGを加えてPEG-Hbを得る。EnzonやApex Biosciencesが開発したPEG修飾法^{2,3)} では、PEG (分子量はHbの約 1 / 10) を1段階で直接Hbと反応させるため、(i) PEGとHbの反応性が低い、(ii) 生成物の分子量分布が広い、(iii) PEGと結合したアミノ基の電荷が消失する等の欠点があった。一方本方法は、(i) ある程度限定されるPEG反応箇所、(ii) PEG結合部位の電荷保持、(iii) スパーサーによるHbとPEGとの反応性増大、(iv) メルカプト基とマレイミド基の特異的反応による生成物の狭い分子量分布が特徴である (Hb には反応

性の異なるPEG結合部位が少なくとも14 (= 7 × 2) カ所 (Cys-93(β), Lys-40(α), Lys-120(β), Lys-61(α), Lys-7(α), Lys-8(β), Val-1(β)) 存在する (Fig. 2.)¹⁾。PEGが特定のアミノ酸だけに結合する訳ではない)。

本論文では、PEG (平均分子量 5 kDa) 結合数が 4 , 6 , 8 , 10 (平均値) のPEG-Hbを合成し、粘度、コロイド浸透圧、酸素親和度の変化を検討した。PEG結合数は、PEG修飾時のHb濃度とPEG/イミノチオラン/Hb比で決定される。しかし、PEG/Hb比 80であっても、得られたPEG-HbのPEG結合数は10であった。これは、PEG結合数の増加により溶液粘度が上昇、Hb表面がPEGで覆われ、PEGの反応性が低下したためと考えられる。また、PEG結合数が増加すると、アロステリック結合因子がHbに結合し難くなり、酸素親和性が増大しないことも明らかとなった。

紹介者のコメント

著者らの開発したPEG修飾法がPEG-Hbの合成に有効であることが改めて示された。PEG-Hbの分子径とPEG結合数の間には、単純な比例関係ではなく、マレイミド基とメルカプト基の特異的反応やPEGの構造変化に由来した分子径増大量の変化が見られた。高分子の構造がいかに溶液物性や機能に影響するかを考える時、この実験結果は興味深い。

今回合成されたPEG-Hbを人工酸素運搬体として利用する際には、PEGを10分子も結合させる必要はない。PEGを10分子結合したPEG-Hbの溶液物性をPEG未修飾Hbと同ヘム濃度と比較した時、その粘度は未修飾体の約 5 倍、コロイド浸透圧は未修飾体の約20倍もある。また、PEG 2 分子を結合したPEG-Hbで

も、酸素を効果的に組織に運搬できると本文中に述べられている⁵⁾。

PEG修飾は、他のタンパク質や分子集合体にも広く利用されている方法である。例えば、ヒト血清アルブミン (HSA) を PEG 修飾した PEG-HSA は新しい血漿増量剤となりうることが報告されている⁶⁾。このような製剤の開発には、本研究の知見が有用となるだろう。

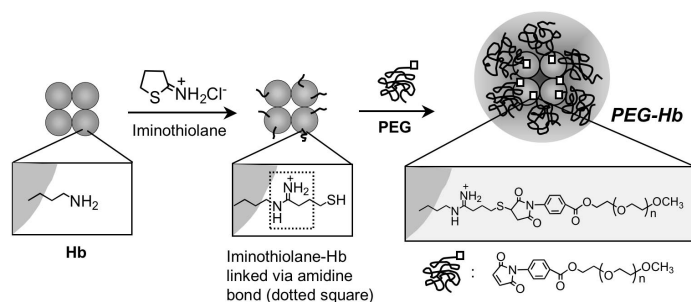


Fig. 1. Schematic presentation of PEGylation of hemoglobin by extension arm facilitated PEGylation protocol.

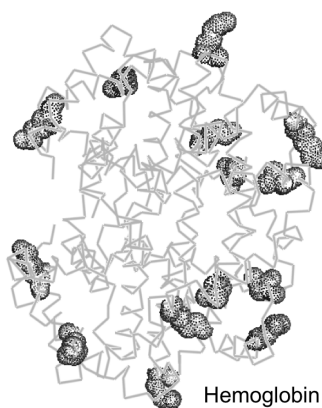


Fig. 2. The binding sites of the extension arm facilitated PEG on hemoglobin. The hemoglobin molecule is depicted by the solid line. The amino acids which react to the extension arm and the PEG are depicted by the gray spheres. The picture was produced on the basis of crystal structure of hemoglobin (PDB ID: 2DN2) by use of PyMOL: DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System; DeLano Scientific: San Carlos, CA, 2002.

緒言

タンパク質の分子表面を特定の分子量と数のPEGで修飾すると、未修飾体にはない新しい機能が付与される。例えば、(i) エピトープの被覆による抗原反応の減少、(ii) 生体内における分解の抑止、(iii) 血中半減期の延長、(iv) 製剤自体の安定度の増大が顕著であり、タンパク質による治療効果の改善にPEG修飾が汎用される。

近年では、PEG修飾によるHbの毒性 (血管収縮) 回避効果が明らかにされている。非細胞型のHb製剤が血管収縮を誘起することは、Hbを原料とした人工酸素運搬体開発の重大な問題の1つであった。Hbに平均分子量5000のPEG (PEG-5K) を10分子結合したPEG-Hbは血管収縮を生起しないことから、人

工酸素運搬体として利用できる可能性がある。PEG-Hbの特徴は、高粘度、高コロイド浸透圧、高分子量、高酸素親和性である。非細胞型のHb製剤でありながら、PEG-Hbが血管収縮を起こさない要因はこれらの物性にあると考えられる。

Enzonは、PEG-5K10分子をウシHb表面のアミノ基とウレタン結合により結合したPEG-Hb (PEG-5K10ウシHb) を合成し、昇圧作用がないことを明らかにしている。PEG-5K10ウシHbの粘度、コロイド浸透圧 (COP) は他の修飾Hbに比べて高いことから、PEG-5K10ウシHbは血漿増量剤にもなりうる。非細胞型の人工酸素運搬体を設計する際には、血漿増量剤としての性質も考慮する必要がある。

Enzonが開発したPEG修飾法では、Hbのアミノ基がPEGとの結合に使われるため、PEGが結合した分、正電荷 ($-NH_3^+$) が失われる。PEG-5K10ウシHbに昇圧効果が見られなかったのは、この電荷喪失またはPEG修飾による分子量や溶液物性の変化が原因と考えられる。PEG修飾による電荷喪失が昇圧効果に与える影響を検討するため、我々は、マレイミド基とメルカプト基の特異的で定量的な反応を利用した新しいPEG修飾法 (extension arm facilitated PEGylation) を開発した。この方法では、我々がextension armと呼んでいる化合物 (2-イミノチオラン) をHbのアミノ基と反応させる。両者はアミジン結合で連結され、アミノ基の電荷が保持されたまま、Hbにメルカプト基が導入される (Fig. 1)。利点は、(i) PEGが結合した部位の電荷保持、(ii) スペースャーによるHbとPEGとの反応性増大、(iii) メルカプト基とマレイミド基の特異的反応である。

この方法を用いて、PEG-5K 6分子を結合したPEG-Hb ([SP-PEG-5K]-Hb) を合成したところ、PEG結合の位置選択性はそれほど高くないに関わらず、分子量分布は狭く、昇圧効果は観測されなかった。ただし、[SP-PEG-5K]-HbをさらにPEG修飾すれば、その反応性や分子量分布は変化すると考えられる。

本論文では、PEG結合数とPEG-Hbの物性 (分子径、粘度、COP、酸素親和性) の相関について報告する。

方法

HbAのPEG修飾

HbA (0.125, 0.25, 0.5, 1.0 mM tetramer) リン酸緩衝液 (pH 7.4, PBS) を2-イミノチオラン 5 mM (Bioaffinity Inc., Rockford, IL) 存在下、フェニルマレイミド-PEG5K (Mal-phe-PEG5K, Bioaffinity Inc., Rockford, IL) 10 mMと混合し、4で終夜反応させた (Fig. 1)。混合液をPBS中で透析し、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によりPEG-Hbを精製した (4)。

分析方法

SECではPEG-Hbの分子量分布を評価した。カラム (superose 12, 31 × 1 cm², Amersham-Pharmacia Biotech) 2本を直列に連結、PBSで平衡化後、分析に使用した (流速: 0.5 mL/min)。カラムから溶出したPEG-Hbや未反応のPEGは、540 nmの吸光度及び屈折率で検出した。グロビン鎖の逆相

HPLC (RPHPLC) はカラム (Vydac C4, 4.6 × 250 mm²) を用いて行った。SDS-PAGEは既報に従って行った。

動的光散乱

PEG-Hbの分子径は動的光散乱装置 (DynaPro, Protein Solutions, Lakewood, NJ) を用いて行った。測定は、遠心分離 (13,000 rpm, 4分) により沈殿物を除去した後行った ([PEG-Hb] 1 mg/mL)。

酸素親和性の測定

PEG-Hb ([Hb] 0.5 mM, pH 7.4, 37 °C) の酸素結合解離曲線はHem-O-Scan (Aminco) を用いて測定した。測定はアロステリック因子共存下、非共存下の両方で行った。

COPの測定

PEG-Hb (40 mg/mL, 室温) のCOPはコロイド浸透圧計 (Wescor 4420 (Logan, Utah)) を用いて測定した。測定前には、校正試料 (Osmocol reference standards (Logan, Utah)) を用いて装置を校正した。

粘度の測定

PEG-Hb (40 mg/mL, pH 7.4, 37 °C) の粘度はcone-plate 型のレオメータ (Brookfield, Middleboro, MA) を用いて測定した (ずり速度: 75 s⁻¹)。

結 果

PEG-Hbのサイズ排除クロマトグラフィー

Hb濃度がイミノチオランとの反応性に与える影響を検討した。イミノチオラン濃度を一定 (5 mM) にした時、Hb濃度が増大すると、メルカプト基数は減少、Hb濃度が減少すると、メルカプト基数は増加した。[Hb] 1 mMではメルカプト基数は4、[Hb] 0.125 mMではメルカプト基数は10であった (イミノチオラン導入前のメルカプト基数は2)。

メルカプト基を導入したHb (0.125, 0.25, 0.5, 1 mM) にフェニルマレイミド-PEG-5K (10 mM) を加えて、PEG-Hbを得た。PEG-Hbのメルカプト基数は0.25以下であったことから、ほぼすべてのメルカプト基がPEGと反応したことになる。各Hb濃度 (0.125, 0.25, 0.5, 1 mM) で調製したPEG-HbのPEG結合数はそれぞれ10, 8, 6, 4であった。

PEG-HbのSECから、生成物にはPEG未修飾Hbは存在せず、溶出時間はPEG結合数とともに増大した。溶出パターンを比較すると、PEGが4分子結合したPEG-Hb (tetraPEG-Hb) は他のPEG-Hbの場合に比べ幅広く、PEGが6分子結合したPEG-Hb (hexaPEG-Hb) は狭かった。これは、hexaPEG-Hbの分子量分布がより狭いことを示している。PEGが10分子結合したPEG-Hb (decaPEG-Hb) の溶出時間はPEGが8分子結合したPEG-Hb (octaPEG-Hb) より少し遅い。これは、修飾試薬 (イミノチオランとPEG) の割合がHbより多くなっていくと、溶出パターンはより対称で幅狭となり、分子量分布が狭くなるこ

とを示している。

グロビン鎖の分析

PEG未修飾HbのHPLCでは、溶出時間順にβ, α鎖に由来する2つのピークが観測された。TetraPEG-Hbでは4つのピークが観測され、主としてβ鎖がPEG修飾されている。MALDI-TOF MSの測定結果から、新たに出現した2つのピーク (pool 1, pool 2) は、それぞれPEGが1分子 (pool 1), PEGが2分子 (pool 2) 結合したグロビン鎖であることが明らかとなった。さらに、pool 1のピークは2成分が重なっているように見える。このパターンをHbβ鎖のCys-93 (計2カ所) のみにPEGが結合したPEG-Hb (DiPEG-Hb) のパターンと比較すると、pool 1の成分のピークは、溶出時間が早い順にPEGが1分子結合したPEG-β鎖およびPEG-α鎖の2成分から構成されていることが明らかとなった。さらにPEG結合数が増加すると、新たにPEGが3分子以上結合したグロビン鎖の溶出成分 (最大5成分) がpool 2以降に出現した。

電気泳動

PEG未修飾Hbの電気泳動では、サブユニットに由来した分子量付近に単一バンドを示した。一方PEG-Hbでは、より高分子量側にPEGが多分子結合したPEG-グロビン鎖に由来する複数のバンドを示した。TetraPEG-Hbでは、PEGが1分子結合したPEG-グロビン鎖が最も濃いバンドとして現れたが、hexaPEG-Hb, octaPEG-Hbでは、PEGが2分子または3分子結合したグロビン鎖が現れ、decaPEG-Hbでは、PEGが3分子結合したグロビン鎖が最も濃いバンドとして現れた。

この実験はタンパク質を変性させて電気泳動を行っているが、もし、タンパク質を変性させない条件で電気泳動を行えば、バンド幅は狭いだろう。

等電点電気泳動

PEG-Hbは、Hbと比べて等電点が高い位置に幅広いバンドを示し、PEG結合数とともに低等電点側に移行した。PEG修飾しても、Hb自体の電荷数は変わらないので、この移行は、Hb表面をPEGで被覆した効果であると考えられる。

分子径

PEG結合数増加に伴い、PEG-Hbの分子径および分子サイズ (PEG-Hbを球体と仮定した時、分子径から算出される球体の体積) は大きくなった。OctaPEG-Hb以降は、PEG結合数増加に伴う分子径の増大がやや小さくなった。PEG-HbにおけるPEGの充填密度 (PEG結合に伴う分子量増加分を分子サイズ増加分で割った値) は、TetraPEG-Hb, hexaPEG-Hb, octaPEG-Hb, decaPEG-Hbともほぼ同じであった (約40 Da/nm³)。これらの結果は、PEGがHbに6分子結合すると、HbがPEG鎖で包み込まれ、さらにPEG修飾が進むと、Hbに結合しているPEGとこれから反応するPEGの構造が変化して、より溶媒相 (水相) に広がっていくことを示唆している。

粘度とCOP

Hb濃度とともにPEG-Hbの粘度とCOPは指数関数的に上昇した。PEG結合数増加に伴うCOPの上昇は粘度の場合よりも大きかった。

PEG-Hbの酸素親和性

4種類のアロステリック因子(2,3-ビスホスホグリセリン酸(DPG) 2.5 mM, 塩化ナトリウム(NaCl) 1.0 M, イノシトールヘキサキスリン酸(フィチン酸)(IHP) 10 mM, 2-[4-(3,5-ジクロロフェニルウレイド)フェノキシ]-2-メチルプロピオン酸(L35)) 10 mM) 共存下でのPEG-Hb (0.5 mM, pH 7.4, 37 °C) の酸素親和性を測定した。アロステリック因子無添加の場合, Hb β 鎖 Cys-93 (計2カ所) のみにPEGを結合したdiPEG-Hbでは酸素親和性が增大(P_{50} が低下)した(diPEG-Hb: 14 Torr, Hb: 10 Torr)。この時, PEG修飾による P_{50} の低下率は約30%であり, PEG結合数に関係なくほぼ同じ値であった。一方アロステリック因子を添加した場合, PEG-Hbの酸素親和性はHbに比べて増大, P_{50} の低下率はdiPEG-Hb, tetraPEG-Hb, hexaPEG-Hbの順に大きくなり, 低下率はそれ以上増大しなかった。その低下率は, NaClまたはDPG存在下では最大約60%, IHPまたはL-35存在下では最大約80%であった。この結果から, PEG-Hbの酸素親和性はdiPEG-Hbとほぼ同じであり, PEGとHbの反応は酸素親和性に影響しないこと, hexaPEG-Hb, octaPEG-Hb, decaPEG-Hbのアロステリック因子に対する親和性はほぼ同じであることが明らかとなった。

考 察

スパーサーを有するメルカプト基とマレイミド基との反応を利用した本方法は, 新しいPEG修飾法である。PEG-Hbが昇圧効果を示さない最小のPEG結合数を考える際, PEG結合数とそれに伴うPEG-Hbの物性変化を考えることは重要である。本研究ではPEG-Hbについて, PEG結合数とその物性の解明を目的としている。

末端がトリクロロトリアジンのPEG-5Kでウシ血清アルブミンを修飾して以来, 官能基特異的反応性を有するPEGおよびそれを用いたタンパク質修飾法が多数開発されている。以前は低分子量のPEGを利用しており, タンパク自身の活性や生成物の純度が低かったが, より高分子量または多岐構造のPEGで修飾することにより, 分子量分布の狭いPEG修飾体が活性を保持したまま得られるようになった。

本研究で合成したhexaPEG-Hbの分子量分布は他の方法で合成したPEG-Hbに比べて狭かった。これは, スパーサーの効果またはHb特有のPEG反応性による効果である。Hbの濃度調整により, 最小4, 最大10分子のPEGを結合したPEG-Hbを合成できた。得られたPEG-Hbの分子量分布はtetraPEG-Hbを除いて狭かった。

HexaPEG-Hbの粘度はHbとPEG-5Kの混合溶液(PEG-5K/Hb = 6/1 (mol/mol)) より高かった。PEG-Hbの分子量増大に伴い反応溶液の粘度は上昇し, PEGが6分子結合した後はPEG

(マレイミド基)とHb(メルカプト基)との反応が抑止されると考えられる。

Hbに対するPEG結合の位置選択性は低い。電気泳動では, PEG結合数が増加すると, PEGが2, 3分子結合したPEG-グロビン鎖のバンドが濃く現れた。

PEG結合数とPEG-Hbの分子径には比例関係が成り立ったが, 結合数増加量に対する分子径増加量の割合は, PEG結合数6までの方がPEG結合数6以降の方より大きかった。これは, PEGが6分子結合すると, 結合したPEG鎖が再配向し, PEG分子がメルカプト基と反応し難くなったためと考えられる。PEG鎖の充填密度はtetraPEG-Hb以降同じである。

PEG-HbのPEG結合に伴うPEG鎖自身の構造変化は以下のよう考えられる。まずPEGが4分子結合するまでは, Hbに結合したPEG鎖間は比較的離れている(少なくともPEG1分子の分子径以上)。PEG結合数が6になると, Hbの表面全体がPEGで覆われ, PEG鎖間の距離は近くなる。さらにPEGが結合しようとする, 既に結合しているPEGはHb分子のより外側に広げなければならない。この時, PEGの構造が変化する。それ以降, PEGの構造は変化することなく, PEG結合数が増加する。結果として, tetraPEG-Hb以降は分子量増大量と分子径増大量の比が一定になる。この構造変化は, PEGのマッシュルーム型からブラシ型への構造転移に関連していると考えられる。

アロステリック因子共存下では, PEG結合数増加とともに酸素親和性は増大した。これは, oxy体からdeoxy体への構造転移がPEG結合数増加に伴い困難になるためと考えられる。PEGは, 水相からHb中心への水の浸入を抑止している。L-35やIHPはHbの $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ 末端に結合して酸素親和性を制御するが, PEGはこの付近には結合していない。Hbを被覆しているPEGがHbに結合している水の結合を不安定化して, oxy体からdeoxy体への構造転移を困難にしていると考えられる。また, PEG結合数が増加すると, アロステリック因子共存下であっても, P_{50} の低下率は小さい。これは, Hb表面を覆ったPEGがoxy体からdeoxy体への構造転移を困難にしているためであり, Cys-93が修飾されているためではない。Cys-93以外のアミノ酸をPEG修飾しても酸素親和性は高くなることがこの考察を支持する。

PEG-Hbを血漿増量剤として利用する場合, PEG修飾はその物性を制御する方法の一つであるが, Hbを原料とした人工酸素運搬体に必要な分子設計方法には, まだはっきりしない点もある。HexaPEG-Hbが昇圧効果を示さないことは, decaPEG-HbのようにPEGを過剰に結合しなくても血管収縮を回避できることを示している。PEG修飾の際に利用する反応形式はPEG修飾の効率に影響する。HexaPEG-Hbと比べると, それ以上のPEGが結合したPEG-Hbには利点がないかもしれない。PEG結合数増加に伴い, PEG-Hbの粘度とCOPは指数関数的に上昇するので, PEG結合数が多いPEG-Hbは生体内に投与することが難しいだろう。また, Cys-93にPEGを2分子結合したdiPEG-Hbの方がHexaPEG-Hbよりも組織を効果的に酸素化することが既に明らかにされており, 組織の酸素化にはdiPEG-

Hbの方が効果的と言える．今回合成したPEG-Hbの酸素運搬能は今後 *in vivo* で詳細に検討する必要があるだろう．

紹介者引用文献

1. Winslow RM, Chapman KW, Vandegriff KD, Young M. Hemospan[®] (MP4) A, human hemoglobin modified with maleimide-polyethylene glycol. In: Winslow RM, eds. Blood Substitutes Academic Press, 2005;470-82
2. Conover CD, Linberg R, Shum KL, Shorr RG. The ability of polyethylene glycol conjugated bovine hemoglobin (PEG-Hb) to adequately deliver oxygen in both exchange transfusion and top-loaded rat models. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1999;27:93-107.
3. Yabuki A, Yamaji K, Ohki H, Iwashita Y. Characterization of a pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate as a physiologic oxygen carrier. Transfusion 1990;30:516-20.
4. Manjula BN, Tsai AG, Intaglietta M, Tsai CH, Ho C, Smith PK, Perumalsamy K, Kanika ND, Friedman JM, Acharya SA. Conjugation of Multiple Copies of Polyethylene Glycol to Hemoglobin Facilitated Through Thiolation: Influence on Hemoglobin Structure and Function. Protein Journal. 2005;24:133-146.
5. Cabrales P, Kanika ND, Manjula BN, Tsai AG, Acharya SA, Intaglietta M. Microvascular PO₂ during extreme hemodilution with hemoglobin site specifically PEGylated at Cys-93(β) in hamster window chamber. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol 2004;287:H1609-17.
6. Hangai-Hoger N, Intaglietta M. Polyethylene Glycol Conjugated Albumin: A New Generation Plasma Expander. 人工血液 2006;14:84-91.

FDA Workshop on Hemoglobin Based Oxygen Carriersに参加して Report on "FDA Workshop on Hemoglobin Based Oxygen Carriers"

酒井宏水⁽¹⁾, 堀之内宏久⁽²⁾, 小林紘一⁽²⁾

Hiromi Sakai⁽¹⁾, Hirohisa Horinouchi⁽²⁾, Koichi Kobayashi⁽²⁾

2008年4月29-30日に米国Maryland州Bethesdaにある《米》国立衛生研究所(National Institute of Health, NIH)にて,《米》食品医薬品局(Food and Drug Administration, FDA)主催のワークショップ(Hbを用いる人工酸素運搬体)が開催された。これに参加したので,その概要を報告したい。

一番の話題は, Journal of American Medical Association (JAMA) に報告の, 欧米で開発されたCell-free Hb-based oxygen carriers (HBOCs) の臨床試験結果のメタアナリシスについてである¹⁾。北米の5社が開発したHBOCsの臨床試験結果の論文13報, その他3件の公開データをもとに3,711人分のデータを解析している。Cell-free HBOCs投与群と対照群の比較では, 死亡率および心筋梗塞の発症率がHBOCs群で高く, 臨床試験とはいえヒトに投与するには極めて危険な製剤であり, 何らかの改良がなされ, 十分に動物試験で安全性を確認すべき, とNatanson博士(NIH researcher)らは主張している。JAMAの論文は4月28日(Workshopの前日)にOn lineで公表されたばかりであったが, Workshop当日の朝に見た現地の新聞(USA Today)には, JAMA誌の内容の一部と, これがFDA Workshopで議論されるであろうとの予告が掲載されていたことには驚いた。しかし偶然とは思えなかった。

会合ではNatanson博士らの見解に対し, 当然の事乍ら反論もあった。この分析には, Baxter社のHemassistをはじめ, Hemosol社のHemolink, Biopure社のHemopure, Northfield社のPolyHeme, Sangart社のHemospanの臨床試験結果について, それぞれが物性の特徴に違いがあるにもかかわらず, ひとまとめにして解析をしていることである。反面, 動物実験の段階で十分な安全性評価が為されていなかった為に, 今になって副作用が明らかになったことも問題である。ICH(International Conference on Harmonization)ガイドラインの非臨床動物実験は, HBOCsの安全性試験には向いていないこと, 企業も臨

床試験の全データを公表しておらず, これをFDAも知らないデータがあり得ること, またFDAに対しても, 患者(被験者)を救うために臨床試験を早期に中止すべきではなかったのかとの批判もあった。

過去にBaxter社が分子内架橋Hbを展開し, 以前から血管収縮と血圧亢進のことが問題となり, Phase IIIで漸くそれを重篤な副作用として認め, 撤退に至った経緯がある²⁾。誰もが重合Hbであれば, このような副作用は低減されると考えていたにもかかわらず, 今になって重合Hbでも副作用が明らかになり, 間違いをまた繰り返しているように思える。二日目のセッションでは, HBOCsによるNO捕捉と血圧亢進の対処策として, NO吸入, NO₂⁻の投与や, ハプトグロビンでHbを捕捉して副作用を低減するような話題提供があったが, どれも対処療法であり, 新しい物質が誕生しない限り問題解決は期待できないのではないかと感じた。

今回の騒ぎで懸念されることは, HBOCs開発の全体的な停滞である。しかし, 幸いにもNatansonらの論文の標題は, "Cell-free Hemoglobin-Based Blood Substitutes and Risk of Myocardial Infarction and Death"であり, 意図的かどうか解らないが「非細胞型」のHBOCsにはっきりと限定している。論文および議論の中では, いわゆる「細胞型」のHb-vesicles(HbV)については全く触れていないのであるが, Cell-free HbとCellular Hbとの違いをどれだけの人が理解して下さっているか。日本の「細胞型」HbV開発者は, 細胞型の利点を明確にし, Cell-free Hbとは全く違うことを主張していかなければならない。

(1) 早稲田大学理工学術院 理工学研究所 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1 早稲田大学理工学研究所 Research Institute for Science and Engineering, Waseda University

(2) 慶應義塾大学医学部 呼吸器外科 Department of General Thoracic Surgery, School of Medicine, Keio University

論文受付 2008年7月18日

本ワークショップには300名以上の参加者があった。日本からは、早慶から酒井、堀之内、小林が、また、東海大学医学部の川口章先生が参加した。昨年北京で開催された第11回国際血液代替物学会(11th-ISBS)では、中国でのHBOCsの研究が国家プロジェクトとして推進されていることが良く解ったが、今回も中国からの参加者も散見され、HBOCsの開発の結末がどうなるのか静観しているように思えた。北米の非細胞型の化学修飾HBOCsの開発で生じた問題点を凝視し、分子デザインから新たな展開を開始する時期に差し掛かったのかもしれない。

以下にプログラムに従って、各発表者の内容について、パワーポイント発表および小生のメモをもとに、重要なことを書き出した。しかし、小生の英語力の無さのため、聞き落としや誤解もあるし、時差ぼけの影響もあり、物足りないと感じられることもある。また、空欄の箇所もできてしまったことには、お詫び申し上げたい。詳細について知りたい読者には、FDAのホームページにTranscriptが掲載されているので、これを参照して頂きたい(<http://www.fda.gov/cber/blood/hboc042908.htm>)。

Tuesday, April 29, 2008

Opening remarks

Jesse L. Goodman(Center for Biologics Evaluation and Research, FDA)

Simone Glynn(National Heart, Lung and Blood Institute, NIH)

Jerry A. Homberg(Office of the Secretary and Office of Public Health and Science, HHS)

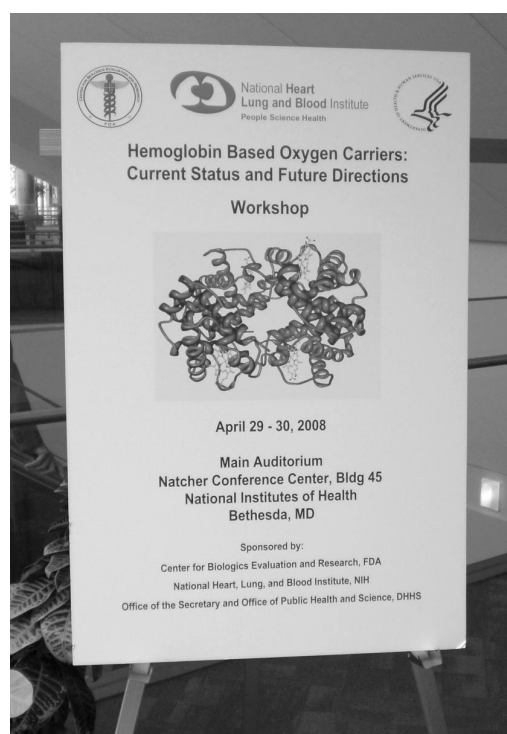


写真 1. 会場入口の案内

Session I, Workshop Overview and HBOCs Update

Overview of the Workshop

Moderator: Joseph C. Fratanoni(Maxcyte)

Overview of Oxygen Physiology

H.F. Bunn(Harvard Medical School)

血行動態が維持されなければ、酸素は運搬できない。NO捕捉を抑制すること、生理的に適った P_{50} 値、膠質浸透圧の調節が重要であることを主張。また、StamlerらのSNO-Hbの説について、Hbの β 93CysがSNO-Hbの発生部位なので、これをアラニンに置換したマウスを使って検討したところ、血管収縮などは全く無かったとの論文³⁾が最近出ており、SNO-Hbの説を否定している。

HBOCs: Biochemical and Physiological Perspectives

A.I. Alayash(CBER, FDA)

Hbの毒性について詳細に説明した。先ず、Hemosol社のo-raffinose polymerized Hbについて、分子量分布が広く、monomeric Hbも含有する、ヘム構造が歪んだrhombic hemeの存在、T構造が固定されていて、酸素親和度が異様に低い(P_{50} が高い)、様々な有用性が言われている β 93Cysが化学修飾のときの架橋点になっている。 H_2O_2 との反応により毒性の高いフェリルHbを産生する。心筋に対する毒性が組織病理から明らか。NO反応と自動酸化によるメト化を抑える方法が必要。Biopure社のOxyglobinについて、アスコルビン酸を体内で産生する動物種(例えばラット)であれば、血中でmetHbが還元される。しかし、ヒトではそうはいかない。HbとSOD/Catalaseの架橋、trolox, glutathioneなど抗酸化剤の利用を検討すべき。

Nitric Oxide and Nitrate Ions: Physiology, Pathology and Pharmacology

Alan N. Schechter(Molecular Medicine Branch, NIDDK, NIH)

HbとNOの反応の概説。NO吸入によるHbNOの増大と同時に、Nitrate(NO_3^-)が顕著に増大する。Nitrite(NO_2^-)はさほど増大しない。NitriteはdeoxyHbで還元されてNOになることが明らかになった。Nitriteの投与試験から血圧の降下を実証。NitriteをNOドナーとして利用できる。

Non-Clinical Testing: Strengths and Limitations

George P. Briot(Univ. of Ottawa and Univ. of Toronto)

従来のICH基準、およびGLP基準の非臨床動物実験(健康動物への単回投与、反復投与)では、安全性について十分な評価ができないのではないかと見落とす項目が出る可能性あり。疾病モデル動物の使用が必要。アカデミックな研究では、一般に効能についての研究が多く、また観察項目が限定されているため、一般性が持てない場合がある。血管内皮傷害は、様々な病態と

関係している。HBOCを投与するとNOが捕捉されるので、血管障害を助長する可能性がある。

Session II, Clinical Experience with HBOCs

Introduction to the Issues

Toby A. Silverman (CBER, FDA)

臨床試験の考え方について概説。Traumaに対する投与試験の難しさ。死亡率は明白なendpointであるが、短期生存と長期生存の結果が一致しない。QOLのある長期生存が患者およびその家族に最も重要である。輸血の出来ない場合（遠隔地など）を想定した臨床試験の倫理的・技術的問題。これまでの各社臨床試験の結果を解析し、その副作用をまとめた一覧表を提示（左心室心筋への影響、心筋虚血、血管収縮、消化器系の不快感/嘔吐/下痢/嚥下傷害/腹痛/腸管からのバクテリア侵入）。警告（Caveats）として、臨床試験の全てが公表されている訳ではない。今回ここに公表されているデータは、FDAに最終報告されたものとは違う。データ解析法や、解釈に問題がある場合もある。血中酵素濃度の上昇を、副作用とみなしていない場合がある。最後に課題として、もっとHBOCsの特徴について科学的に検証する必要あり。臨床上の利益を得る点ではendpointを明確にする必要あり。Survivalのみでは十分な評価ができない可能性があり、Surrogate markerを設定して、安全性と有効性を評価する必要がある。臨床的安全性の理解（最大投与量など）、投与の損益の理解、論理的な臨床開発プログラムの決定、など。

Risk: Benefit considerations in Clinical Trials

Sara F. Goldkind (Office of the Commissioner, FDA)

FDAは、その薬剤を使用することの利益が、既知の毒性または副作用の可能性よりも重要であるかを検討する。また、病態が重篤であるか、他の治療法が無いかも考慮して、薬剤の危険性について回答するか判断する。

Presentations from Industry: Proposed Clinical Indications for HBOCs and Clinical Trial Experience to Date

Moderator: Barbara Alving (National Center for Research Resources, NIH)

Development of Hemospan

Peter Keipert (Sangart Inc.)

Dr. Robert M. Winslow 欠席のため代理としてDr. Keipertが発表した。様々なHBOCsがあるが、同じではない（Polymerized Hbsと一緒にして欲しく無いという意味）。Hemospanは若干の血圧亢進はあるが心拍出量を増大させ、末梢血管抵抗を低下させる。Autoregulatory Theoryの観点から重要なことは、分子サイズが大きいこと、酸素親和度が高いこと（ P_{50} 値が低い、5 mmHg）、低Hb濃度（4.3 g/dL）、膠質浸透圧が高いこと。NO結合速度と血管収縮は関係がない。Phase II（Sweden）では、整形外科手術（関節形成術）における投与試験を実施。血圧維

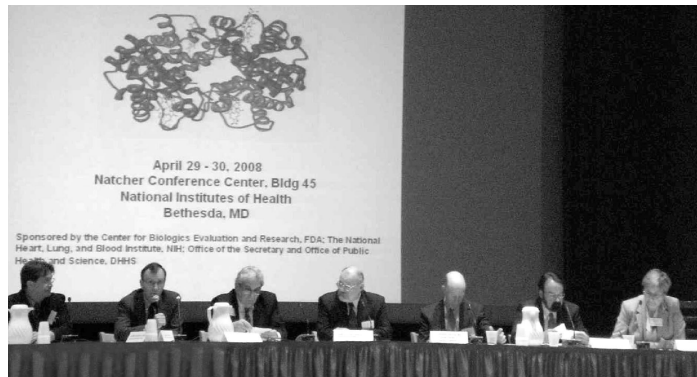


写真2. 会場風景。左から、Dr. De Angelo, Dr. Estep, Dr. Greenburg, Dr. Abuchowski, Dr. Gould, Dr. Keipert, そしてDr. Goldkind

持効果を実証。二例の死亡例あったが、Hemospanの投与とは無関係と判断。Phase III（欧州）を開始する予定。低血圧の予防（ $n = 370$ ）と治療（ $n = 460$ ）の試験について被験者登録名簿が今年完了する見込。Hemospanの用途は、ショックの蘇生、術中の血圧安定化、血液が利用できない場合の輸血迄のつなぎ、虚血領域への酸素ターゲティング。限界は、Hb濃度が低いので、血液希釈度が高いときに対応できない、膠質浸透圧が高いので、体液量過剰が起こりうる。

Clinical Development of Polyheme

Steven A. Gould (Northfield Laboratories, Inc.)

「Unmet medical needs」（いまだ満たされていない医学的ニーズ）、つまり赤血球輸血が出来ない状況での対処法として、Polyhemeが有効である。I U = 500 mL [Hb] = 10 g/dL、1年間保存可能。Hospital Trauma Trial（ $n = 171$ ）では、投与量に応じて血中Hb濃度が高くなること、死亡率の減少を確認⁴⁾。Pivotal Phase III Trial（ $n = 720$ ）重篤な外傷出血患者を対象とした試験では、過去に問題点が指摘された。実際には、124名の患者の登録が正しく行われなかったため、再度解析を行った。その結果、PolyHeme投与の方が、副作用の発症率が高い（肺炎、MOF、出血性ショック、呼吸障害、凝固亢進、敗血症、心筋梗塞）。それでも、赤血球輸血が出来ない状況での対処法として、Polyhemeは有効である。

HBOCs: Current Status and Future Directions

Abraham Abuchowski (Prolong Pharmaceuticals)

PEG-bovine Hbを開発したEnzon社の設立者。PEG修飾蛋白質3種類が既にFDAの認可を得ている（Adagen, Oncaspar, PEG-Intron）。PEG-HbについてはEnzon社の時代に、Phase Ib（ $n = 60$ ）を実施。PEG-Hbの特徴： $P_{50} = 14 - 20$ mmHg, [Hb] = 4 - 6 %, met Hb < 10%, -20 で6ヶ月以上安定。4 で7日間安定。イヌ投与試験（30%血液交換）では特に問題なし。ブタ投与試験（80%血液交換）では、腎臓と脾臓に空包変性があるほかは特に副作用なし。Phase I試験（ $n = 34$ ）、1.67 - 8.33 ml/kgを投与。食道痙攣がみられた例があったが、鎮痙薬（levosinex）の投与で解消した。適応としては、放射線増感剤

があり、転移性疾患の患者に対するPhase Ib試験 (n=33) では、2 - 8 ml/kgを投与した。副作用としては、緩慢な血圧上昇 (24%)、不全失語症 (24%)、吐き気 (24%)、嘔吐 (12%)。製品名AfterShock™は、PEG-Hbを高張食塩水溶液に溶解させた溶液。ショックの蘇生液として期待される。

Biopure HBOC-201

A. Gerson Greenburg(Biopure Corp.)

終始、過去のFDAの見解に対する反論。HBOCsの副作用について、全てのHBOCsが同じではない。安全性のシグナルが毒性と解釈されることがある。血管活性と主要臓器に対する毒性の因果関係は無い。HbOC-201は生命を維持するに十分な酸素運搬が出来る。FDAが要求した補足実験 (ブタ10-30%交換輸血後の臓器血流量と酸素分圧の測定) の結果、主要臓器の血管収縮の証拠は無し。骨格筋では血管収縮あり。冠動脈の血管収縮なし。Pittmanらの微小循環計測の結果、血圧の亢進と骨格筋の血管収縮はあったが、腸管では血管収縮なし。臨床試験でも冠動脈の収縮は無い。血圧亢進はあっても、冠動脈性心臓病の患者に影響を与えない。動物実験では、血液が無い状態でも、左心室系の機能を維持できた。臨床試験において患者の管理方法に問題があったため、効能の評価に不整合が生じた。重篤な虚血状態に対しては、赤血球であろうとHBOCsであろうと副作用を低減させる事はできない。血液が無い時、HBOCsは利用できる利点がある。HBOCsの臨床試験は継続すべきである。今行ふべきことは、安全性シグナルを正確に解釈する事、現在のマテリアルの最も適した用途を考える事、そしてHBOCsの開発を継続する事。

Lessons Learned from the Baxter Experience in the development of HBOCs

Timothy N. Estep(Chart Biotech Consulting)

Baxterの分子内架橋Hb (DCLHb) の副作用の一つに心筋損傷がある。実はpreclinical studyから解っていた。IND (investigational new drug) 申請までの2年間にこの副作用の解析に費やした。その結果は、既に論文で公表されている⁵⁾。サル、ブタで投与後24-28時間で発症するが、時間と共に治癒する。CK_{mb}、LDH₁はさほど上昇しなかった (但しoverallのCK、LDHは、ブタで上昇した)。心機能的には問題は無かった。心筋損傷は、SFHbでも認められた。またHbを重合、或はNO結合を遅くする事で低減された。NOS阻害剤であるL-NAMEの投与で同様の心筋損傷が認められた。しかしヒトでの確認は生検に困難を伴う。次に血管収縮について、NO反応性の制御、血管外漏出の抑制によって低減されるが、種差がある。何らかの薬剤の併用によって対処できる?。米国のPhase IIIでは、DCLHbの死亡率 (46%) が生理食塩水投与 (17%) に比較して高くなったため、試験を中止した。しかし、因果関係は解らない。事実、欧州での試験では、死亡率は42% vs. 38%で、さほど違いはなかった。重篤な外傷患者の登録方法、管理方法に問題があったか。また、蘇生方法自体の問題 (overloadなど)、

Halothaneとの相互作用、LPSとの相互作用、外傷の種類 (鈍的外傷が貫通外傷よりDCLHb投与後の死亡率が高い)、外傷性患者を対象とする臨床試験の難しさもあったか。重篤な患者の方がTreatment groupになり易い?その他、副作用として、DCLHb投与によってMOFになり易い傾向、脾臓炎、NO捕捉による酸素消費量の増大?今後HBOCsの開発に必要なことは、全組織への血流分布の計測、臓器の病理検査、非侵襲のモニタリングなど。問題は多いが、unmet medical needs の対処法としてHBOCsは有望である。

Development of PHP as an NO Scavenger in the Treatment of Distributive Shock.

Joseph De Angelo(Apex Bioscience, Inc.)

PHP (pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugated) は、血管外漏出し、細胞間質のNOと反応する。正常の場合には、NOは重要な働きを示すが、過剰量になると問題になる。この過剰産生されるNOの捕捉をPHPで行う。カテコールアミンが血液分布異常性ショックの治療に使用されるが、問題点もある。これに比較してPHPの方が、副作用が低減されるものと期待できる。臨床試験 (SIRS患者、ショック患者に対する投与: 20 mgHb/kg/hr) の結果、MAPの急激な上昇がみられたが、28日生存率は、PHP 57.6%に対してPlacebo 58.6%で殆ど違いは無い。心筋虚血の発症例も、高めであった (淡々と発表をしていたが、PHPの利点が殆ど解らない発表であった)。カテコールアミン耐性の患者を対象としたPhase IIIを計画中。

Panel Discussion

Wednesday, April 30, 2008

Session III, Clinical Findings and Mechanisms

Adverse Events (T/C)					
	Baxter	Biopure	Hemosol	Northfield	Sangart
N	504/505	708/618	209/192	623/457	85/45
Death	78/61	25/14	1/4	73/39	2/0
HTN	76/38	166/59	113/75	NR	7/1
CHF	0/1	54/22	0/2	17/20	NR
Cardiac Arrest	NR	17/6	1/1	14/9	NR
MI	6/1	14/4	14/7	29/2	2/0
Arrhythmia	23/17	153/100	1/1	NR	15/5
CVA	NR	16/3	2/1	3/1	NR

写真3. 各社HBOCsの臨床試験の結果総括。T/C, Treatment versus Control; MI, myocardial infarct 心筋梗塞; CHF, chronic heart failure, 慢性心不全; CVA, cerebrovascular accident, 脳血管障害; HTN, hypertension, 高血圧; cardiac arrest, 心停止; arrhythmia, 不整脈

Functional Aspects of the HBOCs as a Class

Panel Discussion

Moderator: Harvey Klein (Dept. of Transfusion Medicine, Clinical Center at NIH)

冒頭、臨床試験の結果全てが公表されている訳では無い事、FDAも知らされていない結果がある事を公言した。

Demetrios Demetriades (Univ. of South California)

臨床試験の難しさ。外傷の種類によって死亡率が異なる (penetrating trauma, blunt trauma)。輸血において大量輸血を必要とした場合、パラメータとして、血漿または血小板：赤血球の比が死亡率を決める重要な項目であることを主張。この比が1:8のとき、死亡率は65%。1:1.4のとき19%にまで低下。

Daniel Freilich (Naval Medical Research Center)

軍服姿で発表。非臨床試験の結果から、外傷を対象とする臨床試験のプロトコルを決定しなければならない。効果を最大限に引き出すため、死亡率が高い重篤な出血性ショック患者を対象とする。輸血ができない状況を選択する。Hb濃度の高いHBOCsを用いる。損害を最小限にするため、高齢よりも若年層を対象とする、血圧の回復だけを指標としない、他の汎用輸液も併用する、担当者の危機管理意識、副作用が出たときには直ぐにHBOCsの投与を止める。副作用の報告は迅速に、血管活性の少ないHBOCsを選ぶ、止血ができたならニトログリセリンを投与して、HBOCsの血管活性の影響を低減させる。制御不能出血に使用する状況を考えている様子であった。

John Holcomb (Univ. of Texas Health Science Center at San Antonio)

大量出血患者がHb濃度が11 g/dLとすれば、Hbは十分にある。Bleeding problemとperfusion problemをどう考えるか。各社とも臨床第1相、第2相試験で、利点が得られなかったが、出血性ショック患者について現場で、試験対象患者基準と、除外基準をどうすべきであったかが、最も重要であった。

Charles Natanson (Critical Care Medicine, NIH)

現在のHBOCsの臨床試験の結果について、JAMAに発表の内容を説明 (記述の通り)¹⁾。メタ解析の結果から、現行のHBOCsは死亡率が平均で30%上昇、心筋梗塞の発症率ともに高い。違うものを一色単にして解析して良いのかという議論もあるが、どれか一つの製品についてのデータを除去しても、同じ結果になった。P₅₀値との関係、公表データと未公表データの関係なども検討したが、結論からいうと、臨床試験プロトコル、製造者、物質の特性、結果の出版に拘わらず、死亡率、心筋梗塞の発症率はHBOCs群で高い。

Edward J. Norris (Johns Hopkins Univ. School of Medicine)

発表スライド無し。エホバの証人の患者100人に対し、総量

200unitも投与してきた。HBOCsがunmet medical needsに対応できることを評価するべき。

Edward P. Sloan (Univ. of Illinois at Chicago)

Baxter社のDCLHbの臨床第三相試験：重傷出血性ショック患者に対する投与で、投与28日後の死亡率の評価では、Control群で32%に対し、DCLHb群で45%と高い値あった²⁾。しかし、DCLHb投与に起因する血圧亢進は殆ど無かった。また、塩基欠乏、乳酸値についてもDCLHbとの因果関係は無かった。ショック指数について (SI = HR/BBPが1は、非代償性ショック、SI < 1は代償性ショック)、DCLHbを投与することによるSIの変化は無かった。DCLHbの検討の結果、i) HBOCは重要である、ii) 論理的に想定されるDCLHbの影響が、*in vivo*でいつも観察される訳ではなかった、iii) 臨床的に有用なHBOC蘇生液を見つける必要あり。今後のHBOCs開発に対する忠告として、i) HBOCsの基礎研究と臨床試験は継続すべき、ii) 論理的に想定できる現象が臨床的に認められるか見極める、iii) 効能に関する質問に的確に答えられるよう、臨床試験の方法の最適化を行う。

Gus J. Vlahakas (Harvard Medical School)

Biopure社のHBOC-201の臨床第二相試験について。心臓手術後の血液希釈された状態に使用し、ヘマトクリットが回復するまでの一時的な酸素運搬体として使用し、同種血輸血を回避することが目的。特に心筋梗塞は認められなかった。しかし、HBOCsは血管収縮を起こす事が良く知られている。NOの結合、体動脈圧、肺動脈圧の上昇が報告されているが、NO結合と血管抵抗の上昇が、代謝性自動調節機能を覆すような作用を及ぼす事は無い。HBOCsの特性が有用である場面もありうる。血管収縮の他に、HBOCsはどのような不安定要素を持っているか。消化器系において、膵臓疾患 (lipase, amylase 上昇)、肝臓疾患 (AST, ALT 上昇)、胸痛 (食道の蠕動運動への影響) が報告されている。心筋梗塞について、DCLHbのサルを使った実験で最初に報告され、L-NAME投与のばあいと同様の症状であった。NOの結合が低減されたrHb2.0で低減された。

Stephen Cohn (Univ. of Texas Health Science Center at San Antonio)

米国では、Trauma Centerに1時間以内に到着出来るのは40%。従って田舎で外傷に遭うと、輸血が出来ない場合がありうる。

Organ Specific Aspects of Safety

Panel Discussion

Moderator: Richard Weiskopf (Univ. of California, San Francisco)

Renal(Perfusion)腎・循環系

Andrew D. Baines(Univ. of Toronto)

急性腎傷害では，creatinine値は余り信頼性が無い．重要な初期マーカーとして，尿量，N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NAGL) IL-18, Kidney injury molecule (KIM-1) などがある．

Gastrointestinal 消化器系

Mitchell P. Fink(Logical Therapeutics)

急性膵臓炎 (Lipase, amylase上昇)，肝細胞傷害 (AST, ALT 上昇)，食道蠕動への影響

Cardiac 心臓系

David C. Warltier(Medical College of Wisconsin)

リコンビナントヘモグロビン: rHb1.1の投与により，HR低下，MAP上昇，LVEDP上昇．HBOCsの投与による心筋損傷は，Burhopらが初めて発表した．CPK上昇，壊死など．

Central Nervous System 中枢神経系

Raymond F. Regan(Thomas Jefferson Univ.)

神経系細胞培養系にHBOCsを添加した実験では，毒性は無いことを確認している．しかしMP-4 (Sangart社製) の添加ではLDHの上昇が認められた．metHb生成が速いためか．臨床試験ではHBOCsの脳神経系への影響は良くわかっていない．

Shock Mechanism ショックの機序

Joseph E. Parrillo(Univ. of Medicine and Dentistry of New Jersey)

ショックの分類，病因，敗血症の際の心筋異常について概説．最近出版されたNEJM誌を参照⁶⁾．

Pulmonary 肺系

Mark Gladwin(National Heart, Lung and Blood Institute)

肺に関連するHBOCsの副作用として，肺高血圧症，心拍停止，肺炎，呼吸停止，ARDS (急性呼吸促迫 [窮迫] 症候群)，MOF，血栓症などがある．

Session IV Finding a Way Forward: What is the Best Way Forward Scientifically and Ethically?

Moderator: George P. Brio (Univ. of Ottawa and Univ. of Toronto)

Biochemical Approaches and Mitigation Strategies for HBOCs

The Way Forward: Can Nitrite Modulate HBOC Toxicity?

Mark Gladwin(National Heart, Lung and Blood Institute)

亜硝酸イオン (NO₂⁻) がdeoxyHbと反応して，NOを産生する反応の機序と，生理学的な役割，更には投与の効果について概

説⁷⁾．また，HBOCs投与後の血圧亢進を，NO吸入によって低減させる事に成功したZapolらの論文を紹介⁸⁾．同様にNO₂⁻を投与してやれば，HBOCsと反応してNOを産生し，血管収縮作用が低減出来るのではないか．

Strategies for Engineering Safer, More Efficient and More Stable Recombinant Hemoglobins for Use as O₂ Delivery Pharmaceuticals

John S. Olson(Rice University)

遺伝子組換えHbの分子設計において，P₅₀値の制御による酸素輸送量の調節，NO結合速度の制御による血管収縮の抑制が可能となっている (Somatogen-Baxter社の例)．また，自動酸化の低減，ヘム遊離の低減，などが検討されている．大量製造も可能ではあるが，実際には，費用の問題，E. coliからの産生であるので，LPSの除去を効率よく行うことが課題である．また，分子量を大きくするための工夫 (化学修飾，カプセル化) も検討する必要がある．

Role of Microvascular Reactions in the Design of Hb Based Oxygen Carrying Plasma Expanders

Marcos Intaglietta(La Jolla Bioengineering Institute, University of California, San Diego)

各種HBOCsを投与した後の微小循環系の観察から明らかになったことは，血漿中のHb濃度は，血管収縮を誘発しうる重要因子である．血漿層の粘度調節は，血管収縮を回避するために重要．各種分子状HBOCsは，それぞれ異なった血管活性を示す．HBOCsによるNO運搬 (Stamlerらの説) は不明．全てのHBOCsはNOを捕捉する．血漿層の粘度を増大することでNO産生を増加できる．日本のHb小胞体のほか，PEG-Hb, Polymerized Hbなど，様々なHBOCsを検討して明らかになったことは，分子設計にあたって，血漿増量のため膠質浸透圧 (50 mmHg) は充分である，P₅₀値は12-16 mmHgにすることで，抵抗血管よりも下流の血管での酸素放出を可能とする．全血中のHb濃度は，Transfusion Triggerである7 g/dL以上に維持しつつ，血漿中のHb濃度は2 g/dL程度が良い．血液粘度は2-4 cP程度を目安とし，平滑筋に対するmechanotransduction効果を維持する．

Endogenous Hb Scavengers and HBOC Toxicity

Dominik J. Schaer(University of Zurich, Switzerland)

血中の遊離Hbの排泄には，ハプトグロビン (Hp) およびレセプターCD163が関与している．これらがどのようにHbの毒性を低減しているか．Hp, CD163とHBOCsの相互作用の強さは，その構造に依存し，修飾度が高いほど相互作用は低減する．マクロファージCD-163と相互作用をすると，HO-1が誘導され，酸化傷害を低減する．HpはHbの血圧亢進の効果を低減させる．

Utility of Animal Models in HBOC Evaluation

Joy Cavagnaro(AccessBio)

前臨床試験について，動物実験では臨床の結果を100%予見することはできないし，たとえ臨床試験を行ってもその後，予想しないことも起こりうる．病態の動物モデルを用いた実験，種差の検討が必要である．毒性の許容範囲を明らかにしてそれを見るための動物実験モデルを作製することが重要．

Alternative Focused Clinical Designs

Jeffrey L. Carson

(University of Medicine and Dentistry of New Jersey)

臨床試験のエンドポイントは，臨床的な結果とすべきであり，「同種血輸血の低減」とするべきではない．

Panel Discussion

Jerry L. Carson(University of Medicine and Dentistry of New Jersey)

Joy Cavagnaro(AccessBio)

Ezekiel Emanuel(National Institute of Health)

臨床試験の倫理的問題について概説したJAMA誌の論文を配布⁹⁾．

Thomas R. Fleming(University of Washington)

Marcos Intaglietta(La Jolla Bioengineering Institute, University of California, San Diego)

John S. Olson(Rice University)

Dominik J. Schaer(University of Zurich, Switzerland)

Gus J. Vlahakas(Harvard Medical School)

David C. Warltier(Medical College of Wisconsin)

Closing Remarks

Jay S. Epstein(Office of Blood Research Review)

二日間の討論の中で，全ての問題点に対して十分な答えを得る事は出来なかったかもしれないが，多くの情報を得ることが出来た．また，大まかな意見の一致が見られたのではないかと．それは，重要なUnmet medical needsがあること，HBOCsの研究開発を先に進めるべきこと，そして，新しい戦略が引き続き必要であること．組織委員会および，Dr. J. Goldsmithに謝意を表して，本会を閉会する．

引用文献

1. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. JAMA. 2008;299:2304-12.
2. Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J, Mallory MN, Rodman G Jr. Diaspirin cross-linked hemoglobin(DCLHb)in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trial. JAMA. 1999;282:1857-64.
3. Isbell TS, Sun CW, Wu LC, Teng X, Vitturi DA, Branch BG, Kevil CG, Peng N, Wyss JM, Ambalavanan N, Schwiebert L, Ren J, Pawlik KM, Renfrow MB, Patel RP, Townes TM. SNO-hemoglobin is not essential for red blood cell-dependent hypoxic vasodilation. Nat Med. 2008, in press.
4. Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Ness PM, Norris EJ, Carson JL, Hides GA, Freeman IH, DeWoskin R, Moss GS. The life-sustaining capacity of human polymerized hemoglobin when red cells might be unavailable. J Am Coll Surg. 2002;195:445-52.
5. Burhop K, Gordon D, Estep T. Review of hemoglobin-induced myocardial lesions. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 2004;32:353-74.
6. Parrillo JE. Septic shock--vasopressin, norepinephrine, and urgency. N Engl J Med. 2008;358:954-6.
7. Basu S, Grubina R, Huang J, Conradie J, Huang Z, Jeffers A, Jiang A, He X, Azarov I, Seibert R, Mehta A, Patel R, King SB, Hogg N, Ghosh A, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB. Catalytic generation of N₂O₃ by the concerted nitrite reductase and anhydrase activity of hemoglobin. Nat Chem Biol. 2007;3:785-94.
8. Yu B, Raher MJ, Volpato GP, Bloch KD, Ichinose F, Zapol WM. Inhaled nitric oxide enables artificial blood transfusion without hypertension. Circulation. 2008;117:1982-90.
9. Emanuel EJ, Wendler D, Grady C. What makes clinical research ethical? JAMA. 2000;283:2701-11.