総説

人工酸素運搬体の開発と実用化

Development and Practical Application for Artificial Oxygen Carrier.

緒方嘉貴*

テルモ株式会社 研究開発センター

Yoshitaka Ogata

TERUMO corporation R&D center

Abstract

The development of artificial blood had been proceeded through the development research of the artificial oxygen carrier : TRM-645 to substitute for the blood transfusion. We have developed the liposome encapsulated hemoglobin that have superior function for oxygen transport which was close to red blood cell as the biomimetics-technology of red blood cell. The function of oxygen transport was designed which the P50 value was controlled to 40~50torr to use the inositol-hexaphosphate as an allosteric effector. The oxygen transporting efficiency of TRM-645 under respiration with 30~50 % oxygen was superior to that of human red blood cells (hRBC). The development of the artificial oxygen carrier will be able to evolve to aim at the treatment for the stroke and the myocardial infarction as oxygen infusion liquid from the blood substitution in future. So, development of the function design will change from the blood substitution to the therapeutic purposes.

Key words

Artificial blood, Artificial oxygen carrier, Blood substitute, Liposome, Oxygen infusion.

1. はじめに

輸血を代替する人工酸素運搬体の開発研究は、特に赤血球の酸素運搬能の人工的代替を目的として開発が進んできた。そこで赤血球機能のバイオミメティックテクノロジーとして、リン脂質、コレステロールの分子間相互作用を利用し、高濃度精製ヒトヘモグロビンを2分子膜小胞体リポソームでカプセル化した、人工酸素運搬体(TRM-645)の開発における機能設計と、その実用化について概説する。

2. 最近の人工酸素運搬体開発状況

人工酸素運搬体の研究開発は、Fig.1 に示すように、ヘモグロビンを利用した非セル型またセル型と呼ばれる、2種類の酸素運搬体の研究開発が展開されている。

2.1 非セル型ヘモグロビン

ヘモグロビンは α 鎖と β 鎖からなる4量体であり、静脈内投与された場合には、 α 鎖- β 鎖間が解離し、腎臓からの排泄により血中から急速に消失し、腎毒性を引き起こすことが知られている。そこで人或いは牛赤血球からヘモグロビンを精製し、化学的な修飾を加

Fig.1 Classification of Hb-based oxygen carrier.

*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

Yoshitaka_ogata@terumo.co.jp

えることで α 鎖- β 鎖間の解離を抑制した酸素運搬体の開発が進み、非セル型ヘモグロビン (Cell free hemoglobin) と呼ばれる、高分子結合ヘモグロビン、分子内架橋型ヘモグロビン、重合ヒトヘモグロビン等が開発され、現在そのいくつかが臨床評価の段階にある。これら非セル型ヘモグロビンは、末梢組織へ酸素を有効に運搬・放出し、動物実験では重篤な副作用を示さないとされているが、臨床的には血圧上昇、消化管蠕動不全、肺炎などの副作用が報告されている。またこれら非セル型ヘモグロビンは毛細血管床、特に細動脈を攣縮させ、重要臓器の有効毛細血管密度を減少させる可能性があるため、循環障害により組織の酸素化が不十分となる可能性や、非セル型ヘモグロビンとNO、CO等の低分子ガス状メディエーターが結合することで、ショックなどの病態下ではこれらのガス状物質が同時に過剰生成された場合、これと非セル型ヘモグロビンが相互作用し生理活性が大きく揺動を受けることが指摘されている。¹⁾

2.2 セル型ヘモグロビン

Djordjeovichら²⁾により生体成分であるリン脂質、コレステロール等を利用したリポソームによりヘモグロビンをカプセル化する試みが行われた。ここでセル型酸素運搬体の非セル型ヘモグロビンに対する特徴は以下の点にあると考えている。

- 1) ヘモグロビンに化学的な修飾、分子構造変化などの変更をすることなく用いる。
- 2) サイズが大きいために血管内皮、血管壁を通過せず、NO、CO等の分子状ガスメディエーターと過度の相互作用をしない。
- 3) 血流中の半減期が非セル型では10時間以内であるのに対して20~30時間と長い。
- 4) ヘモグロビンとともにアロステリックエフェクターやメトヘモグロビン還元システムをリポソーム内に構築出来る。
- 5) ヘモグロビンはnativeな状態であり、さらにリポソーム構成成分は生体由来物質に非常に近い構成であるため、代謝の問題が少ない

技術的問題点としては、ヘモグロビンを変性させずにリポソームを形成するという高度なリポソーム形成技術が必要であり、製造工程が複雑であるなど、主に

製造法、工程に由来する困難さを持っていたが、テルモ社において、比較的単純な製造工程を用いて、水素添加大豆レシチン、コレステロール、脂肪酸をリポソーム構成成分として用い、その表面をポリエチレングリコール(PEG)により修飾することで、血中における凝集を防止し、生体内半減期を延長したりリポソームによりヘモグロビンをカプセル化した、人工酸素運搬体TRM-645の開発が進行しているので^{3,4,5)}、本稿にて概略を述べる。

3. 人工酸素運搬体の機能設計

人工酸素運搬体の機能設計は基本的に赤血球と同等の酸素輸送機能を有するということになるが、赤血球から精製されたヘモグロビンは、ヘモグロビンのアロステリック因子である、2,3-Diphospho Glycerate(2,3-DPG)が保存中に分解し、さらに精製過程で除去されるため、非常に高い酸素親和性を示し、そのまま生体に投与したのでは酸素運搬機能をほとんど有さない事が分かっている。そのために非セル型ヘモグロビンでは、 α 鎖- β 鎖の解離を抑制するとともに、ヘモグロビン分子中にグロビン鎖の立体構造変化を抑制するような架橋構造等を持たせることで、その酸素親和性を低下させ、赤血球と同様な酸素親和性にコントロールしている。それに対して、セル型ヘモグロビンでは、ヘモグロビンとともにアロステリック分子をリポソームにカプセル化することで、酸素親和性をかなり広範囲にわたってコントロールすることが可能となる。Fig.2にはアロステリック因子として、Inositol hexaphosphate (IHP)をヘモグロビンとともにカプセル化した人工酸素運搬体

Fig. 2. The Oxygen equilibrium curve of TRM-645 were changed with IHP concentration within liposomes.

Fig.3 The oxygen transferring efficiency of oxygen transfers have compared under respired with 20% and 40% oxygen.

(TRM-645)の酸素親和性変化を示した。

ここに示したように、IHPの添加濃度を变化させるだけで、その酸素親和性(P50)が10~60torrと広い範囲で可変であることが分かる。ここで赤血球をバイオミメティックするという側面から酸素親和性をとらえるのであれば、類似した酸素親和性を持たせる事となろうが、人工酸素運搬体に重要な酸素輸送機能設計は、酸素親和性プロファイルではなく、生体中での酸素輸送能力にある。人工酸素運搬体は輸血を必要とする患者に投与することが前提であり、輸血を必要とする場面において、生体中における酸素運搬特性が最も合目的であるということが重要である。赤血球のアロステリック的特性は、20%酸素濃度の大気を呼吸するという生理的条件下において、最も効率よく酸素運搬するように設計されている。しかしながら酸素運搬効率という面では、ヘモグロビンの25%程度しか機能しておらず、残りの75%のヘモグロビンは、O₂-reserveとして酸素を結合したまま循環している。これが出血時などに予備的な酸素供給元として機能する。しかし臨床的には手術や救急の場のような呼吸管理下においては、酸素運搬量を増大する目的で40~50%程度まで呼吸ガスの酸素濃度をあげることが日常的に行なわれている。ヘモグロビンが8g/dLを越えているような状況下においては、混合静脈血の酸素分圧(PvO₂)がそれほど低下せず(PvO₂: 35~40 torr)、動脈での赤血球の酸素結合率は95%以上あるため、酸素吸入では赤血球の酸素結合率を数%程度上げる効果しか無く、血漿への酸素溶解量を上げるにすぎない。さらに出血が進みへ

Fig.4 Dose-dependent resuscitation effect of NRC on plasma lactate level in 50% exchange transfused rats.

モグロビンが7g/dLを切るような状況になると静脈酸素分圧が低下し、血液の酸素抽出比率が増大し、酸素輸送量を一定に保とうとするが、このような条件下でも酸素吸入は血漿への酸素溶解量にある程度上げる効果が主である。さらに酸素吸入濃度を上げて同様であり、100%酸素吸入ではかえって酸素による障害が起こってくる。

このような臨床的な呼吸管理下で要求される人工酸素運搬体の特性とは、動脈酸素含量を増大させつつ、酸素吸入の効果を最大限に上げることにある。

肺の機能が正常であれば、呼吸管理下で動脈酸素分圧を約250~300torrにすることは容易であり、この程度のpO₂において酸素結合率が最大となるような酸素運搬特性が、臨床的な輸血代替という観点からの人工酸素運搬体に最も適した性能であると考えられる。Fig.3にはこのような酸素運搬特性に機能設計した人工酸素運搬体の酸素結合解離曲線を示す。P50を40~50torrに調整した人工酸素運搬体は40%濃度酸素吸入下において、PaO₂: 300torr, PvO₂: 40torrである仮定すると、酸素運搬効率が50%以上であり、赤血球の2倍の効率で酸素運搬可能となる。このような機能設計により、人工酸素運搬体は、より少ないヘモグロビン投与量で、効率よく酸素を細胞に運搬できることになる。

4. In-vivo における酸素輸送機能

人工酸素運搬体の In-vivo における酸素輸送機能、特に機能設計で述べたような、ヘモグロビンあたりの酸

Fig.5 Effect of NRC, Rat RBCs, Human RBCs and saline on plasma lactate levels in 50% exchange transfused rats.

素供給能を赤血球と比較して大幅に高めている点を評価するために、50%出血モデルラット (40%酸素呼吸下) を用いて、人工酸素運搬体のヘモグロビン投与量依存性を血中乳酸値を指標として評価した。Fig.4 には人工酸素運搬体の投与濃度を変化させた場合の、50%出血モデルラットの投与後3時間までの乳酸値変化を示した。

乳酸値は生理食塩液投与群において血液希釈により有意に上昇し、投与直後には減少傾向を示すが投与後3時間には脱血時レベルまで再度上昇したが、人工酸素運搬体投与例においては投与濃度依存的に投与後3時間後の乳酸の生成は抑制された。このことから人工酸素運搬体の酸素輸送機能により、嫌氣的代謝を抑制していることが分かる。

次に Hb 濃度 6g/dL の人工酸素運搬体、ラット赤血球、ヒト赤血球を 50%出血モデルラットに投与し、それぞれの酸素運搬能を比較した。人工酸素運搬体、ラット赤血球、ヒト赤血球投与群ともに投与直後から減少傾向を示し、投与後3時間では6%人工酸素運搬体群、ラット赤血球群全群、6%、12%ヒト赤血球群において有意に上昇を抑制した(Fig.5)。

以上の結果から、人工酸素運搬体としての TRM-645 の酸素運搬機能設計が、生体内においても効率よく酸素輸送機能として発揮されていることが分かる。

5. 人工酸素運搬体の応用展開および将来展望

酸素運搬を機能とした人工酸素運搬体は、その目的である輸血代替としての酸素輸送製剤であること留ま

Fig.6 The conceptual scheme of the oxygen transfusion therapy by liposome encapsulated hemoglobin (TRM-645) for hypoxic cells with ischemia.

らず、今後は、Fig. 6 に示したように、赤血球と比較して人工酸素運搬体の非常に小さな粒子径という特徴から、赤血球では通過不可能な狭窄部位を通過し、その先の虚血低酸素部位へ酸素を供給することで、虚血による傷害をできるだけ小さく抑える効果が期待されている。あるいは、がん細胞の中心部分においては血管系が未発達のため酸素供給が不十分であり、がん細胞が低酸素状態であるために、酸素ラジカル発生を治療機序とする放射線治療で十分な治療効果が出ないという問題がある。ここに人工酸素運搬体を用いて酸素供給することで治療効果を増大させるという効果が期待されている。これらの人工酸素運搬体の応用は、虚血細胞への酸素供給によって治療効果を上げるという観点から、酸素輸液治療(Oxygen Infusion Therapy)としての発展が望まれている。

文献

- 1) 末松誠, 京兼隆典, 二村雄次, 石村巽. ヘム分解の生化学から見た人工酸素運搬体の設計戦略. 人工血液 2000; 8(2): 40-2
- 2) Djordjevic L, Miller I F. Lipid encapsulated hemoglobin as a synthetic erythrocyte. Fed Proc 1977; 36:567.
- 3) Ogata Y. Characteristics and function of human hemoglobin vesicles as an oxygen carrier. Polymers for Advanced Technologies 2000;11:259-9.
- 4) Ogata Y. Evaluation of human hemoglobin vesicle as an oxygen carrier: Recovery from hemorrhagic shock in rabbits. Polymers for Advanced Technologies 2000;11: 301-6.
- 5) Usuba A, Osuka F, Kimura T, Sato R, Ogata Y, Goto H, Kimura T, Fukui H. Effect of liposome-encapsulated hemoglobin, Neo Red Cells, on hemorrhagic shock. Surgery Today 1998;28(10):1027-35.