●特集 : 医療と膜

期限切れ濃厚赤血球由来ヘモグロビンを内包した リポソームタイプ人工赤血球の開発

後藤 博・浅川芳和・筒井洋治・大木紀子
木村哲寛・緒方嘉貴・上谷利治

テルモ株式会社研究開発センター ☎ 259-01 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口 1500

Development of the liposome encapsulated stroma free hemoglobin (SFH) from out dated human red blood cells as the blood substitute.

Hiroshi Goto, Yoshikazu Asakawa, Youji Tsutsui, Noriko Ohki,
Tetsuhiro Kimura, Yoshitaka Ogata, Toshiharu Kamitani

R & D Center TERUMO CORPORATION,
1500 Inokuchi, Nakai-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa

We have developed and evaluated the liposome encapsulated high-concentrated (>45%) stroma free hemoglobin (SFH) : Neo Red Cell (NRC). SFH was encapsulated together with inositol-hexaphosphate (as an allosteric effector), coenzyme and substrates for reducing metHb back to oxyHb in liposomes. The NRC was subsequently coated with polyethylene glycol bound phosphatidylethanolamine as surface modifier to prevent aggregation of NRC in plasma. The oxygen affinity and the transport efficiency of NRC could be controlled as equal or more than those of the erythrocyte. The metHb formation was reduced 1%/hr to 0.3%/hr by the addition of metHb reduction system. The blood pressure increased transiently during injection, and then immediately returned to preinjection level. Our observations suggest that the NRC are efficient oxygen carriers without causing serious adverse reactions, with controllable metHb formation *in vivo* and during storage.

Key words : Liposome, Red blood cell substitute, Encapsulated hemoglobin, Enzymatic reduction system

1. はじめに

現在の外科治療において、輸血は欠かすことの

できない最も有効な手段の1つではあるが、1) ウイルス感染、GVHD等の副作用の危険が有る。2) 緊急輸血時に血液型判定等が煩雑である。3) 血

Fig. 1. The preparation of NRC.

液の長期保存ができない等、輸血におけるリスクが存在する事是否定できない¹⁾。そこでこれらのリスクを回避するために血液に代わる血液代替物の開発が進められてきた。血液代替物として血漿、酸素運搬体、血小板等の研究がなされているが、特に人工の酸素運搬体が古くから注目を浴び、精力的に研究が成されている。現在人工酸素運搬体としてはヘモグロビンを使用した人工酸素運搬体が研究の主流となっているが、その中でヘモグロビンに何等かの化学的修飾を加え酸素運搬能、血中寿命、毒性等を改善した溶液 Hb タイプの人工酸素運搬体あるいはリポソーム等でヘモグロビンをカプセル化した人工酸素運搬体が研究の中心となっている²⁾。米国における血液代替物は主にこの溶液 Hb タイプが主流であり臨床例も多く存在するが、そこで投与後に血管収縮により血圧が上昇する等の副作用が問題となっている³⁾。これは血管内皮の血管収縮抑制因子である NO をヘモグロビンがトラップすることに起因すると考えられている。そこで生体にたいする影響をより少なくするために、生体膜に近い構造を持ち、さらにある程度の大きさ (0.2 μ 程度) をもつために内皮との相互作用が少なく、投与しても血管収縮による血圧上昇を引き起こしにくいと考えられるリポソームタイプの血液代替物が現在注目されている。我々の開発した人工酸素運搬体 Neo Red

Fig. 2. Oxygen-dissociation curves of Red Cells and NRC

Cell (NRC) は高濃度のヘモグロビン溶液を、酸素親和性をコントロールするためのアロステリックエフェクターとしてイノシトールヘキサホスフェイト (IHP) と、ヘモグロビンの酸化を抑制するために赤血球由来の嫌氣的糖代謝系酵素と気質および補酵素と共に、水素添加大豆レシチン、コレステロール、ミリスチン酸からなるリポソームによりカプセル化したリポソームタイプの血液代替物である⁴⁾。さらに血漿中で凝集しやすいというリポソームの欠点を改善するためにリポソーム膜の表面に PEG 鎖を結合していることも大きな特徴となっている。

2. NRC の調製

厚生省を通じて日赤より入手した期限切れ濃厚赤血球製剤 (CRC) から、赤血球膜除去ヘモグロビン溶液 (ストローマフリーヘモグロビン: SFH) を調製し、濃度を 45% まで高めた後、水素添加大豆レシチン、コレステロール、ミリスチン酸からなる混合脂質を加えて、乳化機でヘモグロビンを IHP および補酵素、基質等とともにリポソーム化し、カプセル化されなかった Hb を除去、フィルターにより粒径を制御した後、Hb 濃度 6 g/dl に濃縮し NRC サスペンションを得た (Fig 1)。

3. NRC の酸素解離曲線

ヒト血液は赤血球中に存在している 2, 3-ホスホグリセリン酸 (2, 3-DPG) によってヘモグロ

Fig. 3. The Schematic and model of the met Hb reduction system in NRC.

ビンの酸素親和性を制御している。これによって、酸素分圧の低い末梢血管で効率的に酸素の放出が行われる。期限切れの濃厚赤血球中ではこの2, 3-DPGがほとんど代謝、消失しており、さらにSFHの調製工程で完全に2, 3-DPGが取り除かれてしまうために、このままのSFHでは酸素親和性が非常に高く(P50: 12 torr)になってしまい酸素を抹消でも離さなくなるため酸素運搬体として適していない。そこでNRCではSFHにアロステリックエフェクターとしてIHPを添加することで酸素親和力をコントロールし、天然の赤血球に比較して高い酸素運搬効率(酸素分圧100 mmHg—40 mmHg間のヘモグロビン酸素飽和度差がNRC: 30—35%, 赤血球: 約26%)を得ている。特に酸素濃度を高くした場合(300 torr程度)には酸素運搬効率は50%以上となり赤血球のおよそ2倍に達する⁵⁾(Fig. 2)。

4. メトヘモグロビンの還元

天然の赤血球では内部に還元機構を有するために、生体内では酸化したメトヘモグロビンは常に1%以下に抑えられている。赤血球の糖代謝系(Embden-Meyerhof系)に着目し、これらの酵素活性を維持したSFHを調製し、これに基質お

Fig. 4. The metHb formation of NRC. (*in vitro* at 37°C)

よび補酵素としてNAD, グルコース, アデニン, イノシン等を添加しNRCを調製することで(Fig. 3), NRC中において嫌氣的糖代謝系を作動させることに成功しNRCのヘモグロビンのメト化の抑制に成功した⁶⁾(Fig. 4)。

5. NRCの表面修飾

一般的にリポソームは血漿中で凝集する傾向がある。そこでNRCでは平均分子量5,000のポリエチレングリコールとリン脂質を結合させた表面修飾剤(PE-PEG)でNRCの膜表面を修飾し、PEGの排除体積効果によって膜表面へのタンパクの吸着を抑えることで、血漿中でのNRCの凝集防止を可能にした⁷⁾。

6. NRCのIn-Vivo評価

6.1 出血ショックに対する効果

ウサギを用いてその血圧を50 mmHg以下に90分間保ち、出血ショックモデルを作成し、出血ショックに対するNRCの効果を評価した(Fig. 5)。出血ショックによる血圧の低下からの回復に、同種血およびHES溶液に比べNRC投与例は優れていた⁸⁾。

Fig. 5. The Schematic model of the liposome coagulation depends on the adsoption of plasma proteins.

Fig. 6. The effect of NRC infusion on hemorrhagic shock.

Fig. 7. The effect of NRC injection on the blood pressure in conscious rats.

Fig. 8. The clearance from the circulation of ^{14}C -labeled NRC, at different dose.

6.2 NRC 投与の血圧におよぼす影響

ラットに対して NRC, SFH, 生理食塩水, 血液を投与し血圧にたいする影響を調べた。その結果 SFH 投与系では血圧の上昇が観察されたが, NRC 投与例では投与中の一時的な上昇にとど

まった (Fig. 7)。

6.3 NRC 投与後の体内動態, 網内系貪食能におよぼす影響

NRC の体内動態を RI 標識 (^{14}C 標識 DPPC) した NRC を調製し, NRC 投与後の体内動態を測定した⁹⁾ (Fig. 7)。さらに NRC 投与が網内系 (Reticuloendothelial system, RES) の貪食能におよぼす影響を carbon clearance 法により測定した。NRC を投与した後の RES 貪食能は投与量 40 mg/ml 以上では一時的に低下するが, 1 日以内に回復することが示唆され, 貪食能に与える影響は小さいと考えられた。また血中からの NRC の消失は主として網内系の貪食作用によるものであり, NRC をマウスに投与した際の網内系臓器における NRC 由来のヒトヘモグロビンは 7 日以内に検出されなくなり, NRC の速やかな

分解が示された⁹⁾。

7. NRC の生体適合性

7.1 凝固系におよぼす影響

血液凝固反応において、リン脂質の存在下で凝固因子が活性を増幅する段階があることなど、血液凝固においてリン脂質は重要な役割を持っている。NRC が血液凝固機能に与える影響について *in vitro* で実験を行った。ヒト血漿と等量（容量比）の NRC を混合して、37°C でインキュベートし、活性部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、プロトロンビン時間 (PT) を測定した。その結果 NRC が血漿中に混在することによる凝固反応の阻害は認められなかった¹⁰⁾。

7.2 補体系におよぼす影響

新鮮ヒト血漿と NRC を容積比 4 : 1 で混合して 37°C 60 分、インキュベートし補体分解産物 C3a, C4a の生成量を測定した。補体活性の陽性コントロールとして生理食塩水に、5 mg/ml で懸濁させた zymosan (SIGMA)、陰性コントロールとして生理食塩水を使用した。NRC による C3a, C4a の生成は認められなかった¹⁰⁾。

8. おわりに

NRC がリポソームタイプの人工赤血球であることを特徴としているため、ヘモグロビンと共に様々な物資をリポソームによりカプセル化する事が可能となった。そこで我々は天然の赤血球を上回る酸素運搬能を得るために IHP をアロステリックエフェクターとして用い、酸素濃度の高いところでは赤血球の約 2 倍の運搬効率を得る事に成功した。また、ヘモグロビンと共に赤血球由来の嫌氣的糖代謝系酵素、補酵素、基質をカプセル化しヘモグロビンの酸化抑制にも成功した。

またリポソームの大きさは赤血球の 5 μm に比較して 0.2 μm と小さく、さらに粘度が血液と比較して低いために出血ショック時などの抹消の血管が閉じてしまっているような場合でも血流が回

復しやすくショックからの血圧の回復に優れている事が判った。また、リポソームという膜でヘモグロビンを包んでいるために、ヘモグロビンそのままを投与した場合に問題となる血圧上昇の副作用を低減する事が出来た。また、大量に投与した場合でもその毒性は低く、投与動物の主要臓器に大きな問題は無い事を確認している。

以上、NCR はヘモグロビンを用いた人工の酸素運搬体として溶液タイプのヘモグロビンの持つ欠点を、リポソームという生体適合性に優れた脂質二分子膜でカプセル化する事で改善し、優れた酸素運搬能と安全性を兼ね備えた次世代の人工酸素運搬体であると考えられる。

参考文献

- 1) 大柳治正, 斉藤洋一, 人工血液研究の現状, 臨床医学, **21**, 770, 1986.
- 2) 土田英俊, 武岡真司, 血液代替物: 最近の進歩, 人工血液 **1**, 5-10, 1993
- 3) FDA Draft Point to Consider in the Safety Evaluation of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers, Cen Biologies Eval Res, HDA Aug, 27, 1990
- 4) 鈴木一比好, 後藤博, 緒方嘉貴, 坂口圭介, 岡本武, 上谷利治, 高橋晃, リポソーム型人工赤血球 (NRC), 人工血液 **2**, 39-40, 1994
- 5) 緒方嘉貴, 後藤博, 坂口圭介, 鈴木一比好, 上谷利治, 高度交換出血モデルによるネオレッドセル (NRC) の機能と安全性, 人工臓器, **22**, 1157-1161, 1993
- 6) 緒方嘉貴, 岡本武, Methemoglobin 還元機構を有した人工赤血球 (NRC) の開発, 人工血液 **2**, 62-66, 1994
- 7) 吉岡浩, 鈴木一比好, 宮内雄二, 人工赤血球リポソームの PEG 表面修飾による血漿中凝集防止, 日本膜学会, 11 年会講演要旨集, 49, 1989
- 8) Ogata Y, Goto H, Sakaguchi K, Suzuki M, Ohaki K, Kamitani T, Takahashi A, Characteristics of Neo Red Cells, their function and safety : *in vivo* studies. Biomater Artif cells Immobilization Biotechnol (in press)
- 9) 坂口圭介, 緒方嘉貴, 鈴木雅弘, 鈴木一比好, 高橋晃, NCR 静脈投与後の体内分布及び網内系食能に対する影響, 人工臓器, **22**, 560-565, 1993
- 10) 坂口圭介, 宮内雄二, 鈴木一比好, 高橋晃, ネオレッドセルの血液凝固系・補体系に及ぼす影響, 人工臓器, **20**, 620-625, 1991

(受付 1995 年 5 月 17 日)