

外 99-39

早稲田大学大学院理工学研究科

# 博 士 論 文 概 要

## 論 文 題 目

酸素輸液としてのヘモグロビン小胞体の開発  
(Development of Hemoglobin Phospholipid Vesicles)  
as an Oxygen Infusion

申 請 者

緒 方 嘉 貴

Yoshitaka Ogata

2000 年 1 月



理 2504 ( 3017 )

生体は、個々の細胞の集合体であり、それぞれの細胞が正常な機能を営むことによって生命現象が成立している。したがって、細胞内にあってはその内部環境に恒常性が要求される。その外側にある細胞外液は細胞内環境維持のための緩衝系として働く。体液に関係した異常は恒常性維持の機構の異常や、外傷等による急激な体液の損失により起き、細胞内環境の維持を危うくする事態が生じるもので、輸液はこの homeostasis 維持機構の破綻を修復するために行なわれる。そのための素材としては水、晶質浸透圧物質、膠質浸透圧物質、栄養素などが主体を成す。しかし循環血液量の半分以上を急激に失うような場合、輸液では生体の酸素要求を満たすことは出来ず、homeostasis が維持出来ない。その場合にどうしても輸血が必要となる。そこで我々は生体の酸素要求を満たしうる酸素運搬能を有し、生体内においても輸血を代替できる酸素運搬能を有した酸素輸液の開発に成功し、2、3 年以内には臨床応用できる段階まで来た。近年、修飾ヘモグロビン、重合型ヘモグロビン、リコンビナントヘモグロビン等、ヘモグロビンを主体とした人工酸素運搬体の研究開発が進み、そのうちの幾つかは既に臨床治験の段階にあり、近い将来輸血治療の一部を代替できる段階に来ている。しかし、臨床治験の段階にあるセルフリーヘモグロビンと呼ばれる剥き出しのヘモグロビンでは、大量のタンパク質を投与する必要があるため膠質浸透圧が高くなる、あるいは endothelium derived relaxing factor : (EDRF)等のトラップ等による血流障害、血管収縮等の副作用が強く、また生体内寿命が短いため十分な酸素運搬機能を生体中で示すことが出来ない等様々な問題があった。

本研究では、血液に近い溶液物性と酸素輸送機能を持たせた酸素輸液を開発するために、人由来のヘモグロビンを、リン脂質、コレステロールの分子間相互作用を小胞体の調製に利用し、高濃度のヘモグロビンを封入した微小粒子製剤であるヘモグロビン小胞体製剤を実現させた。さらに酸素輸液原料となるヘモグロビン、リボソームを医薬品として工業的に大量生産するための基礎的な研究、酸素輸液としての酸素運搬能、酸素結合挙動、溶液物性、更には動物を使った体内動態、循環動態、酸素運搬機能など酸素輸液として臨床応用に必要な基礎的評価結果をまとめた内容となっている。

本論文は全体が9章から構成され第1章では酸素輸液の概念と従来知見をまとめて述べ、生体における血液の役割と酸素輸液に要求される機能と安全性について論じ、医療における酸素輸液の重要性を示し、研究の背景と意義、目的を明らかにした。

第2章は臨床応用に向けた酸素輸液原料としてのヘモグロビンの製造方法とその規格についてまとめた。酸素輸液原料としてヘモグロビンに要求される規格として、医薬品原料として求められる様々な要求規格の他、酸素運搬能にかかわる規格であり、酸素運搬体を構成する原体として要求されるヘモグロビン純度、メトヘモグロビン含量等、また第7章で述べるヘモグロビンの還元を利用している赤血球中の嫌氣的糖代謝系の酵素活性等も規格として要求される。さらにヘモグロビン精製の基本技術とストローマフリーヘモグロビンの製造方法、純度及び残存脂質、血液型物質等の精製度及び嫌氣的糖代謝系の酵素活性について明らかにした。

第3章では、ヘモグロビン小胞体製剤の製造方法とその物理学的性質についてまとめた。リボソーム製剤工程においては、リボソームを構成するリン脂質、コレステロール等を分子的に相溶状態にした後リボソーム形成工程を行なうことは従来知られている。工業的に大量にリボ

ソーム製剤を作る上で、この構成脂質を大量にしかも十分な相溶状態にすることが重要である。ここで工業生産に適した新しい構成脂質の混合方法を見出したので概説する。また、リボソーム形成における重要な技術である乳化技術に関して、様々な乳化法とその特色を概説し、ヘモグロビン小胞体製剤工程として最も優れた乳化法について述べる。またその方法により製造したヘモグロビン小胞体製剤の物理学的性質、微細構造、レオロジーについて詳細を説明する。

第4章は、ヘモグロビン小胞体製剤の表面状態及び表面構造と生体内挙動の相関及び代謝に関してまとめた。ヘモグロビン小胞体製剤の構成脂質が生体に及ぼす影響として、生体内挙動、血液凝固系、補体系に及ぼす影響を検討し、さらに生体内動態及び網内皮系 (RES) 貪食能への影響を検討した。ヘモグロビン小胞体は *in vitro* での血液凝固試験では凝固促進、凝固抑制等の影響は観察されず、血液凝固系に不活性であることが確認された。また補体活性 CH50 の消費及び補体分解産物 (C3a, C4a, C5a) の生成量において補体活性化作用はほとんど認められないことが分かった。<sup>14</sup>C 標識 Inulin 及び <sup>14</sup>C 標識 DPPC 含有ヘモグロビン小胞体製剤を用いて血中濃度及び組織分布を測定した。ラットにヘモグロビン小胞体製剤を 30ml/kg 静脈内投与した場合、血中半減期は 32 時間であった。また、オートラジオグラフィーによる組織分布では、ヘモグロビン小胞体製剤は血中から次第に RES の発達した臓器に分布し、3 日後には肝臓、脾臓に貪食されたヘモグロビン小胞体製剤は 54% に達した。ヒトヘモグロビン特異抗体検出法 (ELISA 法) による肝臓及び脾臓中のヘモグロビン小胞体製剤の濃度測定によれば、肝臓及び脾臓に貪食されたヘモグロビン小胞体製剤は 1 週間後に分解検出されなくなることが分かった。また、リボソーム膜構成成分であるリン脂質は RES 系臓器から脂肪組織への再分配が観察され、リボソーム膜構成成分の生体内における再利用が示唆された。

第5章では、ポリオキシエチレン (POE) 結合したヘモグロビン小胞体の特性をまとめた。生体中ではリボソームも外来抗原等と同様に、抗体の作用により形成された抗原抗体複合体 (オプソニン化) の機構により、速やかにマクロファージ等の貪食系の細胞により生体中より排除される。このリボソーム表面を POE により覆うことによって、高分子の排除体積効果を利用して、オプソニン化による抗原提示を抑制することによりリボソームのステルス化に成功した。またリボソームを薬物担体として血中へ投与したときの安定性、血中寿命を著しく向上する成果が得られた。さらに POE 結合方法と POE 表面結合リボソームの特性を解析した。

第6章は、ヘモグロビン小胞体製剤の酸素結合挙動に関して述べる。ヘモグロビンの酸素結合、酸素親和性の概念と従来知見をまとめて述べ、ヒト赤血球より精製されたヘモグロビンの非常に高い酸素親和性を緩和するために、2,3-DPG の代替物として Inositol hexaphosphate (IHP) によるヘモグロビン小胞体製剤の酸素親和性制御と、ストップフロー法を用いたヘモグロビン小胞体製剤の酸素結合挙動についてまとめ *in vitro* におけるヘモグロビン小胞体製剤の酸素親和性、酸素結合挙動について明らかにした。

第7章では、ヘモグロビン小胞体製剤におけるヘモグロビン還元について述べる。ヘモグロビンを用いた人工酸素運搬体では、ヘモグロビンの鉄錯体が Fe<sup>2+</sup> から Fe<sup>3+</sup> に酸化されるメト化変性が起こり、酸素運搬の機能が失われていくことが大きな問題となる。まず、赤血球におけるメトヘモグロビン還元機構について概説し、ついで赤血球の嫌氣的糖代謝経路 (Embden

Meyerhof pathway)の機能を生かしたままヘモグロビンを精製し、かつ嫌氣的糖代謝系をNAD、アデニン、イノシン、グルコースといった補酵素、基質を添加する事で賦活化し、嫌氣的糖代謝系がHb溶液中で活性化、産生したNADHを利用することでメトヘモグロビンの還元が起こることを見出した。さらにこのメトヘモグロビンの還元がリボソーム中でも起こることを確認した。また、Embden Meyerhof pathwayにはRapoport Luebering cycleと呼ばれる側路があり、赤血球ではその側路で生成する2,3-DPGが酸素運搬機能の調整に大きな役割を果たしている。この機構がヘモグロビン小胞体製剤においても発現し2,3-DPGの生成が確認され酸素運搬機能の調整が行われていることを見出し、その機構について明らかにした。

第8章は、*in vivo*におけるヘモグロビン小胞体製剤の酸素運搬能を解析した。第6章においてIHPをアロステリックエフェクターとして用いたヘモグロビン小胞体製剤は高い酸素運搬能を*in vitro*において示すことを述べたが、この酸素運搬能が*in vivo*において発現されることを、ヘモグロビン小胞体製剤によって70%血液交換されたラットにおいて評価を行った。ここでは組織低酸素状態の全身的指標として血中乳酸値を用いることで酸素運搬能を評価し、ラット赤血球、ヒト赤血球との間での酸素運搬効力比の検討を行った。その結果、臨床で用いられている酸素吸入条件下において、ヘモグロビン小胞体製剤はラット赤血球の1.3倍、ヒト赤血球に対しては2.0倍の酸素運搬効力を持つことが確認され、*in vitro*における結果と相関性が認められた。さらに自己赤血球だけでは生存不可能な85%の血液交換モデルにおいてヘモグロビン小胞体製剤の酸素運搬、血液循環動態に与える影響を詳細に検討した。85%の血液をヘモグロビン小胞体製剤によって交換した家兎では、ヘモグロビン小胞体製剤を投与することにより、4~5時間で出血ショックからの回復が観察され、20時間以上に渡って安定した状態に保つことが確認された。またこの85%家兎血液交換モデルでの心拍出量は血液交換により20~40%増加したが、全酸素消費量は15ml/minに低下し、酸素消費量の70%である10ml/minの酸素をヘモグロビン小胞体製剤が運搬していることが確認された。90%の血液をヘモグロビン小胞体製剤によって交換したビーグル犬においては、血液交換後、ヘモグロビン小胞体製剤の低粘性により、全抹消血管抵抗係数(TPRI)が50%程度に減少し、心係数(CI)がそれに伴い30~50%増加することで、酸素消費量の増加が起こることが分かった。また、血液交換後1日目から著明に網状赤血球の増加に伴う、自己赤血球の増加が観察され、ヘモグロビン小胞体製剤が造血機能に影響を及ぼしていないことが確認された。

第9章では、ヘモグロビン小胞体製剤の機能設計と応用展開及び将来展望についてまとめた。リボソームは、その生体適合性の高さと、構成成分やサイズの自由度等の機能設計における自由度の高さから様々な用途への展開が図られている。特にdrug delivery system: DDSとしての応用範囲は非常に広い。本論文の酸素運搬を機能としたリボソームは、その目的、臨床応用として単に輸血の代替に留まらず、今後は虚血細胞への酸素供給による治療である酸素輸送治療(Oxygen Delivery Therapy: OxyDT)を提唱し、その機能を虚血細胞への酸素輸送に最適化した酸素輸液としての機能設計の取り組みも重要となろう。