

血液代替物開発の現況

小山 薫*, 宮尾 秀樹*

はじめに

輸血療法の安全性は医療の進歩とともに向上してきたが、輸血に伴う副作用・合併症は必ずしもゼロではない^{1,2)}。また緊急時の供給等も十分ではないのが現状(大災害時は特に)である。そのような輸血療法の短所を補うべく、様々な血液代替物が開発されてきた。

血液代替物、いわゆる<人工血液>には、赤血球代替物、血小板代替物、遺伝子組み換えヒト血清アルブミン、遺伝子組み換えヒト抗体等があり、代用血漿剤も広義には血液代替物に含めることができる。本稿においては主として、赤血球代替物、血小板代替物、遺伝子組み換えヒト血清アルブミンについて述べる。

赤血球代替物

1. 赤血球代替物とは?

赤血球代替物は、同種輸血による合併症、すなわちウイルス感染・不適合輸血等の回避とともに、緊急時にすぐに使用できる人工赤血球としても期待されている。さらには臓器移植時の摘出臓器の機能維持への応用等、酸素運搬輸液としての可能性も考えられている³⁾。しかしながら、臨床使用可能な製剤はまだ市販されていない。

赤血球代替物が有すべき性能としては、感染症の発症がない、十分な酸素運搬能、血液型判定が不要、長期保存が可能、適当な血中半減期、短期投与～長期投与・反復投与における安全性、さらに経済性、等が挙げられる⁴⁾。

赤血球代替物には期限切れ輸血用血液のヒトヘモグロビン、あるいはウシヘモグロビンを利用す

るもの、lipidheme (鉄リピドポルフィリン) 等の完全合成系、Perfluorocarbon (PFC) 等がある。

2. ヘモグロビンを利用した赤血球代替物

1) 精製ヘモグロビン

血液型不適合の原因は赤血球膜の型物質であり、赤血球中のヘモグロビンは人類共通のタンパクである。成人ヒトヘモグロビンは2つの α グロビン鎖と2つの β グロビン鎖の合計4つのサブユニットからなる集合体である。ヘモグロビンを溶血した赤血球から抽出し膜成分を除くと精製ヘモグロビン溶液ができる(stroma free hemoglobin: SFH)。この精製ヘモグロビンを直接生体に投与すると、 α 鎖と β 鎖間で解離し、急速に腎から排泄されると同時に、腎毒性を生じる⁵⁾。

また、ヘモグロビンは酸素分圧が高い状態では酸素と結合しやすく酸素分圧が低い状態では酸素と解離しやすいアロステリックな性質を有する。解糖系側路で合成される2,3-diphosphoglycerate (DPG)はその性質をさらに増強しヘモグロビンの酸素運搬能を高めている。精製ヘモグロビンはDPGを欠如するため、精製ヘモグロビンと赤血球の酸素解離曲線は一致しない。すなわち、精製ヘモグロビンは酸素親和性が高く、組織での有効な酸素供給ができないのである。これら精製ヘモグロビンの欠点である短い血中半減期と高い酸素親和性を制御するために、いろいろな試み(修飾ヘモグロビン)が行われてきた。修飾の方法としては、分子内架橋、分子間架橋、高分子結合等がある⁶⁾。

2) 修飾ヘモグロビン

分子内架橋ヘモグロビンは、血中滞在時間を延長させるためにヘモグロビン分子内に架橋を施した製剤である。ただし、分子内架橋だけでは血中半減期は数時間である。さらに、DPG欠如によ

*埼玉医科大学総合医療センター麻酔科

る酸素運搬能低下に対する修飾も必要になる。また、粒子の小さな修飾ヘモグロビンは、ヘモグロビン分子中のヘムが一酸化窒素 (NO) を捕捉するため、血管収縮・腸管収縮作用等の副作用を生じうる⁷⁾。ただし、この NO 捕捉による血管収縮・血圧上昇作用をショック時の昇圧剤として応用するという考え方もある。

Baxter Healthcare 社はヘモグロビン α 鎖間にアスピリン誘導体を用いて分子内架橋を作ることにより酸素親和性を生理的なレベルまで低下させ、同時に血中滞留時間を延長させた製剤 (HemAssist) を開発した⁸⁾。しかしながら HemAssist は、外傷による出血性ショック時の赤血球代替物としての第 3 相試験において死亡率の増加が認められたため開発は中断され、Baxter Healthcare 社は HemAssist Project から 1998 年 9 月に撤退した。HemAssist の死亡率増加にはヘモグロビンによる NO 除去作用が関与している可能性がある。その後 Baxter Healthcare 社は、組み替えヘモグロビン技術 (Somatogen 社、Baxter Healthcare 社が買収) を応用し、酸素親和性を調整した分子量の大きな製剤を開発中である。

DPG はヘモグロビンの中央でイオン結合することによりヘモグロビンと酸素の結合を妨げているが、味の素は DPG の位置に類似構造の pyridoxal 5'-phosphate (PHP) を結合させることにより P50 を 10 mmHg 付近から 20~22 mmHg まで上げ、さらにヘモグロビン分子を polyethylene glycol (PEG) 鎖で修飾することにより高分子化し、血中半減期を 10 時間以上とした製剤を開発した⁹⁾。その後この製剤は Apex Bioscience 社に売却され、敗血症患者における急性低血圧を対象とした臨床第 2 相試験で有用性が示された。

分子間架橋ヘモグロビンは、ヘモグロビン分子間を重合することにより分子量を大きくし、コロイド浸透圧を低くした製剤である。Biopure 社はウシヘモグロビンをグルタルアルデヒドで架橋し重合した製剤 (Oxyglobin, Hemopure) を開発し、獣医領域に続き臨床においても臨床試験が行われている¹⁰⁾。Northfield Laboratories 社も、ヒトヘモグロビンを同じくグルタルアルデヒドで重合した製剤 (PolyHeme) を開発、臨床試験が行われている。

分子内架橋や分子間架橋による修飾ヘモグロビ

ンは、無細胞型ヘモグロビン (cell free hemoglobin, acellular hemoglobin) であるが、脂質膜 (リポソーム) の中に精製ヘモグロビンをカプセル化した、いわゆる細胞型ヘモグロビン (cellular hemoglobin) もある。細胞型ヘモグロビン製剤は分子量が大きく、NO 除去作用に伴う合併症が生じないとされている。テルモ社はリポソーム包埋型ヘモグロビン (Neo Red Cell) を開発している¹¹⁾。Neo Red Cell は、期限切れ濃厚赤血球を溶血させストローマを除去し濃厚精製ヘモグロビンを作成、これをリポソーム内に封入、さらに表面修飾剤として PEG で修飾することにより作成されている。動物実験において Neo Red Cell の有用性が示されているが、網内系に取り込まれるため長期投与における安全性等については今後の検討を要する。

また輸血によるウイルス感染のリスクが減少し、赤血球代替物開発の意図も変化してきている。すなわち、単なる輸血の代替としてではなく、輸血よりも優れた酸素輸液としての人工血液開発を目指す方向性も出てきた。Hb は NO を捕捉する NO scavenger であることは知られているが、低酸素環境下では NO を放出する NO doner にもなりうることはあまり知られていない。すなわち虚血部位においては血管拡張性に働き、虚血部位の血流を増加させる可能性がある¹²⁾。また S-nitrosylated polyethylene glycol-modified human hemoglobin (SNO-PEG-Hb) は、SFH に人工的に NO を結合させ、ポリエチレングリコール (PEG) で表面を修飾させ、Hb の NO 除去効果による血管収縮の副作用を抑えるのみならず、NO を毛細血管に供給することにより収縮した血管を広げ、酸素を供給する働きを持つ¹³⁾。今後の発展が期待される領域である。

3. 全合成赤血球代替物

これまで述べた製剤はヘモグロビン由来の人工赤血球であるが、ヘモグロビンの材料としてヒトあるいはウシヘモグロビンを用いるため、クロイツフェルトヤコブ病や狂牛病といった、プリオンによる感染症の問題があり得る。全合成による人工赤血球は、このような感染の危険性のない製剤であるが、生体内に無い物質であるため安全性の面でクリアしなければならない課題も多い。酸素運搬体としてヘムを合成し、ヘムを運ぶ担体とし

て静注用脂肪乳剤の油滴を応用した製剤 (lipid-heme-microsphere) や、担体としてリポソームを用いヘムをリポソーム中に包埋した製剤 (liposome-embedded-heme) が開発されている¹⁴⁾。両者とも P50 は 40 mmHg 程であり酸素を離しやすくなっている。

4. アルブミン・ヘム

アルブミンの疎水性内部にヘムを取り込ませた製剤 (albumin-heme) も酸素運搬能を有する¹⁵⁾。ヘムの担体としてアルブミン (遺伝子組み換えアルブミン) を使用しているため毒性が少なく、大量投与時の膠質浸透圧の維持といった長所を有する。

5. Perfluorocarbon 乳剤

他の赤血球代替物としては、Clark らが開発したフッ素化合物の液体である Perfluorocarbon (PFC) がある¹⁶⁾。PFC は血液とは混ざらないため、PFC をエマルジョン粒子とする必要がある。臨床応用された最初の製剤は Fluosol DA 20% (ミドリ十字) であり、1970~1985年まで世界的規模で臨床試験が行われたが、現在は製造が中止されている¹⁷⁾。Fluosol は 20% 製剤のため大気下では 1.6 ml/dl しか酸素を溶解しないため、実際の使用では高濃度酸素の吸入が必要となる。また PFC は体内で網内系に取り込まれ、flu-like 症候群 (発熱、悪寒、頭痛等) や血小板減少が報告されており、生体内代謝・生体内反応に関して不明の点も多い¹⁸⁾。

現在、PFC 濃度を 40~60% とし酸素運搬能を高め (それでも酸素吸入は必要であるが)、保存性にも優れた第 2 世代の PFC 製剤が開発され臨床試験が行われている。Oxygent (Alliance 社) は自己血貯血と組み合わせた臨床第 2 相試験において有用性を示した¹⁹⁾。その一方で、2001年の心臓手術症例を対象とした臨床試験では、脳卒中の発生率を上昇させ臨床試験は中断されている。ただし Alliance 社は、脳卒中の原因は Oxygent ではなく臨床試験プロトコルにあると主張し、新たなプロトコルでの臨床試験が再開される予定となっている。

このように PFC 製剤に関して今後の検討を要する点もあるが、人工赤血球のみならず、酸素運搬液としての可能性 (脳梗塞、心筋梗塞時の還流液、臓器保存液等) についても期待されている。

血小板代替物

1. 血小板代替物とは？

血小板輸血においては、ウイルス感染症等の一般的な輸血後副作用に加えて、短い保存期間 (採血後 72 時間) や需要の増大に伴う供給不足、緊急時の対応といった問題もある。不必要な血小板輸血を慎む努力の一方で、血小板代替物の必要性が高まってきている。

血小板は粘着、凝集、放出、血餅退縮等、多くの機能があるため、これら全てを含む代替物の開発は困難である。血小板代替物の歴史は赤血球代替物と比べて浅く始まったばかりであり、粘着・凝集という、血小板の最も基本的かつ重要な機能を有する血小板代替物の開発が行われつつある。最も単純な人工血小板は、血小板の膜受容体蛋白を担体に固相化したタイプであり、いくつかのモデルが作成されている²⁰⁾。

ただし、止血効果だけを例にあげても、血小板代替物のみで十分な効果を得ることは困難であり、生体の止血能と協調して初めて臨床効果が発揮される。血小板自体についても、膜受容体蛋白の同定、血管損傷部位への粘着機構等、不明な点が多く、それらの解析と平行して血小板代替物の開発が行われている。

2. 血小板代替物

フィブリノーゲンをホルムアルデヒドを用いて正常ヒト赤血球膜に固相化したモデル (Fibrinogen-RBC) は、血小板減少ラットにおいて出血時間を短縮させた²¹⁾。フィブリノーゲンのアミノ酸配列の中で Gp II b/III a との結合に関係する RGD 配列を持った合成ペプチドを共有結合にて赤血球膜に固定したモデル (Thromboerythrocyte) は活性化血小板と特異的に反応して凝集を引き起こす²²⁾。deoxycolate で可溶化した血小板膜蛋白をリポソームに固定化したモデル (Plateletsome) は、Gp I b, Gp II b/III a など 15 種類以上の膜蛋白を含み血小板減少ラットや血小板異常ラットの尾切後の出血を減少させた²³⁾。生体適合性のよいアルブミンの表面をフィブリノーゲンで共有結合、あるいは物理的吸着によりコーティングした製剤 (Thrombosphere, Synthocyte) も作成され、血小板減少ウサギの出血時間を有意に短縮した²⁴⁾。

PRP 社は、期限切れのヒト血小板製剤を反復

凍結融解により破壊した後、加熱処理後乾燥させた粉末製剤 (Infusible Platelet membrane, Cyplex) を開発した。この製剤は加熱処理してあり感染の危険性が少ない、免疫原性が少ない、36ヶ月の保存が可能等の長所があり、臨床第2相試験まで行われた²⁵⁾。しかし原料であるヒト血小板製剤の確保の問題もあり開発は中止された。

日本では池田らのグループが、 γ Gp I b α 、 γ Gp I a/II a等の遺伝子組み換え体をリポソームに固相化した製剤 (γ Gp I b α -liposome, γ Gp I a/II a-liposome, γ Gp I a/II a-Gp I b α -liposome) を作成し血小板減少ラット等での検討を行っている²⁶⁾。さらに同グループでは、遺伝子組み換えヒトアルブミンから調整したアルブミンマイクロソフェアを担体として、同様に γ Gp I b α 、 γ Gp I a/II a等を固相化した製剤を作成、検討を行っている²⁷⁾。

遺伝子組み換えヒト血清アルブミン

ヒト血清アルブミンは主に肝臓で合成され、585個のアミノ酸からなる分子量約66.5 kDaの1本鎖で糖鎖を持たない単純タンパク質である²⁸⁾。医療品としての血漿由来ヒト血清アルブミンは、60℃10時間の液状加熱処理が施された製剤である。これまで30年以上にわたり国内で使用され、臨床使用においてウイルス感染等の報告はされていないが、最近問題となっているプリオン等への安全性については確実ではない。また、血漿分画製剤の自給化は国際的な流れであるが、血漿由来ヒト血清アルブミンの日本における国内自給率は約4分の1しかない²⁹⁾。

遺伝子組み換えヒト血清アルブミン (recombinant human serum albumin, rHSA) はこれらを解決した製剤として期待されている。医薬品としてのrHSAの開発においては、高い生産性(経済性)、大量供給が可能、高い純度の3点が要求され技術的困難を伴うが、近く臨床使用可能となる予定である³⁰⁾。rHSAの開発に用いられた宿主はメタノール資化能を有するピキア酵母 (*Pichia pastoris*) であり、ヒト血清アルブミン構造遺伝子を組み込むことによりrHSAを生産する。高純度のrHSAを生産性を損なわずに産生するために様々な工夫がなされている。rHSAとヒト血清アルブミンの蛋白質構造、抗原性、臨床効果等は徹底的に比較検討されたが、差異は認められなかった^{31,32)}。第

3相臨床試験においても高い安全性と有用性が確認されている。

このようにrHSAは従来の血漿由来ヒト血清アルブミンと同じ効果を持つ医薬品として開発されその有用性が確認されたが、さらに最近ではヘムの担体としてrHSAを使用した赤血球代替物も開発されており、様々な方面への応用が期待されている¹⁵⁾。

最後に

輸血に伴う様々な合併症がなく、緊急時にも対処しうる様々な血液代替物が開発されてきたが、臨床使用可能な製剤はまだ少ない。また血液代替物は、酸素運搬輸液等としての可能性も期待されており、この点からも開発が望まれるところである。将来的には、従来の血液製剤をうまく活用しつつ、新たな血液代替物を効率よく導入していくことが大切かと思われる。

文 献

- 1) Lee CA: Transfusion-transmitted disease. *Baillieres Clin Haematol* 9: 369-394, 1996
- 2) Williamson LM, Warwick RM: Transfusion-associated graft-versus-host disease and its prevention. *Blood Rev* 9: 251-261, 1995
- 3) Tsuchida E: Introduction: Overview and perspectives. In: Tsuchida E eds, *Artificial Red Cells*, Chichester, John Wiley & Sons, 1995, pp.1-20
- 4) 高折益彦: 赤血球代替物の臨床応用をめざして. *人工血液* 8: 85-89, 2000
- 5) Bunn F, Esham W, Bull R: The renal handling of hemoglobin. *J Exp Med* 126: 909-924, 1969
- 6) 土田英俊, 酒井宏水: 酸素輸液の開発動向. *医学のあゆみ* 188: 677-686, 1999
- 7) Motterlini R, Vandegriff KD, Winslow RM: Hemoglobin-nitric oxide interaction and its implications. *transfusion Med Rev* 10: 77-84, 1996
- 8) Burhop K, Marchand G, Farrell L, et al: Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) is an effective low volume resuscitation solution in a swine model of hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 21: S255, 1993
- 9) 岩崎敬治, 山路香里, 岩下雄二: 新しい酸素運搬体としての安定化ヘモグロビン. *人工臓器* 16: 1531-1534, 1987
- 10) Garcia-Callont R, Herrera-Llerandi R, Lopez E: Determinations of safety of infusing a bovine-derived, ultrapure polymerized hemoglobin solution to healthy volunteers. *Biomater Arc Cells & Immob Biotech* 19: 328, 1991
- 11) 鈴木一比好, 宮内雄二, 岡本 武ら: ネオレッドセルの特徴と性能. *人工臓器* 17: 708-711, 1987
- 12) Stamler JS, Jia L, Eu JP, et al: Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 276: 2034-2037, 1997

- 13) Nakai K, Togashi H, Yasukohchi T, et al : Preparation and characterization of SNO-PEG-hemoglobin as a candidate for oxygen transporting material. *Int J Artif Organs* 24 : 322-328, 2001
- 14) Komatsu T, Matsubuchi E, Nishihide H, et al : Lipid-heme/microsphere ; a new totally synthetic oxygen carrier under physiological conditions. *Chem Lett* : 1325-1328, 1992
- 15) 小松晃之, 浜松和芳, 松川泰子ら : リコンビナントアルブミン-ヘム複合体の物性と酸素結合能. *人工血液* 6 : 110-114, 1998
- 16) Clark LC, Gollan F : Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science* 152 : 1755, 1966
- 17) Spence R, Norcross E, Costabile J, et al : Perfluorocarbons as blood substitutes : the early years. Experience with Fluosol DA-20% in the 1980s. *Artif Cells Blood Subst Immobil* 22 : 955-963, 1994
- 18) Flaims S : Pharmacokinetics and side effects of perfluorocarbon-based blood substitutes. *Artif Cells Blood Subst Immobil* 22 : 1043-1054, 1994
- 19) Spahn DR, van Bremp R, Theilmeyer G, et al : Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery. *Anesthesiology* 91 : 1195-1208, 1999
- 20) 村田 満, 池田康夫 : 血小板代替物の意義と開発の現状. *人工血液* 6 : 1-5, 1998
- 21) Agam G, Livine AA : Erythrocytes with covalently-bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia. *Eur J Clin Invest* 22 : 105-112, 1992
- 22) Collar BS, Springer KT, Beer JH, et al : Thromboerythrocytes. In vitro studies of a potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusions. *J Clin Invest* 89 : 546-555, 1992
- 23) Rybak M, Renzulli LA : A liposome based platelet substitutes, the Platesome, with hemostatic efficacy. *Biomater Art Cells & Immob Biotech* 21 : 101-118, 1993
- 24) Levi M, Friederich PW, Middleton S, et al : Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat Med* 5 : 107-111, 1999
- 25) Chao FC, Kim BK, Houranah AM, et al : Infusible platelet membrane microvesicles : A potential transfusion substitutes for platelet. *Transfusion* 36 : 536-542, 1996
- 26) 西谷孝子 : リポソームを用いた血小板代替物へのアプローチ. *人工血液* 8 : 6-12, 2000
- 27) 寺村裕治, 武岡真司, 土田英俊ら : 粒子径を制御したアルブミン重合体の合成と Gplb α 結合体の機能評価. *人工血液* 8 : 90-95, 2000
- 28) Minghetti PP, Ruffner DE, Kuang W-J, et al : A molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4. *J Biol Chem* 261 : 6747-6757, 1986
- 29) 白井了志 : 血漿分画製剤の需給状況と自給率. *血液製剤調査機構だより* 52 : 5-6, 1999
- 30) Fleer R, Yeh P, Amellal N, et al : Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human albumin by *Kluyveromyces* yeasts. *Biotechnology* 9 : 968-975, 1991
- 31) Ohi H, Miura M, Hiramatsu R, et al : The positive and negative cis-acting elements for methanol regulation in the *Pichia pastoris* AOX2 gene. *Mol Gen Genet* 243 : 489-499, 1994
- 32) Ikegami K, Hirose M, Ohmura T, et al : Complete determination of disulfide forms of purified recombinant human serum albumin, secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Anal Chem* 69 : 1986-1991, 1997