

ランチョンセミナー

人工酸素運搬体の開発

—その可能性・現状と課題—

金田伸一

テルモ株式会社研究開発センター

要旨

我々は、非カプセル型人工酸素運搬体の問題点を解決し得る方法として、ヘモグロビン(Hb)をリポソームと呼ばれる脂質カプセル内に封入したカプセル型人工酸素運搬体の開発を行い、Hbのカプセルへの内封技術、表面修飾により生体内での安定性、安全性を向上させる技術、高効率に酸素を運搬するための技術、長期保存を可能にする技術等を開発してきた。また、出血モデルを用いた機能試験並びに、複数の動物種による安全性試験により、輸血代替を目的とした製剤としての基本的な有効性や安全性を確認してきた。また、虚血性疾患の治療への応用についても検討してきた。本稿では、人工酸素運搬体の持つ臨床応用の可能性、開発の現状並びに今後の課題について概説する。

キーワード

人工酸素運搬体、ヘモグロビン、リポソーム、輸血、虚血性疾患

はじめに

輸血は、現代の医療において必須の治療法のひとつであるが、輸血用血液製剤については、高齢化社会の進行に伴う需給状態の変化が懸念されている。また、輸血医療は、副作用、合併症、過誤輸血、感染症等の問題も内包している。現在、輸血の安全性は大幅に向上しているが、なお、輸血の抱えるリスクが完全に払拭されたとは言えないのが現状であろう。そのため、これらの問題の解決手段の一つとなり、現行の輸血医療を補助する製剤

として、血液代替物の開発には期待が持たれている。長期保存が可能で、血液型がなく、輸血副作用や感染症のリスクを回避し得る、赤血球製剤の代替物については、これまでも研究に多くの時間が費やされてきたが、開発中止となった事例も多く、何れも未だ開発の途上にある。

我々は、欧米において開発が先行していた人工酸素運搬体の問題点を解決し得る方法として、ヒト赤血球由来のヘモグロビンをリポソームと呼ばれるナノサイズの脂質カプセル内に封入したカプセル型人工酸素運搬体(Liposomal Hemoglobin:LHb, TRM-645)の開発を行ってきた。

本稿では、人工酸素運搬体の持つ可能性、開発の現状並びに今後の課題について概説する。

人工酸素運搬体とは

輸血療法の代替を考えると、赤血球の主たる機能は酸素運搬であり、それを代替することが出来れば、赤血球輸血に期待される主たる効果の代償が可能と考えられる。赤血球による酸素運搬は、血球内に存在するヘモグロビンが、肺で酸素を結合し、組織で解離することにより行われる。ヘモグロビンは、酸素分圧に応じ酸素との結合率(酸素飽和度)が変化することから、肺胞内と末梢組織での酸素分圧較差に対応した量の酸素を着脱することにより全身へ酸素を供給している。すなわち、この酸素運搬機能を代替することにより、人工酸素運搬体は赤血球の代替物として成立することになる。

表1 人工酸素運搬体の開発状況

開発企業等	名称	性状	酸素運搬物質	開発段階
〔非カプセル型〕				
Baxter	HemAssist	diaspirin 誘導体分子内架橋	ヒトヘモグロビン	開発中止
Baxter	—	—	遺伝子組換えヒトヘモグロビン	開発中止
Northfield	PolyHem	glutaraldehyde 分子間重合	ヒトヘモグロビン	PhⅢ
Hemosol	Hemolink	O-reffinose 分子内/間架橋	ヒトヘモグロビン	開発中止
Biopure	Hemopure	glutaraldehyde 分子間重合	重合ウシヘモグロビン	申請中
Sangart	Hemospan	PEG 抱合	ヒトヘモグロビン	PhⅢ
〔カプセル型〕				
Narval Research	LEH	ヘモグロビン封入リポソーム	ヒト・ウシヘモグロビン	開発中止
オキシエクス/ニプロ	HbV	ヘモグロビン封入リポソーム	ヒトヘモグロビン	前臨床
テルモ	LHb	ヘモグロビン封入リポソーム	ヒトヘモグロビン	前臨床
〔パーフルオロケミカル〕				
Alliance	Oxygent	パーフルオロケミカル乳剤	Perfluorooctylbromide	PhⅢ 中断
〔その他〕				
早稲田大学	Albumin-heme	アルブミン包接ヘム類縁体	—	前臨床

人工酸素運搬体の開発状況

表1に、これまでに開発が行われた、あるいは現在開発が行われている主な人工酸素運搬体を示した<sup>1)~3)</sup>。人工酸素運搬体は、その技術的内容から、1)パーフルオロケミカル(PFC)を利用するもの、2)赤血球由来のヘモグロビンやその誘導体を利用するもの、3)ヘム類縁物質を利用するものの3種類に大別される。

PFCは酸素を物理的に高濃度に溶解出来ることから、ヘモグロビンに代わる酸素運搬物質として利用が検討されてきた。PFC製剤の場合、酸素は物理的に溶解されるため、酸素飽和度が酸素分圧の変化に対して直線的に変化し、吸入する空気中の酸素分圧を非常に高く保たないと、赤血球に比べ酸素運搬効率が低くなる。PFC製剤としては、ミドリ十字社がperfluorodecarinを主成分とした乳剤Fluosol-DAを開発し、国内外での臨床検討も行われたが<sup>4)</sup>、安全性等の問題もあり、開発は中止された。その後PFC製剤については、米国Alliance社により、さらに高濃度のパーフルオロケミカルを含有することで、酸素運搬能を向上させた製剤として、Fuluorooctylbromideを主成分とし、リン脂質を用いて乳剤化したOxygentの開発が進められてきた<sup>5)</sup>。しかし、2001年に心臓バイパ

ス手術の患者を対象とした臨床第Ⅲ相試験において、脳卒中の発症率が、同製剤投与群で、対照群に比較して高いという結果が出たため治験が中断された。

現在、最も多く検討が行われているのが、赤血球の酸素運搬能を担うヘモグロビンを利用した人工酸素運搬体である。赤血球由来のヘモグロビンを利用した人工酸素運搬体は、ヘモグロビン分子に種々の化学的修飾を加えた修飾ヘモグロビン製剤(非カプセル型)と、リポソームと呼ばれる脂質カプセル内にヘモグロビンを封入し、細胞様の構造を人工的に作ったカプセル型に分けられる。赤血球においては、解糖系の中間産物である2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG)がアロステリック因子として作用し、ヘモグロビンの酸素親和性をコントロールすることで、生体内における酸素運搬効率を高めている。赤血球を溶血させ、ヘモグロビンを抽出した場合、アロステリック因子である2,3-DPGが失われることにより、ヘモグロビンの酸素親和性が亢進し、末梢静脈血の酸素分圧下では酸素の解離が起こり難くなり、酸素運搬効率が低下する。さらに、ヘモグロビンが血管内にフリーの状態で存在する場合、4量体のヘモグロビン分子は、容易に2量体に解離し、腎糸球体で濾過され、血中での半減期が著しく短く

なる。Baxter 社で開発された HemAssist は、ヘモグロビンの  $\alpha$  サブユニット間を diaspirin 誘導体で架橋し、酸素親和性を低下させて、酸素運搬体としての酸素運搬効率を高めるとともに、生体内でのサブユニット解離を回避し血中滞留性を向上させたものである。本製剤は、米国において第Ⅲ相臨床試験の段階まで開発が進められていたが、出血性ショックの患者を対象とした臨床治験において、同剤投与群で死亡率が高くなった<sup>6)</sup>こと等から開発が中止された。血管内皮細胞で産生される一酸化窒素 (NO) は、血管弛緩因子として平滑筋細胞を弛緩させ、血管壁の緊張状態をコントロールしていることが知られているが、血管内にフリーで存在するヘモグロビンは、容易に血管外に漏出し、NO と結合して血管の収縮を引き起こす可能性が示唆されている。前述の HemAssist においても、血圧上昇作用が認められており、また、同製剤投与時に認められた心筋や脾臓といった組織、臓器における障害についても、この機序が関与している可能性があると考えられる。そこで、ヘモグロビン分子を重合化、あるいは分子間架橋するといった手段により、分子のサイズを大きくし、この現象を回避しようとする試みがなされている。これらの製剤としては、Biopure 社の Hemopure (glutaraldehyde 重合ウシヘモグロビン)、Northfield 社の PolyHeme (glutaraldehyde 重合ヒトヘモグロビン)、Hemosol 社の Hemolink (o-raffinose 架橋ヒトヘモグロビン) がある。Hemopure は 2001 年に南アフリカにおいて製造承認を受け、実際に臨床応用がなされている。米国では、FDA への承認申請を行ったものの未だ承認が得られておらず、現在、試験デザインを変更して再度臨床試験を実施すべく、FDA への申請を行っている。また、PolyHeme については、trauma を対象とした第Ⅲ相臨床試験が最近終了したが、プライマリーエンドポイントを達成出来なかったと報告されている。さらに Hemolink については、第Ⅲ相試験まで実施されたが開発は中止された。

Sangart 社が開発中の Hemospan は、ヒトヘモグロビンに PEG を修飾し分子量を増大させ

た製剤である。当該製剤は、ヘモグロビン濃度が 4g/dL 程度と低く、且つ  $P_{50}$  が 5~6mmHg と酸素親和性が極端に高い点で、他のヘモグロビン由来製剤と大きく性状を異にしているが、非臨床試験では、末梢組織の酸素化に優れているとの結果を報告している<sup>7)</sup>。

一方、カプセル型人工酸素運搬体では、ヘモグロビンはリポソーム内に封入されており、修飾ヘモグロビンに比べカプセルの大きさが非常に大きいことから、血管外への遊出が起り難い等の要因により、非カプセル型で見られた、ヘモグロビンに由来する副作用は起り難いと考えられている。また、膠質浸透圧をほとんど持たず必要に応じた調整が可能である、リポソーム内水相環境や添加物質の調節により酸素親和性を容易に制御可能である、ヘモグロビンに修飾を行う必要がなく抗原性、代謝の点での問題が少ないといった利点を有すると考えられる。また、リポソーム構成成分についても、生体膜に近い成分にて構成可能であるため、カプセルの代謝の面でも問題は少なく、安全性が高いと考えられる。カプセル型人工酸素運搬体は、現在、本邦で、オキシジェニクス社、テルモ社により開発が進められており<sup>2)</sup>、何れも、非臨床試験が行われている段階である。

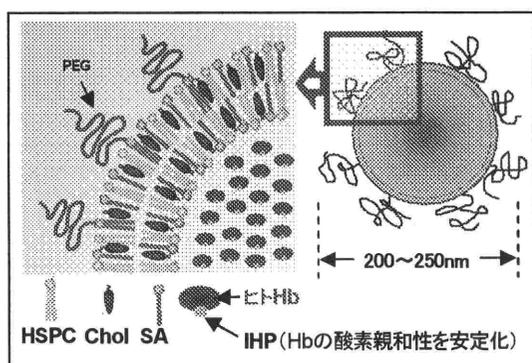
また、ヘム類縁物質を利用する完全合成型人工酸素運搬体として、アルブミン-ヘム複合体が報告されている<sup>8)</sup>。酸素錯体を形成する合成のヘム誘導体をアルブミンに包接させたもので、ヘモグロビンに近い酸素解離曲線を示し、リコンビナントアルブミンの製造技術と組み合わせることにより、非血液由来材料による人工酸素運搬体が調製され得る。本製剤についても、現在、前臨床試験が進行中であるとされている。

人工酸素運搬体については、これまでも、非臨床試験、臨床試験を通じて、その有効性と問題点についての検証がなされてきたが、カプセル型やアルブミンヘムのような全合成型といった第二世代、第三世代の製剤がこれらの問題点をどこまで解決できるのかにより、その可能性と限界が、さらに明確になっていくものと考えられる。

### カプセル型人工酸素運搬体開発の現状

図1に、現在開発中のカプセル型人工酸素運搬体の構成を示した。カプセル型人工酸素運搬体は図のようにリポソーム膜成分である脂質と内水相のヘモグロビン及びアロステリック因子から成り立っており、我々は、このヘモグロビンを脂質カプセル内に封入した人工酸素運搬体をリポソーム化ヘモグロビン(LHb)と呼んでいる。

図1 カプセル型人工酸素運搬体の構成



カプセル型人工酸素運搬体は、高濃度のヘモグロビン溶液を内水相に含有するリポソーム製剤であり、平均粒子径が200-250nm程度のサイズに調製されている。前述したヘモグロビンの血管内皮細胞の間隙からの漏出を防ぐには、最低100nm程度の大きさが必要と言われているが、修飾ヘモグロビン製剤の分子内架橋型はもとより、重合型でも分子のサイズとしてはこの大きさには到達出来ず、漏出を完全に抑えることは困難であると考えられる。一方、カプセル型では、カプセル自体にそれ以上の大きさを持たせることが可能であり、ヘモグロビンに処理を行うことなしに、非カプセル型で見られる副作用の回避が可能となると考えられる。

また、イノシトール6リン酸(IHP)はアロステリック因子として、ヘモグロビンの酸素親和性を調節し、人工酸素運搬体の酸素運搬効率を高めることに寄与している。

さらに、リポソームを血管内に投与した場合、細網内皮系に取り込まれ、速やかに血中から除去されてしまうことから、リポソーム

表面をPolyethylene-glycol(PEG)等の親水性高分子化合物で修飾し、血中での滞留時間を延ばす技術を開発した。これにより血液中的安定性や、生体成分との相互作用を抑制することによる安全性の向上が達成された。

リポソーム内に封入されるヘモグロビンは期限切れ赤血球製剤から調製される。この際、赤血球洗浄工程で残留白血球や血漿成分の除去を行い、続いて、溶血とSD法によるウイルス不活化を行い、次にSD除去とHbの精製を行う。さらにウイルス除去工程を経て、最終段階で、濃縮、濾過滅菌を行い、人工酸素運搬体調製の原料としてのヘモグロビンを得る。

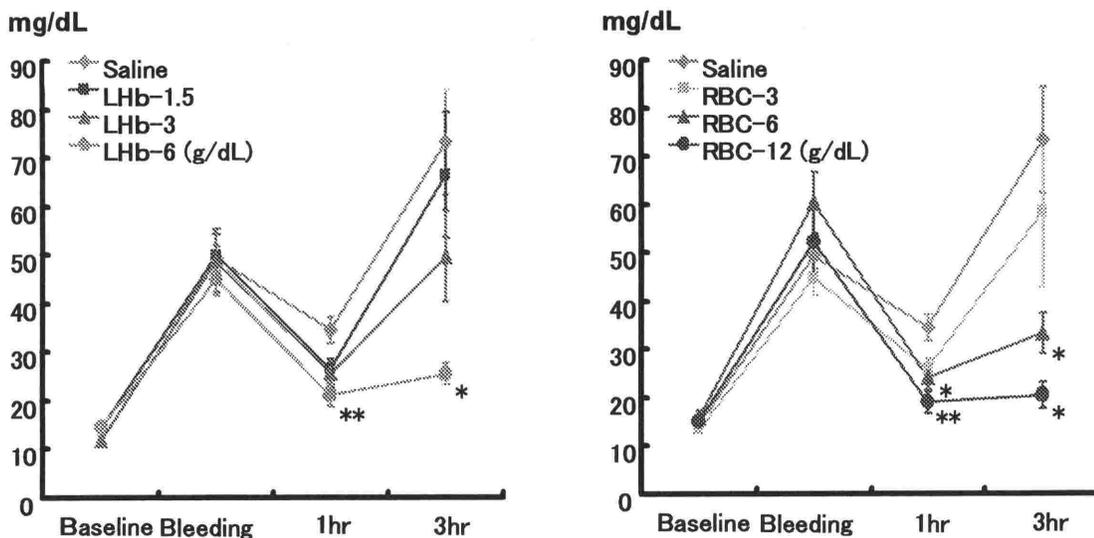
このヘモグロビンにカプセルの原料である脂質と、アロステリック因子であるIHPを添加し、乳化工程でカプセル内にヘモグロビンの封入を行う。続いて未封入のヘモグロビンを除去し、脱酸素化、PEG修飾工程にて脱酸素、PEG修飾を行いLHb製剤とする。リポソーム製剤においては、加熱による最終滅菌が困難なことから、無菌操作法による製造を行う必要があり、ヘモグロビンの濾過滅菌後のLHb製造工程では、添加される原料類は全てろ過滅菌後工程に導入される。

現在、我々は、治験薬GMPに則り、治験薬の製造を行うための製造プラントでの試作検討、バリデーション作業を進めている。

人工酸素運搬体の保存中の最大の問題として、ヘモグロビンのメト化によりその機能が低下することが挙げられる。製造された人工酸素運搬体の長期保存を可能とするため、製造工程で、製剤を脱酸素化し、その後、脱酸素状態を維持しつつ、容器に分注、ガスバリア性のある包装を行なって保存することで、メト化の進行を完全に抑制することに成功し、1年位以上の保存安定性に目処をつけた。現在、さらに長期の保存、あるいは冷蔵保存ではなく室温保存が可能かについても検討を行っている。

次に、人工酸素運搬体の非臨床試験について述べる。人工酸素運搬体については、所謂リポソーム製剤として新規の医薬品に求められる、安全性、安全性薬理、体内動態に関する非臨床試験の実施が求められると考えられ

図2 ラット急性出血モデルにおける血漿乳酸値の変動



Each value represents the Mean  $\pm$  S.E. of 7 rats per each group.  
 \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$  vs Saline (Dunnett's test)

る。我々は、これまでに複数の動物を用いた安全性並びに安全性薬理、体内動態の試験を行ってきており、血液代替物としての基本的なレベルでの安全性、血中での持続性は有すると判断している。しかしながら、輸血の代替を想定した場合、投与を受ける患者は、出血性ショック等、生体の恒常性が著しく損なわれた状態であることが多いと想定され、これらの状態を想定した動物モデルでの安全性評価も必要であることから、今後の課題として取り組んでいく予定である。

また、人工酸素運搬体として機能、有効性についても、複数の動物種において検証を行ってきた。図2には、ラット急性失血モデルを用いた評価結果を示した。ラットはまず血液を代用血漿（ヘスパンダー）を用いて50%程度希釈し、さらに脱血を行った後、異なるヘモグロビン濃度にて、人工酸素運搬体または洗浄赤血球を投与した。全身の酸素代謝の指標としての血中乳酸値は、出血によって上昇し、人工酸素運搬体または洗浄赤血球の投与により低下する。その後再び上昇に転ずるが、投与ヘモグロビン量に依存して、その上昇が抑制され、乳酸値を低値で維持する効果

が認められた。

また、イヌ、サルにて代用血漿を用い、血液を80-85%程度希釈した、高度血液希釈モデルにおいても、生体内での酸素運搬能力を裏付ける結果が得られている。

一方、生体内での人工酸素運搬体の機能、持続性は、リポソームとしての血中での動態と同時に、血中でのメト化の進行速度に依存することとなる。赤血球にはHbのメト化を抑制する何重もの機構が存在する。当初我々は、同様の機構をリポソーム内に持ち込み構築することを試みたが<sup>9)</sup>、ウイルス等に対する安全性確保の観点よりヘモグロビンを高度精製処理することを優先した結果、メト化抑制機構の組込みが困難となった。その結果、生体内に人工酸素運搬体を投与した場合、経時的にメト化が進むことから、その機能の維持時間は、リポソームとしての動態にメト化の進行速度を掛け合わせた結果として得られる。

複数の動物種を用いた検討の結果、リポソームの動態、血中でのメト化の進行には大きな種差が存在することが明らかになったが、霊長類（カニクイザル）での検討結果より、ヒトでは、機能の半減期として24~30時間程度

となることが期待される。

以上のように、人工酸素運搬体が生体内で実際に酸素運搬体として機能することが確認されたが、その一方で、投与量の限界、機能の持続時間は赤血球輸血に比較して著しく短い等の課題の存在も明確になって来ている。

#### 人工酸素運搬体の臨床応用

人工酸素運搬体の臨床適用の領域については、緊急時の輸血代替、輸血用の長期備蓄、さらには体外循環、臓器保護液、虚血性疾患治療等が考えられている<sup>10)</sup>。

輸血代替物としての人工酸素運搬体の有用性については、輸血検査不要、長期保存が可能、輸血副作用の回避等考えられるが、前述のように、その安全性や機能の観点からは、輸血を完全に置き換え得るものではなく、血液型がなく、クロスマッチが不要、どのような血液型の患者にも使用可能、輸血副作用の低減、長期保存が可能といった利点を生かし、輸血を補助する製剤として位置付け、活用されることが望ましいと考えられる。今後、人工酸素運搬体の有効性と安全性をさらに検討していく中で、輸血代替物としての、適用可能範囲、あるいは人工酸素運搬体の特性を生かせる使用条件等をより明確にしていく予定である。

さらに、その酸素運搬体としての、血液とは異なる低粒子径、低粘性といった特性を生かし、酸素運搬による虚血性疾患等に対する治療効果を期待する検討も進められており、この面でも、可能性が追求されていくことになるう。

#### おわりに

人工酸素運搬体については、その有効性と安全性上の問題点についての検証結果からは、輸血を完全に置換し得るものではなく、その特性を踏まえた使用方法によって、赤血球製剤による輸血を補完するものであるという理解が進んできている。今後、輸血代替物として、あるいは、それ以外の適用についても、より現実的な臨床適用のあり方が模索されていくものと考えられる。

#### 参考文献

- 1) Kim HW *Artif Organs* 28:813-828,2004
- 2) 日経バイオ年鑑 2006, 日経BP社, 2005
- 3) Winslow RM *Vox Sang* 91: 102-110,2006
- 4) 薄場 彰 *人工血液* 2:9-14,1994
- 5) 仲井邦彦, 佐久間一郎, 福島昭二 他 *人工血液* 8:43-51.2000
- 6) Sloan EP *JAMA* 282:1857-1864,1999
- 7) Winslow RM *Artif Organs* 28:800-806,2004
- 8) 甲斐俊哉, 木田善規, 福富一平 他 *人工血液* 13:34-41,2005
- 9) 緒方嘉貴 *オレオサイエンス* 1:139-146,2001
- 10) 関口定美 *日本臨床* 55:2439-2446,1997

#### Abstract

We developed liposome-encapsulated hemoglobin as an artificial oxygen carrier that can overcome the disadvantages of the non-capsule type of oxygen carriers that are on clinical trial. We have established several technologies as follows; for encapsulation of hemoglobin with high efficiency, ensuring its stability in the blood, ensuring safety of intravenous administration, oxygen transportation with high efficiency and ensuring long-term storage stability. We have also confirmed the fundamental safety and efficacy of oxygen delivery of the product as a red blood cell substitute in animal studies involving exchange transfusion. We have been also studying the possibility of treatment of ischemic diseases with the capsule-type artificial oxygen carrier, and have been conducting prospective animal experiments.

In this paper, we describe the future prospects of the clinical use of the artificial oxygen carrier, the current status of its development and other future issues related to the product.