

東海大学大学院令和 4 年度博士論文

マウス気管移植モデルにおける  
ヘモグロビン小胞体による  
上皮下毛細血管の早期再灌流と酸素運搬

指導 岩崎正之 教授

東海大学大学院医学研究科

先端医科学専攻

小野沢 博登

## 総括

【背景】ヘモグロビン小胞体 (Hemoglobin Vesicles; HbV) は期限切れのヒト赤血球から抽出した濃縮ヘモグロビンをリポソーム化した人工酸素運搬体、いわゆる人工赤血球である。救急現場での使用はもちろん、手術時の出血に対する輸血代替品としての利用が期待されている。赤血球と比較して HbV は粒子径が 250nm と小さいため、虚血に陥った組織の毛細血管を効率よく灌流することが可能であると考えられる。

【目的】気管移植動物モデルを用いて、HbV による移植臓器の毛細血管再灌流を評価して赤血球との比較を行うこと。

【方法】ドナー、レシピエントともに同系マウスを用い、レシピエント気管とグラフト気管を同時に組織学的に観察可能な並行気管移植モデルを作成した。ドナー気管の両端をレシピエント気管に端側吻合し、2本の気管が並走する手術を行う。移植後、HbV 溶液 (Hb 濃度 10g/dL) 0.3ml を尾静脈より投与した。術後 1、4、6、8 時間でレシピエントを安楽死させた。並走する 2本の気管を摘出し、気管

上皮下毛細血管 (Subepithelial capillaries; SEC) の再灌流を電子顕微鏡を用いて組織学的に評価した。また、HbV による酸素運搬量を算出した。

【結果】レシピエント気管の SEC では、手術および HbV 投与の 1～8 時間後の全ての時点で赤血球とともに直径約 250nm の微粒子が大量に観察され、電子顕微鏡で形態から HbV であることが確認された。グラフト気管の SEC では、赤血球の灌流は移植後 1 時間と 4 時間では認めず、6 時間後から再灌流が確認された。一方、HbV は 1 時間後では確認できなかったが、4 時間後には灌流が始まり、6 時間と 8 時間後の灌流も確認された。SEC の単位断面積あたりの HbV 数の時間経過を、レシピエントとグラフト気管 (n=5) の間で比較、検討した。レシピエント気管では、1 時間後を最大値として時間とともに HbV 数が減少していく傾向を認めた。グラフト気管では 4 時間後に  $2.4 \pm 2.6$  ( $/\mu\text{m}^2$ ) , 6 時間後に  $6.4 \pm 4.6$  ( $/\mu\text{m}^2$ ) と増加し , 8 時間後に  $4.4 \pm 5.4$  ( $/\mu\text{m}^2$ ) の HbV 粒子が観察された。グラフト気管の SEC 単位断面積あたりの推定酸素運搬流量は 4 時間と 6 時間後で

それぞれ  $12 \pm 13 \times 10^{-12}$  と  $33 \pm 23 \times 10^{-12}$  ml/mm<sup>2</sup>/s であった。

【考察】本研究は、移植組織の毛細血管内に再灌流した人工酸素運搬体である HbV を電子顕微鏡で観察した最初の研究である。赤血球の再灌流が始まっていない移植後 4 時間という時点で、グラフト気管の SEC に 250 nm の HbV 粒子が相当数確認できたことは驚くべき結果であった。また、ヘモグロビン小胞体の灌流量から、SEC への単位断面積あたりの酸素流量は、径 8μm の毛細血管であれば 1 時間あたり  $9.5 \times 10^6 \mu\text{m}^3$  の酸素が流れる計算となり、グラフト気管の創傷治癒、生着に寄与する可能性があると考えられる。

【結論】移植組織の毛細血管における HbV による再灌流は、移植後 4 時間という早い段階で始まっており、赤血球よりも先に再吻合部位を通過していることが明らかになった。HbV は赤血球と同様の酸素運搬能力を有することから、虚血障害を軽減し、移植手術における縫合不全や移植臓器の機能不全の予防に寄与する可能性がある。

## 研究の背景

赤血球は生体内で酸素運搬を担う主要な血液細胞であり、その機能は内部に含まれるヘモグロビン(Hemoglobin; Hb)による。赤血球輸血は外傷や手術時のなどの大量出血の際などに用いられ、その有効性は疑いのないものになっている。一方で赤血球輸血にはウイルス感染の問題や、交差適合試験の必要があるなど、緊急時の使用に関して問題が残っている。また、供給の安定性の面においても、赤血球製剤は低温保存が原則であり、保存期間も 1-2 ヶ月と短い。血液需要過多が発生した場合に供給不足に陥る可能性が想定され、日本では少子高齢化の影響もあり慢性的な血液製剤不足に陥ることが懸念されている。2014 年の日本赤十字社の発表では近い将来に 100 万人分の血液が不足する可能性が試算されている。このような社会的背景があり、厚生労働省が掲げる血液製剤の安全性の向上及び安定供給の確保に関する基本的な指針において、人工血液等の輸血代替物の研究開発が推進されている。人工酸素運搬体は輸血代替物として現状の献血-輸血システムの抱える問題を解決し、補完する存在として早期の実用化が期待されている。

人工酸素運搬体の歴史を振り返ると、1957 年に Chang らが Hb を高分子膜で被包化したナノカプセルを開発し、それを契機に様々な人工酸素運搬体の開発が始まった。中でも Hb をベースとした酸素運搬体(Hb-based oxygen carriers; HBOCs)が現状の輸血代替物開発の主流となっている。HBOCs の原料である精製 Hb は、単独の投与を行うと腎排泄による急速な血中濃度低下が起き、腎障害も惹起する。これらの問題を改善すべく国内外を中心に様々な修飾型 Hb の開発が進んでいった。修飾型 Hb は、Hb 自体に化学的な修飾を加えたもので、重合型、分子内架橋型、高分子型などが開発された経緯があり、様々な臨床試験が行われた。しかし、Natason らの修飾型 Hb に関する報告によると、HBOCs を使用した過去の臨床試験のメタ解析では死亡率と心合併症の発生が有意に高いことが判明した。修飾型 Hb は末梢血管で NO をトラップすることにより、高度の血圧上昇を引き起こし、心血管系の合併症を増加させると考えられている。この結果を受け、修飾型 Hb の開発を牽引していた米国 Sangart 社も 2013 年に開発を中止した。

一方、国内では Hb 自体に修飾を施すものではなく、Hb を赤血球と同様に脂質膜などで被包化する構造を構築した。いわゆる細胞型 HBOCs とされ、開発が進んでいった。ヘモグロビン小胞体 (Hemoglobin vesicles; HbV) はその一つとして開発された。HbV は期限切れのヒト赤血球 (RBC) から抽出されたヒトヘモグロビンを含むリポソームである。直径が 250 nm のこの粒子は、血液の滞留時間を長くするためにポリエチレングリコールで表面を修飾した脂質二重層膜を有しており生体親和性が高い特徴がある。様々な動物実験により、HbV の出血性ショックに対する蘇生効果や酸素運搬能力などの有効性と安全性が証明されている。そして救急医療や大規模災害、遠隔地などでの赤血球輸血の代替としての利用が期待されている。2020 年および 2021 年に日本医療研究開発機構 (AMED) の支援で第 1 相臨床試験が行われ、HbV が初めてヒトに投与された。

HbV は非感染性でクロスマッチが不要、室温で 2 年以上保存できるため、手術室での迅速な使用に理想的である。術中の突然の大量出血に対しても、遅滞なく投与することができると考えられる。我々は

過去の研究で、肺切除の動物モデルでは急性期・長期期ともに HbV 投与で循環動態が安定し、術後の回復に長期的に大きな悪影響はなかったという結果を報告している。

HbV は 250nm と赤血球よりはるかに小さい粒子径を持つなど、臨床的に有用な様々な特徴を持っている。HbV の臨床応用が期待される分野の一つに移植医療が挙げられる。移植手術において、移植吻合部の縫合不全や移植臓器の機能不全は、重要な合併症の一つである。移植手術では血流障害は起こりやすく、吻合部での虚血は離開などの重大な合併症を引き起こす。特に肺移植では気管支動脈が吻合されないため、気管支の毛細血管の血流は肺動脈や肺静脈からの側副血行路から供給されることになる。そのため気管支の吻合部での血流と酸素供給には常に注意を払う必要がある。

HbV はその小さな粒子径から末梢組織での微小循環に有利である可能性が指摘されている。我々は、気管を栄養する血管が吻合されていないマウス気管移植モデルにおいて、HbV が赤血球よりも早くグラフト気管内の毛細血管を再灌流させるのではないかという仮説を

立てた。そこで、気管移植モデルにおいて、HbV による毛細血管の再灌流を評価し、赤血球による再灌流と比較することを目的とした。

## 考察と展望

本研究は HbV（人工酸素運搬体）で再灌流した移植組織の毛細血管を電子顕微鏡で観察した最初の研究である。移植後 4 時間という赤血球の再灌流が始まっていない時期に、グラフト気管の SEC に 250nm の HbV 粒子が相当数確認できたことは驚くべき結果であった。

臓器移植を含む外科手術においては、吻合不全や縫合不全を防ぐことが重要である。縫合不全の多くは組織間の血行不良や虚血に起因するため、外科医は常に吻合部位の血流と酸素供給に注意を払う必要がある。一刻も早く血管がつながり、組織間の血流を共有する必要があると考えられている。血管吻合を行わない気管移植モデルの本実験では、直径 250nm の HbV 粒子が通過できる毛細血管の吻合が移植後 4 時間以内に始まり、赤血球の通過は 6 時間後に確認され

た。HbV が生体内で酸素運搬能力を持つことは様々な動物モデルで確認されているので、赤血球よりも早く虚血組織に酸素を供給できれば、縫合不全や移植臓器の機能不全を防ぐことに貢献できる可能性がある。

SEC の HbV の数は経時的に変化し、レシピエント気管とグラフト気管とで異なる傾向が見られた。レシピエント気管では、最初に HbV 粒子の最大数が観察され、その後に減少傾向を認めた。これは、血液中の HbV の滞留時間が赤血球よりも短く設計されているためである。時間の経過とともに肝臓や脾臓などの網内系に捕捉され、分解を受けることで赤血球と同様に代謝される。一方、グラフト気管では、4 時間後では HbV の数は少なかったが、6 時間後には毛細血管の再吻合が進むにつれて増加し、その後、肝臓や脾臓に捕捉されることにより減少したと考えられる。脾動脈を結紮したり、脾臓を切除したりすると、より多くの HbV が長期間にわたって血中に確認できるかもしれない。

SEC 内の HbV による酸素運搬流量の算出では、グラフト気管での

SEC 内ヘモグロビン濃度は、赤血球が灌流していなかった 4 時間後で平均 2.4 g/dL に達していた。また、血漿中の溶存酸素量は 0.3 ml/dL 以下と考えられるが、HbV による酸素含量は平均 3.1 ml/dL と算出された。6 時間後には、SEC 単位断面積当たりの酸素運搬流量は平均  $33 \times 10^{-12}$  ml/ $\mu\text{m}^2/\text{s}$  なので径 8 $\mu\text{m}$  の毛細血管であれば、1 時間に  $9.5 \times 10^6$   $\mu\text{m}^3$  の酸素が流れる計算となる。これだけの酸素が SEC を灌流すれば、グラフト気管の創傷治癒、生着に寄与する可能性がある。

組織の虚血状態は、血管新生を誘発し、新しい血管網を構築するきっかけとなることが報告されている。傷ついた血管からの萌芽、伸長、分枝が血管吻合を促進し、再灌流につながる。また、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) は内皮細胞の増殖と遊走を促進する強力な因子であることが知られており、関連があると思われる。Plock らは HbV 投与が重症虚血皮膚フラップの組織生存率と創傷治癒を改善することを報告している。彼らは、循環血液量の 20% が HbV 溶液で希釈されることで、内皮型一酸化窒素合成酵

素 (endothelial nitric oxide synthase; eNOS) を介した血管新生が促されることを報告した。このような HbV の創傷治癒に対する効果は、皮膚以外の臓器でも期待できると思われる。我々の気管移植モデルでも、おそらく同様の機序で毛細血管の伸長と再吻合が 4 時間以内に起こったと思われる。毛細血管が再吻合した場所は、レシピエント気管とグラフト気管の吻合部と考えられるが、グラフト気管と脂肪組織などの周辺組織との間で毛細血管の再吻合が生じた可能性もある。今後の研究では、血管に色素を注入して血管壁を染色し、グラフト気管周囲の毛細血管網が再構築される経過を観察することを計画している。

この研究の限界は、HbV による酸素供給が移植気管の生着や吻合部の創傷治癒に寄与しているかどうかを評価していない点である。移植臓器の創傷治癒や生着に寄与するために必要な HbV の量はまだ検討されていない。今後、臓器移植における HbV 早期灌流による機能的有効性を検討する実験を実施する予定である。これまでの周術期出血動物モデルを用いた実験では、HbV 投与によって腎皮質の

組織酸素分圧が上昇し、組織における低酸素誘導因子（Hypoxia-Inducible factor; HIF-1 $\alpha$ ）の発現が低下することを確認している。しかし、気管移植モデルのマウスでは、組織酸素分圧の測定が困難である。そのため今後の研究では、ブタなどの大型動物を用いた気管移植モデルを採用し、HbV による灌流の寄与を検討する予定である。

さらに、HbV が有する付加的な機能がもたらす効果も検証する必要がある。高酸素親和性 HbV は、アロステリック因子を変更することで P50 を 9 Torr に低下させ、より多くの酸素を運ぶことができ、組織の酸素化に貢献する。一酸化炭素結合型 HbV (CO-HbV) には、抗酸化・抗炎症機能がある。これらの特殊型 HbV は微小循環不全状態の移植組織の酸素化にも有効である可能性があり、さらなる効果をもたらしことが期待されている。

## 結論

以上より、移植組織の毛細血管での HbV による再灌流は、移植後 4 時間という早い段階で始まっており、HbV は赤血球よりも先に毛

細血管の再吻合部位を通過していることが明らかになった。HbV は赤血球と同様の酸素運搬能力を有することから、虚血障害を軽減し、移植組織の治癒に寄与する可能性があると考えられる。