

## 論文の内容の要旨

少子高齢化に伴う献血者数の減少により、輸血液不足が社会問題となっている。また、赤血球製剤の保存期間は3週間と短いため、災害時に必要十分量の輸血液を確保できない状況に陥る可能性がある。そのような背景から、安全で長期保存可能な赤血球代替物(人工酸素運搬体)の実現に大きな期待がよせられている。本研究は、3種類の人工酸素運搬体と1種類の人工血漿増量剤を合成し、その構造と機能、安全性と有効性を明らかにすることを目的とした。

第1章は序論である。輸血治療の現状と課題、人工酸素運搬体、人工血漿増量剤の歴史、代表的な製剤の特徴や臨床試験の状況、課題について概説している。

小松らはヒト人工酸素運搬体として、ヘモグロビン(Hb)の分子表面に3個のヒト血清アルブミン(HSA)を結合した(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター(Hb-HSA<sub>3</sub>)を合成し、その安全性を実証してきた。そこで第2章では、50%出血性ショックラットにHb-HSA<sub>3</sub>溶液を投与することにより循環動態が回復することを証明し、Hb-HSA<sub>3</sub>の優れた有効性を明らかにしている。

Hbを用いた人工酸素運搬体の課題の一つはHbの自動酸化に伴う酸素運搬能の低下である。赤血球からストロマ(赤血球膜)成分のみを除去したストロマフリーヘモグロビン(SFHb)が活性酸素不均化酵素を含有していることに着目し、第3章ではSFHbを重合して得た微粒子の表面にHSAを結合したストロマフリーヘモグロビナノ粒子(SFHbNP)の合成し、その機能と構造について述べている。SFHbNP(粒径約90nm)が高い抗酸化能と優れた血液適合性を有する人工酸素運搬体となることを示している。

日本には動物用血液バンクは存在しないため、獣医療における輸血液不足はきわめて深刻な問題である。一方、ポリオキサズリン(POx)は優れた免疫学的ステルス性を持ち、体内に蓄積しない生体適合性の高い水溶性高分子である。第4章では動物用人工酸素運搬体として、Hbの分子表面にPOxを結合したPOx-Hbを合成し、その構造と酸素結合能について述べている。また、血液適合性試験や出血性ショックラットの蘇生実験から、安全性と有効性を実証している。

動物用アルブミン製剤を安定的に確保することは難しく、人工血漿増量剤も必要とされている。そこで第5章では、ブタ血清アルブミン(PSA)の分子表面にPOxを結合したPOx-PSAを合成し、その構造と膠質浸透圧について述べている。また、免疫原性評価や血中滞留性評価、出血性ショックラットの蘇生実験により、安全性と有効性を明らかにしている。

第6章は本論文の総括と将来展望である。

以上のように本論文では、計4種類の血液代替物を精密合成し、それらの構造と機能、安全性と有効性を物理化学実験や動物実験から詳細に解明した結果がまとめられている。これらは、ヒト用のみならず動物(イヌ・ネコ)用の血液代替物を実用化するための足掛かりとしてきわめて重要な成果といえる。

## 論文審査の結果の要旨

### 1. 論文の主題

#### Synthesis of Hemoglobin-Based O<sub>2</sub> Carriers and Albumin-Based Plasma Expander as Blood Substitutes

(血液代替物としてのヘモグロビンを用いた人工酸素運搬体とアルブミンを用いた人工血漿増量剤の合成)

### 2. 当該研究分野における位置付け

少子高齢化社会における輸血液不足は深刻な問題である。その解決策の一つとして、赤血球代替物(人工酸素運搬体)の開発が強く求められている。ヘモグロビン(Hb)を原料とする人工酸素運搬体はこれまでに数多く合成されてきたが、副作用が回避できず、欧・米・日ではいまだ実用化されていない。さらに動物医療では日本を含む多くの国で血液バンクが存在しないため、安定した輸血液の供給体制が整っていない。赤血球代替物だけでなく、血漿代替物としての人工血漿増量剤も熱望されている。本研究では、ヒト用人工酸素運搬体として ①Hb に血漿タンパク質であるヒト血清アルブミン(HSA)を結合した(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター(Hb-HSA<sub>3</sub>)および ②赤血球内の酵素(カタラーゼ(Cat))を含むストロマフリーHb(SFHb)を重合して得た微粒子の表面にHSAを結合したSFHbナノ粒子(SFHbNP)、動物用人工酸素運搬体として③Hbに生体適合性の高い水溶性高分子であるポリオキサゾリン(POx)を結合したPOx結合Hb(POx-Hb)、動物用人工血漿増量剤として④ブタ血清アルブミン(PSA)にPOxを結合したPOx結合PSA(POx-PSA)を合成し、それらの構造と機能を明らかにした。さらに動物実験により、安全性と有効性を立証した。得られた成果は、人工酸素運搬体や人工血漿増量剤の実用化に向けた研究開発に新たな指針を示す重要な知見といえる。

### 3. 論文の構成

本論文は、以下の6章で構成されている。

第1章 序論

第2章 (ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの有効性評価

第3章 コア-シェル型ヘモグロビナノ粒子の合成

第4章 ポリオキサゾリン結合ヘモグロビンの合成と有効性評価

第5章 ポリオキサゾリン結合ブタ血清アルブミンの合成と有効性評価

第6章 結論と将来展望

### 4. 論文の独自性や成果

人工酸素運搬体および人工血漿増量剤が実現すれば、医療の様々な分野において革新的な応用が期待される。本論文は、3種類の人工酸素運搬体と1種類の人工血漿増量剤を合成し、そ

の構造と機能、安全性と有効性を明らかにした成果のまとめである。業績の詳細は、以下の 4 点に要約される。

- 1) 出血性ショックラットを用いて Hb-HSA<sub>3</sub> の有効性を評価した。ラットの全血液量の 50% を脱血することにより重度の出血性ショック状態とし、そこへ Hb-HSA<sub>3</sub> 溶液を投与することで蘇生を行った。循環パラメーターは投与直後に脱血前と同程度まで回復し、血球数、腎機能・肝機能を示す各パラメーターも投与 7 日後までに初期値と同程度まで回復した。Hb-HSA<sub>3</sub> 溶液が出血性ショック状態からの蘇生液として有効であることを明らかにした。
- 2) 赤血球内の抗酸化酵素を含むストロマフリー Hb (SFHb) を重合して得た微粒子の表面に HSA を結合したストロマフリーヘモグロビンナノ粒子 (SFHbNP) を合成し、その球状粒子構造 (粒径約 90 nm) を確認した。SFHbNP は過酸化水素水溶液中でも高い酸素錯体安定性を示し、血液と混合しても血球の数と機能に影響を与えなかった。この製剤が高い抗酸化能と優れた血液適合性を有する人工酸素運搬体であることを明らかにした。
- 3) ポリオキサゾリン (POx) は免疫学的ステルス性を有する生体適合性の高い水溶性高分子である。POx を Hb の分子表面に結合した POx-Hb を合成した。POx-Hb のゼータ電位は pH によらず一定であり、Hb の表面が POx で被覆されていることが示された。さらに出血性ショックラットの蘇生実験から、その優れた安全性と有効性を実証した。
- 4) ブタ血清アルブミン (PSA) の分子表面に POx を結合した POx-PSA を合成し、その構造と高い膠質浸透圧を明らかにした。ラットに投与しても抗体は産生せず、免疫学的な安全性が示された。蛍光標識した POx-PSA をラットに投与し、血漿の蛍光スペクトル測定から、長い血中滞留性を実証した。さらに出血性ショックラットの蘇生実験により人工血漿増量剤としての優れた有効性を明らかにした。

## 5. 論文の課題

著者は計 4 種類の血液代替物を開発した。今後、実用化に向けて工業生産可能な合成法を確立する必要がある。本研究ではラットを用いた詳細かつ多くの動物実験により、安全性と有効性が実証されている。ヒト用人工酸素運搬体については臨床試験に向け、大型の動物 (ブタやサル) での試験が必要となる。動物用人工酸素運搬体および人工血漿増量剤については、イヌやネコを用いた実験がそのまま臨床試験へとつながるため、実用化への道のりは近いと期待される。

## 6. 論文の評価

本論文は、ヒト用および動物用の人工酸素運搬体、人工血漿増量剤の実現に向けた大きな一歩となる研究成果のまとめといえる。当該分野における学術的貢献度はきわめて高く、本論文が博士 (工学) の学位論文として価値のあるものと認める。また、2023 年 2 月 13 日、論文内容とそれに関連した事項についての諮問を行った結果、合格と認定した。