

外科領域における輸血と血液製剤の現状と展望

7. 人工血液

慶應義塾大学外科

小林 紘一

キーワード 人工血液, 人工酸素運搬体(人工赤血球), ヘモグロビン小胞体(Hemoglobin-vesicles, HbV), アルブミンヘム, 人工血小板

I. 内容要旨

赤血球輸血は K. Landsteiner による血液型の発見によりその有効性と安全性が確立され, 臨床医学は大きく進歩した。しかし, 緊急輸血時の血液型判定の煩雑さ, 長期保存ができない, 輸血を介するウイルス感染や graft versus host disease (GVHD) の副作用の問題などがある。これらに対処するために血液型を考慮せず使用でき, しかも棚置きできる人工酸素運搬体が開発されつつある。また, 血小板輸血はがん, 造血器腫瘍などに対する抗腫瘍療法の際の血小板減少や, 外科手術の際には病態によっては欠くことのできない治療法となる。しかし, 血小板需要の増加と血小板の短い保存期間のために起こる供給の不足や, 血小板輸血後のウイルス感染症の副作用などの問題がありこれに対処するために, 人工血小板の開発も始まっている。

II. はじめに

輸血は現代医学にとって欠かせない治療法の1つである。血液は血球成分と血漿成分から構成されるが, 輸血に際しては全血輸血ではなく成分輸血が, また赤血球輸血では同種血輸血に変わり自己輸血が推奨されるようになった。これは血液成分の有効利用になるばかりでなく, 輸血に伴う副作用の予防という面でも重要である。医工学の進歩は緊急事態に対応でき, 同種血輸血を回避できるような人工血液の開発を可能にしている。本稿では血球成分の代替物である人工酸素

運搬体(人工赤血球)と人工血小板について述べる。

III. 人工酸素運搬体

現在のところ人工酸素運搬体には①フッ素の化合物で酸素溶解能の高い液体である perfluorocarbon(PFC), ②ヒトやウシのヘモグロビンを利用するもの, ③酸素運搬体としてヘム自体も合成し, このヘムの担体としてアルブミンを用いたもの(アルブミンヘム)などがある(図1)¹⁾²⁾。PFCは酸素運搬機能が低いことや使用時に酸素吸入を必要とすること, 粒子が網内系に蓄積するなどの問題が指摘されている。

ヒト由来の分子状のヘモグロビンをそのまま投与した時には図2に挙げたような問題が存在するのでこれを改善するための方法が必要である²⁾。その方法には2種類あり, 1つは cell free または acellular 型と呼ばれるもので, ヘモグロビンを分子内あるいは分子間架橋させて分子量を増加させ, 腎からの排出を防止し, 血中滞留時間を調整しようとするものであり, 修飾ヘモグロビンとも呼ばれている(図1の poly-Hb や PEG-Hb)²⁾。これらは, 膠質浸透圧が高くなるためにヘモグロビン濃度が5~8g/dlに制限されるため酸素運搬能が十分でないといわれている。これらの製品は欧米で研究されており, 前臨床や, 臨床治験に入ったものがあり, その状況を表1に示す²⁾。しかしこれらは分子が小さいので血管内皮に接近するため血管内皮により産生される nitric oxide (NO) を吸着し, 血圧上昇をきたすのでこの欠点をどのように修正するかが問題となって

ARTIFICIAL BLOOD

Koichi Kobayashi

Department of Surgery, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

7. 人工血液

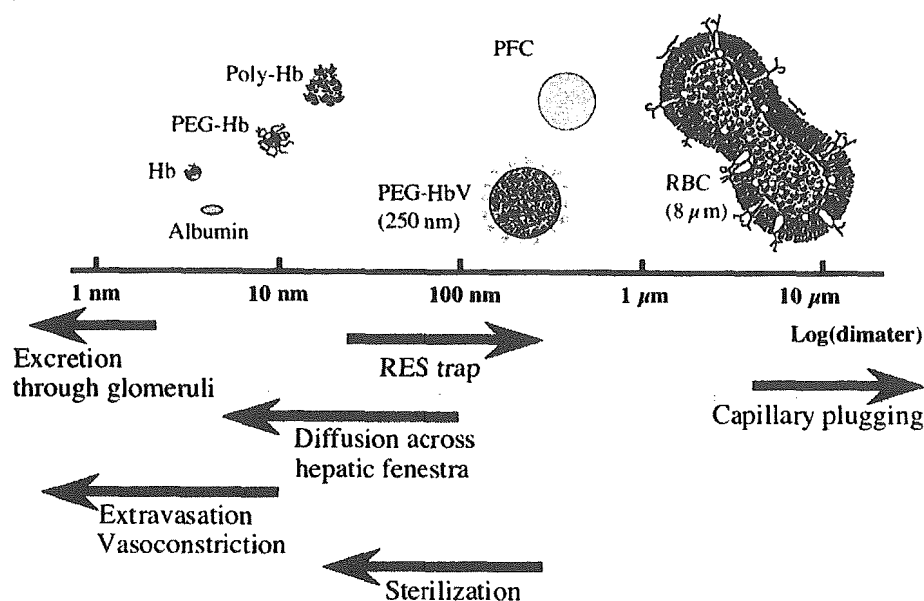


図1 What is the optimal dimension of O₂ carriers?

表1 Hemoglobin based oxygen carriers in development as red blood cell substitutes

Product	Hb source	Technology	Developer	Status
DCL-Hb (HemAssist)	Human red cells	α-α crosslinked Hb	Baxter Healthcare (Deerfield, IL, U.S.A.)	Phase III (trauma) (suspended)
RHb1.1/1.2 (Optro)	<i>E. coli</i>	Recombinant human α fused Hb	Baxter Healthcare (Somatogen < 1998)	Phase II (discontinued)
RHb2.0	<i>E. coli</i>	Recombinant Hb	Baxter Healthcare	Preclinical
HBOC-201 (Hemopure)	Bovine red blood cells	Glutaraldehyde polymerization	Biopure (Cambridge, MA, U.S.A.)	BLA filed (elective surgery). Approved for clinical use in S. Africa
Human POE-Hb (PHF)	Human red cells	PEG conjugation	Curacyte (Apex) (Munich, Germany)	Phase III (septic shock)
Hb-raffimer (Hemolink)	Human red cells	Oligomerization with o-raffinose	Hemosol (Toronto, Canada)	Phase III (cardiac surgery) (suspended)
Pyridoxal polyHb (PolyHeme)	Human red cells	PLP-Hb polymerized Hb with glutaraldehyde	Northfield Laboratories (Evanston, IL, U.S.A.)	Phase III (trauma) Filed BLA
Hemospan	Human red cells	Conjugated with maleimide PEG	Sangart (San Diego, CA, U.S.A.)	Phase II (elective surgery)
HemoZyme	Human red cells	Polynitroxylated Hb	SynZyme (Irvine, CA, U.S.A.)	Preclinical
PolyHb-SOD-CAT	Bovine red cells	Hb modified with SOD and catalase	McGill University (Montreal, Canada)	Preclinical
PEG-Hb	Bovine red cells	PEG conjugated Hb	Enzon (Piscataway, NJ, U.S.A.)	Phase Ia (discontinued)
OxyVita	Human/bovine red cells	Stabilized Hb with sebacoyl diaspirin	IPBL Pharm. (Goshen, NJ)	Preclinical
HemoTech	Bovine red cells	Modified Hb with o-ATP, o-adenosine, and glutathione	HemoBioTech (Amarillo, TX, U.S.A.)	Preclinical

いる¹⁾²⁾。

一方、土田らにより開発されたヘモグロビンをリボソームの人工膜でカプセル化した細胞型 (cellular 型) の酸素運搬体は、膠質浸透圧や粘度の調整が容易であ

る。本物質はヘモグロビン小胞体 (hemoglobin vesicle-HbV) と呼ばれておりこの HbV はリボソームの内側に 35% 以上の濃度でヘモグロビン粒子が詰め込まれており、十分な酸素運搬能力を持っている^{2)3)~5)}。リボソ-

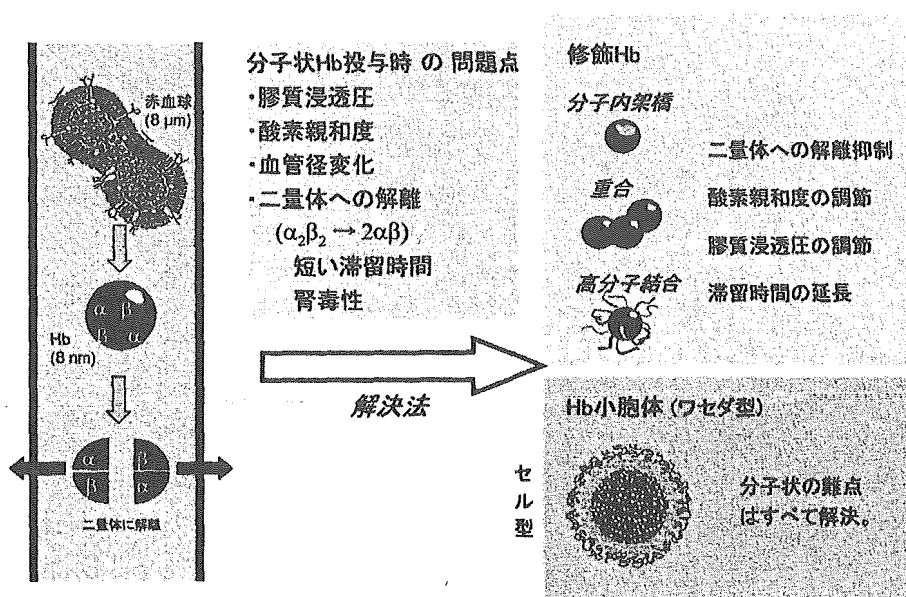


図2 分子状Hbの問題点と解決法

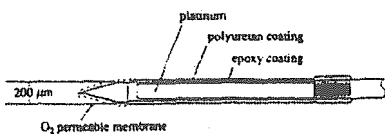
Wistar系ラット(♂, 344 ± 15g)

1. 頸動静脈に挿管。
2. 腎皮質に酸素電極を刺入。
3. ドップラープローブを腹部大動脈に取付。
4. 90%交換輸血試験:

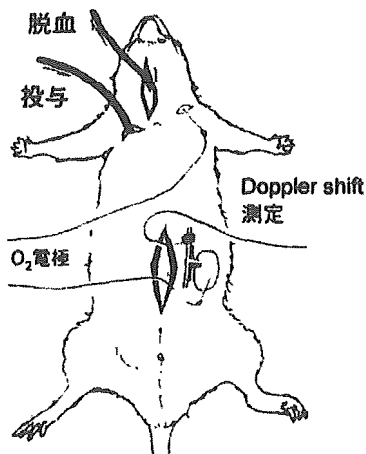
試料: Hb小胞体/アルブミン

アルブミン

RED HbV / ALBUMIN (10%) 100μl in albumin



Polarographic酸素電極



ASAIO J. 43, 289-297 (1997)
Bioconjugate Chem. 8, 23-30 (1997)

図3 Hb小胞体による90%交換輸血試験

ムの表面は親水性高分子(ポリエチレングリコール)により被覆されておりこの親水性高分子により、HbV同士の融合や血液との接触による凝集を防止することができる²⁾⁵⁾。この製品の直径は約250nmである(図1, 図2)。この製品は室温溶液状態で2年間、また乾燥状

態ではさらに長期の保存が可能である。粉末は適量の溶液に溶かすだけで使用できるという特徴がある²⁾。HbVを用いたラットにおける90%交換輸血実験(図3)のデータを示す(図4)⁶⁾。5%アルブミンにHbVを溶解した液で交換輸血を行った群ではそれぞれのコ

7. 人工血液

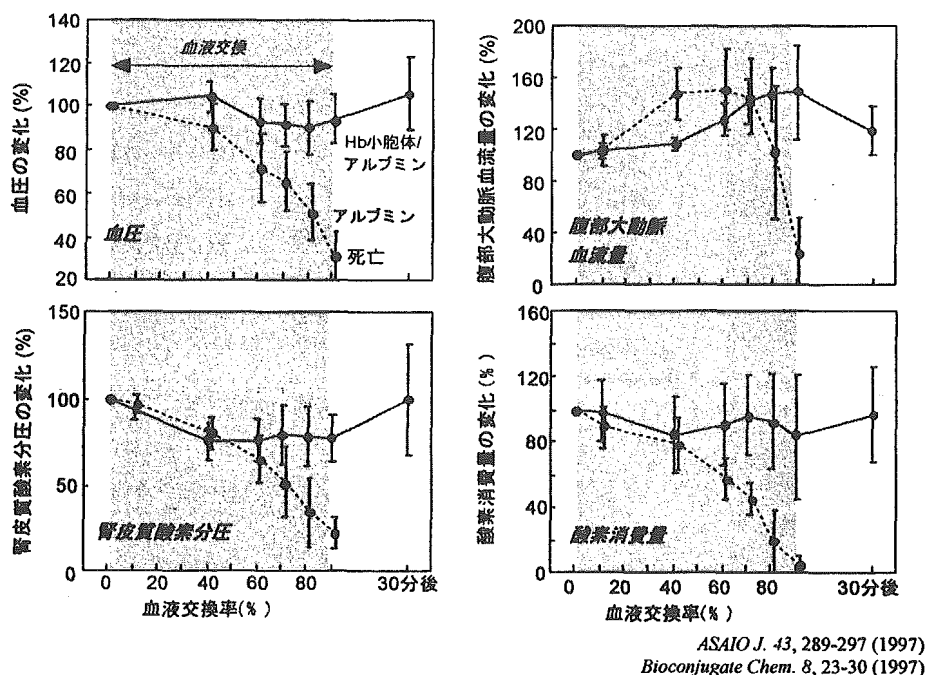
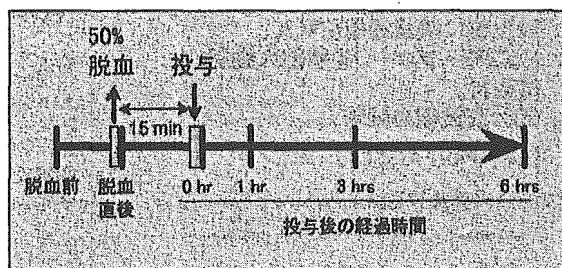


図4 Hb小胞体による90%交換輸血試験

1. 雄性Wistar rat (280 ± 27 g)
2. 吸入麻酔(1.5% sevoflurane)
3. 右頸静脈に挿管
4. 測定項目:
血圧, 心拍数, ヘマトクリット,
PaO₂, PaCO₂, pH, 乳酸値
組織病理



蘇生液

HbV/rHSA	HbV suspended in rHSA, [Hb] = 8.6 g/dL
wRBC/rHSA	Washed RBC suspended in rHSA, [Hb] = 8.6 g/dL
rHSA	recombinant human serum albumin, 5 g/dL

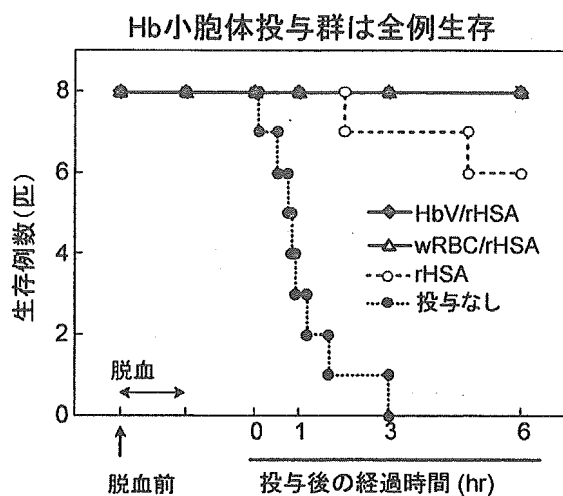
Crit. Care Med. 32, 539-545 (2004)

図5 Hb小胞体の投与による出血ショックからの蘇生

ントロール値を維持したが、5%アルブミンのみで交換輸血を行った群では全例死亡した。

HbVのショックからの蘇生実験(図5)では、5%のrecombinantアルブミンにHbVを溶解した液を投与し

たHbV/rHSA群では、recombinantアルブミンに自己洗浄赤血球を浮遊させた液を投与した群と同様に8例全例が6時間後も生存していた(図6)。このようにHbVが酸素運搬体として機能していることが証明され



Crit. Care Med. 32, 539-545 (2004)

図6 出血ショックと蘇生

た。現在われわれは臨床応用を踏まえた研究を継続中である⁹⁾。

前述したアルブミンヘムは、アルブミンの立体構造の中にヘムを包接させた酸素運搬体であるが、アルブミンによる膠質浸透圧をもった resuscitation fluid としての可能性を持ち、現在動物実験が進行中である⁹⁾¹⁰⁾。

人工酸素運搬体には出血性ショックに対する治療薬としてばかりでなく、体外循環の補填液としての利用、心筋梗塞、脳梗塞などへの虚血部位¹⁰⁾への酸素運搬、固形腫瘍を酸素化することによる抗癌剤や放射線治療に対する増感作用¹⁰⁾なども期待されている。

IV. 人工血小板

血小板製剤は保存可能な時間が短い(72時間)、週末などに入手困難、ウイルス感染や、発熱などの反応を伴うことがあること、生体内での寿命が短いので頻回投与が必要なが多い、濃厚血小板の使用量が増加の傾向にあるなどの理由で止血を目的とした人工血小板の開発が行われている¹¹⁾¹²⁾¹³⁾。

血小板の最も重要な機能は傷害された血管内皮に接触し、粘着、凝集反応により止血を行うことであるが、人工血小板に求められている機能には出血部位で内皮下組織が露呈された部位にのみ作用し、効率よく血栓を形成し、出血をコントロールすることであり、組織の修復後には血栓は溶解し、吸収されなければならない

い。人工血小板開発の基本は膜受容体蛋白とそれらを運ぶ担体にこれを固相化することで、膜受容体蛋白としてはフォンビルブランド因子(vWF)の受容体であるGP1b/IXや凝集に必要なGP1b/IIIaなどが、また膜受容体蛋白の担体としてはリポソーム、ヒアトアルブミンや赤血球などが考えられている。現在開発されつつある人工血小板としては、以下のようなものがある¹⁾。

Fibrinogen-RBC, Erythrocytes with covalently bound fibrinogen: 正常ヒト赤血球を担体とし、これにフィブリノーゲンを共有結合させたもので、血小板減少ラットに輸注するとラットの出血時間が短縮するという¹⁴⁾。

Thromboerythrocyte: 血小板の絶対値を補う目的で開発されたものでフィブリノーゲンのアミノ酸配列でGP1b/IIIaとの結合に関係するAraGly-Asp(RGD)配列を持った合成ペプチドAcCGGRGDF-NH₂を共有結合で赤血球膜に固定したもので、この赤血球は活性化血小板(GP1b/IIIa)と特異的に反応する。自己の赤血球を担体として使用することも可能である¹⁵⁾。

Plateletsome: 可溶化した血小板膜に固定したものの、GP1b, GpIIb/IIIa, GpIVなど15種類以上の蛋白質が含まれている¹⁶⁾。

Infusible platlet membrane (IPM): 期限切れヒト血小板を反復凍結融解により破壊し、粉末にして乾燥させたもので4℃で36カ月保存可能であるという。主成

7. 人工血液

分はリン脂質と糖蛋白である¹⁷⁾。

Throbosphere: 直径約1.2 μ mのcrosslinkされたヒルアルブミンの表面にヒトフィリプリノーゲンを共有結合させたもの¹⁸⁾。

γ GP1 α -liposome: 遺伝子組み替え産物のGP1 α をリポソームに固相化したもの¹⁹⁾。

また、 γ GP1 α /IIaを導入したアルブミン重合体を血小板減少マウスに投与すると、延長していた出血時間が容量依存性に短縮し、同物質のin vitroでの止血効果を確認した報告もある²⁰⁾。

V. おわりに

輸血学の進歩は近代医療の姿を変えたといっても過言ではないが輸血に起因する副作用のあることも事実であり、これを防ぐには安全で効果の高い人工血液の開発も重要である。

文 献

- 1) Kim HW, Greenburg AG: Artificial Oxygen Carriers as Red Blood Cell Substitutes: A Selected Review and Current Status. *Artificial Organs*, 28: 813-828, 2004.
- 2) 土田英俊, 宗慶太郎, 酒井宏水, 小松晃之, 武岡真司, 堀之内宏久, 末松 誠, 小林絃一: 酸素輸液(人工赤血球)の安全度と体組織への酸素供給, 麻酔第52巻増刊, S55-S66, 2003.
- 3) Kobayashi K, Horinouchi H, Watanabe M, et al.: Safety and Efficacy of Hemoglobin-Vesicles and Albumin-Hemes. In "Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine vol. 12", Kobayashi K. Springer-Verlag, Tokyo, Japan. 1-21, 2005.
- 4) Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, et al.: Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation in a rat model. *Biomaterials*, 25: 4317-4325, 2004.
- 5) Tsuchida E, Takeoka S: Stabilized Hemoglobin Vesicles. In: *Artificial Red Cells Materials, Performance and Clinical Study as Blood Substitutes*, Jphn Wiley, New York, NY: 35-64, 1995.
- 6) Yoshizu A, Izumi Y, Park S, et al.: Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier Hemoglobin Vesicles (HbV) maintains interstitial perfusion and suppresses the increase in plasma tumor necrosis factor alpha (TNF). *ASAIO J.* 50: 458-463, 2004.
- 7) Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, et al.: Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemor-

rhagic shock in anesthetized rats. *Crit Care Med*, 32: 539-545, 2004.

- 8) 高折益彦: 酸素運搬体の臨床試験へ, 人工血液, 12: 67-73, 2004.
- 9) Huang Y, Komatsu T, Yamamoto H, et al.: Exchange transfusion with entirely synthetic red-cell substitute albumin-heme into rats: physiological responses and blood biochemical tests. *J Biomed Mater Res*, 71A: 63-69, 2004.
- 10) Kobayashi K, Komatsu T, Iwamaru A, et al.: Oxygenation of hypoxic region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic hemes. *J Biomed Mater Res A*. 64: 48-51, 2003.
- 11) 村田 満: 人工血小板の開発—現状と将来展望—, 分子細胞治療 vol. 3 no. 6: 618-624, 2004.
- 12) 半田 誠: 人口血小板代替物(人工血小板), 人工臓器 2002 第 18 回教育セミナー: 77-83, 2002.
- 13) 村田 満, 池田康夫: 血小板代替物—その開発と臨床応用の可能性—, 臨床血液, 37: 1353-1361, 1996.
- 14) 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.
- 15) Collier BS, Springer KT, Bera JH, et al.: Thromboerythrocytes. In vitro studies of a potential autologous, semiartificial alternative to platelet transfusions. *J. Clin. Invest*, 89: 546-555, 1992.
- 16) Rybak MEM, Renzulli LA: A liposome based platelets substitute, the plateletsome, with hemostatic efficacy. *Biomater. Artif Cells Immobilization Biotechnol*, 21: 101-118, 1993.
- 17) Takako Nishiya, Mie Kainoh, Mitsuru Murata, et al.: Platelet interactions with liposome carrying recombinant platelet membrane glycoproteins or fibrinogen: Approach to platelet substitutes. *Art. Cells, Blood Subs., And Immob. Biotech*, 29(6): 453-464, 2001.
- 18) Teramura Y, Okamura Y, Takeoka S, et al.: Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGP1 α /IIa in thrombocytopenic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 306: 256-260, 2003.
- 19) Chao F, Reddick RL, Bode AR, et al.: Infusible platelet membrane microvesicles: a potential transfusion substitute for platelet. *Transfusion*, 36: 536-542, 1996.
- 20) Levi M, Friderich P, Ten Cate W, et al.: Fibrinogen coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nature Medicine*, 5: 107-111, 1999.

7. 人工血液

ARTIFICIAL BLOOD

Koichi Kobayashi

Department of Surgery, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

To prepare for shortage of blood components and to avoid side effects such as blood borne infectious disease, blood substitutes such as artificial red cell (artificial oxygen carrier) and artificial platelet are being developed.

As for oxygen carriers, there are several candidates such as perfluorochemicals, modified hemoglobins and liposome encapsulated hemoglobins and albumin heme. Perfluorochemicals have limited oxygen carrying capacity and oxygen inhalation is mandatory when they are used. Modified hemoglobins such as intermolecular or intramolecular cross linked hemoglobins have side effect to cause hypertension by scavenging nitro oxide (NO) which is produced by endothelial cells, because the size of these hemoglobins are small enough to go to the adjacent place near endothelial surface.

Hemoglobin vesicles (HbV) in which hemoglobins are encapsulated in liposome is most possible candidate for oxygen carrier. Usefulness and safety of the HbV is evidenced by animal shock model or exchange transfusion model and they are now being prepared for clinical trials as red blood substitutes or oxygen therapeutics. Albumin heme in which recombinant human serum albumin incorporating synthetic heme is thought an ideal resuscitation fluid as this material has colloid oncotic pressure.

Short time storage and viral infection are serious concern in platelet transfusion therapy for bleeding thrombocytopenic patients. Adhesion of the platelet to the collagen surface and aggregation at the bleeding sites to plug holes in blood vessels, and to facilitate the function of the remaining platelets is a starting point in developing platelet substitutes and several platelet substitutes have been proposed on this theory.

3. 細径気管支鏡

慶應義塾大学医学部呼吸器外科講師 堀之内宏久
同 呼吸器外科 藤本博之
同 教授 小林 紘一

key words ultrathin bronchoscope, CT guided bronchoscope, transbronchial biopsy, virtual bronchoscopy

動 向

気管支鏡の発達は、多彩な処置のできる処置用内視鏡の開発と、末梢領域まで到達でき、細かい観察と検査が可能な気管支鏡の開発との2つの方向で進んできた。最近ファイバーの改良が進み、解像力に優れ、また、暗かった画面をCCD装置を組み込むハイブリッド構造とすることによって日常の気管・気管支の観察と評価に苦痛を感じない細径気管支鏡が出現した。機器の改良が進む細径気管支鏡が臨床現場で果たす役割について述べる。

A. 細径気管支鏡の用途 (表1)

気管支鏡は気管・気管支の内腔観察、透視や超音波を併用した病変部位の検体採取といった診断目的に使用される場合と、気管・気管支内病変の切除、異物の除去、喀痰の吸引、薬剤の注入などの治療・処置の目的で使用される場合がある。

細径気管支鏡でも同様に診断目的で使用される場合と処置を目的として使用される場合がある。診断で用いられる場合には通常の気管支鏡では到達が困難な5次気管支より末梢の気管支に到達して観察あるいは検体の採取を行うことが主体となる。その他の診断用途としては気道狭窄症例での狭窄部以遠の観察を行うこと、空洞性病変内の内

表1 細径気管支鏡の用途

利用法	
診断目的	亜区域枝以遠の気管支内腔の観察 気道狭窄症例における狭窄部以遠の観察 小児，新生児の気道内の観察 末梢の空洞性病変の内腔観察 末梢の肺病変の生検，ブラシによる細胞診，細菌検査
処置目的	麻酔時における一側肺換気用チューブの挿入におけるガイド 空洞性病変内への薬剤の直接注入 小児における気管，気管支内分泌物の除去 小児例での気管内挿管のガイド

E. 今後の細径気管支鏡の位置づけ

肺癌を代表とする肺疾患の多くは初期には病巣も小さく、進展範囲も限られていることが多い。このような状態で正確な診断を行って治療を行うことが治療成績の向上につながることも明らかである。しかるに現状では電子内視鏡の開発によって解像度は向上したが、末梢への到達性はまだ充分とはいえなかった。細径気管支鏡の改良により、解像度、到達性に優れた機器が手に入るようになり、末梢小型病変に対する気管支鏡診断の向上が期待できる。小結節に対する診断ではCTガイドの針生検あるいは針吸引細胞診の診断率が高いという報告が多い^{9,10)}。しかし、針生検は手技自体が気胸や癌細胞の播種、喀血や空気塞栓などの合併症の頻度が高い。細径気管支鏡が普及することによって正確な cytopathologic diagnosis が得られることとなれば、安全性、反復してできるという面から細径気管支鏡が今後見直されるようになると考えられる。

文献

- 1) Tanaka M, Kawakami O, Satoh M, et al. Endoscopic observation of peripheral airway lesions. *Chest* 1988; 93: 228-33.
- 2) 熊澤昭文, 佐光智絵子, 沖 昌英, 他. 極細径気管支鏡で空洞内を観察, 薬液注入を行ったアスペルギルス症の1例. *気管支学* 2002; 24(6): 485.
- 3) 荒古道子, 細 隆信, 辰田仁美. 極細径気管支鏡で経過を追えたアスペルギローマの一例. *気管支学* 2004; 26: 276.
- 4) 長谷衣佐乃, 石井芳樹, 田邊ゆめ子, 他. 細径気管支鏡によって空洞内を観察しえた肺アスペルギローマの2例. *気管支学* 2004; 26: 276.
- 5) 坂 英雄. 末梢小型陰影の診断—極細径気管支鏡による生検診断—. *気管支学* 2004; 26: 478-89.
- 6) 藤沢武彦, 田中 満, 坂 英雄, 他. 気管支命名ワーキンググループ報告. *気管支学* 2000; 22: 330-1.
- 7) Asano F, Matsuno Y, Matsushita M. Transbronchial diagnosis of a pulmonary peripheral small lesion using ultrathin bronchoscope with virtual bronchoscopic navigation. *J Bronchol* 2002; 9: 108-11.
- 8) 浅野文祐, 松野祥彦, 小牧千人, 他. 肺末梢小型病変に対する極細径気管支鏡を用いたCTガイド下気管支診断. *日呼吸会誌* 2002; 40 (1)11-15.
- 9) Lopez Hanninen E, Vogl TJ, Riche J, et al. CT-guided percutaneous core biopsies of pulmonary lesions. Diagnostic accuracy, complications and therapeutic impact. *Acta Radiol* 2001; 42: 151-5.
- 10) Yamagami T, Iida S, Kato T, et al. Usefulness of new automated cutting needle for tissue-core biopsy of lung nodules under CT fluoroscopic guidance. *Chest* 2003; 124: 147-54.

第5章 人工赤血球

酒井宏水*¹, 宗 慶太郎*², 武岡真司*³, 小林絃一*⁴, 土田英俊*⁵

1 輸血代替の必要性

我が国の献血輸血システムは、世界的に見ても最高水準にあるといえる。安全な輸血用血液が医療機関に常備され、国民の健康福祉に大きく貢献していることは言うまでもない。肝炎やエイズなど輸血に伴う感染も大きな社会問題となったが、献血血液の厳重な検査と管理が強調され、常に被害を最小限に留めるために尽力している。特に核酸増幅法（NAT 検査）の採用の効果は多大である。しかし、検査項目から外れる病原体の存在、狂牛病や西ナイル熱、それに未知の感染源の存在の脅威に常に曝され、献血者の問診の徹底や献血の規制などゼロリスクを目指した新たな試みもなされている。その他の課題として、赤血球の保存期限は採血後わずか3週間、それに過誤を含め血液型不適合の医療事故もある。輸血回避のため、術中輸血開始目安のHb濃度10g/dlの低減、低温無輸血手術、自己血輸血の推奨と血液希釈、赤血球造血因子（EPO）投与による術前貯血も普及してきてはいるが、症例によっては適用できない。他方、献血1回当りの採血量は400mlになったが、人口の高齢化に伴い健康献血者の総数は低下しつづけている。我が国のように地震などの自然災害が危惧される場合、緊急需要に対応した大量供給ができることは重要な国家的施策でもあり、感染の可能性を危惧することなく、血液型に関係なく、要請に即応していつでもどこでも必要量を直ちに供与できる、赤血球の機能を代替する酸素輸液の出現が強く期待されているところである。

* 1 Hiromi Sakai 早稲田大学 理工学総合研究センター 助教授

* 2 Keitaro Sou 早稲田大学 理工学総合研究センター 講師

* 3 Shinji Takeoka 早稲田大学 理工学術院 教授

* 4 Koichi Kobayashi 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 教授

* 5 Eishun Tsuchida 早稲田大学 理工学総合研究センター 名誉教授；顧問研究員

2 赤血球構造（膜）の重要性

赤血球は直径約 $8\mu\text{m}$ の中窪み円盤状粒子であり、酸素を結合できる蛋白質ヘモグロビン (Hb, 分子量 64,500) の高濃度溶液 (約 35%) を赤血球膜に内包した構造を持つ。人工赤血球の歴史を紐解くと、最初は Hb が酸素結合部位であるのなら、血液型抗原が存在する赤血球膜を除去し Hb を精製単離して用いればよいのでは、という安易な発想から研究開発が始まったことが解る¹⁾。特に、戦後に精製ヒト Hb の投与試験が盛んに実施されたが、血圧亢進、腎毒性、出血、それに極めて短い滞留時間が問題となり当然成功しなかった。1990年代から欧米で Hb 分子を加工した Hb 修飾体 (分子内架橋型、重合型、高分子結合型) などを対象にした臨床試験が推進されたが、全般としては投与の修飾 Hb が血管内皮細胞由来の弛緩因子 NO を吸着するために生起する血管収縮 (血圧亢進)²⁾、Hb との直接接触による血管内皮の障害³⁾、また、代謝異常や軽度の神経性副作用の指摘もあり、いずれもが全て赤血球とかけ離れた構造が原因となることが明らかにされた。

Hb 溶液が赤血球膜で覆われている理由は、①35%濃厚 Hb 溶液の高い粘度と膠質浸透圧の抑制、②本来毒性のある Hb 逸脱の抑制、③Hb 機能維持のための各種リン酸などエネルギー分子、解糖-ならびに還元-酵素系の保持の役割もある。また、④血液 (血球分散系) は非 Newton 流体で、体内循環とくに末梢血管内における特色ある流動形式と生理作用 (ホメオスターシス) が特性である。これら赤血球本来の構造と機能の関係が初めからわかっていたら、小胞体 (細胞型) 構造なら無害で投与妥当との結論が容易に想像できたはずである。

1950~1960年代に Chang や豊田らはすでに、高分子薄膜でできた球の中に Hb を内包する方式を検討していた^{4,5)}。使用された高分子材質はナイロン、コロジオン、ゼラチン、アラビアゴム、シリコンなどであった。また、エマルション粒子の中にヘモグロビンを封入し、カプセル化する方法も検討された。しかし、いずれも粒径制御や分散性に問題があり、具体的な成果を得ていない。1960年代後半に両親媒性分子であるリン脂質が水中で二分子膜を形成しこれが小胞構造 (liposome) に成ることが Bangham によって報告され⁶⁾、1970年代初めに Djordjevic (Univ. Illinois, Rush Presbyterian Med. Center) らは、リン脂質小胞体に Hb を内包した "Synthetic Erythrocyte" の研究を開始した⁷⁾。しかし、粒径制御など調製の困難さ、血漿蛋白質との相互作用に起因する凝集阻止に十分な手段を得なかったため具体化しなかった。

3 ヘモグロビン小胞体の構成

リン脂質二分子膜で高濃度 Hb 溶液を被覆する技術と、特に毛細血管を容易に通過できる粒径

第5章 人工赤血球

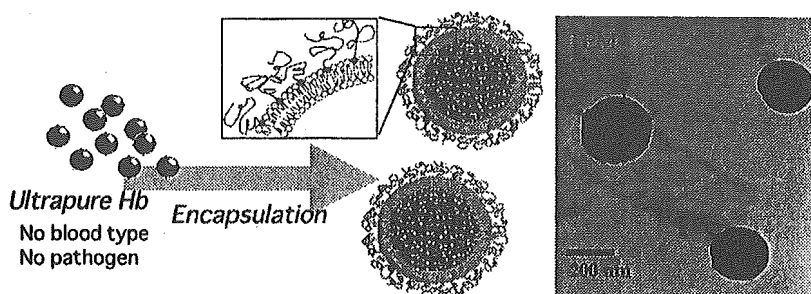


図1 ヘモグロビン小胞体

期限切れ赤血球より精製単離した高純度Hbをリン脂質二分子膜で被覆する。さらに粒子表面にはPEG鎖で修飾する。右側の透過型電子顕微鏡写真から、制御された粒子径(250nm)と、内水相にHbが濃度高く内包されている様子がわかる¹¹⁾。

の制御, また血中分散安定度向上は, 高分子と分子集合の科学に立脚した工夫(1990年代)を組込んでようやく完成できた¹⁾(図1)。高純度(99.9%以上)高濃度の精製Hb溶液, extrusion法の採用により, Hb溶液(濃度35%以上)を包んだ小胞体として得られ^{8~12)}, Synthetic erythrocyteの問題点を解決した。検査済み献血由来の期限切れ赤血球から精製した濃縮Hb利用で感染源はない建前であるが, 精製に際してHbに一酸化炭素(CO)を結合させ安定化を計り, 60℃の加熱処理(pasteurization)とウイルス除去膜処理(ultrafiltration)の組合せで安全性を確保する^{13~15)}。最終段階で光照射励起により酸素を結合したHbO₂に変換。アロステリック因子を添加して酸素親和度の制御(P₅₀=27~32 Torr)ができる¹⁶⁾。ポリエチレングリコール(PEG)結合脂質を粒子表面に配置して小胞体粒子間の凝集抑制と分散安定度向上の効果を観測¹⁷⁾, この表面修飾過程を動力学的に明らかにし, 溶液のまま室温にて2年以上保存できる系が構築できた¹⁸⁾。開発当初, リン脂質小胞体は極めて不安定な構造であるというのが一般常識であり, リン脂質分子内の脂肪酸に重合性基(ジエン基など)を導入することが検討され¹⁹⁾, γ線照射重合により極めて安定な小胞体構造を得ることに成功したものの²⁰⁾, 細網内皮系における代謝分解に問題があった²¹⁾。しかしその後, 通常の飽和型脂質(ジパルミトイルホスファチジルコリン)でも所定の比率でコレステロールや負電荷脂質と混合し, さらに小胞体粒子表面をPEGで修飾すれば, 支障のない分散安定度と保存安定度および血液適合性が得られることが明らかとなったのである。

人工赤血球は当然医薬品であるのでGMP(Good Manufacturing Practice)基準の無菌的製造が前提となるが, 製造工程および製品の無菌性を保証するためいわゆるエンドトキシン(グラム陰性菌体の細胞外膜成分であるリポポリサッカライド:LPS)が基準以下であることを実証することが極めて重要となる。LPSは約8本のアルキル鎖が高分子糖鎖に結合した両親媒性分子で

あるため、リン脂質小胞体の二分子膜に容易に挿入され、常法 (Limulus Amebocyte Lysate Test) による定量測定を阻害することが問題とされていた。しかし、これを克服することに成功し²²⁾、製造工程の無菌性をモニタリングし、常に 0.2EU/mL 以下であることを保証している。

これら新しい観点からのプロセスエンジニアリングによる製造工程の効率化を課題として研究を重ね、パイロットプラントの基本設計を完了している。

4 ヘモグロビン小胞体による酸素輸送効果

医療現場とくに救急医療や外科的手術において、血液型不一致や感染の心配をせずに、いつでも要求に応じて投与できる、輸血代替としての酸素輸液が求められている。この場合、酸素輸液の必須条件は、投与後の全身管理の主な項目：循環動態やガス交換、それに末梢組織の酸素化が輸血をした場合と同等に正常値に保たれることである。

4.1 血液希釈

Hb 小胞体の動物投与試験 (ラット) では、交換輸血法で循環血液量の実に 90% 超過の交換でも血圧が維持され、また血液ガス組成も腎皮質の酸素分圧も正常値を推移することが確認された^{23~26)}。また、臨床現場で想定される最大の交換率 40% の交換輸血においても全例が生存し、ヘマトクリット (赤血球体積分率) が 1 週間で完全に回復する²⁷⁾。したがって、術前血液希釈、術中出血分の補給、さらに人工心肺 (ECMO) 体外循環回路の補充液としての利用が期待できる²⁸⁾。特に小児患者の体外循環では、無輸血充填とした場合 (血漿増量剤の充填)、術中の短時間の Hb 濃度の低下が脳に障害を与え、術後の知能発達に影響をおよぼすとされており、Hb 小胞体を充填液として用いることの利点が期待されている。

Hb 小胞体生理塩溶液の膠質浸透圧はゼロなので、血液交換率が高い場合には循環血液量を正常に維持するために当然、血漿増量剤の添加が必要となる。例えば、5% アルブミン (生理条件) に分散させた場合の膠質浸透圧は 20 Torr (血液は 20~25 Torr)²⁹⁾、粘度と浸透圧はほぼ血液と同等になり、循環動態の恒常性に寄与する。Hb 小胞体の粒径は赤血球の約 1/30 と小さく、血漿中に均一に分散する。赤血球と混合して微小血管モデル (内径 28 μm) を流動させたときの顕微鏡観察の結果、赤血球のような大粒子は管の中央部を流れるが、Hb 小胞体は結果として管壁の近くに偏る傾向 (Near-Wall Excess) が認められた³⁰⁾ (図 2)。無麻酔下ハムスターの 80% 交換輸血における皮下微小循環動態の検討から、微小血管内を流動する PEG 修飾 Hb 小胞体に凝集は認められず、血漿相に均一分散しているが^{31, 32)}、表面未修飾の Hb 小胞体では細静脈や毛細管内など、流速が比較的遅い部位で凝集体が観測されている (図 3)。血流速度、有効毛細管

第5章 人工赤血球

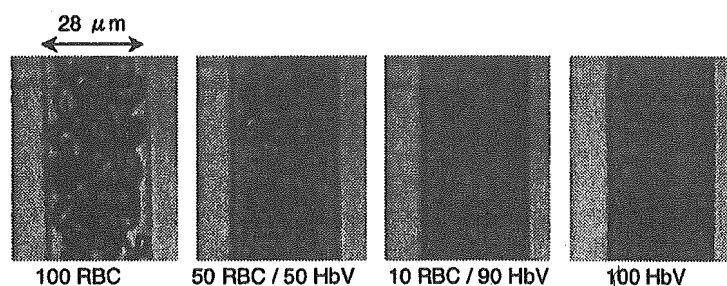


図2 微小モデル血管（内径 $28\mu\text{m}$ ）を流動するHb小胞体と赤血球の混合液

赤血球のみの場合、管壁近傍に透明な血漿層が存在する。Hb小胞体の分量を多くすると、次第に血漿層が濁ってくる。この倍率ではHb小胞体の粒子は確認できないが、濁度変化からHb小胞体が血漿中に均一に分散している状態がわかる³⁰⁾。

密度、組織酸素分圧ともに表面修飾系が未修飾系に比べて極めて高い数値として推移することからも、表面PEG修飾が不可欠であることが明示された。

4.2 出血ショック蘇生液

さらに、出血ショック時の蘇生液としても検討され³³⁻³⁵⁾、赤血球と同等の酸素運搬機能が実証された。例えば、Sevoflurane麻酔下、ラットの循環血液量の50%を脱血して15分後にHb小胞体をリコンビナントアルブミンに分散させて投与し6時間観察した。リコンビナントアルブミン単独の投与では8匹中2匹が死亡したのに対し、Hb小胞体投与群では循環動態も血液ガス組成も脱血液の投与と同等に推移し全例生存した（図4）。これらの結果は、室温で備蓄可能なHb小胞体を、緊急時に投与して出血ショックの患者を蘇生させることができる可能性を意味している。

4.3 低酸素領域への酸素輸送

ヒト赤血球の酸素親和度（ P_{50} ：酸素が50%結合飽和するときの酸素分圧）は、 37°C で約28 Torrである。全身の酸素消費量は、動脈血酸素分圧（110 Torr）と静脈血酸素分圧（40 Torr）の間の酸素飽和度較差（A-V較差、ヒト赤血球の場合は25%程度）とHb濃度、それに心拍出量の積として算出される。赤血球から精製単離したHbの P_{50} は8 Torr程度と低く、静脈血酸素分圧（40 Torr）では到底酸素を放出しないので、Hbを利用する人工酸素運搬体の P_{50} も、赤血球と同等あるいはそれ以上に調節すべきと極めて明快に考えられてきた。

正常の組織であればこの理論が成り立つであろう。しかし、血管性障害により十分な血流が行

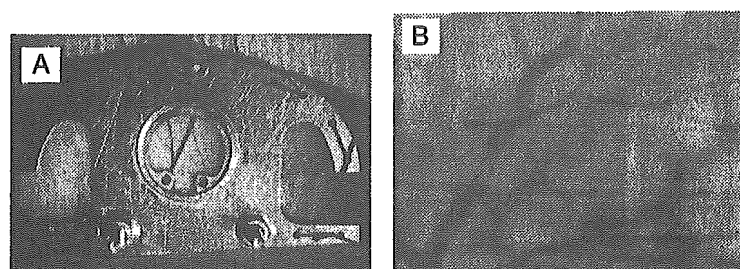


図3 ハムスター皮下微小循環観察モデルと、Hb小胞体投与後の微小循環動態
 (A) 体重約60gのハムスター背部皮膚に硝子製の窓枠を装填することにより、顕微鏡下、細動静脈、毛細血管内の赤血球の流動状態や血管径、組織酸素分圧の観察が可能と成る。
 (B) この動物実験モデルを用い、覚醒下PEG鎖で修飾したHb小胞体で循環血液量の80%を交換すると、Hb小胞体が血漿中に均一分散しているので、毛細管の形状が見える。PEGで修飾しないと、凝集体が多数観測された³¹⁾。

き届かない組織（虚血性領域）の場合、血流速度も組織酸素分圧も極度に低下しているので、動脈血はこの領域に到達する前にすでに酸素をほとんど放出してしまう。したがって、酸素親和度を赤血球よりも大きく（ P_{50} 値を小さく）すれば、虚血性領域に到達してから酸素を放出できると考えた^{36, 37)}。このとき、赤血球よりも小粒径の人工赤血球（250 nm 径）は、血漿中に均一に分散しているので、赤血球が行き届かない狭窄部を經由して到達できる。このような仮説の下、これまでにハムスター有茎皮弁虚血モデルにおいて、高酸素親和度Hb小胞体（ $P_{50}=15$ Torr）で血液希釈することにより虚血領域の酸素分圧が有意に上昇できることを明らかにした^{38, 39)}。したがって、輸血代替としての利用以外の酸素治療剤として、例えば脳や心筋など虚血領域の酸素化、腫瘍組織の酸素化など、低酸素領域へ選択的な酸素ターゲティングとしての利用が期待できる。Hb小胞体の酸素親和度はアロステリック因子により自在に調節できるので¹⁶⁾、各々の症例に相応しい P_{50} を有するテイラーメイド人工赤血球が可能になる。

5 ヘモグロビン小胞体の安全度

5.1 血液適合性

臨床試験開始前にヒトを対象としてできる試験は唯一、採血液との相互作用の検討である。Hb小胞体の粒子表面はPEG修飾してあるので、血漿蛋白質との相互作用が低減され、凝集は生起せず、血液と同等の溶液粘度を示す。血小板の活性化の有無を、RANTESとセロトニンの放出量、PAC-1の発現量の変動から検討し、活性化しないことを確認した⁴⁰⁾。カリクレイン-ニキシン系の活性化も、粒子表面の陰性荷電への接触が引金となるが、負電荷脂質成分をホスファチ

第5章 人工赤血球

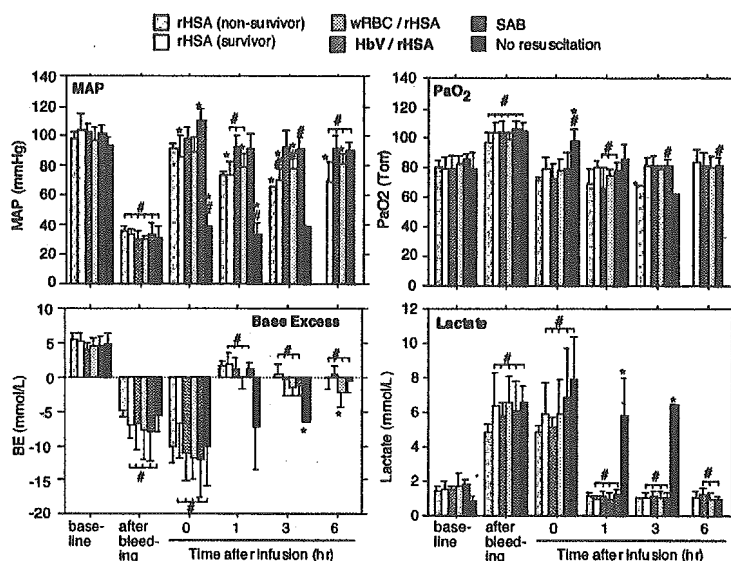


図4 Hb小胞体による出血ショック蘇生試験

Sevoflurane 吸入麻酔下、ラット循環血液量の50%を脱血し15分経過後、Hb小胞体をリコンビナントアルブミン(rHSA)に分散させたHbV/rHSA、rHSA単独、脱血液(SAB)、または洗浄赤血球をrHSAに分散させた溶液(wRBC/rHSA)を投与した。ショック状態では血圧の低下、代償機能により過呼吸となり、動脈血酸素分圧(PaO₂)の上昇、pHと塩基余剰(Base Excess)の低下がみられる。HbV/rHSA投与後では血圧、血液ガス組成ともに脱血液(SAB)の投与と同等である。総てのパラメータでrHSA単独投与群と比較して有意に優れている。蘇生液を投与しないと全例が3時間以内に死亡する。rHSA群は8匹中2匹が死亡したが、HbV/rHSA群は全例が生じた。^{*}p<0.05 vs. baseline, [#]p<0.05 vs. HbV/rHSA

ジグリセロールからカルボン酸型の合成脂質に換えることにより、この活性化を回避することに成功。また、多核球の走化能への影響もないことを確認している⁴¹⁾。

5.2 循環動態の恒常性

修飾Hb投与に際し血圧の異常亢進や、血管床への血小板沈着などの副作用が認められているが、これはNOとの高い親和度に起因すると考えている¹⁾。ハムスター皮下微小循環系の抵抗血管径と血圧の変動を追跡した実験では、修飾Hb(特に分子内架橋Hb、粒径7nm)で最も抵抗血管径が収縮し、同時に顕著な血圧亢進を示した。血管収縮は末梢循環を阻害し、組織へ十分量の酸素が供給されなくなる。粒子径が大きくなるにつれこれらの変動の程度は弱くなり、直径250nmのHb小胞体では、血管収縮も血圧亢進も起こらないことが確認されている⁴²⁾。Hb小胞体のNOの結合速度定数をストップフロー法で測定したところ $4.8 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ と判明し、こ

これは分子状 Hb 溶液の結合速度定数 ($3.0 \times 10^7 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) よりも一桁遅いので、小胞体に濃度高く内包することで NO の結合はある程度抑制されている⁴³⁾。しかし赤血球の NO 結合速度 ($5.2 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) に比較すると二桁もまだ速いことになり、NO 結合速度の違いだけでは説明できない。現在のところ、分子状の修飾 Hb は、血管内皮細胞層を透過して血管内平滑筋近傍に到達し、内皮細胞が産生する NO を捕捉し血管弛緩機能を低下させるが、粒径 250 nm の Hb 小胞体では赤血球と同様に平滑筋までは到達できず、血管内腔に留まるため、血管収縮も血圧亢進も起こらないと考えている (図 5)。

肝臓中では肝実質細胞にある hemoxygenase がヘムを分解する。実はこの際に産生する一酸化炭素 (CO) が、血管弛緩因子として血管内壁の Ito 細胞に作用することが初めて明確に示された。摘出肝灌流中の微小循環動態の検討では、類洞血管の孔 (穿孔篩: fenestration, 孔径約 100 nm) よりも小さい修飾 Hb (7 nm) は、これを容易に通過して Disse 腔に侵入し、肝実質細胞で代謝され、bilirubin 排泄の亢進と同時に CO を放出するが、CO 親和性の高い血中 Hb に捕捉され、結果として 20% の血管抵抗増大と同時に、類洞の不連続的狭窄と流動停止領域の存在を確認している (図 6)。他方、Hb 小胞体では粒径が 250 nm と大きいので、類洞血管の孔を透過できず肝実質細胞に到達しないので、この現象は生起しない。この間灌流圧は一定値に保たれている^{44, 45)}。この結果は、臓器移植の際に Hb 小胞体を灌流液として安全に使用できることも意味しており、摘出してから移植までの所要時間を延長できるので、移植臓器をこれまでよりも遠隔地に運搬することが可能になると考えられる。

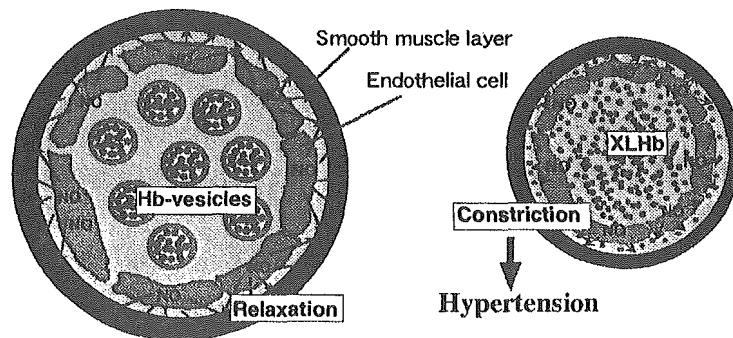


図 5 修飾ヘモグロビン投与による血管収縮の機序

血管内皮層を透過した粒径の小さい Hb は内皮細胞由来弛緩因子 (NO) が平滑筋に到達する前に捕捉しやすく、これが血管収縮につながるものと考えられる。他方、Hb 小胞体では血管内に留まるため、NO 捕捉反応は抑制され、血管収縮は起こらない⁴²⁾。

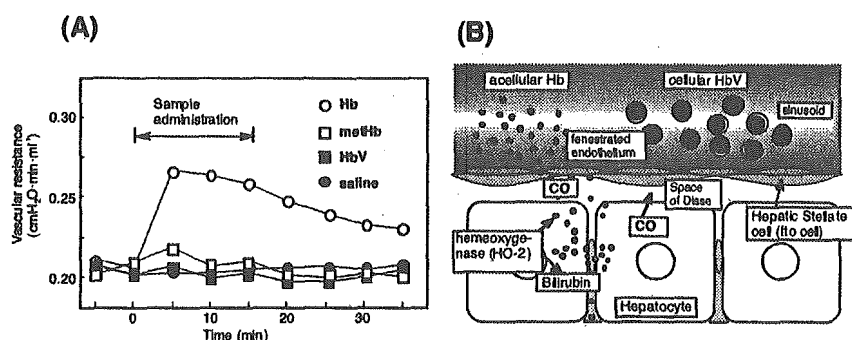


図6 肝の微小循環動態とHb代謝

(A)精製Hb溶液で摘出肝を灌流すると灌流圧が上昇するが、Hb小胞体とmetHbの場合は灌流圧は上昇しない。このことは(B)のように説明できる。Hb分子は類洞血管の孔(fenestration)を通してDisse腔に容易に拡散し、hemeは肝実質細胞のhemoxygenase-2により代謝され、ビリルビンとCOを排泄する。本来COは類洞血管を覆うIto細胞に血管弛緩因子として作用するが、Disse腔でHbに捕捉され弛緩作用低下のため、灌流圧増大につながると理解される。他方、Hb小胞体は篩孔より大きいので通過せず、代謝に入らずまたCOを結合しないため肝臓の微小循環はほとんど低下しない。またmetHbはDisse腔に拡散するがCOを結合しないため変化なし⁴⁴⁾。

5.3 代謝過程

酸素輸液の投与は必然的に血液の大半を置換するくらいの大量投与が前提となるので、成分の体内動態と代謝過程を詳細に検討する必要がある。これまでの検討の結果、投与されたHb小胞体は最終的に、貪食細胞が多く存在する脾、肝、骨髄など、いわゆる細網内皮系(RES)に移行することが同位元素(^{99m}Tc)修飾したHb小胞体の体内動態の観測から解明され⁴⁶⁾、RES機能への影響とHb小胞体の構成成分の代謝確認も実施された。これらの詳細検討は、貪食細胞に捕捉されたHb小胞体が7日以内に分解消失し⁴⁷⁾(図7)、また脾臓重量も一過性増大を示すが7日後には正常値に戻り、血液生化学検査でも異常値は認められていないので^{48, 49)}、老化赤血球の代謝経路と同様と考えている。また、40%の血液を急速交換した後の生存試験(ラット)では、約1週間後には赤血球量は正常値にまで回復していることから²⁷⁾、Hb小胞体の成分が造血に有効利用されていることも考えられ、現在詳細を検討している。

5.4 反復投与試験

新薬の非臨床試験において安全度確認のための項目の一つに、GMP基準で製造された試料について齧歯類およびその他の動物を対象とした反復投与試験がある。予備的にラットに対してHb小胞体の反復投与試験(投与量10ml/kg/日を14日間投与)を実施し、循環血液量の実に2.5倍もの分散液を投与したが、体重は増加し続け、血液生化学的、組織病理学的検討でも顕著な副