

## 質疑応答

## 人工血液の開発はどこまで進んでいるか?

解答: 関口定美\* 仲井邦彦\* 松田典子\*

“人工血液”の定義であるが、血液は血漿からなる液性成分と赤血球、白血球、血小板からなる細胞成分からなり、それぞれ複雑多岐な機能を担っている。従って、これらの機能をすべて有する人工代替物を作り出すことは現在のところ不可能であり、現時点でかろうじて血漿増量剤、電解質溶液その他の補液が人工物として臨床で用いられているに過ぎない。これまで“人工血液”と称して研究されてきたのは、細胞成分のうち赤血球の機能である酸素運搬能を代替する人工的酸素運搬体である。そこで、本稿ではこの人工的酸素運搬体を中心にその開発の現状と臨床適応について言及したい。

## 1. 開発の現状

人工的酸素運搬体の開発は3つの世代に分けられる<sup>1)</sup>。第一世代が化学物質であるパーフルオロケミカル (PFC)、第二世代がヒト赤血球由来ヘモグロビン (Hb) の修飾体、そして第三世代が完全な人工物である組替え Hb (rHb) や合成ヘムなどである。

PFCは、主成分がフルオロカーボンといわれるフッ素化合物で、酸素溶解能に優れ化学的に安定であるが、疎水性であるため輸注には界面活性剤による乳化が必要となる。ミドリ十字で開発製造された Fluosol-DA20%は、日本やアメリカを中心に数多くの臨床試験が行なわれ、主に宗教上の理由から輸血を拒否する症例や適合血が間に合わない場合に使われた。しかし、酸素親和性が高く一度酸素を結合すると遊離しにくく、このほか免疫系の抑制、生体内蓄積性など問題点も多い。従って、現在は一般の輸血ではなく、経皮的冠動脈

拡張術 (PTCA) で応用するといった局所微小循環の改善などに適応が限定されている。また、次世代の PFC として、乳化剤の改良や新たなフッ素化合物の開発など製剤の安定性及び生体適合性を改善する試みも欧米で続けられているが、有用性についてはまだ明らかではない。

第二世代のヘモグロビン修飾体は、ヒト赤血球から溶血後膜成分を除去した stroma-free hemoglobin (SFH) を化学修飾したものである。SFH を人工的酸素運搬体とするには酸素親和性及び血中半減期の2つの問題点を克服する必要がある、その解決法によりさらにいくつかのクラスに分類される (図1)。まず酸素親和性の問題は、2, 3-DPG など親和性を調節しているリガンドが赤血球膜の除去とともに失われ、その結果親和性が高くなってしまふことにあり、このため末梢組織で有効に酸素を放出できない。そこで、2, 3-DPG と立体構造の類似した pyridoxal-5'-phosphate (PLP) で化学修飾する方法が多く用いられている。PLP 化により酸素運搬の指標となる P<sub>50</sub> 値は、SFH の 12 mmHg 程度から 20 mmHg 以上に改善される<sup>2)</sup>。多くのグループが Hb の材料として期限切れ赤血球を用いているが、この PLP 化率については期限切れ赤血球と新鮮赤血球で差がなく、期限切れ血を利用するという献血でいただいた血液の有効利用の意義もある。PLP 化以外には、Hb の $\alpha$ 鎖または $\beta$ 鎖間の架橋を誘導する方法なども報告されている。ただし、この場合架橋により四量体サブユニット間の相互作用の柔軟性が減少し、アロステリックな特性も消失する傾向がある。

第2の問題点は血中半減期が短いことであり、四量体分子である Hb は血中で二量体へ解離しハプトグロビンと複合体を形成し肝へ運ばれ、また

\*北海道赤十字血液センター研究部

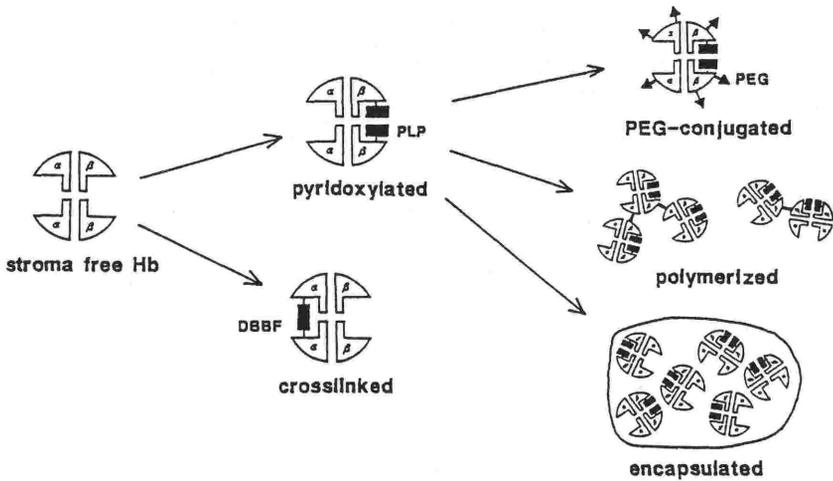


図1 Stroma-Free Hemoglobin の主な修飾法

遊離 Hb の形で尿中へ排泄されてしまう。このため SFH では血中半減期は二時間と極めて短い。この欠点を克服するため、Hb 分子に不活性化物質、例えば PEG を結合させ分子量を大きくする方法<sup>3-4)</sup>、分子同士を化学的に重合する方法<sup>5)</sup>、またはリポソーム化する方法<sup>6-7)</sup> など多くの試みが行なわれている (図1)。例えば、PEG 化 Hb を用いてラットの80%交換輸血を行なった場合、血中半減期は SFH に比較して3.5倍に改善される<sup>8)</sup>。PEG 化での問題点は、血液と同等な Hb 濃度を維持すると膠質浸透圧が上がりすぎてしまい、Hb 濃度を 8 g/dl 程度に抑える必要があることであり<sup>4)</sup>、従って、現状では人工的酸素運搬体というより酸素運搬能を有する血漿増量剤としての性格が強調されよう。

Hb の重合化は主に米国で研究されており、その研究開発の現況を表1にまとめた。Moss ら (Northfield Lab.) の重合化 Hb の場合、生理的な膠質浸透圧で Hb 濃度 14 g/dl を達成し、血中半減期もヒトで40~46時間と報告されている<sup>5)</sup>。ただし、重合化反応の制御は難しく反応物が単一ではないこと、新たな抗原性の出現など未解決の問題点も多い。現在、この重合化 Hb は FDA から phase I の認可を受け臨床試験が行なわれており、結果の公表が待たれる。重合化のタイプは Hb 分子内重合も可能であり、これは Baxter や米国防軍で研究が進められているが、サブユニット間の重合により PLP 化を行なわなくとも酸素親和性を

を下げる事が可能とされている。ただし、血中半減期は比較的短いようである。

リポソーム化 Hb の特徴は、Hb 以外の様々な赤血球内酵素を同時に封入でき、より細胞に近いものが実現できることである。また、Hb を濃縮して封入すれば膠質浸透圧、粘性の問題もなく、循環系の障害などでは血流の改善に有用かも知れない。ただし、リポソームのような大きな粒子は、生体によって異物として認識されてしまい貧食などの生体反応を生ずる。このことはいずれの人工的酸素運搬体の場合も同様であるが、特にリポ

表1 米国における人工的酸素運搬体開発の現状

開発グループ	方 法
Baxter Healthcare	diaspirin 試薬による分子内架橋
Hemosol (Canada)	各種架橋剤による分子間及び分子内架橋
Northfield Laboratories	グルタルアルデヒドによる分子間架橋
Quest Biotechnology	グルタルアルデヒドによる分子間架橋
Biopure/Upjohn	グルタルアルデヒドによる分子間架橋
Biosource Genetics	ウシヘモグロビンを使用 tobacco 植物を用いた組替え Hb の製造
Somatogen	大腸菌を用いた組替え Hb の製造

ソームの場合網内系による貧食が血中半減期と関連して重要となる。粒子の大きさ、膜組成、表面電荷など生体との適合性に関連して解明すべき課題は多く、リポソーム化 Hb の実現にはまだ時間がかかろう。

以上の人工的酸素運搬体は多くがヒト Hb を用いるものであるが、米国ではウシなど動物 Hb の利用も活発に行なわれている。特にウシ Hb は酸素親和性を制御する上で 2,3-DPG など特殊なリガンドが必要なく、酸素親和性の調節が必要ない。HIV など感染症の危険もなく、また米国では献血由来の赤血球が不足している事情があり、Hb の安定な供給源として真剣に検討されている。異種タンパク質による免疫原性が心配されるが、動物実験では Hb の修飾法によってはあまり問題にはならないとの報告も出されている。

以上、第二世代のヒトヘモグロビン修飾体はすでに Phase I の臨床試験に入っているものもあり、臨床応用への可能性を秘める優れたものであるが、あくまでもその原料は生体由来の赤血球であり、真の意味での人工物とはいえない。第三世代の人工的酸素運搬体としては、組替え Hb が注目されている。米国でヒト Hb 遺伝子を用いて大腸菌で rHb を大量に製造する技術が発表されているが<sup>9)</sup>、興味ある点は遺伝子に人為的に変異を組み込み rHb の  $\beta$ 鎖間に架橋を作り、ヒト Hb で問題となる酸素親和性及び血中半減期等の問題点のある程度解決したことである。FDA により

phase I の臨床研究の許可が下りたと聞いている。免疫原性については今のところ問題ないとされているが、そのまま輸注すると膠質浸透圧の点から Hb 濃度が 5 g/dl に制限されてしまうため、リポソーム化など修飾法の検討が進められているようである。

完全な人工物としては、土田らが開発しているリポソーム包埋合成ヘムもきわめてユニークなものである。これは全過程を化学合成したもので<sup>10)</sup>、模式図を図 2 に示すが、合成ヘムの四本の側鎖に囲まれた疎水的ドメインに酸素分子が脱着する。この合成ヘムをリポソームのリン脂質二重相の中に埋め込み、紫外線によってリン脂質同士を重合化し安定化した。酸素溶解能はヒト血液に劣らぬ優れたものであることが証明されている。動物実験が行なわれている段階であり、今後の進展が期待される。

## 2. 人工的酸素運搬体の適応

これまで人工的酸素運搬体を開発という側面から述べてきたが、次に臨床における適応範囲を論じてみたい。一般には、血液型に関係なく使用できることから緊急時や稀な血液型での輸血、長期保存が可能なことから災害や戦時での使用が考えられている。粘性が低いことを利用し心筋梗塞や脳梗塞など血管狭窄時の微小循環の血流確保にも応用されよう。低温での酸素運搬能を利用し最近進歩が著しい臓器保存にも有用と考えられる。こ

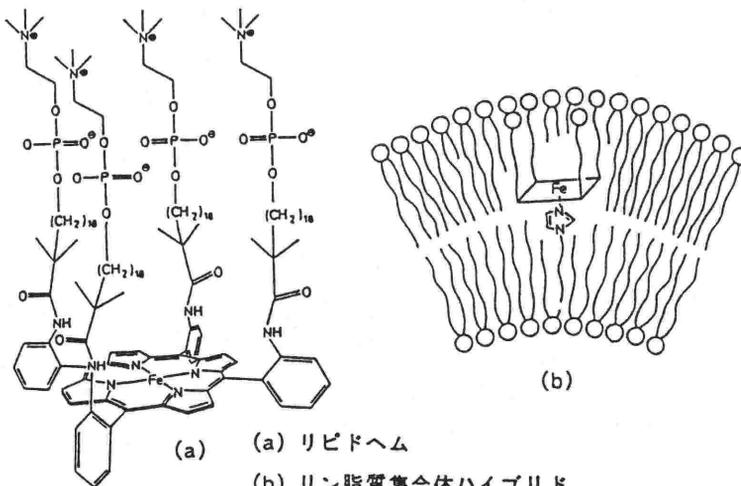


図2 合成ヘム錯体包埋リポソーム模式図

の他、輸血後感染症の危険がないことも指摘されるが、輸血スクリーニングの進歩により輸血後感染症の危険性は激減しており、例えば我国では非A非B型肝炎のスクリーニングが世界でいち早く導入され、輸血後肝炎予防に大きく貢献した<sup>1)</sup>。

また、後述するように現状では人工的酸素運搬体は血漿または血小板製剤との併用が必要であり、輸血後感染症予防を人工的酸素運搬体選択の第1義的理由とするケースは、患者が極度の免疫不全状態に陥っているなど、特殊な場合に限られたものとなる。

このように人工的酸素運搬体の適応は広範なもの期待されるが、あくまで赤血球の有する機能のうち酸素運搬を代替するのみであり、輸血では濃厚赤血球輸血に相当する。現在の輸血医学の進歩は成分輸血の進歩によるところが大きい、出血に対する輸血は出血に対する生体の反応に応じた成分輸血が行なわれ、少量の出血では血液は使わず補液だけを行い、1200 ml 程度までは濃厚赤血球輸血が適応される。それ以上では凝固因子などの補充が必要となり血漿さらには血小板輸血または全血輸血が行なわれる。従って、人工的酸素運搬体のみ適応は濃厚赤血球と同じ 1200 ml 程度までと考えられる。それ以上では他の血液製剤との併用が必要となる。また、現在の人工的酸素運搬体は血中半減期が数十時間となっており、血中からの消失による影響を無視することはできず、この意味でも輸血を完全に代替するレベルには至っていない。

一方、同種輸血は輸血後感染症、同種免疫感作、GVHD などリスクが大きいことから、術前貯血または術中回収により自己血を用いる自己血輸血法が普及した。整形外科領域など手術日が予測できる場合に限られるが、多くの場合準備血液量は 1200 ml 以下で十分となっており、人工的酸素運搬体の適応である 1200 ml 程度の輸血は自己血貯血でも十分に対応できることを示している。また、近年遺伝子工学の技術によって開発された組換え Epo の使用によって、効率的に自己血を貯血することが可能である。術前に Epo を投与しヘマトクリットを高くしておけば、ある程度の出血に対して赤血球輸血を行なうことなく輸液のみに対応することも十分可能と予想される。

従って、人工的酸素運搬体の臨床適応を考える

表2 人工的酸素運搬体の輸血における適応

1. 1000 ml 以下の赤血球製剤に相当する輸血
2. 将来は、同種血液、自己血液、エリスロポエチン適応症例の多岐選択の一つとして

なら、赤血球の代替として輸血に使用することになり、主に 1000 ml 以下の輸血に適応があると思われる。しかし、この程度の輸血は、自己血輸血、あるいは輸血をせず Epo 投与で対応も可能である。従って、人工的酸素運搬体の適応は、自己血輸血や Epo 利用を含め、総合的な輸血計画を立てる中での多岐選択の一つとしてその応用があるのではなかろうか(表2)。

最後に、人工血液の定義について補足をしたい。現状では、人工血液は人工的酸素運搬体を指すにとどまるが、血液成分の代替物は組換え産物を中心に多くのものが開発されつつあり、前述した Hb の他、アルブミン、凝固因子、サイトカインなどが有力である。赤血球以外の細胞成分の人工代替物は、その機能の多様性及び複雑さから極めて困難と想像されるが、白血球及び血小板の造血因子が明らかにされたならば、将来部分的に輸血を代替できる可能性がある。従って、サイトカインや凝固因子と人工的酸素運搬体を併用することにより、人工物による完全な輸血の代替が可能となるかも知れない。今後の技術の進歩を考えるならば、将来人工血液はもっと広範囲な概念に拡張されることになろう。輸血医学の今後の進歩を期待したい。

## 参考文献

- 1) 関口定美, 伊藤敬三: 人工血液—研究の現状とその将来—. 月刊薬事 13: 711, 1989.
- 2) Sekiguchi, S., Ito, K., Ototake N., Ikeda, H., and Sasakawa, S.: Preparation and separation of pyridoxylated hemoglobin. In Progress in Artificial Organs, ed. by Nose, Y., Kjellstrand C., and Ivanovich, P. pp.1153-1156, ISAO Press, Cleveland, 1985.
- 3) Sekiguchi, S., Ito, K., Kobayashi, M., Ototake, N., Kosuda, M., Kwon, K. W., and Ikeda, H.: Preparation of virus-free pyridoxylated hemoglobin from the blood of HBV or HTLV-I healthy carriers. Biomater. Art. Cells Org. 16: 113-121, 1988.
- 4) Yabuki, A., Yamaji, K., Ohki, H., and Iwashita, Y.: Characterization of a pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate as a physiologic

- oxygen carrier. *Transfusion* 30: 516-520, 1990.
- 5) Gould, S. A., Sehgal, L. R., Rosen, A. R., Sehgal, H. L., and Moss, G. S.: The efficiency of polymerized pyridoxylated hemoglobin solution as an O<sub>2</sub> carrier. *Ann. Surg.*, 211: 394-398, 1990.
  - 6) Takeoka, S., Hasegawa, E., Nishide, H., Tsuchida, E., and Sekiguchi, S.: Oxygen-transport and solution properties of poly lipid/Hb vesicles (ARC). *Biomat. Art. Cells Immobil. Biotech.* (in press).
  - 7) Hunt, C. A., Burnette, R. R., MacGregor, R. D., Strubbe, A.E., Lau, D.T., Taylor, N., and Kawada, H.: Synthesis and evaluation of a prototypical artificial red cell. *Science* 230: 1165-1168, 1985.
  - 8) 小須田美雪, 小林正友, 伊藤敬三, 池田久實, 関口定美: 人工的酸素運搬体としての修飾ヘモグロビンの生体内効果. *人工臓器* 17: 1690-1695, 1988.
  - 9) Hoffman, S. J., Looker, D. L., Roehrich, J. M., Cozart, P. E., Durfee, S. L., Tedesco, J. L., and Stetler, G. L.: Expression of fully functional tetrameric human hemoglobin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Sci. USA* 87: 8521-8525, 1990.
  - 10) 土田英俊, 長谷川悦雄: *人工臓器* 19: 1552, 1990.
  - 11) 霜山龍志, 関口定美: HCV 抗体スクリーニングによる輸血後肝炎の減少. *HCV Update (Ortho)* 2: 1-3, 1990.

\* \* \* \* \*

\* \* \* \* \*

\* \* \* \* \*