人工赤血球への道

—新しい赤血球膜を求めて—

まず本論に入る前に、血液不足の現況を中心に、毎年輸血学会でとりあげられる問題にふれてみた。われわれの研究がまだ完成しない現在——というのはおこがましい話ではあるが——当分献血制度を進めていく以外、血液不足に対処する道はない。ここで、“どうぞ献血を”といったら諸賢のお叱かりを受けるだろうか。次に血液、特に赤血球、ヘモグロビンの持つ特性について詳しく述べた。われわれが生命の本質にせまろうとすると、そこに展開される神の創造物の偉大さに心をうばわれ、目をはるるのである。最後にわれわれの研究の一端を述べた。前章で詳しい解説をしたため、本論が十分意を尽せなかったかと思われる。廃物利用の、地味な学問だが、意外に分野は広く、やってみるとけっこうおもしろい領域である。学問とはすべてそういうものなのかも知れないのだが。

関　　口　　弥*

1. はじめに¹⁾——現代輸血の問題点

夜、静まり返った街にサイレンの音が走る。どこかで交通事故が起こったらしい。救急車が止まり、一人の男が血だらけで担送されて来る。顔面蒼白、額に汗がじっとりにじんいる。両側の大腿骨複雑骨折、その他数箇所に挫創がある。血圧は60/30、脈拍は120。ショック状態である。医師は直ちに強心剤、昇圧剤などを注射し、リンゲル液の点滴静注、酸素吸入を始めると同時に血液型を判定し、血液センターに輸血用保存血を依頼する。20分後血液がとどく、医師は血圧その他の全身状態をみながら輸血を始め、その間、必要な外科的処置を行って行く。

輸血——われわれ外科医は今日、輸血によって出血性ショックの患者の生命を救うことができるようになった。手技としてはごく簡単な“一方で採血し、他方でこれを注入する”だけのことであっても、血液と生体の持つ複雑な生命現象のために、現在まだ血清肝炎の問題が残されているとはいえ、治療手段として役立つ輸血法が確立するまでには、永い年月と多くの人の知恵と努力が必要であった。

本論に入る前に、わが国の血液事情をみてみよう。昭和38年には585,000lの保存血がつくられたが、この

うち98%は売血によって供給されていた。その後ライシャワー事件を契機に、売血制度はしだいに廃止され、現在ではきれいな血液の確保をめざし、献血の制度がこれにとって代わった。しかし、この制度はまだ十分徹底しておらず、昭和41年には保存血の供給は405,000lにまで減少してしまった。一方外科学の進歩に伴い、心臓、大血管をはじめ一度に数lもの血液を必要とする手術が、日常各所で行なわれるようになり、加えて交通外傷が頻発するようになった今日、血液は当然不足してきた。かかる血液不足に対処するには、現在のところ献血運動をいっそう推進する以外になく、このため血液事業関係者は日夜苦勞を重ねている。

ソビエトでは以前より死体からの採血が行なわれ、実際に使われている。献血の場合、1人からの採血は200~400ccであるのに、死体1体からは2~3lの血液が得られ、臨床効果も生体血液との間に差異がないことが証明されているが、わが国では法律問題もあり、いまだ基礎研究の段階である。

後で述べるように、赤血球が生きた細胞であることもその保存法に関して重大な問題を与えている。現在の保存法はACD液(クエン酸-クエン酸ナトリウム-ブドウ糖の混和液)を加え、血液の凝固を防ぐ一方、4°Cに保存し、代謝を抑え、赤血球の老化と溶血を防いでいるが、もちろん十分ではなく、3週間たつと廃血として捨てなくてはならない。輸血されても、体内で十分その働きをしないうちに溶血してしまうからである。血液はいつ必要になるかわからない。一方では必死に血液を集めても、

* Wataru SEKIGUCHI 東京大学医学部付属病院第二外科(東京都文京区本郷7-3-1)
One Research for a New Type Membrane of Red Blood Cell

他方では、時には廃血として捨てられる血液がでてくる。もったい話である。

血液を凍結してから解凍すると、赤血球は皆溶血してしまう。ところが血液より赤血球を分離し、グリセリンなどの凍害防止剤を加えて -85°C に凍結保存するときには、解凍時に溶血が起らない。この温度では赤血球の代謝は完全に停止し、赤血球内のヘモグロビンの変化も起らないので、半永久的の保存が可能である。ところが Freezer が高価であることと、凍害防止剤としてのグリセリンの効能がもう一步不完全のところがあり、われわれの教室でも、より良い凍害防止剤を求めて研究中である。

周知のごとく、人の血液には ABO 型、Rh 型などの血液型があり、この法則を無視した勝手な輸血はできない。以前 O 型の人には万能供血者といわれ、どの血液型の人にも輸血が可能であると思われていた。ところがその後、多量の血液を使用する際、特に相手が A 型、AB 型の場合には異常反応を起こすことがあり、危険なことがわかったので現在は同型輸血がたてまえとなっている。Rh 型プラスの血液がいくらあまっても、Rh 型マイナスの人に輸血することはできないし、O 型があっても AB 型がなければ AB 型の人の手術は延期されることにもなる。不便な話である。

ショックの場合いちばん困るのは循環している血液が著しく減少するために、血管がペチャンコになり、心臓が十分な拍出量のないまま、空打ちを始めることがある。このとき、ブドウ糖液でも、リンゲル液でも、ともかく血管内を充テンしてやれば、血圧は上昇し、ショックは防ぎうるということがわかった。ただしこのような液体は毛細血管壁から組織の中へ出て行ってしまうので、かえって具合が悪いこともある。そこで浸透圧効果の十分ある高分子溶液が案出された。現在 plasma expander として使用されているゼラチン分解物の溶液、デキストラン溶液などがこれである。

現在のわが国の輸血学に与えられた大きな課題は血清肝炎であろう。これは血清の中にあるウィルスによって起こり、輸血後 1~2 カ月たったあとで肝障害が来、場合によっては黄疸が現われ、さらに重症の場合には死ぬ

こともある。日本は名だたる肝炎国で、昨年の輸血学会での報告によると献血、預血による血液を使用しても発生率は 15% にも及んでいる。東京オリンピックの際、オーストラリアが、“もし輸血の必要のある外傷が発生しても、日本の血液は輸血してくれるな”と申し入れてきたことは、今でも語りぐさになっている。オーストラリアは赤十字として血液事業を始めた最初の国であり、その運営もすばらしく、もちろん血液は 100% 献血でまかなわれている。

このような血液不足と血清肝炎のため、交通外傷でも中程度のもの、手術では普通の胃切除、胆嚢切除などでは輸血を行わず、代用血漿のみですますようになってきた。しかしこのような plasma expander には酸素運搬作用がなく、一時的に血管床を満たし、循環を回復する働きが乏しい。また plasma expander では相当量注入しても状態が改善されず、わずかに 200 cc ぐらいの血液を輸血しただけで一気になる患者があることを外科医はよく知っているのである。

屠殺場に行く。頭をやられ、意識を失った牛の頸動脈が切れ、血がふきだす。もったいないと思う。また期限切れの血液がすてられてしまうのももったいない話である。しかし輸血の歴史は、動物血輸血の失敗、型違い輸血の失敗の歴史であった。それを知っていながら、なおももったいない気がしてならない。ここからわれわれの研究が始まるのである。

血液には特殊な性質がいくつかみられる。そこでわれわれの研究を紹介する前に、血液、特に赤血球について二三の知識をまとめておきたいと思う。

2. 血液を理解するために²⁾

2-1. 血液というもの

生物の進化の過程をみると、生体の構造が複雑化する前に、体液の流動をより円滑に行なわしめる機構が発達してきていることに気付く。組織、器官を形成する末梢の細胞は、周囲から新しい養素をとり入れ、代謝産物を排泄しながら活発な生命現象を営み、これがまとまって一つの組織、器官としての機能が果される。このような変転きわまりない動的な状態の中で細胞が生き続けるためには、養素を与え、代謝産物を運び出し、内部環境を調節し維持していく体液の流動という補助手段の確保が、どうしても必要であったからである。高等動物になると、このような体液の流動は脈管系を通路とし、心臓のポンプ作用を頂点とした循環の体系によって行なわれることになる。完成された脈管系には血管系とリンパ管系が属し、それぞれ血液、そして血液より形成されたリンパ液が流れ、毛細管を介して細胞間液、細胞内液と交通し、末梢細胞のエネルギー代謝の媒体として重要な役割りを演じているのである。

関口 弥氏 昭和36年3月東京大学医学部卒業、昭和37年6月、東京大学病院第二外科入局、木本誠二教授、羽田野 茂教授の下で一般外科、胸部外科臨床ならびに輸血学、人工血液に関する研究をはじめ、現在に至る。趣味はレコード鑑賞、スキーなど。

血液の量は、成人の場合、体重の約 1/13 に相当し、60 kg の人なら 5 l 前後である。血管外では凝固しやすいが、ヘパリン、クエン酸ナトリウムのごとき抗凝固剤を加えると凝固せず、放置すると液体成分(血漿)の下に、細胞成分が沈殿する。血漿の主成分はアルブミン、グロブリン、フィブリノーゲンなどの水溶性タンパク質で、他に糖、脂肪球、各種電解質を含み、細胞成分は赤血球、白血球、リンパ球、血小板などである。各成分にはそれぞれ特有の役割があり、これが一体となって血液の働き、すなわち呼吸ガス、養素および代謝産物の運搬、組織の水分、pH、浸透圧、温度などの調節、病原菌の貪食作用や抗体の産生、血管外での凝固による大量出血の防止などの生体防御の作用を行なっている。

血液中の細胞成分は、1 mm³ 中に赤血球 500 万、白血球とリンパ球で 7,000、血小板は 20 万ぐらいである。人の赤血球は直径 7~8 μ 、厚さ 1 μ の双凹円板状をなし、したがって表面積は同容積の球体に比しずっと広がっており、ガス交換の際の効率を非常に良くしている。赤血球が赤いのは、中に呼吸ガスの運搬をつかさどる赤色の色素、ヘモグロビン(Hb)が実に 34 g % の割りに包み込まれているからであり、この量は赤血球の乾燥重量の 95%にも達している。すなわち赤血球は数といい、形といい、また内容の Hb の濃度といい、呼吸ガスの運搬のためにつくられた細胞であると考えられる。そして Hb がまた呼吸ガスの運搬にあたって合目的な性質を持っているのである。この機構をもう少し詳しく述べてみよう。

2-2. 赤血球とその働き

われわれは無意識のうちにも呼吸作用を営んでいる。計算上 1 日約 600 l の酸素を消費し、約 480 l の炭酸ガスを放出している。

呼吸作用によって肺内に入った酸素は肺毛細血管壁を通して血中に拡散し、数秒の後には全身の末梢組織に送られ、ここで形成された炭酸ガスは炭酸の形で血液内に入り、肺に運ばれここで呼出される。

肺内の酸素分圧は 100 mmHg、静脈血の酸素分圧は 40 mmHg であるので、酸素は比較的容易に静脈血に移行する。ところが、この酸素分圧では酸素は血漿中に 100 ml 中 0.3 ml しか溶解しない。これでは末梢組織はたちまちのうちに酸素欠乏状態になってしまう。しかるに血液中には 100 ml 中 15 g の割で Hb があり、1 g の Hb は酸素 1.34 ml と結びつくから、100 ml の血液は 20 ml の酸素を運ぶ能力があることになる。これは末梢組織にとって十分な酸素量である。血液 100 ml 中、Hb 量が 3 g 以下となると生命の維持は困難になるといわれているから、15 g という量は十分安全性がみこされた量であるといえよう。

Hb は、4 本の polypeptide-chain から成る globin と hem が結合した複合タンパク質である。Hem は 2 個の

鉄原子が protoporphyrin の四つの窒素原子の中央に位置した金属錯体で、鉄原子の配位類 6 のうち、平面上の 4 個は protoporphyrin のピロール核の窒素原子で占られている。上下の配位座には、globin 中の histidine 残基が結合しているが、酸素がくると一方がはなれ、ここに分子状酸素が結合することになる。globin の結合しない native の hem 中の鉄原子は容易に酸化され、3 価になってしまうが、hem が globin と結合すると非常に安定となり、2 価のまま酸素の着脱を行なうようになる。しかし Hb を酸素のある状態で長時間放置したり、亜硝酸ナトリウムなどの酸化剤を作用すると、鉄原子は 2 価から 3 価になり、酸素を結合しなくなる。これをメト Hb という。すなわち、酸素の結合、解離には鉄原子が 2 価であることが必要なのである。

さて、Hb と酸素との結合は、それにおける酸素分圧によって決定され、特殊な酵素が必要とされる生物学的反応ではない。そこで In vivo で行なわれる酸素と Hb との結合を、トノメーターを使って In vitro でモデル化することが可能である。

HbO₂ (酸素ヘモグロビン。CO のごとき酸素以上に Hb と結合しやすい気体のない場合、通常この形で存在する) をトノメーターに入れ、内部の酸素を完全に窒素と置換すると、酸素を放し還元型の Hb となり、これを自動記録式の分光光度計を使って記録するときは、555 m μ にピークを有する吸収曲線が得られる。ここに再び少量ずつの酸素を注入すると、加えられた量に応じて曲線が変化し、完全に HbO₂ となると 578 m μ 、542 m μ にピークを持ったカーブが画かれる。そこで各々の曲線について酸素飽和度と、加えた酸素の分圧を算出し、その関係をグラフに画くと第 1 図のようになる。同時に、筋肉内にあり、やはり同じ Hem を持った呼吸色素で、Hb より簡単な構造をしているミオグロビン (Mb) につい

A: 肺の PO₂, B: 組織の PO₂, Hb の解離平衡曲線は pH, pCO₂, 温度によって見かけは変わるが、Hill の実験式における n の値は変わらず、n=2.8 である。

第 1 図 正常 Hb の酸素解離平衡曲線

ての曲線も示した。これらの曲線を酸素解離平衡曲線という。

第1図について、もう少し説明を加えよう。図のごとく、Hbの解離平衡曲線はS字状をなし、Mbのそれは双曲線をなす。Hbの曲線についていえば、酸素分圧が100 mHg（肺内の酸素分圧に相当する）のところでは98% ぐらいの飽和度を示すが、40 mHg（末梢組織ならびに静脈血中の酸素分圧に相当する）に低下すると持っていた酸素のほとんどを放出する。Mbの場合には酸素分圧が100 mHgでも、40 mHgでも、ほとんどその飽和度には関係がない。すなわち酸素親和性が強すぎるからで、このような物質がHbの代わりに赤血球内にあったら、末梢へ行っても酸素を放すことなく循環するので、末梢組織はやはり酸素欠乏状態になる。Hbは酸素運搬体であり、Mb末梢におけるは酸素貯蔵体である。ここに両者の機能適合性が美しく供覧されている。

この差は両者の分子構造の差から説明されている。Hbは1分子中4個のHemを持ち、Mbは1個のHemを持つ。Hbの場合、酸素が結合する時、酸素は勝手にHemにつくのではなく、互に影響を持ちながら、結合することによるものとされている。これをHem-Hem-interactionという。

Hbの酸素解離平衡曲線は、実験的には、Hillの式

$$Y = \frac{Kp^n}{1+Kp^n} \quad \left(Y \text{は酸素飽和度, } p \text{は酸素分圧, } K \text{は定数} \right)$$

において、 $n=2.8$ としたときの曲線に一致する。Mbは $n=1$ であり、もし、Hem-Hem-interactionがなければHbも1となるはずである。Hbも尿素処理などで分子構造が変わってくると、 n の値は2.2ぐらいに低下してくる。このような変性Hbは酸素との親和性が強くなり、それだけ酸素を放出しにくくなるのである。

2-3. 生きた細胞としての赤血球

完成した成熟赤血球は、無核で、他の生細胞のごとく細胞分裂による増殖はなく、乾燥重量の95%を占めるHbの生合成も行なわず、一見Hbを包み込んだ袋のような様相を呈している。赤血球浮遊液に、亜硝酸ナトリウムを少量加えてやると血球内のHbの、Hemの Fe^{++} が Fe^{+3} となり、メトHbとなるが、これを十分洗浄してからブドウ糖、キシロースなどを加え、37°CにIncubationすると、メトHbは再び還元されて、スペクトル的にもまったくもとのHbにもどる。また正常赤血球を溶血し、Stroma（赤血球膜）を除いて放置するとメトHbが増量してくるが、赤血球のまま放置するときはこのようなことはない。こんな簡単な実験からも赤血球内にはメトHbを還元するSystemが存在することがわかる。血液を長く保存しておくと、球形となって溶血してしまうが、このような赤血球内のATPレベルを測定してみると、著しく低下している。赤血球内に

TCA回路は存在せず、高エネルギーリン酸結合体の形成はすべて解糖系によっているが、このエネルギーによって双凹円板形状の維持能動移送（赤血球膜には濃度勾配にさからってある特定の物質を赤血球内に透過吸収する働きがある）、メトHbの還元その他が行なわれている。代謝の進行は、赤血球の老化をもたらすのでこの代謝をできるだけ抑えるために、現在の保存法はACD液によって凝固を防ぐと同時に酸性化し糖→乳酸への反応を抑えていることは前にも述べた。すなわち赤血球は単にHbをいれた袋ではなく、エネルギー代謝系を持った有機体、生きた細胞であることを知っておく必要がある。

3. 酸素運搬体を求めて⁸⁾

3-1. その歴史的背景

科学の進歩はまず夢をみることから始まる。外科学においてもまたそうであった。病気のため先天的異常のために機能を失ない、廃物化した臓器に対する治療手段として、他の人または動物の健康な臓器を持ってきて移植したり、人工の代用臓器で置き換えたりしようとする試みが近代外科学の発達とともになされるようになった。特に人工臓器に関しては、当時急速に進歩しつつあった理工学、特に高分子学やエレクトロニクスと結びついて発展していった。欧米には数年おくれたとはいえ、わが国でも昭和30年台に入ってから急速にこのような機運が熟し、昭和32年には医学者と理工学者が集まって人工内臓研究会（後の日本人工臓器学会）が発足し、臓器移植に関するテーマと、代用血管、人工心肺、人工腎臓、人工肝臓等々、人間の持つほとんどすべての臓器に“人工”、“代用”という字をつけた代用臓器の開発に関するテーマがとりあげられた。人工血液もまたこの中に入っていたが、これは代用血漿（plasma expander）とは異なり、酸素運搬能を有することが前提になっていたのである。このうちで、あるものは現在の外科学では必要不可欠のものとなっている。しかしそれもあくまで治療の補助手段として用いられているものがほとんどで、代用血管を除けば、小型化され、長期間体内で、埋没された状態で働く臓器は、心拍を制御するpacemakerぐらいなものであろうか。今では一時の人工臓器開発のブームも下火となり、これに代わって代用臓器開発の中心は臓器移植に移っていった。どのような精巧なコンピューターよりも現在の段階では、天然の臓器にまさるものはないことを医学者はよく知っているからである。一般に人工臓器の研究と発展には、理工学分野の進歩が併行する。生物学的には問題点がよくわかっていても、機質の面で現在のところ、どうすることもできずに将来にその解答を待っている人工臓器の研究も多い。理工学が発展するに伴って、天然臓器との融和をはかった新しい形の人工臓器の開発が試みられる日が必ずくると思わ

れる。

人工赤血球の研究も、初めは Hb 類似物質の合成から始められた。しかし、現在のところ人工 Hb はできていない。そこでまた大昔にもどり、現代医学の立場で、動物の赤血球、Hb の利用の可能性について再検討を加えることになる。

3-2. 人工 Hb 合成への試み⁴⁾

X線を使って分子構造を解明する手段が確立して以来、多く生体高分子の構造が明らかにされた。特に Hb はその複雑な機能と構造との関係を知る好適な材料とされ、現在では Hb を構成するアミノ酸の配列から立体構造に至るまで、ほぼ明らかになった。Hb 1 分子中には 4 箇の Hem があり、Hem と globin の結合は、globin タンパク中の histidine 残基を介して行なわれていること、Hem は globin タンパクの疎水性部分に埋伏した形で存在しているので、2 箇の Hem 鉄は 3 箇に酸化されることなく、酸素と可逆的に結合、解離が行なわれていることなど。

各動物の Hb の globin タンパクには特異性があるが、Hem にはこれがなく、すべての動物に共通であって抗原性がない。そこで Hem を globin タンパクに類似した疎水性の plastic で包むことができれば、各動物に共通な酸素運搬体——人工血色素——ができるはずである。このような意図により、1958 年 A. H., Corwin ら、続いて J. H. Wang らは、Hb の globin 部分を疎水性の plastic であるイミダゾール誘導体-固体の polystyrene で代用させたモデルを示し、豊田らはさらにこれを追試、発展させた。結論的にいえば、polystyrene では疎水性がはるかに弱く、空気中の水分を含んだ酸素にあうとすみやかに酸化されて可逆性を失ってしまうので、生体灌流液としての使用は不可能であった。天然または人工の金属錯体の中には、酸素との結合が可能なものもあるが、生理的条件の下で、前に述べたような合目的的に酸素と結合解離を行なう物質は現在のところ得られていない。

3-3. Hb 溶液輸注について

われわれは酸素運搬能を持った plasma expander が必要であるといった。Hb は溶血して赤血球外に出ても、まったく同様な酸素解離平衡曲線を示すから、本来の性質は失われていないはずである。人の場合、最近では免疫学的に抗原性の異なる多くの異常がみつけれられているが、正常 Hb は Hb-A (Adult 成人型) と Hb-F (Foetal 胎児型) の 2 種であり、後者は通常胎児にあるものだから、問題はない。分子量も 68,000 ぐらいであるから高分子特有の浸透圧による血管内圧上昇作用があり、型検定の必要もないので、ヒト Hb-溶液は、理想的な plasma expander として利用できないかという考えが古くからあり、いくつかの実験報告もみられる。

高度の熱傷、外傷、異型輸血のあと、尿中に Hb や Mb が多量に排泄され、高率に腎不全が起これ、尿が出なくなってしまう。この場合、腎は特異な病理的所見を呈し、以前は、Hb や Mb で尿形成のいちばんのみなもとである腎糸球体（血液がここを通る間に、血中の水分や尿素その他がしぼり出されるろ過装置）がつまってしまい、尿ができなくなるものと考えられていた。事実、古い血液を輸血したあとで腎障害がくることもあり、この考えは一般に認められていたが、近年ショックの病態生理が末梢循環系を中心に検討されるようになると、腎不全の原因として、末梢血管内での赤血球の凝集 (microthrombosis) が起これ、それより末梢の血流の途絶をきたし、全体として腎の酸素不足がくることが重要視されるようになった。また赤血球膜には microthrombosis を起こす要素があり、Hb にはこれがないことが認められて以来、Hb 溶液（赤血球膜は含まない）の輸注が実験的にはあるが再検討されるようになった。

しかし Hb 溶液を静脈内に注入すると、Hb は尿とともに腎からどんどん排泄されてしまう。人の場合、100 ml の血中に 100 mg ぐらひは Haptoglobin と結合し（これはすでに正常な酸素運搬能を失っている）、少量は Albumin と結合して存在するが、Free の Hb は大部分はすみやかに腎より排泄されてしまい、あとは肝その他の細網内皮系（異物処理を行なう生体防御機構）にとられ、代謝されてしまう。Hb の血中残存半減期は 4 時間ぐらひである。

無脊椎動物の酸素運搬体として、環形動物のエリスロクルオリン（分子量 17,000~300 万）、クロロクルオリン（分子量 300 万）、軟体動物のヘモンアニン（分子量 38 万~680 万）などがあり、いずれも分子量が大きく、これらは体液中に遊離の状態で存在している。エリスロクルオリンの分子量 17,000 ぐらひの小さいものは赤血球中におさまっている。すなわち、流血中に存在するためには、分子量が十分大きい、袋の中に納まっている必要があるらしく、したがって Hb-溶液をそのまま酸素運搬能のある plasma expander として利用することはできないと思われる。

3-4. 異種動物の Hb は利用できないだろうか

たとえばウサギの血漿内にウシの赤血球を加えると、ウシの赤血球はすみやかに凝集を起これ、これを 37°C で振とうすると短時間で溶血してしまう。Na₂Cr⁵⁺O₄ を赤血球と混和すると、Cr⁵⁺ が膜を通して赤血球内に入り、Hb と結合し、これをビタミン C で還元してやると以後膜の外には出てこなくなる。これは注入した赤血球の寿命を知る方法として臨床的にも使用されている手技であるが、この手技を利用し、Cr⁵⁺ の γ 線をたよりに、ウサギの血管内でのウシの赤血球の寿命をみると、約 10 分ぐらひである。ただしこの場合は注入する量にもか

り左右され、またウサギの中にも凝集溶血力の強いものと弱いものがあり、その関係は複雑であるが、いずれも注入された異種赤血球は比較的短時間で処理されてしまうことがわかる。

このような場合、膜は破壊されるとして Hb の方はどうであろうか。ウシの赤血球をウサギの血漿内に加え溶血させ、これで酸素解離平衡を測定してみると、酸素との結合解離はまったく正常に行なわれていることがわかる。前述のごとく血漿内には Haptoglobin が存在し、これと結合した Hb は酸素との親和性が増し、解離平衡に強い影響を及ぼすことが知られているが、量はごく少なく、問題にならない。

以上の実験から、ともかく異種 Hb は生体内で働さうることを知った。しかし Hb 溶液をそのまま注入することは不可であるので、赤血球膜に代わる新しい膜で Hb を包むか、または赤血球膜を Hb の変性を起こさないような方法で処理し、凝集溶血をなくせば新しい酸素運搬体がつくれるかも知れないという考えが生れた。昭和 35~36 年ごろであった。ちょうどこのころ、直径数~数十 μ の microcapsule 内に油溶性の色素などを封入する技術がさかんに研究されていた。そこで、われわれは感圧複写紙などの研究でこの方面にすぐれた技術を持つ富士

写真フィルムの研究陣の協力を得、Hb の microcapsule 内封入の実験にとりかかった。

3-5. 人工赤血球のモデル Hb-Capsule⁶⁾

はじめ、Hb-アラビアゴム-ゼラチンの 3 者混液よりコアセルベーション方式によって microcapsule をつくった。しかしこれは pH を 5 以下に下げたり、ゼラチン膜の橋かけ剤にホルマリンを使う必要があるために、Hb が変性を起こし、そのため実験には供しえないことを知った。次に考案したのが現在利用している水中乾燥法である。

Hb を変性させない有機溶媒 (Benzene) に polystyrene を溶解し、これをかきまぜながら Hb の濃厚液を分散する。この段階では Benzene に溶解した polystyrene の中に Hb の粒滴が分散しているが、これを 1% のゼラチン溶液に加え、かきまぜを続けると、水性の Hb を油性の Benzene-polystyrene がとり囲み、これがさらに水性のゼラチンの中に分散した複雑な系ができる。次にこれを暖め、Benzene を放散してやると polystyrene だけが残し、polystyrene の Hb-Capsule ができあがる。材質としては Benzene に溶解するだけでなく、非結晶性で膜形成能があることが必要である。

初期のころは粒径も 500 μ もあり、ザラザラした赤い砂様であった。解離平衡をとってみると、 $n=2.4$ となっており、作成過程で軽度の変性をきたしていることを知り、種々検討を加え、Hb を保護する還元型の glutathion を混和することにより変性を防ぐことができた。また材質も polystyrene から Silicone ladder polymer を使用することで粒径を 10 μ 以下にすることができるようになった。現在、各種測定に供している microcapsule は、内部の Hb はまったく変化しておらず、 $n=2.8$ であり、粒径は 7~8 μ ぐらいにそろっている。

polystyrene や silicone などは生体内に代謝経路がなく、注入された場合、体内に永久に蓄積することにな

第 2 図 Hb-Capsule の製造工程

第 3 図 Hb-Capsule (silicone-membrance),
ます目は 50 μ

第 4 図 Hb-Capsule, 拡大

ポリスチレン

フェニルシリコーン

デキストランステアラート

第5図 Hb-Capsule の材質のいろいろ

る。この Capsule は天然の赤血球と同様、一定の機能を果たした後は、体内から消失すべきであるとの考えから、体内で代謝される高分子を求めて研究を重ねてきたが、このような物質は有機溶媒に溶けにくいので、そのままの形では利用できないが、Dextran に stearic acid を結合した Dextran-stearate は Benzene に可溶となり、膜の形成能も良く、Capsule 化が可能であった。Dextran は融解、代謝されて、体内から消失することが知られており、Stearic acid ももちろん代謝されるので、現在、Dextran-stearate-Capsule の生体内よりの消失過程を検討している。

Capsule 化の途中、材質とともに油溶性の色素を Benzene に溶解しておくと、Capsule 膜を着色することができる。後述のごとく、Capsule が末梢血管内を赤血球とともに流れる様相を顕微鏡で観察する場合、両者を区別することは困難であるが、このような標識をつけておくと便利である。

3-6. Hb-Capsule のいくつかの性質

Silicone による Hb-Capsule の酸素解離平衡を測定する際の、注入酸素量とスペクトル変化を第6図に示した。この Suspension は濁度が強いので、reference に水を包んだ Capsule を入れ、オパールグラス法で行なっているので、正常赤血球の示すカーブとはやや異なる。これより導いた酸素解離平衡曲線を第7図に示した。ともに Capsule 内 Hb が正常であることを示している。

Capsule 膜のガス透過速度を回転式白金酸素電極法で測定した。この方法では酸素の膜透過速度は、赤血球膜も、Silicone 膜も差がでてこない。

赤血球膜は負電位を保っている。このことが Hemorheology の面で重要な因子となることが知られている。

Carry-14型 Spectrophotometer 使用(オパール・グラス法)。

第6図 Hb-Capsule の酸素化に伴うスペクトル変化

ルの変化 I silicone-membrane

Hb_n + nO₂ ⇌ Hb_nO_{2n}

Hill の式

$$Y = \frac{K P^n}{1 + K P^n} \text{ において}$$

n = 2.8 (正常), P₅₀ = 22 mmHg

Capsule 中の Hemoglobin に変性はないことを示す。

測定条件: pH 6.4, 温度 23°C, 気圧 770 mmHg

第7図 Hb-Capsule の酸素解離平衡曲線

Cytopherometer によって測定したところ、silicone 膜では赤血球膜の約半分であった。

3-7. Hb-Capsule の生物学的な問題点

3-7-1. 免疫学的な問題点⁷⁾

もともと血漿内には、入ってきた異種の赤血球を破壊する成分がある。これを自然抗体というが、ウシの赤血球がウサギの血漿中で凝集、溶血を受けたのは、この自然抗体が作用したからである。さらに生体は、異種の赤血球が入ってくると、これを鋳型として、いっそう破壊力の強い成分——免疫抗体を産生する。これは自然抗体に比べてはるかにその力が強く、数千倍に希釈しても、なお凝集力を持っている。異種の Hb に対する自然抗体はないが、免疫抗体はつくられる。このような反応(抗原抗体反応)が皮下で起これば、ここに潰瘍ができ、血管内で起これば全身痙攣を起こし生体は死んでしまう。この Capsule は異種の血漿の中で凝集溶血は起こらない。しかし生体内では、Capsule から Hb が徐々にしみ出してくるために、これを抗原として抗体がつけられる。すなわち Hb-Capsule には抗原性がある。

Hb-抗体を含む血漿中に Hb をいれると白濁する。Hb

第8図 薬剤による抗体産生の抑制

と抗体が反応して沈降物をつくったのである。この沈降物の解離平衡を測定してみると、酸素親和性は著しく上昇し、正常機能は障害されている。ところが十分洗浄した Hb-Capsule を Hb-抗体を含む血漿中に入れても凝集、溶血などの変化はなく、解離平衡から内部の Hb は変性していないことがわかる。すなわち Capsule 膜は、抗原抗体反応を Block していることになる。しかし徐々に、Capsule 内より Hb がもれて出てくるから、このとき激しくはないとしても、なんらかの反応が起こると思われる。

他人の臓器、たとえば腎臓や心臓が、移植された人の体内で機能を果たし続けるためには、その人の体内に、臓器に対する抗体が産生されず、したがって抗原抗体反応（拒否反応）が起こらないようにしてやらなければならない。

近年 Azathioprine のごとき薬剤を使うと抗体ができにくくなることがわかり、臓器移植は非常に進歩したが、このような薬剤を長期間使用すると、かなりの副作用がでてくるので実際の応用にはいろいろ工夫がなされている。ウサギに異種 Hb-Capsule を注入し、この期間約2ヵ月ぐらい Azathioprine を投与すると、抗体は産生されないことがわかっている。それ以後は Capsule 内 Hb がなくなるため抗体はできなくなる。異種の動物 Hb を酸素運搬体として使用するが、抗体の産生はやむをえない。

しかしながら、赤血球は生体内でどんどん新生されるものであるから、代用赤血球も、数日間血管内を循環し、機能を果たした後はすみやかに消失してしまえばよい。したがって臓器移植の場合とは異なり、これが生体内に存在し、抗原性を有するごく短期間だけ薬剤の投与を行えば、抗体の産生をおさえることができることになる。今後臓器移植はなお発展するであろうし、これとともに抗体抑制剤はより無害で、より効果的な薬剤がでてくるに違いない。Hb-Capsule に関する免疫学的問題は一応解決しうる問題とみなしてよいのではなかろうか。

3-7-2. 最後の壁、異物の循環⁹⁾

ウサギの耳静脈に注入された Hb-Capsule は、体内でどのような運命をたどるのであろうか。Capsule 内の Hb を Cr^{51} でラベルし、径 8μ 以上のものと、 8μ 以

第9図 再生された末梢循環 Rabbit ear Chamber 法（弱拡大）

下のものに分け、それぞれ生理食塩水に浮遊し注入してみた。大型 Capsule の場合は大部分が、まず初めに通る肺の毛細血管を通過しえず、ここでストップしている。小型の Capsule の場合は肺の毛細血管を通過し、全身的に流れていくが、30 分後には主に肝、脾、骨髓などに沈着していて、かんじんの流血中にはほとんど存在しなくなる。これらの臓器は細網内皮系といわれる血中内異物を貪食する細胞群を持ち、また末梢血管も異物処理に都合がよくできている血液浄化の器官である。Capsule はこの浄化装置にひっかかり、とり込まれてしまうのであろう。墨汁などを流してやると、細網内皮系の細胞内にとり込まれている所見がみられるが、これらの細胞は Capsule と大きさもそう違いはない（墨汁などははるかに小さい）ので、そう簡単に貪食されるとも考えにくいから、やはり特殊な血管構造の中で沈殿してつまってしまうものが主であると考えている。この際 Capsule の膜荷電が低いということが関係あるのかもしれない。

ウサギの耳に直径 6 mm の穴をあけ、透明なプラスチックの窓をつけておくと、約1ヵ月ぐらいたつとそこに肉芽組織とともに直径 50μ 以下の末梢循環が新生される。これを顕微鏡で観察すると、網目構造の血管内を走る血球がよくみえる。rabbit ear chamber 法というが、ここに着色した Capsule を流してやると、大きいものは途中でつままり、小さいものは細動脈から毛細血管を通り細静脈に消えていく。赤血球が毛細血管を通る際は、よく変形しながら流れていく。このときの変形が流れをスムーズにし、酸素の解離を容易にしているのである。これに比して、Capsule の方は変形がなく、ぎこちない流れで、何とも心細いかぎりである。

Capsule に変形性を与えたら、これがわれわれのさしあたっての目標となった。しかしわれわれの知るところ、現在このような材質は見つかっていない。

3-8. 加工赤血球

赤血球の表面にある型物質、異種赤血球抗原をなくせば、真の意味の universal donor としての赤血球がで

きる。われわれは、Hb の Capsule 化と併行して、赤血球を薬物で処理し、膜表面の抗原物質をなくし、あわせて膜を強化することが可能かどうかに関しても検討を続けている。赤血球をホルマリンで処理すると、異種動物血漿内で凝集しなくなるが、Hb が変性してしまい、とうてい役立たない。群馬大学の井関教授は細菌酵素を使って型物質の処理を行ない、A、B 型を O 型に変えることができた。しかし溶血しやすくなることもあり、まだ実際に輸血には応用されていない。われわれは動物の赤血球表面に TDI を作用することにより、内部の Hb に強い変性を与えずに膜の処理を行なうことができた。この方法で得た加工赤血球はだいたい Capsule と同じ性質を示し(ただし Hb はやや変性している)異種血漿内で凝集溶解を起こさない。そればかりではなく、TDI-処理赤血球は、もとの赤血球に比べて、stroma(赤血球膜)、Hb ともに抗原性が著しく低下している。これは抗原活性部位が TDI により mask されてしまうためと考えられ、したがってこの部分の Hb の構造に変化が起ころのであろう。この Hb は酸素の着脱は可能であるが、酸素解離平衡曲線から、正常の Hb に比してやや酸素との親和性が増強していることが認められ、機能活性部位と、抗原活性部位における共通因子の存在が推定される。

TDI 処理赤血球に亜硝酸ナトリウムを加えると内部の Hb はメト Hb となる。これを十分洗浄した後、還元型グルタチオンや、メトヘモグロビン還元酵素の補酵素として働く。NAD-H₂ や NADP-H₂ を加えてやると、もとの Hb に還元され、酸素の着脱を行なうようになる。これは各種酵素が無傷で残っていることも類推される。

TDI-処理赤血球は、陰イオン性の活性剤で溶血を起こす以外、かなりの浸透圧を加えても溶血しない。したがって凍害防止剤なしで凍結保存が可能であるし、また凍結乾燥法により、真空中に、粉末の形で保存することも

可能である。

これらの性質は、Hb-Capsule より、われわれの求める代用赤血球にいっそう近いものとも思われる。が、膜の Charge, Flexibility など、Hemorheology 上の問題がやはり最後に残されるのであろうか、残念ながら生体の異物浄化装置は現在のところ、これも見逃してはくれない。さらに今後の研究を強く要求しているのである。

◎ ◎ ◎ ◎

以上の研究は、医学者をはじめ、多くのその道の専門家の方々の、暖かいご指導とご鞭撻をいただいてこれまで成長してきたものであります。深く感謝するとともに、今後もしよろしくご支援下さることを心からお願い申し上げます。

文 献

- 1) 村上省三: 輸血, 講談社ブルーバックス B-58 (昭和 41 年)
- 2) 上代昭三ら: 生化学講座, 7, 医学の生化学, 共立出版
- 3) 関口弥ら: 人工血液の研究(第 1~8 報) 日本人工臓器学会(昭和 37~42 年), 日本輸血学会(昭和 41~42 年)で講演
- 4) 豊田忠之: 人工血液の基礎的研究, 日本外科学会雑誌, 67, 36 (1966)
- 5) S. F. Rabiner, et al.: Evaluation of a stroma free hemoglobin solution for use as a plasma expander, 126, 6, 1127-1142 (1967)
- 6) 近藤朝士: “マイクロカプセルについて”, 薬剤学, 26, 1 (1966)
- 7) 山村雄一ら: 免疫化学, 朝倉書店
- 8) 末梢循環研究会編: 末梢循環とその病態生理, 東大出版会 (1967)
- 35) W. Philippoff, R. A. Stratton: *Trans. Soc. Rheol.*, 10-2, 467 (1966)
- 36) H. J. M. A. Mieras, C. F. H. van Rijn: *Nature*, 218, 865 (1968)
- 37) W. Philippoff, F. H. Gaskins: *Trans. Soc. Rheol.*, 2, 263 (1958)
- 38) 黒岩城雄, 中村亦夫: 高化, 24, 529 (1967)
- 39) 山本三三三: “レオロジー”, 160, (1964, 槇書店, 東京)
- 40) G. V. Vinogradov, I. M. Belkin: *J. Polymer Sci.*, A, 3, 917 (1965)
- 41) K. Komuro, Y. Todani, N. Nagata: *J. Polymer Sci.*, B, 2, 643 (1964)
- 42) K. H. Hellwege, W. Knappe, F. Paul, V. Semjonov: *Rheol. Acta*, 6, 165 (1967)
- 43) K. Osaki, M. Tamura, M. Kurata, T. Kotaka: *J. Phys. Chem.*, 69, 4183 (1965)
- 44) H. C. Booij: *Rheol. Acta*, 5, 215 (1966)
- 45) J. G. Oldroyd: *Proc. Roy. Soc. (London)*, A218, 122 (1953), A245, 278 (1958)
- 46) T. Kataoka, S. Ueda: *J. Polymer. Sci.* 印刷中

(片岡忠夫:「高分子融液のレオロジー」186 ページよりのつづき)