

目 次

人工血液

第2巻 第4号 1994年12月

総説 ヘモグロビン系人工酸素運搬体の循環器系に対する作用	西 勝英 82
原著 トリグリセリド型塩基を含有したリピドヘム微小球の構成と 酸素親和性	小松晃之 94
オリゴ糖修飾ヘモグロビン小胞体の分散安定度	大串 建 97
連載 獣医療における血液代替物 小動物における体外循環下での外科的治療	山根義久 102

事務局たより 107

Contents

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 2 No. 4 December, 1994

Review:

- Effects of hemoglobin-based oxygen-carrying artificial blood substitutes
on the circulatory system *Katsuhide Nishi* 82

Original Article:

- Lipidheme-microsphere composed with triglyceride-type base and
its oxygen-binding affinity *Teruyuki Komatsu* 94
Hemoglobin-vesicles stabilized by modification with glycolipid
..... *Takeru Ohgushi* 97

Series: Veterinary Medicine and Blood Substitutes

- Surgical correction for the heart diseases by the cardiopulmonary bypass
technique in the small animal *Yoshihisa Yamane* 102



- 急性脾炎
- 慢性再発性脾炎の急性増悪期
- 術後の急性脾炎
- 汎発性血管内血液凝固症(DIC)

薬価基準収載

蛋白分解酵素阻害剤
注射用 エフオーワイ^R
注射用メシリ酸ガベキサート

- 効能・効果 ①蛋白分解酵素(トリプシン、カリクレイン、プラスミン等)逸脱を伴う下記疾患
急性脾炎、慢性再発性脾炎の急性増悪期、術後の急性脾炎
②汎発性血管内血液凝固症

DICに 蛋白分解酵素阻害剤
注射用 エフオーワイ^R 500
注射用メシリ酸ガベキサート

- 効能・効果 汎発性血管内血液凝固症

●使用上の注意(抜粋)

- 一般的注意 まれにショックがあらわれることがあるので、観察を十分行い、このような症状があらわれた場合には直ちに投与を中止し、適切な処置を行うこと。
- 次の患者には投与しないこと メシリ酸ガベキサートに対し過敏症の既往歴のある患者。

その他の使用上の注意、用法・用量等詳細は添付文書をご参照ください。

資料請求先



小野薬品工業株式会社

〒541 大阪市中央区道修町2丁目1番5号

940301

第2回日本血液代替物学会年次大会 会告（第2次）

1. 会期：1995年6月19日（月）・20日（火）
2. 会場：フォーシーズンズホテル 〒112 東京都文京区関口2-10-8
Tel: 03-3943-2239
Fax: 03-3943-7523

3. プログラム

大会長講演：人工血液の単純補充以外の使用法
特別講演：宇宙環境と体液循環（交渉中）
特別講演：医療行政からみた血液代替物の開発・使用
教育講演：臨床応用が期待される人工酸素運搬体
教育講演：人工血液の臨床治験ガイドライン
教育講演：獣医学における血液需要と人工血液への期待
教育講演：エホバの証人と人工血液
シンポジウム：血液代替物開発における医・工・産連携のストラテジー
ワークショップ：血液代替物の臨床的ニーズー質と量ー
一般演題：広い意味での血液代替物に関する演題

シンポジウム・ワークショップは、一部指定・一部公募。一般演題は公募。

4. 演題提出：演題は同封抄録用紙の要領に従って作成の上、1995年3月31日までに、大会事務局まで提出のこと。

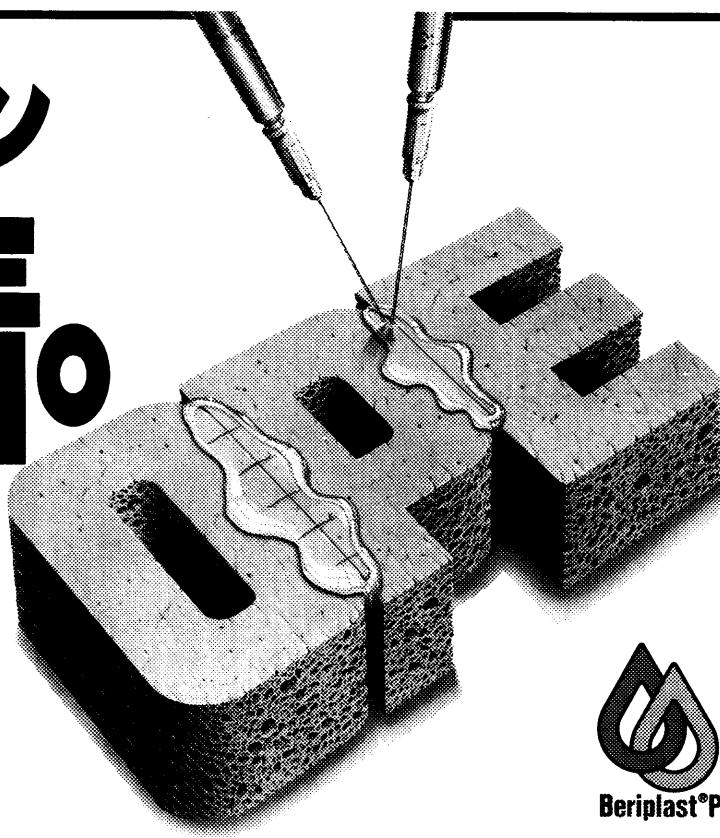
第2回日本血液代替物学会年次大会

大会長 阿岸鉄三

事務局

〒162 東京都新宿区河田町8-1
東京女子医科大学腎臓病総合医療センター内
Tel: 03-3353-8111 内線38315
Fax: 03-3358-9582

フィブリン 接着。



Beriplast®P

ベリプラス[®]Pは、組織を接着・閉鎖して、手術時における血液等の漏出を防ぎ、創傷治癒効果を発揮します。

特長

- ①生理的機序に基づいた創傷組織の接着・閉鎖が迅速に行われる。
- ②創傷組織の修復に重要な血液凝固第XIII因子を高濃度で含有している。
- ③セット化されているため調製が簡便である。
- ④溶解性に優れている。
- ⑤可塑性・弾力性があり、創傷組織によく密着する。
- ⑥湿潤状態での適用も可能である。
- ⑦バツリゼーションを施しているため、HIVやHBV等の各種ウイルスに対する安全性が確認されている。

指 生理的組織接着剤

ベリプラス[®]P

薬価基準収載

【効能又は効果】

組織の接着・閉鎖

(ただし、確合あるいは接合した組織から血液、体液または体内ガスの漏出をきたし、他に適切な処置法がない場合に限る。)
改訂

**【使用上の注意】

1.一般的な注意

1)本剤を血管内に投与しないこと。

2)間隔をおいた使用によりアナフィラキシー様症状を起こす恐れがあるので、観察を十分に行うこと。

2.次の患者には適用しないこと。

1)本剤の成分又は牛肺を原料とする製剤(アプロチニン等)に対し過敏症の既往歴のある患者。

2)下記の薬剤による治療を受けている患者。

凝固促進剤(繊維抽出製剤、蛇毒製剤)、抗線溶剤、アプロチニン製剤

3.次の患者には慎重に適用すること。

重篤な肝障害、汎発性血管内凝固症候群(DIC)が考えられる病態を有する患者。

4.相互作用

次の製剤との併用により血栓形成傾向があらわれる恐れがあるので、併用は避けること。

凝固促進剤(繊維抽出製剤、蛇毒製剤)、抗線溶剤、アプロチニン製剤

5.副作用

ショック…まれにショックを起こすことがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には直ちに投与を中止し、適切な処置を行うこと。

6.妊娠に関する注意

非A非B型肝炎等の未知のウイルス感染の可能性を完全に否定することはできないので、観察を十分に行うこと。

7.適用上の注意

1)溶解時に著しい沈殿の見られるものは使用しないこと。
また、一度溶解したものは時間をわいて再使用しないこと。

2)本剤を体外循環終了時等の噴出性あるいは流出性出血の激しい部位の接着・閉鎖に使用する場合は、適切な方法で血流を遮断した上で適用すること。

3)本剤の過量使用は避けること。

4)本剤の調製は、調製器セット内の使用方法説明書に従って行うこと。

8.その他

配合成分の一つであるトロンビン製剤で過敏症、発熱、嘔吐、頭痛等が報告されている。

【包装】

0.5ml製剤 1ml製剤 3ml製剤 5ml製剤

** 1994年3月改訂

★用法・用量、その他詳細は現品添付文書をご参照ください。
★資料はヘキスト ジャパン株式会社 医薬情報担当者にご請求ください。

製造：
ベーリングベルケ社

輸入販売：
ヘキスト ジャパン株式会社
〒107 東京都港区赤坂八丁目10-16

BEHRING
J. Behring

ヘモグロビン系人工酸素運搬体の循環器系に対する作用

西 勝英
木田吉俊
*Katsuhide Nishi
Yoshitoshi Kida*

Effects of hemoglobin-based oxygen-carrying artificial blood substitutes on the circulatory system

1.はじめに

過去数十年にわたって、人工酸素運搬体の素材として赤血球の代替となり組織に十分な酸素を供給することが可能で、しかも生体にとって毒性のない物質を求めて、多くの研究が行なわれてきた。中でもヘモグロビンは本来赤血球中に存在する物質であり、人工酸素運搬体の開発にとって最も魅力的な物質であると考えられてきた。現在ヘモグロビンを利用した人工酸素運搬体には、高分子ヘモグロビン、重合ヘモグロビン、架橋ヘモグロビンがあり、それぞれの物質について物理化学的性質、酸素飽和度、および生体での酸素運搬供給能力などが示されてきた。これらの物質の物理的、化学的性質に関しては、土田らによる本誌創刊記念論文「血液代替物：最近の進歩」をはじめ、詳しい総説があるので参考とされたい¹⁻³⁾。

将来理想的な人工酸素運搬体が開発されれば、様々な臨床応用の可能性が考えられるが、当面の人工酸素運搬体の開発、臨床応用の第一義的な目的は、緊急出血時の循環器系の機能維持であり、重要臓器に対しての緊急避難的酸素供給である。従って、人工酸素運搬体の臨床応用を前提とした場合、その循環器系に対する作用について十分な検討が必要となってくる。これまでに開発してきた人工酸素運搬体については、主に物理化学的な見地から様々な検討は行なわれているが、生体に投与された時の循環器系に対する作用について生理、薬理学的観点からの検討は、その重要な意義にもかかわらず、十分に行なわれているとは言いがたい。特に人工酸素運搬体としての性質上、血液成分製剤とか他の薬剤の投与とは異なり、大量投与が要求されるので、従来の薬物開発研究における一般薬理試験、急性毒性試験、効果判定試験とは異なる観点からの検討が必要であろう。

ここでは、筆者らが数年に渡り人工酸素運搬体として開発研究に携わってきたピリドキシル化ポリオキシエチレンヘモグロビン重合体(PHP)⁴⁻⁶⁾を例にとり、ヘモグロビンおよびヘモグロビン系人工酸素運搬体の循環器系に対する作用について検討を試みたい。

熊本大学医学部薬理学第二講座、〒860 熊本市本荘2-2-1, Second Department of Pharmacology, Kumamoto University School of Medicine, Honjyo 2-2-1, Kumamoto 860, Japan.

2.ヘモグロビンの循環器系作用の背景

「ヘモグロビン分子はそれ自身生体にとって有害である」という実証はされてはいないが、現在でもなお支配的な考え方がある。これには、過去に“ヘモグロビン”が、動物あるいは人に投与された時様々な副作用が報告されてきたことがその一因となっている(文献2を参照)。特に脳外科領域では、くも膜下出血後に頭蓋内血管の長期にわたる攣縮がおこり局所血流減少による脳の機能障害が発現することが知られており、この脳血管攣縮にはヘモグロビンが関与していることが多くの実験で証明されていた⁷⁻⁹⁾。1960年代の半ば頃までは、動物やヒトに投与された“ヘモグロビン溶液”にはヘモグロビンを赤血球から溶解する際に溶出されてくる膜成分が除去されておらず、エンドトキシンをはじめとする様々な物質が含まれていたのである。Rabinerら¹⁰⁾は、出来るだけ膜成分を除去したヘモグロビン「形質膜除去ヘモグロビン；stroma-free hemoglobin (SFH)」を用い、これらの不純物がヘモグロビン毒性の主な原因物質であると提唱した。Savitsky(1978年)ら¹¹⁾は、この「純化ヘモグロビン；pure SFH」を8名のボランティアに投与したところ、動物実験ではなんら問題はなかったにもかかわらず、僅か0.25 g/kgの少量で全ての被験者に徐脈、血圧上昇と乏尿が観察されたと報告している。その後、このSFHをさらに純粋化する方法が考案された¹²⁾。また、酸素親和性に関しては、Beneschら¹³⁾によりヘモグロビンの2-3DPG結合部位に結合して酸素親和度を低下させる物質(ピリドキサール5'-磷酸 (PLP))が見いだされた。さらに、半減期の延長のため、腎臓で容易には排泄されない重合型あるいは架橋ヘモグロビンが導入されるようになった(文献1-3を参照)。Mossら¹⁴⁾は、ピリドキシル化重合ヘモグロビンを用いて臨床試験を行ない、6名の健常被験者中1名に重篤なアレルギー反応を認めている。現在では純度の高いヘモグロビンが人工酸素運搬体の原材料として使用されているが、グルタルアルdehyド重合ヘモグロビン、ジアスピリン架橋ヘモグロビンのいずれの型の修飾ヘモグロビンでも、第1相臨床試験において少量投与で一過性の血圧上昇と心拍数の減少が観察されていることは注目しておくべきであろう(Vth International Symposium on Blood Substitute, San Diego, March 1993)。

3. ヘモグロビン系人工酸素運搬体の血管系に対する作用

3.1. ヘモグロビンと血管内皮細胞由来弛緩因子(EDRF)/一酸化窒素(NO)との関係

ヘモグロビンおよびヘモグロビン誘導体の循環器系に対する作用について検討するにあたり、生体の機能調節に関与している新しい生理活性物質として現在注目を集めている血管内皮由来弛緩因子(EDRF)=一酸化窒素(NO)について、理工系読者の便宜のために簡単に解説することとする。というのは、ヘモグロビンは、このEDRFあるいはNOの作用を遮断あるいは抑制することが知られているからである¹⁵⁾。1992年のScience誌は、その年のMolecular of the YearとしてNOをとりあげ、生命科学領域における普遍的な重要性について論評している。現在NOの生理的な意義についてますますその重要性が明らかにされつつあり、ヘモグロビンを化学的に修飾あるいはヘム構造を酸素結合部位として利用する人工酸素運搬体の開発にとってその化学的特性の上からもNOとの関連は、単に循環器系ばかりでなく生体機能全般にわたる重要な問題であるとの認識が必要になってきたのである。

1980年、アセチルコリン(ACh)により血管の内皮細胞より放出されるある種の物質が血管平滑筋の弛緩をもたらすことが見いだされ¹⁶⁾、血管内皮細胞由来弛緩因子(EDRF)と名づけられた¹⁷⁾。そ

の後の研究により、この物質は、1)生物学的半減期がきわめて短く(5秒)、2)酸性では安定であるが、アルカリ側で速やかに失活する、3)メチレンブラー、ヘモグロビンおよび抗酸化剤の添加によりその作用は遮断される、4) ACh以外にもさまざまな物質の刺激により放出され、その血管平滑筋弛緩に際して細胞内にcyclic GMPの増加を伴っている、などの性質が明らかにされた^{18,19)}。一方、以前よりニトログリセリン、ニトロプロルシッドなどの亜硝酸化合物による血管平滑筋の弛緩には、化合物中のNO分子が細胞内グアニレートシクラーゼを活性化し細胞内のcyclic GMPを増加させる系が関与していることが知られていた²⁰⁻²³⁾。この亜硝酸化合物によるグアニレートシクラーゼの活性化はヘモグロビンによって阻害されることがすでに1977年に三木ら²³⁾によって報告されている。EDRFの本体については、1985-1986年にかけて、Furchtgottら¹⁸⁾、Moncadaら^{24, 26)}、Ignarroら²⁵⁾のグループによりEDRFによる血管平滑筋弛緩と亜硝酸化合物による血管平滑筋弛緩とが極めて類似することから、EDRFはNOそのものあるいはSHを含むNO誘導体(L-ニトロソチオール類)であることが示された。1988年にPalmerら²⁶⁻²⁸⁾は、培養内皮細胞に¹⁵NでラベルしたL-アルギニンを加えブラジキニンで刺激するとグアニジド窒素からNOが産生されること、さらに、L-アルギニンからのNOの産生は、L-N^G-monomethyl arginine (L-NMMA)により遮断されることを見いたした。このNO合成の発見はその後のNOの生理的な役割についての研究を飛躍的に高めることとなった。1991年になり、以前よりその存在が想定されていたL-アルギニンからNOを合成する際に必要とされるNO合成酵素が、ラット小脳より抽出され、化学構造式が決定された²⁹⁾。この酵素はその後血管内皮細胞からも抽出され、化学的性質が検討された結果、神経や血管内皮細胞におけるNO合成酵素は、カルモジュリン存在下で細胞内カルシウム依存性に直ちに活性化され、NOを産生することが明らかとなった³⁰⁾。このように比較的短期間のうちに、生理活性物質としてのNOの基質、合成酵素、産生、放出、作用機構の概要が明らかにされてきたのである。現在知られているNOの産生過程とその作用の概観をFig. 1に示す。

ここでは、ヘモグロビンとの関連においてEDRF/NOの循環器作用について今まで得られている知見について整理して見ることとする。

1) 様々な刺激により血管内皮細胞から放出され、血管平滑筋の弛緩反応をおこすだけでなく、生理的な状態でも内皮細胞に加わるずり応力により、持続的に放出されており血圧の制御に重要な働きをしている³¹⁻³³⁾。しかしL-NMMA投与による血圧上昇の程度には動物種により差があることから、自然放出EDRF/NOに対する依存度には血管の差、部位の差、動物差があると思われる。

2) NOは、脳動脈、腸間膜動脈、浅側頭動脈、陰茎海綿体小動脈などでは、これらの血管を支配している神経の神経伝達物質であろうと想定されており、これらの血管の拡張に関与している^{19, 32, 33)}。

3) 中枢神経系においても、種々の刺激によりNO産生がおこり、交感神経活性を抑制するように働いている^{33, 34)}。

4) 腎臓では、腎臓の緻密斑(Macula densa)にNO合成酵素が存在

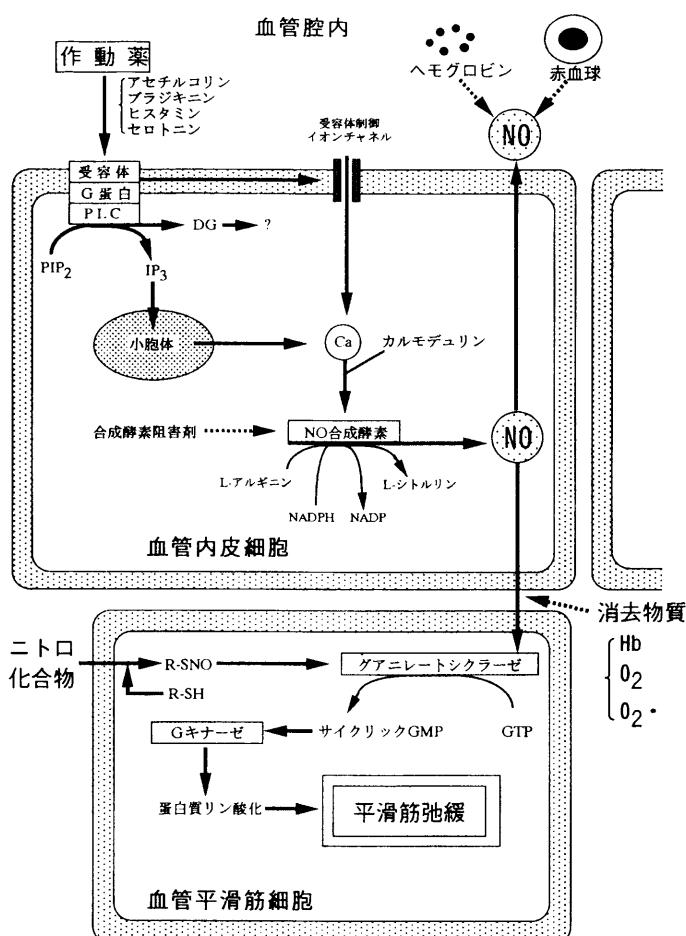


Fig. 1. 内皮細胞由来血管拡張物質(EDRF/NO)の产生と作用機序の概要。点線矢印は阻害を示す。

し、レニン分泌の調節因子として働くことにより、血圧調節に関与している³⁵⁾。

3.2. NOとの結合

ヘモグロビン(Hb)とNOとの関係は、還元型ヘモグロビンと酸素(O₂)、一酸化炭素(CO)との可逆的結合の研究のなかで、これらの物質と同様の結合様式を示す物質の探索の過程で見つけられた。1865年Hermannは³⁶⁾、COで完全に飽和したヘモグロビンは等量のNOによって置換されることから、NOのヘモグロビンに対する結合部位は、COの場合と同じであり、NOのヘモグロビンに対する親和性は、少なくともCOの5倍以上であろうと結論した。このことは後に、GibsonとRanghton(1957年)³⁷⁾によって証明されたが、NOのヘモグロビンに対する親和性は予想以上に高く、COの1500倍であるとされた。彼らは、Adairの式³⁸⁾を用いてNOとヘモグロビンの結合についての研究を行ない、NOは、ヘモグロビンのO₂やCOが結合する同じヘムグループのみに選択的に結合すること、ヘモグロビンとの高い親和性はHb₄(NO)₄からNOが解離する半減期が約8時間と極めて遅いことによるとし、さらに、還元型ヘモグロビンとNOとの反応速度は、O₂との反応速度の5-20倍であることを示した。ちなみに、COとヘモグロビンとの親和性は、O₂の約200倍とされており³⁹⁾、一方NOはCOのヘモグロビンとの親和性の1500倍である。このようにNOは極めて反応性の高いラジカルであり、ヘムなどの鉄錯体やS, N, O, Cなどの原子と直接反応する。さらに、NOは気体であるので、磷脂質によって構成されている生体膜は拡散の障壁とならない。このようなNOの特性のため血管腔内に放出されたNOは赤血球の膜を通過し

てヘモグロビンに結合し、消去されることとなる。その他生体内では、O₂、スパーーオキシド(O₂[•])やO₂[•]生成物質と反応して消去され、その結果NOの生体内半減期は5-6秒となる。したがって、血管内皮細胞で生成されたEDRF/NOは、血管内腔側へ拡散すると直ちに失活する。一方、組織側あるいは血管平滑筋側へ拡散したNOは、もしその場に消去物質がなければ、容易に標的細胞に到達してその作用を発揮することが出来る。しかし、摘出臓器あるいは組織を用いて実験する場合、組織を表面灌流あるいは浸潤する溶液中に赤血球あるいはヘモグロビンが存在すれば、発生したNOは容易にヘモグロビンと結合し、標的細胞に到達するNOは減少し、血管平滑筋に対してはその弛緩作用が減少あるいは遮断されることになる。

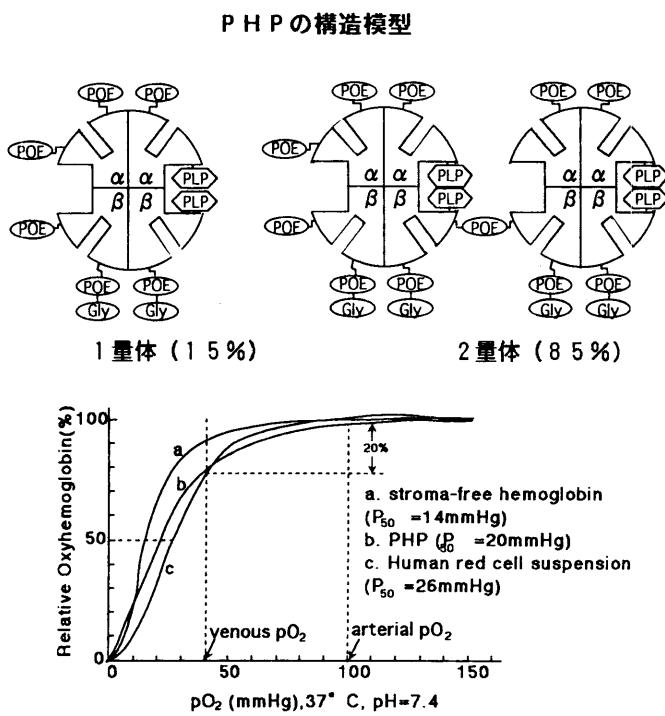
3.3. ピリドキシル化ポリオキシエチレンヘモグロビン重合体(PHP)の各種血管床に対する作用

PHPは、1983年にIwashitaら^{5,6)}によってヘモグロビン系人工酸素運搬体として開発された物質であり、ヘモグロビンにPLPを結合させて、酸素との親和性を赤血球とほぼ同等に低下させ、さらにpolyoxyethylene (POE)を結合させることにより、分子量を約86,000とし生体内半減期を約24時間まで延長させた化学修飾重合型ヘモグロビンである(Fig. 2)。PHPはヘモグロビン系の酸素運搬体であるので、前述したEDRF/NO系に対してどのような影響を及ぼすかを検討することを第一義的目的として、以下のような条件を設定して実験系を組み立てた。すなわち、1) PHPは血管内より投与する。そのため全ての実験系を血管内灌流系とする。2) 灌流系の灌流圧の変化をモニターすることにより血管床の状態を検討する。3) EDRF/NOを放出させるための薬物として、AChを標準薬として使用する。4) Cyclic GMP系を介して血管平滑筋を弛緩させる薬物としてニトログリセリン(NG)を代表薬として用いる。5) 血管平滑筋収縮薬として、ノルアドレナリン(NA)、アンギオテンシンII(ANG-II)を用いる。6) PHPと作用を比較するため形質膜除去ヘモグロビン(SFH)，またヒドロキシエチルスター(HE)を用いて、PHP溶液と同程度の膠質浸透圧をもつコントロール液とした。このような実験プロトコールに従って、1) 摘出心臓冠動脈灌流、2) 下肢血管灌流、3) 肺動脈灌流、4) 腎動脈灌流、5) 腸間膜血管系のモデルを用いて実験を行なった。まるごとの生体におけるPHPの循環器系に対する作用を検討する目的で麻酔下および無麻酔下での血圧、心拍数について観察を行なった。

Table 1. 投与液の組成

	SFH	PHP	HES
Hb (g/dl)	6	6	-
HES (g/dl)	-	-	8.4
pH (25°C)	7.4	7.4	7.4
NaCl (mM)	136.0	136.0	154.0
KCl (mM)	4.0	4.0	4.0
CaCl ₂ (mM)	2.5	2.5	2.5
MgSO ₄ (mM)	1.0	1.0	1.0
Glucose (mM)	11.1	11.1	11.1
HEPES (mM)	10.0	10.0	10.0

Fig. 2. PHPの構造模型とSFH、PHP、ヒト赤血球浮遊液の酸素解離曲線の比較。PHPには1量体と2量体が15%、85%の比率で存在している。



使用したそれぞれの灌流液の成分はTable 1の通りである。全ての灌流液は実験の直前に調整し、酸素化した。灌流系の実験には全てラットを使用した。

3.3.1. PHPの摘出血管に対する作用

ラット大動脈標本に対する作用

ヘモグロビンは摘出血管標本においてEDRF/NOの作用を阻害すると報告されている¹⁵⁾。そこで、ヘモグロビン系人工酸素運搬体であるPHPにも同様の作用があるかどうかを検討した。SD系雄性ラットから摘出した胸部大動脈のリング標本を用い、PHPの摘出血管に対する、1) 直接作用、2) フェニレフリン(Phe)または塩化カリウム(KCl)による収縮に対する作用、3) ACh、イソプロテレノール(Iso)による弛緩反応に対する作用、4) L-アルギニンによる弛緩反応に対する作用を検討した。胸部大動脈標本においては、PHP (10^{-8} - 10^{-5} M)の直接作用は認められなかった。PheまたはKClで収縮をさせた標本に対して、PHPを添加したところ、さらに収縮を起こした。Pheで収縮をさせた標本で、AChの弛緩反応を調べたところ、PHP存在下ではAChの弛緩反応は有意に抑制された。また、AChで弛緩させた標本にPHPを添加すると、弛緩反応は収縮に転じた。Isoの弛緩反応にはPHPは影響を及ぼさなかった。EDRF/NOの基質であるL-アルギニンの弛緩反応はPHPの前処置で濃度依存的に抑制された。これらの結果は、PHPはEDRF/NOを介する弛緩反応をin vitroで抑制することを示している。

イヌ脳底動脈に対する作用

ヘモグロビンは脳底動脈を直接的に収縮させることが報告されている^{9, 10)}。そこで、PHPにも脳底動脈を直接的に収縮させる作用があるかどうかを検討した結果、PHP (10^{-8} - 10^{-5} M)の累積的投与により、イヌ脳底動脈は濃度依存的に収縮反応を示した。この収縮反応は内皮細胞を除去した標本では認められなかった。これらの結果は、ヘモグロビンの脳底動脈に対する作用として知られている直接的な収縮作用をPHPも同様に持っていることを示している。

3.3.2 各種血管床に対するPHP灌流の作用

摘出ラット心臓冠動脈灌流⁴⁰⁾

ラットの摘出心臓をランゲンドルフ法にて定圧(70 mmHg)で灌流した。摘出後心臓をTyrode緩衝液で約30分灌流し、灌流圧、心拍数、左心室圧が一定となった所でPHP溶液での灌流を開始した。PHP灌流開始と同時に灌流量は約50%に低下し定常状態に達した。この灌流量の低下は、HES溶液でも観察された。心拍数は、Tyrode緩衝溶液灌流時の約80%に減少した。一方、SFH溶液では、灌流量は減少せずむしろ増加傾向を示したが、心拍数は、顕著に低下し、対照時の約50%となった。心機能評価の指標となる左心室収縮曲線はPHPおよびSFH溶液灌流で変化は認められなかった。PHP、HES溶液で観察された灌流量の低下が、灌流液の粘度の上昇によるものかあるいはPHP分子そのものによる血管収縮に起因するのかを検討するために、定流量(12-15 mL/min)で、Tyrode液中にPHP、HES、SFHを添加してそれぞれの濃度を変化させた液で灌流を行ない、灌流圧の変化を観察した。その結果、

PHP、HESの濃度上昇に伴って、灌流圧の上昇が認められた。したがって、PHP、HES灌流時にみられた灌流圧の上昇は、灌流液の粘度の上昇によるものと考えられる。一方SFHでは、むしろ灌流圧は低下し、用量-反応関係を示さなかった(Fig. 3)。以上の結果より、PHP溶液は心機能を良好に保持することが出来ること、冠血管に対して積極的な収縮作用は有していないこと、一方心拍数に対しては、徐脈を来たすことが明らかとなった。またSFHは、顕著に灌流圧および心拍数を低下させたが、ヘモグロビン分子そのものが平滑筋やペースメーカー細胞の電流系に作用するのか、あるいは、ヘモグロビン分子以外の微量膜成分残留物質の作用によるのか現在のところ不明である。PHP溶液を用いて、低温(15°C)、低圧(13 mmHg)で心臓を24時間灌流したところ、新鮮標本に比べ約30%の心機能低下は認められたものの良好な収縮機能を維持した⁴¹⁾。このことは将来PHP溶液の臓器保存灌流液としての有用性を示唆するものである。

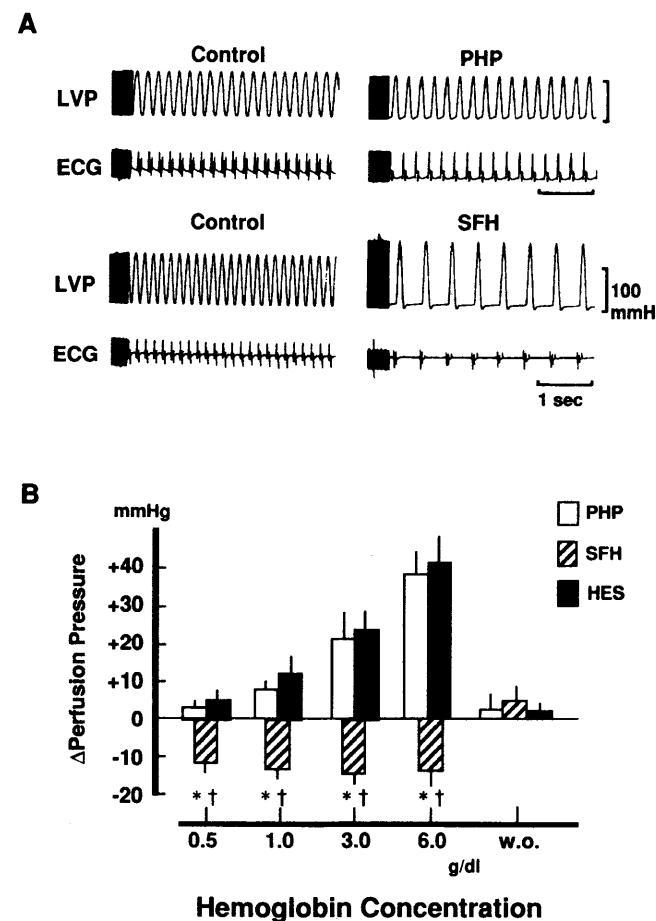


Fig. 3. ラット摘出心臓灌流標本における左心室圧、心拍数に対するPHP、SFH溶液灌流の作用。A: Control, タイロード液での灌流; PHPおよびSFH、それぞれPHP溶液、SFH溶液で灌流開始15分後の記録。B: PHP、SFHおよびHESの灌流圧に対する用量-反応関係。タイロード液での灌流時の灌流圧からの変化分を縦軸に示す。PHP、SFHおよびHESをそれぞれの濃度でタイロード液に添加した。

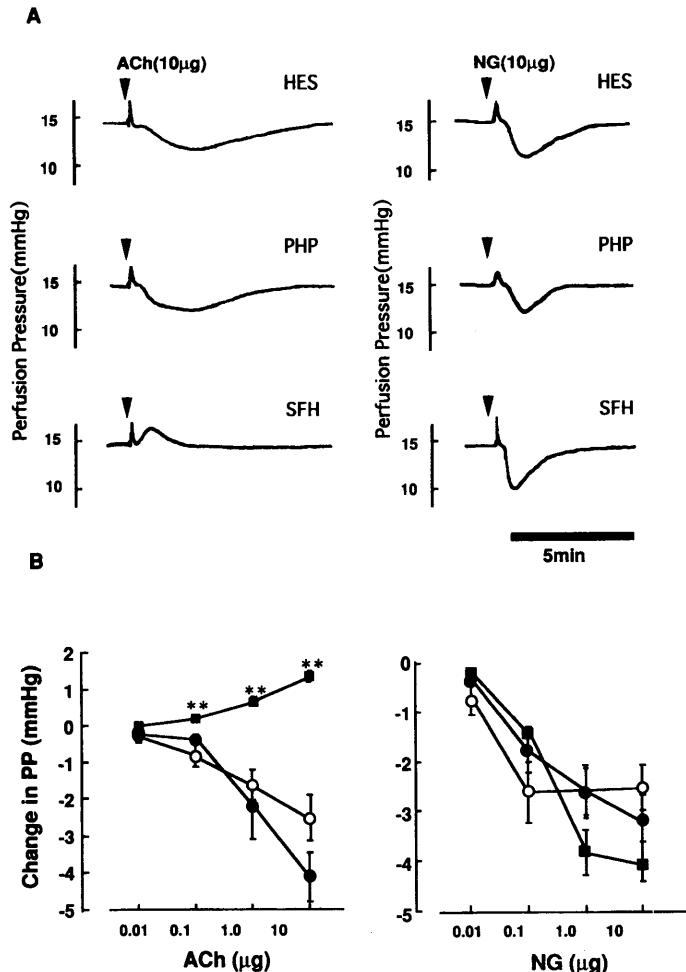


Fig. 4. ラット肺動脈灌流標本におけるHES, PHPおよびSFH溶液灌流時のアセチルコリン(ACh)およびニトログリセリン(NG)の灌流圧に対する作用. A: AChおよびNG肺動脈内投与時の灌流圧変化記録. B: HES(○), PHP(●)およびSFH(■)溶液灌流時のAChおよびNGの灌流圧に対する用量-反応関係曲線. **p<0.001.

下肢灌流⁴²⁾

ラット下肢定流灌流実験系を用いて、各種血管作動物質の作用に対するPHPの影響を調べた。ペントバルビタール麻酔下にラットを開腹し、腹部大動脈よりカニューレを挿入してポンプを介する体外循環回路を作製して、下肢領域の灌流を行なった。一定流量で灌流後、灌流圧が一定となった時点でヘマトクリット値(Ht)が元の約50%になる程度に脱血し、同量のPHP液を投与した(PHP交換輸液)。PHP交換輸液後全身血压が有意に上昇した。自己血灌流時にAChを投与すると用量依存性に血管拡張による灌流圧低下が観察された。このAChによる灌流圧の低下はPHP交換輸液後にも認められ、AChに対する反応に差は認められなかった。一方、ノルアドレナリン(NA)に対する反応(血管収縮による灌流圧上昇)は、PHP交換輸液後に有意な増大を示した。以上の実験結果は、下肢血管床に投与されたPHPは、AChによって放出されたEDRF/NOに対しては、抑制的に作用しないということを示す。

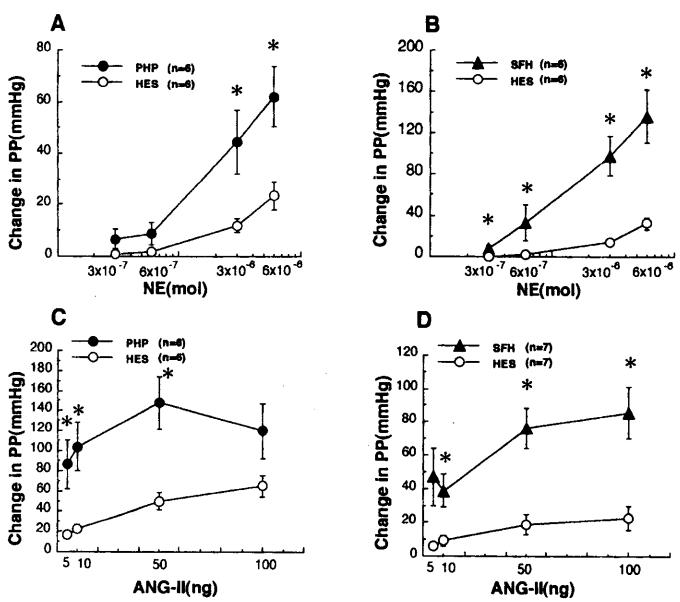


Fig. 5. ラット腎動脈灌流標本におけるHES, PHPおよびSFH溶液灌流時のNAおよびANG-IIの灌流圧に対する用量-反応関係曲線. *p<0.01.

ている。しかし、この実験系からは、なぜPHP交換輸液によりNAに対する反応が増大したのか、またPHP交換輸液後の顕著な血压上昇がどのような機序によって発現したのかは不明である。

肺動脈灌流⁴³⁾

肺血管系においてもEDRF/NOが血管のトーンの調節に関与していることが知られており^{44, 45)}、ヘモグロビンは低酸素状態となった肺動脈系の収縮を増悪させると報告されている⁴⁶⁾。そこでPHPの肺血管系への影響について検討した。ラットの気管支と心臓を同時に摘出し、肺動脈よりカニューレを挿入し、定圧で灌流した。同時に人工呼吸器を用いて気管支より換気を行なった。PHP, SFH, HES溶液のいずれで灌流した場合も灌流圧の上昇は見られなかった。AChの反応に対する影響を観察するため、プロスタグランジンF_{2α}で灌流圧を5-10mmHg上昇させた状態でAChを投与した。PHP溶液, HES溶液での灌流中、AChは用量依存性に灌流圧を低下させた。しかし、SFH溶液灌流中、AChによる反応は逆転して灌流圧は上昇に転じた(Fig. 4)。一方PHP, SFH溶液灌流中、NAに対する灌流圧上昇作用の有意な増大が認められた。以上の結果より、肺動脈血管床では、1)自然に放出されるEDRF/NOは、血管抵抗調節にはさほど関与していないこと、2) AChによって放出されたEDRF/NOに対してはPHPは抑制作用を示さないが、SFHはこの反応を遮断することが明らかとなった。血管内より投与したPHPとSFHとの間で、AChに対する反応の差が明確に出現した理由の一つとして、肺血管床では、血管の透過性が高いため、分子量の小さいSFHは血管内皮細胞の間隙より平滑筋側へ漏出した可能性が考えられる。この血管床においてもPHP, SFHによりNAに対する反応の増大が観察されたが、その機序に関しては現在のところ不明である。

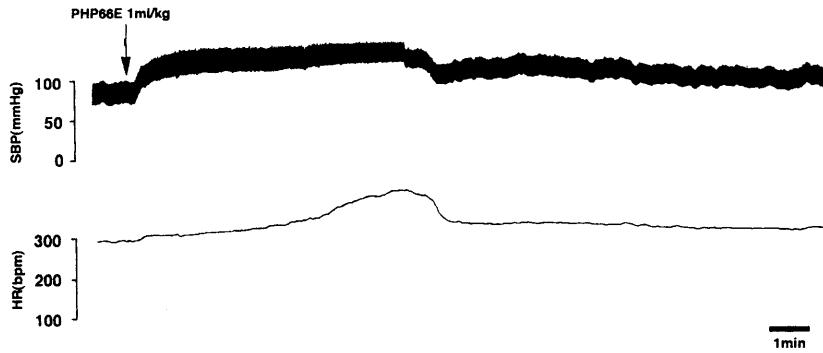


Fig. 6. 麻酔下ラットにおけるPHP投与(1 mL/kg)による血圧と心拍数の変化記録。

腎動脈灌流⁴⁷⁾

腎循環系においてもEDRF/NO系の循環調節に対する関与が報告されている^{48,49)}。そこでPHPの腎循環系に対する影響を摘出腎灌流系を用いて検討した。麻酔下にラットを開腹し、下腹大動脈より逆行性にカニューレを挿入し、左腎動脈を灌流する系を作製した。まずはじめにHES溶液で灌流し灌流圧が約80-100 mmHgとなるよう灌流量を調節した。この流量で灌流液をHES溶液よりPHP溶液に変換すると、灌流圧が一過性に上昇し、その後低下し定常状態に達した。一方SFH溶液は有意に灌流圧低下を示した。PHP, SFH溶液灌流中のAChによる反応を検討した。NAを持続的に投与して一定の血管収縮を起こした状態でAChを投与した。ACh投与により灌流圧は低下したが、PHP, SFH溶液灌流中のAChによる灌流圧低下反応はHES溶液灌流中と変わらなかった。NA, アンギオテンシン-II(ANG-II)による収縮反応はPHP, SFH溶液灌流中顕著な増大を示した(Fig. 5)。L-NMMA投与後、NA, ANG-IIによる反応は対照時に比べてやや増大傾向を示したもの、PHP, SFH溶液灌流中ほどの顕著な増大を示さなかった。したがってNA, ANG-IIに対する反応の増大は、自然放出EDRF/NOあるいは、血管収縮に伴う機械的な刺激により放出されるEDRF/NOの抑制の結果発現したものとは考えられず、PHP, SFH分子そのものがNA, ANG-II受容体に対して作用した可能性が考えられる。これらの点についてはまだ検討を行っていない。

腸間膜循環系⁵⁰⁾

摘出臓器灌流系による検討に加えて、in situで小動脈の内径の変化を直接顕微鏡下で観察する方法でPHPの血管系に対する作用を検討した。麻酔下でラットの腸間膜を露出し、小動脈(内径20-30 μ)を観察の対象とした。血管外より局所的にNAを滴下投与し、あらかじめ血管が収縮することを確認した後、AChを投与しAChによる収縮血管の拡張反応に対するPHPあるいはSFH交換輸液(Htが半分になる程度に脱血し、同量のPHPまたはSFH溶液を輸液)の影響を検討した。自己血灌流時に局所的NA滴下投与により動脈内径は約50%程度に減少し、AChは収縮した動脈を用量依存性に拡張させた。PHPおよびSFH交換輸液後、動脈内径は減少傾向を示したが、約30分後には交換輸液前の値に復帰した。PHPおよびSFH交換輸液後、AChは血管拡張作用を示し、その反応の程度は自己血灌流時と差はなかった。このことから、血管外より投与されたAChにより產生されたEDRF/NOの作用は、血管内腔

にあるPHPあるいはSFH分子により抑制されないと考えられる。

以上、摘出血管、摘出臓器灌流、in situの灌流系におけるPHPの直接作用、ACh, NAの作用に対する影響をTable 2にまとめた。

3.3.3. PHPの血圧、心拍に対する作用⁵¹⁾

麻酔下での作用

各種血管床に対するPHPの影響を調べた実験において、PHP交

Table 2. 摘出血管、摘出臓器灌流、in situの灌流系におけるPHPの直接作用、ACh, NAの作用に対する影響

実験系	直接作用	AChの反応に対する影響	NAの作用に対する影響
摘出大動脈(ラット)	なし	阻害	増強
摘出脳底動脈(イヌ)	収縮	未確認	未確認
摘出心臓(ラット)	なし	未確認	未確認
摘出肺(ラット)	なし	なし	増強
摘出腎臓(ラット)	なし	なし	増強
in situ下肢灌流(ラット)	なし	なし	増強
in situ腸間膜灌流(ラット)	収縮	なし	なし

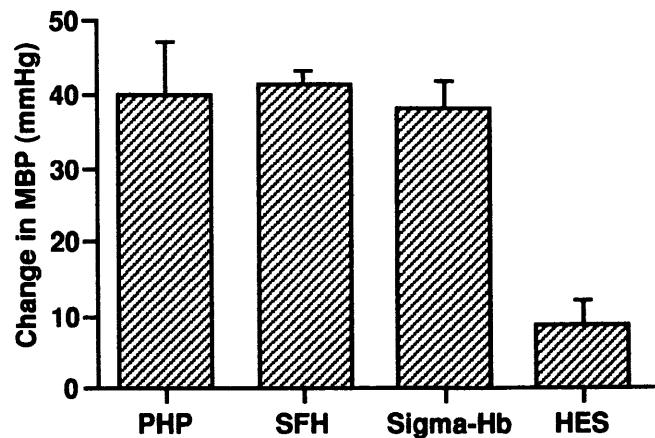


Fig. 7. 麻酔下ラットにおける様々なヘモグロビン溶液(1 mL/kg)による血圧上昇程度の比較。PHPによる上昇はSFH, Sigma Hbによる昇圧と同程度であった。

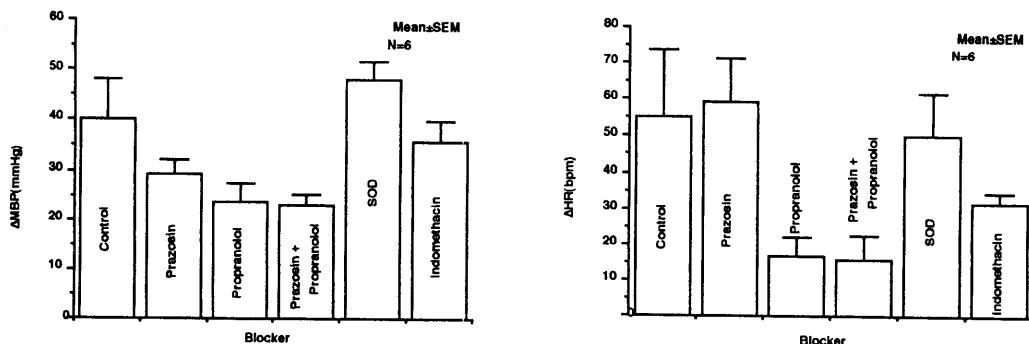


Fig. 8. 麻酔下ラットにおけるPHPによる血圧と心拍数の変化に対する各種ブロッカーカーの効果。PHPによる血圧の上昇と心拍の増加は α -ブロッカーカー、 β -ブロッカーカーでやや抑えられたが有意ではなかった。

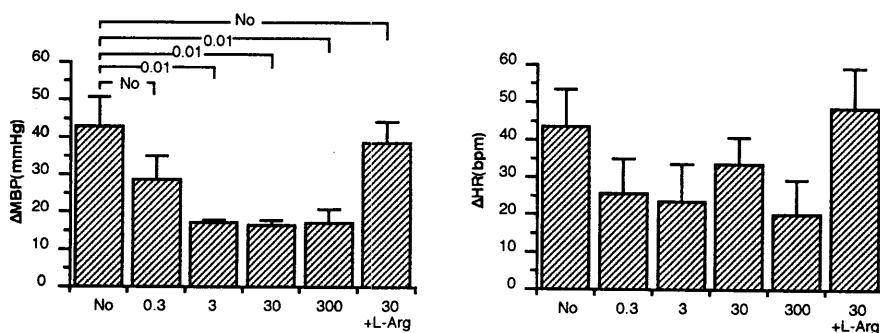


Fig. 9. 麻酔下ラットにおけるL-NMMA前処置時のPHPによる血圧と心拍数の変化。L-NMMAの前処置によりPHPによる血圧の上昇は有意に抑制された。心拍数の増加も抑制されたが有意な抑制ではなかった。

換輸液による昇圧反応が観察された^{42, 47, 50}。そこで、このPHPによる昇圧反応の機序を検討するために以下のような実験を行った。投与したPHP, SFH, HES溶液の組成はTable 3のとおりである。ウレタン(0.92 g/体重100 g) + α -クロラロース(5.5 mg/体重100 g)麻酔下のSD系雄性ラットに大腿静脈から、PHP(1 mL/kg)を投与すると、血圧上昇と心拍数の増加が見られた(Fig. 6)。この血圧上昇が投与液による循環血液量増加の影響であるかどうか調べるために、PHPと同じ膠質浸透圧を持った8.4% HES溶液に関して検討した。しかし、HES投与時には血圧上昇は認められなかった。一方、この血圧上昇がヘモグロビン分子に起因するものなのか、そ

Table 3. 投与液の組成

	PHP	8.4%HES	SFH
Hb (g/dL)	6	-	6
Met-Hb (%)	4.7	-	2.3
Endotoxin (E.U.)	<0.125	N.D.	<0.06
Na ⁺ (mM)	126	126	126
K ⁺ (mM)	4	4	4
Cl ⁻ (mM)	90	90	90
CH ₃ COO ⁻ (mM)	20	20	20
Maltose (g/dL)	6	6	6
HES (g/dL)	-	8.4	-
COP (mmHg)	26	37	N.D.

COP、膠質浸透圧；-, not contained; N.D., not determined.

れどもPHPに特異的なもののかを調べるために、市販されているSigma社のヘモグロビンで検討したところ、PHPと同様の血圧上昇を示した(Fig. 7)。

ヘモグロビン分子に起因する血圧上昇がどのような機序でおこるかを調べるために、各種血管作動物質の遮断薬を用いて解析を行った。血管を直接収縮させる α_1 レセプターのブロッカーカーであるプラゾシン、心収縮力を増強する β レセプターのブロッカーカーであるプロプラノロール、血管収縮性のプロスタグランдинの生合成阻害剤であるインドメタシン、活性酸素の消去酵素であるスーパーオキサイドディスクターゼ(SOD)を前処置した後、プラゾシン、プロプラノロール処置群で、PHP投与による血圧上昇と心拍数の増加はやや抑制されたが、統計的に有意ではなかった(Fig. 8)。しかしながら、EDRF/NOの合成阻害剤であるL-NMMAを前処置した場合、PHPによる血圧上昇は用量依存的に抑制された(Fig. 9)。これらの結果は、PHPによる血圧上昇は α_1 レセプター、 β レセプター、収縮性のプロスタグランдин、活性酸素などを介して引き起こされているのではなく、持続的に放出されているEDRF/NOの作用を阻害することで発現していることを示唆している。

無麻酔下での作用

PHPの血圧に対する作用に麻酔の影響があるかどうか、またPHPの効果はどれくらい持続するかを調べることを目的で、無麻酔無拘束のSD系ラットに20 mL/kgのPHPを投与し、血圧、心拍数

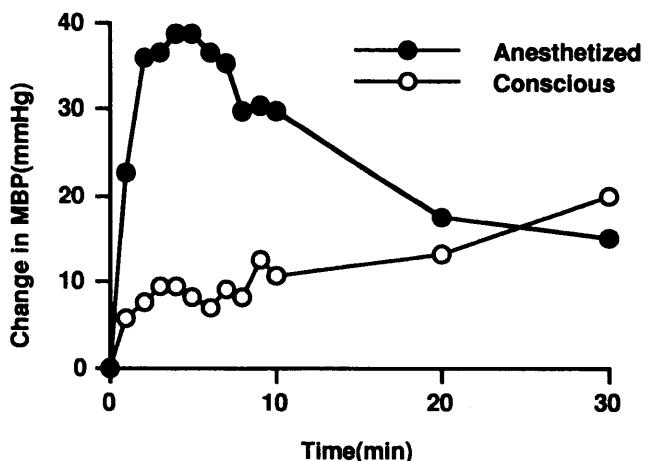


Fig. 10. 無麻酔無拘束ラットとウレタン麻酔ラットにおけるPHP(20 mL/kg)による血圧の変化。無麻酔無拘束のラットでは血圧の上昇の程度が麻酔下のラットに比べ小さい。

に対する影響を24時間にわたって観察した。無麻酔下のラットでは20 mL/kgのPHP投与後30分まではほとんど血圧に変化は認めなかった(Fig. 10)。血圧はそれ以後次第に上昇し、約2時間後にピーク値に達した後緩やかな低下傾向を示した。最大昇圧の程度は麻酔時に比べやや小さかった。一方、心拍数は投与初期の20分間はやや減少したが、その後増加しはじめ、10時間後にピークとなつた。心拍数は24時間後でも投与前より増加したままであった(Fig. 11)。麻酔下に比べPHPによる血圧上昇が小さいことは、無麻酔のラットでは血圧反射系の働きにより、心臓の交感神経活動を抑制したためと考えられる。無麻酔無拘束のラットではPHP投与により心拍数は投与後20分間はほとんど変化しないかやや減少する傾向を示したが、麻酔下の実験ではPHP投与により昇圧が起こるにもかかわらず心拍数はただちに増加する傾向を示した。このことからも麻酔下では昇圧に対する心臓による抑制反射が抑えられていることが示唆される。麻酔下の実験では20 mL/kgの8.4%HES投与によっても有意な昇圧が見られたが、無麻酔無拘束のラットでは8.4%HES投与ではほとんど昇圧は見られなかった(Fig. 11)。

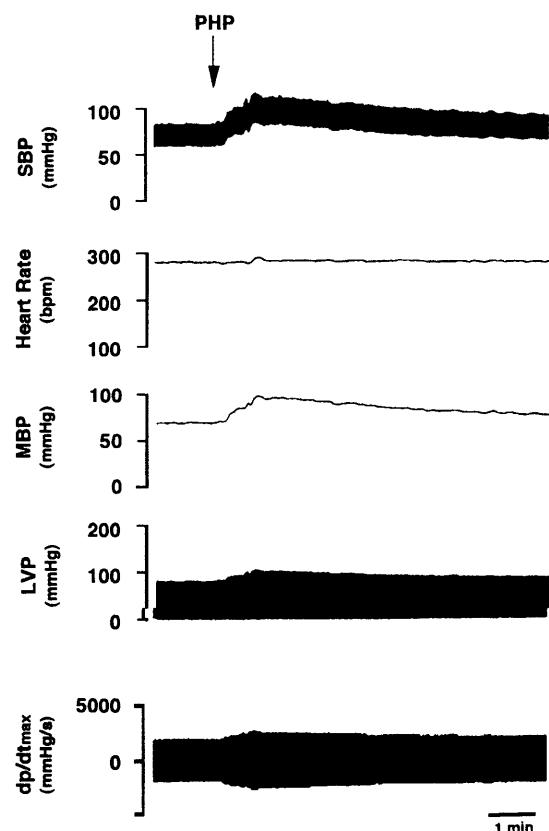


Fig. 12. 麻酔下ラットにおけるPHP投与(1 ml/kg)による血圧、心拍数、左心室内圧(LVP)、最大心収縮速度(dp/dt_{max})の変化。PHP投与により心収縮機能が増強された。

したがって、無麻酔無拘束のラットでの血圧の上昇には、投与による循環血液量の増加は殆ど関与していないと考えられる。各群の最大変化量を対照群での変化量と比較すると、PHP群での血圧の変化が対照群での変化に対し有意に大きかった。

PHPの心臓に対する作用

PHPの投与により、血圧の上昇と共に心拍数の増加も観察され

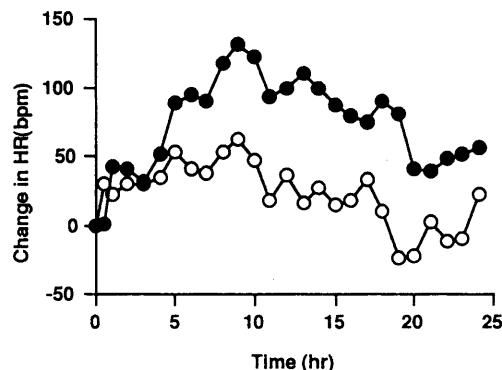
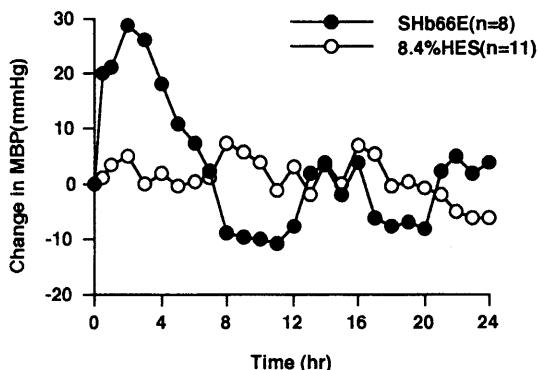


Fig. 11. 無麻酔無拘束ラットにおけるPHP(20 mL/kg)およびHES(20 ml/kg)による血圧の変化の24時間記録。PHP投与により血圧の上昇は約2時間後にピークとなった。昇圧の最大値は麻酔下の時に比べやや小さかった。8.4%HES投与(20 mL/kg)では血圧の変化はほとんど認められなかった。

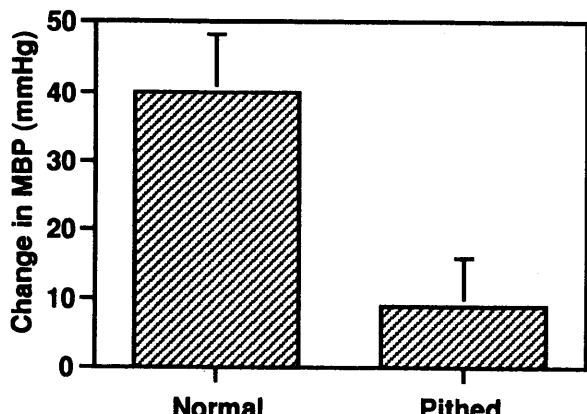


Fig. 13. 脊髄破壊(Pithed)ラットにおけるPHPによる血圧の変化。PithedラットではPHPによる血圧上昇は、正常麻酔ラットに比べて小さかった。

た(Fig. 6)。そこで、PHPの心臓収縮力に対する作用について麻酔下のラットで検討した。血圧、心拍数とともに左心室内圧(LVP)、最大収縮速度(dP/dT_{max})を測定した。その結果、PHP投与により血圧、左心室内圧(LVP)は有意に上昇し、心拍数は増加するとともに、左心室の最大収縮速度(dP/dT_{max})も有意に增加了(Fig. 12)。このことはPHPが心臓の収縮力を増強する作用を持っていることを示している。摘出ラット心臓冠動脈灌流の実験系では、PHPは心機能に直接の影響を与えなかったことから⁴⁰、摘出心臓灌流の実験系とin vivo実験系の違いを考えると、このPHPの心収縮力増強作用には、神経系が関与している可能性が考えられる。Wennmalmら⁵²は、ウサギの摘出心臓灌流の実験系で灌流液中にヘモグロビンを加えると、電気刺激により神經終末から放出されるノルアドレナリン(NA)量は変化しないが、電気刺激を与えない状態での自発的に起るNAの放出量は増加するという報告をしている。このことは、EDRF/NOは、心臓において交感神經終末からの自発的に起るNAの放出を抑制しており、ヘモグロビンはEDRF/NOの作用を抑制し、その結果NAの放出量の

増加を起こしたとも考えられる。また、Cohenら⁵³はウサギの頸動脈を用い、交感神經終末からのNAの放出を内皮細胞が抑制していることを、Greenbergら⁵⁴イヌの肺動静脈でNAの放出を内皮細胞やEDRF/NOが抑制していることを報告している。したがって、これらの報告や今回の結果から、本来心臓や末梢血管においてNAの放出量を抑制しているEDRF/NOの作用をPHPが阻害する結果、心臓や末梢血管でのNA放出量が増加することが、PHPによる昇圧と心拍数の増加、心収縮力の増強に関与している可能性が考えられる。

脊髄破壊ラットでの検討

PHPによる昇圧、心拍数の増加に中枢神経系の関与があるかどうかを調べるために、脊髄破壊ラットを用いて検討した。SD系ラットの脊髄を破壊した後、血圧、心拍数が安定したところで、PHP(1 mL/kg)を投与し、血圧、心拍数の変化について観察した。PHPの投与後、血圧の上昇、心拍数の増加はほとんど認められなかつた(Fig. 13)。このことは、PHPによる血圧上昇と心拍数の増加にはPHPの中枢神経系へ作用が影響している可能性を示唆している。

PHPによる血圧上昇作用の動物種による違い

ラットにおいて観察されたPHPの血圧上昇作用の結果をヒトにも外挿できるかどうかは、実験薬理学に課せられた難しい問題であるが、ヒトに対するPHPの作用を類推する手段として、PHPの血圧上昇作用について種々の動物を用いて検討を行なった。麻酔下でモルモット(Hartley系)、ウサギ(NZW)、イヌにそれぞれPHP(1 mL/kg)を投与したところ、モルモットではPHP投与により血圧は上昇したが、心拍数はほとんど変化しなかった。ウサギではPHP投与により血圧はほとんど変化せず、心拍数は逆に減少した。イヌでもPHP投与により血圧の変化はほとんど認められなかつた(Fig. 14)。これらの結果より、PHPによる昇圧作用は動物種差があることが明らかとなった。ラット、モルモット、ウサギの間に見られた昇圧作用の差は、in vivo系の実験でラット⁵⁵、ウサギ⁵⁶、モルモット⁵⁷にL-NMMAを静脈内投与したときの血圧上

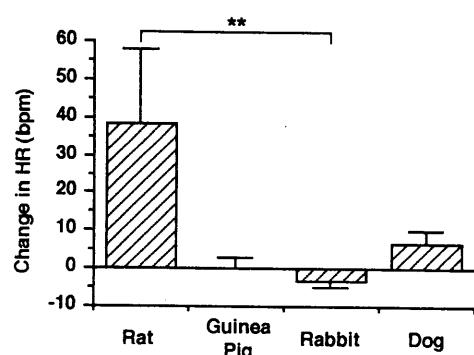
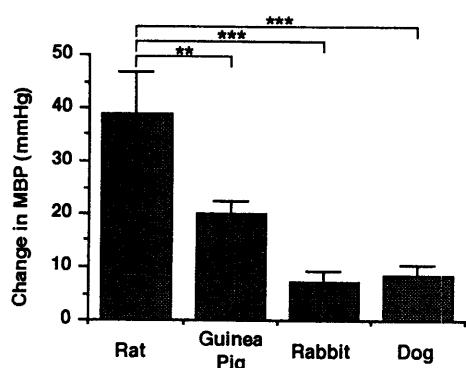


Fig. 14. 麻酔下における様々な動物種におけるPHPによる血圧(MBP)と心拍数(HR)の変化。PHPによる血圧上昇と心拍数変化には種差が認められた。血圧上昇の程度はラットが最も大きく、次いでモルモット、ウサギ、イヌの順にであった。心拍数の変化はラットでは心拍数が増加したがモルモット、ウサギ、イヌではほとんど変化しなかつた。**p<0.01; ***p<0.001.

昇の程度と同じ傾向を示している。これらの報告から同じ投与量のL-NMMA投与による昇圧の値を抜き出して比較してみると、PHPによる昇圧と同じようにラット、モルモットでの昇圧がウサギにおける昇圧よりも大きいという結果になっている。これらのことより、PHPによる昇圧反応の種差はEDRF/NOの全身血圧に対する寄与の程度の種差を反映しているものと考えることができる。

ラット、ウサギで見られたこの種差の原因は、自然放出EDRF/NOの作用の程度の種差を反映しているものだとすると、論理的に予測されるヒトでのPHP投与による昇圧の程度は、ヒトにおいて自然放出されているEDRF/NOが血圧のコントロールにどの程度関与しているかによって決まってくると思われる。L-NMMAを用いた実験により、NOがヒトの摘出肺動脈⁵⁸⁾、内胸動脈⁵⁹⁾、内乳動脈や伏在静脈⁶⁰⁾での弛緩反応に関与しているという報告や、健常人に投与したL-NMMAにより上腕動脈の血流量が低下したり、AChによる弛緩反応が弱められたりするという報告⁶¹⁾、本態性の高血圧患者に大量のL-アルギニンを投与すると血圧が下がるとの報告⁶²⁾があり、ヒトにおいてもEDRF/NOが血流量や血管の緊張の制御、血圧の調節にある程度寄与している可能性がある。さらにヘモグロビン溶液の臨床試験(P.I)でも血圧上昇が報告されており¹⁰⁾、これらのこと考慮にいれると、ヒトでもPHPを投与した場合、血圧上昇が起こる可能性がある。

4. ヘモグロビン系人工酸素運搬体の循環器系作用の問題点

これまでPHPを用いた実験結果よりヘモグロビン系人工酸素運搬体の循環器系に対する作用について述べてきた。PHPに限らずほかのヘモグロビン系人工酸素運搬体によっても血圧上昇が観察されているが^{11, 14, 63)}、これはヘモグロビン分子が生体内で合成されているEDRF/NOの作用を阻害することで発現していく現象であると考えられる。しかし、ヘモグロビン系人工酸素運搬体による血圧上昇の全てが、ヘモグロビン分子による血管内皮細胞から放出されたEDRF/NOを阻害することによって発現していると結論するには早尚であり、さらに今後の検討が必要である。我々の実験では、0.1 mL/kgという少量でも有意な血圧上昇が起きることを観察しているが、このような少量のヘモグロビン分子が循環血液中に自然に放出されたEDRF/NOの作用を阻害し、その結果有意な程度の血圧上昇を引き起し得るかどうか疑問である。また、ヘモグロビン系人工酸素運搬体投与による心拍数の低下⁶³⁾や我々の実験結果で示したように、PHP灌流時のNAに対する血管反応性の顕著な増大は、PHP中のヘモグロビン分子がEDRF/NOを血管系で阻害することだけでは説明がつかない。最近の報告では、EDRF/NOは中枢神経系で血圧のコントロールに重要な働きをしているだけでなく、脳動脈や腸間膜動脈の緊張をコントロールしている末梢神経の神経伝達物質であることが示されている^{32), 33)}。したがって、循環血液中のヘモグロビン分子が血液中に放出されたEDRF/NOの作用を阻害するというだけでなく、血圧をコントロールしている中枢神経系を含め末梢の血管調節神経系でのEDRF/NOの作用に影響をおぼし、その結果血圧の上昇が起きるという可能性も今後検討すべき課題であろう。

おわりに

人工酸素運搬体の臨床応用の第一義的目的は、大量出血時の循環血液量の確保と組織への酸素供給であるとすれば、ヘモグロビン系人工酸素運搬体の持つ血圧上昇作用は、その程度が危険でないかぎり、生体にとって有利に働き、臨床的には好ましい結果をもたらすことになるとも考えられる。しかし、この場合果たして重要臓器の血流分布に問題はおこらないか十分な検討も必要となってくる。この点に関して、Waschkeら⁶³⁾の研究には、注目すべきものがある。彼らはゲルタールアルデヒド修飾ヘモグロビンでラットに交換輸血を行ない、無麻酔下で脳血流を測定した。その結果、興味深いことに脳血流は約2倍に増加したことを示しており、この血流増加は、ヘモグロビン交換輸血による循環血液粘稠度の低下、全身血圧の上昇による脳血管灌流圧の上昇が脳血管収縮を凌駕した結果であろうと推論している。

人工酸素運搬体の臨床応用に対する期待は大きく、通常の医療のみならず災害時の緊急医療においてもその利益は計り知れないものがあり、今日世界的な開発競争が展開されている。しかし、その開発にあたっては、生物科学を含めて医科学には不確定の要素がつきまとだが、それでもなお現在の学問的レベルでの十分な安全性の確認が必要であり、拙速は避けなければならない。安全性の確認にあたっては、小規模な研究者グループや企業内開発グループでの閉鎖的な検討の時代はもはや終り、今後わが国における人工酸素運搬体の開発研究にあたっては多施設にわたる専門的学際的な検討が望まれる。

参考文献

1. 土田英俊, 武岡真司. 血液代替物：最近の進歩. 人工血液 1993; 1:5-10.
2. Winslow RM. Potential clinical application for the oxygen carrying. Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol. 1992;20:221-332.
3. Bunn FH. The use of hemoglobin as a blood substitute. Am J Hematol 1993;42:112-7.
4. Ajisaka K, Iwashita J. Modification of human hemoglobin with polyethyleneglycol: a new candidate for blood substitute. Biochem Biophys Res Commun 1980;97:1076-81.
5. Iwashita Y, Iwasaki K, Ajisaka K, Ikeda K, Uematsu T. Use of a new oxygen-carrying blood substitute. Prog Artif Organs 1983;867-70.
6. Iwashita Y. Pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate (PHP) as an oxygen carrier. Artif Organs Today 1991;1:89-114.
7. Osaka K. Prolonged vasospasm produced by the break-down products of erythrocytes. J Neurosurg 1977;47:403-11.
8. Ozaki N, Mullan S. Possible role of the erythrocyte in causing prolonged cerebral vasospasm. J Neurosurg 1979;51:773-8.
9. White, RP. Vasospasm II. Clinical considerations. In: Fox JL, ed. Intracranial Aneurysms. New York: Springer-Verlag 1983;250-71.
10. Rabiner SF, Helbert JR, Lopas H, Friedman LH. Evaluation of stroma-free hemoglobin for use as a plasma expander. J Exp Med 1967;126:1127-42.
11. Savitsky JP, Doczi J, Black J, Arnold JD. A clinical safety trial of

- stroma-free hemoglobin. *Clin Pharmacol Therap* 1978;23:73-80.
12. DeVenuto F. Hemoglobin solutions as oxygen-delivering resuscitation fluids. *Crit Care Med* 1982;10:238-45.
 13. Benesch RE, Benesch R, Rental RD, Maeda N. Affinity labeling of the polyphosphate binding site of hemoglobin. *Biochemistry* 1972; 11:3576-82.
 14. Moss GS, Gould SA, Rosen AL, Schgal LR, Schgal HL. Results of the first clinical trial with a polymerized hemoglobin solution. *Proceedings of the International Symposium on Red Cell Substitutes. San Francisco* 1989;17:531-2.
 15. Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchtgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and methylene blue in the rabbit aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;232:708-16.
 16. Furchtgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-6.
 17. Cherry PD, Furchtgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;72:2106-10.
 18. Furchtgott RF. The role of endothelium in the response of vascular smooth muscle to drugs. *Ann Rev Pharmacol* 1984;24:175-97.
 19. 戸田 昇. 一酸化窒素(NO). 生体の科学 1993;44:514-6.
 20. Katsuki S, Arnold W, Mittal C.K, Murad F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res.* 1977;3: 23-5.
 21. Schultz KD, Schultz K, Schultz G. Sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature* 1977;256:750-1.
 22. Arnold WP, Wittal C, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increase 3',5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:3203-7.
 23. Miki N, Kawabe Y, Kuriyama K. Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1977;75: 851-6.
 24. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987;327:524-6.
 25. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 1987;60:82-92.
 26. Palmer RMJ, Achton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333:664-6.
 27. Sakuma I, Stuehr DJ, Gross SS, Nathan C, Levi R. Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1988;85:8664-7.
 28. Ree DD, Palmer RMJ, Hodson HF, Moncada S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol* 1989;96:418-24.
 29. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Synder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991;351:714-9.
 30. 江角浩安. NO合成酵素の構造とその働き. 実験医学 1993;18:27-31.
 31. Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3375-8.
 32. Toda N, Okamura T. Possible role of nitric oxide in transmitting information from vasodilator nerve to cerebroarterial muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;170:308-13.
 33. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
 34. Sakuma I, Togashi H, Yoshioka M, Kobayashi T, Yasuda H. A possible role of endothelium-derived relaxing factor in the cerebral cardiovascular control. *Ther Res* 1989;10:97-106.
 35. Vidal MJ, Romero JC, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factor inhibits renin release. *Eur J Pharmacol* 1988;149: 401-2.
 36. Hermann L. Ueber die Wirkungen des Stickoxydulgases auf das Blut. *Arch Anat Physiol* 1865;469-81.
 37. Gibson QH, Roughton FJW. The kinetics and equilibria of the reactions of nitric oxide with sheep hemoglobin. *J Physiol* 1957; 136:507-26.
 38. Adair GS. The hemoglobin system VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin. *J Biol Chem* 1925;63:529-45.
 39. Roughton FJW. The equilibrium between carbon monoxide and sheep hemoglobin at high percentage saturations. *J Physiol* 1954; 126:359-83.
 40. Yamakawa T, Miyauchi Y, Nishi K. Effects of pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate and stroma-free hemoglobin on cardiac function in isolated rat heart. *Artif Organs* 1990;14:208-17.
 41. Iwasaki S, Araki H, Miyauchi Y, Nishi K. 24-hour preservation of isolated rat heart perfused with pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate (PHP) solution at low temperature. *Artif Organs* 1991;15:78-85.
 42. Kida Y, Iwata S, Gyoutoku Y, Aikou A, Yamakawa T, Nishi K. Vascular responsiveness to various vasoactive substances after exchange transfusion with pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate (PHP) solution in anesthetized rats. *Artif Organs* 1991;15:5-14.
 43. Gotoh K, Matsumura H, Morioka T, Nishi K. Effects of pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate and stroma free hemoglobin on pulmonary vascular responsiveness to vasoactive substances in isolated perfused rat lungs. *Artif Organs*

- 1992;16:586-91.
44. Hasunuma K, Yamaguchi T, Rodman DM, Obrein RF, McMarty IF. Effects of inhibitors of EDRF and EDHF on vasoactivity of perfused rat lungs. *Am J Physiol* 1991;260:L97-104.
 45. Cherry PD, Gills CN. Evidence for the role of endothelium derived relaxing factor in acetylcholine induced vasodilation in the intact lung. *J Pharmacol Exp Therap* 1987;241:516-20.
 46. Archer SL, Tolins JP, Raiji L, Weir EK. Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;164:1198-205.
 47. Nishi K, Ueda S, Sato D, Nishi K. Effects of pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate and stroma-free hemoglobin on renal vascular responsiveness to vasoactive substances in isolated perfused rat kidney. *Artif Organs* 1994;18: 429-38.
 48. Tolius JP, Palmer RMJ, Moncada S, Raiji L. Role of endothelium-derived relaxing factor nitric oxide on renal hemodynamic responses. *Am J Physiol* 1990;258:H655-62.
 49. Radermacher J, Forstermann U, Frolich J. Endothelium-derived relaxing factor influences renal vascular resistance. *Am J Physiol* 1990;259:F9-17
 50. Matsumura H, Gotoh K, Araki H, Morioka T, Nishi K. Effects of pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate on diameter of rat mesenteric arterioles in situ. *Artif Organs* 1992;16:461-7.
 51. Kida Y, Maeda M, Iwata S, Iwashita Y, Nishi K. Effects of pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate (PHP) and other hemoglobin-related substances on arterial blood pressure in anesthetized and conscious rats. *Artif Organs* 1995 (in press).
 52. Wennmalm A, Karwatowska-Prokopczuk E, Wennmalm M. Role of the coronary endothelium in the regulation of sympathetic transmitter release in isolated rabbit hearts. *Acta Physiol Scand* 1989;136:81-7.
 53. Cohen RA, Weisbrod RM. Endothelium inhibits norepinephrine release from adrenergic nerves of rabbit carotid artery. *Am J Physiol* 1988; 254: H871-8.
 54. Greenberg S, Diecke FP, Peevy K, Tanaka TP. The endothelium modulates adrenergic neurotransmission to canine pulmonary arteries and veins. *Eur J Pharmacol* 1989;162:67-80.
 55. Gardiner SM, Compton AM, Bennet T, Palmer RMJ, Moncada S. Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* 1990;115:486-92.
 56. Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:3375-8.
 57. Aisaka K, Gross SS, Griffith OW, Levi R. N^G-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: Dose nitric oxide regulate blood pressure in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;160:881-6.
 58. Crawley DE, Liu SF, Evans TW, Barnes PJ. Inhibitory role of endothelium-derived relaxing factor in rat and human pulmonary arteries. *Br J Pharmacol* 1990;101:166-70.
 59. Sakuma I, Yasuda H, Gross SS, Levi R. L-arginine is a precursor of endothelium-derived relaxing factor in various animal species and vascular beds. In: Moncada S, Higgs EA, eds. Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system. 1990;445-9.
 60. Yang Z, von Segesser L, Bauer E, Stulz P, Turina M, Luscher TF. Different activation of the endothelial L-arginine and cyclooxygenase pathway in the human internal mammary artery and saphenous vein. *Circ Res* 1991;68:52-60.
 61. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 1989;335: 997-1000.
 62. Nakaki T, Hishikawa K, Suzuki H, Saruta T, Kato R. L-arginine-induced hypotension [letter]. *Lancet* 1990;336:696.
 63. Waschke K, Schlock H, Albert DM, Van-Ackern K, Kuschinsky W. Local cerebral blood flow and glucose utilization after blood exchange with a hemoglobin-based O₂ carrier in conscious rats. *Am J Physiol* 1993;265:H1243-8.

原著

トリグリセリド型塩基を含有したリピドヘム微小球の構成と酸素親和性

小松晃之, 村松靖子, 西出宏之, 土田英俊*

Lipidheme-microsphere composed with triglyceride-type base and its oxygen-binding affinity

Teruyuki Komatsu, Yasuko Muramatsu, Hiroyuki Nishide, Eishun Tsuchida*

2つのイミダゾリル基を有する新しいトリグリセリド型塩基を合成し、これを油相内部へ含有したりピドヘム-マイクロスフェアの構成と酸素親和性について報告する。得られる微小球の粒径は、組成比により制御可能(30-100 nm)で、構造安定性も高い。酸素親和性は83 Torrと赤血球に比べて低いが、酸素運搬効率はヘモグロビンのそれと同等であり、オキシ体の半減期は18時間に延長した。本物質が生理条件下(pH 7.4, 37°C)で全合成系の人工酸素運搬体として機能することを明らかにした。

Structure and O_2 -binding affinity of lipidheme-microsphere composed with a triglyceride-type base are described. Particle diameter of the lipidheme-microsphere could be controlled (30-100 nm) by the composition of [triglyceride]/[lipidheme] and the obtained microsphere was very stable. Although O_2 -binding affinity (P_{50}) of the lipidheme-microsphere was 83 Torr, its O_2 -transporting efficiency was almost same as that of hemoglobin. Half-lifetime of the O_2 -binding was ca. 18 hr. These results suggest that the lipidheme-microsphere composed with the triglyceride-type base has an ability to act as a totally synthetic oxygen carrier under physiological conditions (pH 7.4, 37°C). — Key Words: Lipidheme-microsphere, Triglyceride-type base, Oxygen binding, Red blood cell substitute, Totally synthetic oxygen carrier.

1. 緒言

大豆油を卵黄レシチンで乳化した静注用脂肪乳剤は高カロリー補給のための栄養輸液としてだけでなく、必須脂肪酸の非経腸的供給源となるため、長期にわたり経口摂取が不可能な患者に対しても広く臨床応用されている脂質コロイド製剤である¹⁻⁴。この脂肪乳剤の調製法、血行動態、異化経路などについてはすでに1960年代から多くの報告があり、現在、安全性の確認されている数種の製品が臨床に使用されている。何れも微小球の平均粒径は0.2 μmに制御され、毛細血管の閉塞はない。また、最近では静注用造影剤や、プロスタグラジン、ステロイド製剤など脂溶性薬物のドラッグキャリアーとしての実用も具体化され、注目を集めている⁵⁻⁶。

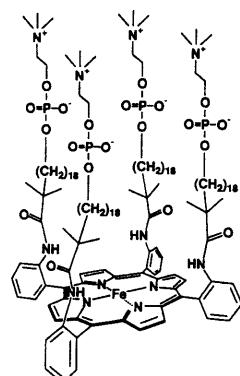
我々はこの微小球表面の界面活性成分をヘモグロビンの酸素結合席である鉄ポルフィリンの誘導体(リピドヘム、Fig. 1a)で置き換えた新しい脂肪乳剤(リピドヘム-マイクロスフェア)を調製し、これが生理条件下(生理的食塩水中、pH 7.4, 37°C)は勿論、血流中でも酸素を効率よく輸送できる全合成系の人工酸素運搬体となることを明らかにしてきた⁷⁻⁹。酸素運搬機能(酸素親和性(P_{50})、オキシ体の半減期など)は、酸素結合部位の化学構造を精密設計・

* To whom all correspondence should be addressed.

早稲田大学理工学部高分子化学研究室, 〒169 東京都新宿区大久保 3-4-1,
Department of Polymer Chemistry, Waseda University, Tokyo 169, Japan.

合成することで任意に調整できる。また、懸濁液の物理化学的特徴(粘度 1.2 cP, 比重 1.001, 浸透圧およびコロイド浸透圧は調節可能)も血液代替物としての条件を充分に満足する。血液と混じた場合でも、血液凝固、溶血などは惹起せず、血液適合性も良好である⁸⁻¹⁰。このリピドヘム-マイクロスフェア系では血液よりも高濃度に酸素を溶解させることのできる溶液の調製が可能で(例えば[リピドヘム]=15 mMで酸素溶解量35 mL/dL), その場合

a)



b)

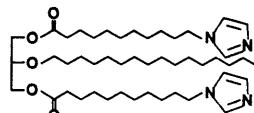


Fig. 1. a) Lipidheme and b) triglyceride-type imidazole.

でも、系の不安定化や粘度上昇は認められない。

最近我々は、粒径の低下(制御)、オキシ体の安定度向上、毒性低減などを目的として分子内に2つのイミダゾリル基を有するトリグリセリド誘導体(Fig. 1b)を新しく合成した。本報ではこのトリグリセリド型塩基を油相内部へ含有させ、リビドヘムの軸配位子として機能させた系の構成と酸素親和性について報告する。

2. 実験方法

2.1. トリグリセリド型塩基の合成

分子内に2つのイミダゾリル基を導入したトリグリセリド(Fig. 1b)の合成は以下のように行った。

11-ブロモウンデカン酸(15.3 g, 57.6 mmol)をベンゼン(20 mL)に溶解させ、塩化チオニル(12.5 mL, 0.17 mol)を徐々に加えた後、室温で4時間攪拌する。余剰のベンゼン、塩化チオニルを減圧除去し、無色透明の液体11-ブロモウンデカノイルクロリドを得た。そこへ2-ヘキサデカンオキシ-1,3-グリセロール(4.56 g, 14.4 mmol)とピリジン(4.7 mL, 57.6 mmol)の乾燥テトラヒドロフラン(THF, 70 mL)溶液を氷浴下で滴下し、50°Cで12時間反応させる。THFをエバポレータで減圧除去した後、残渣をジクロロメタン(CH_2Cl_2)で抽出し、純水で2~3回洗浄する。有機相を脱水、濃縮後、生成物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル60、展開溶媒クロロホルム/酢酸エチル=10/1 v/v)で精製分離し、1,3-ビス(11-ブロモウンデカノイル)-2-ヘキサデカンオキシグリセロール(8.9 g、収率76%)を得た。

イミダゾール(0.44 g, 6.5 mmol)を乾燥THF(50 mL)に溶解し、窒素を充分通気した後、そのまま窒素雰囲気下で水素化リチウム(47 mg, 5.9 mmol)を加え、6時間沸点還流させた、そこへ1,3-ビス(11-ブロモウンデカノイル)-2-ヘキサデカンオキシグリセロール(2.0 g, 2.47 mmol)の乾燥THF溶液(40 mL)を滴下し、12時間沸点還流を続ける。

THFをエバポレータで減圧除去した後、残渣を CH_2Cl_2 で抽出し、純水で2~3回洗浄する。有機相を脱水、濃縮後、生成物をカラムクロマトグラフィー(シリカゲル60、展開溶媒クロロホルム/メタノール=10/1(v/v))で精製分離し、目的物(Fig. 1b, 0.8 g、収率40%)を得た。化合物の構造確認は、IR、¹H-、¹³C-NMRにより行った*。

2.2. リビドヘム-マイクロスフェア分散液の調製

リビドヘム/トリグリセリド型塩基(mol比1/1.1)に大豆油([大豆油]/[リビドヘム]=3(wt/wt))を添加し、さらに分散媒(2 wt%グリセリン水溶液)を加えた後、窒素雰囲気、氷浴下で超音波攪拌(60 W, 5分)し、赤色のリビドヘム-マイクロスフェア分散液を得た。さらに少過剰のアスコルビン酸を窒素雰囲気下で添加し、デオキシ体を調製、pHを7.4とした。

2.3. 酸素親和性測定など

リビドヘム-マイクロスフェア分散液([リビドヘム]=50 μM)に

*分析結果: IR: ν(C=O) 1740 cm⁻¹, ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ (ppm) 0.9 (3H, t, -CH₃), 1.2~1.3 (50H, m, alkyl), 1.6 (6H, m, -OCOCH₂CH₂-), -OCH₂-), 1.8 (4H, m, -CH₂CH₂Im), 2.3 (4H, t, -CH₂Im), 3.5~3.7 (3H, m, -CHOCH₂-), 3.9 (4H, t, -CH₂Im), 4.1~4.2 (4H, m, glycerol), 6.9, 7.1, 7.5 (3H, s, Im).

ついて、異なる酸素分圧に対する可視吸収スペクトル変化から、Hill式を用いてP₅₀を算出した(pH 7.4, 37°C)。可視吸収スペクトル装置はShimadzu UV-2200を使用。また、リビドヘムの分子占有面積測定は日本レーザー電子NL-LB240S-MWA、光散乱粒径分布測定はCoulter NS-4D、電子顕微鏡観察はJEOL 100-CXを用いて行った。

3. 結果および考察

3.1. リビドヘム-マイクロスフェアの形態と構造

得られたリビドヘム-マイクロスフェアの電顕観察から、粒径30~40 nmの均一微小球の生成を確認(Fig. 2)、これは動的光散乱粒径分布測定の結果(40±12 nm)とも一致した。従来、軸配位子として1-ステアリルイミダゾールを含有したリビドヘム-マイクロスフェアの粒径は、いずれも約100 nmであったが、大豆油と類似構造のトリグリセリド型塩基(Fig. 1b)を用いることにより、粒径30~40 nmの超微細粒子の調製が可能となった。

リビドヘムの分子占有面積をWilhelmy法^[1]によるπ-A曲線から決定(2.1 nm²)、微小球表面をリビドヘムが余すことなく被覆していると仮定して、大豆油とリビドヘムの組成比3から微小球の粒径を算出すると、その値(43.8 nm)は実測粒径とよく一致する。そこで、異なる[大豆油]/[リビドヘム]組成2-10 (wt/wt)で調製したリビドヘム-マイクロスフェアの平均粒径を、各組成比における計算値と比較した(Fig. 3)。その結果、得られるリビドヘム-マイクロスフェアの粒径は、組成比により30-100 nmの範囲で制御できることが明かとなった。[大豆油]の増大に伴い実測粒径は計算値から徐々に逸脱する傾向にあるが、[大豆油]/[リビドヘム]比の低い領域では実測値と計算値がよく一致した。

ヘムの吸収帯がない750 nmにおける吸光度(濁度)の経時変化から、得られたリビドヘム-マイクロスフェアの構造安定性を評価した(Fig. 4)。[大豆油]/[リビドヘム]=2-5では、微小球表面がヘムで過不足なく被覆されていると考えられるため粒子の安定度は高く、調製1週間後でも粒径、濁度の増加は認められない。しかし、[大豆油]/[リビドヘム]=10の系では調製1日後に濁度が上昇し、相分離が観測された。これは、表面被覆率が約50%であるこ

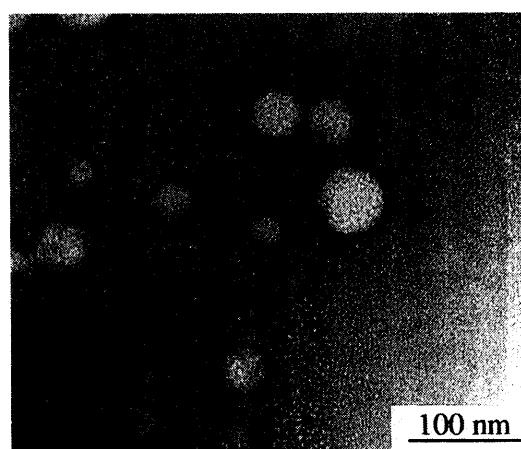


Fig. 2. Transmission electron micrograph of lipidheme-microsphere with triglyceride-type imidazole.

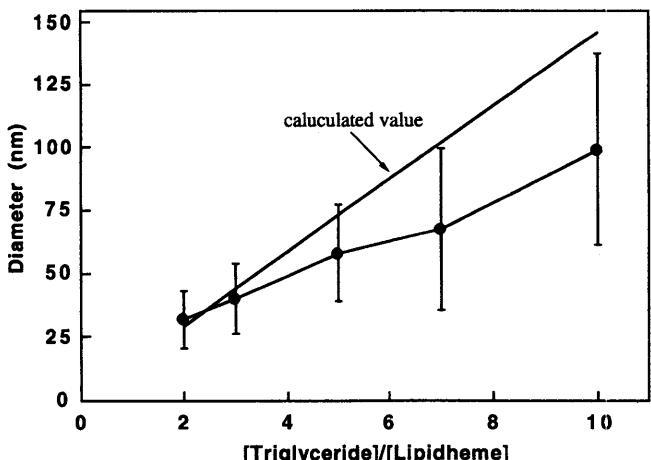


Fig. 3. Relationship between particle diameter of the lipidheme-microsphere and composition of [Triglyceride]/[Lipidheme].

とに起因するものと推測される。

3.2. リピドヘム-マイクロスフェアの酸素親和性

調製したリピドヘム-マイクロスフェア(λ_{\max} 429, 536, 562(sh) nm)のデオキシ体に酸素を吹き込むと速やかにオキシ体(λ_{\max} 424, 541 nm)を形成し、その酸素結合解離は可逆的であった。また、一酸化炭素の通気により安定なカルボニル体(λ_{\max} 426, 540 nm)を形成した。トリグリセリド型塩基を含有したリピドヘム-マイクロスフェアの酸素親和性(P_{50} 83 Torr)は、従来系(P_{50} 41 Torr)に比べてやや低いが、例えば肺(P_{O_2} 110 Torr)-末梢組織(P_{O_2} 40 Torr)間における酸素運搬効率(約25%)は赤血球と比較して同等であった。Hill係数(n)は1.0、酸素結合の協同性は観測されない。オキシ体の半減期(τ_{50})は、18時間で従来系(12時間)より延長した。これらは、脂溶性のトリグリセリド型塩基が油相に安定に存在することや、粒子の構造安定性が増大したことなどに起因する。

4. 結語

イミダゾリル基を有するトリグリセリドを含有したリピドヘム-マイクロスフェアでは、粒径30-40 nmの超微小球の調製が可能で、その大きさは赤血球の約1/200と小さい。系の構造安定度も高く、in vitroにおける酸素運搬効率がヘモグロビンと同等であることを実証した。オキシ体の半減期は従来系に比べて延長している。これらの結果は、血中滞留時間の延長、毒性の低減につながるものと考えられる。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金(課題番号05403028, 053666)によって行われた。記して謝意を表す。

参考文献

- Schuberth O, Wretlind A. Intervenous infusion of fat emulsions, phosphatides and emulsifying agents. *Acta Chir Scand Suppl* 1961;278:1-21.

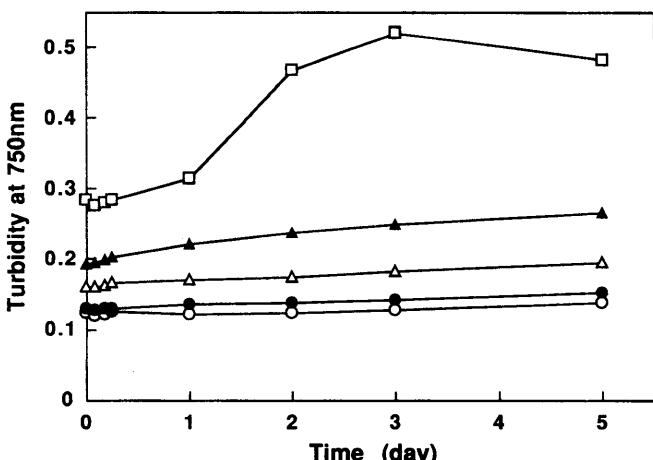


Fig. 4. Turbidity of the lipidheme-microsphere suspension at 750 nm. [Triglyceride]/[lipidheme] (wt/wt): 2(○), 3(●), 5(△), 7(▲), 10(□).

- Davis SS, Washington C, West P, Illum L, Liversidge G, Sternson L, Kirsh R. Lipid emulsions as drug delivery systems. *Ann NY Acad Sci* 1987;507:75-88.
- Washington C. The stability of intravenous fat emulsion in total parenteral nutrition mixtures. *Int J Pharm* 1990;66:1-21.
- Untracht SH. Intravascular metabolism of an artificial transporter of triacylglycerols / alterations of serum lipoproteins resulting from total parenteral nutrition with intralipid. *Biochim Biophys Acta* 1982;711:176-92.
- Riess JG, Dalfors JL, Hanna GK, Klein DH, Kraft M.P, Pelura TJ, Schott EG. Development of highly fluid, concentrated and stable fluorocarbon emulsion for diagnosis and therapy. *Biomatr Artif Cells Immobilization Biotechnol* 1992;20:839-42.
- Mizushima Y, Hamano T, and Yokoyama K. Tissue distribution and antiinflammatory activity of corticosteroid incorporated in lipid emulsion. *Ann Rheum Dis* 1982;41:263-7.
- Komatsu T, Matsubuchi E, Nishide H, Tsuchida E: Lipid-heme/microsphere: A new totally synthetic oxygen-carrier under physiological conditions. *Chem Lett* 1992:1325-8.
- 小松晃之, 荒井健次, 川合宣行, 西出宏之, 土田英俊, 柿崎徹, 小林紘一. リピドヘム-マイクロスフェア(人工赤血球)の物性と酸素輸送. *人工臓器* 1993;22:550-3.
- Tsuchida E, Komatsu T, Kawai N, Nishide H, Kakizaki T, Kobayashi K. Preparation and oxygen-transport of artificial red cells (lipidheme microspheres). *Artif Organs Today* 1993;3:137-43.
- 小松晃之, 村松靖子, 西出宏之, 土田英俊, 柿崎徹, 小林紘一. 人工赤血球(リピドヘム-マイクロスフェア)の体内酸素輸送. *人工臓器* 1994;23:849-53.
- 福田清成, 石井淑夫. 单分子膜. 日本化学会編. 新実験化学講座18, 界面とコロイド. 東京 東京化学同人 1978;440-76.

オリゴ糖修飾ヘモグロビン小胞体の分散安定度

大串 建, 鄭 主恩, 酒井宏水, 武岡真司, 土田英俊*

Hemoglobin-vesicles stabilized by modification with glycolipid

Takeru Ohgushi, Joo Eun Chung, Hiromi Sakai, Shinji Takeoka, Eishun Tsuchida*

合成オリゴ糖脂質(O^1, O^5 -dioctadecyl-N-maltpentaonoyl-L-glutamate)を膜成分に加えたヘモグロビン(Hb)小胞体系では分散安定度が著しく向上する。Ca²⁺やデキストランなどが存在していても小胞体凝集は抑制され、凍結融解後のHb漏出、粒径や酸素親和度に変化を認めず、凍結保存が可能となる。小胞体表面のオリゴ糖鎖はα-アミラーゼにより分解され難いため、オリゴ糖の修飾効果は血流中でも持続する。オリゴ糖修飾Hb小胞体では、血液凝固系への影響や溶血は認められず、Hbや血漿蛋白質の吸着が抑制されるので、血漿中の分散安定度は高くなる。

Synthetic glycolipid was incorporated into the lipid membrane of hemoglobin(Hb)-vesicles to modify the vesicular surface with oligosaccharide chains. Intervesicular aggregation induced by Ca²⁺ or dextran was suppressed due to an excluded volume effect of the oligosaccharide chains. After freeze-thawing of the oligosaccharide-modified Hb-vesicles, diameter change, leakage of Hb and change of oxygen-binding affinity were not observed. The oligosaccharide chains extended from the vesicular surface was hardly decomposed by α-amylase. The oligosaccharide-modified Hb-vesicles showed good blood compatibility, no influence on the blood coagulation, and no hemolysis. Adsorption of Hb and other plasma proteins on the vesicular surface was also suppressed by the surface modification, and the dispersibility of the vesicles in plasma was significantly improved. —Key Words: Hemoglobin vesicles, Glycolipid, Oligosaccharide, Intervesicular aggregation, Blood compatibility, Protein adsorption.

1. 緒言

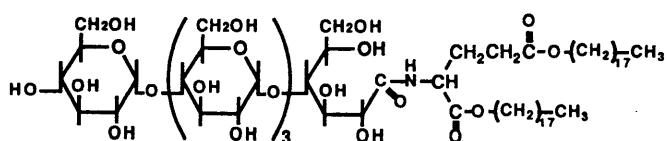
期限切れのヒト赤血球から精製した濃厚ヘモグロビン(Hb; 38 g/dL)に適当な条件下でリン脂質二分子膜を被覆させることにより酸素運搬能の高いHb小胞体の調製が可能となっている^{1,2)}。Hb小胞体は、ストローマフリーHbと比較して血中滞留時間が長く、アロステリック因子や還元剤など添加剤を包含でき、Hb由来の副作用を抑えることができるなど利点が多いが、保存時や血流中での小胞体の凝集や融合、あるいは小胞体内包物の漏出などの問題が残る³⁾。この対策として、合成不飽和リン脂質成分の重合による強化方法^{2,3)}、糖脂質やポリエチレングリコール(PEG)結合脂質による表面修飾法⁴⁻⁶⁾などが検討されている。前者では既に小胞体の凍結や乾燥粉末化が可能となり、優れた安定化効果が確認されている⁷⁾。また、ガングリオンド(生体由来糖脂質)などによる表面修飾法により細網内皮系による小胞体の捕捉を回避できることが報告されている⁸⁾。我々は、簡単な構造の合成オリゴ糖脂質による修飾系でも、糖鎖部位の排除体積効果によって小胞体の凝集が抑制されることを明らかにした⁴⁾。特に、5量体程度の糖鎖長で末端アノマー位に疎水性基を結合した構造が最適であった。本報では、オリゴ糖脂質(O^1, O^5 -dioctadecyl-N-maltpentaonoyl-L-

glutamate (DOMPGlu, Scheme 1))を用いた小胞体表面修飾による安定度の向上を、保存安定度、α-アミラーゼに対する化学的安定度、血液適合性、血漿中での分散性の各点から評価した。

2. 方法

2.1. 糖脂質の合成⁵⁾

マルトペントオースの末端アルドースを臭素酸酸化法によりアルドン酸とした後、脱水によりマルトペンタオノラクトンを得た。これにグルタミン酸ジテトラブチルアンモニウム塩をアミド結合させた後、1-ブロモオクタデカンをエステル結合させることによりDOMPGluを得た(収率50%, Scheme 1)。合成の確認は、IRスペクトルおよび¹H NMRスペクトルにより行った。IR(cm⁻¹): 1736 (-C(=O)O-), 1655(-C(=O)NH-), ¹H NMR(ppm, D²-DMSO); 0.8(CH₃, 6H), 1.2(-(CH₂)-, 60H), 1.5(β-CH₂, 4H), 2.3(α-CH₂, 2H), 3.0-6.0(others, 57H).



Scheme 1. Structure of synthetic glycolipid (DOMPGlu).

* To whom all correspondence should be addressed.

早稲田大学理工学部, 〒169 東京都新宿区大久保3, Department of Polymer Chemistry, Waseda University, Tokyo 169, Japan.

2.2. オリゴ糖修飾Hb小胞体の調製

ロータリーエバポレーターを用いて1,2-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(DPPC)/コレステロール/パルミチン酸/DOMPGLu(7/7/2/1.5モル比)のクロロホルム/メタノール(2/1体積比)混合溶液からナス型フラスコの壁面に薄膜を形成させ、アロステリック因子としてピリドキサール5'-リン酸(PLP, Merck)を18.6 mM含むHb溶液(40 g/dL)を添加して水和させた⁹⁾。得られた多重層Hb小胞体分散液をExtruder™ (Lipex Biomembrane Inc.)を用いて最終的にポリカーボネート製フィルター(孔径0.2 μmΦ, Millipore)に3回透過させ、平均粒径200±30 nmに制御した。未内包Hbをゲル濾過(Sepharose CL-4B)にて除去し、オリゴ糖修飾Hb小胞体の分散液を得た。

2.3. 粘度測定

脂質濃度5 g/dLの小胞体分散液にCa²⁺(CaCl₂) 5 mMまたはデキストラン(Mw 40,000) 3 g/dLを添加し、コーンローター型回転粘度計(芝浦システム、VS-AK)にて粘度(剪断速度1.15-230 s⁻¹)を測定した。

2.4. 凍結融解に対する安定度測定

Hb小胞体分散液をドライアイス/メタノール冷媒にて-80°Cで冷凍保存した。これを室温にて融解後、粒径分布測定(Coulter N4SD)、漏出Hbの定量(ゲル濾過法)、更に酸素親和度の測定(HEMOX™-ANALYZER, TCS Medical product)を行なった(37°C, pH 7.4)。

2.5. α-アミラーゼ活性試験¹⁰⁾

DPPC/コレステロール/パルミチン酸/DOMPGLu(7/7/2/1.5モル比)の小胞体分散液(粒径0.2 μm, 8 g/dL, 5 mL, pH 7.4)にα-アミラーゼ(ブタ臍臓由来, Merck)を160 Somogyi unit/dL添加し、37°Cにて振盪した。経時的に0.5 mLずつ採取後、氷冷下にて生理食塩水4.3 mLと5 g/dLのトリクロロ酢酸0.2 mLを添加してα-アミラーゼを直ちに失活させた後、超遠心分離(300,000 × g, 1時間)にて小胞体を除去した。上澄の遊離糖はPark-Johnson法にて測定した。コントロールとしてDOMPGLuを含まない小胞体分散液に糖鎖濃度(4.6 mg/dL)が等しくなるようにマルトペンタオースを添加した分散液を用いた。

2.6. 血液凝固試験

カオリン活性化部分トロンボプラスチン時間(KPTT), 部分トロンボプラスチン時間(PTT)はKC10(Amelung)を用いて測定した。KPTTの測定は、スチールボールを入れたサンプルカップを回転させ、カオリン分散液(0.5 g/dL, pH 7.4)50 μL、血漿100 mLを添加して1分間放置(37°C)後、試料(脂質濃度8 g/dL)または等張リン酸緩衝液(PBS)を100 μL添加し、3分間放置後Ca²⁺を4 mMになるように添加、血漿が凝固してスチールボールが固定されるまでの時間を測定した。

2.7. 溶血性試験

オリゴ糖修飾小胞体(脂質濃度2 g/dL)1 mLと洗浄赤血球(15 g/

dL)1 mLを混合、37°Cにて2時間振盪した後遠心分離した。上澄液のHb定量から溶血Hb量をシアノメトHb法により測定した。

2.8. 血漿中における凝集試験

オリゴ糖修飾小胞体または修飾していない小胞体(各0.4 g/dL)1 mLをヒト血漿1 mLと混合し、37°Cにて振盪した。セル中の分散状態を目視観測し、小胞体の粒径を経時的に測定した。pH 7.0にて40 g/dLのHb溶液と8 g/dLの小胞体分散液を体積比2/1にて混合し4°Cにて10時間静置させて小胞体表面にHb分子を吸着させた後、ゲル濾過(Sepharose CL-4B)にてHb溶液を除去した。得られた小胞体を上記と同様の方法にて血漿と混合し、分散状態を観測した。

2.9. SDS-PAGE

血漿中にて振盪(37°C, 150分間)した小胞体分散液から超遠心分離(150,000 × g, 2時間)により小胞体を沈殿させて上澄を除去後、等量の生理食塩水にて再分散し、再び超遠心にかけてペレットを

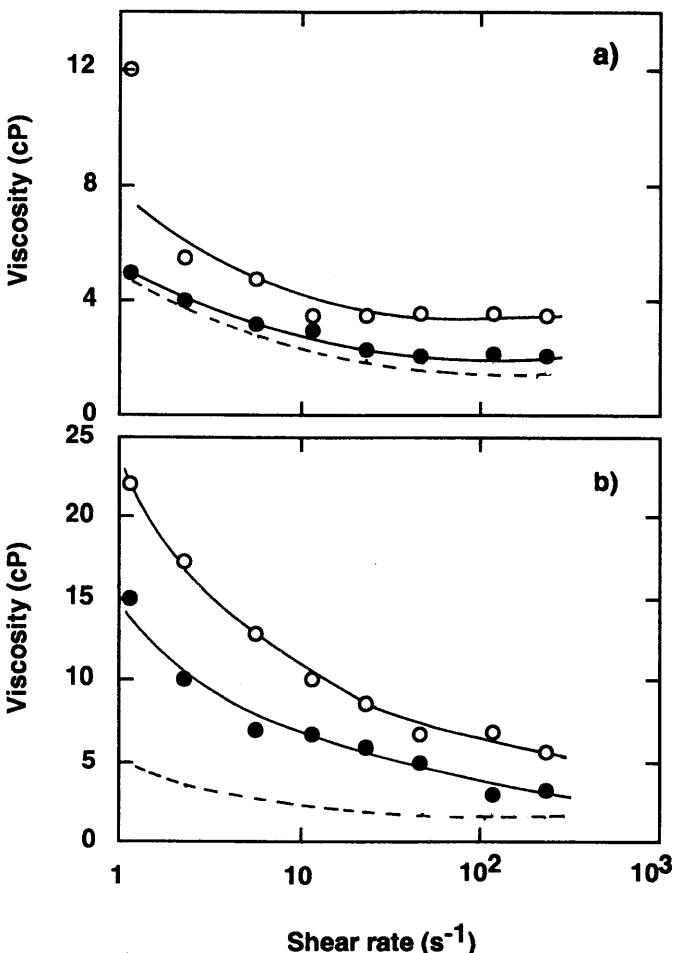


Fig. 1. Increase in solution viscosity of vesicles ([lipid] = 5 g/dL) by the addition of a) Ca²⁺ (5 mM), b) dextran (Mw = 40,000) and inhibitory effect of glycolipid. ○, vesicles; ●, maltopentaose-modified vesicles; broken line, without the addition of Ca²⁺ or dextran.

得た¹¹⁻¹³。再洗浄後2.5 g/dLラウリル硫酸ナトリウム, EDTA 1 mMを含む10 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)を脂質濃度1 g/dLになるよう添加し、メルカプトエタノール200 μL/mLを添加後加熱(100°C, 10分間)し試料溶液を得た。SDS-PAGEは、Phastgel 10-15 (Pharmacia)にてPharmacia CKB-Phastsystemを用いて泳動し、銀染色を行った。

3. 結果および考察

3.1. 凝集抑制

負電荷を有する小胞体分散液にヒト血漿中と等濃度(5 mM)のCa²⁺を添加すると、静電的相互作用によって凝集が起こる⁵。この現象は回転粘度計測定によって、特に低剪断速度領域の粘度上昇として観測される(Fig. 1a)。一方、オリゴ糖修飾小胞体ではCa²⁺添加による粘度上昇は認められなかった。これは、オリゴ糖鎖の排除体積効果により小胞体同士の接近が妨げられたためと考えできる。凝集体中の小胞体間距離は5 Å程度と見積られている¹⁴が、オリゴ糖鎖長は20 Åであるので、接近可能な小胞体間距離は5 Åよりもかなり大きく、小胞体が凝集体として安定化されないことが理由として考えられる。また、この様な凝集抑制効果は5量体のオリゴ糖が小胞体表面に8.6 mol%導入されることによって達成されることから⁴、この濃度以上でオリゴ糖が小胞体表面を効果的に被覆できるものと思われる。

一方、PEGやデキストラン等の水溶性高分子も小胞体の凝集惹起剤として作用することが知られている。デキストラン(M_w 40,000)を小胞体分散液(5 g/dL)に添加すると粘度が大きく上昇し(Fig. 1b)，小胞体の凝集が認められる。これは小胞体表面への水溶性高分子の吸着による小胞体凝集¹⁵、または水和高分子の排除体積効果による小胞体の濃縮¹⁶が原因と考えられている。一方、オリゴ糖修飾小胞体では粘度上昇が低く抑えられていることから小胞体凝集の抑制効果が確認された。例えば、膠質浸透圧を血液と同等の25 Torrに揃える場合、3 g/dLのデキストラン添加が必要

であり、これによる小胞体分散液の粘度上昇が懸念されるが、オリゴ糖修飾を行えば粘度上昇を低く抑えることが可能である。

3.2. 凍結保存

凍結融解は小胞体を融合させる手法として一般的に用いられている¹⁷。しかし、Hb小胞体の凍結保存を目的とした場合、粒径増大や内包物の漏出が起こるため、このままでは困難である。これは、凍結時の水分子の結晶化により小胞体の強制的な凝集／融合が起こり、更に二分子膜表面の水和水が離脱して膜構造が不安定となるためと考えられている¹⁸。スクロースやトレハロースなどの二糖類の添加が小胞体を安定化することは既に報告されているが¹⁹、高濃度の添加はそれを除去するための後処理を必要とする。そこで糖鎖を直接小胞体に導入した形のオリゴ糖修飾系について凍結融解に対する安定度を評価した。

オリゴ糖修飾していないHb小胞体を凍結融解すると、粒径500 nm付近に凝集（融合）した小胞体が認められ、9%程度のHb漏出が確認された。一方、オリゴ糖修飾小胞体では粒径の変化も全く認められず、8.6 mol%のオリゴ糖の導入によりHb漏出率は2.5%まで抑制されていた。更に、酸素親和度の比較では、修飾していないHb小胞体はHill係数(2.1から1.6), P₅₀(36から30 Torr)共に大きな変化を示したのに対し、修飾系では殆ど変化が認められなかつた。これは膜表面をオリゴ糖鎖が効率よく覆い、膜を保護することによりアロステリック因子などの漏出が抑制されているためと考えられる。

3.3. α-アミラーゼ分解試験²⁰

ヒト血液中にはα-アミラーゼが60-160 Somogyi unit/dL存在し、オリゴ糖鎖のα1,4-結合を加水分解することが知られている。Fig. 2に示すように単にマルトペンタオースを小胞体と混合させた系では、マルトペンタオースは速やかにα-アミラーゼの活性を受け、初期速度0.92 mM/minでほぼ15分以内に完全に分解される。15分以降は分解生成物であるマルトトリオースが緩やかに分解される。一方、マルトペンタオースを直接小胞体表面に固定したオリゴ糖修飾系では、3時間後でも分解糖の生成は殆ど認められなかつた。

小胞体表面のオリゴ糖がα-アミラーゼの分解を受け難いのは、小胞体表面が負電荷を帯びているため、pH 7.4では同様に負電荷を帯びたα-アミラーゼ(pI = 6.1-6.5)が表面まで接近できないか、あるいはオリゴ糖鎖自身の排除体積により蛋白質の接近が抑制されているためと考えられる。

Table 1. KPTT and PTT of plasma after the addition of the vesicles Ca²⁺, 4 mM; [Lipid], 3.2 g/dL at 37°C, measured 10 times. Mean±SD.

Sample	KPTT (s)	PTT(s)
DOMPGlu-vesicles	119±3	582±46
vesicles	153±16	697±28
PBS	117±4	555±14

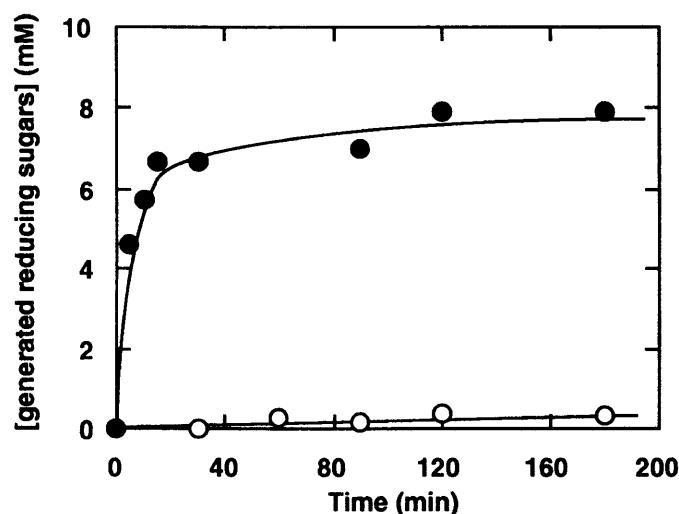


Fig. 2. Change of the concentrations of reducing sugars generated from maltopentaose by α-amylase (160 Somogyi unit/dL). ○, maltopentaose-modified vesicles; ●, maltopentaose with vesicles. ([maltopentaose] = 4.6 mg/dL, [lipid] = 8 g/dL)

3.4. 血液適合性試験

オリゴ糖修飾小胞体と洗浄赤血球を混合後振盪したところ、赤血球からのHbの漏出率は1%以下であり溶血性はほとんどない。また、血液凝固試験では、修飾していない小胞体はコントロールのPBS添加系と比較し凝固時間が遅延されたのに対し、オリゴ糖修飾小胞体はPBS添加系と同程度であった(Table 1)。これは修飾していない小胞体表面では、凝固系のいずれかの因子が相互作用(吸着など)していることが考えられるが、オリゴ糖修飾小胞体ではそのような相互作用が抑制されているものと推測される。

3.5. 血漿中におけるオリゴ糖修飾効果

オリゴ糖修飾していない小胞体分散液をヒト血漿中にて37°Cで150分間振盪した結果、600 nm付近を中心とした新たなピークが出現し、凝集が認められた。一方、オリゴ糖修飾小胞体分散液ではほとんど変化はなかった(Fig. 3)。

次にHb小胞体(粒径0.2 μm)分散液をヒト血漿と混合し37°Cにて振盪したところ、15分後に目視にて確認できる凝集体が生成し、60分後には完全に沈殿分離した。また、in vivo試験でも同様に凝集する挙動が確認されている。このようにHb小胞体にて凝集し易くなった理由として、調製時に小胞体表面に吸着したHb分子が凝集の引金となるものと示唆された。

そこでHbの内包されていない小胞体をHb溶液と接触させた後、ゲルfiltrationにてHbを除去し血漿と混合して測定を行なった。オリゴ糖修飾していない小胞体分散液では60分後に凝集体の生成が認められたが、オリゴ糖修飾系では濁度が僅かに上昇した($\Delta OD = 0.02$, $\lambda_{max} = 800 \text{ nm}$)のみであった。従って、小胞体表面に吸着したHbが凝集を誘起する原因の一つになっていることが確かめられ、オリゴ糖修飾によりこの凝集が抑制される。

これらの小胞体を遠心分離し、生理食塩水にて洗浄後SDS-PAGEにて吸着蛋白質の解析を行なったところ(Fig. 4)，修飾していない小胞体では、Hbのバンドが16,000程度に確認され、ハプト

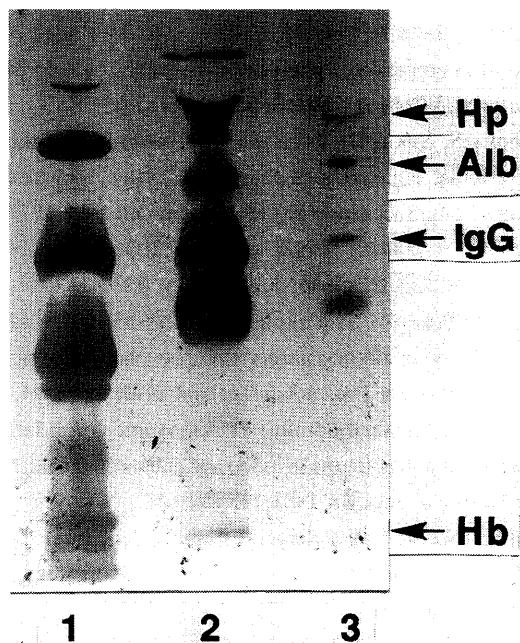


Fig. 4. SDS-PAGE electrophoretic patterns of adsorbed proteins on the surface of vesicles. Lane 1, markers (MW, 14,000, 20,000, 30,000, 43,000, 67,000, 96,000 from bottom); lane 2, unmodified vesicles; lane 3, maltopentaose-modified vesicles.

グロビン(Hp, MW 80,000-100,000), アルブミン(Alb, MW 69,000), ヘモペキシン(Hx, MW 60,000-80,000), グロブリン(IgG)などと考えられる強いバンドが確認された^[11-13]。一方、オリゴ糖修飾系ではHbのバンドは確認されず、また血漿蛋白質の吸着量も大幅に減少していた。従って、まず小胞体表面にHbの吸着が起こり、それに付随してアルブミンなどの血漿蛋白質の吸着が促進され、これが小胞体表面の表面電位や極性を変化させることにより小胞体間の凝集が生じしたものと思われる。そして、一連の蛋白質の表面吸着がオリゴ糖修飾によって妨げられていることが明らかとなった。

4. 結論

小胞体表面をオリゴ糖修飾することにより、Ca²⁺、デキストラン添加や、凍結融解に際して安定度が極めて高い。オリゴ糖はα-アミラーゼの活性をほとんど受けず、調製時にHb小胞体表面に吸着したHb分子の影響による血漿中の凝集も抑制可能であった。更にオリゴ糖修飾は、血漿蛋白質の小胞体表面吸着も抑制することが明らかとなった。

参考文献

1. 武岡真司, 土田英俊. ヘモグロビン小胞体. 人工血液 1994;2:36-8.
2. Tsuchida E. Synthesis and characterization of artificial red cell. Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol 1992;20:337-44.
3. Takeoka S, Ohno H, Hayashi N, Tsuchida E. Control of release of encapsulated molecules from polymerized mixed liposomes induced by chemical stimuli. J Controlled Relea 1989;9:177-86.

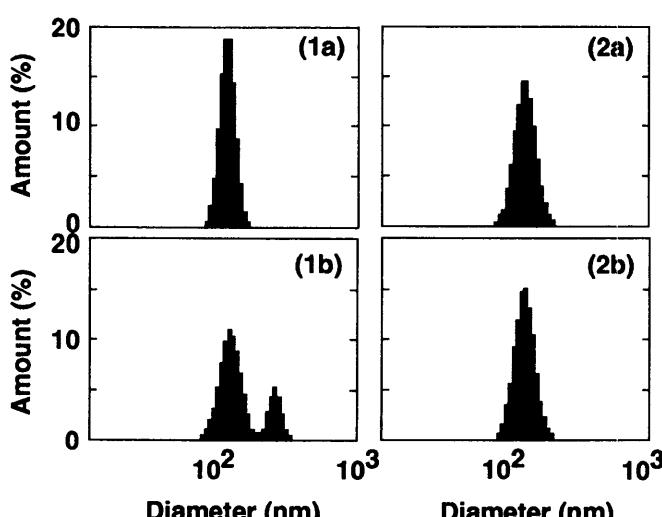


Fig. 3. Light scattering results of vesicle suspensions before (1a) and after (1b) incubation for 150min, and maltopentaose-modified vesicle suspensions before (2a) and after (2b) incubation for 150min in plasma at 37°C.

4. Takeoka S, Sakai H, Ohno H, Yoshimura K, Tsuchida E. Inhibition effect of aggregation of phospholipid vesicles by incorporation of glycolipids. *J Colloid Interface Sci* 1992;152:351-8.
5. Takeoka S, Sakai H, Takisada M, Tsuchida E. Inhibition of intervesicular aggregation of phospholipid vesicles by incorporation of dialkyl oligosaccharide glycerol. *Chem Lett* 1992;1877-80.
6. 緒方嘉貴, 後藤彰久, 宮内雄二, 鈴木一比好, 高橋晃. ネオレッドセルの酸素運搬能評価. *人工臓器* 1990;19:1383-6.
7. Sakai H, Takeoka S, Yokohama H, Nishide H, Tsuchida E. Encapsulation of Hb into unsaturated phospholipid vesicles and γ -ray polymerization. *Polym Adv Technol* 1992; 3:389-94.
8. Gabizon A, Papahadjopoulos D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;185:6949-53.
9. Sakai H, Takeoka S, Yokohama H, Seino Y, Nishide H, Tsuchida E. Purification of concentrated hemoglobin using organic solvent and heat treatment. *Protein Expr Purif* 1993;4:563-9.
10. Kamio Y, Terawaki Y, Nakajima T, Matsuda K. Structure of glycogen produced by selenomonas ruminantium. *Agric Biol Chem* 1981;45:209-16.
11. Bonte F, Hsu MJ, Papp A, Wu K, Regen SL, Juliano RL. Interactions of polymerizable phosphatidylcholine vesicles with blood components: Relevance to biocompatibility. *Biochim Biophys Acta* 1987;900:1-9.
12. Tortorella D, Ulbrandt ND, London E. Simple centrifugation method for efficient pelleting of both small and large unilamellar vesicles that allows convenient measurement of protein binding. *Biochemistry* 1993;32:9181-8.
13. Wessel D, Flugge UI. A Method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 1984;138:141-3.
14. Wu PS, Tin GW, Baldeschiwiler JD, Shen TY, Ponpipon MM. Effect of surface modification on aggregation of phospholipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:6211-5.
15. Sunamoto J, Iwamoto K, Kondo H, Shinkai S. Liposomal membranes. VI. Polysaccharide-induced aggregation of multilamellar liposomes of egg lecithin. *J Biochem* 1980;88:1219-26.
16. Arnold K, Zschoering O, Barthel D, Herold W. Exclusion of poly (ethylene) glycol from liposome surfaces. *Biochim Biophys Acta* 1990;1022:303-10.
17. Sakai H, Takisada M, Takeoka S, Tsuchida E. Cryoprotection of synthetic glycolipids for phospholipid vesicles. *Chem Lett* 1993; 1891-4.
18. Caffery M. The Combined and separate effects of low temperature and freezing on membrane lipid mesomorphic phase behavior: Relevance to cryobiology. *Biochim Biophys Acta* 1987;896:123-7.
19. Harrigan PR, Madden TD, Cullis PR. Protection of liposomes during dehydration and freezing. *Chem Phys Lipids* 1990;52:139-49.
20. 坂野好幸. 臓器アミラーゼ. 大西正健, 坂野好幸, 谷口肇 編. アミラーゼ. 東京: 学会出版センター 1986;187-206.

小動物における体外循環下での外科的治療

Surgical correction for the heart diseases by the cardiopulmonary bypass technique in the small animal

山根義久

Yoshihisa Yamane

人間社会における動物の存在の重要性が認識され、犬や猫などがコンパニオンアニマルとして認知されつつあるなか、動物の病気に対する治療の要求度も高度化してきている。

特に小動物医療においてその傾向は顕著であり、それと並行して診断、治療技術も急速な発展を遂げている。しかし、疾患ごとに分科、専門科されていない獣医療の現状では、未だ多くの面において確立されていない不十分な分野もある。その一つにあげられるのが循環器系疾患であろう。

これまでに数多くの循環器系疾患における研究や症例報告がなされ、かなりその病態については解明されてきたが、それに対する治療は未だ確立されているとは云えない。循環器系疾患に対する内科的治療については、一応の方向性が確立されつつあるが、外科的治療についてはこれからの感が強い。その理由は循環器系疾患の多くのものが、その外科的治療を進める上においてなんらかの補助的手段が必要であること、ヒトと比較して生理学的、解剖学的に困難な問題が多くあること、さらにそれらに対応するためには経済的な問題を無視することができないことなどである。しかし、獣医科領域においてもこれまでにこれらの問題を乗り越えるべく多くの挑戦がなされてきた^{1,2)}。先ず、補助的手段としては、体外循環法、交差循環法、さらに低体温麻酔法などが積極的に取り入れられ実験的に試みられてきた。また、生理学的、解剖学的な問題は新素材の開発とからめてその動物に適した器具器材及び技術の開発などにより対応してきた。その結果人工心肺による体外循環法を用いての手術法が、現在多くの問題を残しているとはいえ、一応臨床に応用できる一つの方法となりつつある^{3,4)}。体外循環法では一度血液を体外に誘導し、酸素加の後に体内に戻すため多くの問題点が発生する。特に、血液とは切っても切れない深い関係がある。

体外循環時に関与する血液としては体外に誘導し体内に再び送血する自己の血液は勿論のこと、回路内に充填液として入れる血液や、術後に輸血に使用する血液などがあげられる。しかし、犬や猫の血球の脆弱性、動物での血液型の複雑さ、さらに手術時の

東京農工大学農学部獣医学科畜外科学教室、〒183 東京都府中市幸町3-5-8, Division of Veterinary Surgery, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, 3-5-8 Saiwai-cho, Fuchu-shi, Tokyo 183, Japan.

1. 獣医科領域における体外循環下での手術と血液

1.1. 体外循環下における手術の対象となる疾患

獣医臨床における体外循環下での手術は、現在のところ全て犬と猫についてである。手術の対象となる疾患はヒトと同様であり、それらの殆どは循環器系疾患であるが呼吸器系疾患のこともある。以下に現在までに筆者らが実施報告した疾患をあげてみる。

循環器系疾患：心房中隔欠損症(ASD), 心室中隔欠損症(VSD), ファロー四徴症(T.F), 肺動脈狭窄症(PS), 動脈管開存症(PDA), 僧帽弁逸脱症候群(腱索断裂), 犬心臓糸状虫腱索テング

呼吸器系疾患：気管閉塞

1.2. 体外循環法と手術

アプローチ法は疾患によりそれぞれ異なるが、開胸は胸骨正中切開、あるいは右側及び左側開胸で行う。脱血は主に右心房、右心耳より前後大静脈内に脱血カニューレを挿入し、自然落差にて実施する。また、送血カニューレの挿入は上行大動脈あるいは股動脈より行い、大動脈起始部より冠動脈内に心停止液(Young液), 心筋保護液(GIK液)の注入を行う。心停止と同時に心筋表面をアイス・スラッシュによって局所冷却し、さらに、体外循環中は中心冷却にて28°C前後の低体温にて維持する(Fig. 1)。

1.3. 人工心肺装置の構造

現在、使用している人工心肺装置は犬(1.5~20 kg)を対象として設計したものであり、そのため充填量は極めて少量となっている。

人工肺：使用する人工肺は膜型人工肺で中空糸内部灌流型(ポリカーボネイト製のハウジング内に多孔質ポリプロピレン中空糸膜[外径250 μm, 内径200 μm]を多数収納)で、充填量の少ない三タ



Fig. 1. 犬のファロー四徴症の根治術。体外循環心停止下に右心切開し、パッチグラフトにて心室中隔欠損を閉鎖。心筋表面はアイス・スラッシュにて局所冷却。

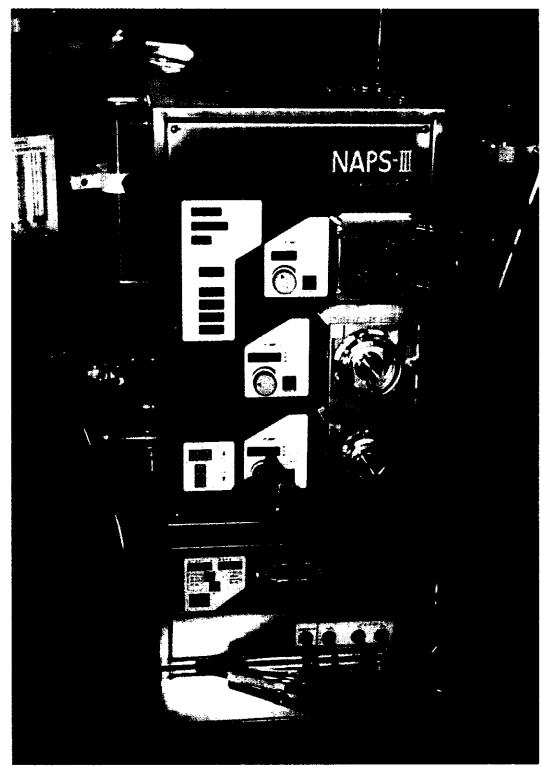


Fig. 2. 人工心（動物臨床医学研究所 NAPS III型）。吸引用、補助用、送血用の三つのローラーポンプよりなり、下段には冷却加温装置が組み込まれている。

イブを準備している(Table 1)。

体外循環回路：体外循環回路はセミクローズタイプとし、S回路(充填量146 mL)とL回路(277 mL)の二つのタイプがある。よって、人工肺のSタイプとS回路の組合せで総充填量は200 mL以下という少量でポンポンが可能となる。

人工心：ローラーポンプを用いており、S回路使用時の最大流量は1,400 mL/min、L回路使用時では2,350 mL/minである(Fig. 2)。

以上、各種の人工肺と回路の組合せで、かなり広範囲の体重(1.5~20 kg)のものに応用可能で、必要に応じて人工肺は並列にて2個用いることもある。その他、脱血カニューレは小児用のものを、熱交換器は金属製のブラウン・ハリソン型を使用。シートリザーバーはL回路で40 mL、S回路で10 mLとできるだけ小さくし、送血カニューレは外径3.0 mm, 3.8 mm, 4.5 mmの三種類

を作成し挿入部位の血管の太さに適したものを使用する。

1.4. 人工心肺回路内の充填液と血液

体外循環を行うためには、人工心肺装置や回路内を血液などで満たしておかなければならない。初期にはヘパリン加新鮮血が使用されていたが、ヘパリン力値の変動のため、採血後24時間以内が安全な使用期限とされていた。その問題解決のためACD加血液の使用が考慮されてきたが、これも大量のクエン酸による毒性の問題が生じた。しかし、この問題はカルシウムの添加により一応解決されている。現在では大部分はACD加血が使用されているが、一時のように血液のみの充填による体外循環をおこなうことは事実上なく、後述するように血液希釈による体外循環が一般的である。

血液希釈は単に使用血液量を節約するばかりではなく、血液の粘性を下げ、末梢循環を改善させることを目的としている。また、同種輸血による末梢循環障害を主徴とする同種血液症候群*(homologous blood syndrome)の発現が注目され、この予防・改善のため自家血あるいは全く血液を用いずに希釈液を充填して体外循環を行うことが考えられてきた。筆者らは、人工心肺や回路内の充填液量の少量化により現在では血液を使用しない無血充填に

Table 1. 膜型人工肺の種類

タイプ	有効膜面積(m ²)	充填量(mL)
S	0.3	23
M	0.6	40
L	1.0	60

*同種血液症候群：赤血球成分以外の不適合性によるアナフィラキシー様反応を指し、一過性の急激な血圧減少を見る。

Table 2. 体外循環充填量の計算法（20%希釈目標の場合）

$$\frac{\text{補液量}}{\text{自己体内血流量} + \text{回路容量}} = 20\%$$

$$\text{自己体内血流量(mL)} = \text{体重(g)} \times 0.08$$

$$\text{回路容量} = \text{輸血量} + \text{補液量}$$

ての体外循環を可能にしている。

しかし、過剰な希釈は組織のhypoxiaや浸透圧低下、さらに血管外への漏出と組織の浮腫などを惹起することになる。そのため通常、血液希釈率は約20%を目安に実施されている(Table 2)。

使用血液を節約して、術後人工心肺内の血液をすべて輸注還血するときには、乳酸加リンゲル液と5%糖液のみによる灌流が行われることが多い。充填液にはその他にメイロン、ビタミン類、ステロイド、抗生物質、カリウムなども添加することがある。

1.5. 送血流量と血圧

体外循環時における適正な血液灌流量とは、生体の酸素需要量に対して十分に供給できるような動脈送血流量のことである。この送血量を決定する目安としてはClarkが体重別に表した標準的な酸素需要量を基礎にして決定する(Fig. 3)。この他に体重、ヘモグロビン、動静脈の酸素飽和度の較差ならびに血行動態的指標によって決定する。

筆者らは、28°C前後の低体温で20%希釈の条件化では比較的高流量の100-130 mL/min/kgの送血を行っている。動脈圧は送血量と末梢血管抵抗によって決定されるものである。体外循環開始時には、末梢血管抵抗の減少により血圧が低下するが、やがてカテコールアミンなどの分泌亢進により血管抵抗が増大し、血圧の上昇がみられるようになる。極端な低血圧時には送血流量を増やすか、脱血量を抑制して中心静脈圧を上げて対処する。逆に、平均

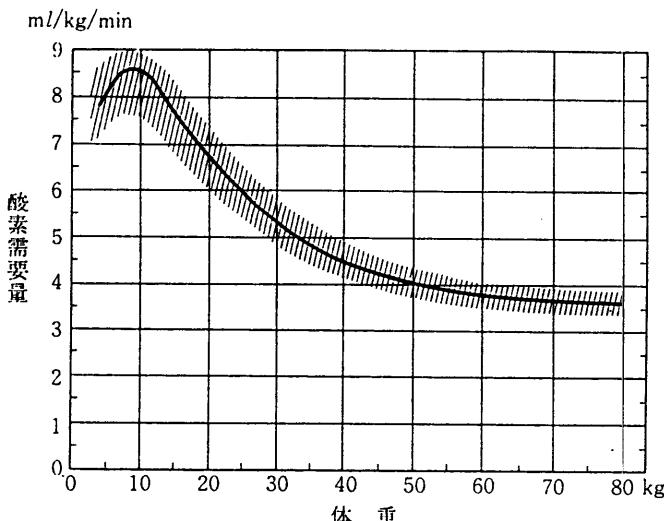


Fig. 3. 体重を基準とした酸素需要量の変動(Clark LC Jr, 1958)

Table 3. 体外循環時に使用する薬剤とその使用量

$$\bullet \text{KCl (mL)}: (5 - \text{血清K}) \times \text{BW} \times 1/5$$

$$\bullet 10\% \text{生理食塩水(mL)}: (140 - \text{血清Na}) \times \text{BW} \times 1/5 \times 1/2$$

$$\bullet \text{メイロン(mL)}: (-\text{BE}) \times \text{BW} \times 1/3 \times 1/2$$

BW: 体重, BE: 塩基余剰(base excess)

動脈圧が80 mmHg以上になるとα受容体遮断薬(クロルプロマジン:コントミン)にてコントロールする。血圧は比較的低めに維持した方が高めより良い結果を生むようである。

1.6. 体外循環中の使用薬剤

体外循環中は種々のホルモンあるいは代謝の異常、また、血管抵抗異常が生じることが知られている。利尿剤(ラシックス)等で強制利尿を行うことにより、血清カリウム及びナトリウムは減少する傾向にある。これらを補正しなければ低カリウム血症は術後の不整脈の原因になり、また低ナトリウム血症は腎臓の浸透圧利尿作用を減じることになる。よって、体外循環中に適宜必要量を算出し補正する。

さらに低体温の体外循環中は一般的にアルカローシスとなっているが、復温過程では各臓器の代謝機能と温度変化が均一ではないために代謝性アシドーシスに傾く。このため、base excessの測定を頻回に実施し、炭酸水素ナトリウム(メイロン)にて補正する(Table 3)。復温過程では必要に応じて血管拡張剤等を投与しつつ、生体温度変化を均等にする。急激な温度較差を避けるため、静脈血と動脈血温の差は5°C以内に保つようにする。

1.7. 体外循環終了後の処置

体外循環終了後は出入りの液量を計算し、最終的な希釈率を再度計算する。

ヘパリンの中和には硫酸プロタミンの投与により行うが、血中プロタミンの半減期はヘパリンより短いため初期使用ヘパリン量の約1.3~1.5倍量を目安にする⁶⁾。

プロタミンは高分子蛋白であり、肺通過時にヒスタミン分泌を促進させる作用がある。そのため、静脈投与時にヒスタミン効果による血管拡張作用のため一時的に低血圧に陥ることがある。この予防のためにプロタミンを左房内に注入することもある⁷⁾。

2. 人工心肺による生体循環の病態変化

体外循環中は心拍動の制御をはじめとした多くの人為的操作が加わるために、生体では各臓器の機能、神経系統、代謝、ホルモン分泌系、末梢循環系、血液性状等に種々の変化が生じてくる。体外循環時に発生する異常とこれらの病態については以下のようないわゆるあげられる。

2.1. 心拍動の停止

心停止のためには、大動脈起始部を遮断し、心停止および心筋

保護液(cardioplegic solution)を冠動脈内に注入し、アイス・スラッシュにて心臓表面を局所冷却する方法が一般的である。しかし、以下の三つの時期に心筋障害が発生すると考えられている⁷⁾。

- ・大動脈遮断直後に起きる心筋の酸素需要と供給のアンバランスにより生じる虚血障害
- ・心停止した心筋の代謝抑制と心筋保護が良好に行われないことによる障害
- ・大動脈遮断解除時の血流再開時に生じる急激な心筋細胞内外の環境変化により発生する障害

以上の防止のためには、大動脈遮断後できるだけ短時間内の心拍動の停止、心筋保護液の十分な量(10-30 mL/kg)の間欠的注入(30分毎)の実施、大動脈遮断解除時の血圧をできるだけ低く保つことに努める。

2.2. 肺循環系の変化

人工心肺による体外循環では、肺循環系は消失することになる。このため大部分の血液は肺を通過しなくなる。肺は生理的環境下ではガス交換は勿論のこと、多くの血管作動物質およびホルモン代謝が賦活される場でもある。

キニン系物質であるブラジキニンは強力な血管拡張作用を有するものであるが、肺通過時にキニナーゼの作用によって不活性化される。また、静脈血中に存在するアンギオテンシンIは、肺内で酵素の働きにより活性化されてアンギオテンシンIIとなり動脈内に流入する。しかし、体外循環では肺での代謝作用が消失するため、必然的に末梢血管拡張と細動脈の緊張低下により動脈血圧は低下する。

2.3. 動脈血圧の変化

体外循環の運転開始時には、十分な送血量にもかかわらず極端な低血圧を示すことがある。この時期の低血圧変化はinitial drop(initial hypotension)と呼称されているが、原因は送血・脱血流量のアンバランスをはじめ各種考えられている。肺動脈流量や肺動脈圧の消失より考えるとキニンーアンギオテンシン系の賦活異常による影響が最も大きいと推察される。また、体外循環では送血量と脱血量が別個に抑制されることになる。すなわち、生体内循環血液量が変動することになる。それにより、神経反射を介して末梢血管の緊張を高めることになる。

さらに、人工心肺でのローラーボンプによる送血では、脈圧がほとんど消失しているために末梢血管は常に緊張状態にさらされることになる。そのため徐々に血管抵抗が増大し、動脈血圧は上昇してくる。このような状況下では、末梢循環不全を来し、組織あるいは臓器はhypoxiaとなり、その結果アシドーシスとなる。

これらの予防のために、交換神経遮断剤(α プロッカ)などの血管拡張剤を使用する。しかし、この場合の血管拡張剤は全身の血管に同等に作用するのではなく、筋肉に分布する血管には強く効果が現れるが、実質臓器の血管には効果がうすい。いわゆる血流分布の異常が強く現われることが判っている。

2.4. 末梢循環の変化

体外循環の末梢循環動態はショック時の循環動態に類似してい

るといわれている。

低血圧、低灌流量による組織のhypoxiaとこれに起因する毛細血管壁よりの透過性亢進、その結果、血漿成分の血管外漏出と組織の浮腫、血管内の血液sludgingなどの変化が現われる。

それらの防止のためには、高流量で維持し、交感神経遮断を目的とした血管拡張剤の使用、過度の血液希釈をさけ、アシドーシス防止のために低体温にして組織の代謝を抑制する。

2.5. 電解質、内分泌系の変化

体外循環では、麻酔、低体温、各内臓の血液異常、血液希釈などの種々の原因が重なって、電解質や内・外分泌系の異常が出現する。臓器では低温によるストレスや、血流減少によるレニンの分泌促進、その結果、血清カリウム値の低下、尿量減少をきたす。

2.6. 線溶系、凝固系の変化

体外循環回路や人工肺の表面は血液にとっては異物であり、これらの表面に接触することにより血小板と内因性血液凝固機序が活性化されて凝固反応が進展する。

以上、主なものをとり上げても体外循環を施行することにより、生体内においては多くの病態変化が出現してくる。手術を成功させるためには、それらの変化を的確に把握することが重要となる。

3. 体外循環と血液代替物

最近の体外循環の方向はできるだけ同種血液を使用しない方向で研究が進んできている。その理由は、末梢循環障害を主徴とする同種血液症候群をはじめとした多くの原因によるものである。ましてや、犬や猫などにおいては血液型が繁雑であり、同種の血液を混じることにより発生する障害はもとより、多くの不明な点がある。また、その取扱も複雑であるため敬遠されがちである。

筆者らも、少しでも血液による生体内変化を生じさせないため、無血充填液を中心に体外循環を施行している。

しかし、血液代替物いわゆる人工血液のようなものが出現し、それらが酸素運搬能力が高く、生体におよぼす悪影響がないとするならば、体外循環法はより安全に、より効率よく施行することができると思われる。

現在研究されているリポソーム型人工赤血球などは酸素運搬効率も高く、生体における安全性および機能などが確立されれば、獣医科領域でも体外循環をはじめとした多くの手術、疾患の治療に役立つものと推察する。その日の一日も早く来ることを念願するものである。

参考文献

- 桑原康人、鶴野光興、上月茂和、清水栄治、榎本浩文、金尾滋、山根義久、岩山紳一、野一色泰晴。体外循環による心疾患への外科的アプローチ法—膜型人工肺および体外循環回路の開発、試作応用—. 第11回小動物臨床研究会年次大会プロシードィング 1990;439-46.

2. 鶴野光興, 上月茂和, 桑原康人, 金尾滋, 清水栄治, 榎本浩文, 山根義久, 岩山紳一, 野一色泰晴. 試作人工心肺装置による臨床応用への基礎的研究. 第11回小動物臨床研究会年次大会プロシードィング 1990;447-57.
3. Shores A, Weirich WE. A modified pericardial patch graft technique for correction of pulmonic stenosis in the dog. J Am Ani Hosp Assoc 1985;21:809-12.
4. Breznock EM, Wood GK. A patch-graft technique for correction of pulmonic stenosis in dogs. J Am Vet Assoc 1976;169:1090-4.
5. 山根義久, 柴崎文男, 上月茂和, 鶴野光興, 松本英樹, 田口淳子, 河野史郎, 鯉江洋, 岸山義弘, 岩山紳一, 野一色泰晴. 犬の肺動脈狭窄症に対するパッチグラフトを用いた体外循環下での外科的治験例. 動物臨床医学 1993;1:33-40.
6. 碓氷章彦. 凝固線溶の変動. 河部稔雄 編. 人工心肺. 名古屋: 名古屋大学出版会 1992;85-87.
7. 藤田毅, 富田哲夫. 対体循環. 和田達夫 監修. 心肺の外科I. 東京: 中山書店 1990;328-46.

●事務局たより

血液代替物評価試験に関する専門委員会の設置

94/3理事会(12月6日)において、本会に新しく専門委員会(血液代替物前臨床評価試験専門委員会、略称：評価委員会)を設置することになった。目的は生産者の依頼に基づき、第三者的立場で評価を行なうものである。本評価委員会の活動はおよそ次の内容となる。本学会が生産者との契約に従って試料を受け、本評価委員会が定めた評価項目に沿って評価試験を実施し、成果を取りまとめる。これらの作業は本学会の活動として推進され、これに伴う業務は本学会の事務局が担当する。

評価委員会の組織は、委員長：清水 勝(東京女子医科大学 教授)、委員(ア順)：阿岸 鉄三(東京女子医科大学 教授)、小林 紘一(慶應義塾大学 教授)、小室 勝利(国立予防衛生研究所 細菌血液製剤部長)、高折 益彦(川崎医科大学 教授)、高橋 恒夫(北海道赤十字血液センター 研究部長)、西出 宏之(早稲田大学 教授)、元木 良一(福島県立医科大学 教授)の構成である。

この専門委員会が設置されるに至った経過は、本年5月生産者より血液代替物評価依頼の申し入れがあったことにより、これを受けて94/1理事会(6月16日開催)において審議の結果、これを受託する形で推進することを決定。評議員会、本学会総会にも諮り、理事会方針が承認された。本学会に評価委員会を設置して活動させる目的は、我国における血液代替物の開発と生産の推進を計ることにある。本委員会は当面赤血球機能代替物に焦点を絞った評価を行なうことに決めている。定められた項目について安全性および効力などに関する試験を実施、公正かつ公平な立場からこれを評価し、その結果を専門委員会で充分討議して結論をまとめ、これを評価報告書とする役割を担うものである。尚、実用に備えて必要となるガイドラインについても報告をまとめる。

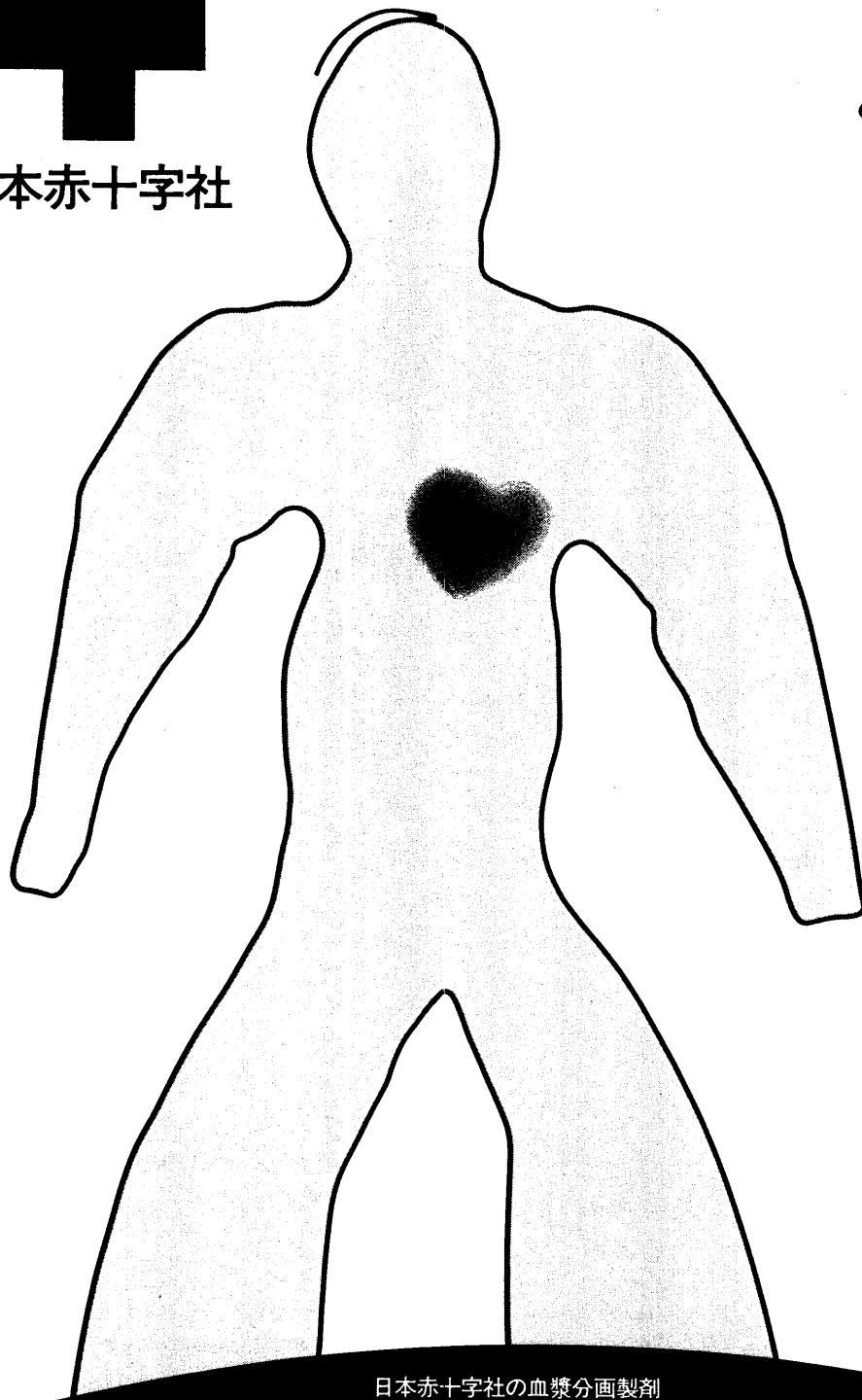
(以上)

・名称	NRC
・小胞体膜組性	飽和ホスファチジルコリン(大豆由来)／コレステロール／ミリスチン酸／ビタミンE
・粒子径	210 - 240 nm
・酸素運搬効率	30 - 40%
・ヘモグロビン濃度	5 - 6% (懸濁液中)
・脂質濃度	3.3% (懸濁液中)
・表面修飾剤濃度	0.1% (ヘモグロビン濃度5%の懸濁液中)
・管理	バイロジエン・エンドトキシンフリー
・荷姿	塩ビ製血液バッグに充填、1単位200 mL
・保存方法	4°Cにて保存
・有効期限	1年間



日本赤十字社

(日本赤十字社は、献血による安全で高品質な血漿分画製剤の製造を目指しています。)



愛 献血者

献血者のお心をお届けします。
採血から供給まで一貫した
クオリティコントロールとプロセスバリデーション。

日本赤十字社の血漿分画製剤

指 赤十字アルブミン
指 ガンマーフ「日赤」

指 人免疫グロブリン「日赤」
指 抗HBs人免疫
グロブリン「日赤」

指 クロスエイトM 250
指 クロスエイトM 500
指 クロスエイトM 1000

日本赤十字社 〒105 東京都港区芝大門1-1-3 文獻請求先 日本赤十字社中央血液センター 医療情報部 〒150 東京都渋谷区広尾4-1-31 TEL 03-5485-6607

【効能・効果】貯血量が800ml以上で1週間以上の貯血期間を予定する手術施行患者の自己血貯血

【使用上の注意】一括粹一

1. 一般的な注意

- (1) 本剤使用時の注意
1) 本剤の投与は手術施行予定患者の中で貯血式自己血輸血施行例を対象とすること。なお、造血機能障害を伴う疾患における自己血貯血の場合には、本剤の効果及び安全性が確認されていないため投与しないこと。

- 2) 本剤投与中はヘモグロビン濃度あるいはヘマトクリット値を定期的に観察し、過度の上昇(原則としてヘモグロビン濃度で14g/dl以上、ヘマトクリット値で42%以上を目安とする)が起こらないように注意すること。このような症状があらわれた場合には、休業あるいは採血等適切な処置を施すこと。
- 3) ショック等の反応を予測するため十分な問診をすること。なお、投与開始時あるいは休業後の初回投与時には、本剤の少量で皮内反応を行い、異常反応の発現しないことを確認後、全量を投与することが望ましい。
- 4) GOT, GPTの上昇等の肝機能異常を認めた場合には、本剤投与の中止等適切な処置を施すこと。

- 5) 本剤の効果発現には鉄の存在が重要であり、鉄欠乏時には鉄剤の投与を行うこと。
(2) 貯血式自己血輸血に伴う一般的な注意

- 1) 術前貯血式自己血輸血の対象は、その施設の従来の経験あるいは記録等より輸血を実行することが確実と予想される患者に限ること。
2. 次の患者には投与しないこと

- (1) 本剤又は他のエリスロポエチニン製剤に過敏症の患者

- (2) 血栓塞栓症又はその既往歴を有する患者

3. 次の患者には慎重に投与すること

- (1) 高血圧症の患者

- (2) 薬物過敏症の既往歴のある患者

- (3) アレルギー素因のある患者

- (4) 血栓塞栓症の可能性のある患者

4. 副作用

- (1) 循環器：血圧上昇、また、ときに動悸があらわれることがある。

- (2) 高血圧性脳症：急激な血圧上昇により、頭痛、意識障害、痙攣等を示す高血圧性脳症があらわれ、脳出血に至る場合があるので、血圧、ヘマトクリット値等の推移に十分注意しながら投与すること。

- (3) 皮膚：ときに皮疹、搔痒感、痤瘍等があらわれることがある。

- (4) 肝臓：ときにGOT, GPTの上昇等の肝機能異常があらわれることがある。

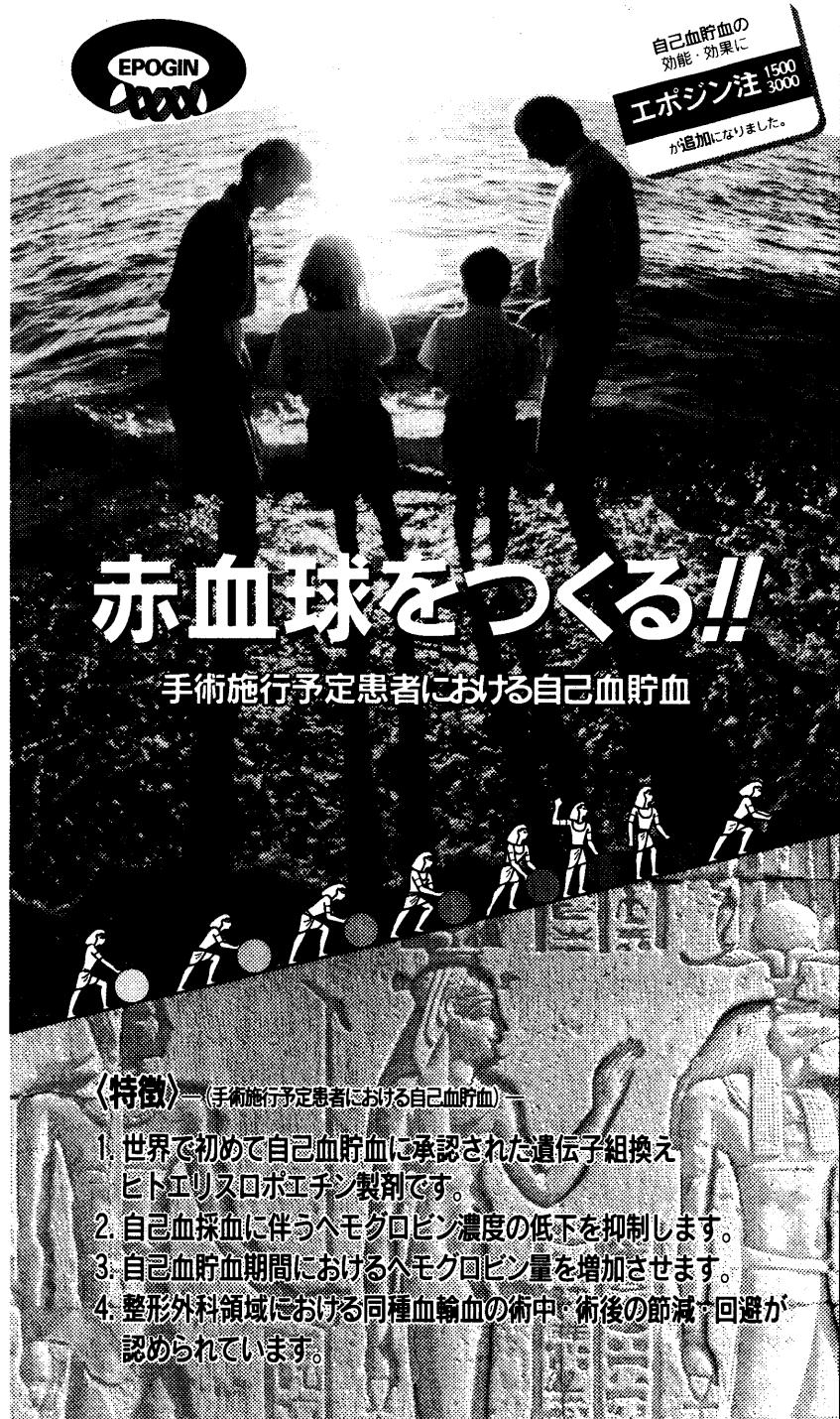
- (5) 消化器：ときに嘔気、嘔吐、食欲不振、下痢があらわれることがある。

- (6) 感覚器系：ときに頭痛、頭重感、めまい、体熱感、ほてり感、発汗、発熱、関節痛、筋肉痛、全身倦怠感があらわれることがある。

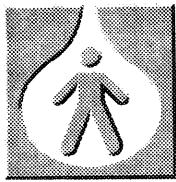
- (7) その他：眼底出血とともに口内苦味感、鼻出血があらわれることがある。ときに血清カリウムの上昇があらわれることがある。

8. 通用上の注意

- (1) 本剤を投与する場合は他剤との混注を行わないこと。



※用法・用量、その他の使用上の注意、取扱い上の注意等については製品添付文書をご覧下さい。



遺伝子組換えヒトエリスロポエチニン製剤

薬価基準収載

劇
指
要指

エボジン®
EPOGIN Injection 一般名：エボジン ベータ(遺伝子組換え)

1500
3000
6000



中外製薬

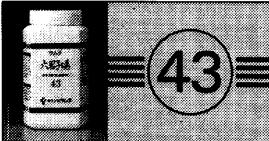
(資料請求先)
〒104 東京都中央区京橋2-1-9

CEP 4087

ツムラは、ツムラ漢方製剤エキス顆粒(医療用)128品目+3品目により、高齢化社会の深まりつつある現実の治療に貢献しつつ、漢方製剤の科学的な実証を通して、21世紀に至る長寿社会の治療手段としての役割をはたしていきたいと願っております。

胃炎のさまざまな症状に

胃腸の弱いもので、食欲がなく、みぞおちがつかえ、疲れやすく、貧血性で手足が冷えやすい場合に



43

リックンシトウ ツムラ六君子湯

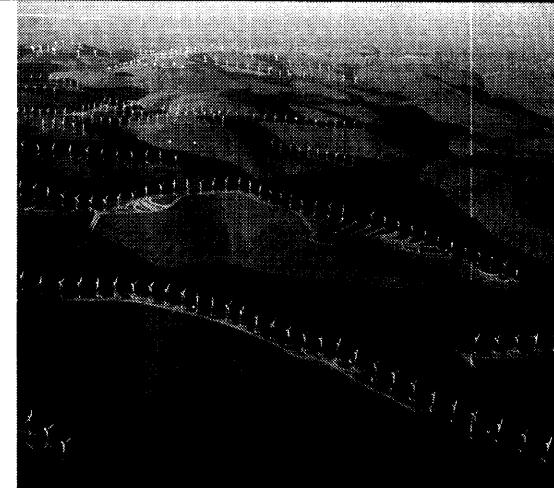
エキス顆粒(医療用)

(健保適用)

胃排出能促進作用と胃粘膜防御作用

- 胃排出能促進作用と胃粘膜防御作用をあわせ持ります。¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾
- 複雑な病態を示す慢性胃炎などの消化器不定愁訴に有用です。⁶⁾⁷⁾
- 胃炎の内視鏡所見に改善効果を発揮します。⁷⁾⁸⁾

(文献) 1)原澤茂・他: 消化器科 12, 215(1990)
2)須山哲次・他: Progress in Medicine 11, 507(1991)
4)坂上博・他: Progress in Medicine 11, 497(1991)
5)佐藤弘・他: Pharma Medica 6 増刊号, 87(1988)
7)三好秋馬・他: 診断と治療 79, 789(1991)
8)竹本忠良・他: 消化器科 12, 223(1990)



アルカモント峠の風力発電(アメリカ・カリフォルニア州)

3)権村博正・他: Progress in Medicine 11, 469(1991)
6)三好秋馬・他: Progress in Medicine 11, 1605(1991)

機能・効果

胃腸の弱いもので、食欲がなく、みぞおちがつかえ、疲れやすく、貧血性で手足が冷えやすいものの次の諸症:
胃炎、胃アトニー、胃下垂、消化不良、食欲不振、胃痛、嘔吐

用法・用量

通常、成人1日7.5gを2~3回に分割し、食前又は食間に経口投与する。なお、年齢、体重、症状により適宜増減する。

使用上の注意

- (1)一般的な注意 ①本剤を服用後、症状の改善が認められない場合は、他の医療用漢方製剤を考慮すること。②甘草を含有する漢方製剤を長期間投与する場合は、血清カリウム値や血圧の測定などを十分に行い、異常が認められたときは投与を中止すること。③複数の漢方製剤を併用する場合は、含有生薬の重複に注意すること。(特に甘草を含有する漢方製剤の併用には、より注意を必要とする。) (2)副作用 電解質代謝: 長期連用により低カリウム血症、血圧上昇、ナトリウム・体液の貯留、浮腫、体重の増加等の偽アルドステロン症があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には投与を中止すること。また、低カリウム血症の結果としてミオパチーがあらわれるおそれがある。(3)高齢者への投与 一般に高齢者は生理機能が低下しているので減量など注意すること。
(以上、「使用上の注意」全文記載)

*組成、取扱い上の注意等は添付文書をご覧下さい。



資料請求

学術資料は、弊社MR(医薬情報担当者)へ
お問い合わせください。下記住所宛て請求下さい。

●本社・医薬事業部: 〒102 東京都千代田区二番町12番地7 ☎03(3221)0001㈹

RY-0431A-1

ヒトエリスロボエチン 製剤 エスパー[®] 注射液 1500・3000

●一般名: エボエチンアルファ(遺伝子組換え)
(劇)(指)(要指) ESPO INJECTION 健保適用品

- 赤血球系に選択的な分化・増殖を促す、特異性の高い薬理作用を備えています。
- 優れた貧血改善効果とQuality of Lifeの向上が見られます。
- 貧血改善にともない、輸血の大幅な減少と回遊が期待できます。
- 主な副作用としては血圧上昇、頭痛などが見られます。
- 液剤であるため使用が簡単です。

効能・効果: 透析施行中の貧血

アクティブライフ 人生へのルネッサンス



【使用上の注意】

- 1.一般的な注意 (1)本剤の投与は貧血症に伴う日常生活活動の支障が認められる貧性貧血患者に限定すること。なお、投与対象はヘモグロビン濃度で10g/dL(ヘマトクリット値で30%)未満を目安とする。(2)本剤の投与に際しては、貧性貧血であることを確認し、他の貧血(失血性貧血、汎血球減少、アルミニウム蓄積症等)には投与しないこと。(3)ショック等の反応を予測するため十分な問診をすること。なお投与開始時あるいは休業後の初回投与時には、本剤の少量を静脈内に注入し、異常反応の発現しないことを、確認後、全量を投与することが望ましい。(4)本剤投与中はヘモグロビン濃度あるいはヘマトクリット値を定期的に投与初期には週1回、維持投与期には2週に1回程度)に観察し、必要以上の造血(ヘモグロビン濃度で12g/dL以上、あるいはヘマトクリット値で36%以上を目安とする)にならないように十分注意すること。必要以上の造血を認めた場合は、休業するなど適切な処置をとること。(5)本剤投与により血圧上昇を認める場合があり、また、高血圧性脳症があらわれることがあるので、血圧、ヘマトクリット値等の推移に十分注意しながら投与すること。特に、ヘマトクリット値は徐々に上昇させるよう注意すること。また、投与中止後もヘマトクリット値が上昇する場合があるので、観察を十分行うこと。血圧上昇を認めた場合には、本剤の投与を中止するなど適切な処置を行うこと。(6)本剤投与により高カリウム血症を認める場合があるので、食事管理を適切に行うこと。(7)本剤投与によりシャントや血液透析装置内の残血を認める場合があるので、シャントや血液透析装置内の血流量には十分注意すること。このような場合にはシャントの再造設、抗凝固剤を增量等の適切な処置をとること。(8)本剤の効果発現は鉄の存在が重要であり、鉄欠乏時には鉄剤の投与を行うこと。

2.次の患者には投与しないこと 本剤又は他のエリスロボエチン製剤に過敏症の患者

3.次の患者には慎重に投与すること (1)高血圧症の患者 (2)薬物過敏症の既往歴のある患者 (3)アレルギー素因のある患者

4.副作用 (1)循環器 血圧上昇、また、ときに動悸があらわれることがある。(2)高血圧性脳症 激しい血圧上昇により、頭痛、意識障害、痙攣等を示す高血圧性脳症があらわれ、脳出血に至る場合があるので、血圧、ヘマトクリット値等の推移に十分注意しながら投与すること。(3)皮膚 ときに搔痒感、皮疹、痤瘍等があらわれることがある。(4)肝臓 ときにGOT、GPTの上昇等の肝機能異常があらわれることがある。(5)消化器 ときに嘔気、嘔吐、食欲不振、下痢があらわれることがある。(6)その他 眼底出血、ときに頭痛、めまい、発熱、熱感(はだり感)、全身倦怠感、関節痛、筋肉痛、口内苦味感があらわれることがある。ときに血清カリウムの上昇があらわれることがある。

用法・用量、上記以外の使用上の注意は添付文書をご覧下さい。

販売元・資料請求先

三共株式会社
〒104 東京都中央区銀座2-7-12

製造元

麒麟麦酒株式会社
〒150 東京都渋谷区神宮前6-26-1

94.2

本誌は、血液代替物開発研究に貢献する論文、関連する情報、学会会員のための会報、学会諸規定等を掲載するが、形式にはこだわらず創意ある投稿を広くを集めます。本誌への投稿者は本学会会員であることが望ましいが、投稿を希望する者は誰でも投稿することが出来る。原稿掲載の採否は編集委員会が決定する。原著論文について、他誌に既発表あるいは投稿中の論文は掲載しない。

執筆規定

DTP (Macintosh)による編集作業によって作製するため、ワープロを用いフロッピーによる投稿を原則とする。ただし、手書き原稿による投稿でも受け付ける。欧文による投稿を歓迎する。

- 1) 原稿はワープロを用いて作成し、使用したソフト名を記載してフロッピーにより提出すること。その際、ハードコピー2部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。Macintosh以外を用いるときは、テキストファイル形式でも保存し提出すること。
- 2) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著者名、全著者所属、英文著者名、英文所属、ついで筆頭著者の住所、英文住所を記入する。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。

投稿規定 Short Version

- 3) 総説、原著、および報告については、第2頁以降に和文抄録、Keywords (英文で6個程度) を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること。英文抄録は英文ワープロを用いて、別の「ABSTRACT」ファイルとしてハードコピーとともに提出しても構わない。
- 4) 句読点はコンマ(,)ピリオド(.)とする。
- 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbol フォントを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめること。
- 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μm, L, mL, μL, mol, g, mg, μg, ng, pg, fg, N/10などを用いる。
- 7) FigureとTable：引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は全て英文とすること。本文ハードコピー上に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。
- 8) 文献：本文に引用した順序に番号を付け、文中では2), 3-5), 1, 4-6)などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名、論文題名、誌名、西暦発行年；巻数：

頁～頁。とし、誌名の省略は医学中央雑誌またはIndex Medicusに準拠する。単行本の場合は全著者名、題名、編集者名、書名、発行地：発行書店、年号；頁～頁。の順とする。

1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
2. 砂本順三, 岩本 清. リポソームの調製. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編. リポソーム. 東京: 南江堂, 1988;21-40.
3. D'Agnillo F, Chang TMS. Cross-kinked hemoglobin-superoxide dismutase-catalase scavenges oxygen-derived free radicals and prevents methemoglobin formation and iron release. Biomatr Artif Cells Immobilization Biotechnol 1993;21:609-21.
4. Reichert CM, Kelly VL, Macher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985;111-60.
- 9) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
- 10) 既発表の図表、その他を引用、転載する場合には、あらかじめ版権所有者の許可を得ること。また、掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

掲載料は無料とし、論説、総説、原著、報告等については別刷り30部を贈呈する。それを越える分についての費用は著者の負担とする(およそ1部100円)。カラー写真掲載・アート紙希望などの場合は、著者の実費負担とする。

編集委員会

●薄場 彰、柿崎 徹、武岡真司、仲井邦彦(委員長)、西出宏之、横山和正、渡辺真純●

日本血液代替物学会 News Letter 人工血液 vol. 2 (4) 1994年12月29日発行

■発行 日本血液代替物学会

〒169 東京都新宿区大久保3

早稲田大学理工学部55S棟701号

TEL (03)3203-4141 (EX) 73-6831 FAX (03)3205-4740

〒063 札幌市西区山の手2条2丁目

北海道赤十字血液センター内

TEL (011)613-6640 FAX (011)613-4131

〒107 東京都港区赤坂1-8-10 第9興和ビル

TEL (03)3586-5799 FAX (03)3505-4794

■編集・制作「人工血液」委員会

■印刷 サイマル・インターナショナル