

目 次

人工血液

第3巻 第2号 1995年6月

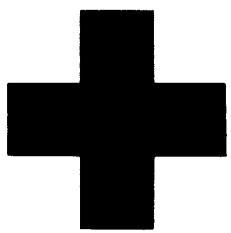
第2回日本血液代替物学会年次大会プログラム	29
総説 血小板増殖因子	畠 清彦 50
原著 NRCの製造と量産化の展望	後藤 博 54
連載 獣医療における血液代替物	
獣医領域における組み換えEPOの応用と問題点	大石明広 60
報告 モザンビーク医療事情	大鹿芳郎 64
学会報告	
Meeting "Current Issues in Blood Substitute Research and Development"に参加して	66
Headline News	59, 67

Contents

ARTIFICIAL BLOOD

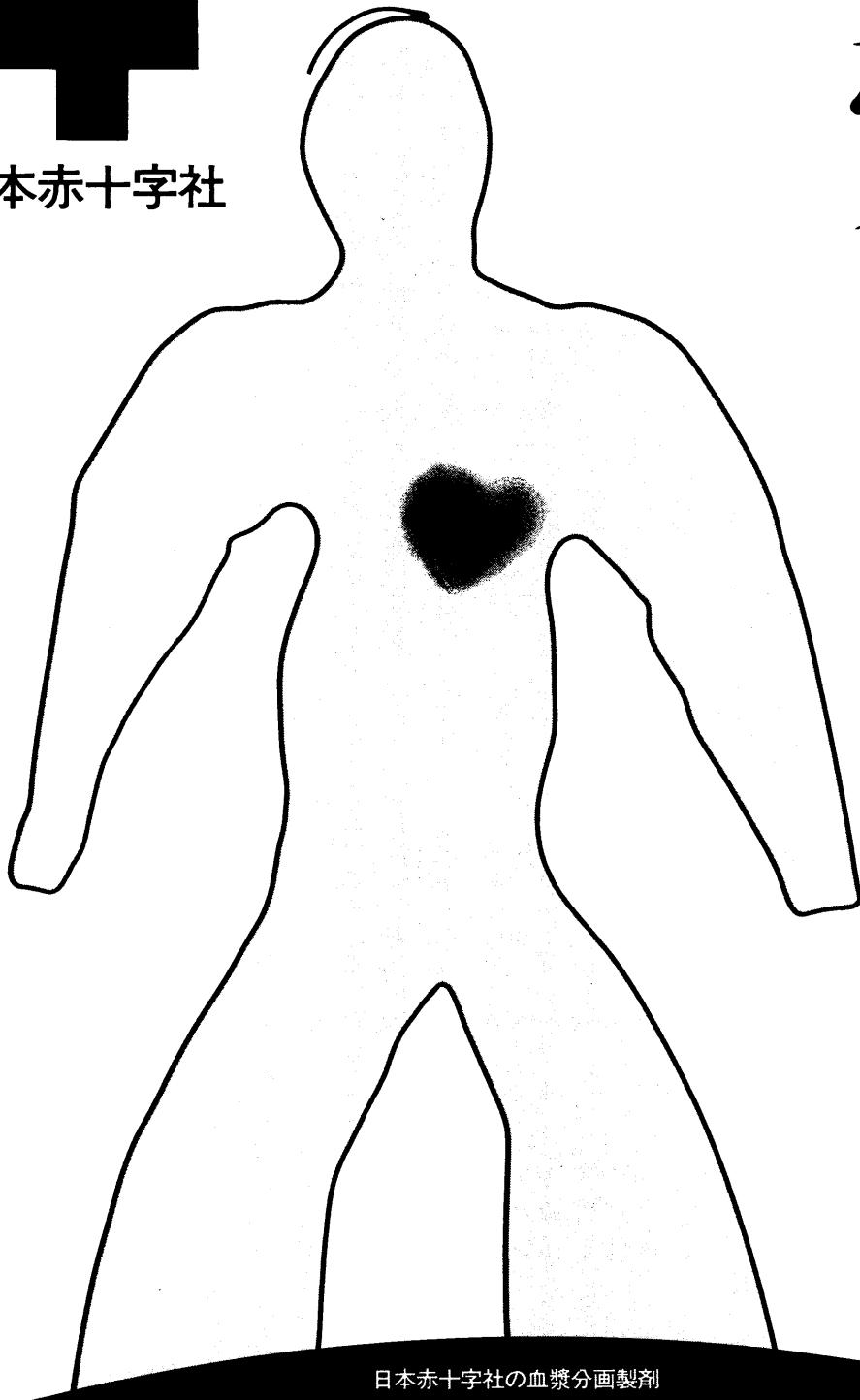
Vol. 3 No. 2 June, 1995

Program and Abstracts for the Second Annual Meeting of the Society	29
Review:	
Thrombopoietin (TPO)	Kiyohiko Hatake 50
Original Article:	
Large scale production of Neo Red Cell	Hiroshi Goto 54
Series: Veterinary Medicine and Blood Substitutes	
Application and problem of recombinant human erythropoietin in veterinary medicine	Akihiro Oishi 60
Report:	
Medical circumstances in Mozambique	Yoshiro Ohshika 64
From the meeting	
"Current Issues in Blood Substitute Research and Development"	66



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
の心をお届けします。

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 文献請求先 日本赤十字社中央血液センター 医薬情報部 〒150 東京都渋谷区広尾4-1-31 TEL 03-5485-6607

第2回 日本血液代替物学会年次大会 プログラム

The Second Annual Meeting of
The Society of Blood Substitutes, Japan

1995年6月19日（月）・20日（火）

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

第2回日本血液代替物学会年次大会会長
東京女子医科大学腎臓病総合医療センター

阿 岸 鉄 三

大会長挨拶

日本血液代替物学会は1993年7月に発足し、同年12月に早稲田大学土田英俊会長のもとで記念シンポジウムが、1994年6月に慶應大学小林紘一会長のもとで第1回年次大会が開催されました。血液代替物の研究・開発において、医学、工学、産業などを代表とする各分野の連携が重要であることはいうまでもありません。そしてその連携が円滑に行われるようになりますが、本学会の重要な責務の一つであると考えています。その意味から、今回私が第2回年次大会を主宰させていただきます。医療以外の分野での血液代替物の位置を明確にすることに留意してプログラムを作成しました。

すなわち行政側からみた血液代替物、獣医学からみた血液代替物、エホバの証人からみた血液代替物に対する考え方をそれぞれ特別講演や教育講演で取り上げました。また医・工・産連携のストラテジーと題するシンポジウムを企画しました。各分野での血液代替物の現況を知ることにより、本大会が各分野の理想的な連携を求める良い機会となることを願っております。

フォーシーズンズホテルは、本学会発足の記念シンポジウムが開催された由緒ある会場で、落ち着いた雰囲気、優れた設備で知られています。皆様の参会を得て2日間の期間を通じ学術交流の成果を挙げることを期待しています。

第2回日本血液代替物学会年次大会会長
東京女子医科大学腎臓病総合医療センター
阿岸鉄三

参加要項

1) 参加費（予稿集、20日分昼食代を含む）

会員10,000円、非会員15,000円、賛助会員30,000円、会社50,000円。

参加費は当日会場受付でお支払いください。

2) 懇親会費 10,000円を当日会場受付でお支払いください。

3) 演題発表基式

シンポジウム、ワークショップの各演者の口演時間は10分です。一般演題は口演時間10分、討論時間5分とします。十分な討論時間がもてるよう時間厳守してください。スライドはライカ判（35 mm）フィルムを使用してください。プロジェクターは1台のみ使用してください。

4) お問い合わせ先

第2回日本血液代替物学会 年次大会会長 阿岸鉄三

〒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

5) その他一学会会誌「人工血液」への投稿のお勧め一学会編集委員会では、年次大会で発表された演題の「人工血液」への投稿を歓迎します。積極的にご投稿ください。また、編集委員会から直接投稿依頼することもあります。

第2回日本血液代替物学会年次大会スケジュール

	第1日目 6月19日(月)	第2日目 6月20日(火)
9:00		9:00
10:00	10:00 理事会	一般演題 6-8 (川村明夫) 9-11 (武岡真司)
11:00	11:00 評議員会	10:30 教育講演 秋本純一 (池田康夫)
12:00		11:10 特別講演 T.M.S. Chang (関口定美)
13:00	13:00 13:25 開会の辞 阿岸鉄三	12:00
14:00	13:30 教育講演 山根義久 (友田燁夫)	13:00 総会
15:00	14:10 教育講演 M.A. Garrioch (高折益彦)	13:30 大会長講演 阿岸鉄三 (土田英俊)
16:00	15:00 特別講演 松谷有希雄 (湯浅晋治)	14:20 教育講演 清水 勝 (宮崎 保)
17:00	15:40 ワークショップ (小林紘一・仲井邦彦)	15:00 シンポジウム (元木良一・西出宏之)
18:00	17:10 一般演題 1-5 (薄場 彰)	16:30 閉会の辞 阿岸鉄三
	18:25	
	18:30-20:00 懇親会	

(司会)

■第1日目 6月19日（月）■

10:00-11:00 理事会（於サクラルーム）
11:00-13:00 評議員会（於ヒッコリールーム）

学術講演（於アンフィシアター）

13:25-13:30 開会の辞 阿岸鉄三

13:30-14:10 【教育講演】

獣医学における血液需要と人工血液への期待

司会 友田輝夫（東医大・生化学）

山根義久（東京農工大・農学部）

14:10-15:00 【教育講演】

The use of diaspisin cross-linked haemoglobin in the clinical setting

Magnus A. Garrioch

(Western General Hospital, Scotland)

15:00-15:40 【特別講演】

薬務行政からみた血液代替物の研究開発

司会 湯浅晋治（順大・輸血部）

松谷有希雄（厚生省・薬務局）

15:40-17:10 【ワークショップ】

血液代替物の臨床的ニーズ一質と量一

司会 小林紘一（慶大・外科）

仲井邦彦（北海道赤十字血液センター）

(1) 重度外傷性ショックにおける血液代替物のニーズ

篠沢洋太郎ほか（慶大・救急部ほか）

(2) NRCの出血性ショックにおける有効性

薄場 彰ほか（福島医大・一外）

(3) ネオレッドセル（NRC）の人工心肺下の酸素運搬能

泉陽太郎ほか（慶大・外科）

(4) 酸素運搬能を有するコロイド溶液への期待

宮尾秀樹（埼玉医大・麻酔科）

(5) 人工酸素運搬体の脳虚血性再灌流障害への応用について

榛沢和彦ほか（新大・二外ほか）

17:10-18:25 【一般演題】

司会 薄場 彰（福島医大・一外）

1. 交換輸血試験によるHb小胞体の酸素輸送に関する検討

酒井宏水ほか（早大・理工ほか）

2. 人工酸素運搬体（アルブミン・ヘム）の調整と特徴

川合宣行ほか（早大・理工）

3. 低酸素親和性ヘモグロビン修飾体の作成—ウシヘモグロビンを用いた酸素運搬体の開発一

仲井邦彦ほか（北海道赤十字血液センター）

4. ヘモグロビン修飾体による血管内皮細胞透過性の比較

仲井邦彦ほか（北海道赤十字血液センターほか）

5. ネオレッドセル（NRC）の特徴と性能

緒方嘉貴（テルモ（株）研究開発センター）

18:30-20:00 懇親会（於ヒッコリールーム）

■第2日目 6月20日（火）■

- 9:00-9:45 【一般演題】 司会 川村明夫（札幌北楡病院・外科）
6. ラット脳虚血エネルギー代謝を利用した人工赤血球の機能評価
濱崎直孝ほか（九大・臨床検査医学ほか）
7. Perfluorochemical乳剤を用いた室温下灌流保護法による血流遮断下肝切除の実験的検討
高橋昌宏ほか（札幌北楡病院・外科ほか）
8. Fluosol-DA(FDA)の異種心移植時超急性拒絶(HAR)抑制効果と病理形態学的検討
和田誠之ほか（広大・一外ほか）
- 9:45-10:30 【一般演題】 司会 武岡真司（早大・理工）
9. 常温下体外循環灌流液としてのNRC部分・完全体外循環実験
薄場 彰ほか（福島医大・一外）
10. 重合性リン脂質を利用した人工赤血球（ARC）のメト化抑制
粟井浩二ほか（日本油脂（株））
11. ネオレッドセル（NRC）の物理化学的特性
濱田健一ほか（早大・理工）
- 10:30-11:10 【教育講演】 司会 池田康夫（慶大・内科）
エホバの証人と人工血液
秋本純一（市立吹田市民病院・内科）
- 11:10-12:00 【特別講演】 司会 関口定美（北海道赤十字血液センター）
Recent development of modified hemoglobin blood substitutes
Thomas M.S. Chang (McGill University, Canada)
- 12:00-13:00 昼休み（サンドウィッチビュッフェ無料、於メイプルルーム）
- 13:00-13:30 総会（於アンフィシアター）
- 13:30-14:20 【大会長講演】 司会 土田英俊（早大・理工）
人工血液の単純補充以外の使用法
阿岸鉄三（東女医大・腎セ）
- 14:20-15:00 【教育講演】 司会 宮崎 保（札幌南通信病院）
人工酸素運搬体の臨床治験ガイドライン試案
清水 勝（東女医大・輸血部）
- 15:00-16:30 【シンポジウム】 司会 元木良一（福島医大・一外）
西出宏之（早大・理工）
血液代替物開発における医・工・産連携のストラテジー
(1) 血液事業と人工代替物
高橋恒夫ほか（北海道赤十字血液センター）
- (2) 適応病態とあるべき代替物
小林紘一ほか（慶大・外科）
- (3) 人工血液の有効性の評価—製造側への提言—
薄場 彰ほか（福島医大・一外）

(4) 獣医療での実証と寄与

山根義久（東農工大・農学部）

(5) 設計・開発における工学の役割と期待

大野弘幸（東農工大・工学部）

(6) 人工赤血球（NRC）の岡発と展開

上谷利治ほか（テルモ（株））

特別発言

関口定美（北海道赤十字血液センター）

Thomas M.S. Chang（McGill University）

16:30-16:35 閉会の辞

阿岸鉄三

学会年次大会開催にあたり、下記の諸社のご協賛をいただきました。（1995年4月20日現在）

記

（アイウエオ順）

旭メディカル株式会社

味の素株式会社

泉工医科工業株式会社

エーザイ株式会社

大塚製薬株式会社

小野薬品工業株式会社

科研製薬株式会社

株式会社荏原

鐘淵化学工業株式会社

株式会社志水

株式会社ツムラ

株式会社ニッショ一

株式会社日本抗体研究所

株式会社ミドリ十字

協和発酵株式会社

麒麟麦酒株式会社

三共株式会社

塩野義製薬株式会社

大正製薬株式会社

大鵬薬品工業株式会社

第一製薬株式会社

大日本製薬株式会社

中外製薬株式会社

テルモ株式会社

東京田辺製薬株式会社

富山化学工業株式会社

鳥居薬品株式会社

日本化薬株式会社

日本ケミファ株式会社

バイエル薬品株式会社

萬有製薬株式会社

三井製薬工業株式会社

明治製菓株式会社

持田製薬株式会社

山之内製薬株式会社

以上

人工血液の単純補充以外の使用法

阿岸鉄三

東京女子医科大学・腎臓病総合医療センター・外科

薬務行政からみた血液代替物の研究開発

松谷 有希雄

厚生省薬務局医療機器開発課長

周辺理工学技術の進歩に触発されて積極的となった医療の分野における理工学技術の応用が、逆に周辺理工学技術の開発を促進するという好ましい相乗効果を生み出している。酸素運搬作用をもつ人工血液の開発は、その代表例である。人工血液のもっとも一般的な使用法は、貧血状態における赤血球機能の量的・質的補充である。われわれは、あえて、人工血液の単純補充以外の使用方法について実験的に検討してきたので、その結果を総括的に報告する。

血液浄化における応用

血液浄化の技術的発展途上で、交換輸血が応用された時期がある。全血交換や、それのもっとも徹底した型であるtotal body wash-outをより簡単な技術によって実施することをめざしてperfluorochemical [Fluosol DA]、あるいは安定化hemoglobin [(pyridoxalated hemoglobin)-(polyethylene) conjugate]を含む溶液を用いてwhole body rinse-outを行い、血中bilirubin・digitoxinの約90%を除去できることが分った。

臓器移植における応用

Viabilityを維持したまでの摘出臓器の保存は、臓器移植における重要な問題である。Perfluorochemical、あるいは安定化hemoglobinを含む溶液で最長48時間までの低温灌流した肝臓が、移植後生着し、機能を回復することが分った。

一方、discordant modelを用いた実験的異種心移植において、whole body rinse-outによって異種抗体を移植前に除去しておくと、超急性拒絶反応の発現するまでの時間が10分程度から約8時間まで著しく遅延することが分った。

[はじめに]

平成5年、6年と2年連続で薬事法の改正が行われた。平成5年の改正は、①希少疾病用医薬品（オーファンドラッグ）等の研究開発促進と、②医薬品審査事務の改善を柱に行われた。続く平成6年の改正は、主に医療機器・医療用具について、①市販後の安全性確保対策、②適正使用の推進、③審査事務の改善を柱に行われた。

一方、平成6年に成立した製造物責任法や、HIV感染と血液製剤の問題など血液事業も大きな課題を抱えている。

ここでは、改正法の内容、血液事業対策の課題を述べるとともに、それを背景とした血液代替物の研究開発への期待と促進策について触れる。

[項目]

1. 平成5年薬事法改正
 - ・オーファンドラッグ等の研究開発
 - ・医薬品審査事務の改善
2. 平成6年薬事法改正
 - ・市販後の安全性確保対策
 - ・適正使用の推進
 - ・医療用具審査事務の改善
3. 製造物責任法
4. 血液事業対策
5. 血液代替物の研究開発の今後

RECENT DEVELOPMENT OF MODIFIED HEMOGLOBIN BLOOD SUBSTITUTES

Chang, Thomas M.S.

Artificial Cells & Organs Research Centre
Medicine and Biomedical Engineering
Faculty of Medicine, McGill University
Montreal, Canada

Crosslinked hemoglobins are now in Phase I, II or III clinical trials. These include: pyridoxylated human polyhemoglobin (Northfield), recombinant human hemoglobin (Somatogen), pyridoxylated bovine polyhemoglobin (Biopure) $\alpha\alpha$ -intramolecularly crosslinked human hemoglobin (Baxter), o-raffinose polymerized human hemoglobin (Hemosol) and PEG-conjugated hemoglobin (Enzon). Thus, extensive earlier research in a number of areas have now solved the initial toxicity problem in human. With the issue of toxicity in human now solved, the next important step is to test the efficacy of crosslinked hemoglobin in clinical trials in human.

The ability to prepare highly purified hemoglobin to remove contaminants has solved the problems of toxicity in clinical trials. If clinical trials continue to proceed successfully, modified hemoglobin may soon be available for routine clinical use. However, the increasing success in clinical trials on crosslinked hemoglobins has just touched the surface of the full potential of more complete artificial red blood cell substitutes. It should stimulate increasing efforts in research and development towards a more complete artificial red blood cell substitute. Examples of research in progress include the crosslinking of superoxide dismutase and catalase to ultrapure hemoglobin. Another very active area of continuing research is on encapsulated hemoglobin to form even more complete artificial red blood cells.

獣医学における血液需要と人工血液への期待

山根義久

東京農工大学農学部獣医学科

獣医科領域で血液が必要とされる疾患や機会は比較的多い。例えば、疾患としては再性性・再性不良性を問わず、先天性貧血(酵素欠損)、免疫介在性貧血(AIHA)、寄生性貧血(バベシア症、ヘモバルトネラ症)、中毒性貧血(エネギ、メチレンブルー、エストロゲン、ハインツ小体性)、失血性貧血(外傷、腫瘍、潰瘍性、ワルフィリン中毒、ノミ、ダニ寄生、鉤虫、鞭虫寄生)、破壊性貧血(犬糸状虫症:V.C.S)、感染性貧血(FelV感染)、代謝性および内分泌性貧血、栄養性貧血(鉄欠乏、葉酸、 B_{12} 欠乏)などが主なものである。以上の多くのものは、病態によっては輸血の対象となり得る。その他に最近の傾向として、従来では実施を見送っていた病態の重度な外科的疾患においても手術が施行される機会が多い。その場合にも術前、術中、術後において輸血という需要が生じる。さらに、腎不全症例で貧血の重度なものにおける腹膜透析や血液透析、血液濾過などの血液浄化療法においても全血補給の要求は行う。また最近では、動物用人工心肺装置の開発と施行方法の確立により、多くの心疾患において開心下での根治術が可能となってきた。その場合の体外循環に対しても、一応、無血充填といえども術後輸血の必要が生じることがある。

いずれにしても今後、獣医科領域における血液需要の増加は確実のようである。この様な状況下で酸素運搬体としての人工血液の登場は大いに期待できるものである。なぜならば、動物では未だ保存血液による輸血がシステム化されていないこと、AIHAやメトヘモグロビン血症のようにむやみに全血輸血のできない疾患が存在すること、また、動物の持つ赤血球の脆弱性の問題と体外循環時における輸血による各種のトラブルを考慮すれば、人工血液の果たす役割には重大なものがあるといえる。

THE USE OF DIASPIRIN CROSS-LINKED HAEMOGLOBIN IN THE CLINICAL SETTING

Garrioch, M.A.¹, Daily, E.K.², Przybelski, R.J.³

¹Consultant in Anaesthesia and Intensive Care,
Western General Hospital, Edinburgh, Scotland

²Consultant to Baxter Healthcare, Madison, Wisconsin,
U.S.A

³Medical Director of Baxter Blood Substitutes Programme,
Round Lake, Illinois, U.S.A.

Diaspirin Cross-linked Haemoglobin (DCLHb) is human, stroma free haemoglobin that has been chemically altered to cross-link the alpha subunits. The resultant stable modified tetramer is filtered and heat pasteurized to remove extraneous protein and inactivate pathogens. DCLHb has a normal oxygen carrying capacity (1.39 ml/g), Hill coefficient ($n=2.4$) and a slightly right shifted oxygen dissociation curve when compared to whole blood ($p50=32$ mm Hg). In a balanced electrolyte solution its viscosity is approximately 1 cp.

In addition to its oxygen carrying properties, DCLHb has been observed to have pharmacological effects. It is a vasoconstrictor causing an elevation in mean arterial blood pressure when given at doses above 50 mg/kg. It also produces an increase in global and regional organ perfusion as assessed by microsphere measurement of flow in various animal models.

Results of randomized, controlled, double blind, Phase 1 safety studies (doses of 25, 50 and 100mg/kg) in human volunteers show the solution to be safe and well tolerated.

Clinical studies of DCLHb in renal dialysis, hypovolaemic haemorrhagic shock and total hip replacement confirm the product's safety in the 50-200 mg/kg dose range.

A multicentre, randomized, controlled, single blind study of 50, 100 and 200mg/kg DCLHb in patients undergoing elective aortic repair has just been completed in Belgium and Scotland. DCLHb administration resulted in no serious adverse events directly attributable to the solution. All patients were discharged from hospital in reasonable health. Preliminary results indicate that, consistent with other studies, this product is safe and has a dose dependent vasopressor effect.

エホバの証人と人工血液

秋本 純一

市立吹田市民病院 内科

輸血に伴う副作用に注意が喚起されている現在、血液代替物（人工血液）開発への期待は高いものがある。今回、輸血を辞退するエホバの証人の信条や倫理観を考察しつつ、人工血液や血液製剤に対する彼らの見方を検討した。

エホバの証人とその仲間は、1994年8月現在、全世界で1,200万人を超える、日本国内では約40万人に及ぶと報告されている。彼らは宗教的信念を強く持ち、「血を食べてはならない」との聖書の章句により、全血、赤血球、白血球、血小板、血漿、及び血液の貯蔵が伴う自己血輸血を受け入れない。しかし、アルブミン、免疫グロブリン、血友病製剤の使用や血液の貯蔵を伴わず、しかも患者の循環系と離断しない術中希釈式自己血輸血や術中回収式自己血輸血を受け入れるか否かは各自の判断によると考えている。

人工血液については、その製剤が人や動物の血液に由来するものか否かが判断の要素となる。その製剤が血液に由来しないのであれば、純粹に医学的な問題であり、受け入れるか否かは患者が個人的に決定すべき事柄である。一方、その製剤が血液を原料として作られているのであれば、エホバの証人は受け入れない。したがって、彼らにとって、全合成系の人工血液の開発と治験は福音である。

彼らは、治療の際、「輸血謝絶 兼 免責証書」を提出している。また、緊急時や意識不明時に備え、「医療上の宣言」証書や「身元証明書」と題するカードを携帯している。それらには、いかなる状況でも輸血を拒否することと共に輸血以外の最善の治療が施されたならば、死を含め、いかなる損害が生じたとしても医師の責任を問わない旨の意思表明が述べられている。

彼らは、全国61の都市に信者の代表からなる「エホバの証人の医療機関連絡委員会」を持っている。同委員会は医療機関とエホバの証人の患者との間の連絡係として、相互理解を促進し、トラブルを避けるために活動している。

近年の法曹界の流れは、輸血拒否を患者の自己決定権と位置づけ、判断能力を有する未成年者を含め、成人患者の意思を尊重する方向にある。そのことは、東京都立病院や各地の大学病院等の倫理委員会方針にも反映されるようになっている。こうした法曹界の流れや医療技術の進歩の結果、無輸血治療のプログラムとチームを持つ病院が全世界で80を数えるまでになっている。

臨床医療の新しい将来のためにも、各種の血液代替物の実用化を心から期待するものである。

人工酸素運搬体の臨床治験ガイドライン試案

血液事業と人工代替物

清水 勝

東京女子医科大学 輸血部

高橋恒夫、関口定美

北海道赤十字血液センター

[緒言]

近年、輸血用血液の安全性は飛躍的に向上してきたことから、人工酸素運搬体（HOC）の臨床上の安全性は、輸血用血液以上であることが要求されるであろう。また、このHOCには既存の認可医薬品中に類似品がないことから、HOCの製造承認を得るためには、HOC独自の承認基準を設定する必要がある。そこで、本学会のHOC評価委員会で臨床治験を目指して検討されている事項を中心に、私見をも交えて述べ、会員諸氏のご見解を伺うことにしたい。

[臨床治験上考慮を要する事項]

最大の問題は、輸血開始点の基準を疾患（術式）別に設定することにある。臨床治験では、出来るだけ同一の術者により行う。

i) 術中出血：手術開始あるいは一定量の出血後から輸血を開始する迄の時間や輸血開始後にある一定量の輸血をする迄の時間が、HOCを事前に投与することによって延長可能かを見ること、また術中の総輸血量の減少の有無も評価の対象とする。投与量は赤血球濃厚液輸血時の厚生省使用基準の600 ml~1,200 ml相当量とするが、2,000 mlも検討に値する。なお、HOCの投与開始点の設定も問題となる。対照群には、代用血漿製剤あるいは赤血球をもちいる。

ii) 出血性ショック：対照群をおいての臨床治験は不可能であり、HOCの投与も赤血球輸血までのつなぎと考えられる。投与量は循環血液量の50%相当量とする。たまたま遭遇する症例を対象として、HOCの投与を試みて、評価する。この様な病態では、むしろ、大型動物による出血性ショックの実験成績を臨床治験の代替資料として活用すべきではないかと考える。現在、評価委員会ではHOCの出血性ショックにおける安全性と有効性についての評価を行っている。

iii) 冠動脈血管形成術、人工心肺充填液、術前希釈式自己血輸血あるいは溶血性貧血：それぞれに固有な特殊性を考慮して、臨床治験を行う必要がある。

血液事業において輸血における副作用を根絶することは最も重要な課題の一つである。様々な輸血副作用の中で血液中の病原体による輸血後感染症と白血球による同種抗原感作はその中心に位置する。より安全な血液を患者に輸血するべく、200ml全血採血から400ml採血へ、血小板についてはアフェレーシスによる高単位製剤へと転換がすすめられ、問診の強化、ウイルススクリーニング技術の進展、白血球除去フィルターの普及、放射線照射等、自己血輸血の奨励、血漿分画製剤における国内自給体制の推進とウイルス除去・不活化の導入等、より安全な輸血を目指し努力が続けられている。このように輸血副作用の予防とその原因の究明とに大きな努力がはらわれてきたものの、現在においても輸血副作用は皆無ではない。人工代替物は、従来の輸血の補充にあてられるのみでなく、この輸血副作用を完全になくしうる可能性を持つものとしての期待が大きい。血漿タンパク質の中ではリコンビナント製剤として凝固第VIII因子がすでに市販され、最近のシェア比は全体の28%（1995年1月）と高くなっている。他の血漿成分では活性化凝固第VII因子、凝固第IX因子、またアルブミンも将来そのリコンビナント製剤の使用が可能となろう。

一方血球成分では、赤血球の酸素運搬能を代替する人工酸素運搬体の開発がすすみつつある。止血、血栓に働く血小板の人工代替物も今その研究が始まられたという状況にある。造血因子等はすでに遺伝子組み換え産物が多種つくられ、rhEPO、rhG-CSF、rhGM-CSF等、骨髄移植や感染症治療にその使用はめざましい。最近発見されたTPO（トロンボポエチン）も血小板輸血のあり方に大きな影響を与えることが考えられる。

輸血の安全性を高めていく上で、人工代替物は単なる輸血の補充のみではなく、輸血副作用を完全に排除しうるものとしての期待が大きい。血液事業は人工代替物を取り入れ、その利点を生かしていくことにより、輸血をさらに安全なものにしていくことが可能となると考える。

適応病態とるべき代替物

小林紘一, 泉 陽太郎, 山畠 健
慶應義塾大学医学部外科

人工血液の有効性の評価—製造側への提言—

薄場 彰、元木良一
福島県立医科大学第一外科

【緒言】 血液の機能は多岐に渡り複雑であり、血球成分であれ、血漿成分であれ夫々の機能が高度に分化されている。それらの機能を同種血で補うのは簡単であるが、現在のところこれらを人工物で補填するまでには至っていないのが現状である。しかし、医学側、工学側および企業側が一致協力すれば血液の機能の全てというわけにはいかないが、一部の機能を人工物で代行できる時代が来ると思われる。血液代替物が開発された時の夢を、適応病態とるべき代替物という面から述べてみたい。

【考えられる血液代替物】

人工酸素運搬体として第一世代の perfluoroochemicals (PFC), 第二世代の修飾ヘモグロビンおよびヘモグロビン小胞体, 第三世代として全合成系の物がある。これらは事故などによる出血性ショック, 手術中の大量出血, 脳や心筋虚の血部位への酸素運搬体として, 潜水病や一酸化炭素中毒の治療, 消化管潰瘍や呼吸不全の治療, 体外循環の還流液, 臓器保存液, 腫瘍の増感剤や組織培養液などとしての使用が考えられる。錐状赤血球に対しては第二世代のものが使用された報告もある。

また recombinant albumin に recombinant hemoglobin あるいは合成したヘムを結合させれば全合成系の人工酸素運搬体を作成できる可能性がある。この場合膠質浸透圧も有することになり都合がよい。酸素運搬能力, 粘度や P_{50} をいろいろな病態に合うように調整しておくことも可能であろう。また全身投与だけでなく病態によっては部分的な還流も可能であろう。なおヘムまたはヘモグロビンの静脈内投与により血管内皮細胞由来弛緩因子である nitric oxide を不活分化することにより体血圧および肺動脈圧の上昇が認められるがこれを利用してショックの際の昇圧剤としようとするアイデアもある。さらに血小板についても反復輸注により抗原性のない, 止血機能を発揮できるような人工血小板も作成されつつある。

以上、解決されなければならない問題が多数あるものの血液代替物が開発された時の夢などについて述べた。

【目的】 1978以来perfluoroochemical(PFC)を研究し15例の臨床例を経験した。1989年以降はヘモグロビン小胞体の一種ネオレドセル(NRC)を中心に臨床応用を目指している。今回、PFC、修飾ヘモグロビン(MHb)、NRCの問題点を明らかにし、製造側への提言を試みた。

【人工血液の条件】 1.投与の条件①血管内へ投与可能。②血管内に一定時間滞留する。③大量投与可能。2.機能的条件①ガス交換能を有する。②変性せず安定している。3.安全性①役目を終了した後は速やかに代謝され排泄される。②組織や臓器へ沈着しない。

【人工血液の問題点】 1.投与上の問題:PFCは体内蓄積の懼れから大量に投与できなかった。MHbは血中滞留時間が短いのが最大の欠点で、さらに抗原性や毒性の問題も依然残る。NRCは最も問題が少ないが滞留時間がやや短い。2.機能的問題:PFCは酸素を溶解して運搬する性格上高濃度の酸素吸入が不可欠である。MHbはアロステリック因子の調整上P50の高値維持が困難だがNRCでは容易である。PFCは血中で不活性で全く変性しないが、MHbは変性しやすい。NRCも若干変性するが還元酵素を内包し還元能を有する。反面、NRCでは感染上の問題が残る。3.安全性の問題:PFCは体内蓄積が最大の問題である。一方、MHbは速やかに代謝され問題はないが、NRCではカプセルを形成する多量の脂質の蓄積が問題となる。

【提言】 PFCでは排泄性の良い素材の開発が必須である。排泄性と安定性は逆相関するので強力な界面活性剤の開発が必要となる。MHbでは血中滞留時間延長が最も望まれる。NRCは三者中最も欠点が少ないが滞留時間を延長するため、粒子径を $0.09\text{ }\mu\text{m}$ 程度に小さくする必要がある。また体内に蓄積する脂質量を減らすにはカプセル膜を薄くするか内部のHb濃度を高くする必要がある。そのためさらに強力な界面活性剤の開発が必要である。NRCのHb濃度は現在6.0 g/dlだが現在の性能を維持しつつ投与量を減らすには生理的なHb値の12g/dlまで濃縮する必要がある。感染予防の見地よりリコンビナントHb(rHb)の利用が推奨されるが、大量生産が困難で高価格が問題で解決が望まれる。

「獣医療での実証と寄与」

山根義久

東京農工大学農学部獣医学科

設計・開発における工学の役割と期待

大野弘幸

東京農工大学 工学部 生命工学科

血液代替物の開発に携わったこともなく、また、それらを獣医療で使用した経験もないで、本シンポジウムのタイトルには不適なシンポジストといえる。よって、このシンポジウムでは、今後における獣医療での血液代替物の適用の可能性とその応用範囲について述べ、獣医学領域において血液代替物の開発に寄与できる可能性と、獣医療における血液代替物の寄与する点について触れてみたい。

先ず始めの、獣医療での血液代替物の適用の可能性とその応用については、教育講演の抄録に述べた通りであり、人医領域とは異なった観点から、むしろその期待は大なるものがある。獣医療の現状は、血液の必要な時に必要なだけ輸血犬(猫)より採取し、全血あるいは成分輸血をしている。そのため、常時輸血犬(猫)を、快適な環境で飼育する必要があり、その実施のためにはかなりの経費を要することになる。さらに輸血時には、輸血の危険性の軽減のために、時間とスタッフを要して交差適合試験を実施する必要があり、設備とスタッフの充実した施設でないと実際に不可能であり、このことが大きく血液需要のブレーキとなっている。それに対し人工血液では、いつでも特別な検査もなく簡単に使用可能となり得る。血液代替物の開発実験には犬が多く用いられてきているが、犬の血球の脆弱性からみても、実験対象としては好適かと思われる。犬で成功すれば、人を含めた他の動物でもその適応性は高いと思われる。今後、常備可能で酸素運搬効率も高く、生体における安全性(血液凝固や免疫系、さらに発癌性、催奇形性)および機能などが確立されれば、血液代替物の獣医療における果たす役割は計り知れないものがあろう。

人工酸素運搬体に代表される血液代替物に関する研究は、時代の要請も高いことから、急速に展開が期待される領域である。しかしながら、血液は”流れる臓器”と呼ばれるように、複雑で精緻な分子集合体の完成された姿もある。従って、血液の全ての機能を代替する人工物は1ランク上の目標であり、今日では緊急時の生命維持に必要な特定の機能を代替できる姿を目標として多くの研究がなされている。

このような精緻な高次機能を現実のものとするには、”医”の持つ膨大な知識を利用しながら、”工”が分子レベルで設計したシステムについて、”医”と”工”で協力して機能評価を行うことが重要である。しかも、試行錯誤を繰り返しながら行うので、”産”的”のパワーをもって開発を支え、実用化レベルにまで引き上げる必要もある。望ましくはこれらの連携が並列に処理されることが重要であるため、医・工・産の3本柱によって支えられた大きなプロジェクトのスタートを期待したい。そのためには、厚生省、通産省、文部省などの省庁のこの分野の研究に対する深い理解と大きな期待、さらにはそれを現実のものとするための潤沢な研究資金が要求される。

3本柱の一つである工学の役割としては、分子レベルの機能設計のような”化学”の基礎に立った研究から、化学工学、流体力学、さらには生物物理や量子力学、情報工学など多岐にわたった学問体系の協力を得て、”合目的的ものづくり”に集約することが重要であろう。そのためには、各分野の専門知識の蓄積は勿論のこと、得られた情報の鮮度も重要になってくるであろう。最近のマルチメディアの発展は、過度とも言える情報の伝達に大きく関わっている。これを有効に利用することにより、物質(系)の設計は評価系からのフィードバックのレスポンスの良さも加われば、加速度を得て進展し、実用化されるものと期待している。

人工赤血球（NRC）の開発と展開

上谷利治（＊）、高橋晃（＊＊）

テルモ（株）

（＊）研究開発センター

（＊＊）マーケティング・グループ

重度外傷性ショックにおける血液代替物のニーズ*

篠沢洋太郎¹⁾、佐々木淳一²⁾、田熊清継¹⁾、土居正和³⁾、長島敦³⁾、奥沢星二郎³⁾、北野光秀³⁾、吉井宏³⁾、茂木正寿²⁾、相川直樹¹⁾慶應義塾大学救急部¹⁾、済生会神奈川県病院救急部²⁾、外科³⁾

評価委員会が組織され、テルモ人工赤血球(NRC)の評価を実施していただいていることに対し、まず謝辞を述べさせていただきます。

NRCはヘモグロビンの酸素親和性を低下させるために、IHPを用いることにより、赤血球としての保存期限を大幅に延長すると共に、ヘモグロビン当たりの酸素供給率を高めた結果、赤血球よりヘモグロビン濃度が低いにもかかわらず、イヌの高度血液交換実験では、心・肺循環系のパラメーターを正常化させ、ウサギショックモデルでは血圧や血中乳酸値の正常化、並びに尿閉からの離脱が同種血よりも有意に早いという結果を得ており、臨床での適応はショックでの有用性を第一義的に考えています。また、赤血球に比し、物理的な刺激による破壊を受け難く、粘度も低いことから、体外循環時の酸素運搬体として、優れているのではないかと考えています。評価委員会で実施していただいているショックや体外循環の実験で有用性が明確になれば、自信を持って展開できると考えています。

また、臓器保存に関しましては私達は検討しておりませんが、移植後の急激な酸素負荷によるreperfusion injury対策として、NRCを用いた常温還流保存が優れているのではないかと考えられ、評価委員会の検討結果次第で次の展開を考えています。

一方で、ウイルスや血液型物質の混入を始めとする品質面での問題や、リポソーム製剤から想定される網内系臓器や補体系への影響も重要な課題であるととらえており、評価委員会での客観的な評価結果を注目すると共に、評価委員会からの指摘事項があれば、規格等の変更も含めて、考慮していきたいと考えています。

これらの評価を受けた後、臨床へ進むことになりますが、原料の期限切れ赤血球の譲渡に関しては、研究用としての譲渡規程しかなく、業務用となる臨床試験では規程の改訂が必要となると伺っております。厚生省や日本赤の御理解が必要となって参りますので、学会のお力添えのほどもよろしくお願ひ致します。

外傷性ショック患者の基本的治療は、止血処置、血管内水分量の維持・酸素運搬能物質の補充である。今回、市井で発生する外傷性ショックにおける血液代替物のニーズ、有用性、問題点などにつき考察した。

[対象と方法] DOAを除く外傷性ショック患者15名(男13名、女2名、年齢32±21(SD)歳、交通外傷11名・刺創3名・転落1名、ISS30±20、生存9名・死亡6名)を対象とした。受傷後24時間の輸血量(transfused blood; TrBld)をもとめ、受傷より搬入まで; T(inj-arr)、搬入より輸血開始まで; T(arr-bld)、搬入より手術まで; T(arr-ope)の各時間、搬入時 shock score; SC(脈拍数/収縮期血圧)、初回採血時 base excess; BE、ヘモグロビン; Hbとの関係を検討した。

[結果と考察] 15名の平均TrBldは7670±6041ml(SD)で、死亡6例では13100±4285ml(8090~18370ml)であった。T(inj-arr)は31±10分、T(arr-bld)は113±81分、T(arr-ope)は130±38分で、T(arr-bld)はTrBldと負に相関し($y=463.97 \log x, r=0.71, p<0.01$)、重症例では短く、最短は45分であった。BEはTrBldと負に相関した($y=-0.62-0.00093x, r=-0.81, p<0.01$)が、SCは生存例ではTrBldと正に($r=0.56$)、死亡例では負に($r=-0.36$)相関する傾向がみられた。Hbは生存例ではTrBldと負に相関し($y=14-0.00033x, r=-0.80, p<0.01$)、死亡例では正に相関する傾向($r=0.74$)がみられた。すなわち死亡例は、搬入時すでに重症ショックであり、間質から血管内への体液移動も抑制されていたと考えられた。以上より、重度外傷性ショック患者の救命には、早期の止血および早期(救急車内)からの酸素運搬能とともに膠質浸透圧維持能かつ止血能を有する血液代替物の投与が必要であると考えられた。血液代替物は血液型判定・交差試験が不要であり、必要時即時使用可能である点で有用と考えられた。

[結語] 重度外傷性ショックの治療に、早期より投与可能な酸素運搬体は有用であろうが、血漿成分の質の考慮も必要であると考えられた。

NRCの出血性ショックにおける有効性

薄場 彰¹、元木良一¹、緒方嘉貴²、上谷利治²
 福島県立医科大学第一外科¹
 テルモ(株)技術開発センター²

【目的】Neo Red Cell(NRC)の出血性ショックに対する効果を検討する目的でNRCの動物実験成績とFluosol-DA(FDA)の動物実験成績及び臨床成績とを比較してた。

【方法】1.出血性ショック実験:体重10.0～13.0kgの雑種成犬10頭に静脈内麻酔後調節呼吸とした。動脈より40ml/minの速度で脱血し、収縮期血圧60mmHg以下の出血性ショック状態とし、直ちに同量のFDAまたはNRCを同速度で輸血した。以上の操作を3～5回繰り返した。FDAを5頭に、NRCを5頭に投与した。2.FDAの臨床例:急性大量出血9例にFDA900～1500mlを投与し循環動態及び酸素運搬能を検討した。3.長期生存実験:a.体重55～100kgのホルスタイン子牛8頭にFDA4000～7000ml（平均5800ml）を投与し長期に生存させ観察した。b.体重7.4～10.3kgのビーグル犬3頭にNRCで82～90%の血液交換後長期に生存させて観察した。

【成績】1.出血性ショック実験:血液効換率は両群ほぼ同程度であった。輸血後体血圧が低下し、末梢血管抵抗はむしろ低下し、心拍出量が増加して心室の仕事量が増加した。FDA群では右心負荷のため極めて不安定であったがNRC群では右室の仕事量の増加はあるものの循環動態的には安定していた。血液ガス分析ではFDA群ではPaO₂が著増し、更にPvO₂も増加したが、NRC群では両者とも正常値であった。即ちFDA群では高濃度の酸素吸入の結果PvO₂が上昇し共存する赤血球の酸素運搬能が著しく低下した。2.FDAの臨床例: FDAは全酸素消費量の30%を運搬していたのに過ぎず、しかも血行動態的にも極めて不安定であった。3..長期生存実験: FDA群では網内系臓器に大量に蓄積したがNRC群では早期に代謝されており問題なかった。

【結論】NRCでは高濃度酸素の吸入が不要でPvO₂が上昇せず、また循環生理学的に安定で心負荷を招来しなかった。またNRCでは全例長期に生存し投与されたNRCは速やかに代謝されており大量投与可能と思われた。以上よりNRCは出血性ショックに対する血液代替物として優れた性能を示した。

ネオレッドセル（NRC）の人工心肺下の酸素運搬能

泉 陽太郎、山畠 健、小林紘一、四津良平
 慶應義塾大学医学部外科

緒言：人工酸素運搬体の酸素運搬能の評価方法として、動物実験では脱血ショック状態に対するその有効性や交換輸血における循環動態の検討などが多数おこなわれている。しかし、いづれの場合も脱血あるいは交換輸血操作自体が心機能や肺機能に影響をおよぼすため、酸素運搬能の評価が困難となっている側面を有する。今回われわれは心機能は灌流量として、肺機能は酸素流量としてある程度任意に調節が可能となる完全体外循環下に人工酸素運搬体ネオレッドセル（NRC）の酸素運搬能の評価を試みたので報告する。

方法：体重10Kg前後の雄のビーグル犬を用いた。ペントバルビタールで静脈麻酔後気管内挿管、レスピレーター管理とした。麻酔はペントバルビタールと塩化スキサメトニウムの静脈内投与で維持した。胸骨正中切開下に上、下大静脈に脱血管、右大腿動脈に送血管を挿入した。大動脈、肺動脈幹を遮断して完全体外循環とした。灌流液組成はNRC1400mlにメイロン、マニトール、アルブミンを加えた。循環血液量の約75%を交換した後体外循環を開始した。灌流温度は38°Cとし、動脈血酸素分圧約300Torr、二酸化炭素分圧約40Torrとした。灌流量は40ml/Kg/minから150ml/Kg/minの範囲で変動させた。

結果：酸素消費量は約8.5l/min/Kgでほぼプラトーに達し、この時の酸素運搬量は約12l/min/Kg、灌流量としては約110ml/min/Kgであった。また犬のHb濃度は3.8±1.9（平均±標準偏差）、NRCのHb濃度は4.5±1.0で両者に有意差はなく、犬のHbとNRCのHbからの酸素消費量は各々3.1±1.3l/min/Kg、4.1±1.4l/min/Kgであり両者に有意差はなかった。

結果：本実験においてNRCは赤血球とほぼ同等の酸素を運搬したと考えられた。

酸素運搬能を有するコロイド溶液への期待

宮尾秀樹

埼玉医科大学総合医療センター麻酔科

人工酸素運搬体の脳虚血再灌流障害への応用について

椿沢和彦¹, 大関一¹, 諸久永¹, 江口昭治¹,
中島孝², 卷淵隆夫³, 成富博章⁴, 西浦美智子⁴, 宮下光太郎⁵

¹新潟大学医学部第2外科, ²国立療養所
犀潟病院神経内科, ³同神経病理, ⁴国立循環器病センター脳循環研究室, ⁵同脳内科

膠質浸透圧(COP)は晶質浸透圧に比べて約1/200と極めて小さいが血管内容量の維持に重要である。一般的に毛細血管内皮細胞はアルブミン(ALB)に対する半透膜でありCOPを発生するが臓器によりALBに対する透過性は異なる。肝臓の毛細血管はALBを自由に通過させ、腎臓の糸球体血管は水分の透過性が大きく、血液脳関門はALBどころかNaも自由に通過できない。ヘモグロビン(Hb)の血管透過性の問題はCOPを維持しコロイド溶液として治療上有利な性質を有する点と、血管外に漏出した場合、NOの阻害物質として働くために、血管収縮を起こすという2面性を持つ。筋肉の血管内皮細胞の細胞間隙は6-7nm、腎糸球体血管の穴が8nm、ALBの直径が6nmであるのに対して、ALBの血管外漏出は生理的には見られないことから、ALB漏出の制御は電荷の問題が大きいと言われている。糸球体基底膜は強い負電荷をもちアルブミンの負電荷と反撥しアルブミンの漏出を防いでいる。分子量64500のHbは分子量69000のALBより少し小さいだけであるが血管透過性は100倍大きい。修飾Hbの血中残存率が高いのは高分子修飾体の結合による分子量の増大効果だけでなく、負電荷付与効果によるもの大きい。一方、in vitroのCOPの測定系は、分画分子量1-3万の測定膜で測定している。これは単に穴の大きさだけで決まる浸透圧でありALBの100倍も血管透過性の高いHbのCOPを測定するのに果たして適当か?という疑問が残る。実際in vivoにおける膠質浸透圧は臓器別、病態別に大きく変化する。熱傷や敗血症ではALBですら血管外に漏出する。ALBや代用血漿剤と異なり、Hbの血管外漏出はNO阻害という点で全身性に大きな生理的変動を与える可能性がある。

最近Dupon社の開発したペントフラクションという代用血漿剤はハイドロキシエチルスター(HES)の一一種であるが日本で使われているHESに比べて数平均分子量で4倍の高分子(12万)であり、敗血症などの血管透過性の亢進した病態に対して、内皮細胞間隙をシールしてアルブミンの血管外漏出を防ぐと言われている。修飾Hbは近い分子量であるため同様の効果を期待できるかもしれない。

【緒言】我々は人工血液による血液置換により酸素運搬能を維持しながら血液成分を減少させることで脳虚血再灌流障害が軽減できると考え検討してきた。前回フルオゾールDA(FDA)による血液置換において砂ネズミの一過性脳虚血負荷後の神経細胞障害の軽減を示すことを報告した。今回はPHP66Eを用いて同様に実験しFDAの場合と比較することで脳保護の機序解明を試みた。【方法】砂ネズミを用いてPHP66Eによる血液置換を行い、5分間の両側総頸動脈閉塞による一過性脳虚血負荷モデル(桐野モデル)で脳保護効果の有無を検討した。神経細胞障害の判定は光顕で海馬CA1細胞を観察することで行った。また血液置換後に一過性脳虚血負荷する際の血球数を計測し、脳虚血負荷前後の脳血流量をレーザードップラーフlow量計で測定した。【結果】PHP66E置換による前処置では一過性脳虚血負荷後の海馬CA1細胞脱落の軽減を認めず脳保護効果は得られなかった。また脳虚血負荷時の白血球数はFDA置換群ではPHP66E置換群に比して増加し、脳虚血負荷前後の脳血流量はFDA置換群ではコントロールに比べ増加傾向が得られたがPHP66E置換群では減少傾向が得られた。

【考察】この実験条件下では血液置換後の酸素運搬能は両者とも全血よりも低く、また同程度と考えられた。よってFDAの脳保護作用機序としては脳虚血負荷時の白血球数が増加していくにもかかわらず脳保護が得られたこと、心筋虚血においてFDAの白血球に対する血管内皮接着阻害作用が報告されていることなどから白血球の脳血管内皮接着阻害作用による可能性が微小循環の改善とともに考えられた。またPHP66Eでは血中の一酸化窒素(NO)の消去作用が確認されており、これにより脳血流が減少して脳保護効果が得られなかった可能性もあると考えられた。しかし脳虚血再灌流障害においてNOが増悪因子であるとの報告も多くPHP66Eの投与法を変えることで脳保護作用を示す可能性もあり今後検討が必要であると考えられた。

交換輸血試験による Hb小胞体の酸素輸送に関する検討

酒井宏水¹、濱田健一¹、武岡真司¹、西出宏之¹、土田英俊¹
泉陽太郎²、山畑 健²、小林紘一²

¹早稲田大学 理工学部

²慶應義塾大学 医学部

【緒言】ヘモグロビン(Hb)小胞体を麻酔したラットに交換輸血した。赤血球や生理食塩水の投与も比較検討し、血圧、血液ガスパラメータ、更に腎皮質の酸素分圧の測定から、Hb小胞体の組織への酸素輸送に関する知見を得ることを目的とした。

【方法】Hb小胞体分散液の性能は、粒径:251±87nm、[Hb]:10g/dl、 P_{50} :32Torr、[metHb]:<3%、[HbCO]:<2%、pH:7.4、粘度:2.9cP(230s⁻¹)、Et:<0.5EU/ml。Wistar系ラット(雄、体重360-420g、23匹)にペントバルビタールナトリウムを腹腔内注射(1ml/kg)して全身麻酔。右内頸静脈から1ml/minずつ脱血、上大静脈より1ml/minずつ試料投与を反復、総血液量の約40%を交換した。左腎皮質に針型酸素電極(Intermedical社製)を刺入し、組織酸素分圧として測定。血圧(MAP)、血液ガスパラメータ(P_{O_2} 、 P_{CO_2} 、pH、塩基余剰(BE))、血小板数を併せ測定。Hb小胞体投与群(HbV群、n=7)に対し、対照群として20mMリン酸緩衝生理食塩水(PBS)投与群(PBS群、n=10)、ラット赤血球をPBSに分散させた溶液([Hb]:10g/dl)の投与群(RBC群、n=6)を実施。

【結果】HbV群はMAPは126±22mmHgから交換後93±23mmHgまで低下し、RBC群とほぼ同様であった。一方、PBS群では交換率とともに低下し、38±11mmHgに達した。左腎皮質酸素分圧は、麻酔下では22.3±2.8mmHgであった。HbV群は交換後16.7±3.2mmHgになり僅かに低下しているが、RBC群(17.2±1.6mmHg)と同様であった。PBS群は、9.2±3.1mmHgにまで低下した。全群で交換後 P_{CO_2} 、BEが低下した。交換後30分ではPBS群で更に代謝性アシドーシスが進行したが、HbV群はRBC群と同様に交換直後のpH値が維持された。血小板数に異常は認められなかった。

【結論】HbV群の血圧、腎皮質酸素分圧、血液ガスパラメータは、RBC群と同等に維持され、PBS群と有意な差が認められた。Hb小胞体がRBCと同等の酸素輸送能を有することを示唆している。

人工酸素運搬体(アルブミン-ヘム)の調製と特徴

川合宣行、小松晃之、安藤克利、西出宏之、
土田英俊
早稲田大学理工学部

【緒言】合成ヘムを利用した人工酸素運搬体が生体内で赤血球代替物として機能することを明らかにしてきた。今回、ヒト血清アルブミン(HSA)に結合させたヘム誘導体が、生理条件下(水相系、pH 7.4、37°C)で可逆的に酸素結合解離できることを初めて明らかにしたので報告する。このアルブミン-ヘムは、全く新しい型の人工酸素運搬体である。

【方法】軸配位塩基を分子内に共有結合したヘム誘導体(FeP)をHSA水溶液と混合した後、限外ろ過により濃縮してHSA-FeP溶液を調製した。得られた溶液は赤色均一の分散液であり、調製一ヶ月後でも沈殿、凝集などは全く認められない。分光測定から O_2 、CO親和性($P_{1/2}$)、結合解離速度定数(k_{on} 、 k_{off})を決定した。

【結果及び考察】FePがHSAに結合すると、HSAのトリプトファン残基(Trp²¹⁴)に由来する蛍光発光(λ :340nm)強度が減少する。FePの滴定からScatchard Plotを作成、HSAに対してFePが1/1で結合し、その平衡定数; $2.6 \times 10^6 M^{-1}$ を決定した。また、FePを結合させた後のHSAの物性は、結合していないものと同様である。FePのDeoxy体に O_2 を吹き込むと、可視吸収スペクトルは速やかに変化しOxy体を生成、その O_2 結合解離は可逆的であった。HSA-FePの $P_{1/2}(O_2)$; 24 Torr (37°C)は、赤血球の値($P_{1/2}(O_2)$; 27 Torr)とほぼ同等に調製した。 $k_{on}(O_2)$ は $2.4 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$ で、赤血球の値($k_{on}(O_2)$; 1.0×10^4)と比較して約 2×10^4 倍大きい。これは肺胞通過時間(約0.8s)内に十分 O_2 結合解離が達成できることを示す。FePをアルブミンへ結合することによって、生理条件下でも可逆的な O_2 運搬が可能となることを実証した。

また、リコンビナントアルブミン(r-HSA)を用いた全合成系人工酸素運搬体(r-HSA-FeP)が同様な O_2 輸送能を有することを明らかにしている。

低酸素親和性ヘモグロビン修飾体の作成 —ウシヘモグロビンを用いた酸素運搬体の開発—

仲井邦彦、小林由希、高橋恒夫、関口定美
北海道赤十字血液センター

【目的】人工的酸素運搬体開発はセルフリー型ヘモグロビン(Hb)修飾体として米国で第2相臨床試験の段階に進んだが、分子間架橋型を除くHb修飾体はコロイド浸透圧(COP)が高いためHb投与濃度が7g/dL程度に制限される。この1つの解決法として酸素親和性の低下による酸素運搬効率(OTE)の改善が考えられる。今回、ウシHb(HbBv)を原料としてpyridoxal 5'-phosphate(PLP)付加、polyethylene-glycol(PEG)修飾による低酸素親和性Hb修飾体の作成を試みたので報告する。

【方法】ウシ新鮮赤血球よりHbBv溶液を調製し、deoxy条件下PLP付加(PLP-HbBv)を行い酸素親和性を低下させた。このPLP-HbBvに対して、活性化PEGを加えることでPEG修飾PLP-HbBvを作成した。未反応成分除去と生成物の透析には分画分子量5万の限外ろ過膜を使用した。酸素親和性の測定はImaiらの方法により、また分子量評価はゲルろ過HPLCにより測定した。血中半減期はラット頸動脈より全血液量の20%相当量を5g/dLにて輸注し算出した。

【結果】ウシ未修飾HbのP50は24mmHgを示すが、PLP付加により53mmHgへ上昇した。その結果、動脈血酸素分圧95mmHgと末梢組織酸素分圧40mmHgの差から算出されるOTEは44%に上昇し、ヒト新鮮赤血球(23%)の約2倍を示した。血中滞留時間延長のためPEG化を施すとP50は44-48mmHgに減少し、OTEは37%を示した。血中半減期は未修飾Hb 1.5時間、PEG修飾後13時間であった。

【考察】今回我々が作成した酸素運搬体のP50値44-48mmHgは文献的に最も最も低酸素親和性のセルフリーHb修飾体であり、この方法でOTEを増大させることで、生理的COPの維持とあくまでも生体には異物である酸素運搬体投与量の減少に効果があると期待された。

ヘモグロビン修飾体による血管内皮細胞透過性の比較

仲井邦彦¹、小林由希¹、太田利男²、佐久間一郎³

高橋恒夫¹、北畠 順³、中里幸和²、関口定美¹

¹北海道赤十字血液センター、²北海道大学獣医学部薬理学、³北海道大学医学部循環器内科

【目的】セルフリーヘモグロビン(Hb)修飾体による酸素運搬体の開発が進められているが、動物実験及び臨床試験の結果から副作用として一過性の血圧上昇が起こることが報告されている。Hbによる血管内皮由来弛緩因子(EDRF)の不活化がその理由と考えられるが、その詳細な機序は明らかではない。前回、organ bath法によるウサギ大動脈血管標本を用いた実験で、未修飾Hb処理した標本ではACh依存性の弛緩反応が強く抑制されたことを報告した。この結果から、血管内皮細胞間隙を透過できるアルブミン(MW 69K)程度の分子量をもつHb修飾体は血管壁内に取り込まれEDRF不活化による血管収縮が起ると考えられる。そこで我々は各種Hb修飾体の分子量に注目し、分子量を増大させることで血管壁内への取り込みが抑制されるという仮説をもとに、培養血管内皮細胞系により分子量の異なるHb溶液の内皮細胞透過性の比較を行った。

【方法】ウシ血管内皮細胞を孔径0.4μmのコラーゲンメッシュ上に単層培養し、上層(仮想血管内腔側)にHb溶液を加え1時間培養し、下層(仮想基底膜側)への透過速度を求めた。

Hb溶液として、未修飾Hb(MW 64.5K) polyethyleneglycol(PEG)修飾Hb(味の素安定化ヘモグロビン、MW 90K<)、Hb-haptoglobin複合体(155K<)、ならびにLiposome Hb(粒子経約200nm、日本油脂)を使用した。

【結果】PEG修飾Hbの透過速度は未修飾Hbの1/6、PEG修飾Hbよりもさらに分子量の大きいHb-haptoglobin複合体は未修飾Hbの1/17の透過速度を示し、分子量を増大させることで内皮透過性は明らかに低下した。一方、粒子化されたHb修飾体であるLiposome Hbは内皮細胞に対して透過性を示さなかった。

【考察】未修飾Hb程度の分子量では血管内皮の細胞間隙等から血管壁内へ侵入し、血管組織内でEDRFを不活化するため著明な血管収縮が起こることが示唆された。Hb修飾体の電荷等を考慮する必要はあるが、HbのPEG化、liposome化は細胞間隙への取り込みを抑制し血管収縮作用をある程度軽減できるものと思われた。

ネオレッドセル(NRC)の特徴と性能

緒方嘉貴、後藤博、木村哲寛、岡本武、上谷利治
テルモ(株) 研究開発センター

【緒言】 Hemoglobin(Hb)に Allosteric Effectorとして Inositolhexaphosphate(IHP)、metHbの還元系として補酵素(NAD)、基質(Adenine, Inosine, Glucose)等を添加し共にリポソームにカプセル化した人工赤血球 Neo Red Cell(NRC)の開発を進めている。

【NRCの特徴及び性能】 NRCはHbの酸素親和性を適正化するために、人赤血球に見られる2,3-Diphosphoglycerate(2,3-DPG: Allosteric Effector)の代わりによりAllosteric効果の強いIHPを用いることで $P_{50}O_2$ をヒト赤血球の約26 torrよりも右方変移させ、約50-60torrに調整することで、酸素運搬率(動脈血の酸素分圧: 100 torr、混合静脈血の酸素分圧: 40 torrとしたときの酸素結合率の較差)を約30%~35%とヒト赤血球の約26%より高めた。さらに、臨床における出血ショック時のような高濃度の酸素を呼吸させるような条件下では酸素運搬率が50%以上となるような酸素運搬能を有している。また、赤血球の嫌気的糖代謝系酵素、metHb還元酵素をHbと共に必要な補酵素、基質と共にカプセル化したため従来のHbを用いた人工酸素運搬体で問題となっていたHbの酸素化つまりmetHbの生成を抑制でき、酸化抑制システムを組み込んでいないNRCに比較してIn-VitroでのmetHbの生成を1/3に抑制した。リポソームはその性質として血漿中では血漿タンパクの吸着などから凝集する傾向があり、凝集塊による栓塞の生成等の心配があつたが、NRCでは表面にPolyethylene glycoleを固定化し、タンパク等の吸着を抑えたため、血漿中での凝集を起こらなくした。また、予備的な安全性試験では毒性も低く、投与後の臓器等にも特に問題となるような変化は観察されていない、さらに免疫系に対する影響も少ないことが観察されている。

本報告ではこれらのNRCの基本的な性能と特徴について報告を行う。

ラット脳虚血エネルギー代謝を利用した人工赤血球の機能評価

濱崎直孝¹、上野恭司²、木村豪雄²、朝長正道²

¹九州大学医学部臨床検査医学講座、

²福岡大学医学部脳神経外科講座

(目的) 酸素消費量の多い脳組織のエネルギー状態は脳循環機能を鋭敏に反映するので「ラット脳虚血モデル」は赤血球の機能を評価する良いモデルになる(1, 2)。本研究は「ラット脳虚血モデル」を用いて人工赤血球の末梢循環能、酸素運搬機能の評価をするのを目的で行った。

(材料および方法) 人工赤血球はテルモ社のリポソームカプセル化ヘモグロビン(テルモ Neo Red Cell; NRC)を、対照物質として新鮮赤血球、保存赤血球、活性化赤血球、若返り赤血球、を用いた。Wistar系ラットより採血した血液を遠心し、血漿と白血球を除去し、赤血球添加液SAGMを等量加えたものを新鮮赤血球、同処理したものを4°Cで2週間保存したものを作成した。活性化赤血球はPEP賦活液(3)で処理した赤血球を用いた。自然発症性高血圧ラット(SHR)へ、それぞれの赤血球を約70%の比率で交換輸血を行なった後、両側の総頸動脈を結紮し脳虚血を作成した。結紮1時間後に脳をin situで凍結し取り出し、脳組織内のクレアチニン酸、ATP、ADP、AMP、乳酸を測定した。赤血球中のATP、2,3-DPGも測定した。各赤血球の酸素運搬効率は酸素解離曲線より求めた。脳血流量を頭頂部の硬膜上よりレーダードップラーにて連続的に測定した。

(結果) (1) 新鮮血をPEP賦活液で賦活化した活性化赤血球を交換輸血したラットは脳虚血にもかかわらず脳代謝は正常状態を維持出来ていた。(2) 酸素運搬能が低下している保存血を交換輸血したラットでは新鮮血の交換輸血に比して脳組織がより強い低酸素状態を示した。(3) 保存血をPEP賦活液で賦活化した若返り保存血の交換輸血を行なったラットでは、in vitroでの酸素運搬機能が上昇しているにもかかわらず、脳組織への酸素運搬能は新鮮血の交換輸血に比して劣っていた。(4) 人工赤血球NRCを交換輸血した場合は、in vitroでの酸素運搬機能が上昇しているにもかかわらず、脳組織への酸素運搬能は新鮮血の交換輸血に比して劣っており、ほぼ保存血並であった。その原因是脳血流が悪い事にあった。

文献

- 1) Yamamoto, M. et al. (1990) J. Neurochem. 54, 594-597
- 2) Kimura, H. et al. (1995) Stroke (in press)
- 3) Hamasaki, N. et al. (1983) Transfusion 23, 1-7

Perfluorochemical乳剤を用いた室温下灌流保護法による血流遮断下肝切除の実験的検討

高橋昌宏¹、柳田尚之¹、倉内宣明¹、岡野正裕¹、今井政人³、目黒順一¹、久木田和丘¹、玉置透¹、米川元樹¹、川村明夫¹
 札幌北楡病院 人工臓器・移植研究所 外科¹、
 北海道大学第一外科¹、旭川医科大学第二外科¹

【目的】近年、肝臓外科の進歩に伴い、血流遮断下肝切除が行われるようになってきたが、血流遮断時の肝の保護法が重要である。室温下灌流法は細胞の代謝をある程度維持させながら臓器保存を行う方法で、より理想的な保存法であるが、代謝を維持させるためには、酸素の供給は不可欠である。今回我々は、酸素運搬体であるPerfluorochemical乳剤を用いた室温下灌流保護法をブタの血流遮断下肝切除に応用し、その有用性について検討したので報告する。

【方法】体重15~20kgの雌ブタを用いた(n=5)。灌流液は細胞外液組成でpH 7.40、浸透圧320mOsmに調節した。酸素運搬体としてPerfluorochemical乳剤を3%の濃度で混入した。酸素化は膜型人工肺を用いた。全麻下に開腹後、門脈、肝動脈、肝上部・肝下部下大静脈を遮断し、直後、門脈よりチューピングし、上記灌流液で灌流開始した。肝下部下大静脈を切開し、約1Lの灌流液でWash outした後、同部にチューピングして灌流液を回収し、閉鎖回路として肝を灌流保存しながら、50%（右側2葉）肝切除施行した。肝切除後も灌流を継続し、計2時間灌流後、血流再開した。灌流量は100~150ml/分、灌流圧は20mmHgに設定した。この間、下大静脈、門脈血は右総腸骨静脈より下大静脈、脾静脈より門脈へ各々カニュレーションし、Y字管で連結してバイオポンプで外脛静脈に返血した。血流再開30分後、3週後に肝生検を行い、組織学的に検討した。経時的に採血し、肝機能、凝固因子等についても検討した。

【結果】術中は重篤な合併症を認めず、全例とも3週後に犠牲死させるまで生存した。GOT、LDHは術1日後に各々平均280(KU)、2,200(WU)と最高値を示したが、7日目に正常値に回復した。総ビリルビン、BUN、Crは全経過を通じて正常であった。HPT、AT-IIIは術1日後に最低値を示したが、3日後には正常値に回復した。組織学的(HE染色)には、再灌流直前で類洞の拡張が認められたが、再灌流30分後では改善されていた。また、肝細胞の構築は常に正常に保たれていた。以上より、血流遮断下肝切除術におけるPerfluorochemical乳剤を用いた室温下肝灌流保護法の有用性が示唆された。

Fluosol-DA(FDA)の異種心移植時超急性拒絶(HAR)抑制効果と病理形態学的検討

和田誠之¹、村上博宣¹、梶原博毅²、松浦雄一郎¹
¹広島大学医学部第一外科、²同保健学科

[目的]近年、フッ素化合物(PFC)系人工血液の血液代替物としての有用性は薄れつつある。一方、FDAはPTCA時の虚血再灌流障害の軽減効果や頭頸部悪性腫瘍の放射線感受性を増強させる効果等が認められ、新たな使用用途が注目されている。我々は、FDAの免疫抑制効果に着目し、異種discordant心移植(XDTp)モデルに投与して、HAR抑制効果を証明し得、この効果の病理形態学的検討を加えた。

[方法]Wistar rat 頸部にGuinea Pig心臓をCuff法にて異所性移植するXDTp動物実験系で、移植30分前に試験薬剤を投与した。無処置(I群)、ラセボ投与(II群;生食5μl/g BW)、FDA投与(III群;5μl/g BW)で移植心拍動持続時間と病理形態学的变化を検討した。

[結果]I, II群で移植心は15分で拍動停止したが、III群では3時間以上も心拍動を保った。病理形態学観察を行い、III群の光顕像ではI, II群で生じた冠動脈内多発血栓像を認めなかつた。さらに透過電顕像で血管内皮細胞形態は保持され、内皮の傷害性反応と血小板血栓形成性反応の抑制が認められた。

[結語]1)FDAはXDTpにおけるHAR抑制効果を持することを見出した。2)FDAはXDTpに伴う血管内皮細胞障害、血栓形成性反応を抑制し移植心拍動を維持していた。3)この実験系はHAR機序解明に有効なモデルになると考えられた。

常温下体外循環灌流液としてのNRCー部分・完全外循環実験ー

薄場 彰¹、元木良一¹、緒方嘉貴²、上谷利治²
 福島県立医科大学第一外科¹
 テルモ(株)技術開発センター²

重合性リン脂質を利用した人工赤血球（ARC）のメト化抑制

栗井浩二、遠藤さおり、矢野嘉宏、守沢和也、赤間和博、中野善郎、佐藤征
 日本油脂(株)筑波研究所

【目的】ネオレッドセル(NRC)の体外循環灌流液としての効果を検討する目的で雑種成犬を用い心拍動下に部分体外循環実験を行い、さらに心停止下に完全体外循環実験を行った。

【方法】1.部分体外循環：体重10kg前後の雑種成犬を用い心拍動下に外頸静脈脱血、大腿動脈送血の部分体外循環を37℃の常温下に60分間行った。回路内にNRCを充填したNRC群とHESを充填した対照群とを比較した。体外循環中は呼吸を停止し、送血量は50～100ml/kg/min、酸素流量は送血量×3とした。2.完全体外循環：雑種成犬12頭で大動脈遮断し上下大静脈脱血、大腿動脈送血の完全体外循環を37℃の常温下に7時間施行した。回路内にNRC1000mlを充填した8頭をNRC群としHESを充填した対照群4頭と比較した。経時的にモニターし循環動態、酸素動態、血液生化学検査を測定した。

【成績】1.部分体外循環：灌流開始直後より心拍数が減少し動脈圧が低下した。両群とも末梢血管抵抗の著明な減少が観察され、心室一回拍出仕事量指数は増加したが心室分時仕事量指数は灌流前値の約1/3に減少した。同一ヘモグロビン濃度で比較するとNRCは赤血球の約2倍の酸素を運搬していた。灌流終了後は脈拍数も術前値に復しどくに異常は認めなかった。2.完全体外循環：NRC群では動脈圧が極めて低値で血管抵抗は対照群の約1/4にすぎなかった。一方対照群では次第に浮腫が出現し、血管抵抗が上昇して3時間以上の灌流継続は不可能であった。酸素配達量では両群とも8ml/kg/minと常温での酸素需要を満足したが、酸素消費量ではNRC群では5ml/kg/minを満足したが対照群では不十分だった。乳酸値もNRC群は対照群より低値であった溶血も軽度だった。

【結論】HESで希釈した対照群では3時間を越える体外循環そのものが継続不可能だった。一方NRC群では血管抵抗が低下して循環が容易となつたばかりか常温での酸素需要を満足する充分量の酸素を末梢組織へ供給していた。

【緒言】演者らは、重合性リン脂質を含有する脂質二重膜で精製ヘモグロビン(Hb)をカプセル化したリポソームタイプの人工赤血球(ARC)の開発を進めている。リポソームタイプの人工赤血球の利点として、生理条件下でHbの高濃度化が可能である、種々のエフェクターを同時に内包できる等が挙げられる。しかしながら、リポソーム化Hbは、Hb溶液と比較してメトヘモグロビン(MetHb)の生成が促進されることが報告されている。今回、ARCのメト化抑制について検討を行ったので報告する。

【方法】リン脂質/コレステロール/脂肪酸(脂肪酸ナトリウム塩あるいはリン脂質ナトリウム塩)をモル比7/7/2の割合で混合した混合脂質を用いてHbをカプセル化し、γ線照射により重合を行いARCを調製した。調製したARCは37℃にてインキュベートし、MetHb生成率を経時に測定した。MetHb生成率は、Soret帯の吸収スペクトルにより算出した。

【結果】脂肪酸を含有する系のARCは、Hb溶液と比較して約8倍のMetHb生成率を示した。これに対し、脂肪酸ナトリウム塩あるいはリン脂質ナトリウム塩を含有する系のARCは、脂肪酸を含有する系と比較して、MetHb生成率を約60%抑制した。

ネオレッドセル（NRC）の物理化学的特性

濱田健一、荒瀬慎哉、酒井宏水、
武岡真司、西出宏之、土田英俊

早稲田大学 理工学部

【緒言】赤血球代替物 Neo Red Cell (NRC)の溶液物性や酸素運搬特性などについて工学的見地から解析する。具体的には、NRCの粒径分布や構造、成分組成、酸素結合解離特性、met化率を測定するとともに、NRCの特徴であるpolyethyleneglycol (PEG)による表面修飾の効果について、rheologyや分散度の測定から確認する。

【方法】Hb、リン脂質、cholesterol、PEG-PE濃度については従来法も含めて検討し、(生)化学分析、spectrum測定から定量した。粒径及び分布は、光散乱法(Coulter N4SD)と透過型電子顕微鏡を用いて測定した。酸素結合解離曲線は、Hemox Analyzer(CTS Medical Instruments)にて測定した。met化率は、NRC非破壊でSoret帯におけるdeoxyHbとmethHbの吸光度比から算出した。NRC溶液の粘度は、回転粘度計(VS-KA, 芝浦システム)を用いて37°Cで測定し、dextran(6%, Mw.40,000), hydroxyethylstarch(HES, 6%, Mw.70,000), albumin (5%)、或は血漿を添加した系についても粘度および濁度変化を測定した。

【結果】NRCは界面活性剤であるTriton X-100の添加で破壊され難いため、Hb濃度はNRCをそのまま原子吸光にて鉄の定量から求め、cholesterol濃度は、cholesterol oxidase-p-chlorophenol法にsodium dodecyl sulfateの処理過程を入れることにより正確に測定できた。測定値はロット間での多少の相違はあるが、粒径は180~200nmを中心を有しており、Hb/Lipid比は0.8程度、粘度は230s⁻¹で3~4cP、P₅₀は60Torr程度であった。表面をPEG修飾したNRCは分散安定度が高く、代用血漿や血漿添加時の粘度は、修飾していない小胞体の同条件の場合と比較して半分以下の上昇に留まった。

【結論】NRCは構造的に安定であるため、従来の測定法をそのまま使用できない場合があり、工夫を要した。NRCはHb/Lipid比が低く粘度は比較的高値を示したが、代用血漿や血漿の存在下でのPEG修飾効果は、粘度や濁度測定から確認できた。

血小板増殖因子

Thrombopoietin (TPO)

畠 清彦

Kiyohiko Hatake

昨今いくつかのグループにより、トロンボポエチンと言われる蛋白をコードする遺伝子がクローニングされ、いくつかの血液関係の国際学会でもトピックスとしてとりあげられている。一体どこのグループ、バイオテクノロジーの会社が特許を握ったのか、という興味もさることながら、臨床応用を待ちわびる血小板減少患者の事を考えると注目せざるを得ないであろう。そこで本稿では現在までにわかっている血小板増殖、巨核球増殖に関与する因子について紹介する。研究や臨床開発に関する方々のお役に立てば幸いである。

30年以上前より血小板産生についても、赤血球産生や顆粒球産生と同様に、液性因子による制御が考えられ、多くの研究者たちがこの因子について精製による同定を試みてきた。しかし適当な出発材料がないこと、活性の測定方法に恵まれなかつたことから途中で挫折をして繰り返していた。しかしこの因子の周辺でいくつかの発見があり、それはやはり液性因子の存在を確信させるものであった(1)。

c-mplという遺伝子によってコードされる受容体遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを添加すると、選択的に巨核球のコロニー形成のみを抑制することからこのc-mplという受容体構造蛋白に対するリガンドが存在するだろうと推定された。恐らくこの時点で10以上のグループ、バイオテクノロジーの研究者たちが挑戦していたと思われる。

c-mplの遺伝子が先にクローニングされていたことから、このc-mpl cDNAの産物を用いていくつかの方法により精製がなされた。これらの方の一つ一つの詳細は避けるが、概略はこの因子の特性をもよくとらえており、触れたいと思う。

c-mpl リガンド(TPO)の精製

手がけていたグループにより精製及びクローニングの方法は異なるが、二つのグループが正攻法で精製に成功した。

まずGenentechのde Sauvageらは、ブタに放射線照射をした後に血小板減少症を作成し、その血漿を大量に用いて、Phenyl-Toyopearlカラム、Blue-Sepharoseを用いて体積を大幅に減らしたあと、MplのcDNAで発現させた蛋白をIgGにカップリングさせた

アフィニティーカラムクロマトグラフィーで最終精製し、SDS-PAGEで単一バンドであることを確認し、N末端からのアミノ酸配列が26個決定された。あとは定石通りであるが、ブタcDNAライブラリーから、アミノ酸配列に相当するオリゴヌクレオチドプローブによりブタのMplリガンドのcDNAが得られ、その後ヒトのgenomic DNAライブラリーからあらためてヒトのMplリガンドのcDNAが得られた（以後TPOと略する）(2)。

Kirinの宮崎洋らは放射線照射によって血小板減少を呈したラット1,100匹から正攻法で生化学的に数段階の精製を行い、N末端を決定、その後定石通りクローニングに成功している(3)。

AmgenのBartleyらは、c-mplの119番目から135番目のペプチド配列を合成し、ヘモシアニンとカップルしてウサギに免疫してまず抗血清を作成し、アフィニティーカラムで精製した。マウスmplのcDNAのうち、483番目にトリプトファンで翻訳が停止するDNA配列を挿入して、受容体構造のうち、細胞外ドメイン部分の蛋白を作成し、精製した(4)。

Wheat germ agglutinin、イオン交換、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィーを用いてイヌの血小板減少させた血清から精製したところ、25 kd, 31 kdの二つの蛋白が得られ、双方ともにN末端のアミノ酸配列は同一であることが決定された。

ZymoGeneticsのLokらは、まずmpl遺伝子をBaF3という細胞に遺伝子導入しておき、これを2-ethylmethanesulphonate(EMS)でさらにtransformationを起こし、その中から自己増殖的に増殖する細胞株を得た。その中にInterleukin-3やinterleukin-4に対する中和抗体では増殖抑制が起こらず、約60万個のクローンの中からmpl遺伝子導入細胞株の増殖する因子を発現しているmplリガンドを分泌したクローンが単離された(5)。

このようにいくつかのグループが正攻法の血漿からの精製から、mpl遺伝子の産物のうち細胞外ドメイン部分をIgGなどにカップルしたものを用いてアフィニティーカラム作成によって精製したもの、BaF3細胞にmpl遺伝子を導入しておいて突然変異をわざと起こさせた細胞から、cDNAライブラリーからスクリーニングしてクローニングした研究所などがある。この他に私信ではあるが数ヵ月遅れて同じプロジェクトで進行していてクローニングした会社も多い。

Mplリガンドの構造

cDNAは1774ヌクレオチドからなっており、332個のアミノ酸

からなる成熟した蛋白をコードしている。Genbankにおけるデータベースから配列を比較すると、先にクローニングされているエリスロポエチンとN末端側で23%の相同性がある事がわかった。さらに部位によっては50%の相同性が保持されている所もあることが判明した。4つのシステイン残基のうち1番目と4番目がdisulfide結合を作り、この存在は機能の保持に必須である(2)。詳細な遺伝子の構造については現在も解析が進行中であり、他の遺伝子にもいえることであるが、後になればなるほど詳細になって改められるであろう。TPOには、6つのN-linked glycosylation siteが予測されており、全部C末端側に存在している。レクチンアフィニティカラムに結合することからTPOは糖鎖が結合していることは間違いないと思われる。ゲル濾過クロマトグラフィー上は60kdに流出することから、全部が糖鎖結合する可能性が考えられる。

エリスロポエチンでは糖鎖結合していないものは生体内半減期が短い事が知られているが、活性は同様に存在する。TPOでもこのアナロジーを考えると、やはり分子自体の安定化や半減期を長くすることに役立っていると考えられる。異なっていると考えられるのはエリスロポエチンは腎主体で産生され、また肝での産生が次であり、作用部位は胎児肝から成人では骨髄へと変化していくわけで、分泌されやすい、もしくは流血中で移動しやすい分子型をとることが赤芽球産生に最も有利と考えられる。ではTPOではどうであろうか？TPOは主に肝で産生され、胎児肝では造血細胞と同一部位に存在し、他に筋肉での発現も認められており、血小板減少のシグナルの本質は何かというと、赤血球産生とは大きく異なっていることが予想されている(6)。

さらに遺伝子の構造の項で述べるが、活性がないと考えられるTPOに極似した物質も同様に発見していることもわかり、この物質がTPOとmpl(TPO受容体)との間の作用の制御に関与している可能性も想像される。

TPO遺伝子の構造

この項では現在最も新しい論文である、Changらのものを参考にしたい(7)。言うまでもなく、遺伝子の構造は最終的に判明するまでもう少し時間がかかると考えられる。ヒトTPO遺伝子は、7つのエクソン、イントロンからなる8kbのDNAである。蛋白は第3エクソンから第7エクソンの部分によってコードされており、染色体3q26.3の部分にマップされる(8-10)。ヒト胎児肝からさらに2つのvariant formのcDNAが単離されている。これらは別のグループからの結果では少なくともmplのtransformantであるBa/F3-mplでは、生物学的活性が認められない(9)。この物質が、differential splicingによる違いであることは間違いないが、受容体への競合阻害などの機序で作用の調節をしているのかどうかについては今のところ不明である。mRNAは1.8kbでNorthern blot解析では、主として肝に存在し、弱いが他に腎臓、筋肉でも検出される。マウスでは心臓、脳、脾にも認められている。蛋白自身は他にエリスロポエチン類似構造部分と、C末端側との間にArginine残基があり、この部分に蛋白分解酵素が作用する可能性が高く、この構造から、エリスロポエチン同様、前駆体から何らかの切断を受け、成熟体のTPOができると考えられている。Truncated formでも生物活性のあることもわかっている(11)。

TPOの生物学的作用

in vitroの作用

まずmpl遺伝子導入された細胞で、DNA合成を刺激し増殖させることは当然であるが、単独でも、もしくはinterleukin-3と相乗作用を有して巨核球コロニーの形成を促進し、これはmpl遺伝子に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの添加により特異的に巨核球コロニー形成を阻害することからもTPOは主として巨核球コロニー産生に作用していると考えられる。また巨核球の大きさを増大させたり、ploidyの増加、2Nから16N中心から64N中心の血小板特異的な表面マーカーの出現を誘導する(8)。ヒトCD34陽性細胞においても、液体培養系で巨核球細胞の産生を促進し、これはmplの細胞外ドメイン部分を発現させた蛋白で吸収されることから直接作用と考えられる。

マウスではAA4⁺Sca⁺

AA4⁺CD34⁺, Lin^{lo}Sca⁺などで精製した幹細胞をTPOで培養すると、液体培養やmatrigel内で偽足状の突起を出し、proplateletの形成も認められた(12)。これは電顕でもα顆粒の存在やミトコンドリアの存在など巨核球の特徴も有している。

in vivoの作用

BALB/Cマウスに毎日腹腔内にTPOを50μg注射すると、7日後に血小板数が4倍に増加し、ヘマトクリット管で血小板が観察されるくらい増加が著明である。マウスを解剖すると、骨髄、脾臓で巨核球が著明に増加している。血小板数増加の程度は、前投与としてinterleukin-3やinterleukin-6, interleukin-11, stem cell factorのどれかを投与しておくと、さらに増強される。interleukin-3やstem cell factorをin vitroで先に与えておくと巨核球コロニー数や大きさがむしろ小さくなることから幹細胞の早い段階に作用するより、晚期に作用すると考えられている(13)。TPOの投与ではマウスでは白血球数は変化せず、軽度の貧血を来す。

血小板をめぐる臨床病態との関連

血小板増加を伴う白血病

急性骨髓性白血病のうち、TPO遺伝子が局在していると判明した染色体3q26の異常を伴う例や慢性骨髓性白血病のうち巨核球性急性転化ではt(3; 21)(q26; q22)を呈し、3q26領域にはzinc finger proteinで癌化に関与しているEVI1というオンコジーンも局在しており、転座の相手側である21q22には、AML1遺伝子が存在している。血小板増加を来すのはTPO遺伝子の発現制御がinversionもしくは転座により阻害されていると想像される。

血小板減少

Amgenのグループはすでに血小板減少患者におけるTPO血清濃度を測定しており、ほとんどの特発性血小板減少紫斑病や、再生不良性貧血、放射線照射による血小板減少や化学療法後の血小板減少患者では、血小板数回復以前にTPO値が高値になっており、病的状態において血小板減少がTPOで制御されている可能性が高いと考えられる。

本態性血小板增多症(essential thrombocythemia)や、これまでに血小板増加を来すとされていたinterleukin-3, granulocyte-

macrophage colony-stimulating factor, interleukin-6, interleukin-11などの投与後にTPOはどう動くのかも興味深い。

TPOの臨床応用

白血病に対する化学療法後の血小板減少

通常、血小板30,000/mm³以下で出血傾向があると考えられる場合、濃縮血小板などの血小板製剤が投与される。急性骨髄性白血病では寛解導入療法、地固め療法後に約1~2週間は30,000/mm³以下が持続するので、最も良い適応となるだろう。ヒトでの臨床治験はまだまだであるが、血小板製剤が24~48時間しか保存できないことから血小板産生を刺激するサイトカインが一刻も早く望まれている。しかし一方で、幹細胞がなくてはいくら外からTPOを入れても血小板数増加は認められないであろう。

再生不良性貧血、骨髄異形成症候群

これらは幹細胞自身の数の減少や分化成熟の障害が存在し、幹細胞自身が非常に著減した状態ではG-CSFやエリスロポエチンに反応しない事から、TPOでも同様に反応しない事が考えられる。そのためこの2つの疾患では、なるべく軽症~中等症のうち使用することが重要ではないだろうか?

特発性血小板減少紫斑病

自己免疫性であるので、治療の基本は免疫抑制剤か副腎皮質ホルモン剤である。しかし一方で脾臓摘出をしても両薬剤を用いても無効例のある事は事実で、是非応用されるべき疾患群であろう。

TPOの考えられる副作用

当然の事ながら血小板が増加しすぎた場合を考えられるが、これはある程度dose dependentであろうから臨床治験の段階から加減が可能である。むしろ恐れるのは日本で必要とされている正常人、健常成人における第1相試験である。脳血栓症や肺血栓症、心筋梗塞症などの重篤な血栓症が誘発される可能性もあり、実施にあたっては注意が必要である。

また未だ血小板機能、たとえば凝集能や血小板因子放出能、TGF産生などに対する作用も不明である。反復投与される場合もありうるわけで生体の免疫能などに対する影響も検討が必要である。エリスロポエチンと構造上相同性があり、赤血球産生にも影響を与える可能性が示唆される。interleukin-6やinterleukin-11のようにC-reactive protein (CRP)を著増、血栓症や低カリウム血症、心房細動粗動などの副作用も、TPOの場合にもおこりうるのかどうか不明である。

最近、factor V Leidenやactivated protein Cの欠乏により、もしくはplasminogen異常症などにおいて冠動脈血栓や脳血栓、肺血栓が、また女性では黄体ホルモン剤などを経口避妊薬として用いる間の静脈血栓症が多発していることが注目されている。このような素因のある人にTPOなどを投与した場合の危険も考えなければならない。以上の点を注意した上で早い臨床応用が望まれる。

TPOの血液代替物としての将来

血液代替物として最も具体化されているのは、ヘモグロビンで

あり赤血球製剤の代替としての応用が考えられている。ではTPOではどうであろうか? 血小板は赤血球よりも構造自体が単純化されても、内部に多くの生理活性物質が含まれ、血管内皮や他の凝固因子、線溶系蛋白やコラーゲンなどと接触した時におこる活性化が非常に起こりやすくなっている。簡単には抗体代替体がつくられるとは思えない。しかしサイトカインには予想以上の作用が存在する事も事実である。例えばG-CSFの投与により全ての系統の血球改善が認められる症例の存在すること、G-CSFの受容体が血小板に存在すること、出血傾向が改善されること、などは予想外の作用である。今のところ、TPO、エリスロポエチン、GM-CSFでも細胞内シグナル伝達の経路は恐らく同様であろうとする報告が多い。

これまでに血小板増加作用を有すると報告してきたサイトカインに以下のものがある。

Interleukin-1 ヘモポエチン-1とも言われ、期待されたが日本での臨床治験でも副作用ばかりが目立っており、血小板への作用も無効であった。

Interleukin-3 マウスのinterleukin-3が真の幹細胞増殖も促進することからヒトでも期待された。一部の症例で有効例が報告されている。しかし骨髄異形成症候群、再生不良性貧血へ単剤での応用は日本では中止された。抗腫瘍剤投与後の白血球減少、血小板減少には良好な結果が出ている。

Interleukin-6 マウスでのin vivoの成績が血小板増加を来ており、将来性が高いと考えられた。これも再生不良性貧血、骨髄異形成症候群へは少数例で有効例が認められたものの、単独での臨床治験は打ち切りとなった。化学療法後の血小板減少には欧米でも平行して進行中である。ちなみにinterleukin-6のknock out mouseでは血小板減少は来さなかった。

Interleukin-11 現在日本で臨床試験が進行中である。interleukin-6と同様にdose dependentに発熱、CRPの上昇、fibrinogenの上昇の他に、脳血栓や心房細動粗動が報告されている。今のところ骨髄異形成症候群や再生不良性貧血患者で劇的効果が認められたという報告はない。

これらはTPOが期待されすぎて、他のサイトカインの臨床治験が思うように臨床でエントリーが進んでいない。私見であるが、今のところまだ骨髄異形成症候群、再生不良性貧血も単一の疾患ではなく症候群でもあり、多くのサイトカインが利用できる方が良いのではないか?

M-CSF 我々はM-CSF使用時に血小板回復の促進された症例が観察されたことから、M-CSF非投与コースと投与コースにおいて同じ化学療法を施行し、比較したところ、1,600万単位を14日間投与した群の67%に、血小板製剤の投与節約、血小板5万/mm³以下の血小板減少期間の短縮が認められた。大量投与ではむしろ血小板減少する事が報告されており、量によってサイトカインネットワークが動くと考えられる。

Megakaryocyte Stimulating Factor (MSF) 接着因子の一つであるビトロネクチンと相同性の高い遺伝子が、骨髄移植後回復患者の尿から精製されクローニングされた。非常に大きな分子であり、発現に困難を来たしたようであるが、私自身非常に興味持っている。

血小板は先に述べたように、数は少なくとも、むしろ機能があれば良いと考えられるような構造であるから機能を亢進させることを自由に制御できると面白い。

さらにサイトカインでもデボ製剤、リポソーム化など長期に作用したり、作用部位での局所濃度が増強できるような製剤の開発を望みたい。

文献

1. Metcalf D. Thrombopoietin at last. *Nature* 1994;369:519-20.
2. de Sauvage, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gwney AL, Spencer SA, Donbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang W-J, Oles KJ, Hultgen B, Solberg Jr LA, Goeddel DV, Eaton DL. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoietin by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994;369:533-8.
3. Sohma Y, Akahori H, Seki N, Hori T, Ogami K, Kato T, Shimada Y, Kawamura K, Miyazaki H. Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietic gene. *FEBS Letters* 1994; 353:57-61.
4. Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li Y-S, Lu HS, Martin F, Chang M-S, Samal B, Nichol JL, Swift S, Johnson MJ, Hsu R-Y, Clogston C, Hsu E, Hokom MM, Hornkohl A, Choi E, Pangilinan M, Sun Y, Mar V, McNinch J, Simonet L, Jocobseu F, Xie C, Shutter J, Chute H, Basu R, Selander L, Trollinger D, Sieu L, Padilla D, Trail G, Elliott G, Izumi R, Covey T, Crouse J, Garcia A, Xu W, Del Castillo J, Biron J, Cole S, Hu M C-T, Pacifici R, Ponting I, Saris C, Wen D, Yung YP, Lin H, Bosselman RA. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 1994;77:1117-24.
5. Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Bwkhead SK, Krammer JM, Bell LK, Sprecher CA, Blumberg H, Johnson R, Prumkard D, Ching AFT, Mathews SL, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Osporn SG, Evans SJ, Sheppard PO, Presnell SR, O'Hara PJ, Hagen FS, Roth GJ, Foster DC. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 1994; 369:565-8.
6. Lok S, Foster DC. The Structure, biology and potential therapeutic applications of recombinant thrombopoietin. *Stem Cells* 1994;12: 586-98.
7. Chang M-S, McNinch J, Basu R, Shutter J, Hsu R-Y, Perkins C, Mar V, Suggs S, Welcher A, Li L, Lu H, Bartley T, Hunt P, Martin F, Samal B, Bogenberger J. Cloning and characterization of the human megakaryocyte growth and development factor (MGDF) gene. *J Biol Chem* 1995;270:511-4.
8. Alexander WS, Dunn AR. Structure and transcription of the genomiclocuencodig murine c-Mpl, a receptor for thrombopoietin. *Oncogene* 1995;10:795-803
9. Gurney AL, Kuang W-J, Xie H-M, Malloy BE, Eaton DL, de Sanvage FJ. Genomic structure, chromosomal localization, and conserved alternative splice forms of thrombopoietin. *Blood* 1995; 85:981-8.
10. Foster DC, Sprecher CA, Grant FJ, Kramer JM, Kujper JL, Holly RD, Whitmore TE, Heipel MD, Bell LA, Ching AFT, McGrane V, Hart C, O'Hara PJ, Lok S. Human thrombopoietin: Gene structure, cDNA sequence, expresstion, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:13023-7.
11. Wendling F, Maraskovsky E, Debili N, Floirndo C, Teepe M, Titeux M, Methia N, Breton-Goiris J, Cosman D, Vainchenker W. c-Mpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature* 1994;369:571-4.
12. Zeigler FC, de Sauvage F, Widmr HR, Keller GA, Donahue C, Schreider RD, Malloy B, Hass P, Eaton D, Mathews W. In vitro megakacyopietin and thrombopoietic activity of c-mpl ligand (TPO) on purified murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1994;84: 4045-52.
13. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Brondy VC, Lin N, Baiky MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS, Roth GJ, Papayannopoulou T, Foster DC. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differetiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 1994;369:568-71.
14. Vainchenker W, Debili N, Wendling F. Mpl ligand (thrombopoietin) and the regulation of megakaryopoiesis. *Focus on Growth Factors* 1994;5:6-12.

NRCの製造と量産化の展望

後藤博, 緒方嘉貴, 鈴木一比好, 上谷利治

Large scale production of Neo Red Cell

Hiroshi Goto, Yoshitaka Ogata, Kazuhiko Suzuki, Toshiharu Kamitani

我々は高濃度のstroma-free hemoglobin (SFH)を内包したリポソームタイプの人工赤血球Neo Red Cell (NRC)の開発を行っている。製品化には大量調製が必須の要件があるので、NRCの調製工程の改良と量産化の検討を行った。NRCの調製で最も重要な工程はヘモグロビン (Hb)・脂質の乳化、分散であるが、Microfluidizer (Microfluidics社)を用いることにより、Hbの回収率(40%以上)、カプセル化効率 (Hb/Lipid (w/w), 1.6以上)とも良好な結果が得られた。またNRCの保存試験では酸素運搬能が2年以上維持され、NRC粒子の安定性が保たれていることが示された。

We have developed the liposome encapsulated high-concentrated stroma-free hemoglobin (SFH): *Neo Red Cell (NRC)*. To achieve the manufacturing of the NRC, we improved the preparation process and studied the large scale preparation. The emulsification of hemoglobin with lipid was the most important process to prepare the NRC. We achieved the high recovery of hemoglobin (>40%) and high encapsulation efficiency (Hb/Lipid (w/w), >1.6), and we successfully prepared the NRC without damage of hemoglobin and enzymes by emulsifying with Microfluidizer (Microfluidics Corp.). The oxygen transport ability and the average size of NRC were not changed over 2 years during the preservation at 4°C. —**Key Words:** Hemoglobin, Liposome, Stability, Microfluidizer.

1. 緒言

人工酸素運搬体であるNRC (Neo Red Cell)は、抗原抗体反応、血液型合わせ、長期保存性等から、臨床で使われる赤血球の問題となる点(1)を補う為に開発された。NRCの大きな特徴は、ヒト赤血球中に存在している2,3-diphosphoglycerate (DPG)に代わりに、inositol hexaphosphoric acid (IHP)を添加することで高い酸素運搬能を付加し、ヘモグロビン (Hb)のメトHb還元系機構を復元させることによりメトHbの生成を低く抑え、リポソーム膜の表面に修飾処理を行っているため血漿中で凝集を起こさない点にある。低粘度・微小粒子径も特徴の一つであり(2)，それにより微小循環系での流動性も高められている。しかしNRCは赤血球のように変形能を持たないため、血管内の流動性を考慮して粒子径を赤血球の約40分の1に設定したため、同じ体積分率の分散液では、赤血球に比べてHb量が低くなることは免れない。これを補うために、リポソーム内のHb濃度を赤血球内Hbの濃度の約1.36倍に高めてある。そのためNRCの調製は濃厚なSFHを調製する工程(3)とそれをリポソームで包むリポソーム調製工程からなり、乳化工

程、精製工程において高度な技術が必要である。この様な濃厚なHbを用い、かつ、粒径分布の均一なリポソームを調製するためには大きなエネルギーが必要であり、従来の技術では酵素系へのダメージは免れることは出来なかった。しかし、今回我々は比較的小さなエネルギーの搅拌とMicrofluidizerを組み合わせて乳化処理を行うことで、酵素系に対してダメージを与えることなく粒径の揃ったリポソームの調製法を確立した。

2. 方法

2.1. NRCの調製(4)

SFHの調製工程

日本赤十字社由來の期限切れ濃厚赤血球製剤からHbを調製した。Fig. 1に示したように、生理食塩水でRBCを遠心洗浄し、Packed RBCを浸透圧ショックで溶血させ、粗大なstromaを遠心で落とし、0.2 μm フィルターで残存stromaを除去した。血液型物質等の除去に分画分子量30万(PLMKセルロース、日本ミリポア)の限外濾過を行い、血液中にある発熱性物質を除去するためにパイロジエン除去フィルター(ポジダイン、日本ポール)で処理した。Hb溶液中の酵素を残して塩、低分子物質等を除くために透析を行い、炭酸水素ナトリウムでpHを7.4に調整して、最後に限外濾過膜で45%まで脱水濃縮した。

テルモ(株)研究開発センター, 〒259-01 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500. R&D Center, TERUMO CORPORATION, 1500 Inokuchi, Nakai-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa, 259-01, Japan.

論文受付 1994年6月17日, 再受付 1994年8月15日, 受理 1995年3月1日。

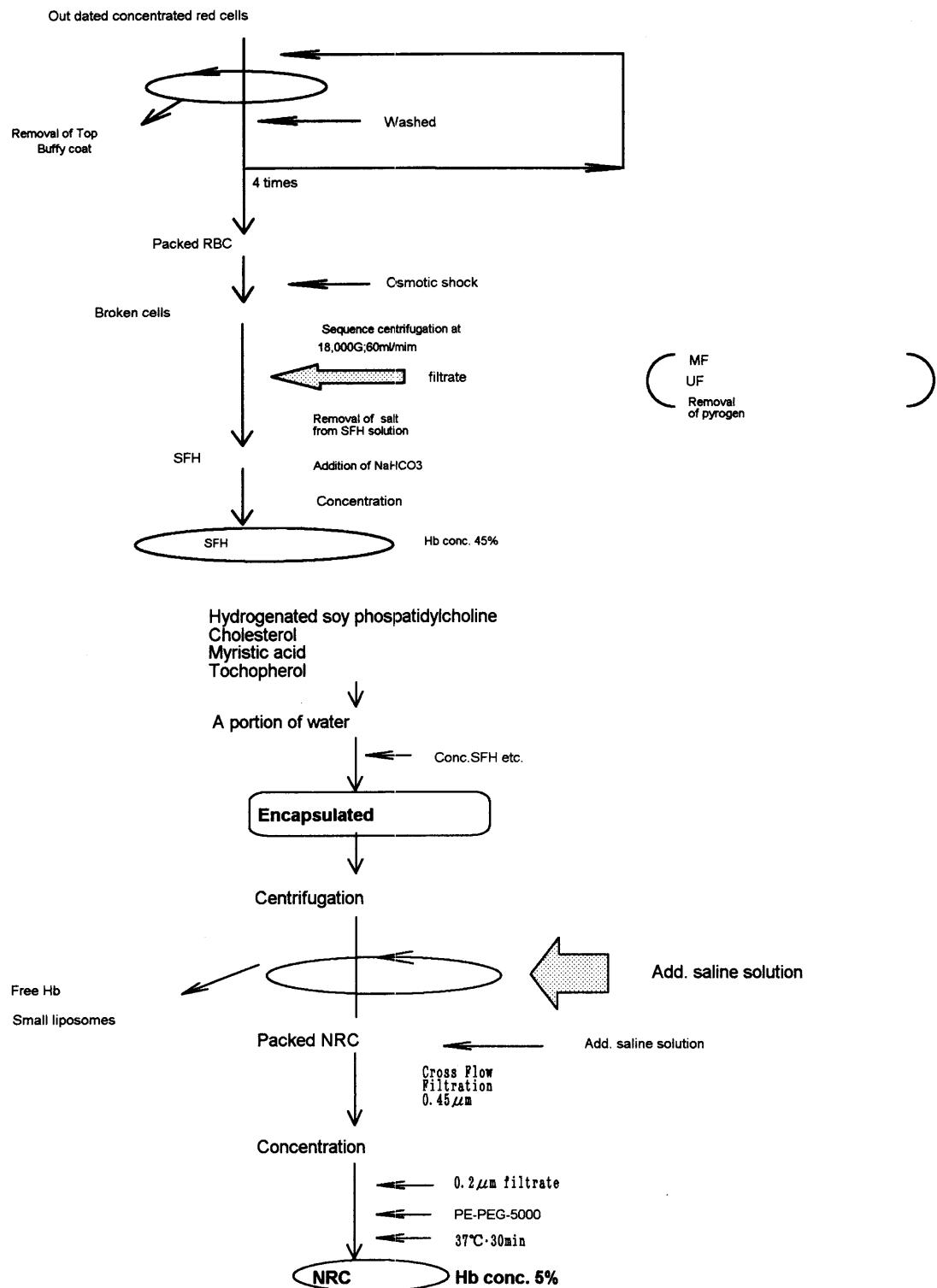


Fig. 1. Preparation of NRC.

2.2. SFHのリポソーム化工程

SFHのリポソーム化工程は濃厚なSFHをリポソームで包む工程、カプセル化されなかったHbを除去する工程、フィルターによる粒径制御の工程、NRC分散液のHb濃度を調製する工程、リポソームの膜表面を修飾する工程からなる(Fig. 1)。リポソームに用いる脂質は、soybean phosphatidylcholine(PC), cholesterol(CHOL), myristic acid(MA), α -tocopherol (TOC)であり、7:7:2:0.28のモル比で均一に混合した。混合脂質とアロステリックエフェクターのIHP等を加えた濃厚SFHを乳化機で乳化処理した。乳化処理後の工程は精製工程であるため、この乳化処理によってNRCのカプセル化効率、平均粒子径、回収率がほぼ決定される。遠心工程では粒子の安定性を阻害すると考えられるリポソームの微小粒子を除いた。続いて、濾過による粒子径制御工程で0.45 μm 以上の粒子を除き、限外濾過膜でNRCをHb濃度5 g/dLまで濃縮した。最後に自社開発したリポソーム表面修飾剤 PE-PEG-5000をNRC分散液に添加し、37°Cに加温することによって膜表面に導入し、これの排除体積効果により血漿中のNRCの凝集防止処理を行った。

行った。

3. 実験

3.1. NRC調製における乳化機の選択

Ebaremildar(荏原製作所)、T.K. Azihomomixer(特殊機化工)、Waring blender(Waring社)、Microfluidizer(Microfluidics社)(6)について乳化処理後の平均粒子径、カプセル化効率、Hb回収率、Hbのメト化率を測定し、量産機の選出と操作方法について検討した。Ebaremildarはラインミキサーで、循環タイプの乳化機である。4°C以下の冷却水をジャケットに循環させ、12,000 rpmの回転羽で乳化する。Azihomomixerは側面をかきとるmixer(50 rpm)と高速で回転するmixer(10,000 rpm)の2つの攪拌羽で乳化する。4°Cの冷却ジャケットによってサンプルを冷却した。Waring blenderはカップの底の攪拌羽が約15,000 rpmで回転して乳化し、3分処理毎に10分間の氷冷水(0°C)による冷却を行った。Microfluidizerの乳化は乳化処理液の液-液衝突によるエネルギーによる。冷却管を通しての冷却に加えて自社で改良を加えたインターラクション

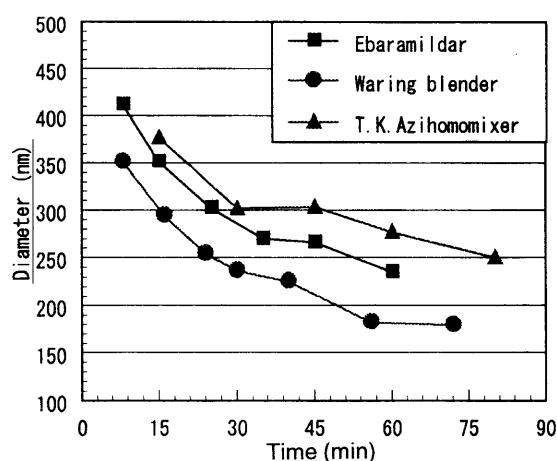


Fig. 2. Influence of time and number of recycle on liposome size.

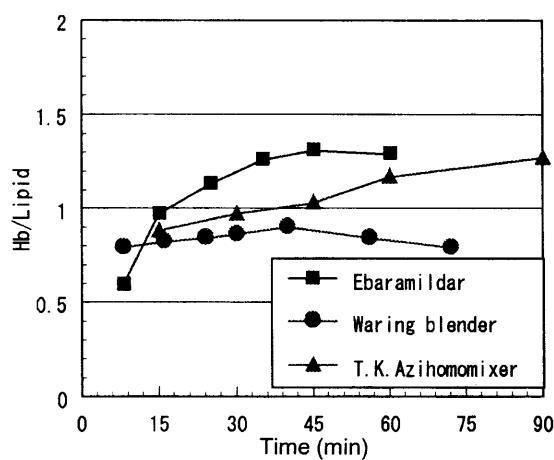


Fig. 3. Influence of time and number of recycle on the efficiency of hemoglobin encapsulation (Hb/Lipid).

チャンバーおよびバックプレッシャーモジュールの直接冷却装置にてサンプルの温度は4°Cに保った。Waring blenderを除く3機種は何れもスケールアップ機の用意がある。

3.2. NRCの長期安定性について

NRCを4°Cで1年以上保存し、酸素解離曲線の測定、動的光散乱法による平均粒子径(DLS-700, 大塚電子)、フリーHb量の測定等を経時的に行った。

4. 結果

4.1. NRCの乳化工程

Microfluidizerを除く乳化機は処理時間で、Microfluidizerは処理回数で、調製されたNRCの物性値が変わる。それぞれの乳化機で調製したNRCの物性値をFig. 2からFig. 5に示した。攪拌タイプの乳化機ではWaring blenderの乳化能力が最も高いが、Microfluidizerは、一回の処理でリポソームの平均粒径が約250 nmまで小さくなっていることがわかる(Fig. 2)。Fig. 3で示したよ

うにHbのカプセル化効率はマイルダーが比較的高い値を示しているが、Microfluidizerも一回の処理で約1.3[Hb/Lipid](フィルター処理前)を示した。Hbの回収率についてはAzhomixerを除き、どの乳化機も約30%以上の回収率が可能であることがわかった(Fig. 4)。乳化機によるリポソーム内包物の損失の指標として乳化後のHbのメト化率を測定した。Fig. 5に示したようにEbaramildar, Azhomixerは処理時間によらずHbのメト化の増加が少ないことがわかった。Waring blender及びMicrofluidizerは処理時間、処理回数とともにHbのメト化が進んだ。

4.2. NRCの長期保存性

酸素解離曲線の測定からP50および酸素運搬能(oxygen transporting efficiency, OTE)が得られるが(Fig. 6)、その値は2年以上ほとんど変化がない(Fig. 7)。また粒子径についても安定で、カプセル化したHbの漏出もほとんどない。Table 1に平均的なNRC物性値を示した。また、NRCの長期保存実験から、NRCの特徴の一つである保存性については、酸素運搬能、粒子の安定性につ

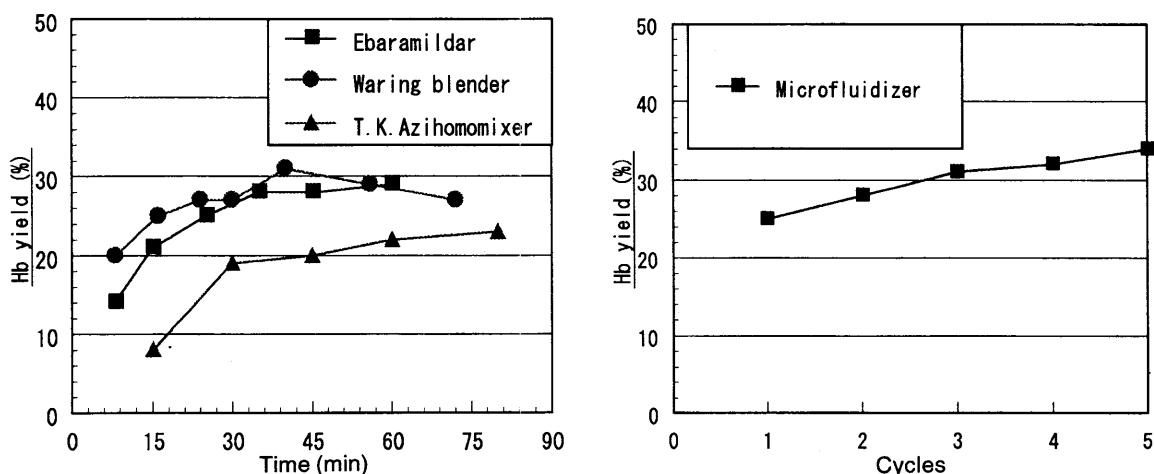


Fig. 4. Influence of time and number of cycles on encapsulated hemoglobin yield.

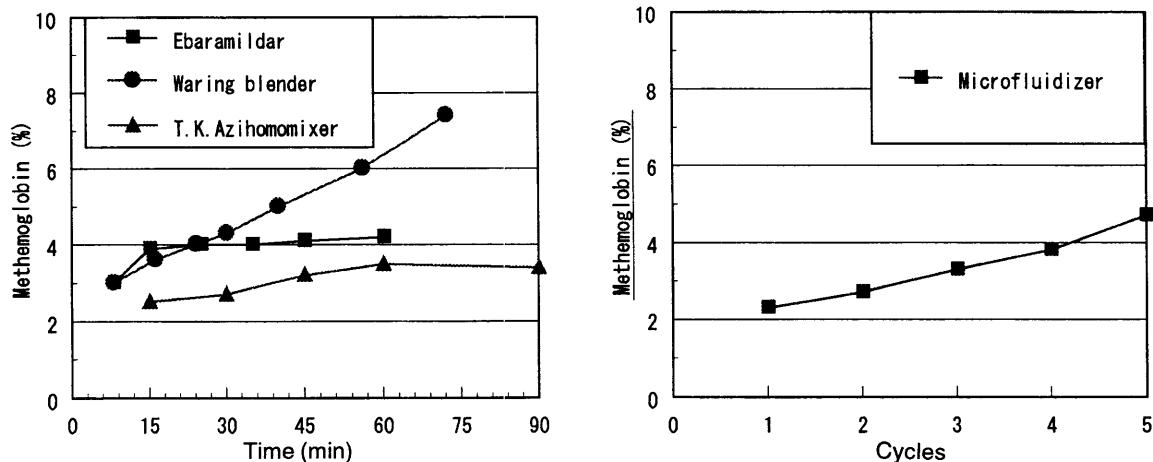


Fig. 5. Influence of time and number of cycles on methemoglobin content.

いて問題無いことがわかった。今後は大量調整を行い、適用の拡大と安全性について進めていく予定である。

5. 考察

NRCの調製に適する乳化機の条件はカプセル化効率、Hbの回収率が高いことと、乳化処理後の工程でNRC回収率を上げるために200 nm程度の均一な粒子径リポソームを作り、Hbのメト化率、SFH中の酵素の失活を最少限度に抑えることである。Ebaramildarは乳化が緩和で量産化に対応したカプセルスケールアップ機の用意もあり、比較的高いHb回収率、カプセル化効率のNRCを作ることができるが、リポソームの粒子径が小さくなりにくいのが欠点である。AzihomomixerはHbの回収率に問題があることと、実験に用いたタイプではサンプルの粘性による負荷が大きく回転ムラが生じていたため、攪拌エネルギーが小さいと考え

られる。実験室スケールの調製では比較的高いエネルギーで乳化するWaring blenderが適するが、高いエネルギーの為、Hbの酵素を失活させてしまうと推測される。Microfluidizerによる乳化では、不均一な状態での直接的な乳化には適さないという欠点があるため、均一化という前処理を行ったところ、一回の処理で平均粒子径が約250 nmになり、Hb回収率、カプセル化効率も高い値を示した。更に前処理を低いエネルギーで行うことでHbのメト化の進行及び酵素系へのダメージを比較的小さく抑えることが可能であると考えられる。このようにMicrofluidizerが他の3種の乳化機と異なり、比較的大きなエネルギーを加えているにも関わらず、Hb、酵素系の活性を損なわないのは乳化液と乳化処理圧に原因があると考えられる。Microfluidizerの乳化処理後液は、ある処理条件(処理液・処理圧等)でチキソトロピーを形成してゲル化すると推測される。このゲル化によって、熱エネルギー

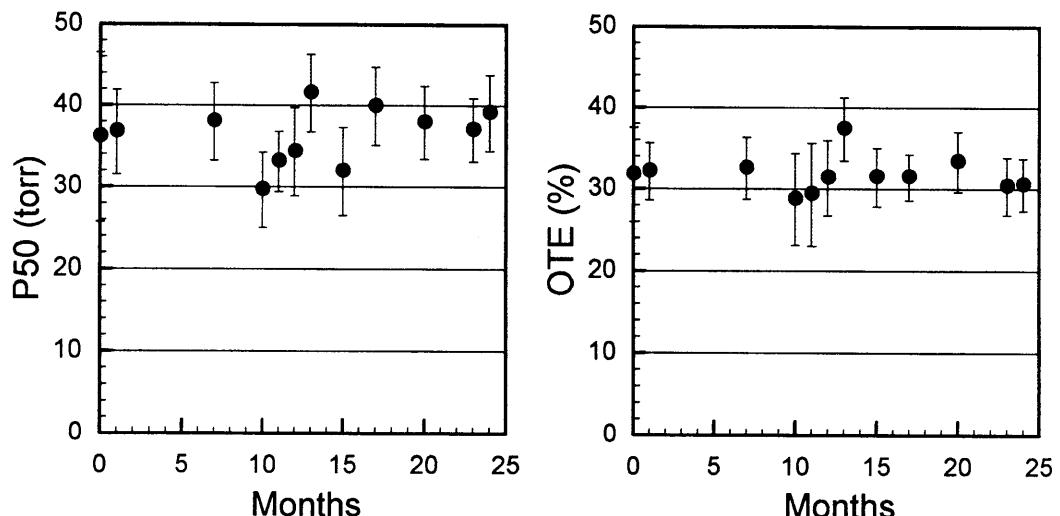


Fig. 6. Changes in P50 and OTE during storage in liquid state (4°C). P50: the partial pressure of oxygen at which Hb is half saturated. OTE: oxygen transporting efficiency. Mean \pm SD.

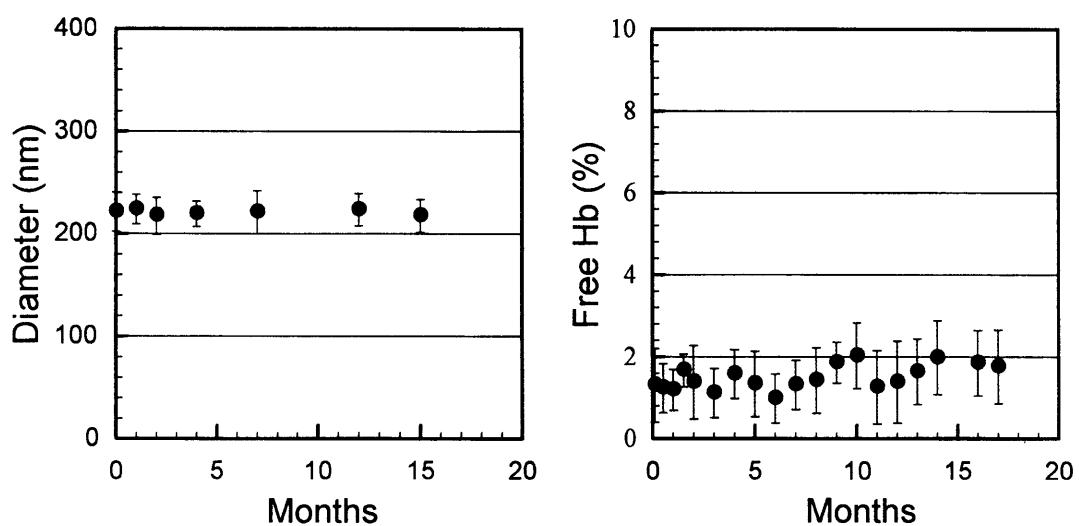


Fig. 7. Particle size and hemoglobin leakage during storage for years (4°C). Mean \pm SD.

Table. 1 Characteristics of NRC suspension

Hemoglobin (g/dL)	5
Total lipid (g/dL)	2.8
[Hemoglobin]/[lipid]	1.8
Packed volume ratio (%)	20
Methemoglobin content (%)	< 1
Diameter (nm)	200±30
P50 (torr)	46
Hill coefficient	1.9
OTE (%)	33

が減少するために、酵素系の失活が少ないものと考えられる。上記のデータに加えて乳化に要する処理時間と処理能力、無菌管理等の操作性を考慮し、実際のNRC調製ではフィルターによる粒径制御の工程があることを踏まえなければならない。総合的にはMicrofluidizerによる乳化が最も好ましいと考えられる。

大量調製ではHb回収率が高いことが必須であるが、現在は乳化処理の条件、特に処理液(SFH)の粘度、混合脂質の水和水の量

脂質濃度等)の設定により、乳化から濾過までのHb回収率を40～50%、カプセル化効率を1.6 [Hb/Lipid]以上(さらにカプセル化効率の高い、3.0 [Hb/Lipid]程度のNRCも調製可能であるがHb回収率が20%低度に低下してしまう)にすることが可能になったが、NRC回収率とカプセル化効率をバランス良く向上させる技術については更に検討が必要であると考えられた。

参考文献

1. 日沼頼夫. 輸血とウイルス感染—日本の現状 日本輸血誌 1985; 31:205-6.
2. 鈴木一比好、宮内雄二. 人工血液の開発. 機能材料 1990;10:43-9.
3. Deloach JR, Sheffield CL, Spates GE. A continuous-flow high-yield process for preparation of lipid-free hemoglobin. Anal Biochem 1986;157:191-8.
4. 鈴木一比好. リポソームを用いた人工赤血球. Bio Industry 1992; 9:290.
5. Vivier AJ, Vuilleardo JC, Ackermann HC, Poncelet D. Large-scale blood substitute production microfluidizer. Biomater Artif cells Immobilization Biotechnol 1992;20:377-97.

H · E · A · D · L · I · N · E · N · E · W · S

ヘモグロビン修飾体は敗血症のリスクを高めるか?

セルフリー型ヘモグロビン修飾体が敗血症に対するリスクを高めるとのレポートがLancet (1/21/95, p158)に報告された。Elwyn Griffithsら (the National Institute for Biological Standards and Control in Hertfordshire, UK)によるマウス (strain記載なし)での実験によると、分子間重合型ヘモグロビン修飾体を30 mg静注後1時間後もしくは3時間後にE coli (018K1, 103 cells)を腹腔接種した24時間後の致死率はそれぞれ100%, 80%となる。一方、未修飾ヘモグロビンでの致死率は50%, 0%であり、明らかな差が見られるという。また、重合型ヘモグロビン投与後は末梢血中の細菌数が顕著に増加する。Griffithsらは重合型ヘモグロビン修飾体は血中滞留時間が未修飾ヘモグロビンに比べ長く、そのためにより重篤な敗血症を招いたと考察しており、他のヘモグロビン修飾体、例えば2-nor-2-formylpyridoxal-5'-phosphate (NFPLP)重合ヘモグロビン(Netherlands Red Cross)などにも同じ現象が見られるだろうと推測している。ただし、敗血症そのものを招く理由について、何らかの免疫抑制が生じる、ヘモグロビン自体が細菌の栄養素となる、などが考えられるものの明らかではないという。

一方、Griffithsらにより具体的に指摘されるかたちとなったWim K Bleeker ら(Central Laboratory of Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service)は即座に追試を行い、Lancet (4/1/95, p863)に反論を載せている。12匹のCBA/JマウスにpolyHbX1 (NFPLP修飾Hb, 15 mL/kg, Hb濃度記載なし)を投与し、1時間後にGriffithsらより供与されたE coli (8 x 103 cells)を腹腔接種した。対照は未修飾ヘモグロビンではなくヒト血清アルブミンであったが、敗血症は再現できず、各種臓器中に見い出される細菌数も両群間に差がなかったという。Griffithsらと結果が異なる点について、実験に用いたヘモグロビン修飾体の純度 (Griffithsらのヘモグロビン修飾体は未修飾ヘモグロビンを13～30%含む)、マウスのstrainの違い、その他の実験条件による差とも考えられるが、結果があまりにも食い違うとコメントしている。

(文責 編集委員会 仲井)

獣医領域における組み換えEPOの応用と問題点

Application and problem of recombinant human erythropoietin in veterinary medicine

大石明広

Akihiro Oishi

1. はじめに

エリスロポエチン(EPO)が赤血球造血の重要な調節因子であることは長く知られていることであるが、獣医血液学や獣医内分泌学ではこのホルモンについての強い関心が引かれていなかった。そのため、獣医学臨床領域においては、EPOに関する詳細な生物学的知識の乏しさを招くこととなり、血中EPO値測定を臨床的に実施するのにも困難な状態となり、さらにはEPO製剤による治療的干渉が有効とされるような病獣のEPO欠乏状況についても十分な理解が得られていない現状となっている(1)。近年、遺伝子組み換え技術によりヒト・EPOが単離・合成されたことにより、EPOの調節特性や生物作用についての一層の分子生物学的知見が得られるようになり、加えて獣医領域にも臨床応用が現実的なものとなっている。しかしながら、ひとくちに臨床応用といっても、このリコンビナント・ヒト・EPO(rhEPO)はまだ決して安価に入手できるものではないため、経済性を問題とする産業動物(ウシ、ブタなど)の臨床には現実的ではなく、もっぱらイヌ、ネコなどの伴侶動物にその応用が限られている。

2. イヌやネコのEPO

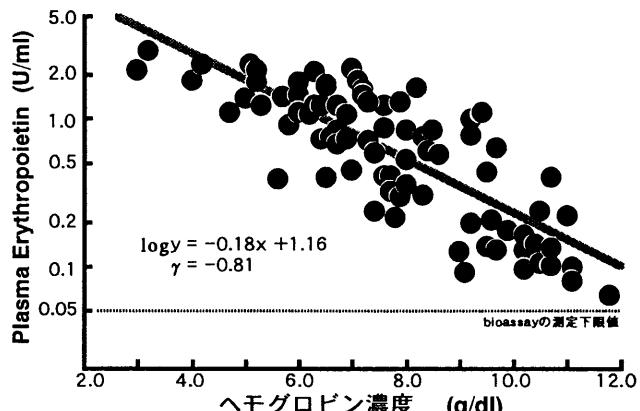
2.1. EPOの測定

EPOの測定は、そのホルモン活性を測ることによるbioassayあるいはEPO抗原を検出するimmunoassayにより行われる(2)。In vivo bioassay(多血症マウスassayとして知られている)は、すべての哺乳動物において高い信頼性をもってEPOを測定することが可能であるが、大変な手間とコストを要するためほとんど実施されない現状にある。また、in vitro bioassayについてはその信頼性に問題が残されているため定性的に行われるに過ぎない。むしろ、獣医領域においてもヒトと同様にimmunoassayが広く普及しつつあるといえる。このimmunoassayはEPO分子上にある抗原決定因子を特異抗体(ヒトEPOに対する抗体)によって検出するものであるが、哺乳動物の種差間における免疫交叉性には一定性がないようである(3)。例えば、アムゲン社により供給されるELISAに使われているEPOに対するモノクローナル抗体は靈長類にのみ特異性があつてイヌやネコのものとは交叉性がみられないとされている(1)。また、粗精製のヒト尿中EPOに対してウサギに免疫して得た

鹿児島大学農学部獣医学科畜外科学教室, 〒890 鹿児島市郡元1-21-24,
Department of Veterinary Surgery, Faculty of Agriculture, Kagoshima University, Kagoshima 890, Japan.

抗血清を用いたRIAによって測定したところ、イヌの血清EPO値は測定可能であったが、ネコのEPOを認識することができなかつたとする報告もある(1, 4)。これとは別に、ネコの血清EPO値をRIAで測定した報告もみられる(5)。このように、動物種によってimmunoassayにはまだいくつか問題が残されているようである

(a) 腎不全を伴わない貧血犬の血漿EPO値



(b) 腎不全に関連した貧血犬の血漿EPO値

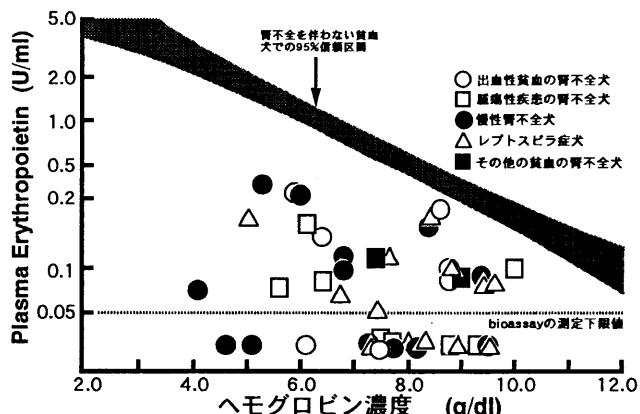


Fig.1. 貧血犬の血漿EPO値。(a)腎不全を伴わない貧血犬(出血性貧血、腫瘍性貧血、ピロプラズマ症、その他の貧血を含む)では、血漿EPO値とヘモグロビン濃度との間に高い負の相関性が認められる。一方、(b)腎不全を有する貧血犬では、血漿EPO値は低下し、EPO欠乏状況がうかがわれる。

が、イヌやネコの臨床データは徐々に集積されつつあり、病態下における実際の内因性EPOの変動を加味したうえでrhEPOを臨床応用できる状況となってきた。

2.1. 貧血と血中EPO

貧血と血中EPO値との重要な関連性はイヌやネコにおいても十分に認識されていることであるが、臨床的にはEPO濃度の変動性について今なお調査が進められている。RIAにより測定した種々のタイプの貧血犬の血清EPO濃度についてまとめた調査結果においては、正常な腎機能を有する貧血犬すべてにみられた血清EPOの指標関数的な増加程度はヒトの貧血患者のものと同程度の傾向にあり、血清EPOレベルとPCVとの間には負の相関性が成立することが示されている(1)。また、猫白血病ウイルス感染によって引き起こされる赤血球無形成のネコにおいても血清EPO値の上昇が認められているが、この場合の血清EPO値と網赤血球数との間には相関性が認められていない(6)。さらに、これもヒトでの報告(7,8)と同様の結果と解釈されるが、再生不良性貧血のイヌでは最も高いEPOレベルが観察され、腫瘍性疾患関連の貧血犬ではEPO産生反応がやや鈍くなることが示されている(1)。

非尿毒症性の貧血とは対象的に、慢性腎不全のイヌでは血清EPOレベルが低下し(1,9)、腎性貧血の主要因をなしている。動物にしてもヒトにしても、慢性腎不全における貧血の発現は臨床的に避けることのできない結果であり、慢性腎不全のイヌ(9)やネコ(10)における貧血発生の割合についても詳細に調査されている。また、貧血は慢性腎不全の必然的結果であるばかりでなく、イヌやネコにおける尿毒症の症候群の中で非常に大きな特徴をなすものとなっている。尿毒症動物における貧血に起因した臨床徵候としては蒼白、食欲欠如、無気力、疲労感、筋肉の虚弱、体重減少、および被毛粗造などがみられるが、これらの臨床症状がEPO補充療法によって大きく改善されることから腎性貧血におけるEPO欠乏の重要性が結論づけられている。

著者が測定法に *in vivo bioassay* を用いて種々の貧血犬の血漿EPO値について調査したところFig.1のような結果を得ており、

貧血症におけるイヌのEPO産生状況を知るうえでの基礎データとしている。

3. EPOの臨床応用

イヌやネコに対する rhEPO 製剤使用の安全性および有効性についてはすでに評価がなされ、臨床使用に向けての予備試験も行われておらず、ヒトと類似した試験結果が得られている(11-13)。獣医小動物臨床においては、すでに世界的にみても、rhEPO 製剤は“今日の治療薬”となっている。

3.1. 慢性腎不全に関わる貧血(腎性貧血)への応用性

尿毒症状態にある貧血犬や貧血猫では前述のような種々の症状が認められるが、rhEPOによる治療はそのような症状に対して有効であると報告されている(11, 12)。すなわち、rhEPO 製剤の投与は慢性腎不全の動物における貧血を是正する(それによって輸血の必要性が排除される)ばかりでなく、動物の全身状態の改善にも有効に働き、典型的な治療効果として動物の食欲増進、脱水状態改善、元気回復、および体重増加が可能になると提言されている。

今日では、小動物用の血液透析装置も開発され広く普及はじめしており(Fig.2)，それによる尿毒症の改善操作が腎不全治療の一役を担うようになってきた。このような小動物用血液透析装置は、いかに priming を少なくして効率の良い透析が行えるかを考慮したものであるが、実際の透析操作においては若干の血液損失は避けられないようである。従って、血液透析患畜に対する rhEPO 製剤使用に際しては、そのような血液損失による貧血の助長をも考慮する必要があると考えられる。著者が両腎摘出犬を用いて行った実験では、血液透析維持中の rhEPO 投与は貧血助長防止のうえでも非常に効果的なものと判断された(Fig.3)。

3.2. その他の応用性

伴侶動物においても、悪性および慢性的な疾患に関連した貧血はEPOの相対的な欠乏が原因して起こることがあるため、補助的

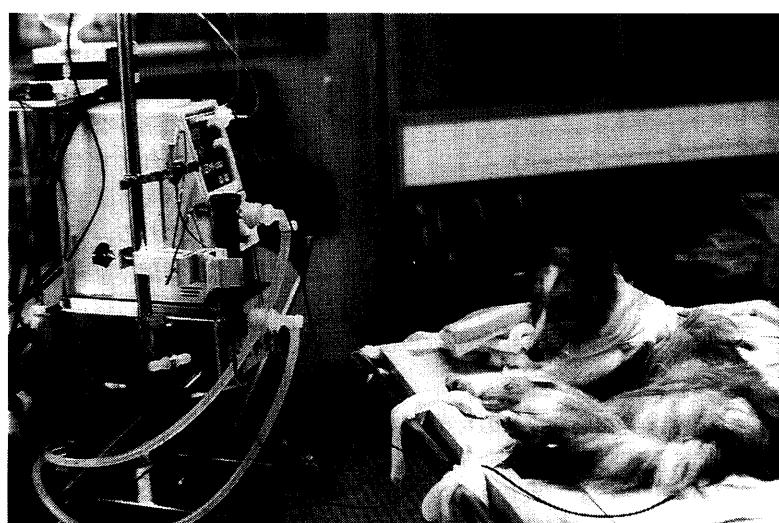


Fig.2 小動物用血液透析装置と腎不全犬の血液透析風景。患畜のイヌは小型犬種のシェットランド・シープ・ドッグ。

にrhEPO療法を行うことにより貧血の是正とそれによる臨床徵候緩和が得られるのでrhEPO製剤の使用が有用と考えられる。また、悪性の腫瘍疾患で化学療法を受けている動物の貧血進行も大きな問題となっているが、rhEPO療法は貧血の進行防止に対して他の造血因子(G-CSFなど)との併用を含めてその効果が注目されている。イヌについては、サイクロフォスファマイド誘導性貧血に対するrhEPO投与の貧血防止効果について試験され、その有用性が確認されている(14)。さらに、ヒトすでに応用されているように、小動物臨床においても自己血輸血への応用が考えられている。自己血輸血は外科領域では有用な手段であり、その実用に向けてイヌの自己血の貯血プログラムが具体的に検討され始めている。

4. rhEPO応用における問題点

rhEPOの臨床使用に際しては、十分に使用経験の積まれたヒトにおいてもそれぞれの応用範囲の中でいくつかの問題点が指摘されており(15)、副作用(特に高血圧や頭痛)の問題、鉄代謝の問題、またEPO抵抗性貧血の問題などが挙げられている。これらの問題点は動物にrhEPOを応用する際にも大きな参考となってお

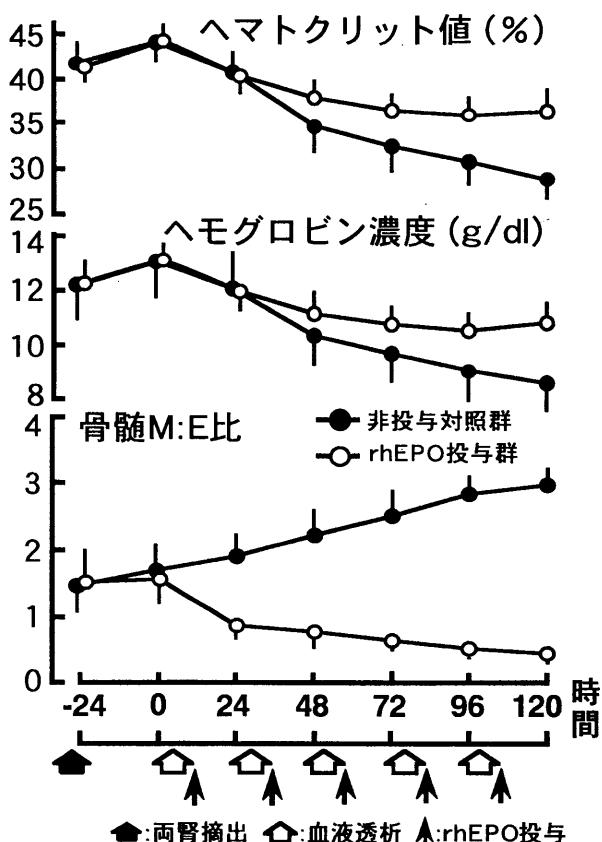


Fig. 3. 両腎摘出後、血液透析により維持された実験犬における、rhEPO投与の貧血進行防止効果。rhEPO非投与の対照群においては連日の血液透析による貧血の進行と赤血球造血反応の欠如が観察されるが、rhEPO投与群(100 U/kg i.v.)では貧血の助長は最小限に防止され、骨髄の活発な赤血球造血反応がそれを裏付けていた。

り、今後十分に検討されるいくものと思われる。EPO補充療法により貧血改善を行おうとする場合、当然のことながら、EPO不足状況以外の貧血悪化要因についてそれをできるだけ除外し、rhEPOが有効に作用できるよう十分なコンディショニングがなされなくてはならない。尿毒症や体液不均衡、炎症や薬剤、鉄代謝異常やビタミン欠乏、またはその他骨髄抑制に関わるあらゆる問題が解決されるよう考慮する必要があろう。

一方、動物の違いによってEPOの性質も非定型的であるため、rhEPO自体およびその製剤に含まれる安定化剤(ヒト・アルブミン)が投与動物に対して局所的または全身的アレルギー反応を引き起こす可能性があるとされている(11)。これには、まれな例として、注射部位の皮膚の発疹、発熱、関節痛、さらに粘膜潰瘍などが指摘されている。そして、イヌやネコにおいて最も深刻な合併症はrhEPOに対する抗体の発現である(1)。この抗体は動物間に交叉性がありイヌではイヌEPOまたネコではネコEPOに対する抗体であるため、この抗体が產生された結果として非再生性の貧血が引き起こされる。rhEPO治療を受けている動物が突然に貧血を再発する場合には、この抗体产生を疑うべきである。このような反応は大用量の投与を行った時に高い頻度で起こるようであり、報告されたデータによれば、イヌで20%およびネコで30%に観察されたとするものや(11)、イヌで75%と高い発生率であったとするものもある(14)。この抗体产生反応が現れるのは少なくとも治療開始後4週間(11)とも3週間以内(14)ともいわれるが、いずれにしてもrhEPOの休薬に対して可逆的な反応のようである。従って、休薬の間は輸血療法も避けられない状態となるが、動物を治療前のrhEPOに効果的に反応する状態にまで戻してやる必要が示されている(1)。

5. おわりに

EPO製剤はイヌやネコの貧血を効果的に回復させることができ、これらの動物の生理学的運動能力およびquality of lifeの改善をも可能とする。しかしながら、このEPO療法においては、rhEPOに対する動物の有効な反応性についてのみならず、望ましくない面の効果についても注意深いモニターを行う必要性が指摘されている。現状にあっては、小動物臨床にたずさわる獣医師がrhEPOを臨床使用するに際して、動物がrhEPO治療を必要とする状態にあるのかどうか、またrhEPO投与に反応性がありそうかどうかについての十分な考慮が求められている。また、EPO製剤の応用性はいかに輸血に頼らないで治療が進められるかに大きな目標がおかれており、これまで本連載に述べられてきた獣医領域における輸血療法の現状を考慮するならばEPO製剤を応用することの有用性は高いと思われる。しかしながら、前述のようなEPO製剤に関する問題点をも加味すると、次にはいかにEPO製剤に頼らないで治療できるかにも目標がおかれることとなる。そのような観点から、安全性の高い血液代替物が開発され獣医領域に導入されることには今後大きな期待が寄せられる。

参考文献

1. Giger U. EPO and its clinical use. Continuing Education 1992;14: 25-34.
2. Caro J, Erslev AJ. Erythropoietin assays and their use in the study of

- anemias. *Contrib Nephrol* 1988;66:54-62.
- 3. Rioux E, Erslev AJ. Immunologic studies of a partially purified sheep erythropoietin. *J Immunol* 1968;101:6-11.
 - 4. Birgegard G, Miller O, Caro J, Erslev AJ. Serum erythropoietin levels by radioimmunoassay in polycythemia. *Scand J Haematol* 1982;29:161-5.
 - 5. Swinney G, Jones BR, Kissling K. A review of polycythemia vera in the cat. *Aust Vet Practit* 1992;22:60-6.
 - 6. Kociba GJ, Lange RD, Dunn CDR, Hoover EA. Serum erythropoietin changes in cats with feline leukemia virus-induced erythroid aplasia. *Vet Pathol* 1983;20:548-52.
 - 7. 外山圭助.エリトロポエチンと貧血.山中學, 村地孝, 林康之編.臨床検査MOOK No.2 貧血の検査. 東京:金原出版 1980;21-40.
 - 8. Miller CB, Jones RJ, Piantadosi S, Abeloff MD, Spivak JL. Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer. *N Eng J Med* 1990;322:1689-92.
 - 9. King LG, Giger U, Diserens D, Nagode LA. Anemia of chronic renal failure in dogs. *J Vet Intern Med* 1992;6:264-70.
 - 10. DiBartola SP, Rutgers HC, Zack PM, Tarr MJ. Clinicopathologic findings associated with chronic renal disease in cats; 74 cases. *J A V M A* 1987;190:1196-202.
 - 11. Cowgil LD. Clinical experience and use of recombinant human erythropoietin in uremic dogs and cats. *Proc ACVIM* 1991:147-9.
 - 12. Mikiciuk MG, Polzin DJ, Osborn CA. The use of erythropoietin in chronic renal failure. *Adv Small Anim Med Surg* 1990:1-3.
 - 13. Koumegawa J-I, Kawahara J-I, Kubo K, Amano K, Wakimoto N, Takahashi K, Juji T, Takaku F. Recombinant human erythropoietin corrects anemia of blood loss; A study in the dog. *Int J Cell Cloning* 1990;8:97-106.
 - 14. 江島博康. イヌのサイクロフォスファマイド誘導性貧血に対するヒトリコンビナントエリスロポエチンの貧血防止効果について. *日本輸血学雑誌* 1992;38:501-7.
 - 15. 土屋輝昌, 上田正次. 赤血球造血を制御する液性因子. 化学と生物 1991;29:701-10.

◆◆報告◆◆

モザンビーク医療事情

モザンビーク派遣輸送調整中隊医官

第2次 竹島茂人

第3次 大鹿芳郎*

モザンビークPKO

モザンビークは年間平均所得が約8000円弱の低所得者の国で、GNPも2年連続世界最下位となったアフリカ東南部にある最貧国である。そんな国の国連PKO活動に日本からも自衛隊が参加していたのをご存じの方はもしかしたら少ないかもしれない（ルワンダ、ザイールとは別、誤解無きよう）。国連モザンビーク平和維持活動(ONUMOZ)は1993年3月に始まり1995年1月に終了したが、この間に自衛隊は1次隊から3次隊まで延べ140数名の隊員を派遣した。それぞれの派遣隊には2名の医官を同行させており、計6名の医官がモザンビークの土を踏んでいる(Fig. 1)。我々派遣医官の主な仕事は日本隊員の健康管理、宿営地の環境衛生整備であった。そんな医官の目から見たモザンビーク医療事情と雑感を紹介する。

ONUMOZにおける衛生支援

まず、ONUMOZ (*Operação das Nações Unidas em Moçambique*) とはモザンビークにおける国連平和維持活動の事で、内戦によって荒廃したモザンビークにおいて最終的には選挙による新政権樹立を射程に置いた和平プロセスを実現させる一環としての国連活動である。具体的には選挙監視、人権監視、行政支援、復興・復旧等幅広い分野に亘る活動を行っていた。

モザンビーク(Fig. 2)はインド洋に面した南北に長い国で日本の約2.1倍の国土を有しているため、ONUMOZではこの国を南部・中部・北部の3地域に分割して活動を行っていた。そしてそれぞれの地域には野戦病院を配置し、国連関係者その他を対象にした医療支援を行っていた。ルワンダ難民救済等とは異なりモザンビーク国民を治療対象とすることは主たる任務ではなかった。南部地域にはアルゼンチン、中部にはイタリア、北部にはパングラデッシュの各野戦病院隊が展開していた。このうち、我々が活動していた南部、中部地域の野戦病院には時々見学がてら訪れることがあったのだが、その診療内容には先進国医療と同レベルとは

いかない場合もまま散見されたようだ。

ある手術

ある夜、ONUMOZ南部地域アルゼンチン野戦病院で緊急手術が行われていた。患者は20歳台のONUMOZ隊員、AK銃（ロシア製自動小銃）による上腹部貫通創で、出血多量の重傷であった。血圧は測定不能、心拍数は180を越えていた。術中にもさらに出血は続き、治療スタッフの懸命な努力にも関わらず、結果的には術中死となってしまった。この間に輸血されたのは、野戦病院にわずかにストックしてあった800mLの保存血のみであった。野戦



Fig. 1. PKO派遣地にて。

病院なのになぜもっと血液のストックがないのかと疑問に思われる向きもあるだろうかと思うが、モザンビークにおける内戦は終息しており銃創は日常的ではない事、モザンビーク国内には血液を安全かつ持続的に供給できるシステムはない上に他国からの補給も心許ないという事情など（さらには野戦病院側の事情もあるだろう）から現実的には血液の充分なストックは困難であったということが考えられる。

この様に書いてくると、いかにもアルゼンチン野戦病院の能力が低いように思われるかもしれないが、それは正しくない。あく

*東海大学医学部病理学、〒259-11 伊勢原市望星台、Department of Pathology, Tokai University School of Medicine, Bohseidai, Isehara 259-01, Japan.

までモザンビークという劣悪な社会・衛生環境の国においては、出来る事も出来なくなるというのが正しい認識と言えるだろう。そこで、以下に現地の医療施設の現状を紹介する。

現地医療事情

先にも述べたような最貧国であるから現地の医療事情も決して誉められたものではない。医官として参加していた私達にとって何よりも心配だったのは、自分たちで手に負えない患者が出た場合のバックアップの医療施設が現地には無いという事でもあった。

モザンビークではほとんどが国立の医療施設であり、私立の病院はごくわずかであった。3つの中央病院がマプト（首都）、ベイラ、ナンプラの3ヶ所にありこの3病院が主要医療機関となっていた。この他に7つの各州に1つずつの病院と25の地方病院、2つの精神病院があり計37の病院が主たる医療機関として機能していた。

このうちいくつかの医療施設の特徴について述べてみる。

(1)マプト中央病院

モザンビーク国内で最大かつ最新の医療設備を有する国立病院。ベッド数1500床、医師数120名の総合病院で、国内唯一の医療教育機関もある。設備は内視鏡、超音波エコー、X線透視室はもちろんCTスキャンまである。しかしながらこれらの医療設備はほとんどがヨーロッパ諸国、インド等からの寄付によるものであった。

(2)ベイラ中央病院

中部地域では最大の国立病院。ベッド数740床、医師数33名の総合病院。設備ではマプト中央病院に及ばないが、単純X線、血液検査（血算、生化学、免疫）、細菌検査は可能でリハビリセン

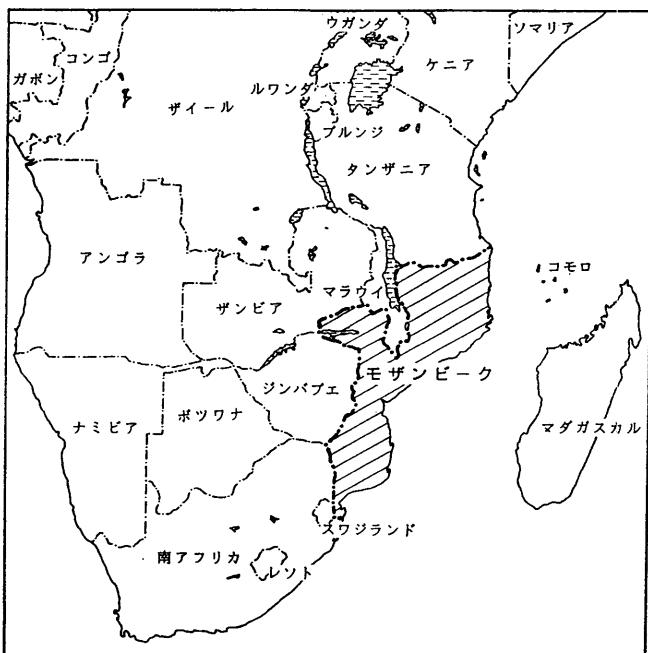


Fig. 2. アフリカ南部

ターも有している。医薬品等はモザンビーク厚生省からの物がほとんどだが一部はNGO等からの寄付による物もあるとのこと。また、献血センターもありAIDS検査は全例に行っているが、B型肝炎は検査キット不足の為に施行していない。

(3)ドント病院

モザンビークにおける典型的な地方病院。医師数は1名。ベッド数は30床だが場合によってはいくらでも増床可能（病院の庭にゴザ等をひいてこれをベッドとして数える）。検査等の設備は不十分で医薬品・消耗品などは極端に不足している。

これらの中央病院や地方病院でも資金・人材不足等から、（我々から見て）十分な医療が施されているとは必ずしも言えない。しかしながら、この様な病院であってもその恩恵に浴するとの出来るのは都市部のごく一部の人々であって、国民の大半はヘルスポートといわれる診療所（の様なところ）で治療を受けている。このヘルスポートには常駐の看護士がいることもあればいないこともあり、アスピリンやクロロキン、簡単な胃薬等が置いてあるだけのことも多い。さらに郊外へ行くといわゆる Witch doctor（祈とう師）が活躍しているところが数多く残っている。

また、医療施設における疾患で多いものは、マラリア、結核等の感染症、栄養失調、下痢性疾患などで、死因のトップもマラリアという事であった。エイズに関しては、モザンビーク保健省によれば一般人で3-5%，場合によっては70-80%のハイリスクグループも存在している。現地の新聞には「マニカ州立病院の献血センターに過去15ヶ月間に集まった約2000人分の血液中222例でHIVが陽性であった」とも報じられていた。

血液の心配

現在日本では人工酸素運搬体等血液代替物の研究開発が盛んに行われており、そう遠くない将来臨床応用されることが期待されているところである。人工血液の開発は輸血感染機会や副作用の減少、また血液事業の発展の為にも強く望まれている。

翻って、モザンビークのような医療後進国において活動を行う場合、先のアルゼンチン病院のように手術室等ある程度の設備・医薬品は揃えられるとしても、血液に関しては供給・保存ともに困難であると言える。一方、我々日本人の中で輸血を必要とするような事態が起こったときには隣国の南アフリカ共和国から輸血用血液を緊急輸送してもらえるように手配はしてあったが、幸いにしてそんな事態に遭遇する事はなかった。しかしもしその様な緊急事態になっていたらと考えると、血液が届くまでの貴重な時間を無駄に過ごすことなく有効な治療を可能にする人工赤血球があればどんなに安心だったかと思われる。長期保存が可能でクロスマッチの必要性が無く、また感染症等の心配も不要な人工赤血球が開発されれば、日本における日常診療においてのみではなくこのような低開発国における海外援助の際にも役立つであろうし、さらには離島や艦船に備えておけば緊急時にも対応が可能になると考えられるのではないか。

医学の最先端を行く感のある人工血液の開発であるが、こんな隠れたところでの効用もあるのかもしれない。

Meeting “Current Issues in Blood Substitute Research and Development”に参加して

薄場 彰^a, 泉 陽太郎^b

平成7年3月30日より4月1日迄の3日間米国カリフォルニア州San Diego市においてカリフォルニア大学San Diego校Winslow教授らのお世話で血液代替物の研究と進歩の現況 (Current Issue in Blood Substitute Research and Development) が開催された。

血液代替物の研究は本邦では前臨床試験の段階だが米国では既に修飾ヘモグロビンやパーフルオロケミカルズ(PFC)の一部は臨床第一相試験及第二相試験の段階にあり、その殆どがWinslow教授の施設で治験が行われている。普段学会でも顔を揃える事の少ない開発各社が今回一同に会したのもWinslow教授の指導に依ると思われる。

日本からは早稲田大学土田英俊教授、テルモ株式会社上谷利治部長並びに慶應大学医学部呼吸器外科泉陽太郎と福島県立医科大学第一外科薄場彰の4人が参加した。

会議は3日間とも同一構成で、午前はcore lectureとして血液代替物および関連分野に関する基礎的講演。午後はresearch communicationとindustry presentationの二部に分かれ前者は血液代替物に関する最新の知見、後者は今回最も注目される製造各社による臨床並びに前臨床試験成績の報告が行われた。

今回のmeetingの特徴は現在人工血液の開発を行っている殆どの会社が参加しその臨床治験成績を公表する点にあった。私どもの参加目的も現在米国を中心に進められている臨床第一相および第二相試験成績の動向を知る事にあった。一般に治験の進行中にその経過が学会で公表されることは稀である。しかし、今回は最も臨床治験が進んでいるBaxter Healthcare社のみならず丁度2年前、今回と同じSan

Diego市で開催された第5回血液代替物シンポジウム(ISBS)以来学会に姿を見せないHemaGen/PFC社が臨床治験成績を公表するとあって期待が高まった。

印象深いlectureおよびpaperを紹介する。

1. Winslow RM: A Physiologic Basis for the Transfusion Trigger

貧血に対し生体がどこまで耐え得るかを平易に解説した。生体は酸素不足に対して代償作用を有し静脈血酸素分圧を下げ結合酸素量を増量し、さらに心拍出量を増量して酸素需要に対応する。この代償機構は安静時にはヘマトクリット値が10%まで代償可能だが、労作時には最低20%のヘマトクリットが必要なこと。また赤血球とヘモグロビンとでは組織での酸素授受に相違があること等を示した。

2. Fratanton JC: Demonstration of the Efficacy of Therapeutic Agent

FDAの立場から血液代替物を評価した。血液代替物の生物学的特性が良く理解されていないこと。輸血の効果でさえ場合により証明困難なのに血液代替物効果の証明は一層困難なこと。輸血は極めて安全なのにあえて血液代替物を使う理由が不明なこと等を解説した。

3. Hess RM: Combat Casualties, Blood and Red Blood Cell Substitutes; A Military Perspective

米国陸軍は人工血液の研究、海軍は冷凍血液の研究と双方とも長い歴史を有する。しかし、戦傷者の65%は即死で治療の対象は25%に過ぎない。加えて、最近の戦争では輸血の需要は減少傾向にある。輸血による副作用は極めて少なく安全で、血液代替物の必要性は少ない。しかし、国家的プロジェクトとして今後も研究を続ける予定である。

4. Rudolph AS: Encapsulation of Hemoglobin

in Liposomes

ヘモグロビンをリポソームでカプセル化したヘモグロビン小胞体の問題点は網内系臓器特に肝や脾への影響である。臨床治験では肝酵素の上昇、血小板減少、白血球増加及び補体の活性化が観察された。一方利点はフリーへモグロビンと異なり血管収縮を起こさないことである。そのメカニズムを大動脈モデルで実験的に証明した。

5. Vandegriff KD: A Theoretical Analysis of Oxygen Transport: A New Strategy for the Design of Hemoglobin-based Red Cell Substitutes

赤血球中のヘモグロビンから組織へ酸素が拡散する場合と、血漿中にある酸素運搬体から組織へ酸素が拡散する場合との相違を検討した。赤血球は血管内の中心部を流れその周囲に血漿が存在する。赤血球の酸素が組織へ拡散する際、血漿は一種の障壁となり酸素濃度勾配は赤血球の周囲のみが高く組織への拡散距離は長い。一方血漿中の酸素運搬体では酸素は容易に組織へ拡散し拡散距離は赤血球より短い。このように一看すると赤血球の酸素拡散は効率が悪いように見える。しかし毛細血管や細動脈レベルの血管では血管内皮の酸素濃度が過度に上昇すると自己調節機構が働き血流量が低下する。従って酸素運搬効率の高い人工酸素運搬体は却ってこの機能を助長してしまう可能性がある。やはり赤血球の効率の悪さにはそれなりの意味があるのかもしれない。

Research communicationでは

1. Tsai AG: Microcirculatory Consequences of Blood Substitution with a-a-Hemoglobin

血漿中に高濃度の酸素を運搬する物質が存在する場合、血管内皮の酸素消費量

^a福島県立医科大学第一外科
^b慶應義塾大学医学部呼吸器外科

が上昇し組織への酸素拡散はかえって抑制される。

2. Johnson PC: Oxygen Delivery Regulation: Implications for Blood Substitutes

細動脈レベルに組織の酸素需要を上回る酸素を常に供給する調節機構が存在する。そしてこの機構は粘度や血流速度の影響をうける。従って人工酸素運搬体を利用する際には酸素運搬効率に加え粘度も考慮する必要がある。

3. Suit HD: Tumor Oxygenation and Radiosensitivity

放射線感受性と腫瘍組織中の酸素濃度との関連について検討、従来の主張を再確認した。特に腫瘍組織内の酸素分圧が必ずしも一様で無いことを強調した。

またindustry presentationでは

1. Alliance Pharmaceutical社

Perfluorooctyl bromide(perfluorobron)を素材に卵黄リン脂質を用いて乳化したPFC濃度90%の乳剤。乳化剤にレシチンを添加しているようだ。臨床に応用する適応を中心で解説した。体外循環灌流液、造影剤や液体呼吸等に応用されることになる。

2. Northfield Laboratories社

ヒトpolymarized hemoglobin "PolyHeme™" の臨床治験成績。PolyHemeはヘモグロビン濃度10 g/dl, P50 30 torr, メトヘモグロ

ビン比率3%未満, tetramer 1%未満, 血中半減期1日の重合ヘモグロビンで500 mlで1単位である。ボランティア30人に1~3単位投与したが、体温・血圧共に上昇せず、クレアチニクリアランスも低下せず肝機能、アミラーゼ、血凝、白血球数に変化なかったと報告した。

3. Hemosol社

Crosslinked Hemoglobinの"HemolinkTM"。血圧を上昇させるのは分子量64000のtetramerへモグロビンで、腎毒性は分子量32000のdimerでみられる。何れにしろ低分子へモグロビンが種々の障害を起こす。そこで、分子間架橋を加えてdimerへの分離を防止し、tetramerを修飾し、分子量を増量し血圧の上昇を防止した。実際、前臨床試験では血圧は上昇せず、またイヌリンクリアランスも低下せず腎毒性も見られなかった。

4. HemaGen/PFC社

Perfluorodichlorooctane (PFDCO)を素材としたPFC濃度40%の乳剤。体内半減期は8日である。動物実験では投与60日後にはPFDCOは体内から検出されなかった。健康成人ボランティアでの臨床治験ではhigh dose群で感覚症状が出現した。また10 mlPFC/kg投与群で体温の上昇、血小板減少、白血球増加が観察された。

5. Apex Bioscience社

PHPにはNOのscavengerとしての作用が

あった。敗血症等に有効かもしれない。

6. Somatogen社

NMRを用いて組織中の高エネルギーリン酸を測定した。組織への酸素運搬の指標となるかもしれない。

7. HemaGen/PFC社

PFCの人工心肺への応用。

8. Enzon社

ウシ由来のPEG Hemoglobinをヒトへ5 ml/kg投与したところ血圧が100 torrから120 torrへ上昇した。血中半減期は20時間であった。

9. Baxter Healthcare社

DCLHbの臨床試験成績。特に重篤な副作用は無かった。細かいデータは集計中である。

最後に本学会の主催者側の最大の関心時は果たして来年も開催すべきか否かという点にあったようである。臨床第二相試験に進んだ人工酸素運搬体が幾つかある一方で、組織への酸素運搬の調節や、ヘモグロビンに関する基礎的研究成績の中には、現在の人工酸素運搬体の評価方法をかなり根底から揺るがすものもできている。また時間的経済的な問題もかなり深刻になりつつあるようだ。現行の体制での研究開発が続けられるのも、そう長くはないように思われた。

H · E · A · D · L · I · N · E · N · E · W · S

PolyHemeによる第2相臨床試験の中間報告—投与量を増加して継続（Northfield社）

■ INTERNATIONAL BLOOD / PLASMA NEWS (The Marketing Research Bureau)によると(January/95, pp82), Northfield社は12人の患者の出血に際し150 gまでのPolyHeme (glutaraldehyde-polymerized human Hb)を投与し、いずれも副作用は見られなかつたことをFDAに報告した。術中もしくは術後に出血性ショックが見られた場合Polyhemeが投与され、7名については150 g使用されたという。これは3単位（日本における6単位相当）に匹敵し、いずれの患者もこれまで他の血液代替物で観察されたような消化器症状、発熱、脈拍、血圧変化はなかったとされる。特に、Northfield社によると5番目の患者では同種血輸血を回避することができ、Polyhemeは臨床で必要とされる治療的な役割を十分果たし得ると強調されている。Northfield社は今後も急性の出血が主な適応対象であるとしている。

■ CCBC (Council of Community Blood Centers) Newsletter (4/21/95)によると、その後FDAはNorthfield社による第2相臨床試験の継続を認めた。投与量は最大で6単位、300 gとなる。すでに3単位程度の臨床試験が成功しており、Northfield社のRichard DeWoskin (chairman, chief executive officer)は"次の連続の臨床試験がうまく行けば第3相として多施設での無作為臨床試験に入る"としている。6単位規模の臨床試験が成功した場合、かなりの輸血の代替が可能となろう。

(文責 編集委員会 仲井)

ヒト エリスロポエチン 製剤 エスボ® 注射液 1500・3000

●一般名：エボエチナルファ（遺伝子組換え）
(創)(指)(要指) **ESPO INJECTION** 健保適用品

- ①赤血球系に選択性的な分化・増殖を促す、特異性の高い薬理作用を備えています。
- ②優れた貧血改善効果とQuality of Lifeの向上が見られます。
- ③貧血改善にともない、輸血の大幅な減少と回避が期待できます。
- ④主な副作用としては血圧上昇、頭痛などが見られます。
- ⑤液剤であるため使用が簡便です。

効能・効果：透析施行中の腎性貧血

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腎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%)未満を目指すとする。(2)本剤の投与に際しては、腎性貧血であることを確認し、他の貧血(失血性貧血、汎血管減少アルニウム蓄積症等)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%以上を目指す)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の閉塞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.次の患者には投与しないこと 本剤又は他のエリスロポ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 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 ときに搔痒感、皮疹、座瘡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、ほてり感、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

●編集後記● 第2回年次大会プログラムおよび抄録集をお届けします。阿岸大会長のご尽力でしっかりと抄録集となりました。畠先生より今注目のサイトカインであるTPOについてご解説頂きました。長らく続きました獣医療における血液代替物の連載が今回で終了いたします。執筆、企画等でご協力いただきました諸先生にあらためて心からお礼申し上げます。新しい連載としてヘモグロビンの基礎科学に関するシリーズを準備中です。大鹿先生にはPKO体験記としてモザ

ンピーク医療事情をご寄稿頂きました。最後に、SanDiegoで開催されました代替物開発に関するmeetingの内容を薄場、泉両先生にご寄稿頂きました。米国での開発は急速に進みつつあり、フェーズ3に入ろうとしています。しかし、その一方で様々な新しい問題点も指摘されています。わが国でも本学会を中心にリポソーム体の前臨床多施設評価試験が進行中であります。編集委員会としても関連情報をなるべく掲載して参りたいと考えています。
(KN)

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会誌

■発行 日本血液代替物学会

■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

人工血液 vol. 3 (2) 1995年6月29日発行

〒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

再生紙を使用