

# 人工血液

第3巻 第3号 1995年9月

## 目次

---

総説	単純補充以外の人工血液の使用法 .....	阿岸鉄三	68
	エホバの証人と人工血液 .....	秋本純一	71
原著	重合性リン脂質を利用した人工赤血球(ARC)のメト化抑制 .....	遠藤さおり	76
	ヘモグロビン小胞体の酸素輸送に関するラット交換輸血試験 .....	酒井宏水	81

事務局たより 87

# ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 3 No. 3 September, 1995

## Contents

### *Review:*

Utilization of Artificial Blood for Other Than Simple Supplementation .....	Tetsuzo Agishi	68
Jehovah's Witnesses and Blood Substitutes .....	Junichi Akimoto	71

### *Original Article:*

Suppression of Methemoglobin Formation in Artificial Red Cells Composed of Polymerizable Phospholipids .....	Saori Endoh	76
Evaluation of Oxygen Transport of Hemoglobin Vesicles by Exchange Transfusion in Rats .....	Hiromi Sakai	81

# 単純補充以外の人工血液の使用法

阿岸鉄三, 船越陽一  
 本田 宏, 中島一朗  
 瀨之上昌平, 劉 輝

## Utilization of artificial blood for other than simple supplementation

Tetsuzo Agishi, Yoichi Funakoshi  
 Hiroshi Honda, Ichiro Nakajima  
 Shouhei Fuchinoue, Hoi Liu

### I. 人工血液の一般的用法

最初に本稿でいう人工血液とは, "酸素運搬能を積極的に付与する血液成分の代替物"と限定的に定義することとする。その意味で人工血液は使用時の患者の状態に程度の差はあっても、従来、貧血状態(赤血球数の低下)の改善の目的に使用されることが一般的であった。それに対して、われわれは人工血液の開発・研究にかかわるようになって以来、単純補充という一般的な使用法以外の方法について実験的な検索を行ってきた。それはより広い医療分野で人工血液の有用性を立証するという目的からであった。本稿においては、われわれの行ってきた実験の結果を要約的に述べる。

### II. 過剰に投与された人工血液の回収

ある種の代用血液においては、酸素運搬能については有用性は認められるものの、体外への排出過程などに問題があるため、使用量に制約を受ける場合がある。例えば、perfluorochemical(提供: Fluozol-DA ミドリ十字)では大量に投与されると、網内系に捕捉されて結果的に機能障害を起こすことから、20 mL/kg体重までの使用量に制限されている。しかし、単純補充に用いられた場合、一時的に大量投与しても血液中から人工血液成分を再回収することが可能であれば、緊急時の使用とその後での人工血液成分の回収と赤血球の補充によって、使用量の制限が拡大される可能性がある。

Perfluorochemical粒子の粒径が0.2 mm以下のものが90%以上を超えることから、平均的膜孔径が0.65 μmである血漿分離器によって、perfluorochemical粒子の分離が試みられた。しかし、膜分離によってはperfluorochemical粒子がほぼ分離されないことが分かった。一方、臨床的に血液成分分離に使用されているHaenetics V-50によって遠心力をかけると血液中から約70% (重量比)のperfluorochemical回収が行われた(1)。

### III. 人工血液の血液浄化領域における利用

医療としての血液浄化は、血液中に存在する病因(関連)物質

東京女子医科大学腎臓病総合医療センター外科, Department of Surgery, Kidney Center, Tokyo Women's Medical College, 〒162東京都新宿区河田町8-1, 8-1 Kawada-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan.

を除去するもくろみから瀉血に始まり、次いで、交換輸血が行われるようになって臨床適用が拡大した。とくに、肝不全患者やRh不適合新生児に対しては、比較的近年まで適用されていた。5リットルの交換輸血を行えば、90%以上の血液の交換が行われるとされている。その問題点は、大量の血液型適合血液を確保しなければならない点にある。そこで、人工血液を用いた交換輸血により、病因物質の除去(血液浄化)を実験的に行った。

### 1. perfluorochemicalによる交換輸血

体重12-15 kgの成犬の大腿動静脈を用いて、血液ポンプによる脱血とperfluorochemicalによる交換輸血を行った。2,000-2,500 mLの交換により、イヌのHtは平均40%から5%に低下した。一方、perfluorochemicalのHt(Fct)は9%程度まで上昇する。その後、できるだけ多くの量のperfluorochemicalを遠心機によって回収し、電解質液補充によって置換する。血液ガス・生化学的検索によって多少の変動は起こるものの、イヌはこの操作に耐えることができた。

次に、中毒犬においてこの操作を行ってみた。例えば、paraquat 150 mg静注を行ったイヌのparaquat血中濃度は最初、50

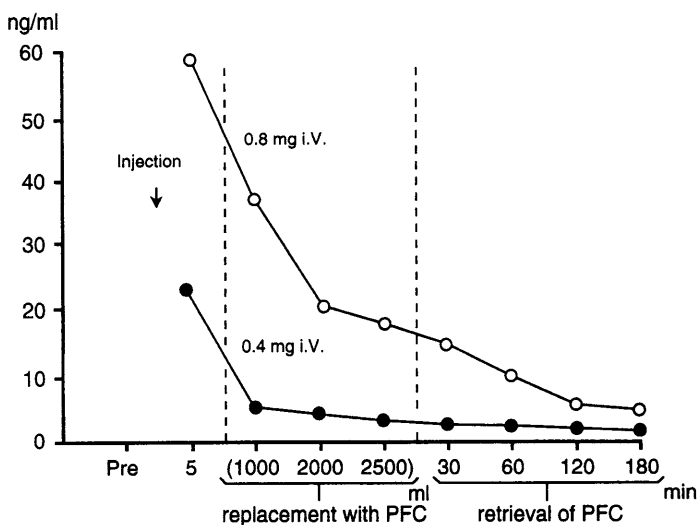


Fig. 1. Digoxin removal by normothermic whole body rinse-out using perfluorochemical.

mg/dLであったが、人工血液を用いた全血交換によって13 mg/dLまで低下した。また、急性digoxin中毒犬の実験において、0.8 mg静注によってdigoxin血中濃度は60 ng/mLまで上昇するが、人工血液を用いた全血交換によって、6 ng/mLまで低下した(Fig. 1)。さらに、総胆管結紮による慢性黄疸犬において、総bilirubin血中濃度10 mg/dLが1 mg/dLまで低下した。

この人工血液を用いた全血交換法は、normothermic whole body rinse-out (以後、NWBR) と名付けられた。

結論として、急性薬物中毒犬にperfluorochemicalを使用して、比較的安全にNWBRを行い、4週間を超える生存犬を得ることができた。投与したdigoxin・paraquatなどの除去率、慢性黄疸犬における総bilirubinの除去率は90%以上であった。perfluorochemicalの回収率は、73.5% (重量比) であった。

NWBRの驚異的な血中病因(関連)物質除去率から、急性薬物中毒や肝不全時に臨床応用の可能性も十分にあると考えられた(2, 3)。

## 2. Hemoglobin conjugate人工血液による血液浄化

その後、大量使用しても回収の必要はないと考えられるHemoglobin conjugateの人工血液、Pyridoxalated-Hemoglobin-Polyoxyethylene (PO-Hb-POE, 提供: 厚生省研究班・(株)味の素)が入手できるようになって、同様の血液浄化実験が行われた。PO-Hb-POEによる2,500 mLの交換輸血によって実験犬のHtは5%以下に減少した。しかし、4週間後の追跡調査では、ほぼ元のHt値に回復していた。腎機能・肝機能・電解質濃度・凝固因子は一時的な変動を見せるものの、イヌは交換輸血に耐え、4週間以内にはほぼ元の値に復していた。PO-Hb-POEを用いたNWBRによって急性digoxin中毒の状態に陥った実験犬のdigoxin血中濃度は、平均150 ng/mLから10 ng/mLへ低下していた。その除去率はおよそ92%であった。

結論的にPO-Hb-POEを用いたNWBRは比較的安全に行われ、急性digoxin中毒犬において血中の90%以上のdigoxinが除去され、致死量を超えるdigoxinを投与された実験犬8頭のうち3頭が4週間以上生存した(4)。

## IV. 人工血液の移植領域における利用

### 1. イヌ肝移植における灌流保存液としての利用

イヌを用いた全肝移植実験において肝摘出後、PO-Hb-POEを含む電解質液を灌流液として用い、6-8°Cの低温持続灌流による24時間、さらには48時間の保存を行ったあとで、イヌ同所性肝移植を行った。はじめ、同様の実験をperfluorochemicalを用いた灌流液を使用して行ったが、完全覚醒犬は得られたものの、長期生存は得られなかった。PO-Hb-POE灌流液を用いた実験で細胞外液様組成としたものでは、完全覚醒犬を得ることができたものの、長期生存は得られなかった。しかし、灌流液組成を細胞内液様組成とし、すなわち高カリウム・低ナトリウムとした結果、実験犬4頭の全例で完全覚醒・長期生存が得られた。そのうちの1例は移植後7日間生存した(Table 1)。さらに48時間の比較的長期間灌流保存実験において、実験犬10頭のうち4頭が移植手術後、24時間以上生存した(5, 6)。

### 2. Hemoglobin conjugateを用いたNWBRによる異種抗体の術前除去

異種移植においては、血行再開直後に起こる超急性拒絶反応により、移植臓器機能が失われる。これには、recipient血液中に存在する異種臓器に対する異種抗体と移植臓器の血管内皮に存在する抗原との免疫吸着結合が引金になるとされている。そこで、人工血液を用いたNWBRによって90%以上の血中病因(関連)物質の除去が行われることが分かっているため、抗体除去に対して応用された。

ラットを用い、モルモットの心臓を腹部大動脈-大静脈間に移植する実験に先立って、ラットの血中Htが5%以下になるようにPO-Hb-POEを用いた全血交換が行われた。その結果、血中IgM, IgG, IgAは5%以下の濃度に低下し、また、抗モルモットリンパ球抗体価の著しい低下を得ることが確認された。その結果、NWBRの処置を行わなかったラットにおいてモルモットの心臓は平均10.4分収縮したのに対して、NWBRの処置を行った群においては平均47.5分までの収縮を認めた(7)。

### 参考文献

- 山形桂仁, 小林峰徳, 江良和夫, 高山裕史, 阿岸鉄三, 太田和夫. 連続遠心器利用による代用血液 (Fluorocarbon) 回収の試み. 医器誌 1983;53(suppl):76-8.
- 高山裕史, 阿岸鉄三, 山形桂仁, 小林峰徳, 太田和夫. 遠心分離

Table 1. Results of 24 hr liver preservation with PO-Hb-POE solution

	ACT improvement	Bile excretion	Consciousness recovery	Long survival
Group 1 Oxypherol (n=10)	1/10	1/10	0	0
H-C solution (n=10)	4/10	4/10	4/10	0
Group 2 Hb-PLP 1 (n=2)	0	0	0	0
Hb-PLP 2 (n=4)	4/4	4/4	3/4	0
Hb-PLP 3 (n=4)	4/4	4/4	4/4	4/4

Group 1, Fluorocarbon-containing perfusate; Group 2, PO-Hb-POE-containing perfusate; H-C solution, Hypertonic citrate solution.

器による代用血液perfluorochemical (PFC) particles回収の試み  
— whole body rinse-outへの応用— 人工臓器 1984;13:1260-2.

3. 阿岸鉄三, 山形桂仁, 小林峰徳, 寺岡慧, 太田和夫. 代用血液 (Fluosol-DA) を用いたnormothermic whole body rinse-out (常温全身洗い出し法). 透析会誌1984;17:537-43.
4. 船越陽一, 阿岸鉄三, 本田宏, 山形桂仁, 寺岡慧, 太田和夫. 安定化ヘモグロビン溶液を用いたnormothermic whole body rinse-outの実験的急性薬物中毒への応用. 人工臓器 1988;17:725-8.
5. 中島一朗, 瀧之上昌平, 寺岡慧, 高橋公太, 本田宏, 河合達郎, 中川芳彦, 林武利, 藤田省吾, 唐仁原全, 君川正昭, 藤川博康, 東間

紘, 阿岸鉄三, 太田和夫. Pyridoxalated hemoglobin-polyethylene glycol conjugate solutionを用いた犬肝24時間保存. 移植 1988; 23:120.

6. Nakajima I, Fuchinoue S, Teraoka S, Tojinbara T, Fujikawa H, Kawai T, Honda H, Agishi T Ota K. Long-term liver preservation using artificial blood substitute. Transplant Proc 1989;21:1314-5.
7. 劉輝, 阿岸鉄三, 菅英育, 中島一朗, 早坂勇太郎, 寺岡慧, 野沢真澄, 太田和夫. 異種心移植における自然抗体除去に対する安定化ヘモグロビン溶液を用いた全血置換の効果. 人工臓器 1993; 22:993-8.

**新発売**  
薬価新収載

**ESPO**

—ヒト エリスロポエチン製剤—

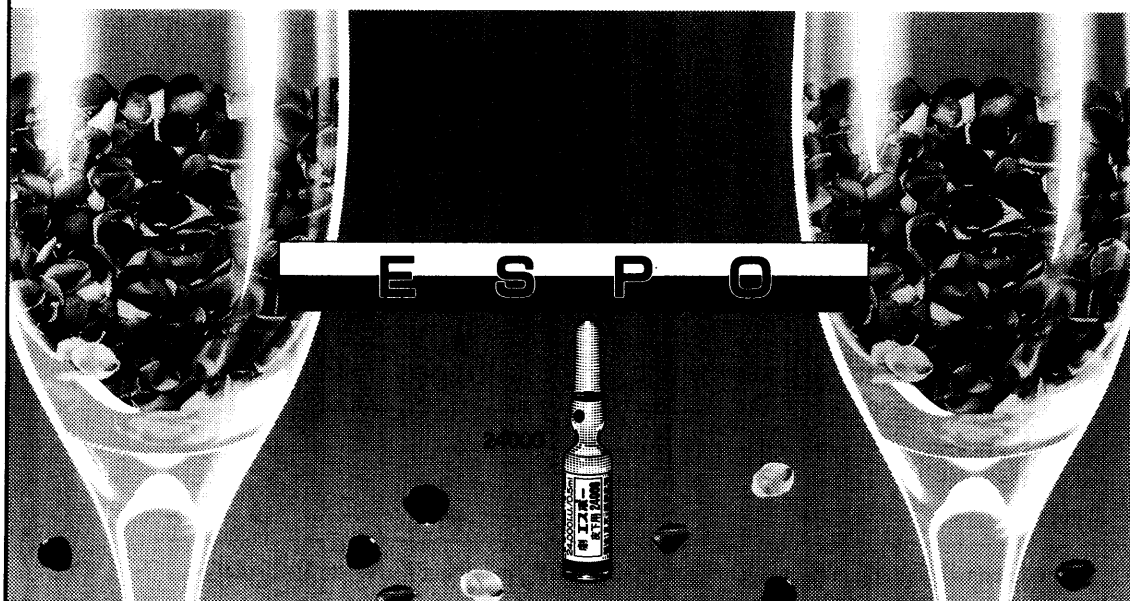
**エスポー<sup>®</sup> 皮下用**

**6000・9000・12000・24000**

(劇)(指)(要指) 一般名: エポエチンアルファ(遺伝子組換え)

●**効能・効果** —抜粋—

①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



用法・用量、及び使用上の注意等は添付文書をご覧ください。

販売元・資料請求先  
**三共株式会社**  
〒100 東京都中央区日本橋本町三丁目二番

製造元  
**麒麟麦酒株式会社**  
〒100 東京都中央区新川二丁目十一番

954(新)

# エホバの証人と人工血液

秋本 純一

Junichi Akimoto

## Jehovah's Witnesses and Blood Substitutes

### 1. はじめに

近年、輸血医療には安全性や血液特有の限界などを含め、克服しがたい種々の問題があることが明らかになってきた。その中には、非A非B型肝炎に加え、AIDSやGVHDといった致命的な副作用が含まれる。また、当然のことながら、輸血療法には血液型が関係しているため、いつでも、どこでも、そしてだれにでも自由に用いることができるわけではないといった限界がある。したがって、安全で即時に、しかも血液型に関係なく利用できる人工血液（赤血球代替物）の開発は、輸血医療がかかえている様々な問題を解決するのに、大いに貢献する福音といえる。加えて、輸血を拒否することで知られているエホバの証人の患者への対応も人工血液開発の必要性を喚起する別の強力な要素である。現に、輸血を承諾しない限り、手術や治療を断るといった対応をとっている医療機関もあると聞いている。しかし、そのような医療機関の中にも、エホバの証人に用いることのできる人工血液が開発されるなら、対応を変化させるところが出て来ると思われる。したがって、人工血液の開発状況や、それがエホバの証人に用いられるかどうかは、医療関係者とエホバの証人双方にとり、大きな関心事である。

エホバの証人とその仲間は、1994年8月時点で全世界に約1,200万人、日本に約40万人いると言われている。日本の人口に占める彼らの割合は約300人に1人であり、その数は毎年約7%の割合で増加していることが報告されている(1)。こうしたことから、治療を求めて医療機関にやって来る彼らへの対応は、避けて通れない問題となっており、近畿大学医学部麻酔科の古賀が述べるとおり、「医療人として逃げるべきことではな(く)」真摯な対応をすべきであると考えている(2)。こうしたことを踏まえた上で、人工血液の有用性や開発状況に触れながら、人工血液に対するエホバの証人の見方、輸血を拒否する彼らの信条や倫理観、そしてふさわしい対応方法を考察してゆきたい。

### 2. 人工血液の有用性

早稲田大学理工学部の土田は「血液型に関係なく、何時でも何処でも即時に利用できる安全な血液代替物の出現が待たれて久しい」「通常の医療だけでなく、地震など広域災害の緊急対策はもちろん、医療制度が十分整わない地域での対応、また、固有の血

市立吹田市民病院内科, 〒564 大阪府吹田市片山町2丁目13番20号, Department of Internal Medicine, Suita Municipal Hospital, 2-13-20, Katayama-cho, Suita-city, Osaka 564, Japan.

液疾患やエイズが蔓延している地域での輸血、血液疾患の治療…にも広く関連して、社会的意義の極めて重要なしかも波及効果の大きい課題となっている」と述べ、人工血液がもたらす恩恵が多方面に渡ることを強調している(3)。また、北海道赤十字血液センターの関口らは「臨床での適応範囲については、…血管狭窄時の微小循環の血流確保、低温における酸素運搬能を利用した臓器保存、など様々な応用も期待される」と語り、その臨床応用の範囲が広いことを指摘している(4)。さらに、慶應義塾大学医学部の池田は「同種血輸血回避を目指す輸血医療にとって、人工酸素運搬体の出現は遺伝子組換えエリスロポエチンの臨床応用、自己血輸血と共に大きな福音」であると述べ、その開発が輸血医療に大きな変革をもたらす可能性があることを示唆している(5)。

このように、研究者の見解は、血液型に関係なく、即時に利用できる安全な赤血球代替物の有用性と開発への期待を強調している。1994年1月の「第2回赤十字血液シンポジウム」東京会場で、昭和大学医学部麻酔科の小堀は、「外科的出血の止血効果は血小板数 $5 \times 10^4/\text{mm}^3$ 、凝固因子は通常の30%あれば十分であることから、出血に対し最も打撃を受けるのは赤血球である。理論的には2000 mL程度出血までは赤血球のみの補給で十分である」と語っている(6)。これは、血液代替物の中で、とりわけ赤血球代替物の開発が臨床の場で最も必要とされているものの一つであることを示唆しているように思われる。

### 3. エホバの証人の血に対する信条

エホバの証人の血に対する信条は「血を避けなさい」という聖書の言葉に基づくものであり、彼らはこれに輸血が含まれていると考えている。これは、彼らの主要な宗教信条の一つとなっている。彼らはこの信条に基づき、全血、赤血球、白血球、血小板、血漿を受け入れない。しかし、アルブミン、グロブリン、そして凝固因子を受け入れるかどうかは各自が決定するものと考えている(Fig.1)。自己血輸血については、貯血式自己血輸血や血液の貯蔵が伴う希釈式自己血輸血と回収式自己血輸血は受け入れない。しかし、血液の貯蔵が伴わず、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決定によると考えている(7)。

当然のことながら、エホバの証人は、輸血を拒否するものの、医療そのものを拒否しているのではない。勿論、死ぬ権利を行使しているわけでもない。彼らはあくまでも良質の医療を受けることを願っているのであり、輸血が関係しないほとんどすべての医

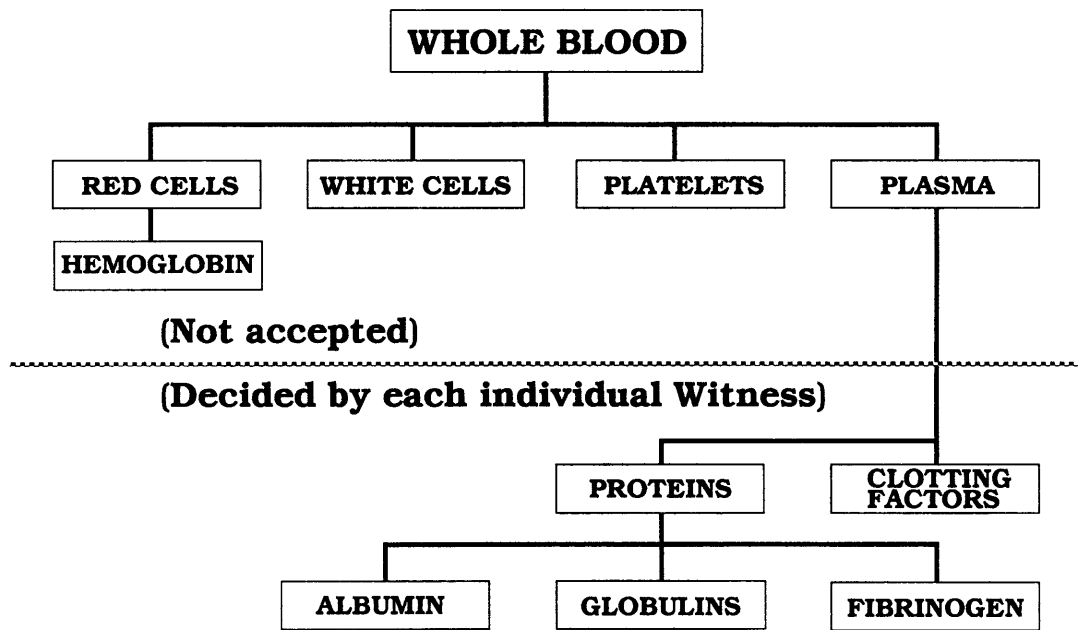


Fig. 1. Jehovah's Witnesses view on blood and blood fractions.

療を受け入れている。したがって、我々医療側は、このことを正しく認識した上で、彼らに対応すべきであろう。

#### 4. 人工血液に対するエホバの証人の見方

先に述べたように、彼らは全血、赤血球、白血球、血小板、血漿を受け入れない。従って、その人工血液が、彼らが拒否する血液成分（全血、赤血球、白血球、血小板、血漿）を原料として作られているのであれば、彼らは、それを受け入れない。一方、その製剤が血液に由来していないのであれば、彼らにとってそれは純粋に医学的な問題であり、受け入れるか否かは個人的な決定となる。

赤血球代替物の世代分類について、北海道赤十字血液センターの関口は、第一世代は「パーフルオロケミカル(PFC)」, 第二世代は「赤血球由来ヘモグロビン(Hb)」, 第三世代は「組換えHb (rHb)や合成ヘムなどの完全な人工物」といった仕方でまとめている(8)。後で言及するが、第一世代赤血球代替物であるパーフルオロケミカルは、さらに第1世代PFCと第2世代PFCに分けられる。

エホバの証人と人工血液の係わりは、神戸大学医学部第一外科と(株)ミドリ十字の研究スタッフによって開発された、いわゆる第1世代PFCであるFluosol-DAの臨床治験であった。第1世代PFCであるミドリ十字のFluosol-DAは、1979年12月当時、日本では累計70名が臨床治験で使用し、その半数がエホバの証人であったと報告されている(9)。また、1982年の「循環制御」誌6月号の「わが国の臨床応用の現況」の中で、光野らは、1981年の「第5回国際人工血液会議」に報告した186例の内容について次のように述べている。「宗教上などの理由で輸血拒否29例、適合輸血血液が入手不能おくれたもの27例、肝炎防止のため78例、脳循環改善のため28例、そのほか循環不全改善、一酸化炭素中毒、重症溶血

性貧血等などである」(10)。これらの臨床治験報告は、人工血液の開発がエホバの証人の患者への対応のみならず、輸血医療が抱える種々の問題に対処するのに有望であることを示唆している。さらに、1990年5月30日付の「毎日新聞」は厚生省業務局の報告として、「【エホバの証人】の信者に、…5年間に計40例、投与されていた」と報じている(11)。

上記のように、エホバの証人は、赤血球代替物の第1世代PFCの臨床治験と関連し、人工血液と係わりを持ってきたが、福島県立医科大学の薄場は、Fluosol-DAの使用について、1994年12月号の「日常診療と血液」で、「Fluosol-DAは…臨床に使用されたが体内蓄積への不安から投与量が制限され、…次第に使われなくなった」と述べている(12)。そして、ミドリ十字は、Fluosol-DAの製造および供給について、1993年8月31日付で日本におけるFluosol-DAの研究開発を中止し、製造承認申請を取り下げたことを公にしている(13)。一方、米国において、Fluosol-DAはPTCA用の心臓保護剤としてFDAの認可を受け、市販されていたことが報告されているが(14)、これも、1994年4月に市販を中止しており、第1世代PFCであるミドリ十字のFluosol-DAは今や製造及び医療機関への供給を終了している。一方、Fluosol-DAの持つ問題を克服すべく開発された第2世代PFCの米国における開発状況について、関口らは、「第2世代PFCとして開発されたものが…すでに安全性では高い評価を得ており、現在第2相臨床試験が進められている」と報告している(4)。これはパーフルオロケミカルについての新たな展望であり、しかもエホバの証人に用いることができることから今後の研究開発に注目してゆきたい。

赤血球代替物の第二世代である赤血球由来ヘモグロビンは現在、開発が進んでおり、関口らは、「すでに第2相臨床試験が進められており、血管収縮を除外すれば特に副作用は認められないようであり、このグループから近い将来臨床に応用されるものが現


われよう」と報告している(4)。一方、小林は「大きな特徴は、血液型物質を含まないので使用にあたって血液型の判定や交差試験の必要がないことであるが、ヘモグロビンは生物由来であるので、血清肝炎やAIDSなどの感染の危惧が問題となっている」と述べている(15)。いずれにしても、この第二世代赤血球代替物は赤血球内のヘモグロビンを原料としているため、エホバの証人に用いることはできない。

赤血球代替物の第三世代である組換えHbについて、関口らは、「ヒト血液由来ヘモグロビンであれば…ウイルス感染に対する安全対策が必須となる。リコンビナントヘモグロビン…によりこのすべての問題を解決した」と述べている(16)。また、もう一つの第三世代赤血球代替物、つまり合成ヘムであるリポソーム包埋ヘムの特長について、小林は「1)血液型に関係なく使用可能、2)優れた酸素運搬能—迅速な酸素結合解離、適度な酸素親和性、高い酸素運搬効率、3)小さな粒子、4)物理的に安定、5)均質物質なので、大量生産が可能、6)無菌、無ウイルスの状態で作製可能、7)無酸素下、室温、冷暗所での長期保存が可能、8)乾燥粉末状にもなり、水の添加で容易に再生できる、などの特徴をもっている」と述べると共に生体への影響について「生体に与える血液学的影響に関しては小動物における実験で溶血、凝固や血小板

凝集がなく、血栓形成もないことなどを観察している。また、血中の半減期は14~20時間である」と報告している(15)。東京女子医科大学輸血部の清水は、赤血球代替物に言及した中で、「宗教上、輸血を拒否する患者(エホバの証人)にとっては手術時における人工赤血球の使用は、朗報といえるであろう」と述べている(17)。これら第三世代赤血球代替物は医学、工学、産業の三者が最終的に目指している人工血液と言える。そして、これらが血液と無関係の完全な人工物である限り、エホバの証人に用いることのできるものである。

### 5. エホバの証人と医療関係者との協力

エホバの証人は、常時、「医療上の宣言」証書(Fig.2)を携帯している。これは、輸血拒否の意思表示を口頭で行えない状況、つまり、交通事故等で意識障害に陥る可能性を考慮したものである。加えて、待機的な治療の際には、「輸血謝絶兼免責証書」(Fig.3)を提出する取り決めを持っている。これらの証書には、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十分に施されたならば、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示が述べられている。また、エホバの証人側では、医療関係者との協力関係を推し進める

Allergies: _____ Current medication: _____ Medical problems: _____	<p><b>MEDICAL DIRECTIVE</b> (signed document inside)</p> <p><b>NO BLOOD</b></p> 
Name: _____ Telephone: _____ Address: _____	<p><b>IN CASE OF EMERGENCY, PLEASE CONTACT:</b></p> <p><b>ALTERNATE CONTACT:</b></p> Name: _____ Telephone: _____ Address: _____

Open to signed document →

<b>ADVANCE MEDICAL DIRECTIVE/RELEASE</b>	
<p>I, _____, make this advance directive as a formal statement of my wishes. These instructions reflect my resolute decision.</p> <p>I direct that <b>no blood transfusions</b> (whole blood, red cells, white cells, platelets, or blood plasma) be given to me under any circumstances, even if physicians deem such necessary to preserve my life or health. I will accept nonblood volume expanders (such as dextran, saline or Ringer's solution, or hetastarch) and other nonblood management.</p> <p>This legal directive is an exercise of my right to accept or to refuse medical treatment in accord with my deeply held values and convictions. I am one of Jehovah's Witnesses, and I make this directive out of obedience to commands in the Bible, such as: "Keep abstaining . . . from blood." (Acts 15:28, 29) This is, and has been, my unwavering religious stand for _____ years. I am _____ years old.</p> <p>I also know that there are various dangers associated with blood transfusions. So I have decided to avoid such dangers and, instead, to accept whatever risks may seem to be involved in my choice of alternative nonblood management.</p> <p><b>I release physicians, anesthesiologists, and hospitals and their personnel from liability for any damages that might be caused by my refusal of blood, despite their otherwise competent care.</b></p> <p>I authorize the person(s) named on the reverse to see that my instructions set forth in this directive are upheld and to answer any questions about my absolute refusal of blood.</p>	
Signature _____	Date _____
Address _____	Telephone _____
Witness _____	Witness _____

Fig. 2. "Advance Medical Directive/Release" document.

## REFUSAL OF BLOOD AND RELEASE FROM LIABILITY

To \_\_\_\_\_ Hospital, doctors, and personnel having to do with the care of \_\_\_\_\_:

You are hereby notified that I will not accept blood transfusions (whole blood, red blood cells, white blood cells, platelets, and plasma) to be used in my treatment. However I will accept the following treatment(s). — albumin; immune globulin; products of clotting factors; intraoperative hemodilutional autotransfusion; intraoperative blood salvage.

I can accept nonblood volume expanders and other medical treatment.

I, as one of Jehovah's Witnesses, make this medical and religious directive based on my deep religious convictions and values. Additionally, I do not want to suffer the harmful and lethal effects of blood transfusions.

I understand that the attending physicians may feel that the use of a blood transfusion is essential to save my life. Even if that is the case, I will not accept blood transfusions, and will adhere to the instructions given in this notice.

I have carefully considered this matter, after receiving the explanation from the doctors about the benefits and risks of both blood transfusion therapy and bloodless therapy. These instructions will not change even if I am unconscious.

I release the hospital, doctors, and other personnel from liability for any damages that might be caused by my refusal of blood, despite their otherwise competent care. This directive shall be binding on my legal representatives, heirs, and executors.

Date: \_\_\_\_\_, 19\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Patient

Date of Birth: \_\_\_\_\_, 19\_\_\_\_

ADDRESS: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Witness Relationship between the patient: \_\_\_\_\_

ADDRESS: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Witness Relationship between the patient: \_\_\_\_\_

ADDRESS: \_\_\_\_\_

After full discussion, I have decided to accept the wishes of the above patient. I agree that I will not use blood transfusions and blood products refused by the patient in any situation.

Attending Doctor: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_, 19\_\_\_\_

Anesthesiologist: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_, 19\_\_\_\_

(\* Prepare two copies. One is to be kept by the hospital, the other by the patient.)

Fig. 3. "Refusal of Blood Release from Liability" form.



ための種々の取り決めを設けている。たとえば、エホバの証人のニューヨーク本部と全世界100の支部に「ホスピタル・インフォメーション・サービス」があり、そのもとに、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」が設置されている。ここ日本においては、主要都市に61の委員会が設置されている。ホスピタル・インフォメーション・サービスは最新の医学および法律文献を医師や医療機関連絡委員会に提供している。さらに、入院患者に対するメンタル・ヘルス・ケア等を行なうための取り決めとして、「患者訪問グループ」が組織されている。なお、医療機関連絡委員会は、医療関係者とエホバの証人の患者との間の協力関係を促進し、誤解や無用な摩擦を避ける目的で活動しているボランティア・グループである。星総合病院の西坂らは、医療機関連絡委員会について、「日本のみならず、諸外国の無輸血治療に関する多くの文献を所持しているゆえに、役立つ情報を入手できると同時に、患者との橋渡しの働きもしてくれる」と述べている(18)。また、大阪大学医学部法医学教室の若杉も、「医師に対する免責を証明する書類を得たり、エホバの証人の医療機関連絡委員会に活動を要請することは、後日の紛糾を避けるための一つの方法である」と語っている(19)。エホバの証人は、このような取り決めを通して、医療関係者との信頼関係を構築している。

#### 6. インフォームド・コンセント

1994年2月に「日本病院会」は病院の基本姿勢として、「説明と同意」の指針について5項目を発表した(20)。加えて、東京都立病産院倫理委員会をはじめ、各地の大学病院や総合病院の倫理委員会もインフォームド・コンセントの原則に基づき、輸血拒否を患者の自己決定権と位置づけ、その意思を尊重した治療を行なう方針を決定し、公にしている。

若杉は、「説明と同意という大原則に従って行われる医療の現場において…エホバの証人であろうとなかろうと適切かつ十分な説明を行っても医療を拒否した場合は、当然それを強行することはできないのであって、医師は患者の同意が得られる中で最善の医療を行わなければならない」と述べている(19)。このように、医学界や法曹界は輸血拒否を患者の自己決定権と位置づけ、患者の意思を尊重する方向にある。例えば、患者の自己決定権の尊重に加え、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ことが報告されている(21)。

#### 7. 結論

「エホバの証人と人工血液」と題して、人工血液の有用性と開発への期待の大きさ、その臨床応用が、輸血療法の限界や抱える問題の多くを解決する見込みを持っており、医療関係者およびエホバの証人や一般の患者にとって福音となり得るといった点について論じることができた。このような社会的動向の中で、私自身、医師としての意識変革が求められていることへの認識を日々、深めている。つまり、医師の裁量権と患者の自己決定権との関係においては、あくまでも患者の意思や倫理観を認め、患者の決定は優先させるべきものであると考えている。このことこ

そ、時代が求める良質の医療のあり方ではないかと思う。こうしたことすべては、多様化する価値観への対応が求められる時代にあつて、患者の信条や倫理観を含め、「人全体」を治療するという医学の目標にも調和するものである。人工血液の開発は、こうした高邁な理念と目標を医療現場に浸透させ、医療従事者と患者双方の必要を満たすのに、大いに貢献するものと確信している。これまでの、医学、工学、産業の各分野における研究者の長年にわたる研究と開発は、医療の新しい将来への先見を示すものである。その努力に心からの敬意と感謝を表し、さらなる研究の成功を祈念する。

#### 参考文献

1. Yearbook of Jehovah's Witnesses. Watch Tower Bible and Tract Society of Pennsylvania. 1995.
2. 古賀義久. 第14回日本臨床麻酔学会総会を語る. 臨床麻酔1995; 1:12.
3. 土田英俊. 人工血液—特に人工酸素運搬体を中心に— Biomedical Perspectives 1994;11:59
4. 関口定美, 仲井邦彦. 人工血液の歴史と現状. 日常診療と血液 1994;4:7-12.
5. 池田康夫. 輸血医学と人工血液. 日常診療と血液. 1994;4:55-60.
6. 小堀正雄. 麻酔医から見た手術中輸血の管理について. 第2回赤十字血液シンポジウム 東京会場 1994;6:17-24.
7. 横田知夫. エホバの証人の無輸血治療の経験とその応用. 第3回赤十字血液シンポジウム 東京会場 1995;2:11-20.
8. 関口定美. 人工血液. 日本医師会雑誌 1992;108:1727-9.
9. 内藤良一. エホバの証人の皆様へお知らせ. (株)ミドリ十字 1979年12月25日.
10. 光野孝雄, 大柳治正. わが国の臨床応用の現況. 循環制御 1982; 6:51-2.
11. 毎日新聞. 1990年5月30日14版:27.
12. 薄場彰. 新しいパーフルオロケミカル. 日常診療と血液 1994; 12:39-44.
13. (株)ミドリ十字. 製造中止に関する医師への案内の手紙. 1993年9月.
14. 横山和正. ホンゾウ医薬ニュース. 日本経済新聞 1990年2月12日.
15. 小林紘一. 全合成系人工血液. 医学のあゆみ. 1995;172:105-8.
16. 関口定美, 仲井邦彦. リコンビナントヘモグロビン. 医学のあゆみ 1995;172:109-13.
17. 清水勝. 人工赤血球の適応病態. 日常診療と血液 1994;4:45-50.
18. 西坂利之, 鈴木恭一, 大槻学. エホバの証人と輸血. 自己血輸血 1995;7:185-94.
19. 若杉長英. エホバの証人と輸血. Emergency Nursing 1994;11:70-2.
20. 伊賀六一. インフォームド・コンセント. 日本病院会雑誌 1994; 2.
21. AWAKE!. Watch Tower Bible and Tract Society of Pennsylvania. 1995;March 22:20.

# 重合性リン脂質を利用した人工赤血球 (ARC) のメト化抑制

遠藤さおり, 粟井浩二, 矢野嘉宏, 守沢和也, 赤間和博, 中野善郎, 佐藤征

## Suppression of methemoglobin formation in Artificial Red Cells composed of polymerizable phospholipids

Saori Endoh, Kouji Awai, Yoshihiro Yano, Kazuya Morizawa, Kazuhiro Akama  
Yoshio Nakano, Tadashi Satoh

重合性リン脂質を用いたリポソームにヘモグロビン (Hb) を内包させ、 $\gamma$  線照射により脂質膜を重合させた人工赤血球 (Artificial Red Cells: ARC) は、37°C の保存下に 24 時間後で 60% 以上のメト化率を示す。そこで筆者らは構成脂質および  $\gamma$  線照射がメト化に及ぼす影響について検討した。まず、ARC の構成脂質中に含有されている palmitic acid (PA) を sodium palmitate または dimyristoylphosphatidylglycerol sodium salt に置換したところ、顕著なメト化抑制効果が認められた。PA のカルボキシル基の及ぼす Hb への影響が、ナトリウム塩に変えることにより緩和されたことによるものと考えられる。さらに、Hb をリポソーム化した後、内包されなかった Hb を除去する前に  $\gamma$  線照射を行った結果、Hb 除去後の ARC は上述の条件下で 20% 以下という低いメト化率を示した。 $\gamma$  線照射により発生する過剰なラジカルによる内包 Hb の損傷が、外水相の Hb により防御されることが示唆された。以上の結果から、ARC の構成脂質中の脂肪酸をナトリウム塩に換えること、および  $\gamma$  線照射時のリポソームの外水相に Hb を残存させることにより、メトヘモグロビンの生成が抑制された ARC を作製することが可能となった。

Artificial Red Cells (ARC) were prepared by encapsulating purified hemoglobin (Hb) with polymerizable phospholipids in which dipalmitoylphosphatidylcholine, cholesterol and palmitic acid had been used with 1-acyl-2-(2,4-octadecadienoyl)-phosphatidylcholine. After performing  $\gamma$ -ray irradiation, Hbs encapsulated in vesicles were susceptible to oxidize to form methemoglobin (MetHb). Indeed, 60% of Hb in ARC changed to MetHb after the following incubation at 37°C for 24 hours. We investigated the effects of lipid composition and  $\gamma$ -ray irradiation dose rate on the MetHb formation of encapsulated Hb. The formation of MetHb decreased to 40% when sodium palmitate or dimyristoylphosphatidylglycerol sodium salt was used instead of palmitic acid. The results indicated that the interaction between palmitic acid and Hb might cause denaturation of Hb. Furthermore, the formation of MetHb significantly decreased when the irradiation was carried out in the presence of the large amount of untrapped Hb together with Hb in vesicles. The result indicated that Hb outside the vesicles significantly protected the encapsulated Hb from attack by excess radicals possibly generated during  $\gamma$ -ray irradiation. From these findings, the acceleration of MetHb formation in ARC with  $\gamma$ -ray irradiation can be inhibited by using sodium salt instead of fatty acid together with placing a sufficient amount of Hb outside vesicles. — Key Words: Methemoglobin, Polymerizable phospholipids, Liposome,  $\gamma$ -ray irradiation.

### 1. 緒言

筆者らは、期限切れヒト濃厚赤血球から赤血球膜を除去し、精製および濃縮したストローマフリーヘモグロビン (SFHb) を用い、リン脂質を主成分としたリポソームによりカプセル化させた人工赤血球 (Artificial Red Cells: ARC) の開発を行っている。リポソーム型人工赤血球は溶液粘度やコロイド浸透圧が低く、生理的条件下での Hb の高濃度化が可能であり、アロステリック因子等の添

加物の封入が可能である等の利点がある(1,2)。ARC は、リン脂質のアシル鎖に重合性基を導入し、 $\gamma$  線重合により膜を強化させているために、血中安定性及び保存安定性に優れたリポソーム型人工赤血球である(3-5)。

天然赤血球から精製したヘモグロビン (Hb) を用いた人工酸素運搬体の研究は盛んに行われている(6-10)が、従来より Hb が酸化型の methemoglobin (MetHb) に変化しやすいという問題点があった。赤血球内においては、Fig. 1 に示したような MetHb 還元酵素系が働いているために MetHb 量は 1% 以下に抑制されている。

ARC の原料である SFHb 溶液を調製する際は、分画分子量

日本油脂(株)筑波研究所, 〒300-26 つくば市東光台5-10, Tsukuba Research Laboratory, NOF Corporation, Tokodai 5-10, Tsukuba 300-26, Japan.  
論文受付 1995年6月28日, 受理 1995年7月30日。

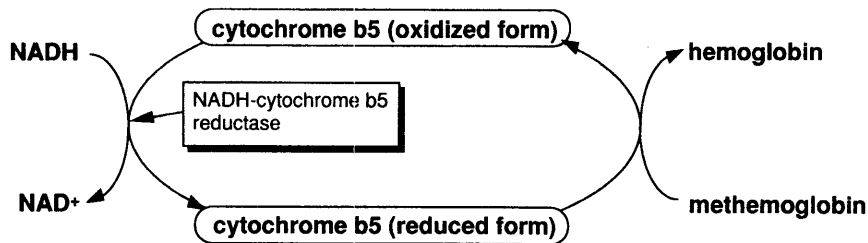


Fig. 1. Methemoglobin reduction system.

10,000の限外濾過膜を用いているために、還元酵素系の分子量33,000のNADH-cytochrome b5 reductase および分子量16,000のcytochrome b5は、除去されずに残存することを確認している(data not shown). 従ってARC作製の際、SFHb溶液中にNADHを添加してFig. 1に示したMetHb還元酵素システムを働かせることにより、MetHbの生成を抑制できると考えられる。そこでNADH添加がMetHb生成に及ぼす影響をARCにて測定するとともに、ARCの構成脂質および $\gamma$ 線照射がMetHb生成に及ぼす影響を検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1. ARC作製法

#### SFHb溶液の調製

期限切れヒト濃厚赤血球から従来法(11, 12)により溶血液を得た後、遠心分離及びBMM (Benbehrug Microporous Membrane, 平均孔径35 nm, 旭化成) 処理を行い、赤血球膜を除去した。その後、透析用限外濾過膜を用いてイオン濃度調整、緩衝液置換および濃縮を行った。ARC作製中のメト化防止のために、得られたSFHbを一酸化炭素(CO)で置換した後、メト化抑制の還元補酵素であるNADHおよび酸素親和性調節因子であるpyridoxal-5'-phosphate(PLP), さらにNaClを添加して濃厚SFHb溶液を得た(Hb濃度34 g/dL, pH7.3)。

#### 濃厚SFHb溶液のリポソーム化

混合脂質には重合性リン脂質である1-acyl-2-(2,4-octadecadienoyl)-phosphatidylcholine (AODPC, 日本油脂), dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC, 日本油脂), cholesterol (Chol, 和光純薬)およびpalmitic acid (PA, 日本油脂)を均一混合(モル比3.5:3.5:7:2)したものを用いた。

混合脂質とSFHb溶液を混合して水和し、Extruder(日油リポソーム)により3.0  $\mu$ mから0.2  $\mu$ mまでの濾過膜を順次通過させ、粒径を制御(造粒)した。内包されなかったSFHbをホローファイバー(Plasmaflo AP-02, 旭メデイカル)を用いて除去した後、4°Cにて $\gamma$ 線照射(<sup>60</sup>Co, 5 kGy/h, 1hr)することにより脂質二分子膜を重合した(13,14)。酸素ガスによりCOを脱離した後、ホローファイバーを用いて精製し濃縮を行いARC懸濁液を得た。

抗酸化剤を含有するARCは、AODPC, DPPC, CholおよびPAに $\alpha$ -tocopherolあるいはbutylated hydroxytoluene (BHT)をモル比3.5:3.5:7:2:0.3の割合で配合したものを均一に混合して作製した。また、金属キレート剤を含有するARCは、3 mMのedetate disodium (EDTA)をSFHb溶液にあらかじめ添加して作製した。

PA-NaおよびDMPG-Naを含有するARCは、混合脂質にAODPC:DPPC:Chol:PA-Na, あるいはDMPG-Naをモル比3.5:3.5:

7:2の割合で配合したものを均一に混合して作製した。

$\gamma$ 線照射の線量率を検討した実験では線量率を1-5 kGy/hまで変化させて重合を行い、ARCを得た。 $\gamma$ 線照射時の脂質濃度について検討した実験では、照射時の脂質濃度を2, 5, 10および15 g/dLと変化させて重合した。

外水相Hb存在下で $\gamma$ 線照射した実験では、SFHbと混合脂質を水和し、内包されなかったHbを除去せずに脂質濃度2%まで希釈して $\gamma$ 線照射を行った。外水相Hb濃度が0.5, 1.0 g/dLの系に関しては、造粒後洗浄した後に、各々の濃度のHb溶液を外水相に添加し $\gamma$ 線照射を行った。 $\gamma$ 線照射後、ホローファイバーを用いて内包されなかったSFHbを除去してARC溶液を精製し濃縮した。

### 2.2. ARCのメト化率測定法

様々な条件で作製したARCを37°Cに保存し、0, 12, 24, 36, 48 時間後にそれぞれ25 mL採取し、Hb濃度が100 mg/mLになるように希釈した。次にアルゴンガスによりオキシヘモグロビンをデオキシヘモグロビン(DeoxyHb)に変化させ、紫外可視分光光度計(島津製作所製, UV-240)を用いて430nmのDeoxyHbの吸光度減少率からメト化率を求めた。

## 3. 結果および考察

Fig. 2に重合ARC, 未重合ARCおよびSFHb溶液を37°Cで保存した場合のメト化率の経時的変化を示した。ARC中HbおよびSFHb

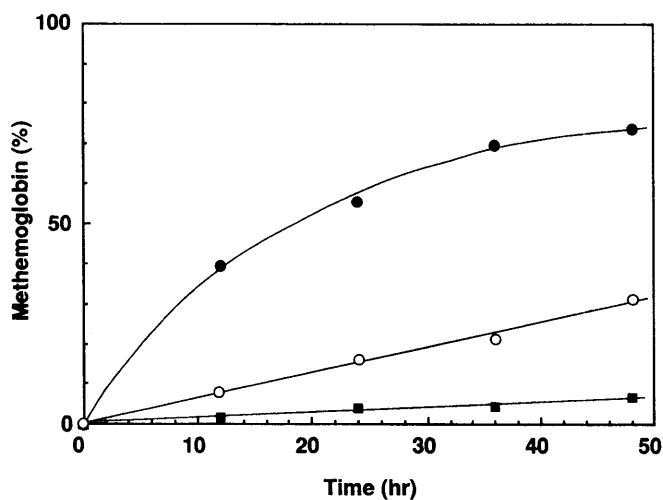


Fig. 2. Accumulation of methemoglobin in ARC *in vitro* at 37°C after the  $\gamma$ -ray irradiation. ●, irradiated ARC; ○, unirradiated ARC; ■, unirradiated SFHb solution.

溶液中には、5 mMのNADHが添加されている。24時間後のメト化率はSFHb溶液で2%、未重合ARCで15%、重合ARCでは60%以上を示した。このように、Hb溶液と比較してARC中のHbは顕著にMetHbに変化し易いことから、NADHを添加するだけではARCのメト化を低下させることはできないと判断した。そこで、この問題を解決するために、構成脂質および $\gamma$ 線照射がARCのHbのメト化にどのような影響を及ぼすかについて詳細な検討を行った。

ARC構成脂質中には重合性リン脂質であるAODPCが22モル%含有されている。このことから重合性リン脂質の脂質過酸化がメト化を促進させている(15)と考え、抗酸化剤である $\alpha$ -tocopherolおよびBHTを構成脂質中に含有させ、ARCのメト化率の経時変化を測定した。また、Hb中の鉄が遊離して脂質の過酸化を誘導する(16, 17)ことも考えられたので、金属キレート剤であるEDTAをSFHb溶液中に添加してARCを作製し、同様にメト化率を測定した(Fig. 3)。その結果、抗酸化剤によるメト化の抑制効果は認められなかった。さらに、抗酸化剤無添加のARCの脂質を抽出し過酸化価を測定したところ、顕著な上昇は認められなかった(data not shown)ことから、メト化促進の原因は脂質過酸化によるものではないと推察した。また、EDTAを添加した系においては逆にメト化が促進される傾向が認められた。この結果からEDTAのカルボキシル基が、Hbに作用してHbの安定性に影響を及ぼしたのではないかと考えた。さらにARCの脂質膜に組み入れている脂肪酸もEDTAと同様にHbに作用してメト化を促進している可能性も考えられた。

脂肪酸がHbのメト化を誘導するという考えは、Szebeniら(18)によっても報告されている。ARCの構成脂質中には負荷電物質としてPAが12.5モル%含まれているため、脂肪酸がメト化促進に及ぼす影響について検討した。構成脂質中のPAをナトリウム塩であるPA-Naまたは、DMPG-Naに置換してARCを作製し、37°Cにおけるメト化率の経時変化を測定した(Fig. 4)。PAを用いた系のARCは24時間後で約60%のメト化率を示したのに対し、PA-NaおよびDMPG-Naを用いた系においては24時間後で約40%とPAの系と比較して顕著なメト化抑制効果が認められた。PAを含有す

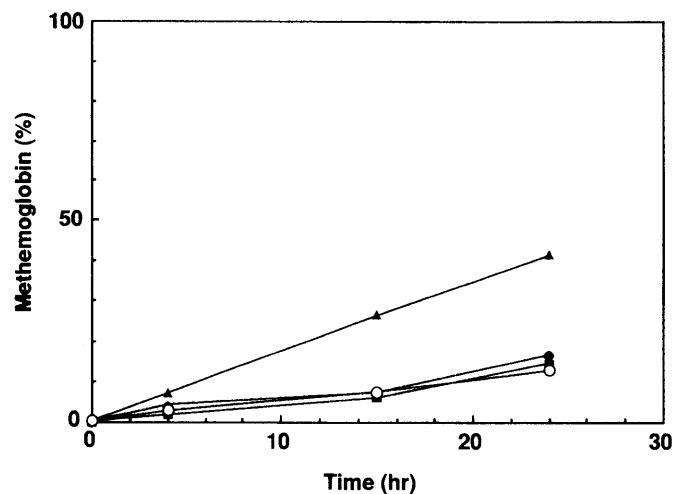


Fig. 3. Methemoglobin formation in unirradiated ARC *in vitro* at 37°C in the presence of antioxidant or metal chelator. ●, ARC with  $\alpha$ -tocopherol; ■, ARC with BHT; ▲, ARC with EDTA; ○, ARC control.

る混合脂質をpH 7.4の緩衝液と混合した場合、系のpHは約5まで低下するが、pH 7.4のHb溶液と混合した場合はpH 7.2-7.3程度までの低下しか認められない(data not shown)。PAを用いた場合はHbがpHを維持するための緩衝剤として作用しており、PAとHbのアミノ基が相互作用してMetHbに変化し易いような構造に変化していると考えられる。一方、ナトリウム塩を用いた場合は中和されているため、安定な構造を維持していると推測した。これらの結果から、PAのカルボキシル基の及ぼすHbへの影響が、PA-NaまたはDMPG-Naに置換することにより緩和されたことによるものと考えられる。

次に $\gamma$ 線照射による影響について検討した。製剤としての安定性を保つため、ARCでは $\gamma$ 線重合を行うことにより脂質膜を強化している。しかしながら、前述したように重合ARCは未重合ARCと比較して37°Cにおけるメト化の進行が顕著である。そこ

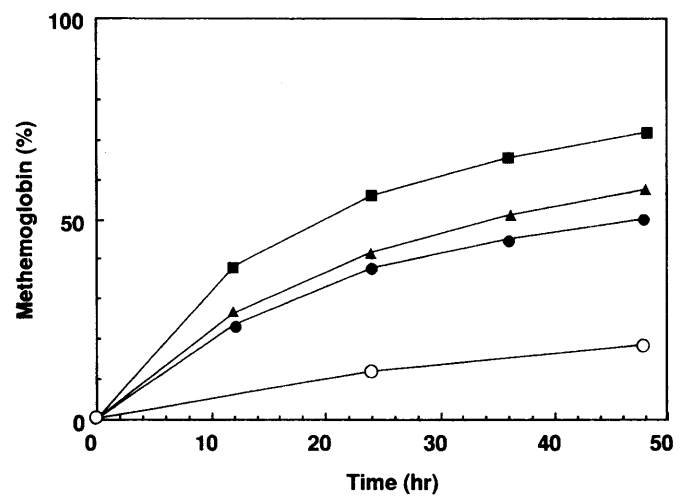


Fig. 4. The effect of lipid composition on the methemoglobin formation in ARC *in vitro* at 37°C. ■, palmitic acid; ●, sodium palmitate (PA-Na); ▲, dimyristoylphosphatidylglycerol sodium salt; ○, PA-Na, unirradiated.

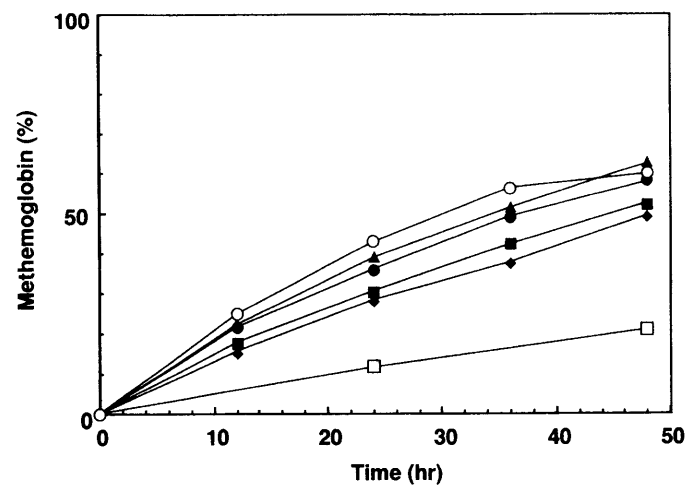


Fig. 5. Methemoglobin formation in ARC *in vitro* at 37°C after the  $\gamma$ -ray irradiation for 1 hr at different dose rate. Lipid composition, AODPC/DPPC/Chol/DMPG-Na; ◆, 1 kGy/h; ■, 2 kGy/h; ▲, 3 kGy/h; ●, 4 kGy/h; ○, 5 kGy/h; □, unirradiated.

で重合による影響を詳細に調べるために、 $\gamma$ 線照射時の吸収線量率及びARC濃度について検討した。

ARCでは5 kGy/hで1時間の $\gamma$ 線照射を行っているが、線量率が過剰であるために顕著なメト化率の上昇が認められるのではないかと考え、1-5 kGy/hの線量率で各々1時間照射したARCの37°Cにおけるメト化率の経時変化を測定した(Fig. 5)。その結果、線量率に依存してメト化率が上昇する傾向が認められた。しかしながら、1および2 kGy/hで照射したARCはMetHbの生成率は抑制されたものの、重合率は60-70%と低かった。3 kGy/h以上の線量率ではメト化速度にほとんど差が認められず、重合率も80%以上を示した。この結果から、線量率を低下させればメト化率低下にともない重合率も低下することがわかった。さらに線量率の低い系でも未重合ARCと比較するとメト化速度の促進が認められることから、 $\gamma$ 線照射による重合とHbのメト化への影響は同時に起こることが示唆され、線量率の調整のみではメト化を抑制できない

ことが示された。

ARCの $\gamma$ 線照射時の脂質濃度は2%であるが、脂質濃度即ち内包Hb濃度が低いために、 $\gamma$ 線による影響を受けやすいのではないかと考え、 $\gamma$ 線照射時のARCの脂質濃度を2, 5, 10および15%と変化させた場合の37°Cにおけるメト化率の経時変化を測定した(Fig. 6)。その結果、 $\gamma$ 線照射時にARCが高濃度であるほど、メト化速度は低下する傾向が認められ、脂質濃度15%の系では24時間後で20%までメト化率が低下していた。ARCが低濃度の系では、一定線量の $\gamma$ 線により何らかの損傷を受けるHbの割合が高くなることを考慮に入れると、水の $\gamma$ 線による分解によって生じるラジカルが関与している可能性が示唆された。この結果から、外水相に過剰なラジカルを捕捉する物質が存在すれば、ARCに内包されているHbへの影響は軽減できると考えられた。

そこで造粒の際に内包されなかったHbを従来は除去していたが、除去せずに外水相にHbが存在したままで $\gamma$ 線照射した系について検討した。造粒後の脂質濃度は10%であるが、従来法では $\gamma$ 線照射の際の脂質濃度は2%であることを考慮に入れ、造粒後脂質濃度2%まで希釈した系(この時の外水相Hb濃度は6.0 g/dLとなる)についてメト化率の経時変化を測定した。また、 $\gamma$ 線照射時における外水相のHb濃度の効果を検討するため外水相のHb濃度を0.5, 1.0 g/dLと低下させ、同様に検討した(Fig. 7)。その結果、造粒後Hbを除去せずに、脂質濃度2%まで希釈して $\gamma$ 線照射を行った系については、37°C保存下24時間後でメト化率が15%を示し、未重合ARCと同程度であった。また、1.0 g/dLの系と比較すると効果は小さいが、外水相のHb濃度0.5 g/dLにおいてもメト化抑制効果が認められた。従って、外水相中Hbは比較的低濃度でもメト化速度を低下させることがわかった。これらの結果から、外水相のHbが $\gamma$ 線照射による内包Hbへの影響を軽減していることが示唆された。 $\gamma$ 線照射によるARCのメト化にはラジカルが関与しており、発生した過剰のラジカルを外水相のHbが捕捉していると推測される。

以上の結果から、ARCの構成脂質中の荷電物質をPAからPA-NaまたはDMPG-Naに置換し、 $\gamma$ 線照射時の外水相にHbを存在させることにより、37°C保存下24時間後においてARCのメト化率を20%以下まで低下させることができた。今後、外水相にラジカル捕捉剤をはじめとする種々の水溶性化合物を添加して、メト化速度との相関を調べ、ARCのメト化促進のメカニズムについて解明する予定である。

#### 参考文献

1. 関口定美, 伊藤敬三. 人工血液—研究の現状とその将来. 月刊薬事 1989;31:711-8.
2. 土田英俊, 西出宏之. 血液代替物: ヘモグロビン再利用と全合成ヘム. 生体材料 1992;10:81-8.
3. Nakachi O, Tokuyama S, Satoh T. Characteristics of polylipid/Hb vesicles (ARC) (in vivo and in vitro test). Biomater Artif Cells Immobil Biotecnol 1992;20:635-40.
4. Morizawa K, Akama K, Kawakami Y. Stability and blood compatibility of polylipid/Hb. Biomater Artif Cells Immobil Biotecnol 1992;20:641-5.
5. 徳山悟, 守沢和也, 松本浩幸, 仲地理, 土田英俊, 関口定美. 重合

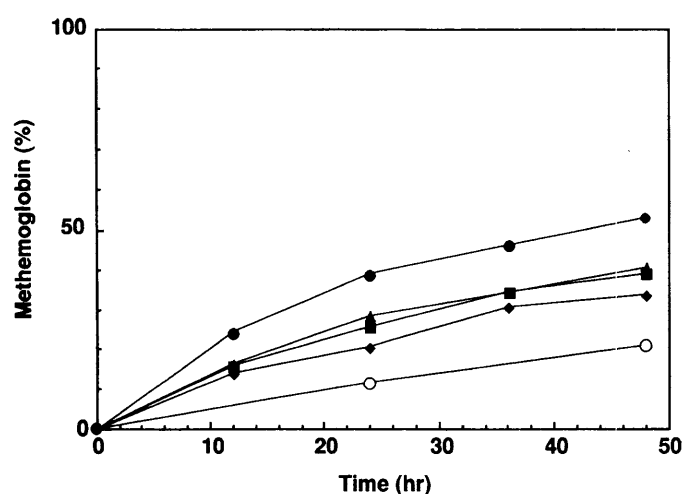


Fig. 6. The influence of lipid concentration during the  $\gamma$ -ray irradiation on the methemoglobin formation in ARC *in vitro* at 37°C. The concentrations of lipid examined were: ●, 2%; ▲, 5%; ■, 10%; ◆, 15%; ○, unirradiated.

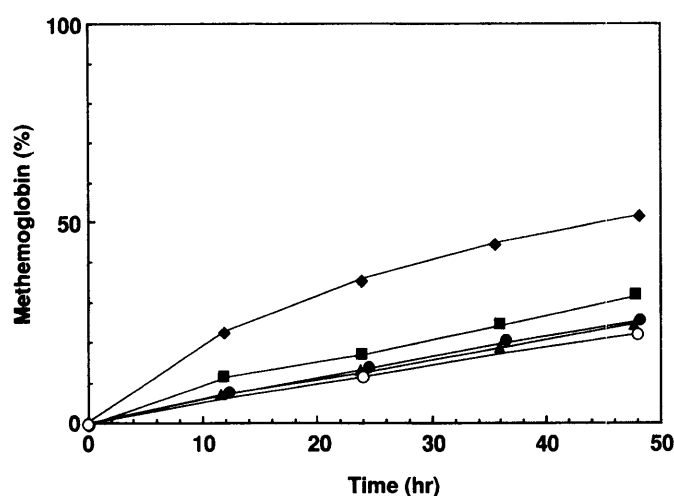


Fig. 7. Suppression of methemoglobin formation in ARC *in vitro* at 37°C by the presence of outer hemoglobin (Hb) during the  $\gamma$ -ray irradiation. The Hb concentrations outside ARC were: ■, 0.5 g/dL; ▲, 1.0 g/dL; ●, 6.0 g/dL; ◆, no outer Hb; ○, unirradiated.

- 性脂質を利用したヘモグロビン内包小胞体の調製とその特性. 人工臓器 1992;21:309-12.
6. Djordjevich L, Miller IF. Synthetic erythrocytes from lipid encapsulated hemoglobin. *Exp Hemat* 1980;8:584-92.
  7. Synder S, Welty E, Walder R, Williams L, Walder J. HbXL99: A hemoglobin derivavative that is cross-linked between the subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7280-4.
  8. Sakai H, Takeoka S, Seino Y, Tsuchida E. Suppression of methemoglobin formation by glutathione in a concentrated hemoglobin solution and in a hemoglobin vesicle. *Bull Chem Soc Jpn* 1994;67:1120-5.
  9. Rabinovici R, Rudolph A, Ligler F, Smith E, Feuerstein G. *Circ Shock* 1992;37:124-33
  10. Spring A, Rabinovici R. Liposome encapsulated hemoglobin: a potential artificial blood substitute. *Drug of the Future* 1993;18: 249-53.
  11. Benesch RE, Benesch R, Renthal R, Maeda N. Affinity labeling of the polyphosphate binding site of hemoglobin. *Biochemistry* 1972; 11:3576-80.
  12. Antonini E, Bernardi L R, Chiancone E. *Methods Enzymol.* 76, Hemoglobins. ACADEMIC PRESS, London 1981, 5.
  13. Ohno H, Ogata Y, Tsuchida E. Gamma-ray polymerization of phospholipids having diene or triene groups as liposomes. *J Polym Sci :part A Polym Chem* 1986;24:2959-69.
  14. 赤間和博, 徳山悟, 細井文雄, 大道英樹. 重合性リン脂質からなるリポソームの $\gamma$ 線重合. *高分子学会予稿集* 1992;41:3532.
  15. Pietrazak WS, Miller IF. Oxidative interaction between hemoglobin and egg lecithin liposomes. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1989; 17:563-82.
  16. Itabe H, Kobayashi T, Inoue K. Generation of toxic phospholipids during oxyhemoglobin induced peroxidation of phosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* 1988;961:13-21.
  17. Szebeni J, Eskelson CD, Chavapil M. The effect of zinc on iron-induced lipid peroxidation in different lipid systems including liposomes and micelles. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1988;20: 205-11.
  18. Szebeni J, Winterbourn CC, Carrell RW. Oxidative interaction between haemoglobin and membrane lipid. *Biochem J* 1984;220: 685-92.

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

### HEMOSOL, ENZONはそれぞれフェーズIを開始した

■HEMOSOL社は, "Hemolink"と命名されたセルフリー型ヘモグロビン修飾体によるフェーズI試験を開始した。L.A.B. Pharmacological Research InternationalのMontrealにおける施設で実施され、36名の健康なボランティアに少量投与された。このフェーズIは夏までに終了する見込みであるが、5月の段階では副作用は認められないという。

■一方、ENZON社もウシヘモグロビンの化学修飾体である"PEG-hemoglobin"のフェーズIをRobert Wood Johnson Medical Schoolにおいて開始した。5月の段階で8名のボランティアに投与された。やはり、夏までにフェーズIを終了予定という。

(INTERNATIONAL BLOOD/PLASMA NEWS 12(10), May 1995より)

(文責 編集委員会 仲井)

## ヘモグロビン小胞体の酸素輸送に関するラット交換輸血試験

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

## Evaluation of oxygen transport of hemoglobin vesicles by exchange transfusion in rats

Hiroshi Sakai<sup>1</sup>, Yotaro Izumi<sup>2</sup>, Takeshi Yamahata<sup>2</sup>, Kenichi Hamada<sup>1</sup>, Shinji Takeoka<sup>1</sup>, Hiroyuki Nishide<sup>1</sup>,  
Koichi Kobayashi<sup>2</sup>, Eishun Tsuchida<sup>1</sup>

ヘモグロビン小胞体(HbV)を麻酔下ラットに約40%交換輸血し、酸素電極による腎皮質酸素分圧や平均動脈圧(MAP)、血液ガス分析値の推移をラット洗浄赤血球投与の場合と比較して酸素運搬能を評価した。HbVの粒径は $251 \pm 87$  nmに揃えられており、Hb濃度は10 g/dL、酸素親和度( $P_{50}$ )は32 mmHgであるから、ヒト血液と同等の酸素放出量(計算)を持つ。HbVは脂質濃度が低いため低粘度(2.6 cP(230  $s^{-1}$ ))を示す。血液混合系では低ズリ速度領域で粘度上昇が認められたが、血管内ではこれよりズリ速度は高くなるので本実験系では特に問題は無い。HbV投与群に対し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)投与群、ラット洗浄赤血球(ratRBC, [Hb]:10 g/dL)投与群、HbV内のHbをメト化させたHbV(metHbV)の投与群を対照として試験した。HbV群では交換後MAPは低下したものの交換前の $74 \pm 12\%$ に留まり、ratRBC群とはほぼ同様であるのに対し、PBS群やmetHbV群では各々 $34 \pm 14\%$ 、 $36 \pm 8\%$ まで低下した。左腎皮質酸素分圧は、PBS群では交換前の $45 \pm 13\%$ 、metHbV群は $43 \pm 5\%$ にまで低下、しかし、HbV群ではratRBC群( $84 \pm 9\%$ )と同様に $75 \pm 12\%$ と比較的高く保たれていた。HbV群の血液ガスパラメータもRBC群と同等に推移、血小板数にも異常を認めなかった。結論として、HbVは酸素運搬体としてratRBCと同等効力を有すると判断した。

The oxygen transporting behavior of hemoglobin-vesicles (HbV) was evaluated in comparison with red blood cells (RBCs) by observing the response to the exchange transfusion of HbV in anesthetized rats, monitoring the oxygen tension of renal cortex ( $P_{O_2}$ ), mean arterial blood pressure (MAP) and blood gas parameters. The diameter of the HbV and the Hb concentration were  $251 \pm 87$  nm and 10 g/dL, respectively. Oxygen affinity;  $P_{50}$  was 32 mmHg, and the oxygen transporting efficiency (the difference in  $O_2$  saturation between 40 mmHg and 110 mmHg) was 38%. The mixture of HbV and blood showed an increase in viscosity at lower shear rate ( $< 46 s^{-1}$ ), whereas this level of viscosity increase would not be so serious in this experiment since the shear rates in blood stream are high ( $> 30 s^{-1}$ ). After 40% exchange transfusion with HbV, MAP changed to  $74 \pm 12\%$  of the initial value, which was almost the same with the ratRBC group ( $84 \pm 9\%$ ), while the exchange transfusion with phosphate buffered saline (PBS) and metHbV decreased MAP down to  $34 \pm 14\%$  and  $36 \pm 8\%$ , respectively. After the exchange transfusion with HbV,  $P_{O_2}$  changed to  $75 \pm 12\%$  of the initial value, which was close to the ratRBC group ( $84 \pm 9\%$ ). The PBS and metHbV groups showed as low as  $45 \pm 13\%$  and  $43 \pm 5\%$ , respectively. Blood gas parameters of the HbV group showed the same profiles as those of the ratRBC group. No abnormality was observed for the number of platelet. These results indicate that the HbV has almost the same oxygen transporting ability as RBC. —Key Words: Hemoglobin, Hemoglobin-Vesicles, Red Cell Substitutes, Oxygen Transport, Exchange Transfusion, Tissue Oxygen Tension.

### 1. 緒言

ヘモグロビン(Hb)を用いた赤血球代替物の開発では、特に修飾Hb系やリコンビナントHbなど、いわゆる裸のHbを用いる系で臨床試験が進んでいる現状である(1-3)。しかし生体系ではHbは生

体膜で被覆されており、この生理学的意義に関連した問題点も指摘されている(4)。一方で赤血球と類似構造を持つ赤血球代替物：ヘモグロビン小胞体(HbV)の性能向上のため、我々は以下の3点を工学的な立場から検討してきた(5-8)。(1)除菌(フィルタ処理)可能な粒径で、できるだけ少量の脂質から構成された小胞体中に高濃度のHbを含む構造(高い内包効率)が重要であり、調製段階での構成分子間の静電的相互作用や、構成分子の運動性の制御により性能向上が認められた(9)。(2)アロステリック因子添加による酸素親和度制御で、酸素運搬効率を高めることを可能とした。また、

<sup>1</sup>早稲田大学工学部高分子研究室, Department of Polymer Chemistry, Waseda University, <sup>2</sup>慶応義塾大学医学部外科, Department of Surgery, School of Medicine, Keio University.  
早稲田大学工学部高分子研究室, 〒169 東京都新宿区大久保3, Department of Polymer Chemistry, Waseda University, Tokyo 169, Japan.  
論文受付 1995年6月23日, 受理 1995年8月5日。

[3] 我々が開発したHb精製法では、赤血球中のHbを一酸化炭素錯体(HbCO)にした後、加熱処理にて夾雑蛋白質を変性除去、ウイルスを不活化するので、常に同一品質の高純度Hbを供給することができる(10)。しかし、metHb還元酵素系の消失によりHbは経時的にメト化して酸素運搬能が減少するが、これは還元剤添加により抑制可能である(11)。今回は以上の進展項目を兼備したHbVを用いて動物投与試験を行った。

赤血球代替物とは、末梢組織へ酸素運搬する赤血球の機能代替物である。これを実際に観察し効果を証明するために、これまでに幾つかの評価法が検討されている。投与時の動脈血と混合静脈血の各酸素含有量の差と心拍出量との積から酸素消費量を見積る方法や(12, 13)、吸気と呼気の酸素と二酸化炭素の分圧差から酸素消費量を算出する方法(14)などが知られているものの、特定臓器での酸素需給バランスを直接確認した報告は少ない。また、これまでにHbVのin vivo 試験結果が多く報告されているが(14-16)、それらの物性(Hb濃度、酸素親和度、メト化率、粒径など)や投与量から考えると、酸素運搬の効力を具体的に示した例は少ない。本研究ではHbV用いた麻酔下ラットの交換輸血試験を行い、酸素電極を腎皮質に刺入して酸素分圧を観察した。酸素電極を用いて腎皮質の組織酸素分圧を測定した例は、Nelimarkkaら(17)や後藤ら(18)により報告されている。本研究では更に血液ガスや血圧も同時に測定し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)と、ラット洗浄赤血球(ratRBC)、および酸素輸送能を持たないmetHbVとの比較から酸素運搬能を評価した。

## 2. 方法

### 2.1. HbVの調製

HbVは既報に従い無菌条件にて調製した(8-11, 19)。Hbの精製は、一度赤血球製剤として保存した赤血球内のHbを一酸化炭素化した後、有機溶剤処理、加熱処理、透析、濃縮を経て濃厚な精製HbCO溶液(40 g/dL)を得た(10)。これにDL-homocysteine (Hcy, Aldrich)を15 mM, pyridoxal 5'-phosphate (PLP, Merck)をHbに対し

て3倍mol添加した。膜成分には、1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC), cholesterol, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol (DPPG) (日本精化), および $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -Toc, Merck)を用い、組成比をDPPC/cholesterol/DPPG/ $\alpha$ -Toc=10/10/2/0.2 (モル比)とした。この混合脂質をHbCO溶液に分散して得られた多重層小胞体をエクストルージョン法により最終的に孔径0.22  $\mu$ mのフィルターを透過させて粒径を制御した。外水相のHbを洗浄除去後、酸素気流下HbVが形成する液膜に可視光照射することによりHbCOをHbO<sub>2</sub>に変換し(19)、PBS (pH 7.4, 37°C)に分散させてHb濃度を10 g/dLに調節した。HbVをACD加ヒト新鮮血(Hct: 50%), 血漿, 5% albumin (Albumin cutter, Bayer Co.), ヒト洗浄赤血球([Hb]: 15 g/dL)と混合したときの粘度を、回転粘度計(VS-AK, 芝浦システム)により37°Cにて測定した。

### 2.2. 洗浄赤血球, metHbVの調製

交換輸血試験の対照試料である洗浄赤血球(ratRBC)の調製は、ヘパリン加ラット脱血液をPBSで2回洗浄しHb濃度を10 g/dLに調節した。また、交叉試験により凝集が起こらないことを確認した。metHbVは、一酸化窒素(NO)結合Hb (HbNO)をO<sub>2</sub>の存在下metHbに変換(20)させて調製した。HbV分散液をN<sub>2</sub>で脱気した後、NOでHbNOとする。再度N<sub>2</sub>で余剰NOを排気後、O<sub>2</sub>と接触させてmetHbとした。分散液をPBSにて洗浄後、Hb濃度を10 g/dLに調節した。metHbVの粒径と粘度は、HbVの値と同等であった。

### 2.3. 交換輸血試験

Wistar系ラット(雄, 体重374 $\pm$ 16 g)に、pentobarbital sodium (Nembutal)を腹腔内注射(1 mL/kg)して全身麻酔後背位に固定、右鎖骨上部を切開し上大静脈にカテーテル(PE-20, 内径0.5 mm x 外径0.8 mm)を挿入し、Vラインを作成した(Fig. 1)。また顎二腹筋を縦方向に切開、同サイズのカテーテルを右内頸動脈に挿入しAラインを作成、血圧測定装置(Polygraph system, 日本光電)に接続

1. Wistar rats (male, 374  $\pm$  16 g).
2. Anesthetization with intraperitoneal injection of pentobarbital.
3. Cannulation into jugular vein and carotid artery.
4. Abdominal incision and insertion of needle type O<sub>2</sub>-electrode into renal cortex.
5. 40% Exchange transfusion (1 ml/min) with HbV, metHbV, PBS, or ratRBC.
6. Monitoring of Pto<sub>2</sub>, MAP, blood gas parameters, and PLT numbers.

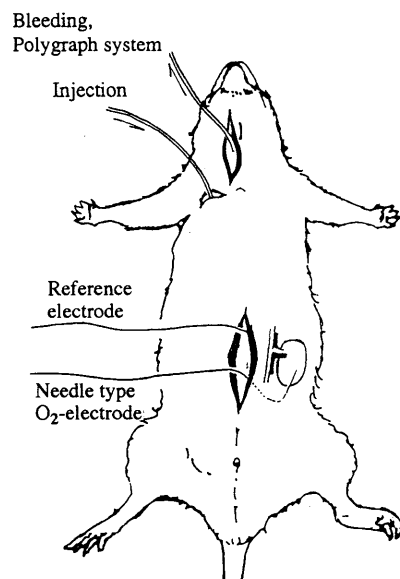
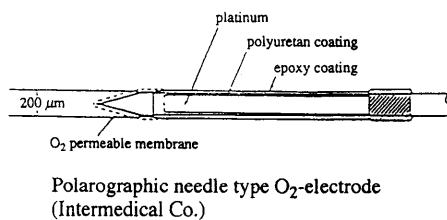


Fig. 1. Schematic representation of the experimental model.



した。開腹して左腎皮質に針型Clark式酸素電極(POE-10N, Intermedical)を刺入固定, Pto<sub>2</sub>を測定した。Pto<sub>2</sub>値が安定した時点でAラインより1 mLずつ脱血後Vラインより1 mLずつ試料投与する操作を9-11回繰り返す, 総血液量(56 mL/kg)の約40%を交換した。PBSによる交換輸血では40%が限界と考え, 全群とも交換率40%で比較することにした。また, 交換輸血前, 直後, 30分後の血液ガス分析(Corning 170 pH/blood gas analyzer, Corning Medical), 更に血小板数(PLT)の測定(Systemex E-400, Toa Medical Electronic Co., Ltd.)を実施した。HbV群(n=7)に対し, 対照群としてPBS群(n=10), metHbV群(n=4)およびラット洗浄赤血球投与群(ratRBC群, n=6)を設けて研究を行った。

## 2.4. 数値解析

初期値からの変化を各群間で比較するため, MAP, Pto<sub>2</sub>, 動脈血酸素分圧(PaO<sub>2</sub>)に関しては初期値を100%とした時の変化として, また, pH, 塩基余剰(BE), PLTに関しては, 初期値からの変化量として表記した。また測定値はすべて平均±標準偏差とした。各群間の有意差検定には, 分散分析法(ANOVA, analysis of variance)およびFisherのPLSDテストを用いた。有意水準は危険率5%とした。

## 3. 結果

### 3.1. Hb小胞体の特徴

得られたHbVの特徴をTable 1にまとめた。粒径は251±87 nm程度に制御されていた。metHb濃度は3%以下, HbCO濃度は2%以下であった。非酵素的還元剤としてHcyを添加することにより, 初期のメト化速度は1.4%/h程度に抑制された(11)。アロステリック因子としてPLPをHbに対して3倍mol添加することにより, 酸素親和度(P<sub>50</sub>)は32 mmHgに制御できた。ラット赤血球のP<sub>50</sub>は35 mmHgであり(21), HbVと同等である。Hb濃度を10 g/dLとしても脂質濃度は6.2 g/dLで溶液粘度は2.6 cP(230 s<sup>-1</sup>)に留まり, 血液の粘度(4.4 cP)よりも低い。

血液成分とHbVの混合比を変化させて粘度を測定した結果を

Table 1. Characteristics of HbV and human RBC

Parameters	HbV	RBC
Diameter (nm)	251±87	8000
Hb (g/dL)	10	15
P <sub>50</sub> (mmHg)	32	28
Hill number	2.2	2.5
OTE (%) <sup>a</sup>	38	28
O <sub>2</sub> release (mL/dL)	6.2	7.0 <sup>c</sup>
MetHb (%)	< 3	< 0.5
HbCO (%)	< 2	< 5
pH (at 37°C)	7.4	7.4 <sup>c</sup>
Π <sup>b</sup> (mmHg)	ca. 0	ca. 25 <sup>c</sup>
Viscosity (cP at 230 s <sup>-1</sup> )	2.6	4.4 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> oxygen transporting efficiency (the difference in oxygen saturation between 40 and 110 mmHg), <sup>b</sup> oncotic pressure, <sup>c</sup> for human blood.

Fig. 2にまとめた。新鮮血と混合した場合, 40%の交換率にて粘度の極大が認められた。またズリ速度が46 s<sup>-1</sup>以下と小さくなるに従い粘度が増大した。洗浄赤血球との混合では特異的な粘度上昇は一切認められず, また血漿との混合ではHbVが60%のところで粘度の極大を示した。

### 3.2. HbVの交換輸血試験における血圧と末梢酸素分圧の推移

Fig. 3にPBSおよびHbVを投与した場合の血圧および腎皮質のPto<sub>2</sub>の変化の典型例を示した。また, 各群の統計的処理を行った結果をFig. 4aおよび4bに示した。通常, 非麻酔下での血圧は150 mmHg程度を示すが, 麻酔下では約100-120 mmHgで定常になった。HbV群では交換後, 血圧は交換輸血前の73±12%まで低下したが, ratRBC群も82±28%まで低下し, HbV群と同等であった。一方, 腎皮質のPto<sub>2</sub>は17-25 mmHgであったが脱血-HbV投与の反復に対応し徐々に低下, 交換輸血前の75±12%になった。40%交

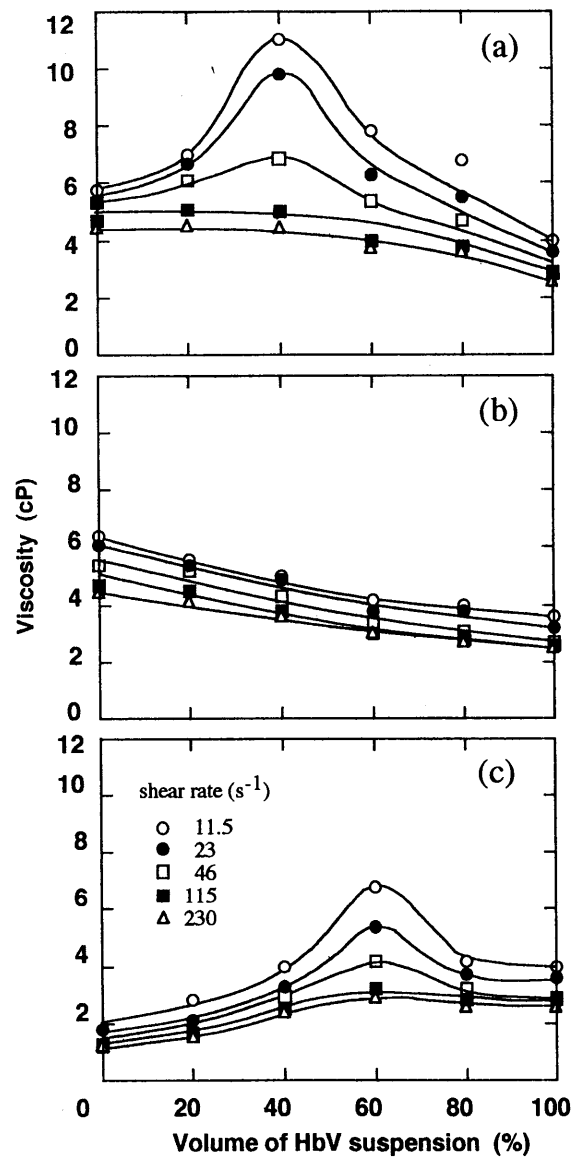


Fig. 2. Viscosity of the mixture of HbV with (a) human blood containing ACD, (b) human washed red blood cells and (c) human plasma (37°C).

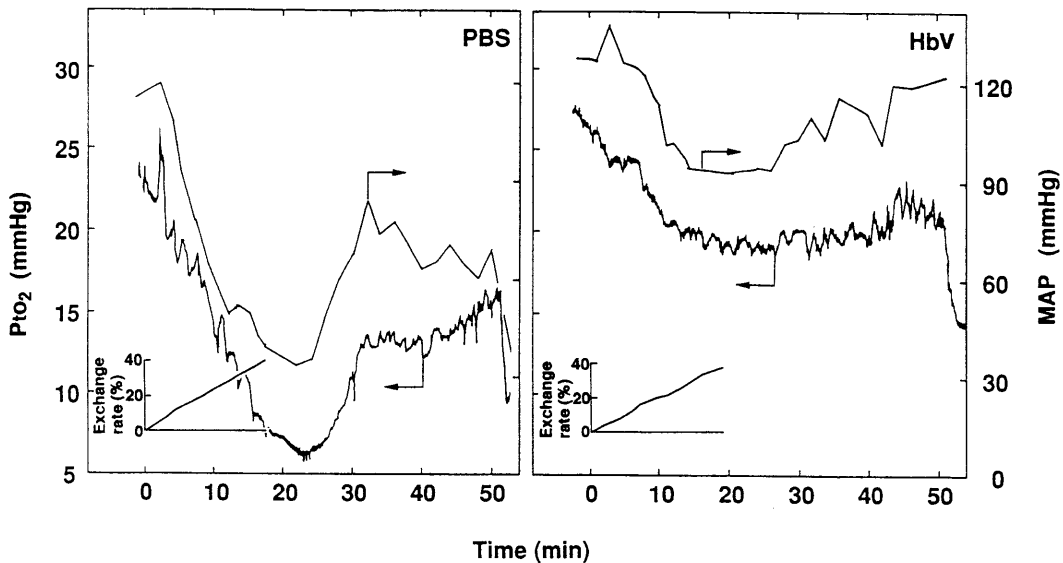


Fig. 3. Typical examples of the time courses of mean arterial pressure (MAP) and renal cortical oxygen tension ( $P_{to_2}$ ) during and after the isovolemic exchange transfusion with HbV and PBS. After ca. 50 min, all the rats were sacrificed, and the MAP and the  $P_{to_2}$  began to drastically drop down.

換投与終了後30分経過しても、この値はほぼ維持されていた。ratRBC群も同様の挙動が認められた。一方、PBS群やmetHbV群では、血圧は交換率に伴い徐々に低下、各々 $34 \pm 14\%$ 、 $36 \pm 8\%$ にまで達し、HbV群との有意差が認められた。またこのとき、腎臓が収縮して黒褐色になり表面には無数の皺が観察された。 $P_{to_2}$ も血圧とともに低下しそれぞれ $45 \pm 13\%$ 、 $43 \pm 5\%$ に達し、HbV群との有意差が認められた。交換後30分経過すると僅かに回復するものの、60%程度に留まった。

### 3.3. 血液ガスパラメータ

血液ガス測定では、全群ともに交換後にBEの低下、 $P_{aO_2}$ の上昇が認められたが(Fig. 4c-e)、HbV群とratRBC群では $P_{aO_2}$ の上昇は軽微であった。metHbV群では交換輸血後30分に著しいpH、BEの低下が認められた。

### 3.4. 血小板数の推移

交換輸血後、全群において血小板数(初期値 $0.9 - 1 \times 10^6$ 個/ $\mu\text{L}$ )の20 - 30%の減少が認められた(Fig. 4f)。30分後には回復傾向にあった。

## 4. 考察

HbVの $P_{50}$ は32 mmHgに制御でき、HbVの酸素運搬効率(OTE、酸素分圧110 mmHgと40 mmHgでの酸素飽和度の差)は38%になる(Table 1)。内包効率のパラメータであるHbと脂質の重量比[Hb]/[Lipid]は1.61であり従来系よりも高い(8, 9)。Hb濃度が10 g/dLであるので、OTEから計算される酸素放出量 6.2 mL/100 mLは、計算上ヒト血液( $P_{50}$  28 mmHg, OTE 28%, [Hb] 15 g/dL)の放出量 7.0 mL/100 mLと同等である。

HbVと新鮮血と混合した場合(Fig. 2)には粘度の極大が認められたが、洗浄赤血球との混合では特異的な粘度上昇は一切認められず、また血漿との混合では粘度の極大を示した。洗浄赤血球と

HbVの間には相互作用は無いので、新鮮血と混合したときの粘度上昇は、アルブミンなど血漿蛋白質とHbVとの相互作用によりHbVが凝集することも一因であることを示唆している。しかし血管内のズリ度は $30 \text{ s}^{-1}$ 以上、例えば大静脈平均 $40 \text{ s}^{-1}$ 、下行大動脈平均 $80 \text{ s}^{-1}$ 、毛細血管平均 $530 \text{ s}^{-1}$ であるので(22)、低ズリ速度領域でのこの程度の粘度上昇は本交換輸血試験には重要ではないと考えた。オリゴ糖やpolyoxyethyleneにて表面修飾すると凝集が抑制されることが知られているが、本実験系では表面修飾していない単純なHb小胞体を用いた。

腎臓は血流量の多い組織であり、脱血-返血あるいは生理食塩水投与時の血圧と心拍出量と腎皮質酸素分圧は連動することが報告されている(17, 18)。末梢への酸素輸送量は、血液の酸素含有量と心拍出量に比例するので、脱血時の血圧低下に伴い心拍出量が低下すると腎臓への血流量は低下、腎皮質酸素分圧は低下する(17, 18)。本交換輸血試験では心拍出量は測定していないが、血圧に対応した変化をしていると考えられる。血液をPBSで交換した場合、膠質浸透圧の低下により次第に循環血液量は減少する。同時に血液の酸素含有量は低下するので末梢組織への酸素供給量も低下する。これらの影響により心拍出量は低下し、血圧の低下が引き起こされる。この代償のため、腎臓の血管は収縮して血圧を維持しようとするので、腎皮質酸素分圧の低下がもたらされると考えられる。このことは、実際に腎臓が収縮して黒褐色になり表面には無数の皺が観察された結果からも支持される。本実験系で血漿増量剤を添加していないのは、血漿増量剤自体が循環動態に及ぼす影響がHbVの酸素運搬の評価を複雑にする可能性があると考えたからである。HbV群、ratRBC群では、膠質浸透圧の低下により循環血液量は低下するものの、Hbの存在により酸素含有量は維持されているので $P_{to_2}$ は高く留まっていると考察される。metHbV群は酸素結合能を持たないため、PBS群と同等にまで低下した。一方、HbV群では血漿増量剤を調節していないにも拘らずある程度の高い $P_{to_2}$ 値が維持できるのは、循環器系臓器を含む

末梢組織への酸素供給も効果的であるからと考えられる。

このように特定臓器への酸素運搬を直接確認した例としては、polyoxyethylene結合Hbを用いて交換輸血した場合の肝臓酸素分圧の変化をphosphorescence imagingにて観察した結果が報告されている(23, 24)。小胞体内包型に関しては、Rabinoviciら(15)が膜型酸素電極を用いた例を報告している。しかしながら対照試験との比較が明確ではなく、十分な酸素運搬効果が証明されているとはまだ言えない。本実験系では、血漿増量剤を添加しない単純な系で、HbVと同Hb濃度のラット洗浄赤血球や、HbVと同様の溶液物性で酸素を運搬しないmetHbV群、PBS群と比較することにより、高Hb濃度、適度な酸素親和度などHbVの特徴による高い酸素運搬能を具体的に示すことができたものと考えられる。

血液ガス分析において、末梢への酸素供給が低下すると固定酸(乳酸など)の増大により酸塩基平衡がずれる代謝性アシドーシスになりpHは低下する。これを代償すべく肺胞換気が増大し、揮発酸CO<sub>2</sub>を減少させる呼吸性アルカローシスとなり、同時にPaO<sub>2</sub>が増大する。このように代償機能が正常に機能するため、交換直後のpHの変化は少ないと推察される。ratRBC群、HbV群とも、僅かにPaO<sub>2</sub>の上昇が認められるものの、PBS群とmetHbV群に比較して軽微である。交換後30分経過すると、PBS群とmetHbV群にてpHの著しい低下が認められたが、HbV群ではその程度は低

く、PaO<sub>2</sub>、pHともにRBC群に近い値が確認された。ratRBC群、HbV群ともに若干のショック状態になっているが、これは膠質浸透圧の低下によるものと考えられる。しかし両群の推移はほぼ同等であり、血液ガス分析からも、HbVがRBCと同等に作用していることがわかる。

本実験系ではどの投与群においても、血小板数に異常は認められなかった。しかし一方では、水添大豆phosphatidylcholineを含むHbVを僅か2.8 mL/kgラットに単回投与した後に一時的に血小板数の著しい減少が報告されている(25, 26)。ところが飽和型の1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine系小胞体投与の場合や、Fluosol-DAの系で抗酸化剤 $\alpha$ -Tocを添加した場合には異常が認められないことが報告されているので(27)、血小板減少には過酸化物質が関与している可能性があると考えられた。これらのことを考慮して、脂質成分に合成飽和型リン脂質と $\alpha$ -Tocを用い、更にはメト化を抑えるためにHbCOを使用して穏和なエクストルージョン法により過酸化物質生成抑制に努めた結果、血小板数に異常が認められなかったと考えられる。

酸素輸送能評価を目的とした本実験系では、HbVに表面修飾していないことに起因する問題は特に認められなかった。しかし今後、膠質浸透圧を揃える実験系において、また血液成分との相互作用低下による二次的効果の点で、表面修飾の効果が期待される。

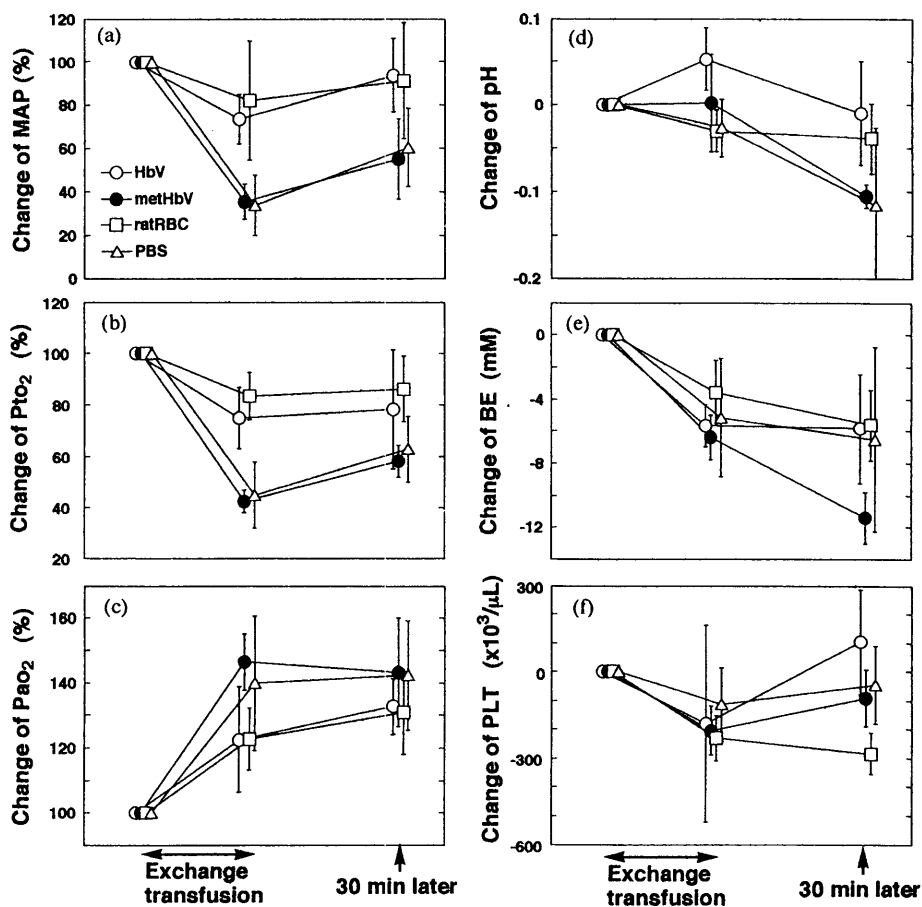


Fig. 4. Statistical results of changes in (a) mean arterial pressure (MAP), (b) renal cortical oxygen tension (Pto<sub>2</sub>), (c) arterial oxygen tension (PaO<sub>2</sub>), (d) pH (e) base excess (BE), and (f) number of platelet (PLT) during the isovolemic exchange transfusion with HbV(n=7), metHbV(n=4), ratRBC (n=6) and PBS(n=10), and 30 min after the exchange transfusion. All values represent means±SD for (n) number of experiments.

## 5. 結論

粒径が約250 nmに制御され、Hb濃度が10 g/dLと高くまたP50 32 mmHgの酸素親和度を有するHbV分散液を調製した。HbVと血液と混合すると低ズリ速度領域で凝集して僅かに粘度の上昇が認められた。HbVでラットに40%交換輸血をしてその酸素輸送能を評価したところ、血圧、腎皮質酸素分圧、血液ガスパラメータの推移は洗浄赤血球を交換輸血した場合と同等であり、HbVの酸素運搬による効果が赤血球のそれに近いと判断された。

## 謝辞

末梢酸素分圧測定の御指導を賜りました、慶應義塾大学医学部外科 加藤良一博士に感謝致します。また、血液学的検査において御協力くださいました 同学中央臨床検査部 川合陽子博士に感謝致します。本研究の一部は文部省科学研究費補助金(1994年度 065159, 06771037)によって行った。

## 参考文献

1. Tsuchida E. ed. Artificial Red Cells, John Wiley & Sons: New York, 1995.
2. 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.
3. Looker D, Abbott-Brown D, Cozart P, Durffe S, Hoffman S, Mathews AJ, Miller-Roehrich J, Shoemaker S, Trimble S, Fermi G, Komiyama NH, Nagai K, Stetler GL. A human recombinant haemoglobin designed for use as a blood substitute. *Nature* 1992; 356:258-60.
4. Parry E. Blood substitutes: historical perspective. In: Lowe KC ed. Blood substitutes. Ellis Horwood Ltd: Chichester, 1988:17-50.
5. Djordjevich L, Miller IF. Synthetic erythrocytes from lipid encapsulated hemoglobin. *Exp Hematol* 1980;8:584-92.
6. Hunt CA, Burnette RR, MacGregor RD, Strubbe AE, Lau DT, Taylor N, Kawada H. Synthesis and evaluation of a prototypal artificial red cell. *Science* 1985;30:1165-8.
7. Farmer MC, Johnson SA, Beissinger RL, Gossage JL, Lynn AB, Carter KA. Liposome-encapsulated hemoglobin: A synthetic red cell. *Adv Exp Med Biol* 1988;238:161-70.
8. Sakai H, Takeoka S, Hamada K, Nishide H, Tsuchida E. Physical properties of hemoglobin vesicles as red cell substitutes. *Biotechnol Prog* 1995 (in press).
9. Takeoka S, Terasa K, Yokohama H, Sakai H, Nishide H, Tsuchida E. Interaction between phospholipid assemblies and hemoglobin (Hb). *J Macromol Chem Pure Appl Chem* 1994;A31:97-108.
10. 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.
11. Sakai H, Takeoka S, Seino Y, Tsuchida E. Suppression of metHb formation by glutathione in a concentrated hemoglobin solution and in a hemoglobin-vesicle. *Bull Chem Soc Jpn* 1994;67:1120-5.
12. Kobayashi K, Watanabe M, Ishihara T, Nishide H, Tsuchida E. Liposome-embedded heme as a totally artificial oxygen carrier. *ASAIO Trans* 1991;37:M443-4.
13. Usuba A, Miyazawa M, Motoki R, Sakaguchi K, Suzuki K, Kamitani T, Takahashi A. Oxygen transport capacity and hemodynamic effect of newly developed artificial blood "Neo Red Cells (NRC)". *Int J Artif Organs* 1994;16:551-6.
14. Djordjevich L, Mayoral J, Miller IF, Ivancovich AD. Cardiorespiratory effects of exchange transfusions with synthetic erythrocytes in rats. *Crit Care Med* 1987;15:318-23.
15. Rabinovici R, Rudolph AS, Vernic J, Feuerstein GA. New salutary resuscitative fluid: liposome encapsulated hemoglobin/hypertonic saline solution. *J Trauma* 1993;35:121-7.
16. Zheng S, Beissinger R, Sherwood RL, McCormic DL, Lasic DD, Martin FJ. Liposome-encapsulated hemoglobin: a red cell substitute. *J Liposome Res* 1993;3:575-88.
17. Nelimarkka O, Niinikoski J. Renal venous oxygen tension as an indicator of tissue hypoxia in hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 1986;14:128-31.
18. 後藤晃一郎, 坂本篤裕, 橋本賢, 中井哲慈, 佐藤哲雄. 出血性ショックに対する高張食塩水投与の効果. *麻酔* 1993;42:1813-9.
19. 鄭主恩, 濱田健一, 酒井宏水, 武岡真司, 土田英俊. ヘモグロビン液膜のカルボニルヘモグロビンからオキシヘモグロビンへの配位子交換. *日本化学会誌* 1995;2:123-7.
20. Maeda N, Imaizumi K, Kon K, Shiga TA. Kinetic study on functional impairment of nitric oxide-exposed rat erythrocytes. *Environ Health Perspectives* 1987;73:171-7.
21. Cartheuser C-F. Standard and pH-affected hemoglobin-O<sub>2</sub> binding curves of sprague-dawley rats under normal and shifted P50 conditions. *Comp Biochem Physiol* 1993;106A:775-82.
22. 岡小天. バイオレオロジー. 裳華房: 東京, 1980.
23. Nho K, Linberg R, Johnson M, Gilbert C, Shorr R. PEG-hemoglobin: an efficient oxygen-delivery system in the rat exchange transfusion and hypovolemic shock models. *Artif Cells Blood Substitute Immobilization Biotechnol* 1994;22:795-803.
24. Rumsey WL, Vanderkooi JM, Wilson DF. Imaging of Phosphorescence: A novel method for measuring oxygen distribution in perfused tissues. *Science* 1988;241:1649-51.
25. Rabinovici R, Rudolph AS, Feuerstein G. Improved biological properties of synthetic distearoyl phosphatidylcholine-based liposome in conscious rat. *Circ Shock* 1990;30:207-19.
26. Rabinovici R, Rudolph AS, Feuerstein G. Characterization of hemodynamic, hematologic, and biochemical responses to administration of liposome-encapsulated hemoglobin in the conscious, freely moving rats. *Circ Shock* 1989;29:115-32.
27. 渡部正弘, 大柳治正, 斉藤洋一. 酸素輸液フルオゾールDAのアナフィラキシー様作用に関する基礎的研究. *人工臓器* 1988;17: 1513-22.

## ●事務局たより

日本血液代替物学会 第2回 定期総会 議事録

日時：平成7年6月20日（火）13:00-13:30

会場：フォーシーズンズホテル アンフィシアター

### 1. 開会

### 2. 会長挨拶

### 3. 議事

- 1) 平成6年度事業報告承認の件（資料1にて承認）
- 2) 平成6年度収支決算承認の件（資料2 a および2 b にて承認）
- 3) 平成7年度事業計画（資料3 a）および収支予算決議の件（資料3 b にて承認）
- 4) 役員人事の件
  - ・理事は全員重任、また、従来事務手続き不備のため欠落していたが、今回評議員に理事を追加（資料4にて承認）。
- 5) その他
  - ・平成8年度年次大会（福島）—大会長 元木良一（福島医科大学教授）、副大会長 関口定美（北海道赤十字血液センター所長）
  - ・1997年9月7～10日 第7回 血液代替物国際会議(7th ISBS) を東京にて開催予定(平成9年度年次大会はこれと兼ねる)。なお、平成10年度年次大会は札幌で開催予定

### 4. 閉会

資料1—平成6年度事業報告（平成6年4月1日～平成7年3月31日）

- 1) 第1回定期総会—平成6年6月17日（金）ホテルオークラ
- 2) 第1回年次大会—平成6年6月16日（木）、17日（金）ホテルオークラにて開催。大会長講演、特別講演6件、招請講演2件（海外）、一般演題15件。参加者 延べ200名。
- 3) 会誌「人工血液」の発行—第2巻2号(30頁)、第2巻3号(28頁)、第2巻4号(26頁)、第3巻1号(27頁)を全て1000部ずつ発行。
- 4) 理事会
  - 94/1: 平成6年6月16日（木）事業報告/収支決算/事業計画/予算の承認/評議委員の選出
  - 94/2: 平成6年9月27日（火）第2回年次大会/サンプル試供と評価の協議
  - 94/3: 平成6年12月6日（火）評価委員会設置/第2回年次大会/会員勧誘
  - 94/4: 平成7年3月6日（火）評価委員会報告/第2回年次大会/行事計画/収支決算/予算案
- 5) 編集委員会
  - 94/1: 平成6年7月12日（火）年次大会発表演題の記事化の検討/次号企画
  - 94/2: 平成6年12月7日（水）査読方針確認/"News Letter"の字句を表紙から削除
  - 94/3: 平成7年2月10日（金）連載企画検討/次号企画
- 6) 血液代替物前臨床評価試験専門委員会
  - 第1回: 平成7年1月9日（月）評価項目/試料説明と従来知見の開示/推進方法
  - 第2回: 平成7年2月6日（月）評価プロトコール/評価法、実験法/配布サンプル量
  - 第3回: 平成7年 3月 6日（月）サンプル配布状況/生化学検査依頼/血液代替物評価シンポジウム

資料2a—平成6年度会計報告収支決算表(自平成6年4月1日 至平成7年3月31日)

収入		支出	
摘要	金額	摘要	金額
前期繰越金	2,352,370	会誌出版費	3,466,185
正会員会費	1,210,000	集会・委員会費	2,570,168
賛助会員会費	3,000,000	年会補助費	1,000,000
維持会員会費	6,000,000	事務人件費	3,246,634
購読会員会費	114,000	事務費	882,114
入会金	0	基金組込	2,000,000
寄付	3,750,000	次期繰越金	3,968,331
広告代・雑収入	612,890		
寄付	50,000		
利息	44,172		
合計	17,133,432	合計	17,133,432

資料2b—貸借対照表(平成7年3月31日現在)

貸方		借方	
摘要	金額	摘要	金額
現金	1,176,320	基金	4,000,000
郵便振替	29,820	次期繰越金	3,968,331
銀行普通預金	2,762,191		
銀行定期預金	4,000,000		
合計	7,968,331	合計	7,968,331

資料3a—平成7年度事業計画（平成7年4月1日～平成8年3月31日）

- 1) 第2回定期総会の開催—平成7年6月20日（火）フォーシーズンズホテルにて開催の予定。
- 2) 第2回年次大会の開催—大会長 阿岸 鉄三、平成7年6月19日（月）、20日（火）フォーシーズンズホテルにて開催の予定。
- 3) 「人工血液」の発行—第3巻2号(6月)、3号(9月)、4号(12月)、第4巻1号(3月)の発行予定。1000～1200部印刷。「ヘモグロビンの基礎科学」の連載を予定。
- 4) 会議—総会1回、評議員会1回、監事会1回、理事会4回、会誌編集委員会4回、年次大会実行委員会2回
- 5) 血液代替物評価委員会の活動

資料3b—平成7年度予算(自平成7年4月1日 至平成8年3月31日)

収入		支出	
摘要	金額	摘要	金額
前期繰越金	3,968,331	会誌出版費	3,600,000
正会員会費	1,250,000	集会・委員会費	2,600,000
賛助会員会費	3,000,000	年会補助金	1,000,000
維持会員会費	6,000,000	会員増強費	500,000
購読会員会費	120,000	事務人件費	3,300,000
入会金	20,000	事務費	750,000
広告代・雑収入	600,000	運営資金組込	2,000,000
利息	80,000	予備費	1,288,331
合計	15,038,331	合計	15,038,331

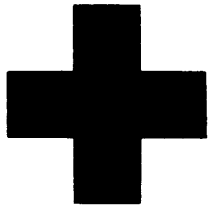
資料4—日本血液代替物学会 役員名簿

顧問	尾形 利郎	東海大学 医学部 教授
	高久 史磨	国立国際医療センター 総長
	堀 原一	筑波大学 名誉教授
会長	土田 英俊	早稲田大学 理工学部 教授
副会長	関口 定美	北海道赤十字血液センター 所長
庶務理事	小林 紘一	慶応義塾大学 医学部 教授
会計理事	藤村 一	生産開発科学研究所 理事
理事	阿岸 鉄三	東京女子医科大学 教授
	池田 康夫	慶応義塾大学 医学部 教授
	清水 勝	東京女子医科大学 教授
	友田 輝夫	東京医科大学 教授
	元木 良一	福島県立医科大学 教授
	湯浅 晋治	順天堂大学 医学部 教授
(事務局長)	西出 宏之	早稲田大学 理工学部 教授
(会誌担当)	仲井 邦彦	北海道赤十字血液センター 研究課長
監事	桜井 靖久	東京女子医科大学 教授
	遠山 博	埼玉医科大学総合医療センター 所長

日本血液代替物学会 評議員名簿

阿岸 鉄三	東京女子医科大学 教授	関口 定美	北海道赤十字血液センター 所長
浅野 茂隆	東京大学 医科学研究所 教授	高折 益彦	川崎医科大学 教授
阿部喜代司	医療技術短期大学 教授	高久 史磨	国立国際医療センター 総長
飯塚哲太郎	理化学研究所 主任研究員	高橋 晃	テルモ(株)常務取締役
池田 康夫	慶応義塾大学 医学部 教授	田中 勸	防衛医科大学 教授
大柳 治正	近畿大学 医学部 教授	土田 英俊	早稲田大学 理工学部 教授
岡田 浩佑	広島大学 医学部 教授	土屋 喜一	早稲田大学 理工学部 教授
尾形 利郎	東海大学 医学部 教授	遠山 博	埼玉医科大学 総合医療センター 所長
川野 武彦	(株)ミドリ十字 代表取締役社長	豊田 忠之	都立広尾病院 副院長
川村 明夫	札幌北楡病院 院長	友田 輝夫	東京医科大学 教授
小林 紘一	慶応義塾大学 医学部 教授	中井 一士	血液製剤調査機構 理事
小室 勝利	国立予防衛生研究所 部長	仲井 邦彦	北海道赤十字血液センター 研究課長
齋藤 英彦	名古屋大学 医学部 学部長	西 勝英	熊本大学 医学部 教授
酒井 清孝	早稲田大学 理工学部 教授	西出 宏之	早稲田大学 理工学部 教授
桜井 靖久	東京女子医科大学 教授	馬場 正三	浜松医科大学 教授
鮫島 達也	青山学院大学 理工学部 教授	藤巻 道男	東洋公衆衛生学院 学院長
四釜 慶治	東北大学 理学部 教授	藤村 一	生産開発科学研究所 理事
清水 勝	東京女子医科大学 教授	堀 原一	筑波大学 名誉教授
篠原 昌史	日本油脂(株)専務取締役	宮崎 保	札幌南通信病院 教授
十字 猛夫	日本赤十字社中央血液センター 所長	元木 良一	福島県立医科大学 教授
杉田 良樹	筑波大学 基礎医学系 教授	湯浅 晋治	順天堂大学 医学部 教授

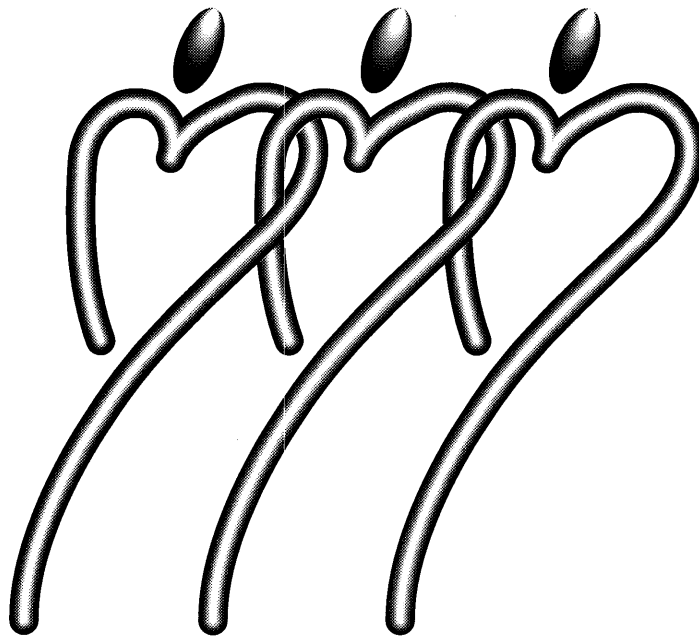
(敬称略、ア順)



日本赤十字社

善意の貴重な  
献血から造られています。

WITH A WARM HEART



日本赤十字社の血漿分画製剤

- |             |                    |                |
|-------------|--------------------|----------------|
| 指 赤十字アルブミン  | 指 人免疫グロブリン「日赤」     | 指 クロスエイトM 250  |
| 指 ガンマーF「日赤」 | 指 抗HBs人免疫グロブリン「日赤」 | 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.03-5485-0607

## 投稿規定 Short Version

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る。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。

- 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,  $\mu$ m, L, mL,  $\mu$ L, mol, g, mg,  $\mu$ g, 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. リボソームの調製. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編. リボソーム. 東京: 南江堂, 1988;21-40.
3. Fowler SA, Andracki M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22:27-42.
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、あらかじめ著作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 会誌

■発行 日本血液代替物学会

■編集・制作「人工血液」編集委員会

■印刷 サイマル・インターナショナル

## 人工血液 vol. 3 (3) 1995年9月30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