

目次

人工血液

第3巻 第4号 1995年12月

- 総説 一酸化炭素中毒の治療：動物実験におけるPyridoxalated Hemoglobin-Polyoxyethylene conjugate(PHP)の有用性と推察される機序
..... 内山利満 89
- 原著 赤血球代替物(NRC)の成分定量法 "ヘモグロビン, コレステロール,
リン脂質, polyethylene glycol 脂質, メトヘモグロビンの定量"
..... 濱田健一 96
- ヘム結合ヒト血清アルブミンの調製と酸素結合能 川合宣行 103
- Perfluorochemical 乳剤を用いた室温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 106

Contents

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 3 No. 4 December, 1995

Review:

- Therapy of carbon monoxide poisoning: Efficacy of Pyridoxalated Hemoglobin-Polyoxyethylene conjugate (PHP) in animal experiments and its speculated mechanisms Toshimitsu Uchiyama 89

Original Article:

- Assay Systems for the Components of Red Cell Substitutes (NRC)
"Quantitative determination of hemoglobin, cholesterol, phospholipid,
polyethylene glycol-lipid, and methemoglobin" Kenichi Hamada 96
- Human serum albumin combined heme derivative and its oxygen-binding
ability Noriyuki Kawai 103
- Continuous *in situ* mild hypothermic perfusion with PFC emulsion at swine
hepatic resection by total vascular clamps Masahiro Takahashi 106

会告

第3回日本血液代替物学会年次大会

会期：1996年6月18日(火), 19日(水)

会場：福島ビューホテル(福島市)

演題募集：一般演題

演題締切：1996年3月31日(日)消印有効

問い合わせ：〒960-12 福島市光が丘1番地 福島県立医科大学第一外科
会長 元木良一(担当 薄場 彰)

Phone 0245-48-2111 内線2331 FAX 0245-48-2735

会告

第11回日本Shock学会総会

会期：1996年5月22日(水)

会場：ホテル辰巳屋(福島市)

演題募集：一般演題

演題締切：1996年3月10日(日)消印有効

問い合わせ：〒960-12 福島市光が丘1番地 福島県立医科大学第一外科
会長 元木良一(担当 薄場 彰)

Phone 0245-48-2111 内線2331 FAX 0245-48-2735

一酸化炭素中毒の治療：動物実験におけるPyridoxalated Hemoglobin-Polyoxyethylene conjugate (PHP)の有用性と推察される機序

内山利満
服藤恵三

Toshimitsu Uchiyama
Keizou Harafuji

Therapy of carbon monoxide poisoning: Efficacy of Pyridoxalated Hemoglobin-Polyoxyethylene conjugate (PHP) in animal experiments and its speculated mechanisms

一酸化炭素(CO)中毒に対するhemoglobinによる治療の可能性をウサギを用いPyridoxalated Hemoglobin-Polyoxyethylene conjugate (PHP)により検討し、その有用性を示した。有用性の機序については原因療法としてのCOの除去、対症療法としての生命維持についてendotoxin shockの病態時の活性物質との関連の見地から考察した。

To determine the probability of hemoglobin therapy for carbon monoxide (CO) poisoning, life-saving effect of a stroma-free hemoglobin, Pyridoxalated Hemoglobin-Polyoxyethylene conjugate (PHP), on CO poisoning in rabbits was demonstrated. The useful mechanisms of PHP are considered to be CO- and free radical-scavenging effects as causal therapy, and life-saving effects in cardiovascular system as symptomatic therapy from the viewpoint of pathophysiologically endogenous active substances released at endotoxin shock. —Key Words: Carbon monoxide, Poisoning, Stroma-free hemoglobin, Therapy, Pyridoxalated Hemoglobin-Polyoxyethylene conjugate, Nitric oxide, Endotoxin shock.

1. はじめに

一酸化炭素(CO)中毒では炭素を含んだ物質の不完全燃焼により生じるCOによる急性中毒が問題となる。COは工場、自動車、都市ガス、煙草の煙などの他、火災時の煙に含まれる。火災時にはCOを始めとするガスの有毒性が大きな社会問題となっており、これらのガスも、新建材や有機系原材料などの熱分解、不完全燃焼により発生する(1-3)。主なガス環境として、高濃度のCOおよびCO₂を含む酸素欠乏状態(酸欠)、NO₂を中心とする窒素酸化物、シアンガスおよび塩化水素を含む環境などがある。これらのガスの中でもCOは、あらゆる火災時に発生(4)し、中毒を生じ、重症の場合は、予後不良の間歇型、非間歇型の中毒症状を呈する(5, 6)。一時回復傾向を見せる間歇型と、中毒症状が初期から継続する非間歇型では、いずれも重篤な状態に陥る前の早期治療が望まれる。

現在、CO中毒の救急処置としては、低酸素状態の改善が治療の基本であり、酸素吸入に加えて高圧酸素(HBO)療法(7, 8)が一般的に行われている。このHBO療法によると、血液ガス濃度(pO₂, pCO₂)、COHb濃度、脳波などのパラメータは改善をみせるが、重症例では機能的な改善が認められない場合も多い。CO中毒に、シアン解毒法の併用の試み(9)がなされているが、効果は得ら

れていない。

一般火災時の発生ガス環境の多くは、高濃度のCOとCO₂を含んだ酸欠状態である。このような環境下では、低酸素状態に対するCO₂の死亡増強効果(10, 11)が、酸素運搬能低下と組織酸欠の両面からの死亡に対する増強効果として発現する。

CO中毒の治療基本は原因療法としてのCOの排泄促進と対症療法としての生命維持の2本柱よりなる。HBOを含めたこれらの治療については、多くの総説(12-14)に譲り、我々の経験したPyridoxalated Hemoglobin-Polyoxyethylene conjugate (PHP)による治療の可能性を踏まえ、その機序について考察したい。

2. 家兎CO中毒へのPHPの救命効果

PHPは酸素運搬能を有する血液代用として、期限切れヒト血液赤血球から得られたhemoglobin(Hb)を化学修飾して開発された(15)。PHPの酸素との親和性は全血とほぼ同程度であり、ラット循環中でstroma-free hemoglobin(SFHb)の約6倍の半減期(12.8時間)を有し、粘稠度や浸透圧などは全血と近い(15)。従って、PHPはoxygen-carrying resuscitation fluidとしての応用が考えられ、ラットでのLD₅₀(i.v.)は1.2 g/20 mL/kg以上で、90%以上のPHP交換輸液は2週間以上の生存を確認し有効性を認めている(16)。PHPの応用は、血液の持つ型判別、クロスマッチなどに要する時間のロス、時には患者への感染の問題、さらに短い血液保有期間、緊急への対応の遅れなどの問題を解決する可能性をもっている。以

東邦大学医学部薬理学教室, 〒143 東京都大田区大森西5-21-16. Department of Pharmacology, Toho University School of Medicine, Omori-Nishi 5-21-16, Tokyo 143, Japan.

下は既報(17)の要約でもある。

2.1. PHPとCO中毒実験

Urethane麻酔下の雄性日本白色種ウサギを用い、人工呼吸器を介してtoxic gas (O₂ 5.0%, CO₂ 16.0%, CO 1.8%, N₂ 77.2%)を吸入させ、平均血圧が0あるいは20 mmHgに達した時点で空気に切り替えると同時に、生理食塩液(生食)20 mL/kg/30 min (control群)あるいは、PHP 1.2 g/20 mL/kg/30 min (PHP群)を30 min持続静注し、血圧、心拍数および動・静脈血pO₂, pCO₂, pH, COHbなどのパラメータの変化を観察した。PHPの投与量は血清生化学的に変化なく臓器形態器的変化の回復する量とした。

Toxic gas吸入後、血圧・心拍数ともに低下を続け、血圧0 mmHgを持続静注開始の指標とした実験では、PHP群(4例中1例は完全回復、3例の致死時間26.7±4.40 min)は、control群(致死時間9.0±3.46 min)に比し、致死時間の延長ならびにpO₂, pCO₂の有意な一時的回復を認めたが、救命効果は認められなかった。

Toxic gas吸入後、血圧20 mmHgを持続静注開始の指標とした実験では、control群とPHP群の各パラメータに有意差が認められた。Control群8例中2例は、各パラメータの回復もなく死に至った。PHP群6例はすべて生存し、各パラメータは回復した。COHb濃度は、PHP群の回復が急速(Fig. 1, 2)で、空気吸入後60 min

に0%を示したのに対し、control群では、60 min後に約12%、120 min後においても約2%を認めた。pO₂は、空気吸入後30-60 minの間に動・静脈血のいずれにおいてもPHP群の回復が有意であった(Fig. 3a)。pCO₂は空気吸入後、control群の方が有意に低値を示し回復が急速であった(Fig. 3b)。pHは、空気吸入後30-45 minの間、PHP群が有意な回復をみせた(Fig. 3c)。血圧は、空気吸入後1 minですでに両者間に有意差がみられ、PHP群の回復が有意で、4 min後には吸入前の値に到達し、2時間後においても高値を保ち、control群は2時間後においても完全回復には至らなかった(Fig. 3d)。心拍数は、両者間に大きな有意差は認められなかった。

これらのPHPの結果は、CO中毒に対し早期にPHPを処置することは、諸機能の回復促進に有用であり、救命の可能性のあることを示唆する。

2.2. pCO₂の変化とCO毒性

急性CO中毒では、COとHbの結合が酸素との結合より約210倍高い結合力(18)によるCOHb形成に基づく酸素欠乏による組織毒性が発現する。さらに組織では、COはmitochondrial cytochrome a₃と結合し、活性阻害や電子伝達系での酸素利用制限により、エネルギー産生を停止(19)し、ヘム蛋白系酵素阻害(20)なども加わって組織障害を起こす。火災時は、このCOによる障害にCO₂置換型酸欠の毒性が加わり、CO中毒を増強する(21)。さらに、

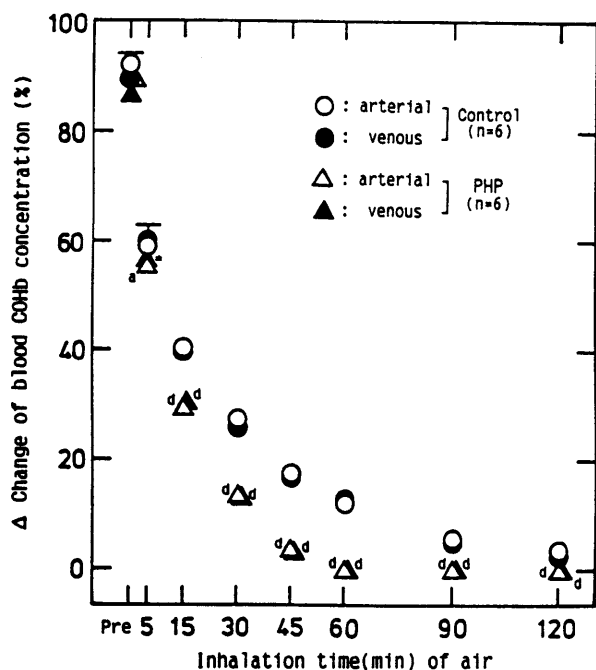


Fig. 1. Blood COHb concentration in control (○) and PHP (△)-treated rabbits artificially respired with air when blood pressure reached approximately 20 mmHg after toxic gas-inhalation. Symbols with vertical bars are the mean±SEM; when the SEM was small, it was included in the symbols. Pre: 5 min after toxic gas-inhalation. Arterial and venous COHb before toxic gas-inhalation were found in neither control nor PHP-treated groups. The times to switch from toxic gas to air (toxic gas-inhalation time) in control and PHP-treated groups were 9.8±0.77 and 11.0±0.41 min, respectively. Statistically different from control: *, p<0.1; a, p<0.05; d, p<0.005. (Cited from Ref. 17)

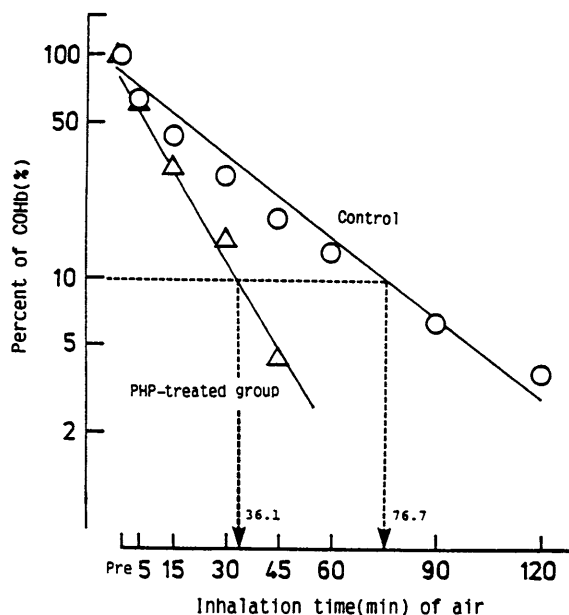


Fig. 2. Arterial COHb-dissociation in control (○, n=6) and PHP (△, n=6)-treated rabbits artificially respired with air when blood pressure reached approximately 20 mmHg after toxic gas-inhalation. Each symbol represents the mean of arterial COHb. Pre: 5 min after inhalation of toxic gas. Straight lines of PHP-treated group ($y=103.2-25.99 \ln x$) and control group ($y=95.7-19.75 \ln x$) were drawn by regression analysis, and the possibility that the inhalation time of air corresponded to the recovery of arterial COHb was evaluated by Spearman rank correlation coefficient in the control group ($r_s=-1.000$) and the PHP-treated group ($r_s=-1.000$). (Cited from Ref. 17)

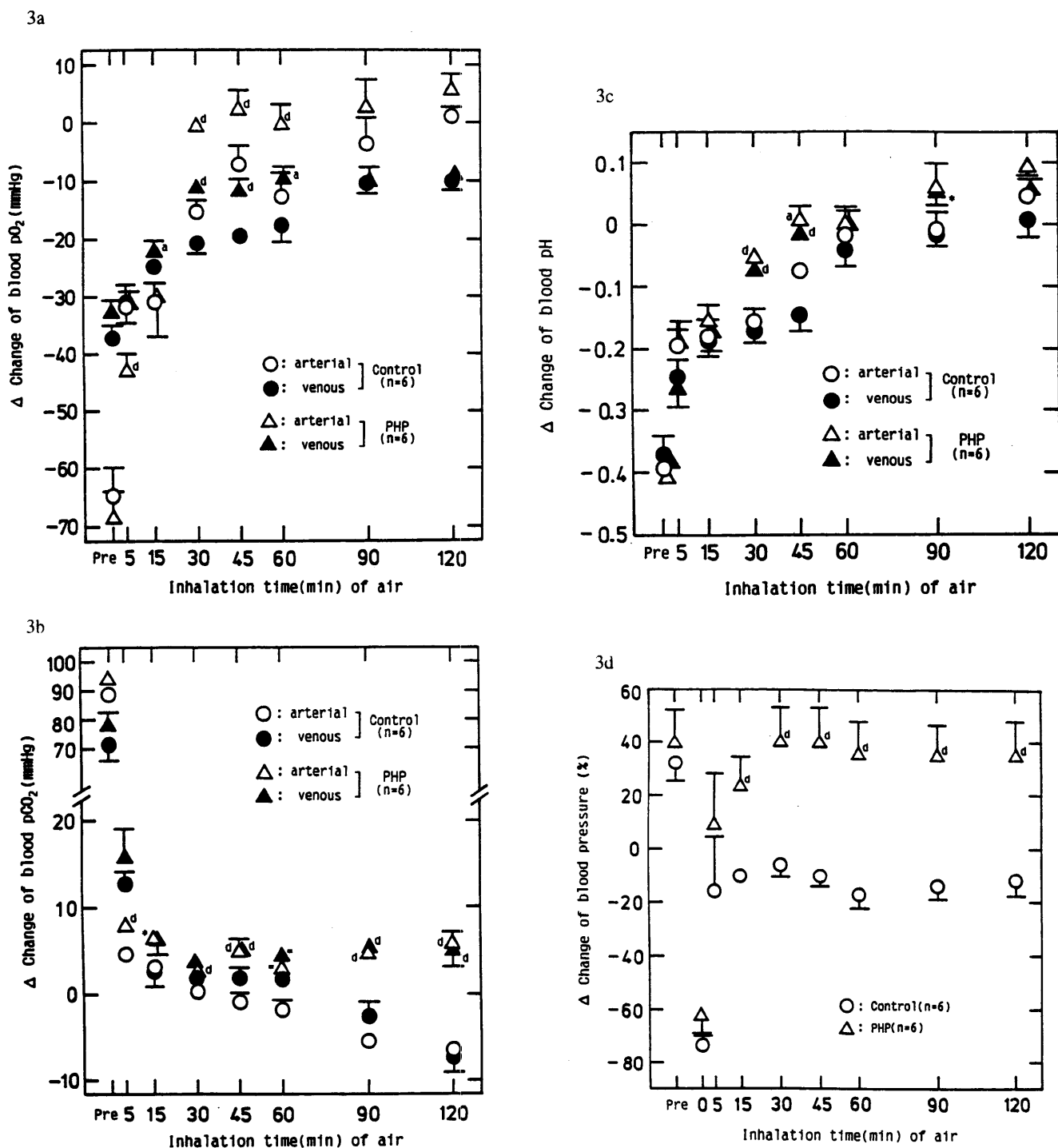


Fig. 3. Blood pO₂, pCO₂, pH and mean blood pressure in control (○) and PHP (△)-treated rabbits artificially respired with air when blood pressure reached approximately 20 mmHg after toxic gas-inhalation. Pre: 5 min after toxic gas-inhalation. a, blood pO₂. The values of arterial and venous pO₂ before toxic gas-inhalation were 82.5 ± 6.48 and 44.8 ± 2.80 mmHg, respectively, in the control group, and 84.2 ± 4.96 and 44.9 ± 2.68 mmHg, respectively, in the PHP-treated group. b, blood pCO₂. The values of arterial and venous pCO₂ before toxic gas-inhalation were 29.9 ± 2.27 and 34.9 ± 3.30 mmHg, respectively, in the control group, and 25.9 ± 1.11 and 30.7 ± 0.84 mmHg, respectively, in the PHP-treated group. c, blood pH. The values of arterial and venous pH before toxic gas-inhalation were 7.27 ± 0.032 and 7.23 ± 0.034 , respectively, in the control group, and 7.29 ± 0.022 and 7.27 ± 0.022 , respectively, in the PHP-treated group. d, mean blood pressure. The values of mean blood pressure of the control and the PHP-treated groups before toxic gas-inhalation were 86.7 ± 8.05 and 71.6 ± 7.76 mmHg, respectively. Symbols with vertical bars are the mean $\pm$ SEM; when the SEM was small, it was included in the symbols. Statistically different from control: *, $p < 0.1$; a, $p < 0.05$; d, $p < 0.005$. (Cited from Ref. 17)

COが血中glucose, pyruvate, lactateを増加させること(22)が知られている。このことは、酸欠状態での組織の嫌気性代謝亢進によるATPの消費, lactateの蓄積をさらに促進し、組織毒性を強めると考えられる。これらのメカニズムによって、火災時には、CO毒性の増強が生じることが示唆される。pCO₂の上昇は間接的に血中catecholaminesを上昇させ、さらに、CO中毒による入院患者での高血糖群(409±100 mg/dL)は脳死を伴い、血糖値が165±39 mg/dLでは脳障害が最低限に留まったことより、高血糖は脳でのlactateのレベルを高めることにより脳障害を生じ、脳死に直結したとも考えられている(23)。

Toxic gas吸入単独実験時の、toxic gas吸入後5分と血圧0 mmHg到達時との各パラメータ値では大きな変化はみられなかったが、動脈血pCO₂値は有意(p<0.05)な増加を示し、pCO₂値は静脈血より動脈血の方が有意に高値を示した。これらは、死の直前状態で各パラメータ値が定常状態になった後も、吸入ガスからのCO₂の溶存と組織からの代謝によるpCO₂の増加によるためと思われる。静脈血では、末梢における血液循環の微弱または停止のため、このpCO₂の上昇という変化はみられなかったものと思われる。

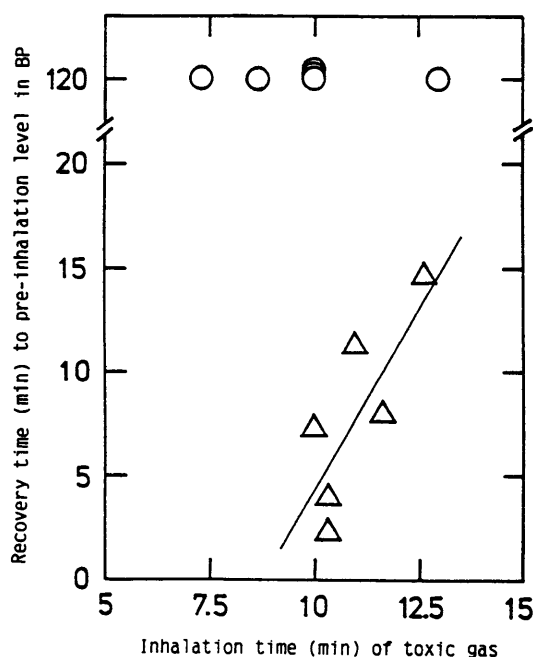


Fig. 4. Recovery time of mean blood pressure (BP) to the level before toxic gas-inhalation in control (○, n=6) and PHP (△, n=6) treated rabbits artificially respired with air when BP reached approximately 20 mmHg after inhalation of toxic gas. Each symbol represents individual datum. The levels of BP at 120-min inhalation with air in control rabbits did not recover to the level before toxic gas-inhalation, and the mean recovery time of PHP-treated rabbits was 8.0±1.86 min. A straight line ($y=3.53x-30.89$) was drawn by regression analysis, and the possibility that the inhalation time of toxic gas corresponded to the recovery of BP was evaluated by Spearman rank correlation coefficient in the PHP-treated group ($r_s=0.953$). (Cited from Ref. 17)

2.3. PHPのCO中毒への有用性

血圧0 mmHgを指標としてPHPの持続静注を開始した実験では、4例中1例の救命と死亡した3例も、各群パラメータ上の有意な一時的回復がみられた。一方、血圧20 mmHgを指標とした場合では、PHPの有意な回復促進効果が認められた。COHb濃度は、control群に比べPHP群の方が回復が急速で、空気吸入後15 minには有意差を認め、2時間後においても有意差があった。PHP群のCOHb濃度は、動・静脈血のいずれにも空気吸入後60 minで0%になったのに対し、control群では2時間後においても2-3%を示した。これらのことは、PHPが、COを速やかに運搬・除去できることを示唆する。健康な喫煙者の血液中COHb濃度は、約2-14%に達するといわれ、COHb濃度が10%以下では、臨床症状は認めない(6, 24)ことより、COHb濃度10%について検討した。この10% COHb濃度への到達時間は、control群の約76.7 minに対し、PHP群は約36.1 minとcontrol群の約47%に短縮している(Fig. 3)。この結果は、PHPの効果が単なる希釈効果ではなく、COに対する末梢組織より血液への運搬・除去効果を有していることを示唆する。

COHb濃度62-63%の急性CO中毒の犬に1気圧air, 1気圧O₂, 1.9気圧O₂, 2.8気圧O₂をそれぞれ吸入させ、血中COHb濃度半減期が、それぞれ188, 32, 25, 12 minであったと報告(8)されている。今回の実験環境は、CO₂置換型酸欠下のCO存在という苛酷な条件下であり、toxic gas吸入後COHb濃度は85-90%と高値を示したにもかかわらず、PHP処置による血中COHb濃度半減期は約7.7 min(Fig.3)と、既報告(8)における2.8気圧O₂吸入時の血液中COHb濃度半減期12 minよりも短い。このこともPHPのCO除去効果を裏付けている。単なる分圧差だけによるHBO療法の場合、COHb濃度の減少に伴ってその減少速度も衰えてくる。PHPも同様であるが、Hbを含有するPHPの場合、COとHbの結合による組織からのCOの奪い取り効果が存在するためCOHb濃度が低下し数%に達した時点では、HBO療法時よりもCO除去能力が高くなる可能性が示唆される。このように、PHPはHbによるCO運搬除去効果を有し、HBO療法は酸素分圧差による除去というメカニズム的な相違がある。このため、HBO療法とPHPの併用による相加・相乗効果の可能性が期待される。

pO₂は、PHP群がcontrol群に比べ、空気吸入後30-60 minの間に動・静脈血のいずれにおいても有意に回復し、PHP群の回復速度の速さを意味している。空気吸入後、PHPに酸素が速やかに結合し、血液中や組織に酸素が運搬されることにより、pO₂は急速な回復を見せる。この点から、control群との有意差が生じ、さらには機能回復への可能性を示唆している。

pHは、PHP群では動・静脈血とも30-45 minの間、control群に比べて有意な回復を示し、その後、toxic gas吸入前値へ回復した。これは、PHP自身の性質に由来するものと思われる。PHPのpHは、弱アルカリ性(pH 7.474±0.033)であるため、速やかなpH値の改善がみられたものと思われる。このことは、火災時に発生する有毒ガスなどの暴露により起こる急性の呼吸性または代謝性アシドーシスによるpH値の低下の改善に、PHPが有用である可能性を示唆する。

血圧は、control群、PHP群の両者間に大きな差がみられた。PHP群の回復は急速で、空気吸入8 min後にtoxic gas吸入前値に回

復し、2時間後においても高値を維持したが、control群は回復傾向は示したが、2時間後においても完全には回復しなかった。これは、Hbをpolyoxyethyleneglycolおよびpyridoxal 5'-phosphateで化学修飾したPHPが、血管内において浸透圧を保ち、循環動態の安定性を有することに由来するものと思われる(1)。このため、組織での出入りやガス交換時にも安定性を示すものと思われる。生食は、組織への移行がし易く血管内保持が悪いという点から血圧の回復には至らなかったものと思われる。Toxic gas吸入時間と、空気吸入後の血圧のtoxic gas吸入前値への回復時間の関係を検討すると、PHP群のデータから1次回帰式($r=0.7885$)が得られた(Fig. 4)。これにより、PHP処置群においては、toxic gas吸入時間(即ち、PHP処置開始までの時間)から、空気吸入後の血圧のtoxic gas吸入前値への回復時間を推定できることが示唆される。さらに、PHPが有意な血圧回復をみせたことには、CO中毒時に血小板からのfree radical, nitric oxide (NO)の遊離をひきおこすこと(25)や、peroxynitriteがNOやNO-derived oxidantとしてheme-containing proteinやsulfideと高親和性があり、それによりミトコンドリアの酵素を阻害し、電子伝達を抑制する(26)ことに関係している可能性がある。このことは、PHPの血圧上昇作用が $\alpha 1$ 受容体拮抗薬 prazosin, β 受容体拮抗薬 propranolol, cyclooxygenase阻害薬 indomethacinで拮抗されずNO synthase阻害薬のN^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA)で拮抗され、その拮抗がL-arginineで消失した(27)ことによっても支持される。即ち、COによる血圧下降には交感神経系やprostaglandins(PG)が直接関係しておらず、NOが関与していることが示唆される。Endothelium-derived relaxing factor (EDRF)はNOと同一であるとされていることより、EDRFの産生や作用出現に関係するguanylate cyclaseの阻害がCOによる血圧下降に拮抗することが想定される。HbはNOの作用に拮抗するが、NO合成阻害薬もCO中毒時の治療効果をもたらすかもしれない。さらに、endotoxinによるshock時に、様々なcytokines, NO, PGが産生、遊離され、これがshockの原因とされており、Hbは内皮細胞の有無にかかわらず、endotoxinにより産生されたNOと結合することによりphenylephrine収縮を増強することからも支持される(28)。

2.4. PHPとpCO₂の変化

血圧20 mmHgを指標としてPHP処置を開始した実験では、pCO₂の回復はcontrol群の方がPHP群より急速であり、回復効果のなかでは唯一、control群が有意な回復をみせたパラメータであった。CO₂は、血液中では約90%がbicarbonateとして存在し、残りはHbやタンパク質と結合するcarbamino錯体が約5%、溶存CO₂が約5%を占めている(29)。血液にCO₂が溶存すると、pCO₂は上昇しpHが低下する。これは、O₂Hb (O₂ binding Hb)の解離を促し(29)、PHPとCO₂とのcarbamino錯体の形成を促進させる。また、一般的にはアルカリ性の溶液の方が、CO₂を吸収保持する力があり、その溶存性が増す(30)。これらから考えると、生食は弱酸性(pH 6.563±0.134)であり、Hbおよびタンパク質を含まないことからcarbamino錯体としてCO₂を保持できない。これに対しPHPは、弱アルカリ性(pH 7.474±0.133)で、Hbを有することから、生食に比べ溶存性とcarbamino錯体の形成の点から、CO₂を血液中に多く保持する可能性が示唆される。これらのことは、control群の有意

に早いpCO₂の回復とPHP群のpCO₂の回復が遅いことを示唆する。また、血液代替Hb物質の中でもPHPのような修飾Hbでカプセル化、小胞体化していないものは直接NOを結合することができるのでCO中毒時の血圧下降に拮抗し、血圧上昇を生じるが、カプセル化、小胞体化した赤血球代替HbはNOと直接、結合しにくく、一酸化炭素中毒時の血圧下降には拮抗しにくいであろう。このことは、リポソームにHbを内包したHb小胞体の一つである人工赤血球(ARC)がマウスのendotoxin致死に無効である(31)ことから支持される。

同容積のPHPと生食を比較すると、Hbなどを有するPHPの方が、生食に比べCO₂を溶存する溶液部分の容積が小さく、同じpHであれば、生食へより多くのCO₂が溶存する可能性がある。しかし、生食の方がpCO₂の回復が速い本実験結果は、持続静注時の体内血液による希釈などから、この生食の効果は小さかったものと思われる。

3. 今後期待されるCO中毒への治療

3.1. 原因療法：COHbの除去促進

O₂吸入のみでは、COHbの低下を期待できない場合にHBO療法が用いられている。現在、臨床応用に到っていないがその可能性のあるものとしてPHPの実験(17)を紹介した。さらに、古くは人工血液Fluosol-DAによる有効性が報告され(32)、CO中毒患者の血液を体外循環させ、O₂存在下で、ある波長の可視光線照射によりCOHb + O₂ → O₂Hb + COの光化学反応を応用し、COHbをO₂Hb化し、COを除去して生体に戻すことが検討されている(33)。加えて、Hbをヒト赤血球からでなくrecombinant-Hbとして得ることが可能となり、これに対し化学的に修飾したHb、SFHbとカプセル化したHb小胞体が可能となる。CO中毒のCO除去のみを考えるとカプセル化したHbの方が、1)高粘稠度と高浸透圧の抑制、2)血流からのHb leakageの抑制、3)血液の化学的環境への低い影響などの点で優れているが、次に述べる対症療法における血圧下降への拮抗という点ではNOへの結合の可能性ではSFHbに比べ劣るであろう。

3.2. 対症療法：CO中毒時に関連する生体内活性物質

CO中毒時にNO, free radicalなどの産生が知られている。PHPを始めとするSFHbはこれらの除去剤として位置づけることができるがカプセル化したHb小胞体は除去剤としての期待は低い。加えて、CO中毒の病態はendotoxin shockに近似しているのでcytokines, NO, free radicalなどの遊離を含めて、これらの関係する病態、即ち、これらの物質の遊離や作用を抑制する治療が共通したものとして応用できる可能性がある。

最近の興味ある報告(34)としてヒト単球をendotoxinのlipopolysaccharide (LPS)で処理するとcytokinesの放出が増加し、dibutyryl cAMP添加により産生が抑制され、さらに、タイプの異なるphosphodiesterase (PDE)阻害薬添加による阻害実験から、PDE IVとの関連が示唆され、新しい治療概念が生まれる可能性がある。

加えて、hydroxycobalamin (vitamin B12a)がendotoxinによる血圧低下と致死を抑制(35)することより治療薬の可能性が加わった。これはcobaltがheme ironよりNOと効率良く結合することに着目

し, cyanocobalamin (vitamin B12)やvitamin B12aが⁵corrin ringにcobaltを持っており, NOと結合することによりNOの作用を抑制することによると説明される。

4. おわりに

CO中毒の治療をPHPによるCOHb解離促進と, 各種パラメータ, 特に血圧回復促進効果に検討を加え, NOへの拮抗の立場より考察を行った。加えて, CO中毒時の病態でのcytokines, NO, free radicalの産生, 遊離はendotoxin shockに近似するものがあり, endotoxin shockの治療手段のCO中毒への応用の可能性を示唆した。PHPの臨床応用には, 本視点からの動物実験の安全性と有用性のcheckが必須である。さらに, 多くの赤血球代替物(36)としてのSFHbとカプセル化Hbのいずれが良いかは一長一短があり, 総合的な検討が必要である。

謝辞

PHPならびにその機序に関する有用な文献的考察にお力添え頂きました岩下雄二博士(味の素(株)中央研究所), 林 裕氏(富士レボ)に感謝申し上げます。

参考文献

1. 守川時生, 箭内英治. 半実大室モデルにおける高分子物質の燃焼時の有毒ガス発生特性. 消防研報告 1985;60:95-103.
2. 山本啓一, 山本淑子. 「ウレタンフォームの加熱時に発生するガスの有害性について」補遺. 日法医誌 1972;26:113.
3. 平松勤司. 火災における高分子材料からの熱分解ガス. 日本接着協会誌 1973;9:265-71.
4. Horovitz JH. Abnormalities caused by smoke inhalation. J Trauma 1979;19(Suppl II):915-6.
5. 黒岩義五郎. 急性一酸化炭素中毒症とanoxic encephalopathy. 臨床神経 1970;10:1-7.
6. 岡田芳明. 一酸化炭素中毒. 救急医学 1979;3:1114-22.
7. 榊原欣作, 高橋英世, 小林繁夫. 急性一酸化炭素中毒の治療, とくに間歇型中毒への移行防止対策としての高気圧酸素治療の意義について. 日災会誌 1982;30:204-16.
8. Sasaki T. On half-clearance time of carbon monoxide hemoglobin in blood during hyperbaric oxygen therapy. Bull Tokyo Med Dent Univ 1975;22:63-77.
9. Moore SJ, Morris JC, Walsh DA, Hume AS. Antidotal use of methemoglobin forming cyanide antagonists in concurrent carbon monoxide/cyanide intoxication. J Pharmacol Exp Ther 1987;242:70-3.
10. 服藤恵三, 内山利満. 酸欠死亡に対する二酸化炭素の相乗効果. 日法医誌 1989;43:424-9.
11. Watanabe H, Yamamoto K, Yamamoto Y, Fukui J. The interaction between severe hypercapnia and hypoxia. Jpn J Legal Med 1990;44:463-8.
12. Severance HW, Kolb JC, Carlton FB, Jorden RC. Acute carbon monoxide poisoning: Emergency management and hyperbaric oxygen therapy. J Mississippi State Med Assoc 1989;30:321-5.
13. Hardy KR, Thom SR. Pathophysiology and treatment of carbon monoxide poisoning. 1994; 32:613-29.
14. 八木博司, 三谷昌光, 楠田憲治. 一酸化炭素中毒. 最新医学 1994;49:1226-33.
15. Iwasaki K, Iwashita Y. Preparation and evaluation of hemoglobin-polyethylene glycol conjugate (pyridoxalated polyethylene glycol hemoglobin) as an oxygen-carrying resuscitation fluid. Artif Organs 1986;10:411-6.
16. Iwasaki K, Iwashita Y, Ikeda K, Uematsu T. Efficacy and safety of hemoglobin-polyethylene glycol conjugate (pyridoxalated polyethylene glycol hemoglobin) as an oxygen-carrying resuscitation fluid. Artif Organs 1986;10:470-4.
17. Uchiyama T, Harafuji K. Life-saving effect of pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate on carbon monoxide intoxication of rabbits. Artif Organs 1994;8:576-86.
18. Douglas CG, Haldane JS, Haldane JBS. The laws of combination of hemoglobin with carbon monoxide and oxygen. J Physiol 1912;44:275-304.
19. Goldbaum LR, Ramirez RG, Absalon KB. Joint committee on aviation pathology: VIII. What is the mechanism of carbon monoxide toxicity? Aviat Space Envir Med 1975;46:1289-91.
20. 中尾喜久. 血液化学の立場から. 神経進歩 1969;13:21-4.
21. Harafuji K, Furukawa K, Uchiyama T. Potentative effects of hypoxia on the carbon monoxide toxicity. Eur J Pharmacol 1990;183:1541.
22. Sokal JA, Kralkowska E. The relationship between exposure duration, carboxyhemoglobin, blood glucose, pyruvate and lactate and the severity of intoxication in 39 cases of acute carbon monoxide poisoning in man. Arch Toxicol 1985;57:196-9.
23. Penny DG. Hyperglycemia exacerbates brain damage in acute severe carbon monoxide poisoning. Medical Hypotheses 1988;27:241-4.
24. Sayers RR, Yant WP. Dangers of and treatment for carbon monoxide poisoning. US Bur Mines Rept Invest 1923;2476:1-11.
25. Thom SR, Ohnishi T, Ischiropoulos H. Nitric oxide released by platelets inhibits neutrophil B2 integrin function following acute carbon monoxide poisoning. Toxicol Appl Pharmacol 1994;128:105-10.
26. Radi R, Rodriguez M, Castro L, Telleri R. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. Arch Biochem Biophys 1994;308:89-95.
27. Kida Y, Maeda M, Iwata S, Iwashita Y, Goto K, Nishi K. Effects of pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate and other hemoglobin-related substances on arterial blood pressure in anesthetized and conscious rats. Artif Organs 1995;19:117-28.
28. Kilbourn RG, Joly G, Cashion B, DeAngelo J, Bonaventura J. Cell-free hemoglobin reverses the endotoxin-mediated hyporesponsivity of rat aortic rings to α -adrenergic agents. Biochem Biophys Chem Commun 1994;199:155-62.
29. Mountcastle VB. Medical physiology (14th ed). ST Louis; The CV Mosby Company. 1980;1721-48.
30. 大木道則, 大沢利昭, 田中元治, 千原秀昭. 化学大辞典 1版. 東

京; 東京化学同人, 1989;1670.

31. 守沢和也, 栗井浩二, 赤間和博, 遠藤さおり, 矢野嘉宏, 徳山悟, 佐藤征. 人工赤血球(ARC)の急性期安全性試験: 網内系および血液学的検討. 人工血液 1995;3:18-24.
32. 尾山 力, 神 敏郎, 豊岡憲治, 福士貞男, 滝口雅博, 松本明知. CO中毒に対するEDA 20の使用経験. 救急医学 1982;6:581-3.
33. 高島明, 安田昌史, 水野信行. 急性一酸化炭素中毒に対する可視光線療法の開発. 医科学応用研究財団研究報告 1989;7:108-13.
34. Verghese MW, McConnel RT, Strickland AB, Gooding RC,

Stimpson SA, Yarnall DP, Taylor JD, Furdon PJ. Differential regulation of human monocyte-derived $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ by type IV cAMP-phosphodiesterase (cAMP-PDE) inhibitors. J Pharmacol Exp Ther 1995;272:1313-20.

35. Greenberg SS, Xie J, Zatarain JM, Kapusta DR, Miller MJS. Hydroxycobalamin (vitamin B12a) prevents and reverses endotoxin-induced hypotension and mortality in rodents: Role of nitric oxide. J Pharmacol Exp Therap 1995;273:257-65.
36. 土田英俊, 酒井宏水. 血液代替物: とくに赤血球代替物に関して. 医学のあゆみ 1995;172:99-104.



—ヒト エリスロポエチン製剤—

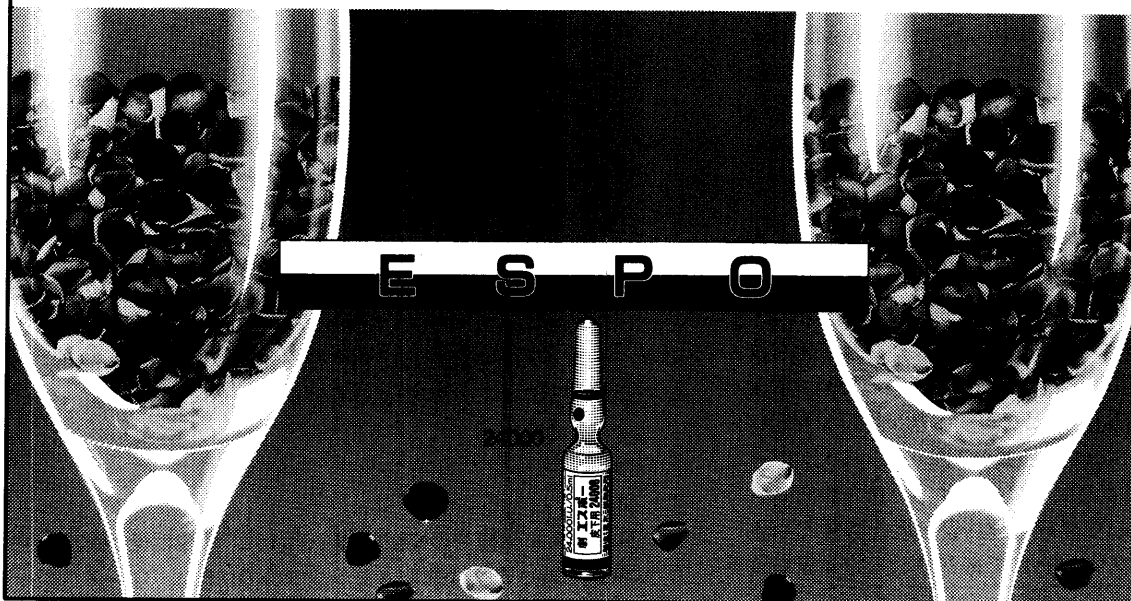
エスポ[®] 皮下用

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
三井株式会社
〒100 東京都中央区日本橋本町一丁目
製造元
麒麟麦酒株式会社
〒100 東京都中央区新川二丁目

95.4

赤血球代替物 (NRC) の成分定量法

"ヘモグロビン, コレステロール, リン脂質, polyethylene glycol脂質, メトヘモグロビンの定量"

濱田健一, 巨勢丈裕, 大串 建, 酒井宏水, 武岡真司, 西出宏之, 土田英俊*

Assay Systems for the Components of Red Cell Substitutes (NRC)

"Quantitative determination of hemoglobin, cholesterol, phospholipid,
polyethylene glycol-lipid and methemoglobin"

Kenichi Hamada, Takehiro Kose, Takeru Ohgushi, Hiromi Sakai, Shinji Takeoka,
Hiroyuki Nishide, Eishun Tsuchida*

高濃度ヘモグロビン(Hb)をリン脂質二分子膜にて包み込んだ形の赤血球代替物(Hb小胞体)は、膜が安定化されているため、通常血液(赤血球)に用いられる成分定量法の適用が困難である場合が多い。本報では、膜表面をポリエチレングリコールにて修飾した安定化赤血球代替物であるネオレッドセル(NRC)を例として、Hb濃度、コレステロール濃度、リン脂質濃度、修飾剤濃度を正確に定量する方法や小胞体構造を破壊せずにメト化率を測定する方法を確立した。

Red cell substitutes (Hb-vesicles) contain concentrated hemoglobin (Hb) covered with a phospholipid bilayer membrane. Due to the stability of the membrane, some of the ordinary assays of the blood component are not applicable for Hb-vesicles. In this report, the Hb-vesicles stabilized with polyethylene glycol conjugated onto the vesicular surface (Neo Red Cells: NRC) are studied for quantitative analysis. The assay systems for Hb, cholesterol, phospholipid and surface modifier and also a new method to determine the content of metHb in NRC *in situ* (without destruction of vesicular structure) are established. —Key Words: Red Cell Substitutes, Hemoglobin, Phospholipid vesicles, Assay systems, Polyethylene glycol, Methemoglobin.

1. 緒言

ヘモグロビン(Hb)を利用した赤血球代替物は、リン脂質二分子膜小胞体による微小カプセル化Hb(Hb小胞体)と、ストローマフリーHbを分子内あるいは分子間にて架橋した系、あるいは高分子を結合させた系などの修飾Hbに大別される(1-3)。微小カプセル化型は、中にアロステリック因子や還元剤などの調節剤を内包でき(4)、またHb由来の副作用を抑制できるなど、修飾型を上回る利点があるものの、集合分子膜で構成されているため、凝集や融合、内包分子の漏出などが問題となる。これまでに膜安定化のために、重合性リン脂質(5-8)や糖脂質(9,10)、ポリエチレングリコール(PEG)脂質(11-13)などを膜中に導入する方法が検討されているが、赤血球膜と比較して高い物理的安定度が特長となる一方、赤血球やストローマフリーHbにて確立された定量法が困難

となる場合が生じてきた。例えば、安定化分子膜が完全に破壊されないとの測定対象基質と反応試剤が充分反応できず、濁度が残るため分光測定に誤差を生じる。また、安定膜を破壊する過激な条件では基質の変性が起こる。

そこで、本報では微小カプセル化型Hbの定量法を確立するために、PEG表面修飾によって膜が安定化されたHb小胞体(ネオレッドセル, NRC)を例として、構成成分例えばHb, メトHb, リン脂質やコレステロールなどの定量法について紹介する。

2. 実験

2.1. 試料

試料はテルモ社開発のNRCを用いた(15)。平均粒径が0.2 μm の小胞体で、二分子膜は水添大豆レシチン(HSPC)、コレステロール、ミリスチン酸(MA)、酢酸トコフェロール(Toc)にて構成されており、更に1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(polyethylene glycol) (PEG-PE) が外表面に導入されている。内

早稲田大学高分子研究室 〒169 東京都新宿区大久保3 Department of Polymer Chemistry, Waseda University, Tokyo 169, Japan.

*To whom all correspondence should be addressed.

論文受付95年8月9日、受理95年8月20日。

相には高濃度のHbと共にアロステリック因子であるイノシトールヘキサリン酸(IHP)や還元酵素系やその基質類が包み込まれており(16), 外相は生理食塩水となっている。

2.2. 原子吸光法によるHb定量

検量線の作成にはFe標準液(Fe1000標準液, Cica-MERCK)の希釈液を用い, 原子吸光光度計(AA-640-01, 島津製作所)にてHb由来のFeを定量した。試料は純水にて100倍に希釈して測定, 注射用水の測定値を基準とした。測定は3回行い平均値を採用した。

2.3. コレステロールの定量

コレステロールオキシダーゼ・p-クロロフェロール法に依った(18)。試料を純水にて10倍に希釈後, この10 μ Lに発色試薬(コレステロールCII-テストワコー, 和光純薬)を3.0 mL添加, 10 g/dLドデシル硫酸ナトリウム(SDS)水溶液を20 μ L添加して, 37℃にて10分間振盪した。紫外可視分光光度計(MPS-2000, 島津製作所)にて500 nmの吸光度を測定し, 盲検(発色試薬のみ)の吸光度を差し引き, 標準液から作成した検量線より定量値を求めた。

2.4. リン脂質, PEG-PEの定量

リン濃度の測定

式(1)に従って試料溶液中のリン脂質由来のリン濃度(mM)を測定。

リン脂質由来リン濃度

$$\begin{aligned} &= [(試料のリン濃度) - (原料Hbのリン濃度) \\ &\quad \times (試料のHb濃度) / (原料HbのHb濃度)] = \alpha \\ &= ([HSPC] / M_{HSPC} + [PEG-PE] / M_{PEG-PE}) \times 10^4 \end{aligned} \quad \dots (I)$$

但し, 試料のリン濃度と原料Hbのリン濃度は過マンガン酸塩灰化法(リン脂質テストワコー, 和光純薬)により測定。[HSPC], HSPC濃度(g/dL); [PEG-PE], PEG-PE濃度(g/dL); M_{HSPC} , HSPC分子量790; M_{PEG-PE} , PEG-PE数平均分子量6141。

PEG-PE濃度の測定

試料を凍結乾燥後, $CDCl_3$ にて抽出された膜成分の 1H -NMRスペクトル(EX-270, 日本電子)を測定。(II)式から[HSPC]と[PEG-PE]の比を求める。

$$\begin{aligned} [PEG-PE] / [HSPC] &= [(B / H_{PEG-PE}) \times M_{PEG-PE}] / [(A / H_{HSPC}) \times M_{HSPC}] \\ &= (B / A) (H_{HSPC} \times M_{PEG-PE}) / (H_{PEG-PE} \times M_{HSPC}) = \beta \end{aligned} \quad \dots (II)$$

但し, A, コリンメチルプロトンの積分比; B, PEGメチレンプロトンの積分比; H_{PEG-PE} , 1分子中のPEGメチレンプロトンの数; H_{HSPC} , 1分子中のコリンメチルプロトンの数。

(III), (IV)式より[HSPC], [PEG-PE]が求まる。

$$[HSPC] = \alpha / (1 / M_{HSPC} + \beta / M_{PEG-PE}) \times 10^4 \quad \dots (III)$$

$$[PEG-PE] = \alpha \times \beta / (1 / M_{HSPC} + \beta / M_{PEG-PE}) \times 10^4 \quad \dots (IV)$$

2.5. メト化率の測定

メト化率100%と0%(100% デオキシHb)の試料を以下に従って調製。両者の可視スペクトルにおけるゾーレ帯の λ_{max} の吸光度比から検量線を作成した。

窒素雰囲気下試料([Hb]=5 g/dL, 3 mL)に亜ニチオン酸ナトリウム(20 g/dL, 150 μ L)を添加し室温にて静置させると, メトHb由来の405nmの吸収が消失し, デオキシHbの430 nmの吸収のみとなる。スペクトル強度に変化が全く認められなくなった時点をもト化率0%の試料とした。

100%メトHb試料の調製は, 以下のようにして行った。窒素雰囲気下試料に一酸化窒素(NO)を5分間通気してHbNOとしたのち, 窒素(30分間)にて余剰のNOを排気後酸素に置換すると, HbNO由来の吸収(415 nm)がメトHb由来の吸収(405 nm)に変化する。変化が認められなくなった時点で, 更に窒素下と酸素下で測定したスペクトルに相違が無いことを更に確認して, メト化率100%の試料とした(17)。

以上二つのHb溶液の組成を変化させた混合系をスペクトル測定し, デオキシHbとメトHbの等吸収点355 nm, 456 nmを直線で結び, これをベースラインとして405 nmのピークの高さ(A_{405})と430 nmのピークの高さ(A_{430})を求めて検量線を作成した。

2.6. 酸素親和度の測定

Hemox Analyzer(TCS Medical Products)にて酸素解離曲線を測定し, 酸素親和度, 酸素運搬効率, Hill係数を解析した。実験条件は以下の通りとした。

i) Hemox 溶液(TCS Medical Products, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM N-tris(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethanesulfonic acid, (TES), pH 7.4)。炭酸ガス分圧(PCO_2) = 0 Torr, 酸素分圧(PO_2) < 450 Torr。

ii) 150 mM リン酸緩衝液(pH 7.4), PCO_2 = 0 Torr, PO_2 < 450 Torr。

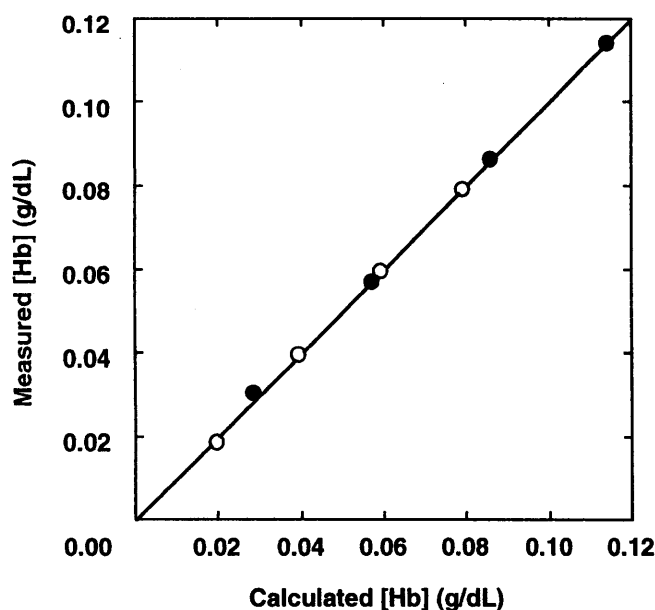


Fig. 1 Relationship between calculated [Hb] and measured [Hb] obtained by atomic absorption spectroscopy (○, Hb solution; ●, Fe standard solution).

3. 結果および考察

3.1. Hbの定量

血液中のHb濃度の測定法としてシアノメトHb法が用いられており(14), 赤血球膜を破壊するために界面活性剤であるTriton X-100が発色試液中に含まれている。しかし、膜を安定化したHb小胞体のHb濃度を測定する場合、本界面活性剤では膜が破壊されずに反応が不完全となる場合もある。また濁度が残るため正確な分光測定が困難になるなどの問題もある。加熱や界面活性剤の追加などで膜を完全に破壊する方法もあるが、Hbの変性によりシアノメトHb法の適用が困難となる。そこで原子吸光法にて試料溶液中の鉄を定量し、これをHb濃度に換算する方法について検討した。

鉄標準液を希釈し、検量線を作成した。また、遊離鉄が存在しない様に充分透析を行った精製Hb溶液のHb濃度をシアノメトHb法で求め、濃度既知の希釈液からも検量線を作成した。両検量線ともHb濃度(鉄標準液の場合、(V)式にてHb濃度に換算)に対して発光強度は比例した。シアノメトHb法から求めたHb濃度と原子吸光法を利用して得られたHb濃度は、鉄、Hb溶液の両検量線のどちらを使用しても一致した(Fig. 1)。

$$[\text{Hb}] = [\text{Fe}] / 4 / M_{\text{Fe}} \times M_{\text{Hb}} \quad \dots (V)$$

M_{Fe} : 鉄の原子量, M_{Hb} : Hbの分子量

従って、Hb濃度は原子吸光法により正確に定量できることが明らかとなった。但し、本法は原料Hb中に遊離鉄やHb以外のヘム蛋白質(チトクロムなど)が全く存在しないか、無視できる量である場合に適用され、原料HbについてシアノメトHb法と原子吸光法での値が一致していることが前提となる。

次に混合脂質成分中のHSPCを1,2-bis(2,4-octadecadienoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine(DODPC)に変えてPEG修飾を行わない系をTriton X-100にて完全破壊可能な試料として調製し、非破壊での原子吸光法にて得られたHb濃度と破壊後シアノメトHb法にて得られた値とを比較したところ、測定値に良い一致を認め、脂質類で被覆されたHbにおいても原子吸光法にて正確にHb濃度が定量できることが明らかとなった。

3.2. コレステロールの定量

コレステロールオキシダーゼ・p-クロロフェノール法は、コレステロールオキシダーゼによりコレステロールが酸化されて過酸化水素が発生し、ペルオキシダーゼの作用により、p-クロロフェノールと4-アミノアンチピリンを酸化縮合させ赤色の色素を生成する。この赤色の吸光度(500 nm)を測定することによりコレステロール濃度を算出することを原理としている(18)。

添付マニュアル通りに本試料のコレステロール定量を試みても発色試液が懸濁溶液となり、コレステロールとの反応が十分に進行せず、しかも濁度がデータに誤差を与える。これは、小胞体膜を破壊して膜中のコレステロールを可溶化させる操作が無いからである。前述した様にTriton X-100は、膜を充分破壊させる能力が無いので、比較的強い界面活性剤であるSDSを添加し、膜を混合ミセルとして破壊した系についてコレステロール定量を検討した。一般にSDSは蛋白質の高次構造を変化させる試剤として用いられる(19)ことから、コレステロールオキシダーゼなどの酵素活

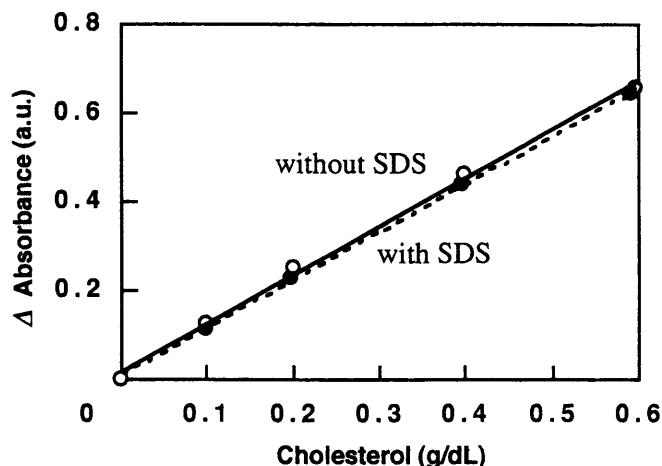


Fig. 2 Calibration curves for cholesterol determination. The enzymatic activity was preserved after the addition of SDS treatment.

性の低下が懸念された。そこでまず、コレステロール水溶液(0.2 g/dL, 0.005~0.03 mL)にSDS(10 g/dL, 20 μ L)を添加した場合と添加しない場合の各々について、コレステロール定量を行い、コレステロール濃度と吸光度の相関を求めた(Fig. 2)。両系に相違は認められず、SDS濃度が66mg/dL以下ではコレステロールオキシダーゼやペルオキシダーゼの酵素活性低下は起こらないことが確認された。

続いてジバルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)とコレステロールの仕込みモル比の等しい混合脂質を用いて、Hb小胞体とHbを内包していない小胞体を調製、本法でコレステロール定量を行った。別に測定したリン脂質濃度から換算したコレステロール濃度と比較したところ、Hb内包の有無に関わらずコレステロール濃度は一致した。一方、SDSを添加せずにコレステロール標準液とHb溶液の混合液からコレステロール濃度を求めた場合、Hbスペクトルの一部が生成物の赤色キノン色素と重なり測定値に正誤差が認められた。従って、本濃度のSDS添加系でコレステロール濃度が一致したのは、SDS添加にてHb変性が起こりHbスペクトルが変化した結果、500 nmのスペクトル強度にほとんど影響を与えなくなったためと考察される。以上より、コレステロールオキシダーゼ・p-クロロフェノール法にSDS添加法を組み合わせによりNRCなどのHb小胞体中の膜中コレステロール定量が可能となった。

3.3. リン脂質、PEG-PEの定量 リン濃度の定量

リン脂質の定量は過マンガン酸塩灰化法を使用した。試料に硫酸および過マンガン酸塩を加え、沸騰水浴中で加熱すると有機物が酸化分解され、無機リン酸が生成する。この無機リン酸にモリブデン酸アンモニウムと還元剤を作用させるとモリブデンブルーが生成し、この吸光度(660 nm)の測定から試料中のリン脂質濃度を定量する。しかし本法は全てのリン化合物を検出するため、Hb精製過程で残存するリン化合物や添加IHPなどの影響も受ける。このため原料Hb溶液のリン濃度の測定を行い、補正する必要がある。

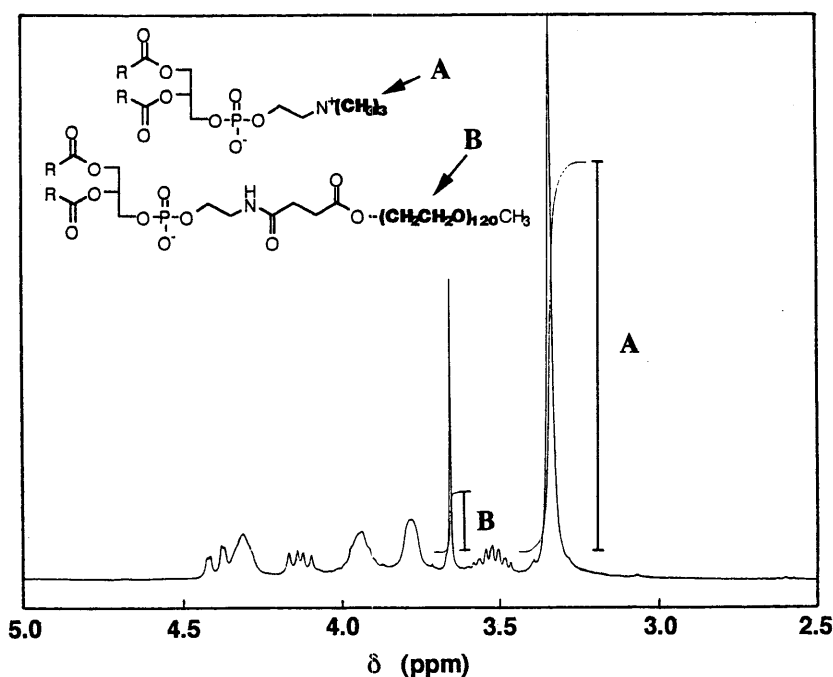


Fig. 3 ^1H -NMR spectrum and constitutional formula of vesicle components (R, Alkyl chain) in CDCl_3 .

試料のリン濃度の測定値78 mM, 原料Hbのリン濃度1.6 mMで, 試料のHb濃度6.6 g/dL, 原料HbのHb濃度43.5 g/dLが得られた. 式(I)に従って試料のリン濃度を算出したところ, リン脂質由来のリン濃度は77 mMとなった.

試料中のリン脂質はHSPCとPEG-PEであり, 各々の濃度はHSPCとPEG-PEの重量比から求められる.

HSPCとPEG-PEの重量比の測定

Fig. 3に試料の凍結乾燥体の CDCl_3 抽出液の ^1H -NMRスペクトルを示す.

PEG-PEのPEG鎖メチレンプロトンのピークは $\delta=3.63$ ppm, コリンメチルプロトンのピークは $\delta=3.39$ ppmに出現する(11). 各々のプロトン数の比が積分比B/A(0.16)であるので, 式(II)のプロトン数(H_{HSPC} , $H_{\text{PEG-PE}}$)に9, 480を代入し, HSPCとPEG-PE濃度の重量比を求めたところ, 導入比はHSPCに対し2.3重量%であった.

(III), (IV)式にリン濃度(α)およびHSPCとPEG-PE濃度比(β)を代入し, $[\text{HSPC}]=6.1$ g/dL, $[\text{PEG-PE}]=0.14$ g/dL となった.

3.4. メト化率の測定

試料の小胞体構造はSDS添加によって破壊されるが, Hbの変性も引き起こされる. また, シアノメトHb法に併用するTriton X-100添加では前述の様に膜破壊が不十分であるため, メト化率の測定は困難である(14). そこで試料を非破壊にて可視スペクトルから算出する方法を検討した.

まず, Triton X-100にて破壊可能なHb小胞体をDODPCより調製し, 本法とシアノメトHb法を比較した.

メト化率0%の試料とメト化率100%の試料の組成を変化させ

て混合した系のスペクトルを測定し, デオキシHbとメトHbの等吸収点350 nm, 455 nmを直線で結び(Fig.4), これをベースラインとして405 nmのピークの高さ(A_{405})と430 nmのピークの高さ(A_{430})を求めて以下の2式を得た.

$$A_{405}=0.49 \times [\text{メトHb}] + 9.8 \quad \dots (VI)$$

$$A_{430}=51 - 0.44 \times [\text{メトHb}] \quad \dots (VII)$$

これより[メトHb]を算出する式(VIII)を得た.

$$[\text{メトHb}] = (51X - 9.8) / (0.44X + 0.49), \quad X = A_{405}/A_{430} \quad \dots (VIII)$$

膜成分がDODPC/コレステロール/パルミチン酸(PA)=7/7/2(モル比)であるHb小胞体はTriton X-100添加にて完全破壊可能な試料であるので, 実験2.5の方法にて作成した検量線から求めたメト化率と, 破壊後通常のシアノメトHb法で測定したメト化率との相関を求めた. 両方法で求められたメト化率の値は一致した(Fig.5). 従って, 本測定法により膜非破壊でHbのメト化率を測定することができた. また, 式(VIII)は試料の粒径, Hb内包量によって異なるので, 各々の試料について同様の操作を行う必要がある.

3.5. 酸素親和度の測定

Hemox Analyzerによる酸素解離曲線の測定は, デオキシHbの最大吸収560 nmにおける吸光度変化を570 nm(オキシHbとデオキシHbの等吸収点)を参照吸収として測定する. また溶液中の PO_2 をクラーク酸素電極を使用してモニターするものである.

今回は, 2種類の緩衝液(Hemox 溶液, 150 mM リン酸緩衝液)を用いてpH 7.4(37°C), PCO_2 0 Torrの条件下で, 試料の酸素親和度を測定, またビーグル犬血液の酸素親和度はHemox 溶液を用いた(Fig.6).

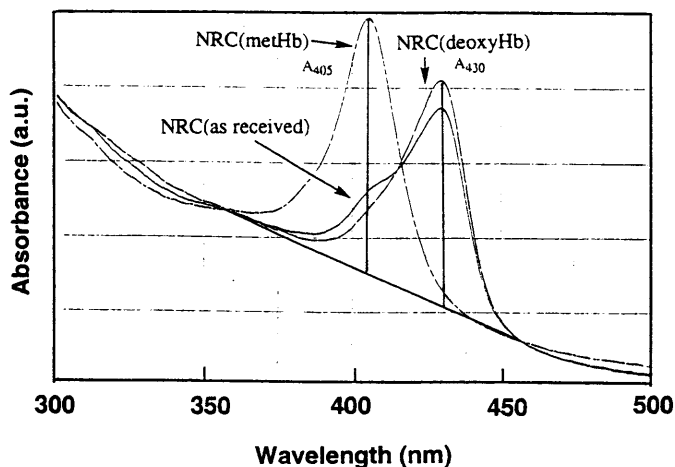


Fig. 4 Visible spectra of NRC containing 0% and 100% met Hb, and NRC as received. Measured in an anaerobic condition.

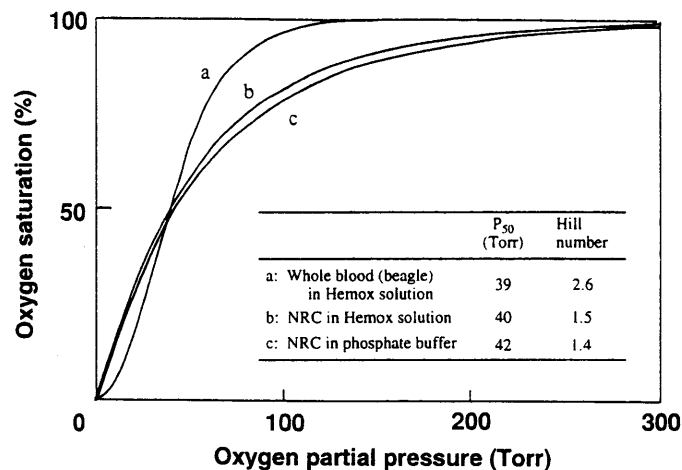


Fig. 6 Oxygen dissociation curves of NRC. a, whole blood (beagle) in the Hemox solution (pH 7.4, 37°C); b, NRC in the Hemox solution; c, NRC in 150mM phosphate buffer (pH 7.4, 37°C).

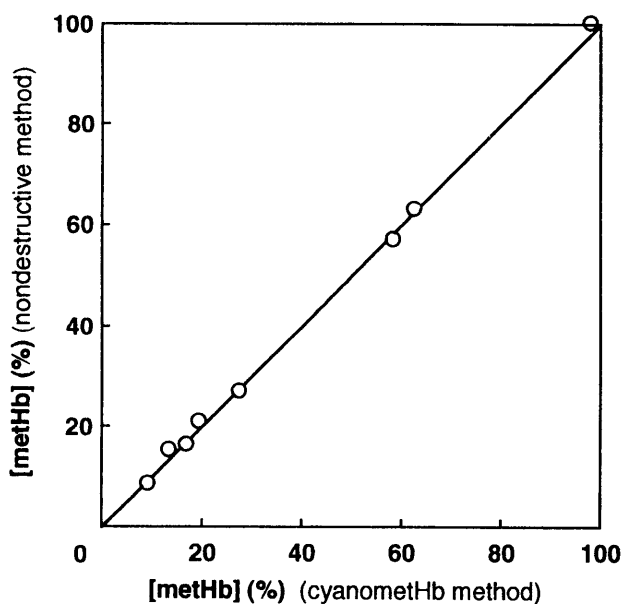


Fig. 5 Relationship between [metHb] measured by the cyanometHb method and that obtained from a calibration curve of the nondestructive method.

ビーグル犬血液の酸素解離曲線では P_{O_2} が約150 Torr付近で酸素飽和度が100%に達しているが、試料では P_{O_2} が300 Torrになっても曲線は徐々に上昇しており、100%に達していない。今回の試料のように P_{50} の値が高い場合にはHemox Analyzerだけで酸素飽和度100%の値を決定するのは困難である。このため本系では、 $P_{O_2}=0$ Torrおよび713 Torrで通気した時の酸素飽和度を各々0%、100%として酸素親和度を算出した。試料において P_{50} 、酸素運搬効率、Hill係数いずれの値もHemox溶液と150 mMリン酸緩衝液とは相違は認められなかった。

今回は $P_{CO_2}=0$ Torrの条件で酸素親和度の測定を行ったが、ヒト動脈血中の P_{CO_2} は約40 Torrであり、今回の実験条件は生体内で

の状態とは異なる。しかし、二酸化炭素を溶液に通気して測定する場合、緩衝液を使用しても小胞体内相にpH条件を正確に定めることは難しい問題もあり、現在血流中における赤血球代替物の酸素親和度を表現できる測定条件について検討している。

4. 結論

Hb小胞体の性能評価における成分定量の諸問題を、Hb小胞体のリン脂質二分子膜やHbの化学的あるいは物理化学的な特徴を利用して解決を試みた結果、Hb、各膜成分、メトHbを正確に定量できるようになった。酸素親和度に関しては、Hemox Analyzerを用いる標準法を確認した。

参考文献

1. 土田英俊, 武岡真司. 血液代替物: 最近の進歩. 人工血液 1993; 1:5-10.
2. 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. Tsuchida E, Eds Artificial Red Cells, John Wiley & Sons New-York 1995.
4. 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.
5. Satoh T, Kobayashi K, Sekiguchi S, Tsuchida E. Characteristics of artificial red cells; hemoglobin encapsulated in poly-lipid vesicles. ASAIO J 1992;38:M580-4.
6. Tsuchida E. Synthesis and characterization of artificial red cell. Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol 1992;20:337-44.
7. Tsuchida E. Stabilized hemoglobin vesicles. Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol 1994;22:467-77.
8. 守沢和也, 赤間和博, 栗井浩二, 徳山悟, 佐藤征. 重合性リン脂質

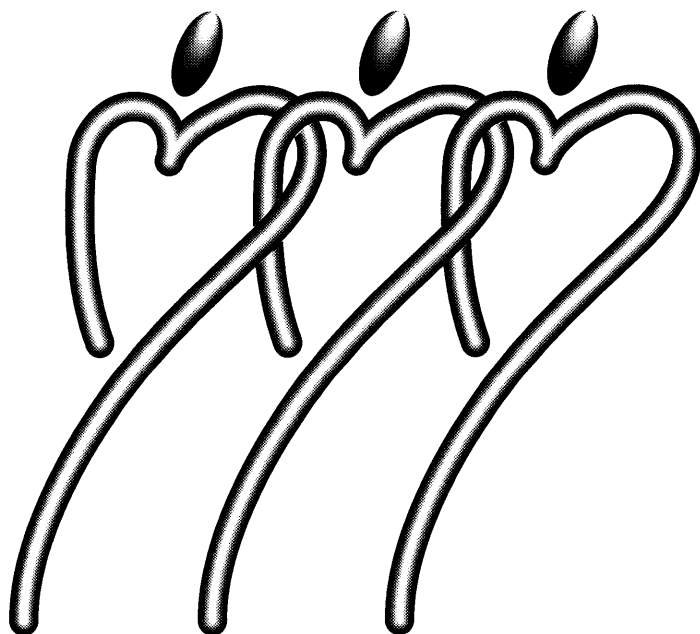
- を利用した人工赤血球の開発(Artificial Red Cell; ARC). 人工血液 1994;2:41-2.
9. Sakai H, Takisada M, Chung JE, Takeoka S, Tsuchida E. Modification of hemoglobin vesicles with oligosaccharide chains. *Artif Organs Today* 1995;4:309-16.
 10. 大串建, 鄭主恩, 酒井宏水, 武岡真司, 土田英俊. オリゴ糖修飾ヘモグロビン小胞体の分散安定度. 人工血液 1994;2:97-101.
 11. Yoshioka H. Surface modification of hemoglobin-containing liposomes with polyethylene glycol prevents liposome aggregation in blood plasma. *Biomaterials* 1991;12:861-4.
 12. 鈴木一比好, 後藤博, 緒方嘉貴, 坂口圭介, 岡本武, 上谷利治, 高橋晃. リポソーム型人工赤血球(ネオレッドセル; NRC). 人工血液 1994;2:39-40.
 13. 緒方嘉貴, 後藤彰久, 宮内雄二, 鈴木一比好, 高橋晃. ネオレッドセルの酸素運搬能評価. 人工臓器 1990;19:1383-6.
 14. 松原高賢. 血色素の定量分析. 信沢孝一編. 血色素の分子生理と分子病理. 東京:共立出版 1987;671-4.
 15. 後藤博, 緒方嘉貴, 鈴木一比好, 上谷利治. NRCの量産化の展望. 人工血液 1995;3:54-9.
 16. 緒方嘉貴, 岡本武, 鈴木一比好, 上谷利治. Methemoglobin還元機構を有した人工赤血球(NRC)の開発. 人工血液 1994;2:62-6.
 17. Maeda N, Imaizumi K, Kon K, Shiga TA. Kinetic study on functional impairment of nitric oxide-exposed rat erythrocytes. *Environ Health Perspect* 1987;73:171-7.
 18. Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20:470-5.
 19. 小立淳. 蛋白質 酵素の基礎実験法. 堀尾武一編, 南江堂 1994; 362.



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 ガンマーF「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 〒100 東京都港区大門2-1-3 文部科学省日本赤十字社中央血液センター 電話 03-5480-6607

ヘム結合ヒト血清アルブミンの調製と酸素結合能

川合宣行, 安藤克利, 小松晃之, 西出宏之, 土田英俊*

Human serum albumin combined heme derivative and its oxygen-binding ability

Noriyuki Kawai, Teruyuki Komatsu, Katsutoshi Ando, Hiroyuki Nishide, Eishun Tsuchida*

軸配位塩基(イミダゾリル基)を共有結合で導入した疎水性テトラフェニルポルフィリン誘導体(FeP)が, ヒト血清アルブミン(HSA)に効率高く包接されることを初めて明らかにした。FePはHSAと1:1で結合し, その結合部位はドメインIIのTrp²¹⁴近傍と推測された。HSA-FeP分散液に酸素を吹き込むと速やかに酸素錯体が生成し, 酸素分子の結合解離は可逆的であった。HSA-FePの酸素親和性, 結合解離速度定数, 酸素運搬体としての寿命などを決定し, HSA-FePが新しい赤血球代替物となることを示した。

Oxygen binding ability of human serum albumin combined heme derivative is described. A hydrophobic tetraphenylporphyrinatoiron(II) derivative bearing a covalently bound axial imidazole (FeP) was efficiently incorporated into human serum albumin (HSA). This HSA-FeP reversibly forms a stable O₂-adduct in aqueous medium similar to hemoglobin. The O₂-binding affinity (P_{1/2}) of the HSA-FeP was 24 Torr that was almost same as that of red blood cells. Half-life time as oxygen carrier was ca. 16 hr. These results suggest that the HSA-FeP has an ability to act as a totally synthetic oxygen carrier under physiological conditions (pH 7.4, 37°C) -Key Words: Human serum albumin, Heme, Oxygen-binding, Oxygen carrier, Red cell substitutes.

1. 緒言

血清アルブミンは血漿中で第1位のタンパク質成分であり, 血液のコロイド浸透圧を保つとともに, 内因性, 外因性物質を運搬するタンパクとして機能している。例えば, ヘモグロビンから遊離したヘミン(メト型のヘム)は血流中で血清アルブミンに捕獲され, 血漿ヘム代謝経路のある肝臓へ送られる。これまでにHSAとヘミンまたはヘミン誘導体の相互作用を特徴付ける試みがいくつか報告されており, ヒト血清アルブミン(HSA)はヘミンと高い親和性を持つ結合部位を一つと, 親和性の低いいくつかの結合部位を持つとされている(1-5)。しかし, ヘムを結合したHSAの作用についてはほとんど検討されていない。Mardenらは, 還元型デオキシヘム-HSAが水相系で一酸化炭素を結合したが, オキシ体(酸素錯体)は検出できなかったと報告している(6)。最近Bonaventuraらは, テトラ(o-ピバラムイド)フェニルポルフィリン鉄(II)を結合したHSAが, 大過剰の軸塩基イミダゾール存在下で, 酸素を結合すると発表しているが, 具体的な報告はまだない(7)。

著者らは酸素結合部位として軸塩基を共有結合で導入したテトラフェニルポルフィリン鉄(II)誘導体2-[8-{N-(2-methylimidazolyl)}octanoyloxymethyl]-5,10,15,20-tetrakis(α,α,α-o-pivalamido)phenylporphyrinatoiron(II) (FeP) を合成したが, これが効率よくHSAに結合し, このHSA-FePが生理条件下で可逆的に酸素を運搬することを見出した。本報文は, この新しい酸素運搬体である

HSA-FePの調製手段と構造, および酸素結合能について報告する。

2. 実験方法

2.1. HSA-FeP分散液の調製

FePは著者らの前報文に従い, テトラ(o-ピバラムイド)フェニルポルフィリンをVilsmeier反応でホルミル化し, 還元して水酸基体を得て, ここにイミダゾリルアルキルカルボン酸誘導体をエステル結合した後, 中心鉄を導入して合成した(8)。HSAはSigma社製(A3782, fatty acid free)を用いた。

HSA-FePの調製は以下のように行なった。Fe(III)Pエタノール溶液([Fe]=0.2 mmol/L)をHSAリン酸緩衝溶液([HSA]=0.086 mmol/L, [リン酸]=33 mmol/L, pH 7.4)に加える。この混合液を限外ろ過(ろ過膜: 限外分子量 2万, 圧力: 2 kg/cm²)し, リン酸緩衝溶液で数倍に希釈する。その後, FePに対して少過剰のアスコルビン酸を一酸化炭素雰囲気下で添加し振盪すると, 瞬時にポルフィリン中心鉄が還元され, 同時にカルボキシ体(一酸化炭素錯体)が得られる。窒素通気下ハロゲンランプ(500 W, 30分)を照射することで効率良く目的のデオキシ体に変化する。

FePのHSAへの結合数, 結合定数は, HSA溶液へのFeP滴定において, Trp²¹⁴由来の蛍光発光(340 nm)の減少からScatchardプロットを作成して決定した(9)。蛍光発光スペクトルはJASCO FP-770を用いて測定した。

早稲田大学高分子研究室 〒169 東京都新宿区大久保3 Department of Polymer Chemistry, Waseda University, Tokyo 169, Japan.

*To whom all correspondence should be addressed.

論文受付95年8月4日、受理95年9月17日。

2.2. 酸素親和性及び結合解離速度定数の測定

HSA-FePの水溶液([FeP]=20 $\mu\text{mol/L}$)について、一連の酸素分圧(酸素-窒素混合ガス)下での可視吸収スペクトル変化から酸素親和性($P_{1/2}(\text{O}_2)$)を算出した。酸素結合反応の熱力学パラメータ(ΔH , ΔS)は酸素親和性のvan't Hoffプロットから決定した。また、酸素の結合解離速度定数(k_{on} , k_{off})はレーザーフラッシュフォトリシス時間分解分光装置(UNISOKU TSP-601)を用いて決定した(8,10,11)。

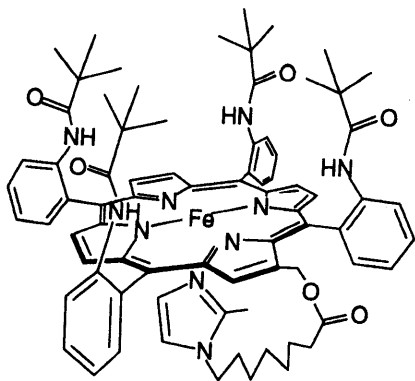


Fig.1 Tetraphenylporphyrin derivative bearing an axial imidazole (FeP).

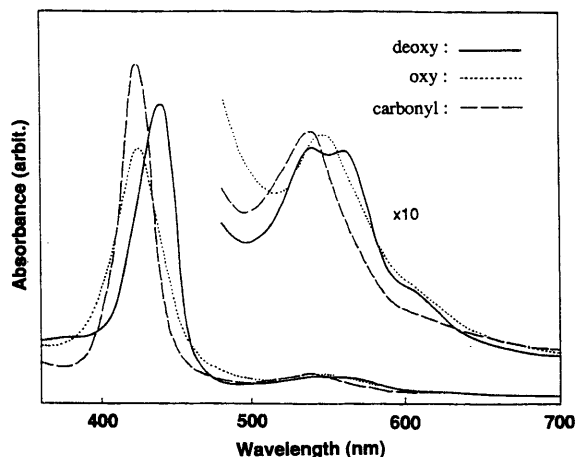


Fig.2 Visible absorption spectra of deoxy, oxy and carbonyl-bound HSA-FeP in phosphate buffer (pH 7.4, 33 mmol/L) at 25°C.

2.3. 酸素錯体半減期の測定

HSA-FePの水溶液([FeP]=20 $\mu\text{mol/L}$)について、オキシ体が不可逆酸化によりメト体へ移行する際の可視吸収スペクトル変化から酸素錯体半減期($\tau_{1/2}$)を決定した。

3. 結果および考察

HSA-FeP水溶液の可視吸収スペクトルは、エタノール溶液におけるFeP単体のそれに一致する。このことから、HSA存在下ではFePが一分子として水溶液中に溶存していると考えられる。FePは蛍光消光剤として働くことが知られているが、HSA-FePではHSAのドメインIIにあるトリプトファン残基(Trp²¹⁴)に由来する340 nmでの蛍光強度が、FeP添加により減少した。FePの結合部位が、HSAの中央部にあるドメインIIのTrp²¹⁴近傍であることが示唆される。未結合ヘム濃度 $\sim$ [HSA]/[FeP]の関係(Scatchardプロット)から、その切片(1.3)よりおよそ一つのFePが結合定数 2.6×10^6 mol/LでHSAに結合していることが明らかとなった。HSA-FePの等電点は等電点測定より4.5であったが、これはHSAの等電点と一致した。

デオキシHSA-FeP水溶液に酸素を通気すると、可視吸収スペクトル(λ_{max} : 439, 542, 563 nm)は瞬時にオキシ体(酸素錯体)のスペクトル(λ_{max} : 424, 548 nm)に移行した(Fig. 2)。また、オキシ体溶液に一酸化炭素ガスを通気することでカルボニル体(一酸化炭素錯体)(λ_{max} : 424, 540 nm)に変化した。酸素分圧 $\sim$ オキシ体率の関係は双曲線型で飽和し、Hill係数は1.0であった。HSA-FePの酸素親和性($P_{1/2}(\text{O}_2)$): ポルフィリン鉄(II)の半量が酸素化する酸素分圧)は37°Cで24 Torrであった(Table 1)。酸素分圧110 $\sim$ 40 Torr間の酸素運搬効率は約20%と赤血球の値(約27%)に比較してやや低かった。また、HSA-FePの $P_{1/2}(\text{O}_2)$ は、トルエン中でのFeP(38 Torr)に比較して低い(Table 1)が、これはHSA-FePのFePがHSAのポリペプチドが形成する極性の高いアミド環境に位置しているので、酸素解離速度定数($k_{\text{off}}(\text{O}_2)$)の減少を誘起し、オキシ体の安定性が向上したと考えられる。

FePの酸素親和性はFePの分子構造、特に下面にあるイミダゾール基及びそのアーム部分の構造により大きく変化することを著者らは明らかにしている(8)。今後、酸素親和性の低いFeP誘導体のHSAへの組み込みも検討する必要があるだろう。

Table 1 O₂- and CO-binding parameters of HSA-FeP at 25°C

	Solution	O ₂			CO		
		$P_{1/2}^e$ Torr	$10^{-8} k_{\text{on}}$ L/mol $\cdot$ s	$10^{-3} k_{\text{off}}$ 1/s	$10^2 P_{1/2}$ Torr	$10^{-6} k_{\text{on}}$ L/mol $\cdot$ s	$10^2 k_{\text{off}}$ 1/s
HSA-FeP	p.b. (pH 7.4) ^a	8.0(24)	2.4	3.2	1.4	4.4	8
FeP ^b	toluene	38	1.6	46	0.6	2.9	17
Red blood cells	p.b. (pH 7.4) ^c	8.8(27)	0.00011	0.00016	57	0.014	1
Hb-a (R-state)	p.b. (pH 7.0) ^d	0.22	0.33	0.013	0.14	4.6	0.9

^a p.b., Phosphate buffer, 33 mmol/L, ^b from ref. 8, ^c from ref. 12, ^d from ref. 10, ^e $P_{1/2}$ values in parenthesis were measured at 37°C.

Table 2 Thermodynamic parameters of O₂-association to HSA-FeP

System	ΔH	ΔS
	kJ/mol	J/K · mol
HSA-FeP	- 69	-190
Hb ^a	-56.9 ~ -64.9	-116 ~ -133

^apH 7.0-7.4 from ref. 13.

HSA-FePへの酸素結合におけるエンタルピー変化(ΔH), エントロピー変化(ΔS)も決定した(Table 2). それぞれ- 69 kJ/mol, -190 J/K · molで, ヘモグロビンの値と同様であった. これらの結果から, HSA-FePはヘモグロビンと同じ機構で酸素分子を結合する酸素運搬体として働いていることが明らかとなった.

HSA-FePでは, 膠質浸透圧をヒト血液と同等に調整するため, [HSA]を0.75 mmol/L (5 wt%)に調製する. このとき[FeP]は[HSA]に等しく0.75 mmol/Lとなるから, その酸素溶解量は3.7 ml/dlとなる. すなわち, ヒト血液(ヘム濃度: 9.2 mmol/L, 酸素溶解量: 23 ml/dl)に匹敵する酸素溶解量を実現するためには, HSA 1分子に複数のFePが結合する高結合比HSA-FePの開発が要件となる.

HSA-FeP水溶液のオキシ体の半減期($\tau_{1/2}$), すなわち酸素運搬体としての半寿命は16hr(25℃)であった. 一方, 界面活性剤(Triton-X)で水相中に可溶化(ミセル溶液)したFePは, 酸素に接触すると迅速に不可逆酸化を生じただけであった. すなわち, FePをHSA中に取り込ませることにより, 水相系でも酸素結合能が保持された訳である. FeP周辺のHSAの微視的環境は, 不可逆酸化を抑え安定なオキシ体が形成可能な疑似的なヘムポケットとして働いている.

4. 結語

FePはHSAのTrp²¹⁴近傍の疎水的微視空間にはほぼ当量結合する. FePを結合したHSAは生理条件下で可逆的に酸素を運搬し, その酸素結合能は赤血球代替物としての一次的な条件に適合する. この混合ヘムタンパク質は新しい型の酸素運搬分子として機能する.

本研究の一部は文部省科学研究費補助金(課題番号05403028, 05236103, 053666)によって行なわれた. 記して謝意を表する.

参考文献

1. Beaven GH, Chen S-H, D'Albis A, Gratzer B. A Spectroscopic study of the Haemin-human-serum-albumin system. *Eur J Biochem* 1974;41:539-46.
2. Muller-Eberhard U, Morgan WT. Porphyrin-binding proteins in serum. *Ann NY Acad Sci* 1975;244:624-50.
3. Adams PA, Berman MC. Kinetics and mechanism of the

interaction between human serum albumin and monomeric haemin. *Biochem J* 1980;191:95-102.

4. Moehring GA, Chu AH, Kurlansk L, Williams TJ. Heterogeneity of albumin as detected by its interactions with deuteroporphyrin IX. *Biochemistry* 1983;22:3381-6.
5. Morgan WT, Smith A, Koskelo P. The interaction of human serum albumin and hemopexin with porphyrins. *Biochem biophys Acta* 1980;624:271-85.
6. Marden MC, Hazard ES, Leclerc L, Gibson QH. Flash photolysis of the serum albumin-heme-CO complex. *Biochemistry* 1989;28:4422-6.
7. Bonaventura J, Brouwer M, Brouwer T, Cashion B, Cameron S. presented in part at the 11th congress ISABI, Boston, July, 1994.
8. Komatsu T, Kumamoto S, Ando K, Nishide H, Tsuchida E. Synthesis and O₂-binding properties of tetraphenylporphyrinatoiron(II) derivatives bearing proximal imidazole covalently bound at the β -pyrrolic position. *J Chem Soc, Chem Perkin Trans 2* 1995;747-53.
9. Halfman CJ, Nishida T. Method for measuring the binding of small molecules to proteins from binding-induced alterations of physical- chemical properties. *Biochemistry* 1972;11:3493-8.
10. Gibson QH. The reaction of oxygen with hemoglobin and the kinetic basis of the effect of salt on binding of oxygen. *J Biol Chem* 1970;245:3285-8.
11. Tsuchida E, Komatsu T, Arai K, Nishide H. Synthesis and O₂-binding properties of double-sided porphyrinatoiron(II) bearing covalently bound axial imidazole. *J Chem Soc, Dalton Trans* 1993; 2465-9.
12. Tsuchida E, Nishide H, Yuasa M, Matsushita Y, Eshima K. Phosphocholine-substituted 5,10,15,20-tetraphenylporphyrinato iron (II): Oxygen carrier under physiological conditions. *J Chem Soc, Dalton Trans* 1985;275-8.
13. Imai K, Yonetani T. Thermodynamical Studies of oxygen equilibrium of hemoglobin. *J Biol Chem* 1975;250:7093-8.

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², 岡野正裕², 石崎 彰³, 田中三津子¹,
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

Continuous *in situ* mild hypothermic perfusion with PFC emulsion at swine hepatic resection by total vascular clamps

Akira Ishizaki³, Mitsuko Tanaka¹, Jun-ichi Meguro¹, Kazutaka Kukita¹,
Tohru Tamaki¹, Motoki Yonekawa¹, Akio Kawamura¹

ブタを用いた肝血流遮断下肝切除に対しPerfluorochemical (FC-43) 乳剤を用いた生体内室温下持続灌流法の有用性について検討した。実験群を以下の3群に分けた。I 群：当科で開発した灌流液で室温 (24℃) 灌流保護 (n=5)。II 群：UW液で冷却 (4℃) 浸漬保護 (n=3)。III 群：乳酸加リンゲル液で冷却 (4℃) 浸漬保護 (n=3)。I 群の灌流液の内容はグルコース、アロプリノール、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、アデノシン、アミノ酸、デキサメサゾン、インスリン、hydroxyethyl starch (HES) 等であり、さらに酸素運搬体として3%のFC-43を加えた。また、細胞外液組成とし、pH 7.40、浸透圧320 mOsm/Lに調節した。I 群における灌流回路はローラーポンプと酸素化のための膜型人工肺よりなっている。各々の肝保護法下に50%肝切除を施行し2時間保護した後血流再開した。平均生存日数はI 群21日、II 群17日、III 群8日であった。全例21日目に犠牲死させた。灌流、保護中の体温はI 群35.2±0.7℃、II 群32.7±1.1℃、III 群31.7±0.8℃と、冷却群で有意に低値をとった (p<0.05)。GOTは術24時間後でI 群308±59KU、II 群767±216KU、III 群694±276KUであり、I 群が有意に低値を示した (p<0.05)。組織学的には灌流中に類洞の軽度拡張が認められたが、肝細胞の構築は正常に保たれていた。当科で開発した室温灌流法は、血流遮断下肝切除における肝細胞保護法として有用であると考えられた。

We examined the effect of continuous *in situ* mild hypothermic perfusion with FC-43 emulsion at swine hepatic resection by total vascular clamps. The experiment was divided into three groups as follows; Group I (n=5): continuous *in situ* mild hypothermic perfusion (24℃) using our original perfusate. Group II (n=3): simple cold storage with UW solution at 4℃. Group III (n=3): simple cold storage with lactated Ringer's solution (4℃). The composition of our original perfusate are glucose, allopurinol, super oxide dismutase (SOD), adenosine, amino acids, dexamethasone, insulin, and hydroxyethyl starch which 3% of FC-43 had been added. The pH was adjusted to 7.4 and the osmolality was 320 mOsm/L. The perfusion system basically consists of a roller pump and a hollow-fiber-oxygenator. Fifty percent hepatectomy was performed during preservation and total hepatic vascular exclusion was declamped 2 hours after preservation. The mean survival times in group I, II, III were 21, 17 and 8 days, respectively. All swine were sacrificed on the 21st day after the operation. The body temperatures during the operation in group I, II and III were 35.2±0.7℃, 32.7±1.1℃ and 31.7±0.8℃, respectively (group I v.s. groups II and III; p<0.05). The serum levels of GOT 24 hours after the operation was 308±59KU, 767±216KU, and 694±276KU, respectively (group I v.s. groups II and III; p<0.05). The histological findings in all groups showed almost normal hepatic architectures except a sinusoidal dilation. We propose from the current experiment that continuous *in situ* mild hypothermic perfusion may be useful for cytoprotection during hepatectomy combined with total vascular exclusion. —Key Words: Mild hypothermic perfusion, FC-43 emulsion, Total vascular clamps, UW solution, Lactated Ringer's solution, Cytoprotection.

¹札幌北楡病院 人口臓器・移植研究所 外科, Department of Surgery, Artificial Organs & Transplantation Hospital, Sapporo Hokuyu Hospital, ²北海道大学 第一外科, First Department of Surgery, Hokkaido University School of Medicine, ³旭川医科大学 第二外科, Second Department of Surgery, Asahikawa Medical College.
札幌北楡病院 人口臓器・移植研究所 外科, 〒003 札幌市白石区東札幌6条6丁目
Sapporo Hokuyu Hospital, Sapporo 003, Japan.
論文受付95年12月6日、受理95年12月8日。

1. はじめに

肝硬変合併肝癌症例の多い我が国においては、出血量の減少や肝予備能の温存を目的として肝切除に関する様々な術式の開発がなされてきた。系統的亜区域切除術(1)、Glisson系脈管一括処理肝切除術(2)はその中でも代表的な術式である。その一方では1974年、Fortnerら(3)が肝血行遮断低温灌流法を用い、無血下の大量肝切除法を報告して以来、従来は手術の適応外とされていた進行肝癌や巨大肝血管腫に対して肝血行遮断下の拡大肝切除術(4-6)が行われるようになってきた。そこで、本術式をより安全に行うために、肝血行遮断時における肝保護が重要な問題となっていった。実際、臨床においては、肝をUniversity of Wisconsin (UW) 液(7)やラクトリンゲル液で冷却する方法が多く用いられている。しかし、本法では術中の体温低下から凝固・線溶系に異常を生じる可能性があり、また肝冷却による再灌流障害の可能性もある。したがって、肝血行遮断時におけるより安全な肝保護法の確立が望まれる。

一方、酸素運搬体として開発されたPerfluorochemical(以下PFC)乳剤(8)は酸素分圧を上昇させればほぼ直線的に溶存酸素含量を高めることが可能であり、この特性を利用して臓器保存に対する多くの実験が行われ、良好な成績が報告されてきた。しかし、これらの実験はいずれも低温下で行われたものであった。目黒(9)、弘中(10)は、PFC乳剤を用いた室温下灌流法により、各々腎と肝の保存実験で良好な成績を発表し、室温下における臓器保存の可能性を示唆した。

以上の背景より、肝血行遮断下肝切除をより安全に行うために、生体、肝への影響の少ない肝保護法の開発が必要と考えられた。今回、肝血行遮断時における肝保護法としてのPFC乳剤を用いた室温下持続灌流法の有用性について、実験的に検討した。

2. 実験方法

2.1. 実験動物と麻酔法

体重15-20 kgの雌豚を用いた。麻酔はKetamine Hydrochloride 12-15 mg/kg筋注、Thiamylal Sodium 5mg/kg静注にて導入後、気管内挿管し、GOE(笑気+酸素+エトレン)麻酔で維持した。筋弛緩剤は使用しなかった。

2.2. 実験群

肝血行遮断中の肝保護法の違いにより、実験群を下記の3群に分けた。

I 群：PFC乳剤を用いた室温(24℃)下灌流保護法(n=5)。

II 群：4℃UW液による冷却浸漬保護法(n=3)。

III 群：4℃ラクトリンゲル液による冷却浸漬保護法(n=3)。

I 群の灌流液は細胞外液組成で、pH 7.40、浸透圧320 mOsm/Lに調節した。エネルギー源としてグルコースを用い、インスリンも加えた。活性酸素に拮抗するoxygen scavengerとしてallopurinolとsuperoxide dismutase conjugated to polyethylene glycol (PEG-SOD)を加え、膜安定化剤にはDexamethasoneを加えた(Table 1)。また、I 群灌流時における酸素化は膜型人工肺(キャピオックスII, テルモ社製)を用い、灌流液の酸素分圧を500 mmHg以上に維持した。

2.3. 手術方法

麻酔後ただちに右頸静脈を露出し、補液と中心静脈圧測定用の12Fr.カテーテルを挿入した。補液はラクトリンゲル液を使用した。次に、右頸動脈に動脈測定用の14Gメディカットカテーテルを挿入した。最後に左頸静脈を露出し、V-Vバイパス用に16Fr.カテーテルを留置した。剣状突起より恥骨上部までの腹部正中切開にて開腹した。右総腸骨静脈を露出し、16Fr.カテーテルを腎下部下大静脈まで挿入し、V-Vバイパスに備えた。肝上部・肝下部下大静脈を遮断鉗子がかけられる程度に剥離後、門脈、総肝動脈、胃十二指腸動脈、右肝動脈、左肝動脈を露出し、テーピングした。脾静脈より上腸間膜静脈へ16Fr.カテーテルを挿入し、先の右総腸骨静脈へ留置したカテーテルとY字管で連結し、Bio-Pumpを介して、左内頸静脈の送血を開始した。以上の処置後、16Fr.カテーテルを門脈に挿入し、各群の灌流法で灌流を開始した。灌流開始と同時に肝下部下大静脈に横切開を加え、灌流液の排出を計った。I 群では、約1Lの灌流液でWash out後、肝下部下大静脈横切開部に16Fr.カテーテルを挿入し、閉鎖回路として肝を灌流しながら、50%(右側2葉)肝切除施行した。この時の灌流量は100-150 ml/分、灌流圧は50mmHg以下に設定した(Fig. 1)。II 群、III 群では各々の灌流液約2Lで肝をWash out後、表面をice slushで冷却しながら肝切除施行した。各群とも灌流開始2時間後に血流再開した。

2.4. 検査項目

各群における生存日数、死因、術中体温の変化、血液生化学検査、凝固因子について検討した。また、経時的に肝を生検し、組織学的にも検討を加えた。

Table 1 Composition of original perfusate

COMPONENT	/L
NaCl	93 mmol
Na-lactate	27 mmol
KH ₂ PO ₄	4 mmol
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3 mmol
Glucose	11 mmol
Amino-acid	0.75 g
HEPES(buffer)	25 mmol
Allopurinol	1 mmol
PEG-SOD	5 mg
Adenosine	5 mmol
Dexamethasone	8 mg
Insulin	50 U
Fosfomycin sodium	0.66 mmol
Hydroxyethyl starch(HES)	30 g
FC-43	30 g
pH : 7.40	OSMOLARITY : 320 mOsm/L
Na : 140-150 mEq/L	K : 4 mEq/L

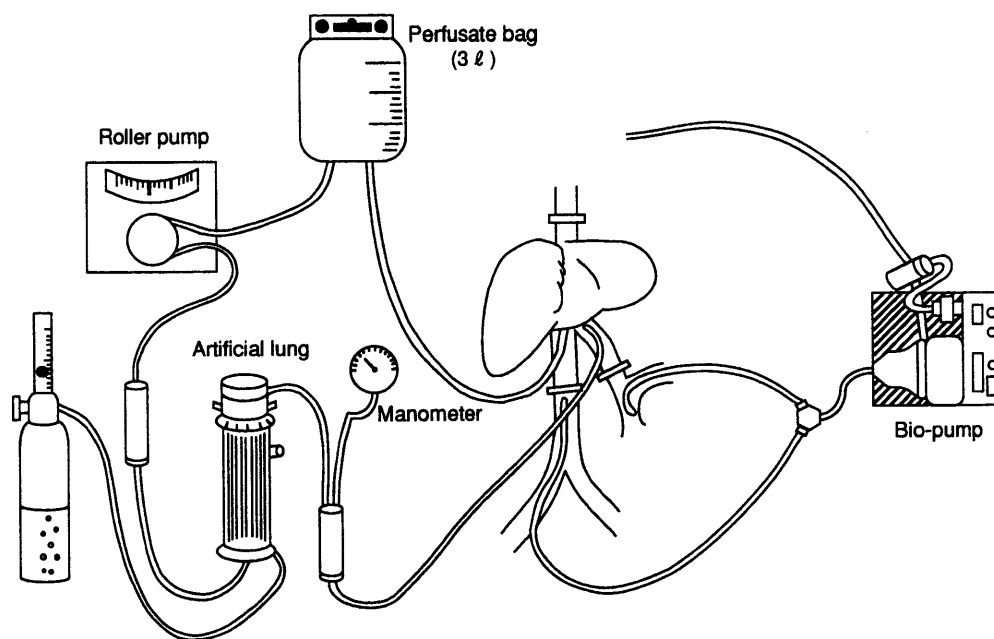


Fig. 1 Schema of mild hypothermic perfusion model in group I.

2.5. 統計学的検討

結果はmean±SDで示し、統計学的処理は、一元配置分散分析を用い、 $P<0.05$ をもって有意と判定した。

3. 成績

いずれの群も術中の血行動態は安定しており、血流再開後の肝の肉眼的所見は速やかに赤紫色に変わり、適度の弾性状態となり、血行遮断中の肝保護は良好であったと思われる。以下に検査項目につき詳述する。

3.1. 生存期間と死因

I 群は全例犠牲死させる21日目まで生存した。II 群は2例が14日目、16日目に死亡した。前者の死因は腹腔内感染症であったが、後者の死因は不明であった。III 群では2例がいずれも術後管理中のカテーテルトラブルによる失血死で5日目、7日目に急死した(Fig. 2)。

3.2. 術中体温

I 群の術中体温の変化は灌流開始時 $36.3 \pm 0.4^\circ\text{C}$ 、灌流終了時 $35.2 \pm 0.7^\circ\text{C}$ 、手術終了時 $35.8 \pm 1.0^\circ\text{C}$ と、軽度の低下を認めた。しかしII 群では同じく $35.7 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、 $32.7 \pm 1.1^\circ\text{C}$ 、 $33.6 \pm 1.3^\circ\text{C}$ 、III 群で $35.7 \pm 1.4^\circ\text{C}$ 、 $31.7 \pm 0.8^\circ\text{C}$ 、 $32.4 \pm 0.8^\circ\text{C}$ とI 群に比べ体温は有意に低下した(灌流2時間: Iv.s. II $p<0.05$, Iv.s. III, $p<0.01$, 術終了時: Iv.s. II & III, $P<0.05$)(Fig. 3)。

3.3. 肝機能

3.3.1. GOT

GOTはI 群で術終了時 $98 \pm 24\text{KU}$ 、24時間後 $308 \pm 59\text{KU}$ 、72時

間後 $119 \pm 40\text{KU}$ 、II 群で $195 \pm 43\text{KU}$ 、 $767 \pm 216\text{KU}$ 、 $159 \pm 118\text{KU}$ 、III 群で $371 \pm 77\text{KU}$ 、 $694 \pm 276\text{KU}$ 、 $179 \pm 124\text{KU}$ であり、II 群、III 群ともにI 群と比べ24時間後において有意に高値を示した($P<0.05$)(Fig. 4)。

3.3.2. アンモニア

アンモニアはI 群で術終了時 $80 \pm 30 \mu\text{g/ml}$ 、24時間後 $118 \pm 48 \mu\text{g/ml}$ 、72時間後 $96 \pm 30 \mu\text{g/ml}$ 、II 群で $146 \pm 32 \mu\text{g/ml}$ 、 $84 \pm 28 \mu\text{g/ml}$ 、 $97 \pm 47 \mu\text{g/ml}$ 、III 群で $111 \pm 31 \mu\text{g/ml}$ 、 $76 \pm 17 \mu\text{g/ml}$ 、 $65 \pm 19 \mu\text{g/ml}$ であり、3群間に有意差を認めなかった(Fig. 5)。

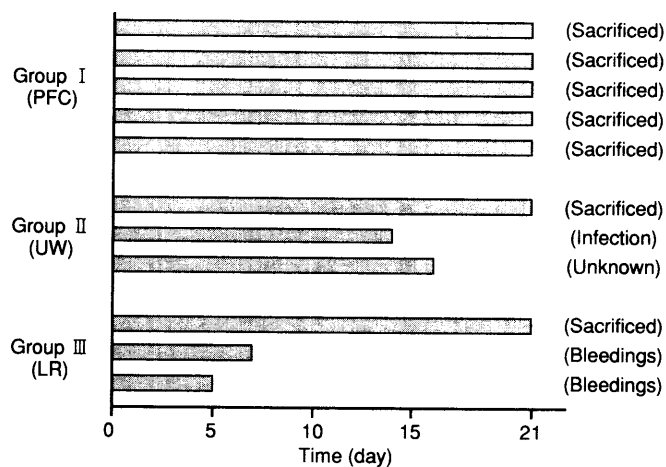


Fig. 2 Survival days and cause of death.

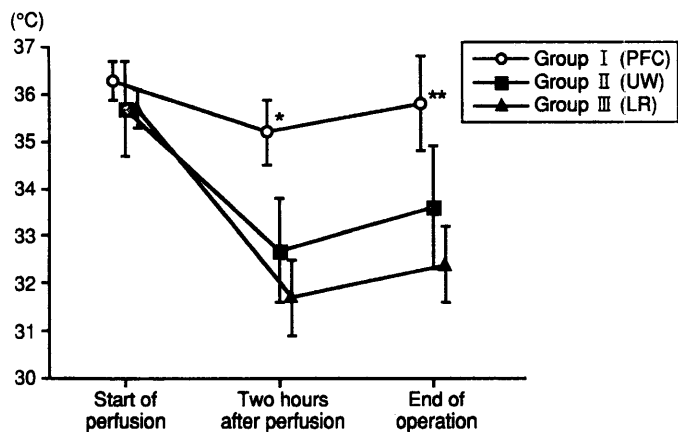


Fig. 3 Changes in the body temperature during the procedure
* I v.s. II, $p < 0.05$, I v.s. III, $p < 0.01$, ** I v.s. II and III, $p < 0.05$.

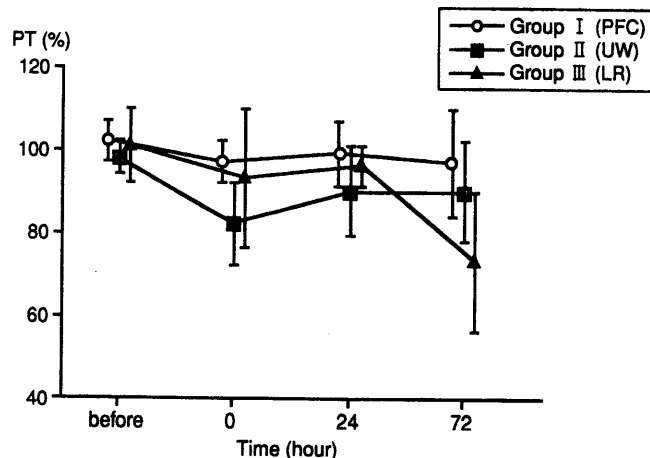


Fig. 6 Changes in the Prothrombin time.

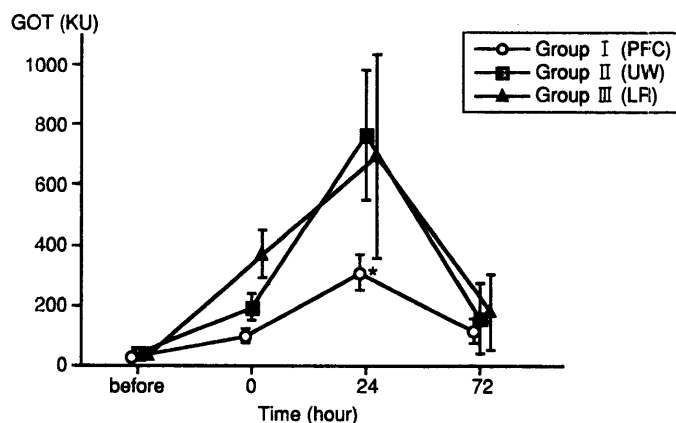


Fig. 4 Changes in the serum GOT levels
* I v.s. II and III, $p < 0.05$.

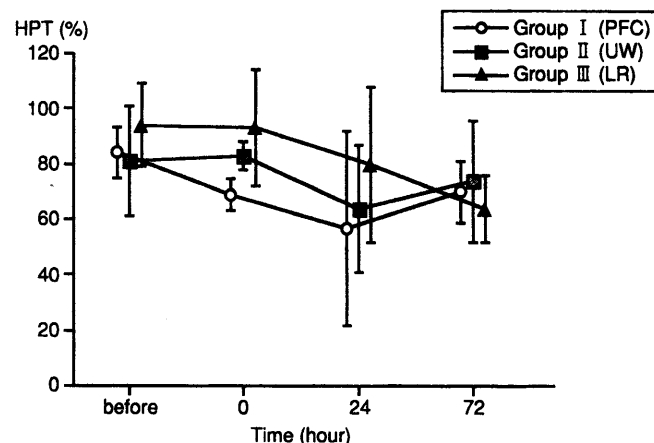


Fig. 7 Changes in the Hepaplastin test.

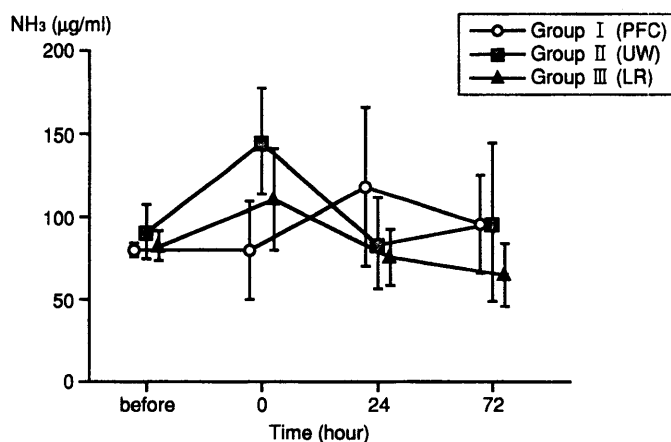


Fig. 5 Changes in the serum ammonia levels.

3.4. 凝固因子

3.4.1. PT(活性値%)

PTはI群で術終了時 $97 \pm 5\%$, 24時間後 $99 \pm 8\%$, 72時間後 $97 \pm 13\%$, II群で $82 \pm 10\%$, $90 \pm 11\%$, $90 \pm 12\%$, III群で $93 \pm 17\%$, $96 \pm 5\%$, $73 \pm 17\%$ であり, 3群間に有意差を認めなかった(Fig. 6).

3.4.2. HPT(活性値%)

HPTはI群で術終了時 $69 \pm 6\%$, 24時間後 $57 \pm 35\%$, 72時間後 $70 \pm 11\%$, II群で $83 \pm 5\%$, $64 \pm 23\%$, $74 \pm 22\%$, III群で $93 \pm 21\%$, $80 \pm 28\%$, $64 \pm 12\%$ であり, 3群間に有意差を認めなかった(Fig. 7).

3.5. 組織学的検討

3群ともに血行遮断解除直前(灌流2時間後)では, 類洞の拡張が認められ, とくにI群において強い傾向が認められた. 血行遮断解除30分後では類洞の拡張所見は改善されていたが, 軽度のうっ血が認められた. また, 肝細胞の構築はいずれの群においても常

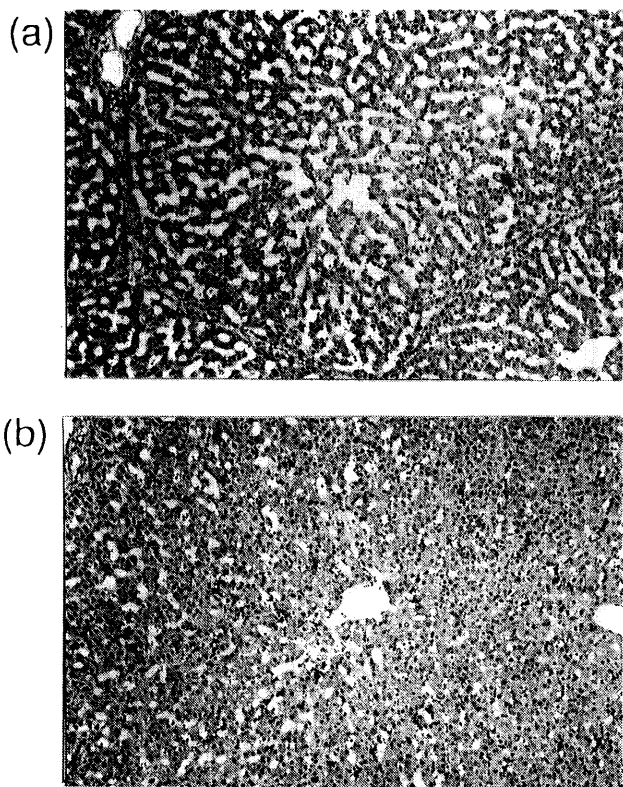


Fig. 8 Histological findings of the liver biopsy specimen in group I ($\times 100$ hematoxylin and eosin stain), (a) for 2 hours after perfusion, (b) for 30 minutes after reperfusion.

に正常に保たれていた(Fig. 8). 電顕的検討はI群のみに施行したが、解除直前においてミトコンドリアの軽度膨化と粗面小胞体の減少が認められたが、解除30分後ではミトコンドリア、粗面小胞体ともに形態学的に正常に復していた(Fig. 9).

4. 考察

近年の欧米における肝移植の発達により、移植手技を応用した肝切除法が広く施行されるようになってきた。本法により、従来では切除不能と思われた高度脈管浸潤や下大静脈腫瘍塞栓を有する肝癌例や巨大血管腫例も切除可能となった。しかし、本法では肝血行遮断による肝の阻血障害が生じるため、血行遮断中の肝保護が重要な問題となってきた。一般には冷却保護法が用いられているが、Fortner(3)、阿部(11)は、低体温から出血傾向をきたす可能性があることを報告している。また、肝移植において見られる様なprimary nonfunction(12)や再灌流障害(13)の問題も残されている。これらの冷却保護法の欠点を考え、我々はより常温に近い方法で肝を保護できないか検討した。しかし、常温に近い温度で肝を保護するには、代謝をある程度維持させる必要があり、代謝に必要な様々な物質を加えた灌流液と灌流装置を作成する必要があった。

灌流液の添加物についてはエネルギー源としてグルコースを加え、これに対応したインスリンを加えた。グルコースは浸透圧の維持にも使用された。アミノ酸は基質として加えたが、その至適濃度は不明であった。緩衝剤として4-(2-Hydroxyethyl)-1-

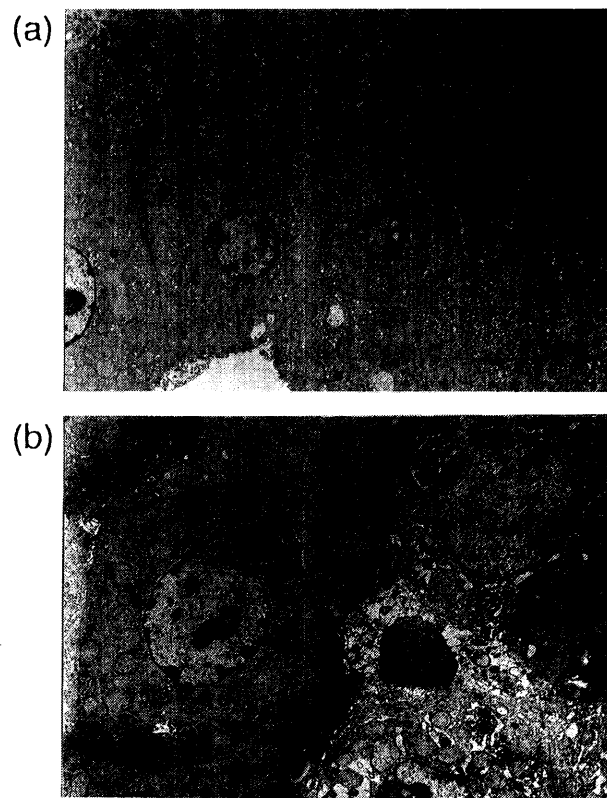


Fig. 9 Transmission electron microscopic aspect in group I, (a) for 2 hours after perfusion ($\times 2000$), (b) for 30 minutes after reperfusion ($\times 3000$).

piperazineethane-sulfonic acid (HEPES) を用いることにより、安定したpH値が得られた。allopurinol(14)とPEG-SOD(15)は高濃度の酸素を投与する場合の再灌流時の活性酸素に拮抗し、その組織障害(16)に有効であることは多くの研究結果から証明されている。Adenosine, Dexamethazone, HESについてはUW液の組成(17-19)の成績を参考にした。

本法にとって酸素の存在は不可欠であり、酸素運搬体としてはPFC(FC-43)乳剤を用いた。PFC乳剤の臓器保存における有用性はすでに多くの研究結果から証明されているが、それらはほとんどが低温灌流保存で行われたものであった(20,21)。しかし、酸素消費量の少ない低温灌流保存にPFC乳剤を用いることはその特性である優れた酸素運搬能からすると極めて不合理であり、本法の様に室温下での灌流、さらには常温下での灌流保存に使用されてこそ、その特長が生かされるものと考えられる。

PFC乳剤の濃度についてみると、他施設の研究では10~20%で行われている場合が多い(22)が、目黒(9)は腎の保存実験で3%のFC-43を使用して良好な成績を得ており、保存臓器の違いはあるが3%でも十分な酸素運搬が可能と思われる。次に、酸素化法は、膜型人工肺を用いたが、bubbling法に比べ、灌流経過や組織学的維持が良好であり、 PO_2 の維持も容易であることより、本法を用いた。灌流モードについては非拍動流を用いたが、Belzerらは拍動流が良いとしている。非拍動の方が低温持続灌流に際して血管の障害が少ない(23)との報告もあり、未だ一定の見解はない。

今回、我々が開発した灌流法(24)によるブタの肝切除の実験結果をみると、体温の変化や24時間後のGOT値から、本法は他の冷却群に比べ、生体にとって侵襲が少なく、肝に対しても傷害の少ない保護法であると考えられた。組織所見において、本法が他の2群と比べ類洞の拡張が強かったことは、持続灌流による物理的作用と考えられた。実際に灌流量を毎分100~150ml確保するためには灌流圧が最高50mmHgに達することもあった。この値は正常な門脈圧と比べてかなり高く、類洞内皮に物理的障害を与えた可能性も考えられた。しかし、灌流圧を下げると流量も減少するため、十分な組織灌流すなわち酸素運搬ができないことになる。今回の実験では、組織酸素消費量を測定しなかったが、今後、酸素消費量をみながら灌流量を設定することが重要と考えられた(25)。また、I群で検討した電顕像から、細胞小器官の保存は良好であり、本法による2時間の肝灌流は肝細胞に大きな傷害を与える可能性は少ないと考えられた。以上の結果より、本灌流法は肝血行を遮断しながら *in situ* あるいは *ex situ* で肝切除を行う際の肝保護法として充分臨床応用可能な灌流法と考えられた。

現在、肝移植においてはUW液により12時間の肝保存は充分可能な時代になっている。したがって、今回我々が行った2時間の室温下灌流法の成績は従来の研究とは比べようもないことは歴然としている。しかし、先に述べた様に冷却保存は再灌流障害や primary nonfunction 等の問題が残されており、より理想的な保存法の開発は必要と思われる。今回の成績ではPFC乳剤が室温下臓器保存において有用な物質であることを示唆しているが、残念ながら、PFCの製造は現在中止されている(25)。しかし、酸素運搬体としてNRC(26)等の新しい人工血液が製造されており、これらを利用した臓器灌流保存法が開発されるならば、臓器移植にとって新しい展望が開かれると思われる。

参考文献

- Makuuchi M, Hasegawa H, Yamazaki S. Ultrasonically guided subsegmentectomy. *Surg Gynecol Obstet* 1985; 161: 346-350.
- 高崎健, 小林誠一郎, 田中精一, 武藤晴臣, 済陽高補, 斉藤明子, 上田哲哉, 島田幸男, 田中民称, 本田弘. グリソン鞘処理による新しい系統的肝切除術. *手術* 1986; 40: 7-14.
- Fortner JG, Shiu MH, Kinne DW, Kim DK, Castro EB, Watson RC, Howland WS, Beattie, Jr EJ. Major hepatic resection using vascular isolation and hypothermic perfusion. *Ann Surg* 1974; 180: 644-652.
- 奥田康司, 安藤和二郎, 牟田幹久, 谷脇智, 馬場裕二, 安永弘, 名嘉真透, 浦口憲一郎, 押領司篤茂, 才津秀樹, 小須賀健一, 中山和道, 大石喜六. 体外循環下肝持続灌流冷却により切除した下大静脈腫瘍栓合併肝細胞癌の1例. *日消外会誌* 1991; 24: 885-889.
- 山岡義生, 熊田馨, 小沢和恵. 体内冷却肝灌流法を用いた肝切除術. *消外* 1988; 11: 2028.
- 竜崇正, 渡辺一男, 高山亘, 藤田昌宏, 本田一郎, 渡辺敏, 吉田雅博. 下大静脈腫瘍栓合併肝細胞癌に対するBio-pumpを用いた肝右葉切除. *手術* 1994; 48: 223-227.
- Wahlberg JA, Love RA, Landegaard L, Southard JH, Belzer FO. 72-hour preservation of the canine pancreas. *Transplantation* 1987; 43: 5-12.
- 光野孝雄, 大柳治正. 人工血液, 血液ガス運搬体としてのPFC乳剤. *医学の歩み* 1978; 105: 533-561.
- 目黒順一. 室温下灌流法による腎の保存, 及びConditioningと機能判定に関する実験的研究. *日外会誌* 1994; 95: 400-410.
- 弘中敏雄. フルオロカーボン乳剤を利用した肝保存に関する実験的研究. *日外会誌* 1973; 74: 397-411.
- 阿部幹. 体内肝灌流法の実験的研究. *福島医誌* 1989; 39: 535-549.
- Ohkohchi N, Sakurada M, Endoh T, Koyamada N, Katoh H, Koizumi T, Orii T, Satomi S, Taguchi Y, Mori S. Role of free radicals and energy synthesis on primary graft nonfunction in liver transplantation. *Transplant Proc* 1991; 23: 2416-2419.
- Goto M, Kawano S, Yoshihara H, Takei Y, Hijioka T, Fukui H, Matsunaga T, Oshita M, Kashiwagi T, Fusamoto H, Kamada T, Sato N. HEpatic tissue oxygenation as a predictive indicator for ischemia-reperfusion/liver injury. *Hepatology* 1992-a; 15: 432-437.
- Nordström G, Seeman T, Hasselgren P-O. Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery* 1985; 97: 679-683.
- Bennett JF, Bry WI, Collins GM, Halasz NA. The effects of oxygen free radicals on the preserved kidney. *Cryobiology* 1987; 24: 264-269.
- McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Eng J Med* 1985; 312: 159-163.
- Ploeg RJ, Goossens D, McAnulty JF, Southard H, Belzer FO. Successful 72-hour cold storage of dog kidneys with UW solution. *Transplant* 1988; 46: 191-196.
- McAnulty JF, Vreugdenhil PK, Southard JH, Belzer FO. Use of UW cold storage solution for machine perfusion of kidneys. *Transplantation Proc* 1990; 22: 458-459.
- Yu W, Coddington D, Bitter-Suermann H. Rat liver preservation. *Transplantation* 1990; 49: 1060-1066.
- Kamada N, Calne RY, Wight DGD, Lines JG. Orthotopic rat liver Transplantation after long-term preservation by continuous perfusion with fluorocarbon emulsion. *Transplantation* 1980; 30: 43-48.
- 荻野和功, 大柳治正, 宇佐見真, 斉藤洋一. Perfluorochemical乳剤を用いた24時間ラット肝低温持続灌流保存. *日外会誌* 1988; 89: 1662-1671.
- 玉置透, 鎌田直司. 低温持続灌流法によるラット肝の長期保存に関する研究. *移植* 1987; 22: 185-193.
- 小崎正巳. 臓器保存の現況. *臨床科学* 1985; 21: 1494-1500.
- Kawamura A, Meguro J, Takahashi M, Ikeda A, Hirai H, Kukita K, Yonekawa M, Witmanowski H, Yokota N, Hayashi T, Ito K. Artificial conditioner for stored organs. *Int J Artif Organs* 1994; 17: 53-60.
- 薄場彰. 人工血液としてのperfluorochemical (PFC) 乳剤の評価. *人工血液* 1994; 2: 9-14.
- 薄場彰, 元木良一, 緒方嘉貴, 鈴木一比好. NRCの課題—臨床治験を前にして—. *人工臓器* 1995; 24: 201-205.

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, μ m, L, mL, μ L, mol, g, mg, μ 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) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
- 10) 既発表の図表、その他を引用、転載する場合には、あらかじめ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, 池淵研二 (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 (4) 1995年12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

再生紙を使用