

目次

人工血液

第4巻 第1号 1996年3月

総説 造血幹細胞の <i>in vitro</i> 増幅	中畑龍俊	1
展望 血小板保存と血小板代替物	池淵研二	6
原著 ポリエチレングリコール型脂質および糖脂質によるヘモグロビン小胞体 (HbV)の表面修飾効果	朴 晟翼	9
第24回国際輸血学会 血液代替物関連演題紹介		15

Contents

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 4 No. 1 March, 1996

Review:

<i>In Vitro</i> Expansion of Hematopoietic Stem Cells	Tatsutoshi Nakahata	1
--	---------------------	---

News and View:

Platelet Storage and Platelet Substitute	Kenji Ikebuchi	6
--	----------------	---

Original Article:

Effect of Surface-modification of Hemoglobin-vesicles(HbV) with Polyethyleneglycol-lipid or Glycolipid	Sung Ick Park	9
ISBT'96 Abstracts of Blood Substitutes		15

会告

第3回日本血液代替物学会年次大会

会長 元木良一

会期：1996年6月18日(火), 19日(水)
9:30～

会場：福島ビューホテル
〒960福島市太田町13-73(新幹線福島駅西口前)
Phone 0245-31-1111

[プログラム]

招待講演

Kim D Vandegriff(米国カルフォルニア大学サンディエゴ校)
Carton(ベルギー-Gathuisberg University Hospital)
Takashi Yonetani(米国ペンシルバニア大学)

教育講演

土田英俊(早稲田大学)
横山和正(ミドリ十字株式会社)
高折益彦(川崎医科大学)

シンポジウム

司会 清水 勝(東京女子医科大学)
「NRC開発の現況」

一般演題

公募

応募用紙 人工血液1995年第3巻第4号に綴じ込み済み(又は下記にご請求下さい)

演題締切 1996年3月31日(日)消印有効

演題送付先・連絡先：

〒960-12 福島市光が丘1番地
福島県立医科大学第一外科
元木良一(担当 薄場 彰)
Phone 0245-48-2111 ext.2331
FAX 0245-48-2735

造血幹細胞の*in vitro* 増幅

In vitro Expansion of Hematopoietic Stem Cells

中畑龍俊

Tatsutoshi Nakahata

1. はじめに

造血幹細胞は増殖、分化し全ての血液細胞を産生し、かつ自らと同じ特性を持つ細胞を生み出す自己複製能を有する細胞とされている。近年、造血幹細胞移植として骨髓移植が盛んに実施されるようになり、造血系悪性疾患および再生不良性貧血などの難治性疾患に対する治療法として確立した。また造血幹細胞のサンプルとして末梢血幹細胞、臍帯血造血幹細胞も利用され、応用として純化した造血幹細胞/前駆細胞、Tリンパ球除去骨髓細胞などを用いた移植治療も開発されつつある。一方で、移植ドナーの負担を軽減する目的や、移植後の造血回復を促進することを目指し、種々の造血系サイトカインを用いた液体培養で造血幹細胞および前駆細胞を*in vitro*で増幅し、この細胞を用いた細胞移植治療を行おうとする研究も展開されている。

造血幹細胞の*in vitro*増幅は、臨床展開での重要性もさることながら、造血幹細胞の生物学的特性研究という基礎的分野でも極めて重要であり、ますます盛んに研究が進んで行くであろう。

2. 造血幹細胞の増殖

骨髓、末梢血、臍帯血など造血細胞をメチルセルロース、軟寒天などの半流動培地中で培養すると種々の造血細胞で構成されたコロニーが形成される。このコロニーの構成細胞を分析すると、コロニーの元になった細胞の増殖能や分化能が解析できる。現在では造血幹細胞やそれよりやや分化した造血前駆細胞がこの方法で測定でき、またコロニー前駆細胞の増殖、分化を支持する造血因子、サイトカインの機能を判定することが可能である。

ヒト白血病細胞株KG-1細胞の細胞表面抗原に対する抗体、抗CD34抗体が開発され、造血幹細胞や前駆細胞に対する知識が集積してきた。CD34陽性細胞はヒト骨髓、末梢血、臍帯血単核球のそれぞれ1-2%、0.01%、1%を占めている。抗体を用いてCD34陽性細胞を純化すると、コロニー前駆細胞はCD34陽性細胞分画に属し、またCD34陽性細胞を移植することにより造血系が再構築することから、ヒト造血幹細胞もCD34陽性細胞に存在すると考えられている。

CD34陽性細胞を他の細胞表面マーカーCD38陽性、陰性で区別することが可能になり、両者の比較をすると、CD34陽性CD38陰性細胞はより未分化と考えられる混合コロニー、芽球コロニー形成能が高く、2週間の培養で1個の細胞から数千個の造血前駆細胞が生み出され、かつその産生は10週以上にわたって継続されることが示された。

3. 造血幹細胞の自己複製

造血幹細胞と前駆細胞の決定的な相違は、幹細胞が自己複製能を有していることである。前駆細胞は増殖とともに徐々に分化過程を進み、成熟血球を生み出すとその寿命以上には存続できない。一方幹細胞は2分裂の度毎に片方は自己と同じ性質を有する幹細胞であるため、必ず自己のポピュレーションを一定に維持できる。造血幹細胞の自己複製の分子レベルでの調節機構はまだ解明されていないが、従来の細胞生物学的手法を用いた研究では、造血幹細胞が分裂する際、自己複製するか分化して前駆細胞になるかは確率のみに規程されるランダムな現象とするモデル(stochastic)が提唱されている。このモデルではこの確率は外因性因子に影響を受けず、この確率はマウス芽球コロニー構成細胞の再培養系を用いた実験で $p(\text{probability})=0.589$ と計算されている¹²⁾。1個の幹細胞は1回の分裂で $0.589/0.5=1.178$ 個の幹細胞を生み出す計算になる。この確率をずっと維持できる系が開発できれば*in vitro*でヒト造血幹細胞は増幅できることになる。例えばヒトCD34陽性CD38陰性細胞は2週間の培養期間で約2万個の細胞に分裂できるので、増幅は可能かもしれない。

4. 造血幹細胞の増殖に関与する可能性のあるサイトカイン

これまでの造血コロニーを用いた研究から、アッセイできる最も未分化な芽球コロニー形成に関与することが明らかになったサイトカインは、そのレセプターの構造からIL-3レセプターファミリー(IL-3, GM-CSF)、チロシンキナーゼレセプターファミリー(SCF, flk2リガンド)、gp130レセプターファミリー(IL-6, IL-11, LIF, G-CSF, IL-12)に大別され、かつ単独ではなくこれら3種類のサイトカインの組み合わせが幹細胞の増殖に必要であることが明らかになってきている。ただ3種類のサイトカインの相乗作用の詳細なメカニズムは殆どわかっていない。

従来造血幹細胞の増殖には、サイトカインとは別にまだ同定できない造血ストロマ細胞の支持機能という側面がある。ストロマ細胞機能として一部知られていることは、ストロマ特有のサイトカイン産生、サイトカインの貯蔵、特有の接着機能などが挙げられる。分子レベルの解析が進められることが期待される。

5. 造血幹細胞の*in vitro*増幅の臨床的意義

造血幹細胞の*in vitro*増幅が可能になれば、移植医療に限らず、様々な臨床応用が考えられる。その代表的なものを掲げる(表1)。

すでに移植細胞の一部をサイトカイン存在下液体培養を施行し、残りの細胞と合わせて移植する臨床治験が実施されている。通常の移植に比べ、造血回復が促進される、患者の入院期間が短縮される、などの効果が期待される。

東京大学医学研究所 癌病態研究部, 〒108 東京都港区白金台4-6-1.
Department of Clinical Oncology, The Institute of Medical Science, Tokyo University, 4-6-1 Shirokanedai, Tokyo 108, Japan.

6. 造血幹細胞の*in vitro*増幅の実験例

1) ヒトSCFによる造血幹細胞の増幅

SCFが登場して以来、このサイトカインとIL-3、IL-6、IL-11を組み合わせることにより、未分化な造血前駆細胞が著明に増幅できることが明らかになった。ヒトではSCFとIL-3、G-CSFを組み合わせCD34陽性lin陰性細胞を出発材料として用いると、数十倍増幅することが報告された。骨髓CD34陽性HLA-DR陰性CD15陰性細胞を用い、SCF、IL-3/GM-CSF fusion protein (PIXY)存在下に培養するとCFU-GMが50-500倍、HPP-CFCが2-8倍に増幅させら

れることが報告された。また骨髓CD34陽性HLA-DR陰性CD15陰性Rhodamine123弱陽性細胞をSCF、PIXY存在下に培養すると、3週間でCD34陽性細胞が約60倍に増幅したとの報告もある^{3,5)}。

臍帯血のCD34陽性細胞を2つのサイトカインの組み合わせで増幅させた実験成績では、IL-3とSCFを基本とした組み合わせが最も有効であり、この組み合わせにIL-6、IL-11を添加することで、CFU-GM、CFU-Mixが約50倍に増幅できた。ただ培養系をさらに延長しても増幅率を高めることはできず、かえって減少するため、造血幹細胞にとって最適の条件にはまだなっていない可能性

表1 造血幹細胞の*in vitro*増幅の臨床応用の可能性

同種骨髓移植への応用	
採取量の減少	→ ドナーの危険性の軽減
	→ ドナーの全身麻酔の回避
	→ ドナーの入院期間の短縮
	→ 外来での骨髓採取
	→ 医療経済的效果
造血幹細胞の純化、増幅	→ GVHDの回避、軽減
	→ 各種リンパ球併用によるGVL効果
	→ 治療成績の向上
増幅造血前駆細胞の併用	→ 血球の移植後早期回復
	→ 感染症の回避
	→ 輸血量の減少
	→ 無菌室在室期間の短縮、一般個室での移植
	→ 治療成績の向上
	→ 医療経済的效果
同種末梢血幹細胞移植への応用	
アフエレーシス回数の減少	→ ドナーの危険性の軽減
造血幹細胞の純化、増幅	→ 同種骨髓移植への応用と同様
増幅造血前駆細胞の併用	→ 同種骨髓移植への応用と同様
自己骨髓移植、自己末梢血幹細胞移植への応用	
正常造血幹細胞の純化、増幅	→ 腫瘍細胞、白血病細胞の <i>in vitro</i> パージング
	→ 悪性腫瘍、白血病の治療成績の向上
	→ 複数移植への応用
	→ 医療経済的效果
増幅造血前駆細胞	→ 同種骨髓移植への応用と同様
遺伝子治療への応用	
遺伝子導入効率の上昇	→ 遺伝子発現効率の上昇
安全性のチェック	→ ウィルス、マイコプラズマ、細菌チェック
ウィルスベクターのチェック	→ 安全性の確保
長期遺伝子発現のチェック	→ SCID/Hu, Marmoset/hu chimeraによるチェック
人工血球の大量生産	
品質管理の徹底	→ 医薬品としての血球の産生
人工赤血球の大量生産	→ 安全な輸血
人工血小板の大量生産	→ HLA適合血小板輸血

がある。

最近マウスの系で骨髄系及びBリンパ球系の両者を表現できる造血前駆細胞の評価系が開発された⁶⁾。その結果、IL-3、IL-1はBリンパ球への分化過程を抑制するとされ、ごく最近になってさらにTリンパ球系の成熟にも抑制作用を有することも示された⁷⁾。造血幹細胞の増幅は骨髄系ばかりでなくリンパ球系の機能も保持したままの形で起こることが期待されるため、サイトカインの選択には慎重な立場や、*in vivo*の系を加えた解析が必要かも知れない。

2) gp130とKITシグナルを用いた造血幹細胞の増幅

LIFは白血病抑制因子という名称を持つが、実はマウスのES細胞(embryonic stem cell)、つまり3胚葉系組織に増殖分化でき、適正な条件で*in vivo*に戻すとその細胞由来の個体を形成できる能力を持つ全能性細胞の未分化性を維持するために、必須の因子とも考えられている^{8,9)}。そのため造血幹細胞の自己複製にも関与することが期待されたが、明瞭な実験系では証明されていない。

LIFはIL-6、IL-11、CNTF、OSMなどと共通の受容体であるgp130をシグナル伝達に利用していることが知られた。他の細胞系ではgp130はIL-6と結合した可溶性IL-6受容体(sIL-6R)と邂逅でき、有効なシグナルを伝達できることが知られている。このこと

はgp130を発現するが、IL-6受容体を発現していない細胞でもIL-6とsIL-6Rの組み合わせでgp130のシグナルが伝達されることを意味する¹⁰⁾。フローサイトメトリーを用いた実験で、IL-6受容体に関しては陽性、陰性の2群があることが明らかになったため、CD34陽性細胞の増幅系にSCF、IL-6に加えてsIL-6Rの添加を試みた。GMコロニー、赤芽球バーストに加え多数の混合コロニー、未分化な芽球コロニーが形成した(表2)。またソーティング実験から、CD34陽性細胞のうちIL-6R陽性、陰性細胞を分離しこれらのサイトカインの組み合わせに対する反応を比較したところ、陰性細胞の方が未分化な造血コロニーを多数産生することが明らかになった。

SCF、IL-6、sIL-6Rの組み合わせは予想通り、CD34陽性細胞を出発材料とした*in vitro*増幅系を動かし、従来の報告よりはるかに大規模な混合コロニー前駆細胞、CD34陽性細胞の増幅を支持する(図2)。

7. おわりに

ヒト造血幹細胞の*in vitro*増幅は極めて魅力的なテーマである。造血前駆細胞レベルの細胞は種々のサイトカインや可溶性受容体を組み合わせることにより著明に増幅できることが明らかになっ

表2 ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞のコロニー形成

Factor(s)	Colonies, no. per 500 cells					
	GM	Blast	Meg	B	Mix	Total
Serum-containing culture						
IL-6	6 ± 0.9	0	0	0	0	6 ± 0.6
sIL-6R	3 ± 0.5	0	0	0	0	3 ± 0.7
IL-6 + sIL-6R	13 ± 0.7	1 ± 0.7	0	0	0	14 ± 1.9
SCF	13 ± 2.5	1 ± 0.7	1 ± 0.7	0	0	15 ± 2.1
+ IL-6	54 ± 4.3	10 ± 3.1	1 ± 0.6	0	0	65 ± 7.4
+ IL-6 + sIL-6R	62 ± 3.7	45 ± 7.2	13 ± 2.6	28 ± 5.8	122 ± 22.8	270 ± 17
IL-3	23 ± 1.8	1 ± 0.7	0	0	0	24 ± 1.7
+ IL-6 + sIL-6R	29 ± 2.1	12 ± 5.0	1 ± 0.7	30 ± 4.9	21 ± 7.1	93 ± 7.1
GM-CSF	51 ± 4.0	1 ± 1.0	0	0	0	52 ± 10
+ IL-6 + sIL-6R	89 ± 6.8	8 ± 3.1	0	0	0	97 ± 11
G-CSF	49 ± 3.7	1 ± 1.4	0	0	0	50 ± 6.6
+ IL-6 + sIL-6R	61 ± 4.0	6 ± 3.4	0	0	0	67 ± 7.8
Serum-free culture						
IL-6	0	0	0	0	0	0
+ sIL-6R	0	0	0	0	0	0
sIL-6R	0	0	0	0	0	0
SCF	1 ± 1.7	0	0	0	0	1 ± 1.7
+ IL-6	4 ± 0.7	0	0	0	0	4 ± 2.1
+ IL-6 + sIL-6R	5 ± 1.8	7 ± 3.3	5 ± 2.1	8 ± 3.5	45 ± 4.3	70 ± 5.4
IL-3	5 ± 0.7	0	0	0	0	5 ± 0.7
+ IL-6 + sIL-6R	6 ± 1.9	0	0	0	0	6 ± 1.9
GM-CSF	1 ± 0.5	0	0	0	0	1 ± 0.5
+ IL-6 + sIL-6R	3 ± 1.0	0	0	0	0	3 ± 1.0
G-CSF	3 ± 0.8	0	0	0	0	3 ± 0.8
+ IL-6 + sIL-6R	3 ± 1.4	0	0	0	0	3 ± 1.4

細胞を各種サイトカインの単独および組み合わせでメチルセルロース培養を行い、コロニーは培養14日目に算定した。結果は3ディッシュの平均±SDで表す。

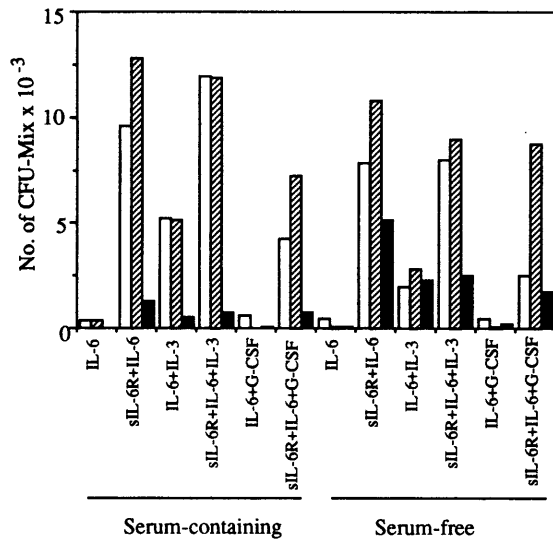


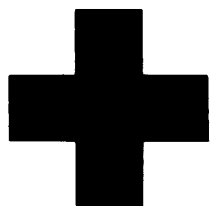
図1 CFU-Mix コロニー前駆細胞の増幅

CD34陽性細胞2000個(総コロニー数786個, CFU-Mixコロニー前駆細胞188個を含む)を各種サイトカイン存在下(SCFは全ての系に添加)に血清含有および無血清培養を行い, CFU-Mixコロニー前駆細胞の増幅を観察した。□: 培養7日 ▨: 培養14日 ■: 培養21日

た。この系が真の造血幹細胞の増幅になっているかどうかは, *in vivo*の系を開発し検証しておく必要があると考えられる。

参考文献

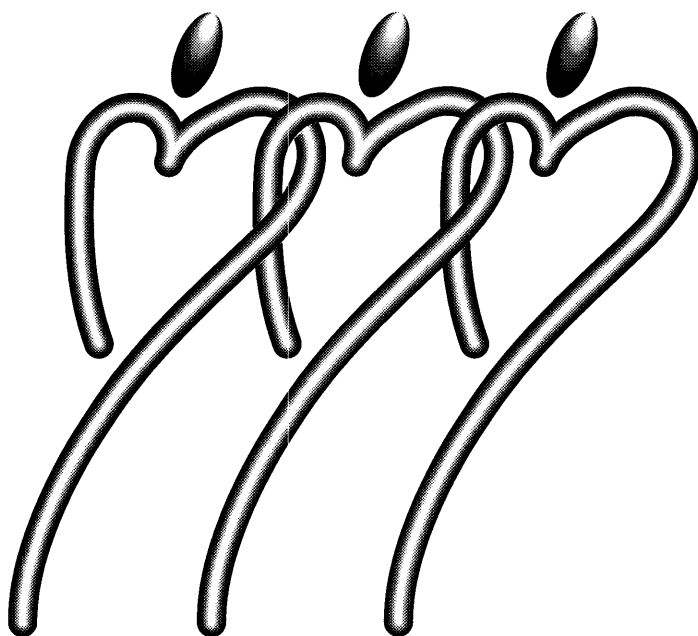
- 1) Nakahata T, Gross AJ, Ogawa M: A stochastic model of self-renewal and commitment to differentiation of the primitive hemopoietic stem cells in culture. *J Cell Physiol* 1982;113: 455-58.
- 2) 中畑龍俊:造血幹細胞の自己複製とその応用. 医学のあゆみ 1991;156:572-6.
- 3) Brugger W, Möcklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L: Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-3, interferon- γ and erythropoietin. *Blood* 1993;81:2579-84.
- 4) Koller MR, et al.: Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures. *Blood* 1993;82:378-84.
- 5) Haylock DN, To LB, Dowse TL, Juttner CA, Simmons PJ: Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage. *Blood* 1992;80:1405-12.
- 6) Hirayama F, Shih JP, Awgulewitsch A, Warr GW, Clark SC, Ogawa M: Clonal proliferation of murine lymphohemopoietic progenitors in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5907-11.
- 7) Hirayama F, Ogawa M: Negative regulation of early T-lymphopoiesis by interleukin-3 and interleukin-1 α . *Blood* 1995;86:4527-31.
- 8) Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles MV: Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biology* 1993;13:473-86.
- 9) Nakano T, Kodama H, Honjo T: Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 1994;265:1098-101.
- 10) Sui X, Nakahata T, et al.: gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92:2859-63.



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 〒105 東京都港区芝大門1-1-3 文庫請求先 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 03-3439-6607

血小板保存と血小板代替物

Platelet Storage and Platelet Substitute

池淵研二

Kenji Ikebuchi

1. はじめに

顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)が臨床応用されるようになり、高度の化学療法を施行しても顆粒球の造血回復がすみやかに誘導されるようになった。また、骨髄移植後の造血回復もG-CSF投与により顆粒球系に関しては5-7日間は早く回復できるようになっている。また化学療法後にG-CSFを投与すると末梢血中に造血幹細胞、前駆細胞が大量に動員され、それらを成分採血装置を用いて採取すると、骨髄のかわりに末梢血幹細胞が移植材料として応用できることも明らかになってきた。最近では、正常ドナーにG-CSFを投与すると5-6日目にピークをもった幹細胞の動員がはかられ、同種末梢血幹細胞移植も現実味を持って語られ始めている。

化学療法や細胞移植療法が高度化するにつれ、臨床側としてはますます先端の医療を目指すであろうが、その医療を支える輸血療法もますます大切なものになってくると考えられる。予想外の造血荒廃を呈する例や、骨髄移植後の再発例に対する対応も必然的に重くのしかかってくる。血小板輸血は現在その全てを正常ドナーからの献血に依存しており協力体制の整備により、ほぼシングルドナー由来のアフェレーシス血小板製剤が供給されるようになった。ドナーの数を減らせることで、これまでになく同種免疫を惹起する率は下がり、また侵入する白血球をフィルターを用いて除去する技術も進歩し、製剤としての安全性は高められつつある。

2. 血小板保存法、血小板代替物が開発されなければならない理由

献血にはドナーの協力が必要である。献血に対するドナーの協力意欲はすばらしく、特別の事故や自然災害が生じない限り、現在血小板製剤の需要と供給はほぼ平衡関係に達している。ただ頻回輸血者のうち一部は輸血不応状態となり、抗HLA抗体陽性になった場合には、HLA適合のドナーから献血をお願いし、成分献血をさせていただき供給している。HLAタイプによってはドナープールの大きさに差があり、一人のドナーから何回か、仕事の勤務時間であるにもかかわらずセンターにきていただくような御無理をお願いすることもある。血小板が有効に保存できればあらかじめドナーのスケジュールに合わせて採血しておくことが可能となる。

血小板製剤の有効期間は現在採血してから72時間以内とされている。このわずかな時間の間に、検査に適合し血液型の合った製

剤を需要に合わせて供給することはセンターとしても最も大変な作業である。有効に保存できる期間があと数日延ばすことができるだけでこの作業の負担はかなり軽くなる。ちなみに米国では5日間を有効期間としている。

血小板製剤は液状であるため、どうしてもドナーの血漿が輸血される。現在まだ血漿中のどの成分かつきとめられていないが、血小板輸血後にも一定の頻度で蕁麻疹やアナフィラキシーのような副作用が生じる。血小板製剤に含まれる白血球は保存期間中に種々の炎症性サイトカインを産生し輸血後発熱反応の成因となるため、白血球除去フィルターや、白血球混入率の低い成分採血装置の開発も進められているが、血漿成分によって生じる副作用については解決方法がまだ講じられていない²⁾。血小板を洗浄し有効保存できる液の開発が進められれば、この部分の障害が減少させられる。

ごく最近造血サイトカインとしてトロンボポエチンが開発された^{3,4)}。巨核球の成熟分化に作用点を有するサイトカインで、動物実験の成績では定常状態に投与すると血小板数を3-5倍増加させることができる。例えば血液系悪性腫瘍や固形腫瘍の患者が、その治療の間の安定した時期にトロンボポエチンを用いて血小板を増やし、自己の血小板を採取する。この血小板を数週間有効に保存できれば患者は化学療法や骨髄移植時に輸血される血小板の一部を自分の血小板でまかなえることも期待できる。同種の血小板輸血に伴う種々の副作用が回避できるようになるであろう。

また止血作用のある血小板代替物が開発されることになれば、これまで述べた全ての適応に対して利用できる。さらに緊急時に即輸注できることになる。ただし血小板はいかに小さな血球であってもその機能は多彩であり、露出した血管内皮下組織への粘着から、放出反応を伴う血小板同士の凝集、活性化された血小板表面での凝固因子の活性化など知られている。また血小板には血小板由来成長因子(PDGF)や血小板活性因子(PAF)など含まれ、その放出により止血、血栓以外の他の細胞系への影響も重要である。血小板代替物がこれら全ての機能を有する形で開発されることは当面難しく、とりあえずは粘着能を有したモデル粒子の開発が主に行われている。

血小板保存法の現状-液状保存

原則としてガス透過性の高い保存バッグの中で血漿中に血小板を浮かせ、22℃で水平振盪する保存法が一般的である。これまでの検討では保存5日目まで血小板数、pH、形態、浸透圧抵抗、凝集能は80%以上は維持され、保存中に血小板が活性化を受けた時の指標であるP-セレクトリンの増加は軽微であり3日間保存した製

北海道赤十字血液センター、〒063 札幌市西区山の手2-2、Hokkaido Red Cross Blood Center, Yamanote 2-2, Nishi-ku, Sapporo 063, Japan.

剤まで使用できるとされる。

好氣的解糖に有利な酢酸をエネルギー源として加え、血漿以外の膠質浸透圧維持体を用いたSeto液など保存液の開発もあるが血漿保存以上に有利な保存液として特筆するものはない⁹⁾。

我々の施設では血漿に浮かした血小板製剤を収容したバッグを1500mLの培養液を容れた外バッグで包む2重バッグシステムを開発し、内バッグ中の環境を改善させる系を検討したところ、約21日まで血小板機能を保持しつつ保存できることが明らかにできた⁶⁾。装置の大型な点、培地の価格面以外に22°C長期保存中の細菌感染（もし出発材料にごくわずかでも細菌を含んでいた場合気になる）など臨床応用するに際し乗り越えなければならない課題も残っている。ただ興味深いことは、生体内ではほぼ8-10日間と考えられている血小板寿命が、生体外の2重バッグの中で21日間維持できることである。生体では血小板は血管内皮や白血球、赤血球と触れ合い、脾臓にトラップされるなどを契機に寿命が短い方に向かわされているのであろうか？

血小板の低温保存は従来大変難しいものと考えられてきた。それは血小板は無刺激状態ではディスク状だが活性化を受けると偽足を豊富に出しその形態を変える能力が高い。その基準にはマイクロチューブル、マイクロフィラメントなど細胞骨格の支えがあるが、特にマイクロフィラメント、アクチンは低温変化に弱く不可逆的な構造変化をきたす。サイトカラシン類にはアクチンの構造変化を抑制する作用が報告されているので、低温保存に用いられる可能性のある薬剤である。また低温は血小板の細胞内カルシウムイオンの移動を抑制し、フリーのカルシウムイオン濃度が上昇し、やはり細胞骨格の不可逆的な変化を誘導する。サイトカラシンBと細胞内カルシウムキレート剤(Quin-2, Fura-2)の組み合わせで低温保存した血小板の形態がディスク状に保持されると報告されたがまだその他の機能保持には疑問が持たれ実用化には至っていない⁷⁾。

血小板保存法の現状-凍結保存

DMSOを凍結保護剤として用いプログラムフリーザーにて凍結保存する系が長年用いられている。解凍後の血小板数の回収率は良好であるが *in vitro* で測定される各種アゴニストに対する凝集能の低下は著しい。にもかかわらず自家の系でその血小板を輸注すると出血時間の短縮、出血傾向の改善が期待でき一部の施設では実施されている。我々もこの凍結保存を試みたが血小板膜のGPIb、すなわちトロンビンやvon Willebrand因子(vWF)への結合部位が凍結解凍操作で喪失する減少を観察した⁸⁾。血小板製剤中に含まれる白血球由来のタンパク分解酵素により膜表面からはがされるのかを調べるためその阻害剤を添加したが、GPIbの喪失は防止できず凍結解凍の物理的刺激がその成因と考えられる。

さらに急速に凍結し氷晶を形成させないガラス化技術を応用する例もあるが、ガラス化後の解凍過程で氷晶核が形成されどうしても細胞が痛むことは避けられないとされる。解凍過程の温度変化を調節する装置の開発が期待される。

血小板代替物開発-Thromboerythrocyte, Plateletsome

血小板膜の糖タンパク質は粘着、凝集過程に重要な機能を有している。現在その性質のよく判っているものだけで10種類以上あ

るが、種々の血漿因子や、血小板活性化刺激物質の受容体タンパクとして働くもの、血小板-細胞間、血小板-血管内皮下組織間の接着に関与するもの、などに大別される。臨床疾患との因果関係が明らかにされているものには、血小板無力症と、GPIIb/IIIaの欠損、Bernard-Soulier症候群とGPIb/IX欠損などがある。前者は血小板にフィブリノーゲンやvWFが結合できず、後者は血小板の血管内皮下組織への粘着が障害される。

これら機能糖タンパクを何らかの担体の表面に発現させるといのが現在の血小板代替物開発の手法の一つである。フィブリノーゲンをホルムアルデヒドで赤血球表面に固相化する系が開発された⁹⁾。この代替物は正常血小板と混合すると、血小板凝集に巻き込まれ、また血小板減少ラットに輸注するとラットの出血時間が短縮することが確かめられた。最近フィブリノーゲンのGPIIb/IIIa結合部位のアミノ酸配列であるRGD配列を含んだ合成ペプチドac-CGGRGDF-NH₂を赤血球膜上に固相化したThromboerythrocyteが開発された¹⁰⁾。わずかな血小板とThromboerythrocyteをインキュベートすると、ADP凝集は惹起され、RGDに対する抗体でこの凝集が阻害されることからこの系の特異性が実証された。またコラーゲン層に正常血小板を粘着させ、そのうえにThromboerythrocyteを浮遊させると、さらにThromboerythrocyteがコラーゲン上の粘着に参画することも示された。報告者の主張によると自己の赤血球50mlをこのように処理すると約5単位の血小板製剤に相当する代替物が作成されると計算できる。

また担体としてリボソームを用い、その表面に血小板膜タンパクを固相化する系も検討されている。まずdeoxycholateで可溶化した血小板糖タンパクを固相化するもので、中にはGPIb、GPIIb/IIIa、GPIV等15種類以上の膜糖タンパクが含まれていた。このいわゆるPlateletsomeは放射線照射により血小板減少になったラットに輸注すると尾を切断した際の出血量を減少させると報告されている。また同様のリボソームの表面にGPIbの細胞外ドメインのうちトロンビン、vWF結合部位のみを固相化したものも開発中であり、この代替物は*in vitro* でリストセチン凝集を生じることまで認められている。

血小板保存法の現状-凍結乾燥

別の目的で開発された技術が血小板保存法の領域で応用されつつある。血漿中のvWFの検査試薬として、血小板を固定し膜表面糖タンパクGPIbを保存する技術が開発されていた。ヒトでは1.8%パラフォルムアルデヒドで固定するとGPIbがうまく温存できる⁴⁾。これを標準試薬として用いると血漿中vWFがアッセイできる。この系は固定血小板が*in vitro* でリストセチンにより凝集することを意味していた。パラフォルムアルデヒドで固定した血小板を凍結乾燥し保存し、再び血漿中で培養すると固定したはずの血小板が偽足突起を出すなど形態変化を生じ、コラーゲン膜上で粘着すると報告されている¹²⁾。臨床治験も考慮されていると聞くがその詳細はやっと報告され始めたところである。

血小板代替物の理想的な形

輸注された血小板代替物は生体内で勝手に機能してはならず、傷害血管部位にたどり着き初めてその機能を発揮しなくてははいけ

ない。流血中で勝手に血栓を造ってはいけないということである。また血小板は血栓を形成した後通常は溶解吸収されるため、代替物がずっと生体から排除できない性質を有してはいけないと考えられる。また代替物はわずかに存在する正常血小板と合同で止血に働く必要があり、正常血小板の機能を阻害するものであってはならない。また長期の保存に耐えられること、生物製剤を輸血する際副作用として問題になる、感染症の危険の回避は重要な要件である。

おわりに

血小板保存や血小板代替物に関して総説を試みた。赤血球代替物開発と同様歴史は長く、多くの試みがなされてきた領域である。赤血球は酸素運搬体としての機能に注目し、ヘモグロビンの修飾体やリボソーム内包型ヘモグロビンが開発され、臨床治験が進められている。血小板は赤血球に比べ機能が多彩であり、その機能の一部代替が効けば良いと想像するが、粘着や凝集の惹起が必要な場所で起こることと、一旦形成された血栓が順調に生体内で処理されること、などハードルが高いものである。

参考文献

1. Grigg AP, Roberts AW, Raunow H, Houghton S, Layton E, Boyd AW, Mcgrath K, Maher D: Optimizing dose and scheduling of filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) for mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells in normal volunteers. *Blood* 1995;86:4437-45.
2. Aye MT, Palmer DS, Giulivi A, Hashime S: Effect of filtration of platelet concentrates on the accumulation of cytokines and platelet release factors during storage. *Transfusion* 1995;35:117-24.
3. Kaushansky K, Lok S, Holly RD, Broudy VC, Lin M, Bailly MC, Forstrom JW, Buddle MM, Oort PJ, Hagen FS, Roth GJ, Papayannopolou T, Foster DC: Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 1994;369:568-71.
4. Fibbe WE, Heemskerk DPM, Laterveer L, Pruijt JFM, Foster D, Kaushansky K, Willemze R: Accelerated reconstitution of platelets and erythrocytes after syngeneic transplantation of bone marrow cells derived from thrombopoietin pretreated donor mice. *Blood* 1995;86:3308-13.
5. Shimizu T, Shibata K, Kora S: First autoclave-sterilized platelet-additive solution containing glucose with a physiological pH for the preparation of plasma-poor platelet concentrates. *Vox Sang* 1992; 62:87-93.
6. Yakushiji C, Takahashi TA, Ichinohe K, Maruyama T, Sekiguchi S: Long-term liquid preservation of platelet concentrates in a double-bag system. *Therapeutic Plasmapheresis(XII)*, 1993:819-24.
7. Winokur R, Hartwig JH: Mechanism of shape change in chilled human platelets. *Blood* 1995;85:1796-804.
8. 瀬川紀美子, 高橋恒夫, 半田誠, 片山政彦, 池田康夫, 諸井将明, 関口定美: 凍結保存による血小板膜糖蛋白質 Glycoprotein Ib損失の機能 日本輸血学会雑誌 1994;40:635-43.
9. Agam G, Livne A: Passive participation of fixed platelets in aggregation facilitated by covalently bound fibrinogen. *Blood* 1983;61:186-91.
10. Collier BS, Springer KT, Beer JH, Mohandas N, Scudder LE, Norton KJ, West SM: Thromboerythrocytes in vitro studies of a potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusions. *J Clin Invest* 1992;89:546-55.
12. Read MS, Reddick RL, Bode AP, Bellinger DA, Nichols TC, Taylor K, Smith SV, McMahon DK, Griggs TR, Brinkhous KM: Preservation of hemostatic and structural properties of rehydrated lyophilized platelets: Potential for long-term storage of dried platelets for transfusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:397-401.
11. Allain JP, Cooper HA, Wagner RH, Brinkhous KM: Platelets fixed with paraformaldehyde: a new reagent for assay of von Willebrand factor and platelet aggregating factor. *J Lab Clin Med* 1975;85:318-28.

ポリエチレングリコール型脂質および糖脂質によるヘモグロビン小胞体(HbV)の表面修飾効果

朴 晟翼, 宗 慶太郎, 酒井 宏水, 武岡 真司, 西出 宏之, 土田 英俊*

Effect of Surface-modification of Hemoglobin-vesicles(HbV) with Polyethyleneglycol-lipid or Glycolipid

Sung Ick Park, Keitarou Sou, Hiromi Sakai, Shinji Takeoka
Hiroyuki Nishide, and Eishun Tsuchida

高濃度に精製されたヘモグロビン(Hb)をリン脂質二分子膜にて包み込んだHb小胞体(HbV)について、赤血球代替物としての溶液物性を検討した。Hb小胞体分散液にポリエチレングリコール(PEG)脂質あるいは糖脂質の分散液を添加すると自発的にHbVの外表面に取り込まれ、表面をPEG鎖あるいはオリゴ糖鎖にて修飾できる。5%-アルブミン溶液中に分散したHbV([Hb]=10g/dL)は可逆的な凝集体を形成するが、PEG鎖やオリゴ糖鎖による修飾により凝集が抑制されることを振動型キャピラリー粘度計によるレオロジー特性から明らかにした。均一孔径の貫通孔を有するメンブランフィルターの透過性試験では、Hb小胞体は血液よりも透過速度が高く、精製Hb溶液([Hb]=10g/dL)の半分程度であった。PEG鎖あるいは糖鎖にてHb小胞体を修飾した系では、未修飾系よりも透過速度は高く、また両者の相違は認められなかった。以上から表面修飾により小胞体の分散性が向上し、赤血球よりも優れた末梢循環特性が期待できる。

Hb-vesicles(HbV) which encapsulate a purified and concentrated hemoglobin (Hb) solution with lipid bilayer membranes were studied as oxygen-carrying particles with good rheological properties. When solutions of polyethyleneglycol (PEG)-lipid or glycolipid conjugating a maltopentaose were added to the HbV suspension, the lipids were spontaneously incorporated into the outer surface of the HbV, and modified the surface with PEG chains or oligosaccharide chains. Aggregation of the unmodified HbV when suspended in an 5wt%-albumin solution at the Hb concentration of 10g/dl was suppressed by the modification with PEG. The unmodified HbV tends to aggregate in the albumin solution and increase the solution viscosity especially at low shear rates. While, the modification effectively reduces the viscosity because of the suppression of the aggregation. Permeability of HbV through membrane filters having penetrated pores with a regulated size was examined in relation with the degree of aggregation during a capillary flow. Both the unmodified and modified HbV have the higher permeability than blood and lower than stroma-free Hb solution at the same Hb concentration (10g/dL). PEG-HbV and Glyco-HbV showed higher permeability than the unmodified HbV. Thus, the solution properties of the HbV were improved by the surface modification and excellent behaviors in microcirculation would be expected.

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^{1,2)}。既に修飾Hbは臨床第3相試験が進んでいるが、血圧上昇など生理活性の高いHbの直接投与にはまだ課題も残している。他方、微小カプセル化型では、アロステリック因子や還元剤などの調節剤を内包でき³⁾、

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⁴⁾や糖脂質⁵⁾、ポリエチレングリコール(PEG)脂質^{6,7)}などを膜中に導入する方法が検討されている。我々は水相系でのリン脂質やHbの解離状態、相互作用や分子運動に関する基礎知見から分子集合挙動の制御により高濃度Hbを二分子膜で包み込んだ一定粒径のHb小胞体(HbV)の分散液を調製、系のHb濃度を10g/dLに高めることに成功している⁸⁾。これを生理食塩水に分散させて40%交換輸血試験(麻醉ラット)を行った結果は、既に本誌にて報告した⁹⁾。更に、5%アルブミン溶液に分散させて90%交換輸血試験もほぼ終了している。表面修飾していないHbVはアルブミン中で可逆的な凝集体を形成するが、末梢まで充分酸素を運搬

早稲田大学 理工学総合研究センター 高分子化学研究室 〒169 東京都新宿区大久保3 Department of Polymer Chemistry, Advanced Research Center for Science and Engineering, Waseda University, Tokyo 169, Japan.

*To whom all correspondence should be addressed.

論文受付96年3月4日、受理96年3月11日。

しており、同Hb濃度での赤血球との比較では70～80%程度の効果が認められている。一方、PEG型脂質、オリゴ糖脂質にて表面を修飾した系では小胞体の分散安定度を高める効果がよく知られている^{5,6)}。そこで、本報ではHbVにこれらの修飾剤水溶液を添加することによって、表面を修飾する方法とその効果を述べると共に、各修飾HbVの特長、特にアルブミンに分散させた系の状態、粘度、細孔透過性について検討した。

2. 実験方法

2.1. HbVの調製

HbVは既報の方法にて調製した¹⁰⁻¹²⁾。HbVの内水相には高濃度のHbCO(ca, 38g/dL)と共に、アロステリック因子としてピリドキサル 5'-リン酸(18mM, Merck社)、メトHb還元剤としてDL-ホモシステイン(5mM, Aldrich社)が溶けている。HbVの膜成分である脂質は、日本精化社製のプレソームPPG-I(1,2-ジパルミトイル-*sn*-グリセロ-3-ホスファチジルコリン(DPPC)、コレステロール(cholesterol)、1,2-ジパルミトイル-*sn*-グリセロ-3-ホスファチジルグリセリール(DPPG)=5/5/1、モル比)に0.9mol% α -トコフェロール(Merk社)を混合して用いた。

Hb溶液中に混合脂質を分散させて小胞体を形成後、エクストルージョン法にて粒径を約250nmに制御し、超遠心分離(50,000g, 40min)にてHbVを沈殿させて未内包のHbを除去、5%のアルブミン溶液(Albumin 5%-Cutter, Bayer社)にHb濃度が10g/dLになる様に分散させて試料HbVとした。

2.2. 表面修飾剤の導入

PEG脂質(1,2-ジパルミトール-*sn*-グリセロ-3-ホスファチジルエタノールアミン-N-(ポリエチレングリコール)) (PEG-DPPE)はAvanti社から購入した。PEG鎖の平均分子量は約5,000である。糖脂質(*O'*, *O'*-dihexadecyl-N-maltopentaonoyl-L-glutamate) (DHMPGlu)は既報に従って合成して用いた⁵⁾。HbVの表面修飾は、0.16mMのPEG-DPPEあるいは4.9mMのDHMPGlu水溶液を各々外表面膜に対して0.37mol%, 8mol%になる様にHbV分散液に添加し、CO雰囲気下37°Cにて30分間攪拌して行った。超遠心分離(50,000g, 40min)により未導入の修飾剤を上澄として除去後、沈殿を5%のアルブミン溶液にHb濃度が10g/dLになる様に分散させて試料とした。得られた各々の試料をPEG-HbV, Glyco-HbVと表記する。

2.3. HbV分散液と血液との相互作用試験

アルブミンに分散させたHbV, PEG-HbV, あるいはGlyco-HbVを0, 15, 30, 60, 90, 100%の体積比でヒト血液(1mg/ml EDTA添加, ヘマトクリット 55%)に混合させた。キャピラリー粘度計(OCR-D型, Parr Physica社; キャピラリー径 0.9948mm Φ)を用い、各混合液の粘度を周波数2Hz, ズリ速度0.63～358s⁻¹の条件で測定した。全測定は採血から6時間以内に終了させた。またHbVを様々な混合比でヒト血液と混合させ、光学顕微鏡を用いて250倍にて観測した。

2.4. 試料のフィルター透過性試験

均一孔径の貫通孔を有するポリカーボネート製メンブランフィルター(Nuclepore, 孔径8.0, 5.0, 3.0, 2.0 μ m, 直径25mm)をエクスト

ルーダ(Lipex Biomembrane社)に装填し、循環水により装置を37°Cに保った。各試料約7mlを導入し順次透過させ、0.3kg/cm²窒素ガス圧差における透過時間から透過速度(ml/sec)を算出した。また比較試験として、EDTA加ヒト血液および精製Hb溶液(10g/dl, リン酸緩衝生理食塩水中)の透過試験を実施した。

3. 結果及び考察

3.1. HbVの物性と表面修飾剤の後導入

調製した各HbVの物性をTable 1にまとめた。未修飾のHbV粒径は244 $\pm$ 70nmでありHb内包効率を表わすHbと脂質の重量比は1.73であった¹¹⁾。系のHb濃度は10g/dLに調整されている。P₅₀は30 Torrであり、アロステリック因子であるピリドキサル 5'-リン酸の内包により、赤血球よりもやや高く、すなわちHbの酸素親和度はやや低く調節されている。肺における酸素分圧110Torr, 混合静脈内40 Torr間でHbから放出される酸素の割合(酸素運搬効率OTE)は酸素結合解離曲線から35%であり、赤血球のそれよりも高い計算となる。

HbV分散液(2.2wt%, 833ml)にPEG-DPPE分散液(0.1wt%, 231ml)を37°Cにて添加すると30min以内に速やかに小胞体の外表面に導入され、HbV表面はPEG鎖にて修飾される⁶⁾。本条件にて仕込みのPEG-DPPEの約80%が導入され、外表面における濃度は0.3mol%, 重量換算では2.9wt%と成る。一方HbV(1.0wt%, 800ml)にDHMPGluの分散液(0.07wt%, 800ml)を添加すると、HbVの外表面はオリゴ糖鎖にて修飾される¹³⁾。37°C, 30minの条件にて仕込みのDHMPGluのはほぼ100%近くが導入され、外表面における濃度は8.0mol%, 重量換算では17.4wt%となる。

超遠心分離(50,000g, 40min)した後の上澄にはHbが含まれないことから、修飾剤の導入前後において内包Hbの漏出は全く起こっていないことを確認した。HbVにPEG-PEを導入した系では10nm程度の粒径の増大が認められ、これは後述する様にPEG修飾による粒径の増大と思われるが、測定誤差範囲内でもあるので正確な議論はできない。また、修飾剤導入の前後において酸素親和度P₅₀は大きな変化は認められなかった。

Table 1. Characteristics of HbV, PEG-HbV and Glyco-HbV.

Parameters	HbV	PEG-HbV	Glyco-HbV
Diameter (nm)	244 $\pm$ 70	251 $\pm$ 76	245 $\pm$ 73
Hb (g/dL)	10.2	10.0	10.1
Lipid (g/dL)	5.9	5.7	5.8
[Hb]/[Lipid]	1.73	1.75	1.74
Modifier ^a (mol%)	—	0.3	8.0
(wt%)	—	2.9	17.4
P ₅₀ (Torr)	34.5	35.3	35.7
OTE (%) ^b	37.2	38.6	37.0

^a the ratio of PEG-DPPE or glycolipid in outer layer

^b oxygen transporting efficiency (the difference in oxygen saturation between 40 and 100 Torr)

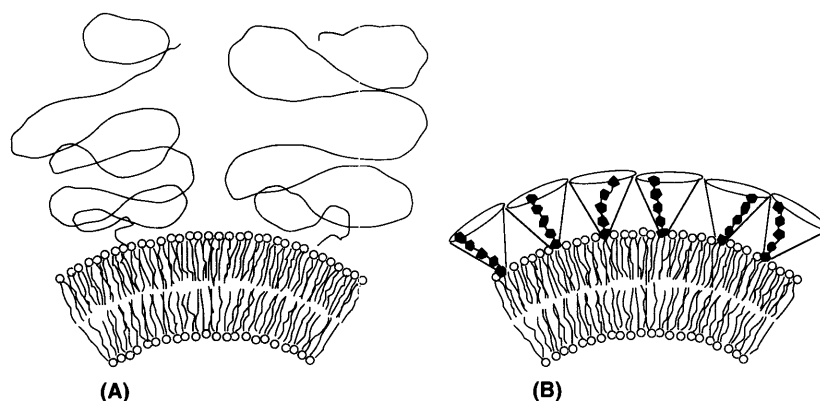


Fig. 1 Schematic representation of the bilayer membrane of a vesicle, of which outer layer was modified with (A) polyethyleneglycol (Mw. 5000) and (B) oligosaccharide (Mw. 900).

二分子膜の外表面にのみ修飾分子を導入する場合には、上層の分子充填状態が変化して膜全体が不安定となり、フリップフロップ(内外層間の分子の移動)によってこの調節(安定化)が行われるものと思われる。膜構成分子のダイナミクスは、二分子膜が相転移温度以下では後導入されない事実や、コレステロールの導入により脂質の主成分の相転移温度以下で後導入されるようになる現象(コレステロールは相転移温度以下の膜中の分子運動性を高める作用がある)からも理解できる¹³⁾。その際に小胞体内の低分子やイオンの漏出が懸念される。HbはpH変化やアロステリック因子の濃度に敏感で酸素親和度 P_{50} やヒル係数が変化する。そこでHbVに表面修飾剤を導入する前後にて P_{50} とヒル係数の測定を行ったが大きな変化を認めないことから、Hbよりも小さい内包物(アロステリック因子など)の漏出も特に問題とならないことが明らかとなった。

3.2. 表面修飾状態

分子量5,000(114量体)のPEG鎖や5量体のオリゴ糖鎖が小胞体外表面を修飾している様子を模式図Fig.1に示す。PEG-DPPEはジアシルホスファチジルエタノールアミン部までが二分子膜に取り込まれており、PEG鎖は水相に向け真っ直ぐ伸びているとすると二分子膜厚(5nm)の6~7倍の長さになる。実際はフレキシブルなPEG鎖は糸まり構造をとっている。この糸まりの厚さは約6nm、表面の分子占有面積は110nm²と見積もられ、約250個分の脂質を覆っている状態が推測される¹⁴⁾。導入量から算出された膜全体の被覆率は約80%程度である。

一方、オリゴ糖鎖はグルタミン酸部までが二分子膜中に取り込まれ、水相に伸びた糖鎖長は2.8nmである。 α 1,4-結合の糖鎖はらせん構造をとることが知られているが、5量体はらせんの一部に相当する湾曲構造となっているものと思われる。また、DHMPGluをベンゼン/メタノール混合溶液に溶かして気-液界面に展開し π -A曲線(LB膜作成装置、HBM式、協和界面科学)から外挿して求めた分子占有面積は1.0nm²となった。これはリン脂質の分子の面積(0.43nm²)の約2倍に相当する。ゼータ電位などのこれまでの実験結果から、表面物性は8mol%まで濃度依存の変化をとり、この濃度以上では殆ど変化が認められなくなる^{15,16)}。糖鎖

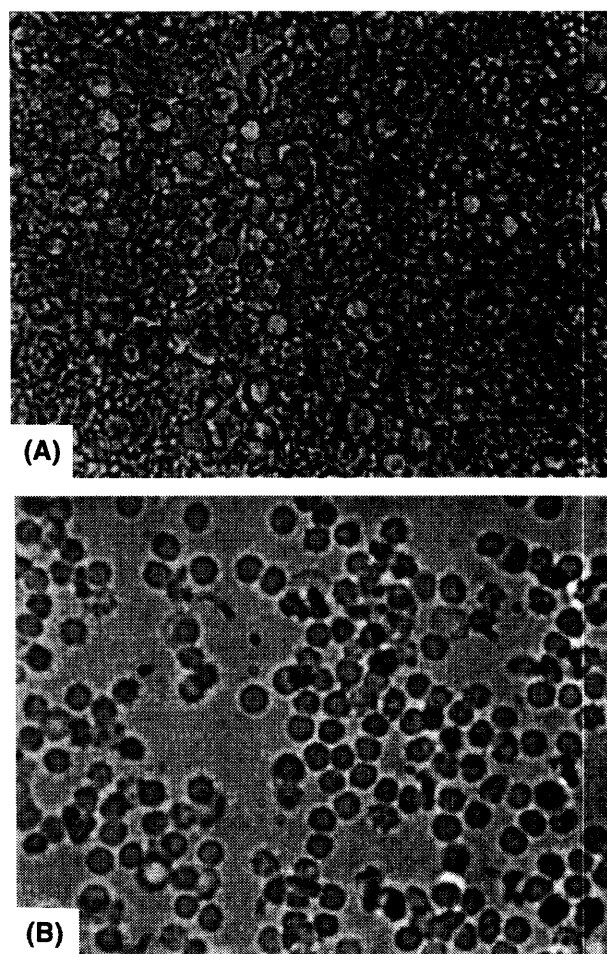


Fig. 2 Optical microscopic observation of (A) HbV(30%)/blood(70%) and (B) PEG-HbV(30%)/blood(70%).

の影響が表面全体に及ぶのは8mol%の導入率の時で、それ以上の濃度では糖鎖間の圧縮が起こると考えられる。従って、Fig.1に示した様に糖鎖は法線方向に対して60度傾いて回転することによって、表面全体を被覆している様子が推測される。

このように、PEG鎖とオリゴ糖鎖では小胞体表面の修飾状態は大きく異なり、PEG鎖の方が排除体積が大きく、膜表面からより遠隔まで影響を及ぼしている。

3.3. 表面修飾HbVの凝集状態の光学顕微鏡観察

HbV, PEG-HbV, Glyco-HbVを生食に分散させた系では、どの試料も外見上の相違、例えば濁度や粘性等に相違は認められなかった。一方、試料を光学顕微鏡にて観察したところ、未修飾のHbVではアルブミン溶液に分散させた時点で既に凝集していた(Fig.2)。しかし、簡単な攪拌で解離することから可逆的な凝集体であった。血液との混合比の増大に伴い凝集体は少なくなった。このことは、アルブミン中で一旦凝集したHbVは、血液と接触させても血球成分との相互作用やアルブミン以外の血漿成分(グロブリン、フィブリノーゲンなど)に起因する更なる凝集が生起していないか、あるいは生起しても本条件における粘度測定の結果に影響しない程度であると考えられる。

一方、PEG-HbVでは凝集体は認められず、ヒト血液と様々な割合で混合しても光学顕微鏡(x250倍)では直径約250nmのPEG-HbVは観察できず赤血球しか見られなかった(Fig.2)。このことはPEG-HbVはアルブミンあるいは他の血液成分と相互作用が弱い、或いはPEG鎖の排除体積により小胞体同士が接近できず、凝集しないことを示している。Glyco-HbVは未修飾HbVと同様にアルブミン溶液に分散させると凝集が観察された。しかし、未修飾HbVで見られた凝集体との相違(凝集度や凝集体の大きさ、沈殿など)は判別できなかった。

3.4. 血液混合系の溶液粘度

アルブミンに分散させたHbVをEDTA加ヒト血液と様々な割合で混合した系の粘度をキャピラリー粘度計にて測定(37°C, 2Hz)した。Fig.3に示した様に、未修飾HbVのみの系ではズリ速度 358s^{-1} における粘度は 8cP であり、低ズリ速度で急激な粘度の増大が認められ、 1s^{-1} にて 40cP に達した。血液との混合比の増大と共に、特に低ズリ速度側での粘度の低下が認められ、血液の値 $4\sim 5\text{cP}$ に単純に近づいた。一方、アルブミン分散PEG-HbVのみの系では粘度の値はズリ速度 358s^{-1} では 3.5cP であり、血液のみの値 3.6cP とほぼ同等であった。しかも、低ズリ速度側での粘度の増大はほとんど認められなかった。Glyco-HbVのみの系では、ズリ速度 355s^{-1} では 6cP であり、 18s^{-1} で 10cP に増大、それよりも低いズリ速度の領域では急激な粘度の低下が起り 1s^{-1} で 5cP 程度となった。血液との混合比の増大と共に全ズリ速度領域での粘度低下が認められ、血液のみの値に収束した。従って、HbVをPEG鎖あるいはオリゴ糖鎖にて修飾することにより、アルブミン溶液中の溶液粘度は低下し、未修飾系で見られた低ズリ速度での粘度の増大は大きく抑制された。また、血液との混合により粘度は単調に変化し、アルブミン以外の血液成分による凝集は本観察からは認められなかった。

3.5. 試料の細孔透過特性

アルブミンに分散させた試料の細孔透過性を調べるために、均一径の各貫通孔を試料分散液が透過する速度を求めた(Fig.4)。赤血球は孔径 $5\mu\text{m}$ の細孔までは透過できるが、 $3\mu\text{m}$ 以下になるとは

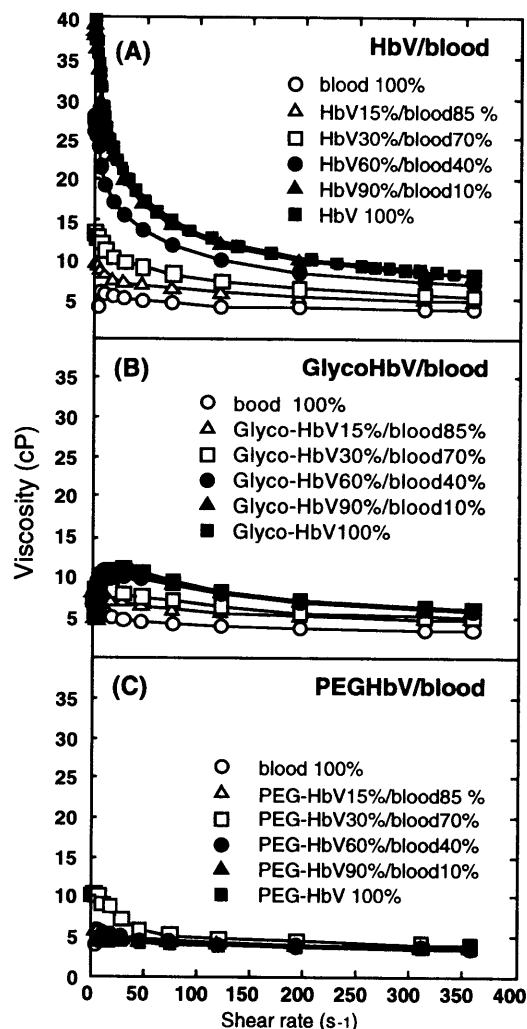


Fig. 3 Shear rate dependence of the viscosity of (A) HbV/blood, (B) Glyco-HbV/blood, and (C) PEG-HbV/blood in the mixture with human blood measured with an oscillatory capillary rheometer at 37 °C.

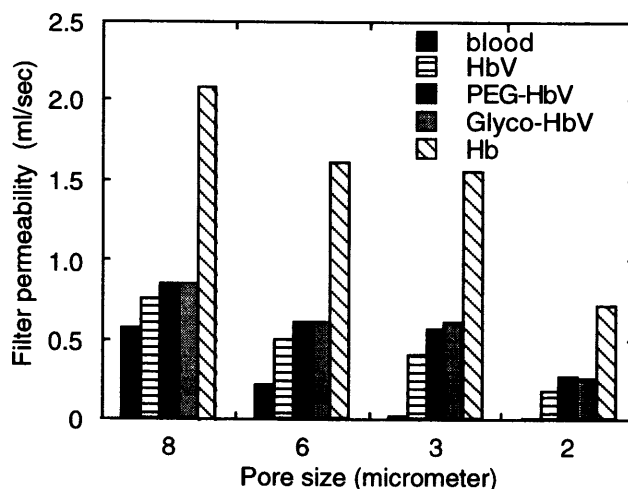


Fig. 4 Comparison of the filter permeability of samples through the isopore membrane filters at 0.3 kg/cm², 37 °C.

とんど透過できなかった。直径8 μ mの赤血球は折り畳まれた変形構造をとる場合4 μ m程度までの細孔は透過できることが知られている。一方、Hb溶液では孔径が小さくなるに従い透過速度は少しずつ低下するものの、2 μ mの孔径でも8 μ m孔径を透過する赤血球よりも大きな透過速度を有していた。一方、未修飾HbV、PEG-HbV、Glyco-HbV系の透過速度はどれも赤血球よりも大きいもののHb溶液の半分以下であり、しかも表面修飾状態の影響を受けていた。すなわち、未修飾のHbVでは修飾系よりも速度が遅く、凝集の度合いが大きいことを示している。しかし、PEG修飾、糖修飾共に同程度の速度であり、Glyco-HbVは静的な条件では凝集しているが、弱いズリ応力で容易に解離する弱い相互作用による凝集体であることが示された。また未修飾HbVでは凝集の影響が透過速度に反映されていたが、いずれの系でもHbVの細孔透過性は赤血球よりも優れていた。

4. 結論

HbVをアルブミン溶液に分散させると、アルブミンとの相互作用により凝集が生起するが、表面をオリゴ糖あるいはPEG鎖にて修飾することにより、凝集が抑制された。抑制効果はオリゴ糖よりもPEG鎖による修飾の方が大きかったが、動的な条件では大きな差は認められず、オリゴ糖修飾系は弱い相互作用にて凝集体を形成していることが示された。現在、ラットを用いた90%交換輸血試験にて凝集状態が循環動態に及ぼす影響について検討している。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費補助金(065159, 07508005)および岩城留学生奨学金によって行った。記して謝意を表する。

参考文献

1. 土田英俊, 武岡真司. 血液代替物: 最近の進歩. 人工血液 1993; 1:5-10.
2. Tsuchida E, Eds. Artificial Red Cells, John Wiley & Sons, New York 1995.
3. 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.
4. 守沢和也, 赤間和博, 粟井浩二, 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.
5. 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.
6. Yoshioka H. Surface modification of hemoglobin-containing liposomes with polyethylene glycol prevents liposome aggregation in blood plasma. Biomaterials 1991;12:861-4.
7. 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.
8. Takeoka S, Ohgushi T, Terasa K, Ohmori T, Tsuchida E. Layer controlled hemoglobin-vesicles by interaction of hemoglobin with phospholipid assembly. Langmuir 1996;12:(in press).
9. 酒井宏水, 泉 陽太郎, 山畑 健, 濱田健一, 武岡真司, 西出宏之, 小林絃一, 土田英俊. 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 人工血液. 1995;3:81-6.
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. Tsuchida E and Takeoka S. Stabilized Hemoglobin Vesicles. Artificial Red Cell (Tsuchida E. ed.), pp35-64, John Wiley & Sons: New York, 1995.
12. Sakai H, Takeoka S, Hamada K, Nishide H, Tsuchida E. Physical properties of hemoglobin vesicles as red cell substitutes. Biotechnol Prog 1996;12:119-25.
13. Kanda S, Inoue K, Nojima S, Utsumi H, Wiegandt H. Incorporation of spin-labeled ganglioside analogues into cell and liposomal membranes. J Biochem 1982;91:1707-18.
14. Kalina H and David N. Phase behavior of a lipid/polymer-lipid mixture in aqueous medium. Macromolecules 1995;28:991-1002.
15. Sakai H, Takisada M, Takeoka S, Tsuchida E. Cryoprotection of synthetic glycolipids for phospholipid vesicles. Chem Lett 1993: 1891-4.
16. 酒井宏水, 滝貞幹正, 鄭 主恩, 武岡真司, 土田英俊. Hb小胞体のオリゴ糖修飾効果. 人工臓器 1994;23:864-7.



—ヒト エリスロポエチン製剤—

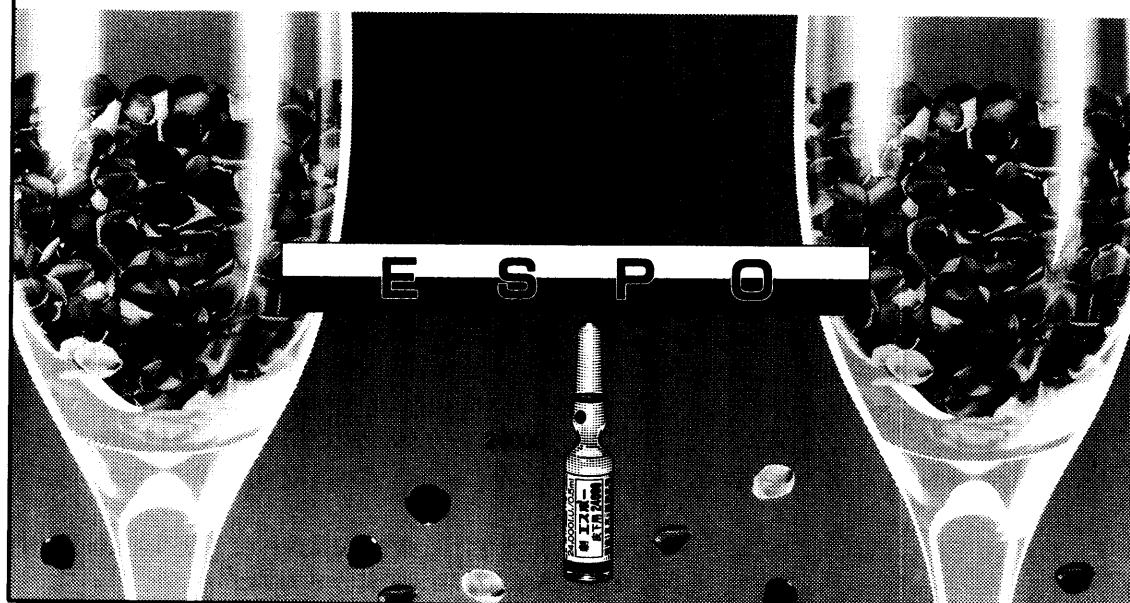
エスポー[®] 皮下用

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 一抜粋—

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・調剤請求元
三井株式会社
〒100 東京都中央区日本橋本町二丁目一
製造元
麒麟麦酒株式会社
〒100 東京都中央区新川二丁目一

95(4)(B)

お詫びと訂正

前号Vol.3(4) p.106の英文著者名でAkira Ishizaki先生の前にMasahiro Takahashi, Naoyuki Yanagida, Masahiro Okano先生のお名前が抜けておりましたことを深くお詫び申し上げます。

24th Congress of the International Society of Blood Transfusion ISBT '96

March 31- April 5, 1996 Makuhari Messe, Japan

SYMPOSIA

April 3, Wednesday 8:30-10:00

SAFETY AND EFFICACY OF ARTIFICIAL OXYGEN CARRIER

Chairpersons: T.M.S.Chang (McGill University, Montreal, Canada)
E.Tsuchida (Waseda University, Tokyo, Japan)

INTRODUCTION TO SYMPOSIUM

SAFETY AND EFFICACY OF ARTIFICIAL OXYGEN CARRIER

E.Tsuchida¹, T.M.S.Chang²

1. Waseda University, Tokyo, Japan

2. McGill University, Montreal, Canada

The most recent progress in red cell substitutes, especially hemoglobin(Hb) vesicles(HbV), lipidheme vesicles(LihV), etc will be discussed in this session. Modified-Hbs are now under clinical trials, however, it has been clarified that the rheological and biochemical problems are related to the acellular form of Hb. HbV and LihV having the cellular structure, therefore, are expected to solve the difficulties. Some results of pre-clinical tests, biophysical and rheological performances will be also discussed.

CROSSLINKED OR ENCAPSULATED HEMOGLOBIN AS BLOOD CELL SUBSTITUTES

T.M.S.Chang

Director, Artificial Cells & Organs Research Centre,
Faculty of Medicine, McGill University, Montreal, Canada

These approaches were first studied many years ago (Chang, 1957-1964). However, it is only in the last 10 years that major research and development have started. Both approaches prevent the breakdown of hemoglobin into dimers in the circulation. Incorporation of the required cofactors and other molecular modifications have improved the oxygen dissociation curve for oxygen release. There is no blood group antigen and therefore no need for crossmatching. If needed, they can be stored for a long time in the lyophilized form. Before modification, one can sterilize hemoglobin to remove infective microorganisms like H.I.V. and hepatitis viruses. Besides human hemoglobin, bovine hemoglobin and recombinant human hemoglobin can also be used. Modified hemoglobins are effective for treating hemorrhagic shock and hemodilution in experimental animals. Crosslinked ultrapure hemoglobin is the simplest, thus several groups have completed Phase I clinical trials and are now deep into Phase II clinical trial for safety and efficacy. A second generation method is to crosslink hemoglobin to superoxide dismutase and catalase to avoid oxygen radicals especially in reperfusion injury. Microencapsulated hemoglobin is another second generation method. In addition to using liposome, another more recent approach is the use of biodegradable polymer hemoglobin nanocapsules.

RECENT PROGRESS IN HEMOGLOBIN VESICLES AS RED CELL SUBSTITUTES IN JAPAN

E.Tsuchida

Dept. Polymer Chemistry, Waseda University, Tokyo, Japan

The most recent progress in red cell substitutes in Japan especially hemoglobin vesicles(HbV) will be presented. The characteristics of HbV as the results of the technological development will be introduced which are superior to the modified Hbs, mostly developed in the United States possessing both the economical performances and imperfection of properties.

Modified-Hbs are now undergoing clinical trials, however, it has been clarified that some problems are related to the acellular form of Hb. Therefore, HbV having the cellular structure are expected to solve not perfectly enough but some remaining difficulties especially in rheological solution properties. HbV satisfies the following demands; solution properties (oncotic pressure, viscosity, efficacy of O₂-transport) as blood does, control of half lives, less toxicity, rapid excretion and metabolism, no source of infection, and long term storage (more than a year). 90-95% exchange transfusion of HbV/albumin into anesthetized rats showed normal changes in hemodynamic and tissue O₂ tensions comparable with the transfusion of RBC/albumin, and there were apparently significant differences in comparison with the injection of albumin. All the rats with HbV survived over 24 hrs until sacrifice. These results indicated that the O₂-transport by HbV is almost the same with that of RBC. The system of suppression of metHb formation with safety in vivo will also be discussed.

COMPARISON OF ENDOTHELIAL CELL PERMEABILITY OF ACELLULAR AND CELLULAR HEMOGLOBIN

K.Ikebuchi, S.Sekiguchi

Hokkaido Red Cross Blood Center, Sapporo, Japan

Acellular hemoglobin(Hb) has been reported to cause vasoconstriction and show the inhibitory effects on the endothelium-dependent vasorelaxation, the mechanism of which is thought to be Hb's trap and inactivation of endothelium-derived relaxing factor(EDRF) produced by endothelial cells. Since EDRF acts as a physiological mediator in the subendothelial space, Hb should penetrate into this space. The permeability of several kinds of acellular and cellular Hb were examined by the endothelial cell-coated diffusion chamber assay. The permeability of Hb tended to decrease as their molecular weights increased. The permeability of PEG-Hb(MW 90k<), Haptoglobin-Hb complex(MW 155k<) were 1/6 and 1/17 of that shown by unmodified Hb, respectively. Liposome-encapsulated Hb showed little permeability. To increase the endothelial cell permeability, inflammatory substance and cytokine such as LPS and IL-6 were added in this system, however liposome-encapsulated Hb again showed little permeability. These data well relate the inhibitory capabilities of several kinds of Hb on the endothelium-dependent vasorelaxation in the previously reported rabbit aortic strips experiment. For their clinical application, Hb had better work as only oxygen carrier without any side effects. The availability of modified high molecular Hb and liposome-encapsulated Hb as an artificial substitute for red blood cell is suggested.

OXYGEN CARRYING CAPACITY OF HEMOGLOBIN VESICLES IN VIVO

K.Kobayashi¹, Y.Izumi¹, A.Yoshizu¹, H.Sakai², S.Takeoka², H.Nishide², E.Tsuchida²

1. Department of Surgery, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan 2. Department of Polymer Chemistry, Waseda University, Tokyo, Japan

The oxygen carrying capacity of Hemoglobin vesicles(HbV) was evaluated in vivo. HbV is a type of liposome encapsulated hemoglobin. It has a particle size of approximately 250nm, hemoglobin concentration is 10g/dl and its P₅₀ is controlled to 32 Torr. Exchange transfusions with HbV (40% and 90% of the estimated circulatory volume) were carried out in male Wistar rats. Mean arterial pressure and renal cortical tissue oxygen tension were monitored together with arterial blood gas measurements. In the 90% exchange, abdominal aortic blood flow and venous oxygen tension were also measured as an indicator of oxygen consumption. Phosphate buffered saline, 5% human albumin, washed rat red blood cells containing 10g/dl of hemoglobin (ratRBC) and HbV containing methemoglobin were employed as controls. In both 40% and 90% exchange transfusions, mean arterial pressure and renal cortical tissue oxygen tension were sustained in the HbV and ratRBC groups but declined in other controls. In the 90% exchange transfusion oxygen consumption was sustained only in the HbV and ratRBC groups. These data indicate that the oxygen carrying capacity of HbV was almost equivalent to that of ratRBC.

NEO RED CELL (NRC) AS A PERFUSATE FOR CARDIOPULMONARY BYPASS

A.Usuba, R.Motoki

First Department of Surgery, Fukushima Medical College, Fukushima, Japan

We evaluated the effect of NRC as a priming solution for total cardiopulmonary bypass (TCPB) using mongrel dogs. Nonpulsatile TCPB was made in 12 adult mongrel dogs weighing 9-16 kg at 37°C using a roller pump. The perfusate was 500 ml NRC and 500 ml hydroxyethylstarch (HES) on NRC group (8 animals), and was 1000 ml HES on control group (4 animals). TCPB could be continued for 7 hours in the NRC group. In the control group, TCPB could not be continued for more than 3 hours due to increasing the vascular resistance (VR). VR in NRC group decreased less than 1/4 of VR in control group. This change suggests that, the viscosity of which is lower than that red blood cells (RBC). In NRC group, oxygen delivery and oxygen consumption showed more than 8 and 5ml/kg/min respectively. On the other hand, the oxygen delivery showed more than 8ml/kg/min, however the oxygen consumption showed less than 5ml/kg/min in control group. There was a dissociation between oxygen delivery and oxygen consumption. GOT, GPT and lactate increased and acidosis progressed in control group. These results suggest that oxygen did not supplied enough to the peripheral tissue in control group. In NRC group, the LDH activity was significantly lower than that in control group, and hemolysis was less notable.

POSTER PROGRAM

April 4, Thursday

ARTIFICIAL OXYGEN CARRIER

Chairperson: R.Motoki (Fukushima Med. College, Japan)

THE EFFECT OF CELL-FREE HEMOGLOBIN (Hb) ON INTRAVASCULAR CLEARANCE AND CELLULAR, PLASMA, AND ORGAN DISTRIBUTION OF BACTERIAL ENDOTOXIN(LPS) IN RABBITS

M.Yoshida^{1,2}, R.I.Roth², Y.Miura¹, J.Levin²

1. Div of Hematology, Dept of Medicine, Jichi Medical School, Tokyo, Japan 2. Dept of Laboratory Medicine, VA Medical Center, San Francisco, USA

Hb and LPS synergistically produce toxicity. To elucidate possible mechanisms, three groups of rabbits received LPS alone, LPS plus human serum albumin(HSA), or LPS plus Hb(Hb group). The intravascular retention of injected ¹²⁵I-LPS during the 30-min period analyzed was significantly longer in the Hb group than in the LPS alone or HSA groups($p=0.0007$ and $p=0.03$, respectively). The intravascular half-life of LPS in the LPS alone, HSA, and Hb groups was 2.8, 4.0, and 4.9 min; the area under the curve was $1,369\pm483$, $1,594\pm360$, and $1,731\pm481$ (ng/ml x min, mean $\pm$ SD); and the total body clearance was 24.7 ± 9.2 , 20.1 ± 5.4 , and 18.9 ± 6.0 (ml/min, mean $\pm$ SD), respectively. Over 96% of injected LPS was associated with the cell-free plasma, with 51-54% of LPS in the apoprotein fraction at the initial time point, and 35-37% in the HDL fraction. The proportion of LPS increased significantly in the HDL fraction and decreased significantly in apoproteins during the 30-min period analyzed. The liver was the main distribution site(74%) of injected LPS. In the Hb group, the accumulation of ¹²⁵I-LPS in the spleen was significantly lower than in the HSA group($p=0.05$). The synergism of the in vivo toxicity reported for LPS and Hb may be due, in part, to the decreased rate of intravascular clearance of LPS.

TOXIC AND PHARMACOLOGIC LIMITS ON THE UTILITY OF THE PRESENT GENERATION OF HEMOGLOBIN-BASED BLOOD SUBSTITUTES

J.R.Hess¹, R.F.Reiss²

1.Walter Reed Army Institute of Research, Washington, DC, USA 2.Columbia-Presbyterian Medical Center, New York, NY, USA

We have produced human hemoglobin(Hb) and chemically modified human Hbs, in sterile formulation and of high purity, to advance the development of hemoglobin-based oxygen carriers for the emergency resuscitation of hemorrhagic shock. We have tested these Hbs in more than 20 cell, organ, and animal systems and identified significant toxicities and other pharmacologic limits on their usage. Infusion of these Hbs causes hypertension and increased vascular resistance in several species. Hb causes human mononuclear cells to secrete cytokines which lead to granulocyte adhesion and invasion of vascular walls. In the presence of bacterial endotoxins, these cytokine actions can be amplified to cause organ failure. In the presence of Hb, platelets activate more readily and are laid down at sites of endothelial injury in greater numbers. Cell-free Hb and the Hb breakdown products iron and heme can generate oxygen free radicals and increase peroxidative damage. Modified Hbs exhibit "two compartment open" pharmacokinetics with redistribution times out of the vascular compartment of only a few hours and whole body persistence of at most a few days. 30 to 40% of circulating Hb is met-Hb, unavailable for oxygen transport after the first 24 hours. Hb can replace RBCs only in limited situations.

OXYGEN TRANSPORTING ABILITY AND SOLUTION PROPERTIES OF STABILIZED HEMOGLOBIN-VESICLES(HbV)

S.Takeoka, H.Sakai, H.Nishide, E.Tsuchida

Department of Polymer Chemistry, Waseda University, Tokyo, Japan

Hemoglobin vesicles(HbV) which encapsulate concentrated Hb(<45g/dL) with mixed membrane of phospholipids, cholesterol, and α -tocopherol were prepared by an extrusion method. The excellent oxygen transporting ability of HbV with the large amount of Hb loading and good solution property in blood stream were evaluated *in vitro* and *in vivo*. The diameter was controlled to 251 ± 87 nm. The oxygen affinity of HbV was 32 Torr. The Hb concentration of an HbV suspension, dispersed in a phosphate buffered saline(pH7.4), was adjusted to 10g/dL. The comparable oxygen carrying ability to red blood cells was confirmed *in vitro* study. At this concentration, the viscosity was 2.6cP(230 s^{-1}), lower than that of blood(4.4 cP). The HbV suspension showed a typical non-Newtonian flow for a particle dispersion and agreed well with the Casson model. The viscosity of an HbV suspension at shear rates lower than 23 s^{-1} showed a maximum with increasing the mixing ratio of human blood, plasma, or albumin. While, HbV modified with polyethylene glycol or oligosaccharide show the lower viscosity after mixing with the blood components. This is due to the prevention of the interaction of blood components with the HbVs. The efficacy of the low viscosity of the stabilized HbV was also confirmed from tissue oxygenation *in vivo* tests.

EXCHANGE TRANSFUSION WITH HEMOGLOBIN VESICLES IN RATS

Y.Izumi¹, A.Yoshizu¹, K.Kobayashi¹, H.Sakai², S.Takeoka², H.Nishide², E.Tsuchida²

1. Dept. of Surgery, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan 2. Dept. of Polymer Chemistry, Waseda University, Tokyo, Japan

Hemoglobin vesicles(HbV) is a type of liposome encapsulated hemoglobin. It has a particle size of approximately 250nm, hemoglobin concentration is 10g/dl and its P_{50} is controlled to 32Torr. Exchange transfusion with HbV (90% of the estimated circulatory volume) was carried out in male Wistar rats. Renal cortical and skeletal muscle tissue oxygen tensions were monitored as an indicator of tissue perfusion. Abdominal aortic blood flow and venous oxygen tension were also measured as an indicator of oxygen consumption. Human albumin, washed rat red blood cells containing 10g/dl of hemoglobin(ratRBC) were employed as controls. At the end of 90% exchange transfusion, renal cortical and skeletal muscle tissue oxygen tensions along with oxygen consumption were sustained in the HbV and ratRBC groups but declined significantly in the albumin group. None of the albumin group rats survived after the exchange transfusion. Survival in the HbV and ratRBC groups was 100%. These data indicate that HbV transported oxygen almost as well as ratRBC.

IMAGING ANALYSIS OF NADH
AUTOFLUORESCENCE IN Hb-VESICLE-PERFUSED
RAT HEPATIC MICROVASCULAR UNITS

M.Suematsu¹, S.Takeoka², Y.Wakabayashi¹, H.Sakai²,
Y.Shinoda¹, Y.Ishimura¹, E.Tsuchida²

1. Dept. Biochemistry, Keio University, Tokyo, Japan

2. Dept. Polymer Chemistry, Waseda University, Tokyo, Japan

Although there is a growing body of evidence showing the usefulness of artificial blood substitutes to protect tissues from ischemic organ damages, it is still difficult to evaluate quantitatively actual improvement of tissue oxygen delivery at the intracellular levels in response to their transfusion. This study aimed to examine whether the state of tissue oxygenation in the liver lobules can be altered by the administration of Hb-vesicles(HbV) which encapsulate concentrated human Hb with phospholipid bilayer membrane. Isolated rat livers were perfused with oxygenated Krebs-Ringer solution(3ml/min/g liver), and the surface microvasculature was visualized through an intensified digital fluorescence microscope. NADH autofluorescence(450 nm) in the parenchymal domains was visualized by epillumination at 360nm after eliminating vitamin A autofluorescence by photobleaching technique. In the steady state, there was an intralobular gradient of NADH (portal<central). When the perfusion rate was reduced to 50% of the control, NADH exhibited a significant increase both in periportal and in pericentral regions followed by disappearance of the gradient. Under such circumstances, administration of HbV (equivalent to 5% in Hct) but not that of CO-saturated HbV attenuated the flow-induced increase in NADH panlobularly, suggesting the recovery of oxygen delivery. In addition, HbV administration elicited approximately a 10% increase in the vascular resistance presumably because of elimination of CO generated endogenously by heme oxygenase, which plays a crucial role in maintaining the microvascular resistance in a relaxing state. The current system thus serve as a useful model to evaluate the effects of artificial blood substitutes on oxygen delivery and functional integrity in microcirculation.

CHARACTERIZATION OF *NEO RED CELLS(NRC)*,
THEIR FUNCTION AND SAFETY IN VIVO TEST

Y.Ogata, H.Goto, T.Kimura, H.Fukui

R&D Center TERUMO CORPORATION, Kanagawa, Japan

We have developed and evaluated a new generation of artificial oxygen carriers, the Neo Red Cells(NRC) with metHb to Hb conversion enzyme system being preserved. Stroma free hemoglobin(SFH) prepared without damage to the enzymes from outdated human red blood cells, together with inositol hexaphosphate as an allosteric effector, NAD as a coenzyme and glucose, adenine and inosine as a substrate were encapsulated in liposomes. NRC thus prepared had a mean diameter of 250nm, encapsulation efficiency of 1.3g-Hb:1g-lipid and P₅₀O₂ of 65mmHg, the metHb formation was reduced from 1%/hr to 0.4%/hr by the addition of metHb reduction system. NRC were then coated with polyethylene glycol bound to phosphatidyl-ethanolamine as a surface modifier to prevent aggregation of NRC in plasma. The blood pressure increased transiently during injection of NRC, and then immediately returned to pre-injection level in conscious rats. The oxygen transporting capacity of NRC was investigated in rabbits which were made anemic by drawing 85% of their blood and replaced it with an equal volume of NRC solution. Their conditions and recovery from anemia was compared with rabbits infused with normal rabbit blood. The rabbits received NRC recovered from anemic condition within 2hr after exchange transfusion and recovered to pre-exchange conditions within 10hr, and the animals continued living normally for over 6 months before being sacrificed. Further the hemorrhagic shock model rabbits infused with NRC recovered from acidosis and renal dysfunction faster than rabbits infused with normal rabbit blood. The present investigations suggest that the NRC with enzymatic reduction system restrained the formation of metHb and they are efficient oxygen carriers without causing serious adverse reactions.

EFFECTS OF NEO RED CELL (NRC) ON HEMORRHAGIC SHOCK

A. Usuba, R. Motoki

First Department of Surgery, Fukushima Medical College,
Fukushima, Japan

The development of artificial blood began with a cobalt histidine complex. Perfluorochemicals (PFC) were subsequently developed, and stroma free hemoglobin (SFH) is used at present, but SFH is nephrotoxic and has a vasoconstricting action. In addition, since its oxygen transporting ability is low, SFH is used as modified hemoglobin or encapsulated hemoglobin. The former includes cross-linked, polymer, and macromolecule bound hemoglobin. The latter includes our liposome encapsulated hemoglobin which has been named Neo Red Cells (NRC). NRC has excellent characteristics such as low viscosity and high oxygen transport efficiency. In the hemorrhagic shock experiment, total peripheral resistance index decreased and cardiac index increased after blood exchange with NRC indicating that the low viscosity of NRC reduced the load on the circulatory system. And the NRC oxygen carrying capacity is several times that of natural red blood cell. In addition, NRC had no toxicity and scarcely affected the blood coagulation system or complement system. Blockade of the function of the reticuloendothelial system was transient and not serious problem. Therefore, NRC may be safe even after bolus administration as a blood substitute for treatment of acute massive bleeding and is expected to be a very useful.

TREATMENT OF ACUTE, MASSIVE HEMORRHAGE WITH NRC(LIPOSOMAL ENCAPSULATED HUMAN HEMOGLOBIN) IN DOGS

M. Takaori, A. Fukui, K. Kimura, Y. Fujita

Department of Anesthesiology, Kawasaki Medical School,
Okayama, Japan

The aim of this study is to test an efficacy of NRC (liposomal, encapsulated human hemoglobin) as artificial red cell for treatment of acute, massive hemorrhage. Isovolemic replacement of the circulating blood with 6% hydroxyethyl starch solution (HES) was done 4 times in an amount of 12ml/kg every 10 min in 12 beagles which were anesthetized with sevofluran and ventilated by a respirator. In 6 beagles, the replacement was continued other 4 times but, in remained 6, it was carried out other 4 times altering with NRC. Then the animals were left in place for 2 hours. Arterial blood pressures, heart rate, and arterial blood pH remained unchanged throughout the experiment. Cardiac output increased following the hemodilution in both groups. Mixed venous oxygen saturation remained unchanged until hematocrit value decreased to 14%. Thereafter it decreased sharply in the animals hemodiluted with HES but less in the animals with NRC. The above results indicated that NRC could replenish oxygen supply to the tissue during hemodilution associated with the treatment of acute, massive hemorrhage with artificial colloids.

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. リポソームの調製. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編. リポソーム. 東京: 南江堂, 1988;21-40.
3. 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

●池淵研二(委員長), 薄場 彰, 柿崎 徹, 武岡真司, 西出宏之, 宮尾秀樹, 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. 4 (1) 1996年3月31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