

目 次

# 人工血液

第4巻 第2号 1996年6月

第3回年次大会プログラム	.....	22
総説 血管透過性と修飾ヘモグロビンの下限分子量	..... 宮尾秀樹	45
学会報告 Frozen Platelets and Platelet Substitutes in Transfusion Medicine シンポジウム	..... 池淵研二	51

Contents

# ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 4 No. 2 June, 1996

Annual Meeting Program	.....	22
<i>Review:</i>		
<i>Endothelial Permeability and Lower Limit of Modified Hemoglobin Size</i>	.....	
<i>Hideki Miyao</i>	45	
<i>Report:</i>		
<i>Frozen Platelets and Platelet Substitutes in Transfusion Medicine Symposium</i>	.....	
<i>Kenji Ikebuchi</i>	51	

# 第3回日本血液代替物学会年次大会

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

大会長 元木良一

福島県立医科大学第一外科教授

会期 1996年6月18日(火)・19日(水)

会場 福島ビューホテル

〒960 福島市太田町13-73

Phone: 0245-31-1111

Fax: 0245-31-2762

## 年次大会長挨拶

第3回日本血液代替物学会年次大会をお世話させていただけますことは、私ばかりでなく教室員にとりましても大変光栄なことであります。本学会は1993年の発会以来、血液代替物に関する研究成果の発表の場として、研究推進の母体となってまいりましたが、本年次大会も前進に向けての大きな一歩となることを期待しております。さて、今大会では土田英俊会長に「酸素輸送の基礎と血液代替物」と題する教育講演をお願いいたしました。次々と酸素運搬体が開発されますが、その基礎を教えていただけるものと思います。招待講演はBirnbaum先生に「DCLHb」、Vandegriff先生に「Hb使用型の赤血球代替物」についてお話しいただきます。横山和正先生には「遺伝子組み替えアルブミン」について講演をお願いいたしました。各分野のエキスパートによる最新の話題がお聞きできるものと存じます。

輸血医学は血液代替物と最も近い関係にあり、今後の血液代替物の開発に貴重なご示唆をいただけるものと考え、「輸血医学と血液代替物の開発」と題したシンポジウムを計画いたしました。また、最も精力的に研究が進められている酸素運搬体についても、新進の研究者をすぐり、Vandegriff先生にもご参加いただいてシンポジウムを計画しました。血液、この生命維持に不可欠な素晴らしい天然物に替わる人工物を作ることの困難さは本学会会員ひとしく認識しておられることと存じます。前途には難問が山積されておりますが、会員の叡智を結集し解決に向けて前進したいと存じます。

第3回日本血液代替物学会年次大会会長  
福島県立医科大学第一外科学教室教授

元木 良一

## 参加要項

### 1) 参加費(会員懇親会費を含む)

¥10,000を当日会場受け付にてお支払いください。

### 2) 演題発表

シンポジウムの口演時間は15分、討論時間は5分です。一般演題の口演時間は7分、討論時間は5分です。何れもスライドの枚数に制限はありませんが、時間を厳守してください。プロジェクターは1台です。

### 3) 論文提出

シンポジウム、一般演題の演者は原著または総説形式の論文を年次大会期間中に必ず会場受け付に提出してください。査読用原稿4部はワープロ、手書きを問いません。邦文、英文何れでも受け付けます。図表もコピーでもかまいません。様式は本誌投稿規定に従ってください。査読後の印刷原稿は必ずワープロ原稿とし、フロッピーを添えて提出してください。図表は投稿規定に従って作製してください。

### 4) 連絡先

第3回日本血液代替物学会 年次大会長 元木 良一

〒960-12

福島市光が丘1番地

福島県立医科大学第一外科

Phone:0245-48-2111 ext.2331

FAX : 0245-48-2735

# 第3回日本血液代替物学会日程

6月18日 (火)

6月19日 (水)

9:00	開会の辞 元木良一	
10:00	一般演題 1-5 (武岡 真司)	一般演題 6-10 (薄場 彰)
11:00	教育講演 土田 英俊 (関口 定美)	シンポジウム-2 (高橋 恒夫)
11:40	招待講演-1 M Birnbaum (高折 益彦)	
12:00	招待講演-2 KD Vandegriff (西出 宏之)	12:00 閉会の辞 元木良一
12:30	昼食	
13:00	総会	
14:00	大会長講演 元木良一 (阿岸 鉄三)	
14:40	招待講演-3 T Yonetani (小林 紘一)	
15:30	招待講演-4 横山和正 (湯浅 晋二)	
16:20	休憩	
16:30	シンポジウム-1 (清水 勝)	
18:00	18:10	
		懇親会

---

## 第1日目 6月18日 (火)

8:55-9:00 開会の辞

元木 良一

9:00-10:00 【一般演題】

座長 武岡 真司(早大・理工学総合研究センター)

1. アルブミン-ヘム錯体の溶液物性と酸素結合能

安藤 克利(早大・理工学総合研究センター)

2. The Pharmacologic, Cardiovascular and Pressor/Perfusion Properties of HemAssit™

Kenneth E. Burhop, Ph.D. (Baxter Healthcare Co., Blood Substitutes Program, Round Lake, IL, USA)

3. An Overview on the Use of HemAssist™ in the Treatment of Acute Ischemic Stroke in Animals

Kenneth E. Burhop, Ph.D. (Baxter Healthcare Co., Blood Substitutes Program, Round Lake, IL, USA)

4. 表面修飾ヘモグロビン小胞体溶液のレオロジー特性とラット90%交換輸血試験

朴 晟翼(早大・理工学総合研究センター)

5. 出血性ショックにおける人工酸素運搬体、ヘモグロビン小胞体(HbV)の効果の検討

吉津 晃(慶大・医・外科)

10:00-10:50 【教育講演】

司会 関口 定美(北海道赤十字血液センター)

酸素輸送の基礎と赤血球代替物

土田 英俊(早大・理工学総合研究センター)

10:50-11:40 【招待講演 - 1】

司会 高折 益彦(川崎医大)

Diaspirin Cross-Linked Hemoglobin Solution (DCLHb™) Clinical Studies

Marv Birnbaum, M.D.,Ph.D. (University of Wisconsin, Clinical Science Center, Madison, Wis, USA)

11:40-12:30 【招待講演 - 2】

司会 西出 宏之(早大・理工学総合研究センター)

Oxygen Transport by Hemoglobin-based Red Cell Substitutes

Kim D. Vandegriff, Ph. D. (Department of Medicine, University of California, San Diego, CA, USA)

12:30-13:30 昼食

13:30-14:00 総会

14:00-14:40 【大会長講演】  
外科から見た酸素運搬体

司会 阿岸 鉄三 (東女医大・三外)

元木 良一 (福島医大・一外)

14:40-15:30 【招待講演 - 3】

司会 小林 紘一 (慶大・外科)

Nitric Oxide in the Blood: Allosteric Effector of Hemoglobin and Soluble Guanylate Cyclase

Takashi Yonetani, Ph. D. (Department of Biochemistry and Biophysics, School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA)

15:30-16:20 【招待講演 - 4】

司会 湯浅 晋治 (順天堂大・輸血)

遺伝子組み替えアルブミン(r-HSA)の開発とその意義

横山 和正 ((株) ミドリ十字)

16:20-16:30 休憩

16:30-18:10 【シンポジウム - 1】 輸血医学と血液代替物の開発

「血液代替物の開発にむけて—輸血医学面からの期待」

司会 清水 勝 (東女医大・輸血)

1. 輸血療法の現状・問題点・将来展望

清水 勝 (東女医大・輸血)

2. 代用血漿剤の開発

高折 益彦 (川崎医大)

3. 血液代替物開発と感染性ウイルス

池淵 研二 (北海道赤十字血液センター)

4. 巨核球・血小板增多因子臨床応用の現状

畠 清彦 (自治医大・血液)

5. 輸血治療の光と影

大戸 斎 (福島医大・輸血)

---

## 第2日目 6月19日 (水)

9:00-10:00 【一般演題】

座長 薄場 彰 (福島医大・一外)

6. Neo Red Cellを用いた心単純浸漬保存の研究

船越 陽一 (東女医大・三外)

7. ラット摘出心灌流におけるNeo Red Cellの血栓形成とその予防

仲井 邦彦 (東大医研)

8. Neo Red Cell (NRC)によるラット高度血液交換モデルの確立

柳田 尚之 (札幌北極病院人工臓器・移植研究所)

9. 赤血球代替物(ネオレッドセル:NRC)の出血性ショックに対する治療効果－循環血液量維持効果－

福井 明 (川崎医大・麻酔)

10. 赤血球代替物(ネオレッドセル: NRC)の血液希釈における酸素消費量維持効果

福井 明 (川崎医大・麻酔)

10:00-12:00 【シンポジウム - 2】 血液代替物開発の現況と問題点

司会 高橋 恒夫 (東大医研)

1. An Overview on the Use of HemAssist™ in the Treatment of Hypovolemic Shock in Animals

Kenneth E. Burhop, Ph.D. (Baxter Healthcare Co., Blood Substitutes Program, Round Lake, IL, USA)

2. Stability and Toxicity of Hemoglobin Solutions

Kim D. Vandegriff, Ph.D. (Department of Medicine, University of California, San Diego, CA, USA)

3. Hemoglobinを用いた酸素運搬体による血管収縮機構

仲井 邦彦 (東大医研)

4. 重症出血性ショックに対するネオレッドセル(NRC)の効果

薄場 彰 (福島医大・一外)

5. 人工酸素運搬体、ネオレッドセル(NRC)を灌流液として用いた完全体外循環実験

泉 陽太郎 (慶大・医・外科)

6. ヘム系赤血球代替物の酸素輸送特性と安定度評価

武岡 真司 (早大・理工学総合研究センター)

12:00-12:05 閉会の辞

元木 良一

元木良一

福島県立医科大学第一外科

土田英俊

早稲田大学 理工学部総合研究センター

教室では perfluorochemical を素材とした酸素運搬体の経験をもとに、被包形 Hb である Neo Red Cell(NRC)の研究を進めてきたが、外科臨床の立場から有効性と安全性について私見を述べてみたい。

動物を脱血し NRC で高度に置換しても酸素消費量は減少せず生存可能であったことは NRC の有効性を端的に示している。特筆すべきは動脈血酸素分圧( $\text{PO}_2$ )を高めた状態では赤血球を凌駕する酸素運搬量がえられる点で、小粒子径であること、低粘性であることなどと相待って、末梢血管痙攣を伴うショックなどでは絶好の適応となろう。

緊急時使用を想定すれば血液型に関わる煩雑な操作が不要なことは福音であり、粉末状態での長期保存への今一步の前進を期待したい。

感染の問題も臨床的にはクリア済みと考えたいが、昨今の社会情勢では再考を迫られることもありえよう。

その他の安全性に関しては基礎的検討を終了しているようであるが、重症患者では健常動物とは異なる病態があり、今後さらなる研究が望まれよう。例えばサイトカイン血症に伴う肺毛細管透過性亢進や凝血系機能亢進、酸素代謝の変化に伴う酸塩基平衡や電解質の変化、網内系への取り込みに伴う網内系機能低下などがあげられる。被包型 Hb では血液の変化が直接 Hb に及ばない剤型であり、現時点では最も安定した酸素運搬体と考えている。

酸素分子を迅速に結合脱着できる物質(ヘム)は、高酸素分圧では酸素を結合し低酸素分圧にて酸素を放出する。この結合-脱着の平衡が酸素輸送の原理である。また静置系では濃度(分圧)勾配によって酸素は拡散する。例えばそのようなヘム誘導体を分散固定したフィルム(膜)では酸素輸送が促進される。液相系の場合分散度に優れた運搬体に担持させたヘムが酸素を可逆的に結合脱着できれば、酸素運搬体としての条件を充分に満足する。これに生体適合性と生理条件下での酸素要求分圧に適合した親和度を付与できれば、これが赤血球代替物としての第一要件を満足する物質系の誕生となる。

ヘモグロビン(Hb)を利用した赤血球代替物はヘモグロビンがヘムの運搬体である。修飾Hb溶液系の臨床試験の著しい進展が見られるが、各種の副作用(例えば、血管内皮弛緩因子(NO)の捕捉による血圧の異常亢進、Hb溶液の高酸素濃度や低剪断応力に対応した血管収縮(血管内皮のautoregulation機能)、或いはエンドトキシンとの強い複合体形成による毒性亢進など)が指摘されている。そこで赤血球の構造(ヘモグロビンが袋に包込まれた)の重要性が注目され、Hb小胞体の開発が急がれている状況にある。

当学会では清水 勝 教授(東京女子医科大学 輸血部長)を委員長とする血液代替物評価委員会が設置され、Hb小胞体(NRC)の前臨床評価試験において、基本物性や酸素運搬評価についての優れた結果が得られている。このことは本大会での別講演でも発表される。

## Diaspirin Cross-Linked Hemoglobin Solution (DCLHb™) Clinical Studies

Marv Birnbaum M.D., Ph.D. University  
of Wisconsin, Clinical Science Center,  
Madison, Wis, U.S.A.

Hemoglobin solution have been in clinical studies for over seventy-five years, with no product yet approved for routine clinical use. Recent advances in purification technologies have resulted in a number of potential products in advanced clinical development. Patients studies with the modified, heat-treated DCLHb™ commenced 1993, and a multinational efficacy study involving the use of DCLHb in cardiac surgery patients was initiated in mid 1995. The first study evaluated the safety and of DCLHb in 130 hemorrhagic shock patients at ten U.S. and European sites: DCLHb was observed to be safe at the doses tested, and the results support initiation of an efficacy study in trauma patients (Sloan et al., Acad Emer Med [1995]2:5). In a hemodialysis patient study the utility of the DCLHb pressor effect was evaluated: the results implied "greater blood pressure stability with DCLHb" (Swan et al., Am J Kidney Dis [1995]26:918-923). The pressor effect was evaluated further in three surgical studies involving 160 patients: various doses of DCLHb were used as prophylaxis against hemodynamic instability during aortic repair (Garrioch et al., Crit Care Med [1996]24:A39), orthopedic or major abdominal surgeries. In an ICU study, fourteen "Sepsis syndrome" patients with low systemic vascular resistance despite maximum standard therapy experienced a "rapid and significant vasopressor response to DCLHb infusion that allowed for a 15-100% reduction in standard vasopressor drug requirements, with a significant decrease in mean APACHE II scores 24 hours after treatment (Rhea et al., Crit Care

Med[1996]24:A3). Along with the pressor effect of DCLHb, these studies demonstrated volume expansion properties to compliment the oxygen-carrying properties shown in preclinical preclinical studies. Thus, the potential benefit of DCLHb as a more classical "blood substitute" is currently being evaluated in cardiac surgery patients requiring blood transfusion in the perioperative period after cardiopulmonary bypass.

## Oxygen Transport by Hemoglobin-based Red Cell Substitutes

K. Vandegriff, R.J. Rohlfs, M.D. Magde,  
Jr., A. Gonzales, M. Gonzales, D. Baker,  
and R. Winslow Department of Medicine,  
University of California, San Diego

The design of hemoglobin-based oxygen carriers (HBOCs) has been led by assumptions that HBOCs should maintain some important physical properties of blood such as O<sub>2</sub> affinity and colloid osmotic pressure (COP). The first assumption that the cell-free Hb should mimic the O<sub>2</sub> binding properties of intraerythrocytic Hb (which has lowered affinity through allosteric regulation by intracellular 2,3-DPG) has directed design toward manipulation of the protein to lower its intrinsic O<sub>2</sub> affinity. The second assumption is that the HBOC should be iso-oncotic. These assumptions are now under examination. New evidence suggests that HBOCs having O<sub>2</sub> binding properties similar to those of whole blood (i.e., similar p50 and Hill coefficient) may increase O<sub>2</sub> delivery at the arteriolar level, leading to autoregulatory mechanisms which alter blood flow to maintain O<sub>2</sub> consumption constant by preventing either tissue hypoxia or hyperoxia. Mathematical models of O<sub>2</sub> transport that compare homogeneous Hb solutions with RBCs predict that cell-free Hb enhances O<sub>2</sub> delivery to the arteriolar wall due to an increase in surface area of exposure to the O<sub>2</sub> carrier and a decrease in the diffusion distance for O<sub>2</sub> leaving the lumen.<sup>1</sup> This enhanced O<sub>2</sub> delivery may lead to vasoconstriction and an increase in mean arterial pressure (MAP), a common side-effect observed following infusion of HBOCs. To study autoregulatory responses, we chose three different cross-linked, tetrameric Hbs that have identical solution properties (i.e., COP and viscosity) and similar vascular retention times but different O<sub>2</sub> affinities (Hbs provided by Hemosol Inc. and the U.S. Army). These solutions were tested in a rat model of exchange transfusion (ET) followed by hemorrhage. The O<sub>2</sub> affinities of the Hbs varied from higher than that of blood to the same as blood to much lower than blood. All three produced either a transient or persistent rise in MAP, however, the persistence of the increase in MAP correlated with p50: the Hb with high O<sub>2</sub> affinity showed only a transient increase in MAP at the onset

of ET which returned to baseline within minutes; the Hbs having O<sub>2</sub> affinities the same or lower than that of blood showed significant increases in MAP that persisted throughout the experiment (1-2 hours).<sup>2</sup> The difference in the time courses of the rise in MAP suggests that this mechanism may be different from that of NO scavenging and the combination of the two vasoactive effect may exacerbate problems due to high systemic vascular resistance. We monitored the effects on tissue oxygenation after ET with these three Hb solutions in our shock model using metabolic lactate production as an index of tissue hypoxia. Lactate levels were higher during hemorrhage following ET with the Hbs having low O<sub>2</sub> affinity. ET with the Hb having high O<sub>2</sub> affinity produced less lactate during hemorrhage, but the lactate levels were still higher than in animals that received no treatment and most animals in all three Hb groups did not survive the bleed.<sup>3</sup> Therefore, additional factors for tissue oxygenation by HBOCs must be important. In conclusion, contrary to a previously held assumption about the design of HBOCs for use in shock, O<sub>2</sub> binding properties may need to be different from those of whole blood to improve tissue oxygenation by preventing autoregulatory vasoconstriction due to tissue hyperoxia at the arteriolar level. (This work was supported in part by Program Project Grant HL-48018 from the USPHS/NIH NHLBI).

- 1)Vandegriff, K.D., and Winslow, R.M. In *Blood Substitutes: Physiological Basis of Efficacy* (Winslow, R.M., Vandegriff, K.D., and Intaglietta, M., eds.) Birkhäuser, Boston pp: 143-154, 1995.
- 2)Vandegriff, K.D., Rohlfs, R.J., Gonzales, A., Gonzales, M.L., M. McCarthy, Magde, M.D., Jr, Adamson, J.G., and Winslow, R.M. VI International Symposium on Blood Substitutes, Montreal, 1996.
- 3>Rohlfs, R.J., Gonzales, A., Gonzales, M.L., Baker, D., M. McCarthy, Magde, M.D., Jr., Vandegriff, K.D., Adamson, J.G., and Winslow, R.M. VI International Symposium on Blood Substitutes, Montreal, 1996.

## Nitric Oxide in the Blood: Allosteric Effector of Hemoglobin and Soluble Guanylate Cyclase

Takashi Yonetani  
Department of Biochemistry &  
Biophysics, School of Medicine,  
University of Pennsylvania,  
Philadelphia, PA, USA

Nitric oxide (NO) acts as a regulator of a number of vital cellular, physiological and biochemical reactions, principally by acting as the allosteric activator of *soluble guanylate cyclases* in various tissues. Nitric oxide in the blood is well maintained at a steady-state level of the order of micromolar by the dynamic balance between the continuous supply of NO by endothelial NO syntheses and other sources and the rapid scavenging of NO by oxy hemoglobin (oxy Hb) in the erythrocytes. Nitric oxide in the blood rapidly diffuses into erythrocytes and reacts with oxy Hb to form *met* Hb and  $\text{NO}_2/\text{NO}_3^-$ . *Met* Hb so formed is immediately reduced to *deoxy* Hb by active *metHb* reductase in the erythrocytes. The relative concentration of NO ( $\mu\text{M}$  in plasma) with respect to that of Hb (20 mM heme in the erythrocytes) is very limited in the blood. Under such conditions, NO converts *deoxy* Hb preferentially to  $\alpha\alpha$ -*nitrosyl* Hbs [ $\alpha(\text{Fe-NO})\alpha(\text{Fe})\beta(\text{Fe})_2$  or  $\alpha(\text{Fe-NO})_2\beta(\text{Fe})_2$ ] (Huang [1979] *J. Biol. Chem.* 254,11467-11474 and Kosaka et al [1994] *J. Am. Physiol.* 266, C1400-C1404). We found it to be an allosteric, low-affinity O<sub>2</sub>-carrier ( $P_{50} = 30$  and 70 torr for Hb and  $\alpha(\text{Fe-NO})_2\beta(\text{Fe})_2$ , respectively) under physiological conditions to facilitate more efficient delivery of O<sub>2</sub> to peripheral tissues. EPR and NMR measurements indicate that the Fe-His(F8) bonds in the  $\alpha$ -subunits of *deoxy*  $\alpha$ -*nitrosyl* Hb [ $\alpha(\text{Fe-NO})_2\beta(\text{Fe})_2$ ] are broken, causing its quaternary structural transition to ***Super-T*** states having an extremely low O<sub>2</sub>-affinity, as observed in other known ***Super-T*** Hbs such as HbM<sub>Iwate</sub> [ $\alpha(\text{Fe}[III])^{87}\text{His->Try})_2\beta(\text{Fe})_2$ ], HbM<sub>Boston</sub> [ $\alpha(\text{Fe}[III])^{58}\text{His->Tyr})_2\beta(\text{Fe})_2$  and  $\alpha(\text{protoporphyrin})_2\beta(\text{Fe})_2$ ] (Fujii et al [1995] *J. Biol. Chem.* 268, 15386-15393).  $\alpha(\text{Fe-NO})_2\beta(\text{Fe})_2$ , which is in a ***predominantly Super T*** state, reversibly forms the  $\alpha$ -Fe-His(F8) bonds upon

oxygenation of the  $\beta$ -subunits and shifts its quaternary structure toward ***R***-states, so that  $\alpha(\text{Fe-NO})_2\beta(\text{Fe})_2$  becomes an allosterically-sensitive, low-affinity O<sub>2</sub>-carrier, which becomes the *deoxy* state at the venous  $\text{PO}_2 = 40$  torr by releasing almost all the bound O<sub>2</sub>, where normal Hb remains 75%-oxygenated. Thus, the NO in the blood facilitates increased oxygen delivery to tissues through the vasodilation as well as the formation of an allosteric, low-affinity Hb,  $\alpha(\text{Fe-NO})_2\beta(\text{Fe})_2$ . Binding of NO to Hb as well as *soluble guanylate cyclase* causes the trans-axial breakage of the Fe-His bond in their heme prosthetic groups, resulted in alteration of their protein conformation (to the ***Super-T*** low-affinity state in Hb and to the activated state in *soluble guanylate cyclase*). Thus, the unique feature of NO as the physiological regulator relies solely on its ability to trans-axially break the heme Fe-His bond upon ligation, due to its preference to a 5-coordinated heme structure rather than its free radical nature and/or its high chemical reactivity.

## 遺伝子組み替えアルブミン(r-HSA)の開発とその意義

横山和正

(株) ミドリ十字

## 輸血療法の現状・問題点・将来展望

清水 勝

東京女子医大 輸血科

アルブミンは血漿分画製剤の中で最も多く使用されており、1993年における日本での使用量は約580万本(12.5g換算)に上る。これは血漿に換算すると約290万Lに相当する。医療現場においてアルブミンは循環血液維持、膠質浸透圧の維持に使用されており、その1回投与量は12.5gから100gと他の分画製剤に比べ、けた外れに多い。日本における血漿分画用に供されている血漿量は約70万Lであり、アルブミンの国内自給は極めて難しい。その意味でr-HSAの開発は血漿分画製剤の自給という点からも望まれている。

アルブミンを遺伝子組み替え技術で開発するに当たって考慮した点は(1)高生産系と(2)高度精製システムの開発であった。我々は酵母を用い高生産に成功するとともに効率の良い精製法を確率した。現在得られているアルブミンは血漿由来のアルブミンと同一構造であり、免疫学的にもその同等性が証明されている。また、純度も不純物から計算された結果では99.999999%以上であった。

r-HSAの開発は順調に進んでおり、1993年に第I相臨床試験を開始し、現在第III相臨床試験において血漿由来のアルブミンと比較試験中である。

1. 輸血療法の現状：この10年間の治療用血液の使用量は、血小板を除くと、余り大きな変動はないが、第VIII因子では遺伝子組み替え由來のものが全使用量の30%を占めるようになった。献血者数は年々減少しているが、血液の確保量は殆ど不变である。血漿分画の自給率は、第VIII因子以外は未だ20-30%で、大部分を外国の売血由來の製品に依存している。近年輸血療法の安全性は飛躍的に向上したが、最近新たな問題も生じている。

2. 輸血療法の問題点：輸血療法は、不可避的に何らかの副作用・合併症を伴うことを前提にしていることに最大の問題がある。従って、可及的に輸血は行わないこと、またdonor exposuresを減らすことにつきる。輸血療法も人の関与による過誤が起こりうる。TA-GVHDなどの免疫学的な、またHCVやHIVなどの輸血感染症の予防対策、ABO型などの過誤輸血対策、更に緊急輸血時の院内体制の準備も必要である。一方、血液事業面では未だに大量に消費されているアルブミンについても、安全性の面からも国内時給を一層推進すべきである。

3. 輸血療法の将来展望：より積極的な安全対策として、総ての赤血球はO型に変換することや総ての輸血用血液中の病原体を不活化処理することなどを検討すべきであろう。さらに、抜本的な安全対策としては人体由来でない血液代替物の開発である。人工酸素運搬体や遺伝子組み替えアルブミンあるいは血漿增量剤などについて、臨床応用上の問題点を克服していくことが望まれる。またトロンボポエチンは血小板輸血の在り方を大きく変えるであろう。このようなことによって治療用血液の使用量は“ゼロ”にはならないが、どのくらい削減出来るであろうか。従来より、輸血療法は光(利点)と影(副作用)とが織りなすドラマであるといえるが、この両者のバランスは輸血療法に内在する本質的な問題として、今後益々重要となるであろう。

高折益彦

川崎医科大学

池淵研二、関口定美

北海道赤十字血液センター

血液循環はリンパ循環に始まった。したがって血漿の循環が血液循環の基本となっている。そして完全な人工血液の開発にはまずより良い人工血漿を開発することが必要となる。また血液中の赤血球量が正常の1/2に低下しても生体機能は維持されるが、血漿量が正常量の3/4に低下すれば生命維持さえ困難となる。すなわち出血があっても血漿量の増大を計れば循環機能は維持され、生命が維持される。とはいえたる血漿それ自身あらゆる出血治療に用いることには種々の問題がある。そのため第一次世界大戦時以来、各種人工膠質液、すなわち人工血漿の開発が行われて来たが、未だ血漿に非常に近いものは完成されていない。現在ではやっと正常血漿膠質浸透圧に近いものを開発しているに過ぎない。しかしこれらには血液凝固障害や組織沈着などの副作用が残っていて、将来もこの方面での改良が望まれる。今回はこれらの点を踏まえて代用血漿の現状と理想像について検討してみたい。

血液製剤のスクリーニング検査の向上により血液製剤の安全性がより高められた。わが国では輸血後のB型肝炎は0.000214%、C型肝炎は0.26%の発生率であり、米国ではHIV感染のウィンドーピリオドによるものは36万単位に1件の割合で発生がみられるという。血液代替物はこれらの輸血感染症発生レベルを著しく低下させる安全性を保持しなければならないが、現在のところ完全なウィルス不活化の方法は確立されていない。血液代替物製造過程におけるウィルス除去が主要となり、これまで洗浄法、遠心法、限外ろ過法などがあつたが、さらに多孔性再生セルロース中空糸(BMM)を用いることによって、スパイクしたHBVが検出感度以下に除去できることが明らかになった。同時にヘモグロビン由来代替物副作用の成因となる赤血球ストローマ成分であるフォスフォリピッド、型物質も除去され、非常に良質のヒトヘモグロビンが得られることになった。これらを原料として修飾型ヘモグロビン、リポソーム内包型ヘモグロビンを製造すれば、感染の危険のない代替物にすることが可能と考えられる。

畠 清彦

自治医科大学血液

大戸 齊、元木良一

福島県立医科大学輸血部

血小板・巨核球の増殖に関する因子としてインターロイキン 3,6,11, thrombopoietin (TPO) がクローニングされ、単剤で骨髄異形成症候群、再生不良性貧血、化学療法後に臨床治験が行われている。すでに実用化された G-CSF の単剤長期投与や erythropoietin (EPO) の併用により血小板数の増加が認められた症例や、血小板機能の上昇によると思われる止血効果の認められる症例の報告がある。白血病の地固め療法後の M-CSF 投与でも血小板製剤の輸注を節約できる事が証明された。TPO は巨核球の増殖・分化及び血小板機能に対しても効果が期待され、有望視されている。日本で行われたサイトカインの臨床治験の結果から今後の展望について触れる。

日本では毎年 60 万人の患者が延べ 700 万人からの献血で製造された輸血 1800 万単位(1 単位 = 200ml 換算) を受けている。内 10 万人は輸血後 1 年以内に死亡し、50 万人は輸血を含めた治療によって命を永らえている。血液に由来する各種血漿蛋白製剤の使用者はこの 5 倍の数字に達するであろう。また大量出血、あるいは特殊な血液型のために輸血が間に合わず死亡している患者は 3000 人を越えていると推定する。

逆に輸血による急性死亡は 1) 不適合輸血で 50 ~ 100 人、2) 輸血後移植片対宿主病で 50 ~ 100 人、3) その他の原因で 50 ~ 100 人と、合計で 150 人 ~ 300 人にのぼると推定される。

輸血は血液の移植とも言われ、多くの合併症をきたしやすく厳格な検査、適切な管理が要求される。売血の 60 年代は受血者の 70% に副作用を伴っていたが、現在では 1% 以下に減少している。輸血で蓄積したノウハウは新たな医学の発展に応用されるであろう。

## シンポジウム2-1

### An Overview on the Use of HemAssist™ in the Treatment of Hypovolemic Shock in Animals

Kenneth E. Burhop, Ph.D.

Baxter Healthcare Corporation, Blood Substitutes Program, Route 120 & Wilson Road, WG2-3S, Round Lake IL., 60073. USA

HemAssist™ (also known as diaspirin crosslinked hemoglobin) is a highly purified,  $\alpha,\alpha$ -crosslinked human hemoglobin solution that is currently under investigation in a variety of human clinical trials. HemAssist is acellular, undergoes several viral inactivation steps, has a p50 of approximately 32mmHg, and is hyperoncotic (42mmHg) at a concentration of 10 g%.

Following severe, controlled hemorrhage in rats, resuscitation with HemAssist has been shown to quickly restore mean arterial blood pressure (MAP), base excess and subcutaneous and gut PO<sub>2</sub>; increase oxygen consumption; and increase blood flow to key tissues and organs such as the gut, heart, and brain. These physiologic effects have been shown to result in a decrease in bacterial translocation, a preservation of the gut mucosal architecture, and a significant decrease in mortality.

A significant number of studies in larger animal models of hemorrhagic shock reinforce these findings in rats. Studies in swine undergoing controlled hemorrhage have shown that small doses of HemAssist are able to effectively restore MAP, base excess and lactate values back near baseline levels, restore blood flow to key organs and tissues, and decrease mortality. Following resuscitation from hemorrhage in sheep, HemAssist has also been shown to restore oxygen consumption as well as autologous blood.

In uncontrolled hemorrhage models in rats and swine, despite increased MAP, resuscitation with HemAssist has not resulted in a dramatic, incremental increase in blood loss.

Therefore, HemAssist appears to be efficacious in a number of preclinical animal models of hemorrhagic shock. The results of a variety of animal models demonstrate that HemAssist produces a self-limiting increase in mean arterial blood pressure (MAP), increases blood flow to a variety of critical organs when administered to hypovolemic animals, and positively affects a number of physiologic indices of perfusion.

## シンポジウム2-2

### Stability and Toxicity of Hemoglobin Solutions

K. Vandegriff

Department of Medicine, University of California, San Diego

Several hemoglobin-based red cell substitutes are now in clinical trials. Nephrotoxicity, a problem with unmodified cell-free hemoglobin solutions, appears to have been eliminated through chemical and genetic cross-linking. However, side effects with modified hemoglobins still persist, and the mechanisms of these effects are under investigation. The application of these products requires that large amounts of modified hemoproteins be introduced free into the circulation. But in the absence of red blood cell antioxidant systems, there is little protection against oxidative byproducts of hemoglobin denaturation. Oxidative intermediates and heme loss present a catalytic environment for membrane damage through peroxidation of lipids and proteins, and acute exposure of endothelial cells to methemoglobin or free heme is cytotoxic. Properties of cell-free hemoglobins that may lead to *in vivo* toxicities are heme globin dissociation, protein denaturation, O<sub>2</sub>-free radical production, oxidation reactions, extravasation, inhibition of NO-EDRF activity, or altered O<sub>2</sub> transport properties. None of these potential toxicities have been addressed fully.

Most hemoglobin-based red cell substitutes have been designed to lower hemoglobin's intrinsic O<sub>2</sub> affinity. In general, the rate of hemoglobin autoxidation is inversely related to its O<sub>2</sub> affinity so that autoxidation is faster for hemoglobins with lowered O<sub>2</sub> affinity. Once hemoglobin is oxidized to its ferric form(methemoglobin), a number of undesirable reactions can take place. For example, oxidation of ferric(Fe<sup>3+</sup>) to ferryl iron(Fe<sup>4+</sup>) makes the protein more vulnerable to oxidative damage and provokes tissue injury through lipid peroxidation. The heme-globin interaction in methemoglobin also is less stable, accelerating heme-globin dissociation. Free heme, which is lipophilic, partitions into cellular membranes where it promotes membrane damage through catalysis of unsaturated lipid peroxidation. Ferric iron, as either free iron or in heme, further promotes oxidative damage by catalyzing the production of the highly reactive hydroxyl radical through the Fenton reaction. In the presence of free heme, cultured endothelial cells are acutely susceptible to oxidative injury, and a correlation exists between the rate of hemoglobin autoxidation, the level of heme uptake, and endothelial cytotoxicity. The presence of free heme causes induction of heme oxygenase synthesis either directly by providing substrate or indirectly by increasing the number of O<sub>2</sub>-derived free radicals. Heme oxygenase in turn provides a protective mechanism against further endothelial cell damage by making the cells resistant to oxidant damage, but this protective effect takes place only after a period of hours of exposure to oxidative stress. It is unknown whether acute injury to endothelium occurs *in vivo* upon exposure to cell-free hemoglobin-based products. The primary side-effects reported from Phase I/II clinical trials are hypertension and intestinal dysmotility, both which appear to be vasoactive in origin. The mechanisms of these effects are unclear, but scavenging of NO either by binding to cell-free hemoglobin or through conversion of NO to ONOO through redox reactions are believed to be involved. Whether other effects come into play are uncertain at this time.(This work was supported in part by Program Project Grant HL-48018. USPHS/NIH NHLBI)

## シンポジウム2-3

### Hemoglobinを用いた酸素運搬体による血管収縮機構

仲井邦彦、高橋恒夫

東大医科研細胞プロセッシング研究部門

## シンポジウム2-4

### 重症出血性ショックに対するネオレッドセル(NRC)の効果

福島県立医科大学第一外科

薄場 彰、元木良一

少量のヘモグロビン(Hb)誘導体輸注により持続的な血管収縮が引き起こされ、その結果数十mmHgの血圧上昇が観察される。血管弛緩反応は内皮細胞より放出される弛緩因子により制御されており、この弛緩因子のうち血管内皮由来弛緩因子(EDRF)はその本態がnitric oxideでありHbと親和性が極めて高い。従って、血管収縮はHbによるEDRFの結合・不活性化によるものと考えられる。しかしながら、末梢血にはおよそ15 g/dLのHbが赤血球として含まれており、ここに少量のHb誘導体を加えることが何故顕著な血管収縮反応を惹起するかは説明されてない。

非細胞性Hbと赤血球でEDRF不活性化に何らかの差異があるものと推察される。我々はその一つの要因がHbの見かけ上の大きさではないかと考え、細胞性Hb（赤血球およびリポソーム）および非細胞性Hb（未修飾Hb、分子内架橋型Hb、PEG修飾型Hb）を用いた一連の比較実験を行った。実験方法として、ウサギ大動脈標本オルガンバス実験、ラット摘出心ランゲンドルフ灌流実験、ならびに単層培養ウシ血管内皮細胞透過性実験を行った。その結果、EDRFの不活性化効率は細胞性Hbより非細胞性Hbにおいて顕著に高く、非細胞性Hbの中では分子量や酸素親和性の違いに関係ないことが確かめられた。また、単層培養内皮細胞の透過速度は分子量の小さなHb（未修飾Hbおよび分子内架橋型Hb）で高く、次いでPEG修飾Hb、リポソームの順であった。この結果は小さな分子量のHbは内皮細胞間隙から取り込まれ血管壁内部でEDRF不活性化に関与しうることを示すものと考えられた。

[目的] Liposome encapsulated hemoglobin、ネオレッドセル(NRC)の出血性ショックに対する resuscitation fluid としての効果を心機能が温存されている軽症群と心不全が進行した重症群とで比較検討した。

[NRC] ヘモグロビン濃度:6.0 g/d、平均粒子径:0.20 μ m、粘度:2.0 cP,  $P_{50}$  は 45~55 torr

[方法] 体重 9.0~13.0 kg の雑種成犬又はビーグル犬を用い、静脈内麻酔後、気管内挿管し吸入酸素濃度を 50% とした。NRC は HES( hydroxyethylstarch) と 2:1 に混合した。軽症群(6頭)；40 ml/min で脱血し収縮期血圧を 60 mmHg まで低下しさせ直ちに NRC を投与しそれを繰り返した。重症群(7頭)；脱血ショック後 3 分間治療せずに放置後に NRC を投与しそれを繰り返した。

[結果] 軽症群；NRC を脱血量と等量投与すれば血圧は回復した。動物は 5 回のショックに耐えられた。心機能が温存されており、低粘度の NRC の投与により、血管抵抗が著減し心拍出量が著増した。ショックに伴い酸素需要は術前値の 2.1 倍に増加したが、NRC は心拍出量と酸素結合能の両方を増加させて対応し、充分量の酸素を組織へ供給した。重症群；NRC を脱血量の 1.5 倍量投与しなければ血圧は回復しなかった。3 回のショックに耐えたが 4 回以上では死亡した。低粘度の NRC 投与にもかかわらず血管抵抗は上昇し心拍出量は低下し、心不全が進行した。酸素需要は術前の 1.6 倍に増加したが、NRC は心拍出量の低下分を酸素結合能を赤血球の 2 倍以上に増加させて補った。一方、赤血球はショック 2 回目までは酸素結合能を増加して対応できたが、3 回目は対応できなかった。

[結論] 心機能が温存されている軽症の出血性ショックに対し NRC は心拍出量と酸素結合能の両者を増加させて酸素需要の増加に対応した。一方、心不全が進行した重症の出血性ショックに対しても、NRC は心拍出量を増加させることは出来ないが、酸素結合能を増加させることで、酸素需要の増加に対応した。従って、NRC は重症の出血性ショックに対する resuscitation fluid として優れた性能を示した。

人工酸素運搬体、ネオレッドセル(NRC)を灌流液として用いた完全体外循環実験

泉 陽太郎、吉津 晃、山畠 健、成毛聖夫、  
江口圭介、川村雅文、堀之内宏久、菊池功次、  
四津良平、小林紘一  
慶應義塾大学医学部外科

**【目的】** ネオレッドセル(NRC)はヒト期限切れ濃厚赤血球より精製したヘモグロビン(Hb)をリポソームに封入した人工酸素運搬体である。Hb濃度は5.6g/dl、粒径は約200μm、P50は45Torrに調節されている。今回われわれはNRCを灌流液として人工心肺を用いた完全体外循環を行った。完全体外循環下では送血量、脱血量、血液の酸素化の調節が可能であるため、人工酸素運搬体の酸素運搬能の評価はより正確になるとと考えられた。

**【方法】** 動物種は体重約10Kgの雄ビーグル犬5頭を用いた。灌流液組成はNRC1400ml、20%マニトール3ml/kg、メイロン40ml/l、25%アルブミン150ml(灌流液および循環血液量より換算して約3%相当)とした。胸骨正中切開下に上下大静脈に脱血管、右大腿動脈に送血管を留置した。送血管より灌流液を徐々に送り体血圧を60mmHg以上に保ちながら脱血管より循環血液量の約80%を急速に脱血した後完全体外循環とした。ヘマトクリットより算出した交換率は81±9.1%であった。動脈血酸素分圧は約400mmHg、二酸化炭素分圧は約40mmHgとなるように調節した。体温は約37℃に保った。この条件下で灌流量を40ml/kg/minから170ml/kg/minの範囲で変動させ、それに伴う循環動態、血液ガス値の変化を検討した。

**【結果】** 体外循環中の平均体血圧は灌流量の増加について上昇する傾向がみられた。体外循環中のpHおよびbase excessは全体に酸性にかたむいていたが、灌流量が上昇するにつれて改善がみられた。酸素消費量は灌流量の上昇とともに増加し灌流量120ml/kg/minでほぼプラトーに達した。この時の酸素消費量は9.5ml/kg/min、酸素運搬量は16.5ml/kg/minであった。灌流量と酸素消費量の関係を犬赤血球中のHbとNRC中のHb各々1g/dlにあたりに換算すると酸素消費量が一定となった灌流量120ml/kg/min以上の範囲では、NRC中のHbから消費された酸素量が犬赤血球のHbに比べて若干高い傾向がみられたが両者有意差はなかった。

**【考察】** 完全体外循環下では灌流量の調節が可能である。本実験で酸素消費量が一定となる灌流量120ml/kg/min以上の範囲ではNRC中のHbから消費された酸素量と犬赤血球のHbから消費された酸素量の間に有意差はなかった。これよりNRC中のHbは犬の赤血球中のHbとほぼ同じ量の酸素を運搬したと考えられた。今後、稀釈体外循環等の灌流液として応用される可能性が示唆された。

ヘム系赤血球代替物の酸素輸送特性と安定度評価

武岡真司、西出宏之、土田英俊

早稲田大学 理工学総合研究センター

鉄(II)ポルフィリンの誘導体(ヘム)は酸素が配位した酸素錯体を形成するため、酸素運搬体として機能する。しかし、一般にこのような酸素錯体は不安定であり速やかに酸化(メト化)して失活する。酸素錯体としての長寿命化を計るために、1)ヘムが5配位構造をとっている、2)ヘム二量化による酸化(μ-オキソダイマー形成)が抑制されている、3)ヘムが疎水場に導入されプロトン酸化が抑制される、が要件であり、ヘモグロビンのヘム担持構造はこれらを全て満たしている。また、上記の条件を満足すべく分子設計されたヘム誘導体(リピドヘム)を分子集合体の疎水場に担持させることにより、単純ではあるが性能の高い全合成系の酸素運搬体が合成されており、基礎的な動物実験を終了させている。

本報では、Hbや高濃度Hbをリン脂質二分子膜で包み込んだHb小胞体、リピドヘム小胞体、リピドヘム小球体、アルブミンにヘムを担持させた新しい型の酸素運搬体について、構造的な特徴の整理、および酸素配位の動力学の比較を行うと共に、酸素錯体としての安定度評価および安定度向上(メト体還元)のための方法論に関して述べる。更に、赤血球代替物として血流中で長時間安定に機能するために、粒子表面の修飾やメト体還元のための光電子利用や膜を介した電子移動系についても触れる。

## 一般演題#1

### アルブミン-ヘム錯体の溶液物性と酸素結合能

安藤克利、川合宣行、武岡真司、西出宏之、土田英俊  
早稲田大学 理工学総合研究センター

## 一般演題#2

### The Pharmacologic, Cardiovascular and Pressor/Perfusion Properties of HemAssist™

Kenneth E. Burhop, Ph.D.  
Baxter Healthcare Corporation, Blood Substitutes Program, Route 120 & Wilson Road, WG2-3S, Round Lake IL, 60073. USA

**【緒言】** Albumin は、膠質浸透圧調整や各種分子の運搬機能を担う蛋白質である。テトラフェニルヘム誘導体を包接した Albumin が、生理条件下で可逆的に酸素を結合解離することを見いたした。この Albumin-ヘム錯体の溶液物性と酸素結合能を明らかにする。

**【方法】** 軸配位塩基であるイミダゾリル基を共有結合したヘム(FeP)-エタノール溶液に、一酸化炭素雰囲気下アスコルビン酸を小過剰添加して中心鉄を還元、一酸化炭素錯体を形成させた。これをヒト血清 Albumin-リン酸緩衝水溶液(pH7.4)と混合して Albumin に包接、光照射(500 W, N<sub>2</sub>下)により一酸化炭素を解離して Deoxy 体を得た。こうして調製した Albumin- FeP 錯体について、溶液物性及び酸素結合能を評価した。粘度は毛管粘度測定を、酸素配位平衡定数、結合解離速度定数は Laser 閃光分光分析を用いて決定した。また、酸素錯体の半減期は Oxy 体の可視吸収スペクトル変化より算出した。

**【結果と考察】** Deoxy 体に酸素を吹き込むと速やかに酸素錯体を形成し、溶液は鮮赤色を呈する。その酸素結合解離は可逆的であった。Albumin の構築する疎水的分子雰囲気へ FeP を包埋することによって、水相系でも安定な酸素錯体が形成できることを明らかにした。分子内塩基型ヘムを用い、エタノール中で一酸化炭素錯体を形成させることで、Albumin に存在する Histidine 残基-ヘム間の酸素結合能の低い配位錯体形成を防止し、酸素運搬体としての機能を向上させた。また、Albumin と FeP の仕込み混合比を変化(1:1-10:1)させて調製した Albumin-ヘム錯体について、その結合比をゲルfiltration 法、及び酸素配位能から検討し、その特徴について報告する。

During extensive preclinical testing of hemoglobin based blood substitute solutions, it was discovered that all of the products evaluated possessed pharmacologic properties in addition to their other inherent physical (e.g., low viscosity) and chemical properties (e.g., high oxygen carrying capacity). HemAssist™ (also known as diaspirin crosslinked hemoglobin) is perhaps one of the most extensively studied members of this new class of products.

HemAssist is a highly purified,  $\alpha,\alpha$ -crosslinked human hemoglobin solution that is currently under investigation in a variety of human clinical trials. Infusion of even small doses of HemAssist into animals and humans typically results in an increase in mean arterial blood pressure. A variety of preclinical studies have demonstrated that the vascular response to HemAssist is reproducible, can vary from tissue-to-tissue, can vary within a given tissue, and can vary depending on the state of tension/tone of a tissue. The pressor response is species dependent, has a rapid onset, is of limited magnitude and duration of action, can be observed in various *in vitro* and *in vivo* preparations, and can be mitigated by some anesthetics and by many commonly used antihypertensive agents. Perhaps most importantly, however, is the fact that a host of studies in a number of different clinically relevant animal models have suggested that vital organ perfusion is maintained or even enhanced following administration of HemAssist.

It is now known that several endogenous physiologic and pharmacologic mechanisms seem to mediate this pressor response. HemAssist can clearly interact with nitric oxide (an endogenous vasodilator), stimulate the release and/or increase the activity of endothelin (a potent natural vasopressor agent), up-regulate alpha receptors in the adrenergic system, and can differentially affect vasomotion in blood vessels.

The purpose of the current presentation will be to provide a comprehensive summary of the pharmacologic properties of hemoglobin solutions such as HemAssist.

## 一般演題#3

### An Overview on the Use of HemAssist™ in the Treatment of Acute Ischemic Stroke in Animals

Kenneth E. Burhop, Ph.D.

Baxter Healthcare Corporation, Blood Substitutes Program, Route 120 & Wilson Road, WG2-3S, Round Lake IL., 60073. USA

## 一般演題#4

### 表面修飾ヘモグロビン小胞体溶液のレオロジー特性とラット90%交換輸血試験

朴 晟翼<sup>1</sup>、武岡 真司<sup>1</sup>、酒井 宏水<sup>1</sup>、宗 慶太郎<sup>1</sup>、  
巨勢 丈裕<sup>1</sup>、西出 宏之<sup>1</sup>、土田 英俊<sup>1</sup>、  
泉陽 太郎<sup>2</sup>、吉津 晃<sup>2</sup>、小林 紘一<sup>2</sup>

<sup>1</sup>早稲田大学 理工学総合研究センター  
<sup>2</sup>慶應義塾大学 医学部外科

HemAssist™ (also known as diaspirin crosslinked hemoglobin) is a highly purified,  $\alpha,\alpha$ -crosslinked human hemoglobin solution that is currently under investigation in human clinical trials in stroke. In an effort to collect preclinical data to support this testing in man, HemAssist was examined in four separate animal models of acute cerebral or spinal cord ischemia/reperfusion.

HemAssist was examined in a number of separate studies in two different rat models that incorporate ischemic cortical lesions. In a spontaneously hypertensive rat model, hypervolemic hemodilution with HemAssist prior to middle cerebral artery occlusion, followed by reperfusion, resulted in a dose-dependent decrease in the amount of damage seen in the ischemic hemisphere of the brain as assessed by TTC staining and also resulted in a decrease in the amount of brain edema as measured by specific gravity. In a second rat model, hemodilution to 30% Hct with HemAssist prolonged the time required to produce half maximal lesion size in the brain by 68%. In both models, HemAssist increased cerebral perfusion.

In a feline model of focal cerebral ischemia, isovolemic exchange/transfusion with 15 mL/kg of HemAssist 1 hour following stroke induction, resulted in a significant increase in the oxidation state of cytochrome aa<sub>3</sub> (as assessed by multi-wavelength differential, near-infrared spectrophotometry) and produced a 73% reduction in cerebral edema compared to non-treated controls (as assessed by magnetic resonance imaging).

In a rabbit model of spinal cord ischemia (aortic occlusion), isovolemic exchange/transfusion with HemAssist at doses as low as 10 mL/kg resulted in an increase in the effective time to induce paralysis from 27.1±3.6 min (control) to 43.26±3.35 min in HemAssist treated animals.

These studies in various animal models of acute cerebral and spinal cord ischemia/reperfusion demonstrate that HemAssist increases brain blood flow and oxygen delivery and decreases tissue injury.

【緒言】高濃度ヘモグロビン小胞体(HbV)の外表面をPolyoxyethylene(Poe)あるいはオリゴ糖(maltopentaose, MP)で修飾した系(HbV-Poe, HbV-MP)についてレオジー挙動を検討した。更に90%交換輸血試験を行い、体内血流動態への影響を検討した。

【方法】HbV分散液(粒径:0.251±0.087 μm)にPoe結合脂質あるいは合成糖脂質の水溶液を添加し、HbVの外表面のみを修飾。これを5%albumin溶液に分散させ、Hb濃度を10g/dlに調節。EDTA加ヒト血液と混合しOscillating Capillary Rheometerにて粘度測定。均一細孔径を有するNucleporeフィルター(孔径0.2~8.0 μm, 0.3kg/cm<sup>2</sup>)を用いて各水溶液の透過速度を測定。更にWistar ratを用い90%交換輸血試験を実施し、血流動態、血液ガスパラメータ、組織酸素分圧を解析した。

【結果】生理塩水中のHbV(未修飾)の粘度は2.6cP(剪断速度358 s<sup>-1</sup>)であるが、albumin溶液中では8cPに上昇、ヒト血液の値(3.7cP)を上回る。更に剪断速度100 s<sup>-1</sup>以下で急激に増大し、例えば0.58 s<sup>-1</sup>では37cPになる。他方、HbV-MPでは粘度は低下し358 s<sup>-1</sup>にて6cPを示した。一方、HbV-Poeでは血液と同等(3.5cP)であった。ヒト血液との混合では、各系とも組成に比例した粘度変化を示し、血液成分との更なる相互作用は観測されなかった。Nucleporeフィルターの透過速度は、HbV-Poe, HbV-MPがHbVよりも約30%高い値を示した。また粒径が赤血球(8μm)に比較して0.25μmと小さいため、血液が透過できない細孔でも高い透過速度を示した。

90%交換輸血試験では、HbV-Poe投与群(n=6)の腹部大動脈血流量は前値の149±36%に増大(HbV群: 109±29%, p<0.05)、末梢血管抵抗は68±23%に低下(HbV群: 87±22%)した。組織酸素分圧には差は無いが、pHと混合静脈血酸素分圧もHbV群に比較して有意に高く安定した値を推移した。

【結論】表面修飾によりHbVの凝集が抑制され低粘性溶液が得られた。これが体内に於て速やかな血液循環と血液ガスパラメータの改善をもたらしたものと考えられる。

## 一般演題#5

### 出血性ショックにおける人工酸素運搬体、ヘモグロビン小胞体(HbV)の効果の検討

慶應義塾大学医学部外科<sup>1)</sup>、  
早稲田大学理工学部総合研究センター<sup>2)</sup>  
吉津 晃<sup>1)</sup>、泉 陽太郎<sup>1)</sup>、堀之内宏久<sup>1)</sup>、  
菊池功次<sup>1)</sup>、濱田賢一<sup>2)</sup>、酒井宏水<sup>2)</sup>、武岡  
真司<sup>2)</sup>、西出宏之<sup>2)</sup>、土田英俊<sup>2)</sup>、  
小林紘一<sup>1)</sup>

[目的] ヘモグロビン小胞体 (HbV)は期限切れヒト赤血球より精製したHbをリポソーム（リン脂質小胞体）に内包した人工酸素運搬体である。今回我々は出血性ショックに対してHbVを投与し、その酸素運搬能および有効性を検討した。なお、Hb濃度は10g/dl、P50は34Torrに調節した。

[材料と方法] 動物種は雄、Wistar系ラットを用いた。ペントバルビタール腹腔内注入麻酔の後、右頸静脈と右内頸動脈にカニューレを挿入した。右内頸動脈より平均体血圧 (MAP)を測定した。また、骨格筋（頸二腹筋）および左腎皮質に針型酸素電極を挿入しそれぞれの酸素分圧 (PtO<sub>2</sub>) を測定した。各PtO<sub>2</sub>が一定になったところで内頸動脈より推定循環血液量の50%を1ml/minの速度で脱血し、直ちに右内頸静脈より同量の試料を1ml/minの速度で投与した。試料としては5%アルブミンで調製したHbV (HbValb群)、対照として5%アルブミン (albumin群) および5%アルブミンでHb濃度10g/dlに調製したラット洗浄赤血球 (ratRBCalb群) を用いた。

[結果] 骨格筋および腎皮質PtO<sub>2</sub>は脱血後全群で脱血前の約40%まで低下したが各試料の投与に伴い回復した。投与終了直後では脱血前に比しHbValb群では80%、ratRBCalb群では90%まで回復したが、albumin群では60%に留まり前2群より有意に低かった。MAPは脱血後全群で脱血前の約20%まで低下したが各試料の投与に伴い回復した。投与終了直後では脱血前に比しHbValb群では100%、ratRBCalb群では120%まで回復したが、albumin群では80%に留まり前2群より有意に低かった。代謝性アシドースは脱血後全群でみられたが、各試料投与後30分で回復がみられた。群間に有意差はなかった。

[まとめ] 本実験ではMAPおよび骨格筋、腎皮質のPtO<sub>2</sub>の脱血ショックからの回復はHbValb群とratRBCalb群では同程度でありalbumin群と比べて良好と思われた。これよりHbVは出血性ショックに対して洗浄赤血球とほぼ同様の効果を有していると考えられた。出血性ショックに対するHbVの人工酸素運搬体としての有効性が示唆された。

## 一般演題#6

### Neo Red Cell を用いた心単純浸漬保存の研究

船越陽一、藤田省吾、渕之上昌平、阿岸鉄三、  
太田和夫  
東京女子医科大学、第3外科

#### 1. 目的

期限切れヒト血液から作られた人工血液であるNeo Red Cell (NRC) の有効活用を目的とし、心移植をモデルとして臓器保存液としての可能性を検討した。

#### 2. 実験動物と方法

##### 1) 心臓移植手術

体重250-300gのrat (LEW/Crj) を用い、ジエチルエーテルにて麻酔後以下の手術を行った。

(1) ドナー：開胸し、下大静脈よりヤング液を注入、心停止後、下大静脈を心臓近くで結紮切断。ついで大動脈、肺動脈を切断し、肺静脈、上大静脈を結紮切断して心摘出した。摘出後直ちにNRCにて大動脈より充分に灌流した後、4°Cで単純浸漬保存した。

(2) レシピエント：腹部正中切開で開腹し、腎動脈より末梢の大動脈、下大静脈を剥離した。一定時間単純浸漬保存した心臓の大動脈を大動脈に、肺動脈を下大静脈に端側吻合し、移植心の拍動再開を観察した。

##### 2) 保存液

NRC基本液あるいはUW液にNRCをsuspendしたもの (UW-NRC) を使用した。

#### 3. 結果

##### 1) NRC群

- |                  |        |     |
|------------------|--------|-----|
| (1) 1時間保存 (n=2)  | : 拍動再開 | 2/2 |
| (2) 3時間保存 (n=3)  | : 拍動再開 | 3/3 |
| (3) 6時間保存 (n=3)  | : 拍動再開 | 3/3 |
| (4) 24時間保存 (n=3) | : 拍動再開 | 0/3 |

##### 2) UW-NRC群

- |                  |        |     |
|------------------|--------|-----|
| (1) 6時間保存 (n=3)  | : 拍動再開 | 3/3 |
| (2) 24時間保存 (n=3) | : 拍動再開 | 2/3 |

#### 4. まとめ

NRCを単独に臓器保存液として使用した群よりもUW-NRCとして使用した群で心保存時間の延長が認められた。NRCは若干の修飾を加えることにより、臓器保存液として使用できる可能性が示唆された。

(NRCはテルモ(株)より提供)

## 一般演題#7

### ラット摘出心灌流におけるNeo Red Cellの血栓形成とその予防

仲井邦彦<sup>1</sup>, 薄場 彰<sup>2</sup>, 太田利男<sup>3</sup>, 佐久間一郎<sup>4</sup>, 北畠  
顯<sup>4</sup>, 中里幸和<sup>3</sup>, 桑原幹典<sup>5</sup>, 元木良一<sup>2</sup>, 高橋恒夫<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>東大医科研, <sup>2</sup>福島医大外科, <sup>3</sup>北大獣医学部薬理, <sup>4</sup>北大  
医学部循環器内科, <sup>5</sup>北大獣医学部放射線

## 一般演題#8

### Neo Red Cell (NRC) によるラット高度血液交換 モデルの確立

柳田尚之, 玉置 透, 川村明夫, 石崎 彰,  
岡野正裕, 高橋昌宏, 田中三津子, 目黒順一,  
久木田和丘, 米川元樹  
札幌北楡病院 人工臓器・移植研究所

リポソーム型人工赤血球の条件の1つとして、毛細血管等の微小血管を自由に循環できることが必要条件である。今回、ラット摘出心ランゲンドルフ灌流実験系を用いてNeo Red Cell (NRC, テルモ)の循環動態の評価を試みたところ、栓塞形成による灌流圧上昇を経験した。血栓形成の原因について検討したので報告する。

【方法】Wister系雄性ラット(180 - 240 g)にあらかじめヘパリンを腹腔投与し、20分後に心臓摘出、ランゲンドルフ法にて灌流を行った。灌流は10 nM U-46619を含むKrebs-Henseleit (KH)液またはHepes液(リン酸不含)を用いる定速灌流法とし、灌流開始後20分で灌流圧が120-140 mmHgとなるよう灌流速度を設定した。灌流時のNRC濃度はHb濃度0.1%とした。NRC灌流後、Hbを含まない灌流液による置換灌流を施した後中性ホルムアルデヒドにより固定し組織標本とした。

【結果】KH液での灌流ではNRC灌流開始とともに灌流圧の急速な上昇(> 200 mmHg)が認められ、組織学的にも栓塞形成が示された。Hepes液による灌流では灌流圧の上昇はみられないものの、組織学的にNRCを含む栓塞が認められた。一方、Ca<sup>++</sup>free KH液もしくは6% BSA存在下KH液での灌流では灌流圧上昇はなく組織検査でもNRCの残留は認められなかった。

【考察】KH液もしくはHepes液による灌流では栓塞形成が認められ、リン酸を含むKHで著しいこと、またCa<sup>++</sup>free KH液では起きないことから、栓塞形成へのリン酸ならびに2価陽イオンの関与が示唆された。特に、KH液にNRCを添加すると顕微鏡下に結晶形成が認められ、栓塞の原因の一つは無機リン酸塩結晶と推察された。一方、KH液へのBSA添加は栓塞形成予防に効果が認められた。

【結論】無機塩類緩衝系を用いた灌流実験ではNRCはリン酸塩結晶形成を含む何らかの原因で栓塞を誘導することが判明し、アルブミン添加により回避できることが示された。栓塞形成の機序を明らかにすると共にアルブミン添加による栓塞形成予防効果の詳細な検討が必要と思われる。

【目的】Neo Red Cell (NRC) は出血性ショックに対する濃縮赤血球輸血に変わるものとして、犬、ウサギ、ラットなどで有効性と安全性について実験が進められている。しかし、ラットモデルは文献的にみてもその再現性が確認されていない。われわれはより有効な total body rinse のためにラットにおける高度血液交換モデルを確立する目的で以下の実験を行った。

【方法】NRC は Hb 濃度 7% に調整されたものを用いた。体重 220~290g の BN 系ラット (♂) を用いて、頸動静脈にそれぞれ cannulation して、動脈側から 1.5ml の血液を吸引後、静脈側から 1.7ml の NRC を注入する操作を繰り返すことによって血液交換を行った。交換率はヘマトクリットを指標をして、70~80% まで交換した。交換後は NRC を 1ml/hr の速度で 8 時間持続静注した。経時的に採血して、一般末梢血、血液ガス分析を行った。

【結果】血液交換前後で、赤血球  $780.0 \pm 39.76 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、ヘマトクリット (Ht)  $42.43 \pm 1.45\%$  はそれぞれ  $198.0 \pm 31.19 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、 $10.93 \pm 1.75\%$  へと低下し、Ht 値から血液交換率は  $74.33 \pm 3.42\%$  と計算された。動脈血ガス分析では base excess (B.E.) は  $1.45 \pm 1.35 \text{ mM}$  から  $-5.15 \pm 0.65 \text{ mM}$  へと変化し、代謝性アシドーシスに傾いたが、24時間後には  $1.23 \pm 0.98 \text{ mM}$  と回復を示した。交換後の Ht の経時的变化は直後、24時間後、48時間後、72時間後、1週間後においてそれぞれ、 $10.93 \pm 1.75\%$ 、 $8.25 \pm 1.05\%$ 、 $11.15 \pm 1.95\%$ 、 $22.8\%$ 、 $45.8\%$  であり、48時間以降、自己の造血機能が回復し始め、1週間ではほぼ前値に復することがわかった。

【まとめ】血液交換後、輸液などの管理により、ラットでも NRC による平均 75% の血液交換が可能である。Ht が前値の 50% に回復するまで 48~72 時間を要するが、その間 NRC は有効な酸素運搬体として機能していると思われた。

**赤血球代替物（ネオレッドセル：NRC）の  
出血性ショックに対する治療効果  
—循環血液量維持効果—**

福井 明、高折 益彦  
川崎医科大学麻酔科学教室

**赤血球代替物（ネオレッドセル:NRC）の  
血液希釈における酸素消費量維持効果**

福井 明、高折 益彦  
川崎医科大学麻酔科学教室

**【緒言】**急性出血に対しては、晶質液、代用血漿、次に輸血を使用することが一般的である。人工赤血球NRCは大量出血の治療手段としてその有効性が期待されている。臨床的出血を模して NRC, 6% hydroxyethyl starch液 (HES), blood(自己血) にて治療を行い、その際の循環血液量の変化、これに伴う循環緒因子の変化、酸素消費量 ( $\dot{V}O_2$ ) の変化について検討した。

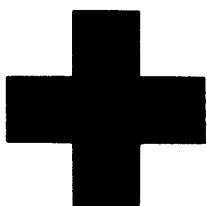
**【対象・方法】**18頭のビーグル犬に、ケタミン2mg/Kgで麻酔を導入、気管内挿管後、30%笑気・酸素混合ガスと0.97%のセボフルレンで調節呼吸下に麻酔維持した。生理的諸因子測定用のカニューレーションを施行、循環動態安定後、stage0値の測定を行った。次に動物を以下の3群に分けた。HN群では動脈より40ml/Kgの脱血を40ml/minで行い、その5分後にHES20ml/Kg、乳酸リンゲル液 (LR)20ml/Kgを可及的速やかに注入（操作1）し、第2回目の測定(stage1)を行った。次にNRC20ml/Kgを可及的速やかに注入（操作2）し、第3回目の測定(stage2)を行った。NH群では操作1でNRC, LR, 操作2でHESを、AH群では操作1で自己血, LR, 操作2でHESをそれぞれ同量注入した。生理的緒因子は、循環動態値、動脈血血液ガス分析値とした。また $\dot{V}O_2$ を吸気・呼気酸素濃度較差と呼吸量から算出、循環血液量を<sup>125</sup>I-human albumin, <sup>51</sup>Cr標識赤血球の希釈法で測定した。

**【結果・結論】**3群ともstage1で平均動脈圧、平均右房圧、平均肺動脈圧は低下、心拍数、心拍出量は増加し、この変化がstage2まで持続した。しかし群間に有意差を認めなかった。ヘモグロビン値は3群とも低下したが、HN, NH群間に有意差を認めなかった。 $\dot{V}O_2$ は3群とも各stage間、ならびに群間に変化を認めなかった。循環血液量はAH群で変化を認めなかつたが、stage1でHN, NH群は有意に低下し、AH群との間に有意差を認めた。しかしstage2では3群ともstage0値に回復し、群間に有意差を認めなくなつた。すなわちNRCには、輸血と同様に酸素運搬能、ならびに循環血液量維持作用が認められた。

**【緒言】**血液希釈(HD)の進行に伴い酸素運搬体である赤血球量は減少する。そしてある極限に達すると組織酸素代謝の破綻を来たす。これに対して酸素運搬能が正常赤血球より大きい人工酸素運搬体のネオレッドセル(NRC)を使用してHDを行った場合、HDの安全限界の拡大が期待される。本研究ではHDをNRCで行った場合の酸素消費量 ( $\dot{V}O_2$ ) の変化を6%ハイドロオキシ澱粉液(HES)を使用した場合の変化と比較した。

**【対象・方法】**14頭のビーグル犬に2mg/Kgのケタミンで麻酔を導入、気管内挿管後、人工呼吸下におき、50%笑気・酸素混合ガスと0.97%のセボフルレンで麻酔維持した。以下の生理的諸因子測定用のカニューレーションを施行、循環動態安定後、対照値の測定を行った。次に可及的速やかに動脈カニューラから12ml/Kgの脱血を行い、ただちに同量のHESの注入を行つた。これを10分毎に4回行い、第2回目の測定を行つた(4HD)。この時点で動物を7頭ずつ2群に分け、HES群ではHESによる、NRC群ではNRCによる同様のHDをそれぞれ4回行い、第3回目の測定を行つた(8HD)。以後動物をそのままに放置し、1, 2時間後にそれぞれ第4, 5回目の測定を繰り返した(1h, 2h)。生理的緒因子は、循環動態値、動脈血血液ガス分析値とした。また呼気ガス量を測定し、これに呼気・吸気酸素濃度較差を乗じて $\dot{V}O_2$ を算出した。

**【結果・結論】**ヘマトクリット値は8HDでH, N群それぞれ10.6, 13.1%に低下した。動脈血酸素含量はN群で7.6, H群で5.9ml/dlとN群で高値が2hまで持続した。混合静脈血酸素分圧は両群とも40mmHg台まで低下したが、混合静脈血酸素含量はN群で有意に高値を示した。 $\dot{V}O_2$ は両群で低下し、8HDでのそれはH群で著しく、2hでは対照値の50%以下に達した。これに反してN群では軽度の低下で両群間に有意差を認めた。HD後の動脈圧、肺動脈圧、右心房の各平均圧はN群で有意に高値を示した。また心拍出量も2hにはN群で有意に高値を示した。したがつてNRCは十分に酸素を末梢組織に運搬し、それにより生体の酸素代謝を正常に維持し、かつ循環動態も維持することが認められた。



善意の貴重な  
献血から造られています。

日本赤十字社



日本赤十字社の血漿分画製剤

指 赤十字アルブミン

指 ガンマーフ「日赤」

指 人免疫グロブリン「日赤」

指 抗HBs人免疫  
グロブリン「日赤」

指 クロスエイトM 250

指 クロスエイトM 500

指 クロスエイトM 1000

日本赤十字社 〒102 東京都千代田区大手町1-13 文部省立赤十字病院中央血液センター 血液清掃部 TEL 03-5485-6607

# 血管透過性と修飾ヘモグロビンの下限分子量

宮尾秀樹

Hideki Miyao

## Endothelial Permeability and Lower Limit of Modified Hemoglobin Size

Although the weight of whole body endothelium is as large as that of liver, it is difficult to recognize the endothelium as an organ. Because of its organ specificity, it is impossible to discuss the nonspecific characteristics of the endothelium, especially its permeability. Plasma oncotic pressure is, then, different from each organ or from various pathological conditions such as sepsis and burn which can increase the permeability of the endothelium. It may be useless to measure the oncotic pressure of synthetic colloids, since the semipermeable membrane of oncometer is made for albumin which has no distribution of molecular weight but has only one molecular weight (69,000). Yet, a synthetic colloid has a wide distribution on its molecular weight. An electric charge of colloid also contributes to the permeability as well as the size of molecule. It is said that one third of oncotic pressure is originated from the electric charge. Since each electric charge of luminal surface of endothelium, basement membrane, and subendothelium is different and also has an organ specificity, then this problem also makes the interpretation of endothelial permeability confused. Hemoglobin has an advantage of having more significant oncotic pressure than other synthetic colloids when it is used as an artificial blood, because the molecular weight of hemoglobin is large enough to produce effective oncotic pressure as albumin does. The leakage of hemoglobin through endothelium, however, can inhibit nitric oxide and result a vascular constriction, consequently this phenomenon is in contradiction to the aim of the therapy. Then, hemoglobin should be modified chemically so that it cannot leak out of the vascular space. There are some studies of a new synthetic colloid, which may suggest the lower limit of molecular weight of the modified hemoglobin. According to this understanding and morphological speculation, we may safely say that lower limit of the molecular weight and the size of modified hemoglobin is thought to be greater than 300,000 dalton and 30nm, respectively.—Key Words: Modified hemoglobin, Endothelium, Permeability, Artificial blood, Artificial organ, Hemoglobin vesicle.

臓器としての血管内皮細胞は、全身の内皮細胞を集めると肝臓ほどの重量を持つと言われるほど、大きな臓器であるが、臓器により特異性が強くその透過性について一律に論じることは不可能である。また血清膠質浸透圧はその標的半透膜が内皮細胞であるために臓器別に異なるし、敗血症や熱傷などの病態によっても異なる。膠質浸透圧計は測定膜がアルブミンを対象としているために他のコロイドの膠質浸透圧測定は無意味といつても過言ではない。血管透過性を左右する因子は分子の大きさとともにその電荷も浸透圧の1/3を担っている。内皮細胞表面、基底膜、間質の電荷も臓器特異性があり、血管透過性の解釈を複雑にしている。人工血液としてのヘモグロビンはアルブミンと分子量が近く单一分子量であるために、膠質浸透圧維持の目的では他の合成コロイドより有利である。しかし血管外漏出により内皮細胞由来血管弛緩因子である一酸化窒素を失活するために血管収縮を起こし、血流障害による酸素供給の低下という、投与目的に相反する反応を起こす。そのため表面修飾や重合などにより血管外への漏出を防ぐ努力がなされている。血管外漏出をふせぐための修飾ヘモグロビンの分子量下限に関して、合成コロイドの研究で興味ある報告がある。また大分子量物質の血管内外への輸送手段であるtranscytosisの分子量上限サイズが30nm位という知見がある。これらの事から修飾ヘモグロビンの下限分子量は300,000 dalton、サイズは30nmが適当と考える。

### はじめに

人工血液の問題点として血中停滞率、腎からの排泄、半減期、細網内皮系への取り込み、内皮細胞由来血管弛緩因子(EDRF)抑制物質としての血圧上昇などがあるがそのいずれにも関連するキーワードとして血管内皮細胞がある。全身の血管内皮細胞を集めると肝臓ほどの重量を持つと言われるほど、大きな臓器であるが、その重要性は形態学が縦割り(臓器別)であるために認識されにくい。また臓器別に形態、生理、病理が大きく異なり、ひとつの臓器としてある概念をイメージすることは難しい。人工血液が内因性の血球以外に最初に出会う細胞であり、酸素運搬体としての寿命を全うする上で常に一番身近に接する細胞は血管内皮細胞である。一酸化窒素(NO)の発見以来、血管内皮細胞も急に脚光を浴びてきただが、ヘモグロビンを有する人工血液がNO抑制的に働くことはどちらかといえば人工血液の発展には抑制的に働きそうである。しかし米国において修飾ヘモグロビンの臨床応用に積極的なグループはこの点を無視するか、別の問題に切り替えようとしているかのような印象さえ有る。ヘモグロビン小胞体は短期的にはこの問題を解決しているように思われ、将来への展望も大きいと思われる。この論文の目的は修飾ヘモグロビンの内皮細胞透過性がどのような因子に左右されるかを検討し、血管外漏出を防ぐためには修飾ヘモグロビンのサイズや分子量の下限を推定することである。

### 1. 血管内皮細胞の形態

#### 1.1. 一般的な毛細血管内皮細胞の形態

Fig. 1に一般的な毛細血管内皮細胞の模式図を示す<sup>1)</sup>。細胞内へ

埼玉医科大学総合医療センター麻酔科、〒350 埼玉県川越市鴨田辻道町  
1981. Department of Anesthesia, Saitama Medical Center, Saitama Medical School. Tsujidou-cho 1981, Kamota, Kawagoe 350, Japan

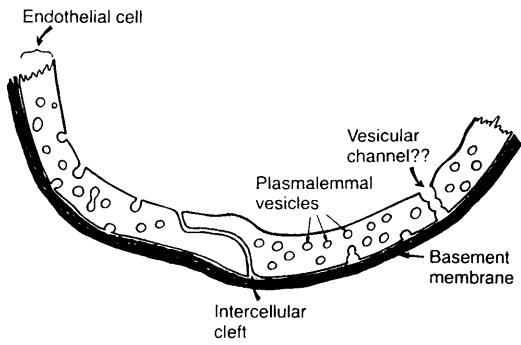


Fig. 1. Structure of the capillary wall.

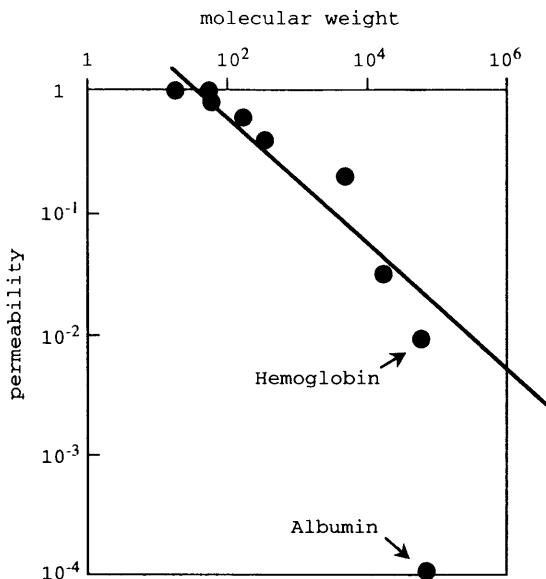


Fig. 2. Logarithmic graph of Table 1.

Table 1. Relative permeability of muscle capillary pores to different-sized molecules<sup>1)</sup>

	Molecular Weight	Permeability
water	18	1
NaCl	58.5	0.96
Urea	60	0.8
Glucose	180	0.6
Sucrose	342	0.4
Inulin	5,000	0.2
Myoglobin	17,600	0.03
Hemoglobin	65,000	0.01
Albumin	69,000	0.0001

いるが<sup>2)</sup>, Fig. 1 はcontinuous capillary の内皮細胞である。血液脳関門に代表される脳血管内皮細胞間隙はFig. 1 のintercellular cleft がtight junction となっているために電解質も自由に通過できない。そのために血管内外の水分の出入りの制御は膠質浸透圧ではなく晶質浸透圧が司る。腎糸球体血管はfenestraeが多く大量の水分を濾過するのに都合が良い。一方肝臓や脾臓や骨髄はdiscontinuous capillaryで基底膜を欠き数百nmの大きさの穴を持つと言われ、アルブミンは自由に血管を出入りしている。このように臓器によりその血管透過性は大きく異なる。

## 2. 膜質浸透圧とは

### 2.1. 晶質浸透圧と膜質浸透圧

溶液は、水は通すが溶質を通さない半透膜で隔てられた場合その溶質により浸透圧を持つ。晶質浸透圧は細胞膜を半透膜とした浸透圧であるのに対して膜質浸透圧は血管内皮細胞を半透膜とした浸透圧である。誤解を承知で単純化して言えば、細胞膜は水は通すが電解質や糖は物理的に通過しない。血管内皮細胞は水、電解質、糖は通すが蛋白質は通さない。従って晶質浸透圧は細胞内外の水の出入りを制御し、膜質浸透圧は血管内外の水の出入りを制御する。

### 2.2. 分子の大きさと電荷

筋肉毛細血管における透過性を分子量18の水を1として比較した場合、分子量65,000のヘモグロビンは0.01、分子量69,000のアルブミンは0.0001と分子量が近いにもかかわらずヘモグロビン透過性はアルブミンに比べて100倍も高い(Table 1)<sup>1,3)</sup>。Table 1 を対数軸を使って表すとFig. 2 となる。NaClからヘモグロビンまでは、透過性と分子量にはほぼ直線関係が得られるが、アルブミンは直線からはずれて極端に低い値となる。従ってアルブミンの血管透過性には別の因子を考慮する必要がある。Fig. 3 はアルブミンに対する各毛細血管壁の穴の相対的サイズをイラストで示す。6nmのアルブミンに対し筋肉毛細血管間隙は6-7nm、糸球体血管間隙は8nmであるが生理的状態ではアルブミンは糸球体血管外に

の物質輸送をここでは省き、血管内から血管外への物質輸送に焦点をあてる。水、酸素、二酸化炭素、アルコールなどは内皮細胞のどこからでも自由に通過し血管外へ出る。電解質や糖は内皮細胞間隙を通って血管外へ出るが、アルブミン等の大分子量物質は通常は内皮細胞間隙を通過できないためにplasmalemmal vesicleによる輸送またはvesicular channelを通って血管外へ出ると言われている。一方内臓の毛細血管はfenestraeといわれる60-80nmの穴を持ち<sup>2)</sup>、このfenestraeからも大分子量物質輸送が行われていると考えられている。

### 1.2. 内皮細胞の臓器特異性

毛細血管の内皮細胞はcontinuous capillary, fenestrated capillary, discontinuous capillary (sinusoid)の3種あると言われて

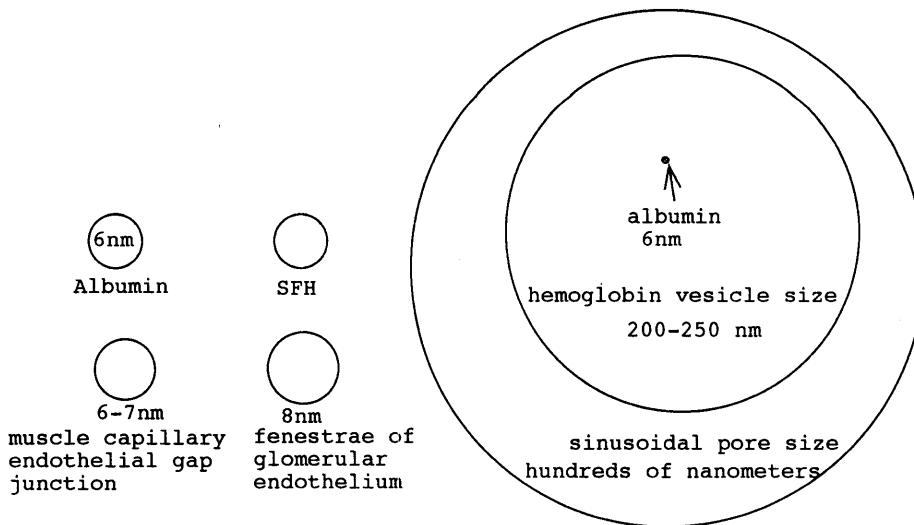


Fig. 3. Illustration of the sizes of various endothelial gap junctions, albumin, SFH, and hemoglobin vesicle<sup>1,2)</sup>.

漏出しない。糸球体血管間隙がアルブミンより大きいにもかかわらずアルブミンが漏出しないのは糸球体血管の基底膜のプロテオグリカンは非常に強い負電荷を帯びているのでアルブミンの負電荷と反発するためと言われている<sup>1)</sup>。ヘモグロビンがアルブミンと分子量が近いにも関わらず腎排泄が早いのはヘモグロビンが陽電荷を持つためと考えられる。ヘモグロビンは4量体で $\alpha$ ,  $\beta$ のそれぞれ2個のサブユニットからなる。Bunnはstroma free hemoglobin (SFH)の血中半減期が短いのは血中でSFHが2個に分かれ糸球体を通過してから再び4量体になると推測しているが<sup>2)</sup>根拠が明確でなく、また、Baxter Healthcare社の $\alpha$ 鎖分子内架橋ヘモグロビンは2個に分かれないとても関わらず血中半減期が4.3時間と短い<sup>3)</sup>のはやはりSFHが陽電荷をもつため糸球体からの排泄が速いためと考えられる。一方味の素社のpyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate (PHP)は分子量が大きいこともあるが、化学修飾の課程で陰電子を負荷することにより糸球体からの濾過率を減少させていると考えられる<sup>4)</sup>。しかし電荷に関しても臓器特異性が存在する。Glauserは中性と陰性荷電のデキストランを使った羊の実験で肺血管においては陰性荷電のデキストランが血管外に漏出しやすく肺毛細血管は陽性に帶電していると推測している<sup>5)</sup>。Brodyも陰性荷電のferritinが肺毛細血管を透過しやすいと報告している<sup>6)</sup>。Simionescuは膠質浸透圧の約1/3は電荷の影響があるとしている<sup>7)</sup>。一方肝臓のsinusoidの血管間隙は数百nmあり基底膜を欠くためアルブミンは無論のこと200nmのヘモグロビン小胞体さえも一部漏出すると考えられる。末松はヘモグロビン小胞体を用いた肝灌流実験で血管抵抗の若干の上昇を観察しているが<sup>8)</sup>これはヘモグロビン小胞体の類洞外への漏出を示している可能性がある。

### 3. 血管内皮細胞と修飾ヘモグロビン

#### 3.1. 内皮細胞由来血管弛緩因子(EDRF)とヘモグロビン

EDRFの主体はNOと考えて良いがNOの半減期が数十秒ときわめて短いのはヘモグロビンがNOを失活させるためである。内皮細胞で産成されたNOは血管外の平滑筋に作用し血管を弛緩させ

るが、もし血管外にヘモグロビンが存在するとNOとヘモグロビンの親和性は一酸化炭素の3,000倍と極めて高いために血管の弛緩が起らなくなる。SFHの投与で血圧の上昇が起こるのはこのためである。すなわちSFHが血管外へ漏出しEDRFであるNOを失活させ血管収縮がおこり血管抵抗が上昇し血圧が上がる。この血圧上昇を副作用としてではなく、治療に用いようとする試みが検討されているが、血管抵抗上昇による血圧上昇は血流の低下を招き末梢への酸素運搬効率が低下する。酸素運搬能を高めるために投与された人工血液が酸素運搬効率を低下させるのは治療目的に矛盾する。人工血液開発側の視点では、分子量を大きくしたり、電荷を調節することは腎臓からの排泄を遅らせ、半減期を長くする事に主眼があるよう見受けられるが、アルブミンや合成コロイドと違い、血管外へ漏出したヘモグロビンには体循環系への作用があり、しかもその作用が治療目的と相反する事を認識することは重要である。化学修飾により分子量を大きくした修飾ヘモグロビンは健常な毛細血管内皮細胞間隙においては透過しにくいが、血管透過性の増加した病態ではその透過性の検討は行われていない。

#### 3.2. 修飾ヘモグロビン

SFHは分子量65,000であるが腎臓からの排泄が早いため色々

Table 2. Molecular weight ranges of modified hemoglobins<sup>5,6)</sup>

Range of Molecular Weight	
SFH	65,000
Baxter Healthcare	65,000
Somatogen	65,000
Biopure	68,000-650,000
Northfield	64,000-400,000
Ajinomoto PHP	78,000-263,000

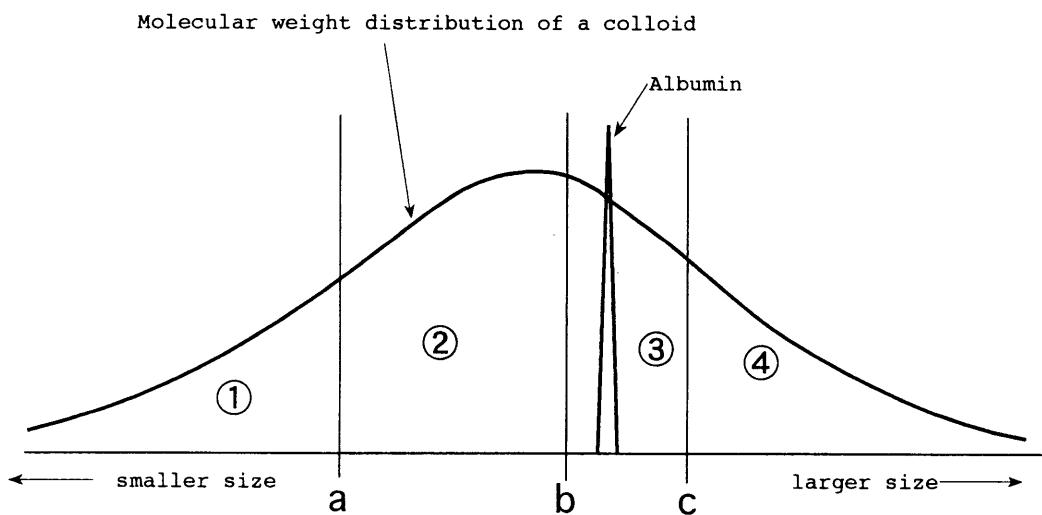


Fig. 4. Molecular weight distribution of a colloid and albumin. a, fractionating point of colloid osmometer; b, fractionating point of normal capillary endothelium; c, fractionating point of septic patient's capillary endothelium.

な化学修飾を施し分子量を大きくして腎からの排泄を遅らせていく。その結果血管透過性が低くなり、膠質浸透圧を生みコロイド溶液としての性質を持つこととなる。修飾ヘモグロビンは大きく分けて重合ヘモグロビン、分子内架橋ヘモグロビン、高分子結合ヘモグロビンの3種類に分けられる。Table 2に各社の修飾ヘモグロビンの分子量分布を示す<sup>5,6)</sup>。Baxter Healthcare社とSomatogen社の修飾ヘモグロビンは分子内架橋のため单一分子量であり分子量もSFHと変わらない。Biopure社とNorthfield社は分子間架橋重合ヘモグロビンのためつながるヘモグロビンの分子数により分子量分布が大きくなっている。味の素社のPHPはポリオキシエチレン鎖で修飾しているが2量体と3量体を含むため单一分子量ではない<sup>6)</sup>。

### 3.3. 分子量分布と平均分子量と半透膜

アルブミンは69,000の单一分子量であるが合成コロイドや修飾ヘモグロビンは分子量分布を持つ。溶液中の重量%が同一であれば、分子量が大きくなるほど粒子の数は少なくなるため膠質浸透圧への寄与は小さくなる。溶質の重さを粒子の数で割った単純平均が数平均分子量で、それに粒子一個の重さを加味した平均分子量が重量平均分子量である<sup>10,11)</sup>。数平均分子量は膠質浸透圧に関係し重量平均分子量は粘度に関係すると言われている。このように広い分子量分布をもつコロイドの膠質浸透圧測定にはその数値の評価には注意すべき点がいくつか存在する。分子量69,000のアルブミンを分画分子量30,000の半透膜(3万以上の分子量を持つ物質は透過しない)を用いて膠質浸透圧を測定した場合は膠質浸透圧は正確に測定できる。なぜなら3万以下のアルブミンは存在しないからである。ところが広い分子量分布を持つコロイドを測定する場合は全く異なる。Fig. 4に示すように膠質浸透圧計半透膜の分画分子量をPoint a、内皮細胞の分画分子量をPoint bとすると領域②+③+④の部分が膠質浸透圧計半透膜の浸透圧に関与するが、生体内での浸透圧に関与するのは領域③+④の部分である。さらに敗血症のように血管透過性の亢進した病態においては領域④のみが浸透圧に関与する<sup>11)</sup>。

### 3.4. 膜質浸透圧25mmHgの意味(生理と病理)

合成コロイドを含まない血清での膜質浸透圧25mmHgという表現は健常人であればある程度生体内での膜質浸透圧を反映していると考えられる。合成コロイドを直接測定した場合、膜質浸透圧25mmHgはその数値の解釈に注意を要する。現在信頼性の高いと言われているWescoe社の膜質浸透圧計は分画分子量が3万であり、測定値25mmHgはFig.4の領域②+③+④の合計であり、生体内では領域②の部分は浸透圧に関与しないため、実際の生体内での浸透圧はもっと低いと考えられる。また既述のように内皮細胞の臓器特異性により、脳では40mmHg、肝臓では0mmHgということも考えられる。さらに敗血症では15mmHgかもしれない。このように膜質浸透圧は測定膜、臓器、病態により異なるということを銘記すべきである。

### 3.5. 修飾ヘモグロビンの分子量下限は?

アルブミンを中心とした各種コロイドの数平均分子量と重量平

Table 3. Number average and Weight average molecular weight of various colloids

	Number average molecular weight	Weight average molecular weight
Dextran 40	25,000	40,000
Dextran 70	39,000	70,000
Hespander (Japan)	19,000	70,000
Hetastarch (USA)	70,000	450,000
Pentastarch	63,000	264,000
Pentafraction	120,000	280,000
Albumin	69,000	69,000
Hemoglobin	65,000	65,000
Ajinomoto PHP	90,000	(-)

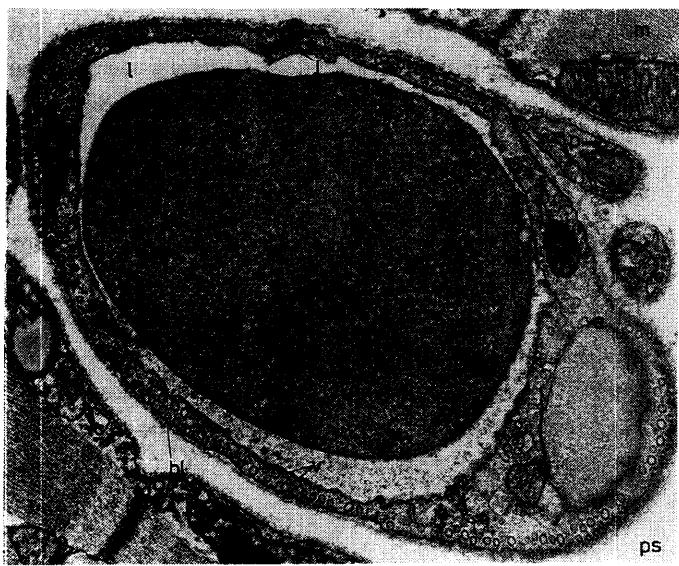


Fig. 5. Rat myocardium. Blood capillary made up of a single endothelial cell (e). bl, Basal lamina; j, endothelial junction; l, lumen; m, muscle; p, pericyte; ps, pericapillary space; rb, red blood cell; v, plasmalemmal vesicles ( $\times 34,000$ , from Simionescu<sup>2)</sup>).

均分子量をTable 3に示す。デキストラン70やヘスパンダーは日本でよく使われる代用血漿剤であるが、重量平均分子量はアルブミンとほぼ等価であるが数平均分子量はアルブミンと比べて極端に小さい。すなわちデキストラン70やヘスパンダーは小分子量成分を多く含むので単純平均である数平均分子量が小さくなる。従って血管外へ漏出する成分が多いことを表し、生体内での膠質浸透圧はかなり小さくなることを意味する。一方欧米で最もよく使われているハイドロキシエチルスターチであるヘタスターチは重量平均分子量が45万とかなり大きく、大分子量成分を多く含む。アルブミンもヘモグロビンも数平均分子量と重量平均分子量が等しく、单一分子量であることがわかる。味の素の高分子結合ヘモグロビンであるPHPは数平均分子量が9万であり重量平均分子量の記載がないがアルブミンより大きく、血管外漏出も少ないと思われる。ペントラクションはハイドロキシエチルスターチの一種であるが低分子量と高分子量の成分を除去した特殊なコロイドで、そのために数平均分子量が最も大きく、重量平均分子量と数平均分子量の格差が少なく、分子量分布が小さいことを表している。このコロイドは血管透過性の亢進した病態に対しても血管間隙をシールして、内因性のアルブミンの漏出を抑える効果があると言われている。このペントラクションに関する新しい知見が修飾ヘモグロビンの分子量決定に関連があると思われる。1988年にZikriaはラットの小腸の熱傷実験でハイドロキシエチルスターチの分子量を3群にわけてアルブミンの漏出実験を行った<sup>12)</sup>。Zikriaはsealing effectという言葉で10-30万の分子量を持つハイドロキシエチルスターチが内皮細胞間隙をシールして内因性のアルブミンの漏出を防ぐ作用を説明した。それより小さい分子は間質へ漏出し、それより大きい分子はローリングにより血液内

にとどまる。1992年Traberはエンドトキシンと肺リンパ流量の関係を血漿、ペントスター、ペントラクションで比較し、ペントラクションによる肺リンパ流量の著明な低下を認めたと報告した<sup>13)</sup>。ペントラクションはペントスターをdiafilterにかけ小分子と大分子を除去した製剤である。ペントスターは小分子量コロイドを含み血管外への漏出が多いと考えられる。ペントラクションがエンドトキシンにより透過性の亢進した肺毛細血管からの漏出を防いでいると推測している。このような知見は修飾ヘモグロビンの分子量下限の決定に示唆的な意味を持つ。ヘモグロビンの血管外漏出が血管収縮を起こすことを考えると、これをさけるためには少なくとも10-30万以上の分子量を持つ必要があると思われる。しかし血管内皮細胞間隙のsealing effectに関してはあくまで概念であり、形態学で証明されたわけでは無い。Permeabilityという語は物理学的なニュアンスを含むが、対象は生体であり、当然物質輸送には生体反応が関与する。血管内外の物質輸送に関する機構はtranscytosisと呼ばれFig.1に見られるようなvesicleやvesicular channelを介する物質輸送である。アルブミンの血管外への輸送はこうしたtranscytosisを介した輸送が主であり当然ヘモグロビンも同様のことが起こると思われる。Simionescuは電子顕微鏡によるすばらしい仕事を数多く残しているが、Fig.5にratの心筋内の毛細血管を示す<sup>2)</sup>。内皮細胞の細胞質内に多数のvesicleが認められ、この直径が約60nmである。アルブミンの直径が約6nmであることを考えると10倍の大きさである。Simionescuはこの本の中でvesicleやvesicular channel (Fig.1)を介するtranscytosisを受ける分子の範囲を2-30nm、分子量で~30万位としている。ZikriaとSimionescuの所見から判断すると修飾ヘモグロビンの下限分子量は30万、サイズは30nmが適当と考えられる。この範囲に属する修飾ヘモグロビンは無いが、分子間架橋型が最も有力な修飾であると思われる(Table 2)。

#### さいごに

酸素運搬体であるヘモグロビンはアルブミンと分子量が近いために修飾ヘモグロビン製剤はコロイド輸液としての性質も持ち血管内容量維持のためにも好都合である。しかしヘモグロビンの血管外漏出はEDRFとしてのNOを阻害し、血管収縮により組織での酸素供給に悪影響を及ぼす。小胞体ヘモグロビンはそのような修飾ヘモグロビンの問題点を解決しているように思われ、現時点では日本での開発研究が世界をリードしている。修飾ヘモグロビンも問題点を残しながらも今後の発展が期待できる領域である。将来的には小胞体ヘモグロビンと修飾ヘモグロビンの併用も魅力ある研究領域であるように思われる。

#### 参考文献

- Guyton AC. Textbook of Medical Physiology 8th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991;171-290.
- Simionescu M, Simionescu N. Ultrastructure of the microvascular wall: functional correlations. In: Renkin EM, Michel CC, eds. Handbook of Physiology. Sec. 2, Vol IV. Bethesda, Md.: American Physiological Society, 1984;41-101.
- Pappenheimer, JR. Passage of molecules through capillary walls. Physiol Rev 1953;33:387.

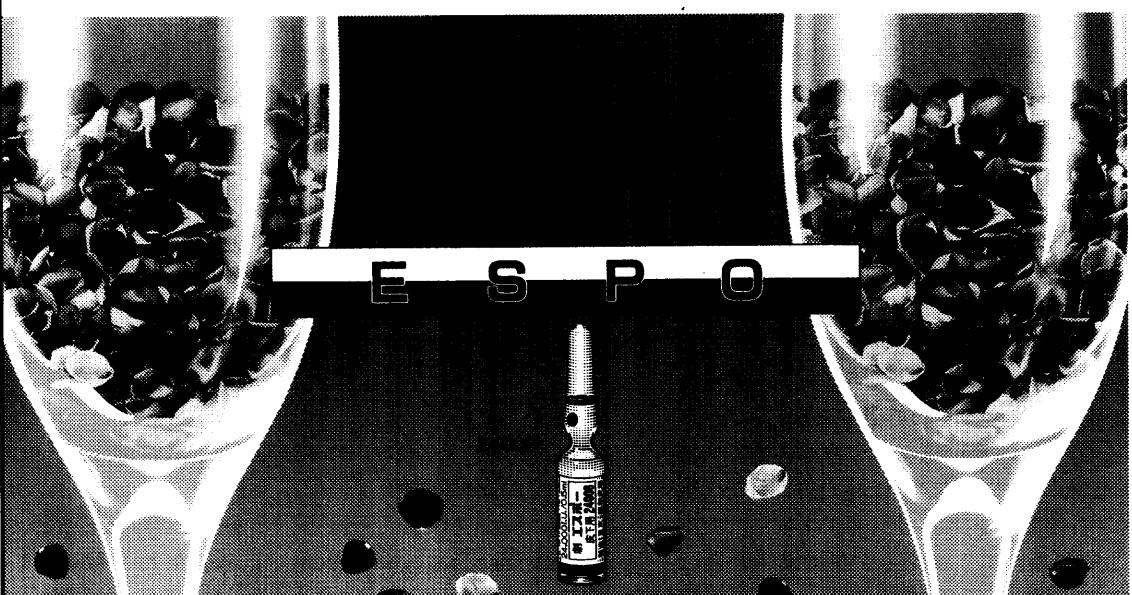
4. Bunn HF, Esham WT, Bull RW. The renal handling of hemoglobin. I. Glomerular Filtration. *J Exp Med* 1969;129:909-24
5. 仲井邦彦, 関口定美. ヘモグロビン化学修飾の開発と問題点. *日常診療と血液* 1994;4:13-9.
6. Iwashita Y. Pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate (PHP) as an oxygen carrier. *Artif Organs Today* 1991;1: 89-114.
7. Glauser FL, Fairman RP, Millen JE. Facilitated transport of anionic dextrans in the pulmonary microvasculature of normal sheep. *Microcirculation* 1982;2:305-13.
8. Brody JS, Vaccaro CA, Hill NS, Rounds S. Binding of charged ferritin to alveolar wall components and charge selectivity of macromolecular transport in permeability pulmonary edema in rats. *Circulation Research* 1984;55:155-67.
9. Suematsu M, Takeoka S, Wakabayashi H, Sakai H, Shinoda Y, Ishimura Y, Tsuchida E. Imaging analysis of NADH autofluorescence in Hb-vesicle-perfused rat hepatic microvascular units. Abstract of 24th Congress of the International Society of Blood Transfusion ISBT '96. 1996:192.
10. 森定雄. サイズ排除クロマトグラフィー—高分子の高速液体クロマトグラフィー. 東京:共立出版社, 1991:49.
11. 宮尾秀樹. 代用血漿輸液剤の現状と今後の展望. *臨床麻酔* 1994;18:1351-61.
12. Zikria BA, King TC, Stanford J. A biophysical approach to capillary permeability. *Surgery* 1988;105:625-31.
13. Traber LD, Brazeal BA, Schmitz M. Pentafraction reduces the lung lymph response after endotoxin administration in the ovine model. *Circulatory Shock* 1992;36:93-103.



**ヒト エリスロポエチン製剤**

# エスパー® 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** 一括率一

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下さい。

販売元・資料請求先  
三共株式会社  
〒100 東京都中央区日本橋本町二丁目  
製造元  
麒麟麦酒株式会社  
〒100 東京都中央区新川二丁目  
95 (貯)

# Frozen Platelets and Platelet Substitutes in Transfusion Medicineシンポジウム

池淵研二 北海道赤十字血液センター研究部

## はじめに

1996年3月7、8日米国メリーランド州ベセスダにてFrozen Platelets and Platelet Substitutes in Transfusion Medicineシンポジウムが開催された。この分野の仕事を始めたばかりであったが幸運にも出席することができ、多くの研究者の発表を聞く機会を得たので、この紙面をお借りして報告したいと思う。

### 1. 血小板代替物研究の始まり

今回のシンポジウムの会場が海軍病院に近接する一画で開催されたこと、初めの発表者がRutherford B海軍大佐で制服姿がきまっていたことが印象に残る。米国では1952年以来、軍関連血液プログラムが開始され、輸血用血液の確保、輸送、戦地での使用などの研究が開始された。血小板製剤に関して求められることは、軽いこと、保存がきくこと、保管および輸送が簡単であること、そして輸血に際して特別の処理をしないで済むこと、などと考えられていた。その方向性に従い血小板の凍結保存、凍結乾燥、固定血小板、血小板膜の利用などが検討され、今回発表された研究の歴史が理解できた。

### 2. 凍結血小板の機能評価

エール大学Sinder ELより凍結血小板の有効性を示すための各種の $in vitro$ および $in vivo$ 血小板機能検査について最近の考え方が解説された。血小板膜の安定性に関する指標のLDHはその他の指標との相関があまり良くない。CD62(GMP-140, P-selectin),  $\beta$ -Thromboglobulinが放出反応の指標として優れ、後者は代謝レベルの指標であるpHと良く相関する。また $pCO_2$ ,  $pO_2$ ,  $HCO_3$ の測定は保存24-48時間後のpHレベルを予想するのに良い指標となる。機能検査としてMorphology score, %HSR, 血小板凝集能などがあり、血小板が機能的膜安定性を保持していること、膜リガンドの状態、浸透圧制御の維持などを表す。血小板のマイクロパーティクル形成は最近同種免疫誘導に関与することが知られているが、血小板細胞骨格に関連しアクチンの変性蛋白であるsp-1, sp-2がこのマイクロパーティクルの成因と考えられる。他の $in vitro$ 検査には1-D, 2-Dゲルを用いた血小板蛋白の電気泳動、ミトコンドリアの検査などが知られるが、まだルーチン検査にはなっていない。凍結血小板は解凍後4時間が使用期限と考えられ、製剤の細菌感染も重要なテーマと考えられる。

$In vivo$ 検査にはインジウム-111, クロミウム-51による血小板ラベルが応用できるが、常に効果判定にはペア試験が行われるべき

である。また補正血小板増加率(CCI)も血小板回収率の指標となり、実際に出血が止まることも $in vivo$ での指標となる。

### 3. 血小板製剤のウィルス不活化

ニューヨーク血液センターHorowitz Bより血小板製剤のウィルス不活化的現状が講演された。ソラレン誘導体(AMT)と長波長紫外線(UVA)の組み合わせで次のような細菌、ウィルス、原虫の不活化(log)が得られる:

大腸菌	6.7
緑膿菌	6.9
fdファージ	7.3
R17ファージ	2.5
ネコ白血病ウィルス	5.1
VSV	6.5
sindbisウィルス	7.0
HIV(cell-free)	5.5
HIV(replicating in CEM cells)	5.5
HIV(latent)	4.5
トリパノソーマ原虫	6.0

活性化酸素のクエンチャーはタイプ1(superoxide, hydroperoxide, hydroxy radicalに対するもの: マンニトール, グルタチオン, グリセロール, SOD), タイプ2(1重項酸素に対するもの: トリプトファン, ヒスチジン, アザイド), 混合型(ルチン, トロロックス, quercetin)に大別されるが、ルチンをAMT, UVAの系に合わせると血小板機能が維持できる(コラーゲン凝集は $85\pm5\%$ , アラキドン酸, ADP凝集は $90\pm6\%$ )。

ソラレン誘導体はAmes試験から変異原性があることが知られているが、特殊なフィルター(C18フィルター)を通することで、除去可能であった。

血小板減少を誘導したウサギに輸血し出血時間の短縮が生じるか検討された:

	血小板数( $\times 10^9/L$ )	出血時間(秒)
コントロール	119	124
ソラレン処理血小板	121	105
輸血(-)	9	>600

以上、ソラレン誘導体、ルチン、UVA照射の組み合わせでHIVを含む各種ウィルスの不活化が得られ、かつ輸血合併症の他の成

因となる原虫の不活化にも役立つことが明らかになった。

Steritech社のCorash Lらはソラレンの100種類以上ある同族体のうちAMT, 8-MOP以上のウイルス不活化を誘導するS-59を用いて検討した。S-59はUVA照射によりウイルス核酸のクロスリンクを誘導する。ウイルス不活化の程度は以下の通りであった:

HIV(cell-free)	6.7 log
HIV(cell-associated)	6.6
Duck hepatitis B virus(DHBV)	6.8
Bovine viral diarrhea virus(BVDV)	6.5
Staphylococcus epidermidis	6.6
Klebsiella pneumonia	5.6

前骨髄球系細胞株OM-1にHIVゲノムをトランスフェクトしp24抗原を発現させた系では、その発現を不活化に要する濃度の1500倍低いレベルで抑制した。

血小板の*in vitro*凝集能は7日間の保存期間中維持された。血小板を脂質膜染色剤PKHでラベルしカニクイザルに輸血し*in vivo*での血小板の寿命を測定したところ:

	回収率(%)	血小板寿命(時間)
コントロール	82.6±15.2	103±19
処理血小板	77.8±16.4	99.2±30.4

とコントロール血小板と有意差が認められなかった。

ソラレンを用いたウイルス不活化法は他にLimitting dilution法で確認されるTリンパ球前駆細胞を5log以上失活させることも確認でき、免疫原性の抑制にも利用できることが報告された。

#### 4. 血小板機能検査機器

バージニア大学Carr MEより、*in vivo*の血小板機能を評価する系として出血時間がそれほど信頼性がないことから、より質的な血小板機能評価法を検討したことが報告された。血小板粘着能、血小板凝集能、フィルターを介する血流を血小板が停止させる系、*in vitro*クロット形成系、などが紹介された。

これまで行われてきたガラスピーズ粘着能試験はすたれ、ガラスファイバー、ダクロンファイバー、コラーゲンファイバーなどで構成されたフィルターを血小板あるいは全血が一定の圧負荷時に通過する様子を測定する系に置き換わりつつある。この系では時間ごとの血流量やフィルターが詰まるまでの時間が測定される。この方法は通常のIvy法に基づく出血時間より正常、異常血小板機能の差をみるのに優れており、Thrombotest 4000, Platelet Function Analyzer PFA 100TM Systemとして商品化されている。

血小板凝集能検査では最近、全血を用いた停滞ポイントフロー凝集法が注目されている。本法では血小板粘着能と凝集能を合わせて測定でき、糖尿病や末梢血管障害疾患での病的血小板凝集能亢進状態を検出できる。

止血を全体的にとらえる方法が開発され、流体相での凝固および血小板機能を合わせて見ることができる。トロンボエラストグラフィー(Tromboelastograph<sup>R</sup> Coagulation Analyzer [TEG]), SonoClot<sup>R</sup>分析器, Platelet-induced thrombin generation time (PITT), Haemostatometryなどが紹介されている。SonoClot<sup>R</sup>, Thromboelastograph<sup>R</sup>ではクロット形成とその後のクロットパターンが解析される。PITTでは動きのある表面への血小板の粘着および凝集が測定される。Haemostatometryでは一定の圧負荷時に*in vitro*で模擬的"血管"内を血液が流れ、"血管"に穴があけられた時

にそれを閉じるまでの時間が内圧の変化から計算される。本法では血流の停止によりクロット形成の程度も計算できる。

#### 5. 凍結保護剤の選択

Walter Reed陸軍研究所LaRussa TRVらにより血小板凍結に用いる凍結保護剤のいずれが解凍後の血小板機能を維持できるか、またそれを予想するのにどのアッセイ系がよいか、検討の結果が紹介された。凍結保護剤としてDMSO, グリセロール, D-グルコース、グリセロール/D-グルコース、1,2-プロパンディオール、エチレングリコール、PVP、デキストラン、ポリエチレングリコール、D-トレハロース、ペニクスターーチが検討された。HemodyneTM装置により血小板をトロンビン、カルシウムと反応させた時に生じる物理学的力、血小板収縮力が測定されたが、この量的指標は*in vivo*の血小板機能を見るための最も適切な*in vitro*機能検査と考えられる。また血小板凍結直前の血小板活性化は解凍後の血小板機能障害の成因となるため、解凍前の血小板P-セレクチンも測定した。また解凍後の血小板がトロンビンに反応してP-セレクチンを発現できるかどうかは血小板機能の維持の程度をみる指標になった。血小板平均体積(MPV)は血小板細胞骨格が凍結保護剤に影響されたか否かをみる指標になると考えられた。結果、3つの指標いずれでも5%DMSOによる血小板凍結が優れていることが明らかになった。

#### 6. 血小板細胞骨格の形態

ミネソタ大学White JGより血小板はアクチン、ミオシンと多くの修飾、制御蛋白で構成された筋肉細胞類似の細胞としてとらえられることが述べられた。安静時の血小板ではアクチンは一部がアセンブリーを生じているのみで、大部分は非構造マトリックスとして拡散して存在する。また短アクチンと膜アクチン骨格を構成するミオシンは構造編成され、GPIIb/IIIa受容体を細胞膜直下のタリンと膜貫通型に結合させ転位させる。すでにアセンブリーされたアクチンは新たなフィラメント形成を伴わず収縮でき、血小板内容物の放出に関与する。トロンビンや有効な活性化物質による刺激、障害血管や異物表面との接触などはフィラメントのアセンブリー状態を変化させ、血小板を粘着、収縮、放出へと導く。

#### 7. 血小板機能の光学的測定

FDAの生物製剤評価研究センターFratantoni JCより血小板浮遊液の示すスワーリング現象に関して知見が述べられた。ディスク状血小板は機能が高く、長く保存された血小板は細胞骨格変化を生じ球形となり機能が低下する。ディスク状血小板の割合を検査するためNAPSACがデザインされ、この装置は血小板のスワーリングを数値化でき、顕微鏡観察で求めたディスク状血小板比率と良く相關する。

#### 8. 血小板活性化のメカニズム

FDAのVostal Jより血小板活性化物質が血小板受容体に結合し、その刺激は主にG-蛋白を介してセカンドメッセンジャー酵素システムに伝達されることが解説された。これらはフォスフォリバーゼA<sub>2</sub>, D, Cなどを含んでいる。同時に負の調節としてアデニレート・サイクラーゼ系も存在する。セカンド・メッセンジャーの増加は続いて細胞内カルシウムの増加に関連した活性化経路を進行し、プロテインキナーゼCを介するリン酸化、細胞内骨格蛋白や膜フォスフォリピッドの再構成、含有顆粒の放出、新

たな膜抗原の発現、血小板凝集などを生じる。最近Rasとホモロジーを有する、G-蛋白特異的なチロシンキナーゼが細胞骨格アセンブリーの制御に重要であることが明らかになってきた。また膜インテグリンを介したシグナル伝達系が知られるようになった。

#### 9. GPIIb-IIIa, トロンビン受容体の機能的状態

テネシー大学Jennings LKより血小板の2つの重要な受容体に関する知見が報告された。血小板GPIIb-IIIaは構造上3つのタイプが活性化と平行して存在する:非活性化非占有、活性化非占有、活性化占有。アゴニストにより非活性化受容体は内部から外部に向かう構造変化により活性化タイプに変化し、リガンドが結合できるようになる。

#### 10. 血小板製剤の評価のための血小板標識法と動物モデル

オクラホマ大学Dale GLより動物モデルが紹介された。血小板とNHS-ビオチンを5分間反応させると、血小板の95%以上が染色でき、しかも機能上の変化は生じない。イヌの血小板をビオチンで標識しイヌに戻すことで血小板の寿命を測定すると、72時間後では標識血小板生存率が50%, 168時間後では0%であった。また脾臓を摘出したイヌでは標識血小板の寿命はやや延びた。イヌに腸骨動静脈シャントを形成し、この部位にできた血栓を観察する系で標識血小板の血栓形成に関する割合なども検討できる。チアゾールオレンジはRNAを染色できるが、例えばイヌにエリスロポエチンを投与したところ、血小板が増加しRNAを含有する血小板の割合が増え、血小板新生が誘導されていることが示された。

#### 11. 血小板減少症ウサギモデル

McMaster大学Blajchman MAよりニュージーランド白ウサギを用いたin vivoモデルが紹介され、種々の保存法による血小板機能の検定が行われた。ウサギに9.3Gyの放射線を照射し、ヤギ抗ウサギ血小板抗体を投与すると血小板数は常に $10 \times 10^9/L$ 以下になる。白血球は7日目より回復傾向を示すが、血小板減少は持続する。なんらかの処理を施したヒト血小板をウサギに投与しin vivoの評価をする時にはさらに、網内系をブロックするためエチル・パルミテート1g/kgを投与する。ヒト血小板の生体内半減期はこの系では4時間で、この間にアッセイする。ウサギの出血時間は耳を温め9mmの傷をつけ止血するまでの時間で評価する。

まず保存温度の検討では22°C保存に比べ、4°C保存では24時間までは止血時間は正常範囲内だが、48時間では延長した。22°C5-10日間保存の血小板はpHが6.4程度に低下しているが、このヒト血小板を輸血したウサギの出血時間は正常範囲内であった。しかし保存血小板はすぐに網内系に捕捉される傾向があった。凍結血小板は止血効果があり、凍結乾燥血小板は新鮮血小板の約1/4の機能を有していた(凍結乾燥血小板33.3単位は新鮮血小板8.3単位に相当)。またウイルス不活化処置(ソラレン、UVA照射)を行った血小板も止血効果を有していたが、UVAのエネルギーを2.4から7.2J/cm<sup>2</sup>に上げると出血時間は160秒から440秒に延長した。

ヒトアルブミンをクロスリンクし直径1.2μmのパーティクルを作製し表面にヒトフィブリノーゲンを共有結合させた血小板代替物(Thrombosphere)は、1回の投与で72時間までウサギの出血時間(800→200秒)、出血量を減少させることができた。

#### 12. PCPSリポソーム

IMMUNO AG社のSchwarz HPより凝固因子製剤としての高純度の精製β-Xa因子(FXa)と1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-

phosphocholine(PC),1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoserine(PS))で構成されたプロコアギュラント・フォスフォリピッド・リポソームの検討結果が報告された。

#### 13. 軍隊における凍結血小板の活用

ボストン大学海軍研究部のValeri CRらにより凍結血小板の輸血効果について、液状保存血小板との比較検討の結果が報告された。53例の心臓血管手術患者(弁置換を伴う心肺手術とその再手術)を2群に分け、6%DMSOで凍結した血小板と液状保存した血小板を輸血し、非手術出血量、他の赤血球および新鮮血漿輸血量を比較した。

輸血血小板	非手術出血量(ml)		他の輸血製剤(ml)
	RBC	FFP	
液状保存(n=29) (3.4±1.1days)	2548±1463	1693±936	722±726
凍結保存(n=24) (289±193days)	1755±693	945±526	350±478

以上のように凍結血小板の方が出血量を減少させたが、凍結血小板製剤中にマイクロパーティクルが多く存在することがその成因かもしれない。凍結血小板の回収率は-80°C保存で6ヶ月まで80%, 6ヶ月-2年70%, 2-3年70%と安定している。戦地にはドライアイスで輸送でき、22°C液状保存では5日間しか保存できないのに比べ利用価値が高い。

#### 14. 血小板凍結保存と自家血小板採取、保存

メリーランド大学Schiffer CAより5%DMSOでの凍結血小板の輸血効果に関して報告された。凍結血小板のin vivoの回収率は50%で止血効果がある。白血病患者で同種抗体感作された例で自家凍結血小板輸血の効果が認められ、これからますます増加する末梢血幹細胞移植例で、幹細胞採取時に自家血小板を採取すること、トロンボポエチンの利用で血小板が採取しやすくなることを考えると、利用価値が高まるだろう。

#### 15. 低温保存時の血小板細胞骨格の変化

ハーバード大学Hartwig LHにより低温保存時の血小板の内部構造の変化に関する知見が報告された。低温保存によりF-アクチンのアセンブリーが生じ血小板のディスク形態が保持できなくなる。安静時の血小板ではF-アクチンが高密度スペクトリンをベースにした膜骨格と固有の相互作用をしてディスク状形態にロックされている。膜骨格を裏打ちするフィラメントがCaを介する反応でフィラメント・フラグメント化すると膜骨格のロックがはずれる。安静時の細胞ではキャップされている有刺のフィラメント先端からキャップをはずされた時にアクチン・アッセンブリーは生じ、その先はフィラメントが延長する核となる。この過程は膜のPolyphosphoinositidesにより制御されている。低温保存は血小板のこのキャップをはずし、アクチン・フィラメントのアッセンブリーを誘導する。血小板を再び温めるとCa依存性のフラグメント化が生じ、血小板は球状変化し、ディスク状には戻らない。低温保存は細胞内Caを上昇させ膜リピッドの相変化を生じさせ、有刺フィラメントの先端のキャップをはずすので、サイトカラシンBとEGTA-AMによる細胞内Caのキレートが低温によるアクチンの再構築を抑制されると考えられる。この2つの薬剤の存在下で4°Cに冷却された血小板はディスク状を維持できる。37°Cに戻しサイトカラシンBを除き、mMオーダーのCaを添加し

細胞内キレート剤の作用を解除させると、血小板はトロンビン刺激に対する反応性を完全に回復する。これらの検討結果は低温による血小板活性化の機序を説明し、かつ低温による血小板保存の可能性を予想させる。

サイトカラシンBで処理した血小板の機能: EGTAの添加効果:

	%凝集能			
	1時間	24時間	7日	21日
(-)	100	28	0	0
20μM EGTA	92	95	83	78
40μM EGTA	92	87	92	77

#### 16. 輸血可能な凍結保護剤を用いた血小板凍結法

COBE社のAntwiler GDにより血小板凍結保護剤の調製法が述べられた。凍結保護剤AS-26は水が凍結する時の水素結合を置換するpolyols(グリセロール、マンニトール)と、ガラス転位温度を上昇させるためのポリマー(PVP)を含んでいる。この凍結保護剤の添加で血小板は-80°Cで凍結でき通常の電気冷凍庫で保存できる。

各種の血小板機能の比較:

	Day 1, 凍結前	解凍後
HSR(%)	85	44
pH	7.40	7.11
Morphology Score	308	213
凝集能(%) (ADP+Epi)	67	63
凝集能(%) (Col+Epi)	90	72
GMP(%)	11	89
%血小板回収率	100	94

この方法で調製した血小板について血小板減少症モデルウサギを用い止血効果を検討したが、液状保存血小板と匹敵する止血効果を示した。

#### 17. 血小板凍結保存剤としてのThromboSol

LifeCel社のConnor JらによりThromboSolを利用した血小板凍結法が報告された。血小板は生体中ではセカンド・メッセンジャーを介する活性化の抑制を受けている。この活性化の内因性抑制が血小板採取や保存により失われ、かつ凍結保存時の血小板障害を生じさせる。ThromboSolはこのセカンド・メッセンジャーを介する経路を刺激し、内因性活性化の抑制に似た状態を生み出す:

Amiloride; Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>exchange inhibitor

Adenosine; cAMP上昇

Na-Nitroprusside; cGMP上昇

各種の血小板in vitro機能を良好に保持する:

%HSR	59
Shape change	18.2
%Disc	66.4
GPIb(%)	85
GMP-140(%)	32.6

止血効果も良好に保たれる:

	血小板回収率(%)		出血時間(s)
	1hr	3hr	
新鮮血小板	100	100	148-131
6%DMSO保存血小板	56	25	280-374
ThromboSol保存血小板	77	64	171-184

解凍後保存した血小板でも機能が良好に保持される:

	保存1日	保存3日
細胞数(%)	91	90
%Disc	112	88
Shape change	92	89
%HSR	98	96
GPIb	100	100
GMP-140	100	100

以上ThromboSolを用いた血小板の凍結保存はin vitroおよびin vivoの血小板機能を保持できる。解凍後もそのまま5日間保存できる。またThromboSolは医薬品として既に認可されており、輸血時に洗浄する必要がないことは優れている。

#### 18. 凍結乾燥による血小板の保存法

カリフォルニア大学Crowe JHらにより血小板の凍結乾燥保存法が解説された。血小板の凍結乾燥過程における血小板への障害を検討する第1ステップとして、血小板の低温保存の障害の成因を検討したところ、血小板膜の脂質の相転換時の障害に相關することが明らかになった。リポソームを用いた系で抗凍結作用を有するグリコプロテインの作用を検討したところ、この蛋白は相転換時のフォスフォリピッド2層膜の安定化と透過性に関与することが示された。

#### 19. 凍結乾燥固定血小板の機能

ノースカロライナ大学Bode Aらにより固定した血小板の凍結乾燥品の血小板としての機能に関する報告がなされた。洗浄血小板を1.8%パラフォルムアルデヒドで60分間固定し、5%アルブミン存在下に凍結すると、再び水和させた後血小板としての形態と止血機能が温存できていることが明らかになった: 正常の形態、膜表面糖蛋白、リストセチン凝集(他のアゴニストによる凝集は欠如)、プロコアギュラント活性、ハイシアードでの血管内皮下組織への粘着、血栓生成部位への粘着に伴う形態変化、CD62/CD63発現、顆粒成分の放出、トロンボキサン生成など。

動物モデルに投与したところ、血管障害部位への集積、出血時間延長の矯正なども認められた。今後血小板製造過程での細菌、ウイルス感染の除去、反復投与時の免疫原性、毒性、副作用、製造できる量などの検討を要するが、将来有効な製剤になる可能性がある。

#### 20. トロンボエリスロサイト

マウントサイナイ大学Collar BSにより、特殊なトロンボエリスロサイトに関する検討が報告された。トロンボエリスロサイトは約106個のRGD配列を有するペプチドを赤血球膜表面に固相化した赤血球である。RGDペプチドの長さは活性化したGPIIb/IIIaのみに作用し、非活性化GPIIb/IIIaには影響しないように調節しておく(n=9が最適)。このトロンボエリスロサイトは血管障害を生じ、活性化された部位のみに集積できる。この製剤は粘着はできないが理論的には凝集を惹起でき、赤血球が有するADPを血小板

活性化物質として放出し、トロンビン生成に関する膜成分を有している。*in vitro*系ではトロンボエリスロサイトはコラーゲンに粘着した血小板と反応できることが示された。*in vivo*の血小板減少症モデル動物(カニクイザル)では2%量の製剤の輸血は出血時間延長を有意に短縮できなかった。ただし出血時間が血小板代替物の効果判定に最も有効な指標かいなかまだ明らかではないとも考えられる。

## 21. 血小板膜成分の製剤化

PRP社のSwisher Sにより輸血可能な血小板膜、IPM(Infusible Platelet Membrane)の性状、機能、*in vivo*投与成績が報告された。IPMはヒト血小板由来の製剤で、いくつかの構造、抗原蛋白を除去してあり、血小板第3因子、GPIb活性は温存してあるが、GPIIb/IIIa, factorV, VIII, IX, X、トロンボスpongine, セロトニンは除去されている。フォスフォリピッド含量はほぼ保たれている。大きさは約0.5μm。熱処理でウィルスの不活化を行い、SV40, BVD, HSV-1, HIV-1は60°C20時間の不活化処理で5-6log以上不活化してある。保存期間は36カ月と考えられている。

IPM(2mg/kg)はブスルファン投与で血小板減少を誘導したウサギの出血時間を著明に短縮し、輸血効果は約8時間持続し、反復投与も有効であった。

数種類の動物で急性、慢性毒性が調査され、生化学的および組織学的にも副作用は20-175mg/kg投与まで認められていない。またエンドトキシンでDICを誘導したウサギに投与し、状態を悪化することもなかった。

ヒトでの第1相臨床治験が22名のボランティアについて行われたが、6mg/kg投与まで特記すべき症状はなく、生化学的データも凝固データも変化がなかった。IPMに対する抗体形成の有無が15名のボランティアの協力のもと実施された。間隔を30日間あけた2回投与で、抗体、抗HLA抗体とも産生は認められなかった。

血小板減少症患者8例に投与され、うち6例に出血時間の短縮が得られ、その効果は投与後2-6時間持続した。現在血小板減少症患者に対する臨床第2相治験が行われている。

## 22. 血小板製剤の副作用を考える

オクラホマ大学George JNにより血小板製剤の考慮すべき副作用に関する考えが述べられた。1) 感染症副作用、2) 血小板代替物が全く機能を失っている場合、わずかに残存する患者血小板機能を抑制しないか、3) 血栓形成の副作用はないか。かつてプロトロンビン・コンプレックス凝固因子製剤としてフォスファチジルコリン/フォスファチジルセリン複合体が開発されたが、この製剤は血栓形成の副作用を有していた。これまでの検討では、血小板代替物として開発中の製剤では報告されていない。

## 23. 血小板製剤の信頼できる評価法

ジョージタウン大学Sandler SGより、今後の血小板代替物の開発と臨床評価をするうえで信頼できる検査項目について意見が述べられた。

1) 血小板減少症モデル動物: 放射線照射で血小板減少に陥った動物でのびまん性の出血傾向を感度よく見極めるには、リンパ液中の赤血球の存在を見る系が優れている。

2) 臨床例のシミュレーションとなる動物モデル: 化学療法惹起性血小板減少症および大量輸血に伴う希釈性血小板減少症。

3) ヒトでの臨床治験: 臨床の状態が均一でないので、ペアード検討することは難しい。そこで同一症例で新規の血小板製剤とFDA認可済みの血小板製剤をペアード比較する検討がよい。おわりに

関西空港から出発し、シンポジウム前日の20時にホテルに到着する予定であったが、あいにくのアメリカ東部の大雪でシカゴ空港に遅れて到着し、乗り換え便がさらに遅れ、結局寒波に見舞われたベセスダに深夜に到着した。翌日早朝から講演が始まり、眠気と時差ボケに耐え、なんとか努力して講演を聞いたが、午後の眠気はひどく集中力もとぎれとぎれであった。テープを取っていたのと抄録集が整っていたのでなんとか見聞録をまとめたが、数字については不確かな部分がかなりある。ただ血小板代替物の最新の情報をまとめられ、この領域の進展状況が私としてはかなり理解できた。興味のある読者は講演者の名前から原著を探しさらに情報をつかまえられることを期待する。

## 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ます。本誌への投稿者は本学会会員であることが望ましいが、投稿を希望する者は誰でも投稿することが出来る。原稿掲載の採否は編集委員会が決定する。原著論文について、他誌に既発表あるいは投稿中の論文は掲載しない。

### 執筆規定

DTP (Macintosh)による編集作業によつて作製するため、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(,)ビリオド(.)とする。
- 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbol フォントを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめること。
- 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μm, L, mL, μL, mol, g, mg, μg, ng, pg, fg, N/10などを用いる。
- 7) FigureとTable：引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は全て英文とすること。本文ハードコピー上に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。
- 8) 文献：本文に引用した順序に番号を付け、文中では(2), (3-5), (1, 4-6)などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名、論文題名、誌名、西暦発行年；巻数：

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

1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
2. 砂本順三、岩本 清. リポソームの調製. 野島庄七、砂本順三、井上圭三 編. リポソーム. 東京: 南江堂, 1988;21-40.
3. 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、あらかじめ版権所有者の許可を得ること。また、掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

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

### 編集委員会

●薄場 彰、柿崎 徹、武岡真司、仲井邦彦、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. 4 (2) 1996年5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