

## 目 次

# 人工血液

第5巻 第1号 1997年3月

総説 代用血漿剤 .....	高折益彦	1
血小板の低温保存 .....	丹羽光一	10
原著 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	14
出血性ショックモデルを用いた人工酸素運搬体,ヘモグロビン小胞体の酸素運搬能の検討 .....	吉津 晃	18

## Contents

# ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 5 No. 1 March, 1997

*Review:*

Plasma substitutes .....	Masuhiko Takaori	1
Cold preservation of platelets .....	Koichi Niwa	10

*Original Article:*

Establishment of rat model of high blood exchange by Neo Red Cell (NRC) .....	Naoyuki Yanagida	14
---	------------------	----

The oxygen transporting capability of hemoglobin vesicle, an artificial oxygen carrier, evaluated in a rat hemorrhagic shock model .....	Akira Yoshizu	18
--	---------------	----



日本赤十字社の血漿分画製剤は、善意の献血から創られています。

平成7年度 東京都内小・中学生「献血の絵」小学生低学年の部・金賞  
光塩女子学院初等科・3年 坂 真理子

日本赤十字社の  
血漿分画製剤

クロスエイトM250 クロスエイトM500 クロスエイトM1000  
赤十字アルブミン

日本赤十字社 〒105 東京都港区芝大門1-1-3

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

# 代用血漿剤

## Plasma Substitutes

高折益彦

Masuhiko Takaori

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剤を開発することが必要となろう。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をあらゆる出血治療に用いることには種々の問題がある。そのため現在まで各種人工血漿剤の開発が行われて来たが、未だ正常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。しかし代用血漿剤には救急治療における循環血液量改善面や経済性の面から明かにヒト血漿や血液に優れた点がある。その反面、大量使用に伴い血液凝固障害や組織沈着などが出現する。将来はこのような副作用の発現を最小限に抑え、より生理的なものの開発が望まれる。本稿においては現時点における代用血漿剤の臨床応用について検討し、代用血漿剤の理想像についても触れてみたい。

Body fluid circulation has preliminarily initiated from the lymph circulation and plasma circulation in the vascular system is an original form of the blood circulation. Therefore a development of good artificial blood should be sustained new development of adequate artificial colloid, i.e plasma substitute. In the present time, acute, massive hemorrhage can be treated to maintain human life by replacement of the circulating blood with plasma substitute until his hematocrit value falls down to a half of normal level. Contrary when his plasma volume would be reduced to 3/4 amount of the normal, his circulatory dynamics should be impaired crucially and his vital function could not be maintained. The plasma substitute is sometimes superior to homologous blood transfusion, specially for the treatment of acute, unexpected, massive hemorrhage. Therefore many artificial colloids were applied to manufacture plasma substitute for the past several decades. Nevertheless a few plasma substitutes, such as dextran, hydroxyethyl starch and modified gelatin, have been used in practice at present. However other many artificial colloids have been abandoned for medical use, because of their antigenicity, long termed tissue retention, red cell aggregation, hemostatic dysfunction and etc. In this paper, the author wishes to discuss the problems related to the complications and futurity of the plasma substitute in practice.

### 1. はじめに

体液循環の始まりはリンパ循環にあり、それによる組織必要代謝物の搬送効率を上げるために血液では特に酸素・炭酸ガス運搬を目的としてヘモシアニンのような物質が出現してきた。さらに高等動物ではヘモグロビンを含有する赤血球が出現した。しかし体液循環の基本はリンパ循環であり、血漿循環である。これが保たれることでたとえ生体は相当量の赤血球を失っても速やかに生活能力を失うことはない。逆に赤血球が保持されていても、血漿が減少した場合には血液粘度の上昇のため循環が保てなくなる。事実、出血により赤血球、血漿とも正常時の1/2に減少した際でも、血漿のみの補給により生体はそれが持つ代償機能を介してほとんど完全に近いほどそのすべての生体機能を維持することができる。そして血液内で容量的に占める割合からも血漿は血液量を維持する最も重要な構成成分である。このような血漿の重要性はすでに古くから知られていたが、以前は血漿を製品化する技術が不十分だったので、むしろそれに代わるべきもの、すなわち代用血漿剤、人工血漿膠質液の開発に目が向けられてきた。そし

て1950年代から1960年代に多くの代用血漿が使用されたが、その使用方法が不適切であったり、一部の製品においては十分な検討がなされないまま臨床応用されたため、その使用に伴う合併症を多く見るに至り、一般臨床医から疎まれる結果を生じた。そして近年のヒト血漿精製技術の進歩とともにヒト血漿そのものを用いる方向に進んだ。しかしその供給源は有限であるので、増強した経済力にものをいわせて我が国はその供給を諸外国からの輸入に委ね、世界各国のひんしゅくを招いた。一方、アルブミンは枯草菌を用いた遺伝子組み換え技術を用いた外生産を行うことも可能となったが、現在はもちろん、将来でもその生産量が臨床市場の要求を満足させるに至るか疑問が残っている。さらに人工コロイドのあるものは血管壁でのアルブミン透過性に対していわゆる sealing effectを有し、積極的にこれを利用使用しようとする考えも生じて来ている。本稿においては代用血漿剤のあるべき姿を前提に、あわせて今までに開発してきたものについての反省も述べてみたい。

### 2. 代用血漿剤の歴史

代用血漿剤は初めから臨床応用を目的に開発されたものではなく、すでに19世紀の基礎医学分野において臓器灌流実験にその必

川崎医科大学名誉教授, 〒701-01 岡山県倉敷市松島577.  
Professor Emeritus of Kawasaki Medical School, 577 Matsushima, Kurashiki,  
Okayama 701-01, Japan.

表1. 循環血液量増加を目的とした場合での代用血漿剤と保存血液の比較

	代用血漿	保存血
保存	室温	4℃冷蔵庫
使用に必要な検査	—	++
注入速度	大	小
保温ならびに加温	容易	困難
注入に伴う合併症		
代謝性アシドーシス	—	+
高K血症	—	+
静脈炎	—	+
クエン酸中毒	—	+
肺微小血栓症	—	+
感染症(肝炎・AIDS)	—	+
アレルギー反応	+	++
HLA不適合反応	—	+
末梢循環改善	+	—
出血傾向	++	+
血液酸素運搬能	—	+
経済性	低価格	高価格

要性が認められていた。すなわち臓器灌流を行うのにアラビヤゴムやゼラチンを生理食塩水に加えると灌流臓器の膨化が生じない(すなわち膠質浸透圧の必要性)ことから使用されていた。その臨床応用は第一次世界大戦の1915年にHoganによりゼラチンが循環血液量補給の目的で用いられ、それなりの効果が認められた。その2年後にHurwitzがアラビヤゴムを同様の目的に使用したが、副作用(赤血球の凝集)が著しく臨床応用は失敗した。次いで第二次世界大戦ではHechtがPVP(polyvinylpyrrolidone)を開発、使用した。これは戦後、我が国でも用いられた。その後、1945年にはGroenwallがデキストラン(以下Dx)が代用血漿として優れていることを認め、1950年からの朝鮮戦争で用いられた。一方1937年Terashimaは澱粉を動物実験で用いることを試み、後にWiedershaimが澱粉にhydroxylationを行い、血中のアミラーゼ作用を受け難くしたhydroxyethyl starch(以下HES)を開発した。そしてベトナム戦争の時期にBallingerらにより臨床に使用されるようになった。

このように代用血漿剤の開発と戦争とは深い係わりがあり、いかにこれが緊急時の循環血液の補いに役立つものであるか示している(表1)。しかしこの間代用血漿剤として表2に示される数多くの人工コロイドが開発、研究されて来たが、それらの中には臨床使用に耐えられないような欠点があり、その都度捨て去られて来たものもある。そのため現在用いられている代用血漿剤としては表3に示される3種類のものに留まっている。

### 3. 過去において問題となった諸点

#### 3.1. 細胞沈着

Vickery<sup>1)</sup>はDxを投与された患者の15人中4例で無尿症状を認め、組織学的には腎尿細管細胞が膨化し、尿細管管腔を圧迫・閉塞している像や、管腔内にDxの沈殿が生じ、これが管腔を閉塞している像を認めた(図1)。Rükhardtら<sup>2)</sup>はDxを投与した動物の肝臓では肝細胞に空胞様変性がみられることを指摘した(図2)。そし

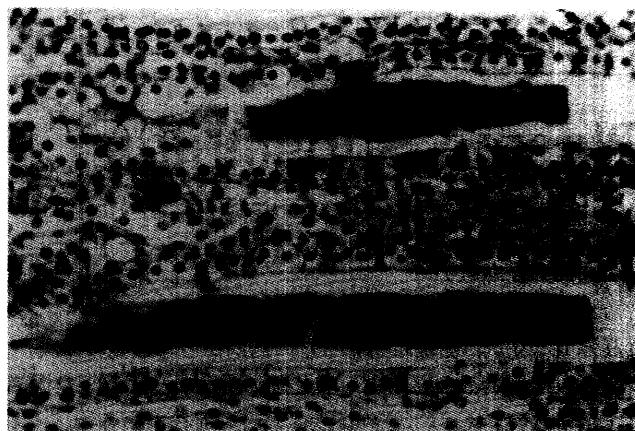


図1. デキストランを投与された後に見られた腎尿細管組織像  
(論文1より引用)

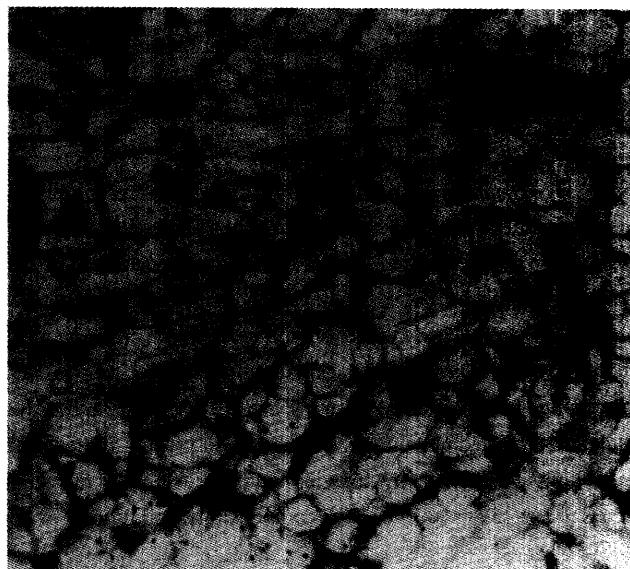


図2. デキストラン投与後に見られる肝細胞の空胞様変化  
(論文2より引用)

てその染色性から投与したDxが細胞内に沈着しているものと認めた。われわれも同様の現象をDxやHESの投与後12時間以内に摘出した動物の肝臓、腎臓で認めた。しかし1週間後の臓器ではその消失を認めた。またHESを投与した場合でも同様のことが観察された。組織沈着について最も注目を集めたのはPVPであった。Loefflerら<sup>3)</sup>は投与したPVPの1/3は組織沈着をおこすと報告した。同様な組織沈着はアルギン酸の場合にも認められ<sup>4)</sup>、そのためPVP、アルギン酸ともに臨床で用いられなくなった。

このような現象と関連してかってDx投与後の腎障害が外国においても<sup>5,6)</sup>、また我が国においても<sup>7)</sup>問題になった。これに対してMaillouxら<sup>8)</sup>は腎における再吸収率の亢進が障害をきたす原因であるとの仮説から一側の腎動脈に狭窄を作り、臨床にて観察された所見と同等の変化の作成に成功した。そしてDx投与に伴う腎変化は腎組織内での高浸透圧状態による変化に随伴した細尿管細胞変性(osmotic nephrosis)と結論付けた。しかし後にDiomiら<sup>9)</sup>はMaillouxらの実験を追試して、たしかに腎機能の低下は腎動脈に狭窄を作ることによって発生せしめるが、無尿を発生せしめる

表2. 現在までに開発された代用血漿剤

	臨床的価値 及び応用	
<b>A) 血液成分誘導体</b>		
(1) Hemoglobin .....	溶血により抽出したヘモグロビンを生理食塩水に溶解したもの。速やかにメトヘモグロビンへ移行するため効果少なし。腎障害あり。	(−)
(2) Modified Human Globin .....	溶血により赤血球内ヘモグロビンより抽出。ヒスタミンの遊離あり。血漿量保持能少ない。臨床例108例に使用す。	(−)
(3) Bovine Serum Albumin .....	臨床例410例に使用。12例にアナフィラキシー症状発現。	(−)
(4) Aminokrovin .....	排出胎盤血より得た血清を酸化加水分解する事により作り得るも製造再現性少なし。	(−)
(5) L 103 .....	動物血(馬・羊その他)の酸・加水分解物。	(−)
(6) Aminol .....	動物血の醜酵・加水分解物。	(−)
(7) Human Albumin .....	(代用血漿剤の範疇に入るか疑問)高価であることが一般の利用を妨げる。	(++)
(8) Human Plasma .....	(代用血漿剤の範疇に入るか疑問)血清肝炎ビールスの伝播度高い。	(++)
<b>B) 修正タンパク質</b>		
(1) Gelatin .....	牛・豚より製造する。室温においてゾル化。抗体産生あるもほとんど臨床的意味なし。	(+)
(2) Modified Fluid Gelatin .....	ゼラチンを加熱分解後、化学的再重合。室温においてゾル化しない。半減期5-6時間。	(+++)
(3) Oxypolygelatin .....	ゼラチンの過酸化水素酸化物。10-13℃にてゾル化。半減期4時間以内。赤血球泥化著明。	(+)
(4) Isinglass .....	鱈の浮袋のゼラチン成分の精製物。	(−)
(5) Casein .....	牛乳より抽出。抗原性大。	(−)
<b>C) 多糖類</b>		
(1) Acasia .....	アフリカアカシアの樹液より抽出。ヒスタミン遊離肝障害あり。	(−)
(2) Pectin .....	組織沈着。不十分な血漿量保持能。血管透過性亢進。	(−)
(3) Methylcellulose .....	組織沈着。出血傾向大。貧血誘発。低蛋白血症発生。	(−)
(4) Starch .....	高血糖。不十分な血漿量保持能。出血傾向。	(+)
(5) Hydroxyethyl Starch .....	とうもろこし澱粉中のsorghumstarchのグルコース環の6番目炭素にhydroxyethylationを行ったもの。デキストランの性質に殆ど同じ。	(+++)
(6) Dextran .....	大量使用に伴い出血傾向を生ず。低分子デキストランでは腎障害発生の可能性。	(+++)
(7) Hydrodextran .....	デキストラン分子末端をアルデハイド基に置換。高価(商品名Hydrox-Baker)。	(++)
(8) Levan .....	蔗糖にAerobacter Levanicumを働かせ生合成せしめる果糖重合体(MW 10-30×10 <sup>3</sup> )。生物・物理・化学的性質デキストランに類似。	(+++)
(9) Alginate .....	海水産褐藻細胞膜より精製。	(+++)
(10) Glucomer .....	グルコース重合体。血漿量保持能力不十分。	(−)
<b>D) 化学合成高分子</b>		
(1) Polyvinylpyrrolidone .....	ヒスタミン遊離の可能性(?)比較的高分子群抗体産生。組織沈着。	(++)
(2) Polyvinylalcohol .....	血漿量保持能はPVPに劣る。組織沈着あり。	(−)

(++)臨床的価値大(++)一般性少し(+)代用血漿剤として使用する事もできる(−)臨床応用なし

本表は高折益彦: 代用血漿剤とその使用法 災害医学 1968;11:728-41 より引用した。

表3. 現在使用されている主な代用血漿剤

	dextran	hydroxyethyl starch	modified fluid gelatin
構造	polysaccharide	polysaccharide	polypeptide
分子量	$60\text{-}75 \times 10^3$	$60\text{-}400 \times 10^3$	$30\text{-}40 \times 10^3$
溶解濃度	6%	6%	3-4%
製造	biosynthesis	sorghum starchにエチレン オキサイドを作用させる	ウシの軟骨ゼラチンを 分解後再重合
コロイド浸透圧(対血清)	1.65	—	2.15
絶対粘度(c.p.s. at 25°C)	2.56	2.21	2.15
抗原性	非定型的獲得免疫 (反応の発現はまれ)	未発見	未発見
自然加水分解	(+)	きわめて少ない	(-)
低温ゲル化	(-)	(-)	(+)
体内における代謝	25%完全代謝	0-50%	10%以内
排泄	60%以上尿中	90%以上尿中	90%以上尿中
フィブリノーゲンとの結合	(+)	(+)?	(-)
pinocytosis	(+)	(+)	(±)?
osmotic nephrosis	(+)	(+)	(±)?
intercompartmental fluid movement	(+)	(±)	(-)
血漿中濃度(half time)	5-12hrs	5-10hrs	3-4hrs

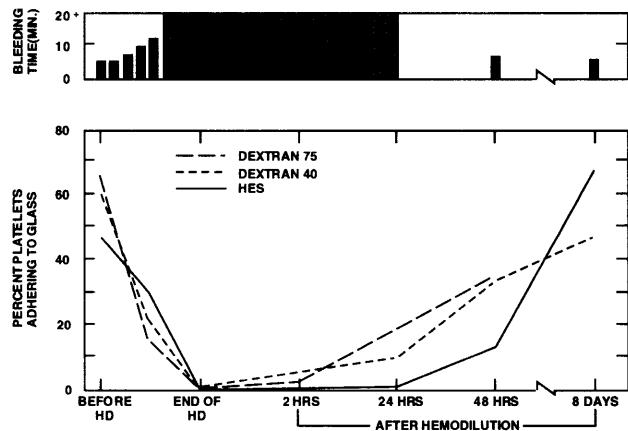


図3. 代用血漿投与後に見られる出血時間の延長と血小板付着能との関係(論文13より引用)

には至らなかったと報告している。とは言えDx, その他の代用血漿剤投与に伴う腎機能障害の予防には生体に十分の水分補給を行いうことが重要であると結論付けている。

### 3.2. 出血傾向

代用血漿剤投与にともなう止血機構の障害に関しては数多く報告されている。Horvathら<sup>10</sup>は修正ゼラチンはDxに比して止血機器への障害が少ないとしている。戸崎ら<sup>11</sup>は平均出血量730mLの臨床手術症例で出血量と等量のコハク酸橋修正ゼラチン液を投与し、臨床的には出血傾向を認めるることはなかったが、検査成績上では止血時間が2倍に、血小板付着能は投与前の73%に低下することを認めた。止血障害における血小板付着能の変化の重要性は古くはBloomら<sup>12</sup>、Lewisら<sup>13</sup>(図3)、Bygdemann<sup>14</sup>、その後Bennettら<sup>15</sup>によっても指摘されたところである。そしてAbergら<sup>16</sup>はDx



図4. 凝血塊中フィブリン塊内に見られる代用血漿凝固物(論文17より引用)

が血小板-第VIII因子との結合を阻止し、これが血小板付着能の低下原因であると結論付けた。しかし実際の臨床の場において代用血漿を使用した際にしばしば指摘される出血傾向には種々の因子が関与する(表4)。たとえば図4に示されるように凝固にともなうフィブリン形成にあたり、その中にDx分子が封入されているために凝血塊が非常に脆くなることも一因となっている。

表4. 代用血漿投与に伴う出血量増加に関する因子

血液希釈に伴う凝固因子希釈
血小板付着能の障害
fibrinogen分子とコロイド分子との反応
fibrin内へのコロイド封埋による血餅脆弱化
凝血塊内の赤血球量減少による血餅脆弱化
末梢血管拡張
毛細血管収縮性変化(内皮細胞表面変化)
微小血管内血液量増加
静脈圧上昇
リンパ流増加による局所血液希釈

### 3.3. 循環血液量の增量、維持効果

代用血漿剤を投与した際の循環血液量の增量効果はその代用血漿コロイドの膠質浸透圧に依存している。そしてその膠質浸透圧はその膠質分子の形状にも関係するものの、一般的には分子量が低下すれば大となる。そして血漿膠質浸透圧が大となれば組織液を血管外から血管内に導入して血液量を増量せしめる。これに反し循環血液量維持効果はその膠質分子の血管透過性(血管外の組織間液腔への移行、腎からの尿中への排泄)に関係し、これも分子の形状に影響されるものの分子量が大となれば一般的に血管外移行は少なく、血液量維持効果は大となる。しかしながらかかる代用血漿分子もそれが永久に血管内に滞留することは望まれないので、どの程度をもって最適とするか現在まで代用血漿剤開発に当たり論議、検討されてきたところである。

我々の雑種成犬を対象とした血液希釈実験ではDx40(平均分子量40,000)、またはHES450(平均分子量450,000)とを用いて等量血

液交換を行い、対象動物の血液ヘマトクリット値を10%に低下させた場合にDx40、HES450とともに組織間腔のみならず、細胞内腔からも水分を血管内に導入していることが認められ、それにともない血液量の增加が、とくにDx40では著しいことが認められた<sup>18)</sup>。しかしDxによる血液希釈では、その24時間後ではむしろ血液量が減少していて、循環血液量維持の面ではHESに劣っていることが認められた(表5)。一般に分子量が小となれば、一過性の血液量増加は大となるものの、その持続時間は短縮される(図5)。ただしこれ以外に分子の立体構造上の空間的サイズ、ならびにその形状にも影響される。たとえばDxとHESとを比較した場合、その循環血液量增量効果、維持効果においてはDxの分子量75,000に相当するHESの分子量は400,000~450,000となる。また代用血漿の投与を受ける生体の体液分布状況にも影響を受ける。すなわち生体が脱水状況にある場合には循環血液量増加の割合は少ない(図6)。

さらに動物実験でみられる血液量増加の程度と臨床の場において同一代用血漿剤を用いた場合での血液量増加の程度とは異なることがある(表6)。その原因は明かではないが、代用血漿剤と同時に投与された輸液の影響、代用血漿剤の限定された使用量などが関係しているものと推測される。

### 3.4. 免疫反応

代用血漿剤として用いられるものは膠質物質であること、すなわち比較的高分子であることから代用血漿剤としての使用後に抗体産生を来たすものがある。あるいはその抗体が正常健康人に既存しているものさえある。そのため投与直後、あるいは再度投与時の抗原・抗体反応のために臨床使用に至らなかつたものも多かった。表7はRing、Messmer<sup>19)</sup>の調査結果を引用したものであるが、この表に見られるように炭化水素系の人工コロイド、Dx、

表5. デキストラン40、HES450を用いて等量置換による血液希釈を行った際の各体液分画量の変動(論文8より引用)

Factor	Substitute	Stage				
		1	2	3	4	5
Plasma volume (mL/kg)	Dextran 40	55 ± 2	122 ± 5	98 ± 8	70 ± 2	62 ± 4
	HES	49 ± 2	98 ± 4	87 ± 3	73 ± 3	69 ± 7
Hematocrit (%)	Dextran 40	40 ± 1	10 ± 0	12 ± 1	17 ± 1	23 ± 1
	HES	43 ± 2	9 ± 1	11 ± 1	13 ± 1	17 ± 2
Volume of erythrocyte mass (mL/kg)	Dextran 40	33 ± 2	13 ± 1	13 ± 1	15 ± 1	18 ± 1
	HES	35 ± 2	10 ± 1	10 ± 1	11 ± 1	13 ± 1
TBV (mL/kg)	Dextran 40	84 ± 3	134 ± 6	109 ± 8	83 ± 3	78 ± 5
	HES	79 ± 3	107 ± 4	97 ± 3	83 ± 3	81 ± 7
CBV (mL/kg)	Dextran 40	19.6 ± 0.3	22.9 ± 2.0	19.5 ± 2.4	17.8 ± 1.6	15.6 ± 1.7
	HES	16.6 ± 0.3	16.4 ± 0.9	15.5 ± 1.4	17.0 ± 0.7	17.3 ± 1.5
CBV/TBV (ratio)	Dextran 40	0.22	0.17	0.18	0.21	0.20
	HES	0.20	0.15	0.16	0.20	0.21
Extracellular fluid volume (mL/kg)	Dextran 40	195 ± 14	246 ± 12	237 ± 6	242 ± 16	210 ± 14
	HES	174 ± 6	240 ± 7	231 ± 11	216 ± 12	210 ± 22
Interstitial fluid volume (mL/kg)	Dextran 40	140 ± 16	124 ± 9	139 ± 8	172 ± 13	148 ± 14
	HES	125 ± 7	142 ± 10	144 ± 9	143 ± 9	141 ± 18

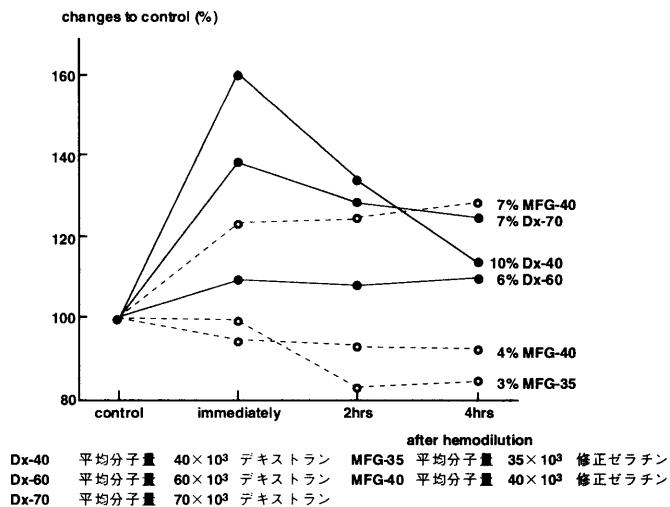


図5. 分子量の異なる各種代用血漿剤を用いて血液希釈を行った際の循環血液量の経時的变化

HESに比較してゼラチンを基材としたペプタイド型のものでは発生率が高く、かつ重篤なものも見られる<sup>20)</sup>。HESとDxでの発生率には大きな差が認められない。また欧米人と日本人とには多少差が認められ、後者での発生率が少ない<sup>21)</sup>。またDxに対する抗体の保有率(スウェーデン、ノルウェー人を除く)においても低率である<sup>21)</sup>。しかしこのような反応は低分子分画(1,000 Dalton)のDxの前投与によって防止することが可能である<sup>21)</sup>。

### 3.5. 血液粘度変化

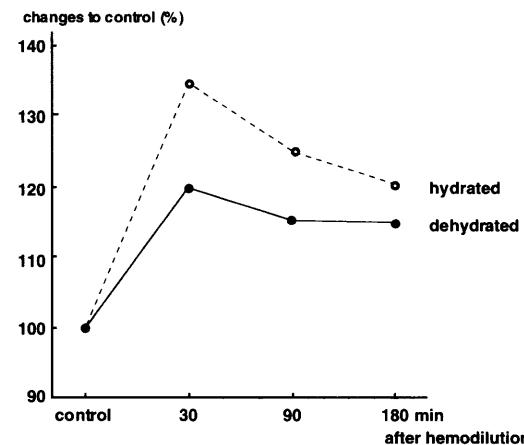
代用血漿剤の粘度は一般に正常血漿の粘度よりも高い<sup>22)</sup>(表8)。しかし実地臨床において代用血漿剤を使用する際は血液希釈をともなうため、使用後の血液粘度は低下する(図7)。そのため末梢血管抵抗が減少し、心拍出量が増加する。これが出血に対してヘモグロビンを含有しない代用血漿剤を使用しても末梢組織への酸素供給を維持する機構となっている。したがって使用する代用血漿剤の粘度が高い場合には予想される心拍出量の増加が期待できず、末梢組織への酸素供給が不完全となることがある<sup>23)</sup>。

### 3.6. 蛋白合成抑制

代用血漿剤の投与にともない肝における蛋白合成が抑制される。すなわちDx投与によって血漿アルブミン合成が抑制される事実がある<sup>24)</sup>。また高単位の $\gamma$ -グロブリンを投与することによってアルブミン合成が抑制されることは以前から認められている<sup>25)</sup>。投与したDxが肝のミクロゾームに付着してアルブミン合成を抑制する可能性もあるが、Rothschildら<sup>25)</sup>が行ったミクロゾームへのleucine取り込み状態を観察したin vitroでの研究ではデキストランそのものによる蛋白合成の抑制ではなく、Dx投与時に見られるアルブミン合成の抑制は血漿の膠質浸透圧上昇によるものと解釈されている。

### 3.7. 網内系機能

Vickery<sup>1)</sup>、Rückhardt<sup>26)</sup>らが観察した人工コロイドの組織沈着は



動物は4日間の飲水制限を受け体重において4%の減少を示していた。

### 図6. 脱水状態にある動物で血液希釈を行った際の循環血液量変化

個々の細胞のpinocytosisによるものであるが、この現象はとくに網内系において著明に認められる。すなわち代用血漿を投与した場合、生体の各部の網内系が代用血漿のコロイドを先に摂取しているために、その後に摂取すべき異物に対する摂取能力の低下が予想される。すなわちSchildt<sup>27)</sup>らの研究でもin vitroでの肝組織による<sup>125</sup>I標識アルブミンの巨大凝集塊捕捉・摂取能は、種々の代用血漿剤に対して肝組織を暴露させると表9に示されるように肝の網内系としての機能の低下が認められる。さらに異種動物の赤血球(図8)、エンドトキシンのin vivoでの捕捉・摂取実験でも代用血漿剤投与後においては網内系の異物除去能力の低下が認められる。

さらにLohnborgら<sup>28)</sup>は胆囊摘出術を受ける患者を対象にして、手術直前に500mLのDxを投与して、これが患者の網内系機能にいかに影響するか、<sup>125</sup>I標識アルブミンの巨大凝集塊摂取能から検討した。その結果Dxの術前投与は明かにアルブミン巨大凝集塊摂取率を低下させた。しかしその低下率が対象群の92.5%であったことから、この影響が臨床的に考慮しなければならないものかどうかは疑問であるとしている。

## 4. 代用血漿剤の臨床使用目的

### 4.1. 血漿量の増加

血漿量を増大させる必要性がある場合は、それによって血液量も増大させることを目的とする場合が多い。すなわち出血による絶対的乏血状態(absolute hypovolemia)の改善、あるいは血管床の拡張に伴う相対的乏血状態の改善、たとえばアナフィラキシー・ショック、敗血症性ショック、あるいは脊椎麻酔、硬膜外麻酔による低血圧状態の改善に用いることが多い。しかし絶対的に血漿量が減少し、いわゆる血液濃縮を来たした場合に用いることもある。その典型的な場合として熱傷がある。また最近では晶質液と赤血球濃厚液にて出血性ショックの急場を凌いだ症例などに用いることがある。さらに血漿交換の後に用いる場合もある。

### 4.2. 末梢組織血流改善

末梢組織での血流改善は次の機序から得られる。

(a) 心拍出量の増加に伴う末梢微小循環血流量の増加  
 (b) 血液希釈に伴う血液粘度の低下  
 (c) 代用血漿コロイドによる赤血球凝集の解除(disaggregation)  
 (a) に関しては一定の限度までしか期待出来ない。たしかに臓器全体としての血流量は心拍出量の増加に応じて増加するものの、毛細血管での血流増加は正常状態の120-150%を得るに止まる。すなわち残りは全て動脈短絡血行を介して流出するためである。

(b) に関する効果は最も大きい。すなわち血液粘度(V)を決定する最大因子は赤血球の濃度、すなわち血液ヘマトクリット値(Ht)であって、

$$V = C \cdot e^{-\frac{100}{100-Ht}}$$

の式で表されるごとく、Htが60%以上になるとVの著しい上昇を来たす。これに反しHtが20%になると、Htが50%のときの1/2以

表6. 臨床で代用血漿剤を用いて血液希釈を行ったときの循環血流量変化

膠質液		希釈率	血液量変化率
6%デキストラン-70	5%ブドウ糖液	0.48	0.91
"	saline	0.47	0.97
"	"	0.54	0.96
"	乳酸リンゲル	0.50	1.04
10%デキストラン-40	saline	0.25	1.59
"	乳酸リンゲル	0.51	1.26
4%修正ゼラチン-40	saline	0.42	0.93

表7. 代用血漿剤使用に伴うアナフィラキシー様反応発現率  
 (論文19より引用)

colloid	infusions registered (1975)	No. of anaphylactoid reactions	incidence (%)
plasma protein:			
serum solutions	25582	5	0.019
human serum albumin	60048	7	0.011
total	85630	12	0.014
dextran*:			
dextran-60/75	34621	24	0.069
dextran-40	51261	4	0.007
total	85882	28	0.032
gelatin:			
urea-linked gelatin	6151	9	0.146
oxypolygelatin	810	2	0.617
modified fluid gel	6028	4	0.066
total	12989	15	0.115
starch:			
hydroxyethyl starch	16405	14	0.085
total	200906	69	0.033

\* includes dextran from 5 manufacturers.

下となる。そのため最も血管抵抗が大である毛細血管を血液が臓器血流量に応じて大量に流れることになる。ただしこの式にても示されよう、Htが0%に近づいたときには血液粘度は血漿の粘度(C)の影響を強く受けることになるので、使用する代用血漿剤の粘度も考慮することが必要となる。すなわち低分子コロイド剤の使用が血流増加を助けることになる。

(c) に関しては一般的にコロイドの分子量が低くなるにしたがって、その表面荷電はマイナスとなり、このコロイドが赤血球の表面に付着した際にも赤血球の表面荷電を変化させない。そのため血液pHの変化や血液内に放出された種々の代謝物質により赤血球が凝集した状態にこのようなコロイドを加えることにより赤血球の凝集を解除する(disaggregation)ことが出来る。すなわち各種ショック状態時の末梢微小血管内での赤血球の泥化現象改善に低分子Dxが用いられる。

#### 4.3. 血液膠質浸透圧の上昇

現在使用されている代用血漿剤の膠質浸透圧は正常血漿の膠質浸透圧よりも高い。このような高浸透圧液を注入することにより、組織の水分を血管内に誘導することが出来る。たとえば肺水腫の改善に使用されたり、臓器移植の際に組織浮腫の防止に用いられる。しかし時間経過とともに使用したコロイドの小分子分画が組織間質内、さらには細胞内にも浸潤するため、in vivoで使用する際には同時に利尿薬を併用して、速やかにこのコロイド小分子分画を体外に排泄させることが必要となる。

#### 4.4. 抗凝固作用の応用

すでに前項にて述べたごとく、代用血漿剤は多かれ少なかれ抗凝固作用を有する。そのためこの性質を利用して、術後の血管内血栓形成の予防、脳梗塞の予防・治療に用いられる。また微小血管吻合術の際の血栓形成防止に用いられる。

#### 5. 代用血漿剤として必要な条件

生理的な血漿の有する意義、役割は多い。これらの総てについて人工膠質を代替物として働くことは実際問題として困難である。現段階で代用血漿として用いる人工膠質に期待しているこ

表8. 代用血漿剤の固有粘度—血漿、電解質液との比較  
 (論文22より引用)

	粘度 (C.P.S.) at 37°C
蒸留水	0.700±0.002
生理食塩水	0.712±0.001
1 % 修正ゼラチン液	0.964±0.000
血漿	1.354±0.114
4 % 修正ゼラチン液	1.723±0.001
6 % デキストラン70液	2.057±0.002
6 % HES-100液	2.208±0.002
10% デキストラン40液	2.930±4.005

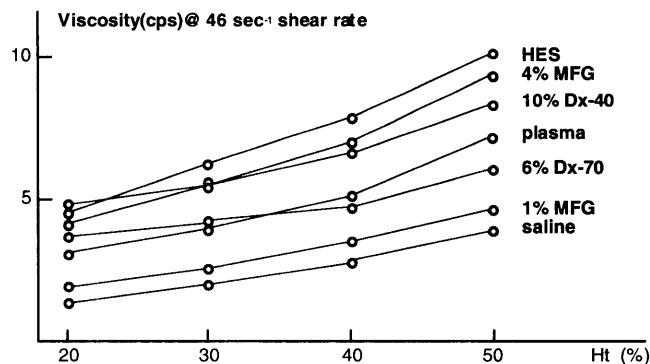


図7. 血液希釈に伴う血液粘度の変化(論文22より引用)

表9. 代用血漿投与後に見られる網内系機能低下—<sup>125</sup>I標識アルブミン巨大凝集塊捕捉能による(論文27より引用)

Substance <sup>a</sup>	cpm/cpm in controls
Dextran 40	1.0
Dextran 70	1.4
Hydroxyethyl starch	1.6
Gelatin	1.7
PVP	1.8
Plasma	4.1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: specified in Table 1; 0.2ml plasma from infused animals was added to the incubation medium of 2.8ml.

<sup>b</sup>: significantly different from controls.

表10. 代用血漿剤として臨床において用いられる膠質物の条件

1. 適当な膠質浸透圧を有すること
2. 適当な粘度を有すること
3. 適当の血管内滞留時間を有すること
4. 組織沈着を生じないこと
5. 抗体産生を認めないこと
6. 心肺、肝、腎、止血機能を障害しないこと
7. 製造方法が一定し、滅菌操作が容易であること
8. 熱に安定、自然変成がないこと

とは

(1)水溶液としたとき生理的なコロイド浸透圧を生じ、それによって血管内で血漿量を十分維持出来ることが第一である。しかし前述したごとく過去に代用血漿剤として臨床応用が試みられたが、その副作用、合併症から放棄されてきたものが多かった例にかんがみ以下の諸条件を満足することが必要である。すなわち

(2)適当な粘度を有することである。高粘度である場合には、その使用量が多くなるに従ってその代用血漿剤を注入された生体の血液粘度も次第に上昇し、それによって微小血管での血流抵抗が増加し、ひいては心拍出量を減少させる。これに反し、使用する代用血漿剤の粘度が低く、注入された生体の血液粘度が低下する場合には心拍出量を増加させるが、細動脈と細静脈とを連絡する短絡血行路が開通し、栄養血管としての毛細血管での血流の増加が期待できず、末梢組織への酸素運搬に支障を来たすことにも成

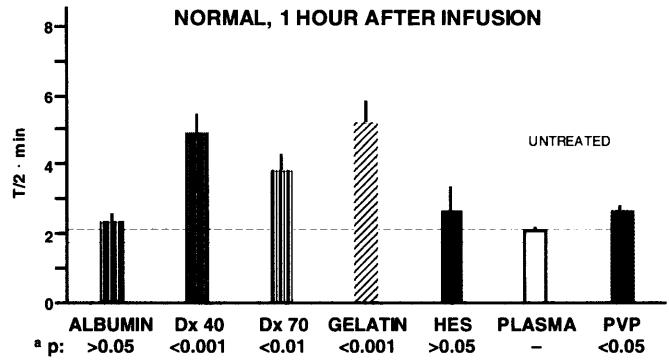


図8. 代用血漿投与後に見られる網内系機能の変化—異種赤血球摂取能の変化(論文27より引用)

りかねない。一方、心臓の仕事量は増加するにもかかわらず大動脈の冠動脈開口部での拡張期圧が低下するため十分な心筋内血量が得られず、心筋酸素不足状態から心不全を招来る。

(3)適当な血管内滞留時間を持つことも大切である。すでに述べたように長時間の血管内貯留は肝におけるアルブミン合成を抑制するし、網内系でのpinocytosisを増加させ、人工コロイドの体内蓄積を増加させるので好ましくない。また逆にあまりにも速やかな血管外排出は期待する血漿量増加が得られず治療目的にそぐわないばかりか、組織浮腫の原因となりうる。実際臨床において最適の血管内停滞時間は症例、症例によりことなるが一般にはそのコロイドの血中半減時間が6-12時間とされている。

(4)組織沈着を生じることも必要である。人工コロイドである限りpinocytosisは必ず受けるが、それがexocytosisの形にて細胞外に排出されることが必要である。かつて使用されたpolyvinylpyrrolidoneのごとく、細胞内蛋白と結合して細胞外への排出が起らなかった例など代用血漿としての適合性に欠けている。

(5)抗体産生がないことも重要である。動物組織から得られた人工コロイドはほとんど蛋白、もしくはペプタイドを含有し、そのため多くは生体に抗体を産生させ、臨床使用に耐えられなかつた。代用血漿剤は単回使用ではないことを考えれば当然のことと言える。

(6)心肺、肝、腎、止血機能に障害を及ぼさないこと、なども当然代用血漿剤に課せられる必要条件と言えよう。

(7)代用血漿コロイド液の工業生産が容易であり、とりわけ滅菌操作が容易であることも必要となり、とりわけ熱に対して安定していることが望ましい。そして

(10)溶液状態で自然変性がないことも必要である。

このような条件をふまえて、今日、使用されている代用血漿はDx, HES そして修正ゼラチンの3種類に限定されている(表3)。

## 6. 代用血漿の有効な使用

代用血漿はあくまで生理的な血漿の代替物である。しかし表1に示すように予想せざる出血に対して緊急的に用いる場合にはむしろ血液よりも治療効果を増大させる。また毛細血管壁におけるsealing effectの有効性も指摘されている。さらに代用血漿の経済

性においては血漿、アルブミン、そして献血にて得られる同種血液に対して優れている。ただし酸素運搬能の欠如の点、出血傾向発生などの問題点もあり、これらの欠点は極力抑えて行かなければならぬ。すなわち代用血漿の性格を正しく認識して、その使用適応においても、またその使用量においても適切に使用することが要求される。

## 7. おわりに

以上、本稿においては代用血漿剤の薬物的特長について述べ、代用血漿剤の欠点、そして臨床使用への応用範囲などについて述べてきた。特に代用血漿使用にともなう生体機能への影響を中心に述べた。本来ならば種々の臨床応用に関する引用文献も提示すべきではあったが、時代的にもかなり古いものも多く、紙面数の関係もあり割愛したことをお詫びしたい。

## 参考文献

1. Vickery AL. The fate of dextran in tissues of the acutely wounded: A study of the histologic localization of dextran in tissue of Korean battle casualties. *Am J Pathol* 1956;32:161-73.
2. Rükhardt CH, Perlick E. Pathologisch-anatomisch Befund nach Verabreichung von Dextransulfate und Carboxymethyldextransulfate im Tierexperiment. *Acta Biol Med Germ* 1963;10:126-46.
3. Loeffler RK, Scudder J. Excretion and distribution of polyvinylpyrrolidone in man as determined by use of radiocarbon as a tracer. *Am J Clin Pathol*. 1953;23:311-20.
4. 土屋呂武. 代用血漿アルギン酸による各種臓器の病理組織学的研究. *福岡医学雑誌* 1951;42: 24-38.
5. Langsjoen PH. Observation on excretion of low molecular dextran. *Angiology* 1965;16:148-53.
6. Morgan DF, Little JM, Evans WA. Renal failure associated with low molecular weight dextran infusion. *Br Med J* 1966;2:737-9.
7. 菊池金男, 菅野久義. 低分子Dextran輸液の腎組織に及ぼす影響について. *日輸血誌* 1972;18:127-8.
8. Mailoux L, Swartz CD, Capizzi R, Kim KE, Onesti G, Ramirez O, Brest AL. Acute renal failure after administration of low molecular weight dextran. *New Engl J Med* 1967;277:1113-8.
9. Diomi P, Matheson NA, Norman JN, Shearer JR. The renal response to dextran 40 in dogs with renal artery constriction. *Surgery* 1971;69:256-62.
10. Horvath SM, Hamilton LH, Spurr GB, Allbaugh EB, Hutt BK. Plasma expanders and bleeding times. *J Appl Physiol* 1955;7:614-6.
11. 戸崎洋子, 安澄典子, 高折益彦, 松木英世, 奥村睦子. 代用血漿としてのSuccinate-polymerized Gelatin. *日本臨床* 1968;26:1227-33.
12. Bloom WL, Fowler MO, Ward JA, Franch RH. Hemodilution and changes in hemostasis induced by dextran: An experiment in dogs with and without plasma volume expansion. *J Surg. Res* 1963;3:152-8.
13. Lewis JH, Szeto ILF, Bayer WL, Takaori M, Safar P. Severe hemodilution with hydroxyethyl starch and dextrans. Effects on plasma protein, coagulation factors and platelet adhesiveness. *Arch Surg* 1966;93:941-50.
14. Bygdemar S, Eliason R. Effect of dextrans on platelet adhesiveness and aggregation. *Scand J Clin Lab Invest* 1967;20:17-23.
15. Bennett PN, Dhall DP, Bergentz SE. Effect of dextran 70 infusion on platelet adhesiveness after operation. *Br J Surg* 1979;55:289-90.
16. Aberg M, Hendner U, Bergentz SE. Effect of dextran on factor VIII (antihemophilic factor) and platelet function. *Ann Surg* 1979;189:243-90.
17. Muzaffar TZ, Stalker AL, Bryce WAJ, Dhall DP. Structural alterations in fibrin clots with dextran. *Thromb Diath Haemorrh* 1972;28:257-67.
18. Takaori M, Safar P, Galla SJ. Changes in body fluid compartments during hemodilution with HES and dextran 40. *Arch Surg* 1970;100:263-8.
19. Ring J, Messmer K. Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitute. *Lancet* 1977;1:466-9.
20. 辻重喜, 清水裕幸, 久場襄. ゼラチン性血漿增量剤によるアナフィラキシーショックの1症例. *麻酔* 1976;25:90-2.
21. Messmer K, Richter W, Takaori M. Prinzip der Haptophemmung zur Prophylaxe der Dextran anaphylaxie. In: Immunologische Aspekte Fortschritte der Dextran-Therapie. Myrhofer O, Steinbereithner K, Bergmann H, eds. Verlag Wilhelm Maudrich: Wien, 1984;15-27.
22. 畠田昭雄, 福地坦, 土師久幸, 森本君子, 小田武雄, 高折益彦. 代用血漿剤の血球凝集ならびに血液粘度に及ぼす影響. *麻酔* 1972;21:1-18.
23. 小田武雄, 高折益彦. 急性貧血と心拍出量. *呼と循* 1971;19:947-53.
24. Rothschild MA, Oratz M, Wimer E, Schreiber SS. Studies on albumin synthesis: The effects of dextran and cortisone on albumin metabolism in rabbits studied with albumin-<sup>131</sup>I. *J Clin Invest* 1961;40:545-54.
25. Rothschild MA, Oratz M, Mongelli J, Schreiber SS. Albumin, metabolism in rabbits during gamma globulin infusion. *J Lab Clin Med* 1965;66:733-40.
26. Oratz ME, Rothschild MA, Schreiber SS. Effect of dextran infusions on protein synthesis by hepatic microsome. *Am J Physiol* 1970;218:1108-12.
27. Schildt B, Bouveng R, Sollenberg M. Plasma substitute induced impairment of the reticuloendothelial system function. *Acta Chir Scand* 1975;141:7-13.
28. Lohnborg G, Berghem L, Jarstrand C. Effect of dextran infusion on the phagocytic and metabolic functions of the reticuloendothelial system in man. *Acta Chir Scand* 1979;146(suppl.489):271-7.

# 血小板の低温保存

## Cold Preservation of Platelets

丹羽光一, 池淵研二, 関口定美

Koichi Niwa, Kenji Ikebuchi, Sadayoshi Sekiguchi

濃厚血小板製剤(PC)は現在は室温(20-24°C)で振盪しながら保存することが義務づけられている。血小板製剤は1970年初頭までは4°Cで保存されていたが、輸血後の生体内寿命が短いことから低温保存はされなくなった。PCの保存期間は、血小板機能が良好に維持される期間、また万が一混入した細菌が増殖しない期間として、日本では3日、アメリカでは5日と短く定められており、保存期間が延長できるような低温保存法の確立が望まれている。低温保存による血小板機能の劣化は、血小板が低温により活性化することに起因すると考えられる。そこで、低温保存するには血小板が活性化しないような処置を施さねばならない。本稿では、低温による血小板活性化の機序と、血小板製剤の低温保存に関する最近の知見を概説する。

Currently platelet concentrates (PC) should be stored at room temperature (20-24°C) with agitation. In the years preceding 1970, platelets had been stored at 4°C. However, the storage under refrigeration was avoided because the storage at 4°C resulted in a marked shortening of post transfusion viability of platelets. PC can be stored only for 3 days in Japan and for 5 days in the United States, because of the potential of bacteria propagation. The needs for development of the cold storage has been arising. Low temperature causes the activation of platelets, which is supposed to be associated with the storage injury. Therefore, the inhibition of platelet activation must be essential to the cold storage. In the present article, the authors describe an overview of the mechanisms of cold activation in platelets and the current state of the research for cold storage.

### 1. はじめに

濃厚血小板製剤(PC)の需要は年々増加する傾向にあり、良質な製剤を安定して供給することは、血液センターにとって最も大きな課題である<sup>1)</sup>。現在、PCは室温(22°C)で振盪しながら保存することが義務づけられている。振盪は、バッグの通気性をよくしてPCのpHを7.2前後に保つために必要であり、静置しておくとpHが低下して急激に血小板機能が低下する<sup>2)</sup>。室温で振盪しながら保存する限り、血小板機能は一週間程度は良好に保たれる。しかし細菌感染への配慮から、その保存期間は日本では3日、アメリカでは5日と定められている。PCは、血液製剤は勿論、おそらくあらゆる製剤の中で最も使用期限が短いものの一つであろう。

細菌汚染の観点からは、血液製剤は低温で保存するのが最良の方法である。実際、1970年初頭まではPCは4°Cで保存、供給されていた<sup>2)</sup>。しかし4°Cで保存した血小板は、室温(22°C)で保存した血小板に比べて輸血後の生体内寿命が短いことが指摘され<sup>3)</sup>、以後PCは室温で保存されるようになった。室温保存は、万が一製剤の細菌汚染があった場合にその増殖が早く進行し、輸血副作用の危険性が高い。また、3日という短い保存期間のために、血液センターにおけるPC需給の調整がつきづらく供給業務は煩雑になりがちである。PCを低温で保存することができれば、これらの問題は解決されることになり、その保存法の確立が望まれている。

北海道赤十字血液センター研究部, 〒063 札幌市西区山の手2条2丁目。  
Research Division, Hokkaido Red Cross Blood Center, Yamanote 2-2, Nishi-ku  
Sapporo 063, Japan.

### 2. 低温による血小板の活性化

低温で保存した血小板の機能は、室温で保存した血小板に比べて、1)in vitroでの凝集能が高く維持されている(図1)<sup>4,5)</sup>、2)生体に輸血したときの止血時間が短い<sup>4)</sup>、など優れた面もある。低温保存した血小板の止血効果が大きいのは、血小板が凝集し易い状態にあること<sup>6)</sup>や、低温保存によって生じるマイクロパーティクル(断片化した血小板膜)<sup>7)</sup>によるものと考えられる。一方、前述の如く輸血後の生体内寿命が短い。MurphyとGardner<sup>3)</sup>の報告によれば、22°Cあるいは4°Cで18時間保存した血小板を輸血したときの平均生体内寿命は、それぞれ3.9日あるいは1.3日であった。低温保存した血小板の輸血後の生体内寿命が短いのは、形態が変化していることや、細胞表面にGMP-140(P-selectin)が多く発現していることが深く関係している<sup>8)</sup>。

低温保存した血小板のこれらの特徴は、低温による血小板の活性化が原因になっていると考えられる。血小板は循環血中ではdisc(円盤)状の形態をしているが、低温に曝露されるとballoon(風船)状に丸くなり、偽足を伸ばすなどの形態変化をおこすことが古くから知られていた<sup>9)</sup>。そのほか、低温によって表1に示す様々な反応が血小板に生じることが分かっている。これらの反応のうち、形態変化や顆粒の放出などの反応は、生理的な刺激物質で血小板を刺激したときの反応と同一であり、血小板のcold activationと呼ばれている。図2に、刺激物質によって引き起こされる生理的な血小板活性化の機構をごく簡略化して示した。血小板の活性化の詳細に関しては、本稿の域を越えるので、優れた総説を参照

表1. 低温が血小板に及ぼす影響

	文献
形態変化 (disc→balloon, 假足の伸展)	9
細胞周囲のマイクロチューブルのバンドが消失する	17, 18
膜糖蛋白の変化 (GMP-140, GP53の発現が大きい)	8, 13, 19
細胞内顆粒を放出しやすくなる	20
細胞内Ca <sup>2+</sup> が上昇し, アクチンの重合が起こる	21
cAMP濃度が一過性に上昇する	14
保存後, 輸血後生体内寿命が短くなる	3, 4
保存後の%HSRが小さくなる	22
保存後の凝集能が高く保たれる	4, 5
保存後, 輸血後の止血能が亢進する	4

されたい<sup>10-12</sup>.

生理的な活性化の機構と, cold activationにはどのような差異があるのだろうか? 血小板がトロンビンなどの刺激を受けてから細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)が上昇するまでの情報伝達経路では、図2に示したようなfosfolipase Cの活性化やinositol triphosphate(IP<sub>3</sub>)の産生など、様々な生化学反応がおこる。さらに図には示していないが、刺激物質の種類による差異はあるものの、アデニル酸シクラーゼやfosfolipase A<sub>2</sub>の活性化など、何種類もの情報伝達経路が存在することが分かっている。しかし、低温によって活性化した血小板において、それらの生化学反応が同様におこっているかどうかは十分に分かっていない。

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇は生理的な活性化、あるいは低温による活性化いずれの場合もおこる反応である。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇の成因であるdense tubular system(DTS)からのCa<sup>2+</sup>リリースは、生理的にはDTS膜上のIP<sub>3</sub>受容体(IP<sub>3</sub>感受性のCa<sup>2+</sup>チャネル)を経たものであるが、低温刺激の場合のCa<sup>2+</sup>通過経路は分かっていない。低温刺激においても生理的な場合と同様にIP<sub>3</sub>受容体からCa<sup>2+</sup>リリースがおこる可能性もあるが、リン脂質膜が低温になり相転移が生じ、物質透過性が高まるためにDTSからCa<sup>2+</sup>が細胞質に漏れ、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇を引き起こすという考えもある<sup>13</sup>。

プロスタグランジン類はアデニル酸シクラーゼを活性化し、環状AMP(cAMP)の上昇を引き起こす。cAMPは[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇を抑制することで血小板の活性化を抑制すると考えられている。血小板を低温にすると一過性にfosfolipase Cの活性が下がり、cAMP濃度が上昇するという報告があるが<sup>14</sup>、このことがcold activationにおいてどのような役割を果たしているかははっきりしていない。

このように、生理的な活性化の細胞内機序と低温によるそれは、全く同一というわけではなく、十分な検討はなされていない。しかし、低温により血小板が活性化することは現象として明白であり、低温保存しても血小板が活性化しないような処置を施せば、輸血後の生体内寿命の短縮は防げるかもしれない。このような発想は室温保存では古くから採用され、血小板の活性化を抑制するいくつかの薬物が、保存中の血小板の機能保持に有効であることが報告されている<sup>15, 16</sup>。低温保存におけるこのような試みは少なく、ごく最近になっていくつかの研究が報告されるよう

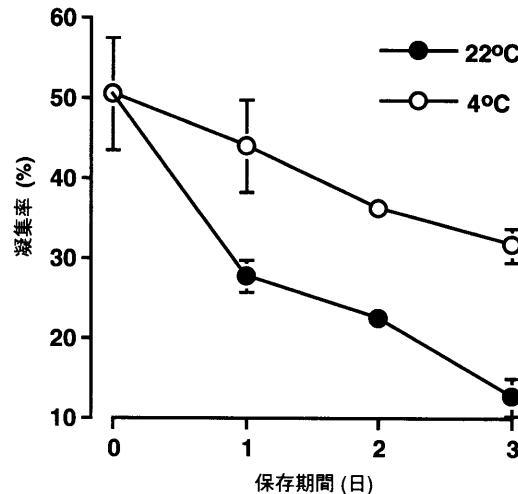


図1. ADP刺激(10μM)による血小板最大凝集率。バフィーコートから調整してポリオレフィンバッグに入れたPCを、22°Cで振盪、あるいは4°Cで静置して保存し、経日的に凝集率を調べた(丹羽ら、未発表データ)。

なった。血小板の低温保存の可能性を示唆する最近の研究を、以下に紹介する。

### 3. 血小板の低温保存

#### 3.1. quin-2とサイトカラシン

血小板を低温に曝露すると、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇、およびアクチン分子の重合が起こる。これらの反応は、刺激を受けたときの血小板でも生理的に生じる反応である(図2)。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇はミオシン軽鎖キナーゼを始めとするCa<sup>2+</sup>依存性酵素を活性化し、この結果アクチン分子が重合し血小板の形態変化が引き起こされる。

WinokurとHartwing<sup>21</sup>は、細胞内でCa<sup>2+</sup>をキレートするquin-2と、アクチンの重合部位に付着してアクチンの重合を阻害するサイトカラシンを付加した血小板を4°Cでインキュベートすると、形態変化が起こらずに血小板はdisc状のままであったと報告した。すなわちquin-2によって、細胞内に増加したCa<sup>2+</sup>がキレートされ、サイトカラシンによってアクチンの重合が妨げられたのである。また、この血小板を遠心洗浄してサイトカラシンを除去し、過剰量のCa<sup>2+</sup>を添加してquin-2のキレート効果を相殺した後に血小板をトロンビン刺激したところ、通常の血小板と同様の形態変化が起きたという。

quin-2は本来は[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を測定するために開発されたCa<sup>2+</sup>感受性蛍光プローブの一つである<sup>23</sup>。quin-2自体は親水性で細胞内に容易に入ることができないため、脂溶性のAM(acetoxymethyl ester)基を付けた、quin-2 AMの形で細胞に取り込ませる。取り込まれたquin-2 AMのAM基は細胞内のエステラーゼで分解されquin-2は細胞内にトラップされる。

よって遠心による洗浄ではquin-2は除去することが困難である。また、サイトカラシンは毒性が高い、遠心洗浄でかなりの量が除去できるとは思われるが、この方法が血液製剤の低温保存に応用できるかどうかは今後の研究、あるいは新たな薬物の開発を待たなければならない。しかし、cold activationの機序を解明し、

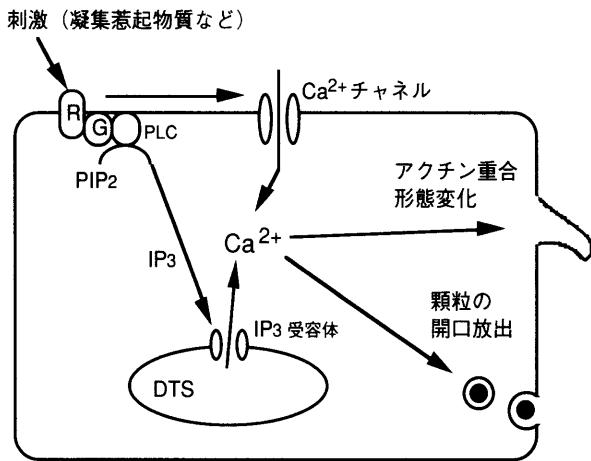


図2. 凝集惹起物質による血小板活性化の概略. R : 受容体 ; G : GTP結合蛋白質 ; PLC : フォスフォリパーゼC ; PIP<sub>2</sub> : フオスファチジルイノシトール4,5-2リン酸 ; IP<sub>3</sub> : イノシトール1,4,5-3リン酸 ; DTS : dense tubular system.

実験レベルではあるが可逆的にそれを防げることを証明した点で、この報告は貴重である。

### 3.2. Antifreeze glycoproteins (AFGPs)

Tablinら<sup>13)</sup>は、南極や北極に生息するある種の魚類の血漿に含まれるAFGPsが、血小板のcold activationを抑制するという興味ある報告をしている。AFGPsは血漿蛋白総重量の3/4を占め、Ala, Ala, Thrのアミノ酸リピート配列を持っており、galactose-N-acetylgalactosamineがThrに結合している。分子量は33.7-2.6kDaと分布し、低分子のものが多いという。

Tablinらは、洗浄血小板とAFGPsと一緒に4℃で1時間インキュベートした後、血小板の% activation (disc状でなくなった血小板の割合)を調べた。その結果、活性化していた血小板は無処置の血小板では約65%, AFGPs処置した血小板では約30%と、活性化が抑制されていた。また、4℃で21日間長期保存した血小板で、活性化の指標である膜糖蛋白GP53の発現量が調べられた。その結果、無処置の血小板ではほぼ100%の細胞がGP53を発現していたが、AFGPsを添加して保存した血小板では20%と、活性化が抑えられていた。ただし、緩衝液ではなく血漿に浮遊した血小板では、低温保存によるGP53の発現を抑制できなかった。このことは、AFGPsが血漿蛋白に結合したためと考察されている。

AFGPsが低温による細胞の傷害を防ぐ機序はよく分かっていないが、イオンチャネルに作用すること、温度変化による脂質相転移に作用することなどが考えられている。AFGPsはまだ商品として入手できるものではなく、今回の報告も実験室レベルの段階である。しかし今後AFGPsの作用機序が明らかにされ、安価な供給ができるようになれば、血液製剤の低温保存に応用できる可能性もある。

### 3.3.ThromboSol

LifeCell Corporation社は血小板の低温保存や凍結保存のために

表2. ThromboSolの組成

amiloride	0.25mM
adenosine	0.1mM
sodium nitroprusside	50μM
dipyridamole	40μM
quinacrine	0.2μM
ticlopidine	0.75mM

ThromboSolを開発した。ThromboSolは表2に示す組成からなる添加剤で、主に血小板が刺激を受けて活性化するまでの細胞内情報伝達系に作用して血小板の活性化を抑制する。

各薬物の作用機序を簡単に説明しておく。amilorideは利尿薬として用いられている薬剤で、細胞膜上のNa/H交換輸送を阻害する。この結果細胞内のpHはアルカリ側に傾き、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇が抑制される。adenosineはA2受容体に結合してアデニル酸シクラーゼを活性化し、cAMPの産生を促進する。cAMPはCa<sup>2+</sup>と同様に重要な細胞内セカンドメッセンジャーで、血小板においては[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇を抑制し、血小板の活性化を抑制する。sodium nitroprussideはNOを発生させる。NOはグアニル酸シクラーゼを活性化し、環状GMP(cGMP)量を増加させる。cGMPはcAMPと協調して[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇を抑制すると考えられており、結果として血小板の活性化を抑制する。dipyridamoleは、cAMPを分解する酵素であるフォスフォジエステラーゼを阻害するため、結果としてcAMPが蓄積する。quinacrineはフォスフォリパーゼA<sub>2</sub>を阻害してアラキドン酸の産生を抑制する。ticlopidineは血小板抑制効果を有するが、その作用機序はよく分かっていない。

Connorら<sup>24)</sup>は、22℃あるいは4℃で9日間保存した通常のPCと、ThromboSolを添加して4℃で保存したPCの血小板機能を、in vitroで比較検討した。4℃で保存した血小板は形態がballoon状になってしまっており細胞内の顆粒が減少していた。また22℃で保存したものに比べ、血小板数が低下し、浸透圧ショック回復率(%HSR)や変形能(ESC)が劣っていた。これに対し、ThromboSolを添加し4℃で保存した血小板は、balloon状になっていたものの細胞内顆粒はよく保たれていた。また血小板数は22℃で保存したPCと同程度で、%HSR、ESCの値は無処置で4℃保存したPCよりも高かった。さらにGMP-140の平均蛍光強度は、22℃で保存した血小板よりもThromboSolを添加して4℃保存したものの方が低く、活性化が抑制されていたことが示唆された。

このようにThromboSolは低温保存しても血小板を活性化させず、また機能もよく保存させるという良好な結果が得られている。ThromboSolの最大の特徴は、ThromboSolを構成する薬物が、いずれも既に他の目的で臨床に用いられている点であろう。今後の最大の焦点は、低温保存した血小板の輸血後生体内寿命の低下をThromboSolが防げるか否かである。今後、ThromboSolを用いた動物実験や臨床実験が報告されるものと思うが、血小板低温保存の実用化が期待できそうな添加剤である。

### 4. おわりに

血小板を室温保存せざるを得ない状況と、低温保存研究の現状

について概説した。

血小板は、生体外における機能検査から生体内の止血効果や寿命を推し量ることが難しく、また機能検査自体も簡便というわけではないので、PCの適切な保存法の開発、研究は困難な仕事である。しかし、適切な低温保存法が確立されれば、細菌汚染の危険性だけでなく、近年問題になっているPC中のサイトカイン産生も減少させることができる<sup>25)</sup>。これらのメリットが明らかである以上、様々な困難を排して低温保存法を確立する価値は十分にあるであろう。

## 参考文献

1. 中瀬俊枝, 関口定美. 血小板製剤供給体制の将来の方向. 日本輸血学会雑誌 1995;41:548-52.
2. Murphy S. Platelet storage for transfusion. Seminars in Hematology 1985;22:165-77.
3. Murphy S, Gardner, FH. Effect of storage temperature on maintenance of platelet viability - deleterious effect of refrigerated storage. New Engl J Med 1969;280:1094-8.
4. Becker GA, Kunicki TT, Chalos MK, Aster RH. Studies of platelet concentrates stored at 22C and 4C. Transfusion 1973;13:61-8.
5. Shively JA, Gott CL, Jongh DS. The effect of storage on adhesion and aggregation of platelets. Vox Sang 1970;18:204-15.
6. Kattlove HE, Alexander B, White F. The effect of cold on platelets. II. Platelet function after short-term storage at cold temperatures. Blood 1972;40:688-96.
7. Bode AP, Knupp CL. Effect of cold storage on platelet glycoprotein IB and vesiculation. Transfusiuon 1994;34:690-6.
8. Holme S, Sweeney, JD, Sawyer S, Elfath MD. The expression of p-selectin during collection, processing, and storage of platelet concentrates:relationship to loss of in vivo viability. Transfusion 1997;37:12-7.
9. Zucker MB, Boreili J. Reversible alterations in platelet morphology produced by anticoagulants and by cold. Blood 1954;9:602-8.
10. 久米章司, 尾崎由基男. 血小板活性化機構とカルシウムイオン. 小島至編. カルシウムのシグナル伝達機構. 東京: 中外医学社, 1993;108-16.
11. Sergeant P, Sage SO. Calcium signalling in platelets and other nonexcitable cells. Pharmac Ther 1994;64:395-443.
12. Blockmans D, Deckmyn H, Vermeylen J. Platelet activation. Blood Rev 1995;9:143-56.
13. Tablin F, Oliver AE, Walker NJ, Crowe LM, Crowe JH. Membrane phase transition of intact human platelets: correlation with cold-induced activation. J Cell Physiol 1996;168:305-13.
14. Zappia GC, Steiner M, Ando Y, Baldini M. Effect of chilling on platelet cyclic adenosine 3:5-monophosphate and adenylate cyclase activity. Transfusion 1976;16:122-9.
15. Bode AP, Miller DT. The use of thrombin inhibitors and aprotinin in the preservation of platelets stored for transfusion. J Lab Clin Med 1989;113:753-8.
16. Mrowiec ZR, Oleksowicz L, Zuckerman D, De Leon-Fernandez M, Khorshidi M, Dutcher JP, Puszkin EG. Buffy coat platelets stored in apyrase, aprotinin, and ascorbic acid in a suspended bag: combined strategies for reducing platelet activation during storage. Transfusion 1996;36:5-10.
17. White JG, Kravit W. An ultrastructural basis for the shape changes induced in platelets by chilling. Blood 1967;30:625-35.
18. White JG. Influence of taxol on the response of platelets to chilling. Am J Pathol 1982;108:184-95.
19. Ando Y, Steiner M, Baldini, M. Effect of chilling on membrane related functions of platelets. Transfusion 1974;14:453-61.
20. Robblee LS, Shepro D, Vecchione JJ, Valeri, CR. Increased thrombin sensitivity of human platelets after storage at 4C. Transfusion 1979;19:45-52.
21. Winokur R, Hartwing JH. Mechanism of shape change in chilled platelets. Blood 1995;85:1795-804.
22. Handin RI, Fortier NL, Valeri CR. Platelet response to hypotonic stress after storage at 4C or 22C. Transfusion 1970;10:305-9.
23. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 1985;260:3440-50.
24. Connor J, Currie LM, Allan H, Livesey SA. Recovery of in vitro functional activity of platelet concentrates stored at 4°C and treated with second-messenger effectors. Transfusion 1996;36:691-8.
25. Currie LM, Harper JR, Allan H, Connor J. Inhibition of cytokine accumulation and bacterial growth during storage of platelet concentrates at 4°C with retention of in vitro functional activity. Transfusion 1997;37:18-24.

## 原著

# 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<sup>1)</sup>, 玉置透<sup>1)</sup>, 川村明夫<sup>1)</sup>, 石崎彰<sup>1)</sup>, 岡野正裕<sup>1)</sup>, 高橋昌宏<sup>1)</sup>, 田中三津子<sup>1)</sup>, 目黒順一<sup>1)</sup>, 久木田和丘<sup>1)</sup>, 米川元樹<sup>1)</sup>, 緒方嘉貴<sup>2)</sup>, 福井秀男<sup>2)</sup>

## Establishment of Rat Model of High Blood Exchange by Neo Red Cell(NRC)

Naoyuki Yanagida<sup>1)</sup>, Toru Tamaki<sup>1)</sup>, Akio Kawamura<sup>1)</sup>, Akira Isizaki<sup>1)</sup>, Masahiro Okano<sup>1)</sup>, Masahiro Takahashi<sup>1)</sup>, Mitsuko Tanaka<sup>1)</sup>, Jun-ichi Meguro<sup>1)</sup>, Kazutaka Kukita<sup>1)</sup>, Motoki Yonekawa<sup>1)</sup>, Yoshitaka Ogata<sup>2)</sup>, Hideo Fukui<sup>2)</sup>

ストローマフリーへモグロビンをリポソームにカプセル化したNeo Red Cell(NRC:TERUMO)は他の血液代替物に比較して酸素親和性が低く、解離曲線がヒト赤血球に近似しており、出血性ショックモデルに対して安全に投与されうることがイヌ、ラビットなど中動物を用いた実験系で確認されている。今回、NRCを用いて、自己赤血球のみでは生存不可能なほど高度なラット血液交換モデルを作成した。Brown Norway(BN)雄性ラットを用いてNRCで80%以上の高度血液交換を行い、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。血液交換前後で、ヘマトクリット(Ht) 43.5±1.9%は7.1±1.5%へと低下し、血液交換率は83.5±3.8%と計算された。動脈血ガス分析ではbase excess(B.E.)は-1.37±1.10mMから-7.77±0.35mM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±0.98mM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、7.1±1.5, 8.5±1.9, 12.7±2.2, 15.5±5.4, 44.1±3.3%であり、24-48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した。血液交換後、さらにNRC持続静注を加えることにより、ラットでNRCによる約85%の高度血液交換が可能であった。Htが前値の50%に回復するまで72時間を探すが、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。血液交換後、1週間でHt値はほぼ前値に回復し、1ヶ月以上の長期生存も得られた。

It has been proved that liposome-encapsulated hemoglobin, named Neo Red Cell(NRC) can be safely administered and is effective to treat animals (such as canine and rabbit) under hemorrhagic shock, because NRC has a lower oxygen affinity than other blood substitutes and has an oxygen-hemoglobin dissociation curve similar to human hemoglobin. We made a high grade blood exchange model with NRC in rats. Brown Norway rats were used. We extracted blood from rats at a rate of 1.5mL/15-30sec, and transfused NRC at a rate of 1.7mL/15-30 sec. The exchange rate was about 85%. After blood exchange, NRC was continuously administered intravenously at a rate of 1mL/hr for 8 hrs. Complete blood count and blood gas analysis were done. Hematocrit(Ht) decreased from 43.5±1.9% to 7.1±1.5%, and the rate of exchange was calculated at 83.5±3.8%. Base excess decreased from -1.37±1.10mM to -7.77±0.35mM, however metabolic acidosis was improved within 24 hours. Ht was 7.1±1.5% immediately after blood exchange, 8.5±1.9% 24 hrs after, 12.7±2.2% 48 hrs after, 15.5±5.4% 72 hrs after, and 44.1±3.3% one week after. It was suggested that hematogenous function was improving 48 hrs after the blood exchange. It was proved that a high grade blood exchange about 85% could be performed by adding c.i.v. of NRC. It took over 72 hrs to improve to 50% of the preexchange level in Ht value and one week to improve completely, and it was concluded that NRC had an effective function as an artificial oxygen carrier. —Keywords: Artificial blood, Neo Red Cell(NRC), Hematocrit, Blood exchange.

### I. 緒言

期限切れ濃厚赤血球から調製したストローマフリーへモグロビンをリポソームにカプセル化した人工酸素運搬体であるNeo Red Cell(NRC:TERUMO)は他の血液代替物に比較して酸素親和性が低く、解離曲線がヒト赤血球に近似しており、出血性ショックモデルに対して安全に投与されうることがイヌ、ラビットなど中

1) 札幌北楡病院 人工臓器・移植・遺伝子治療研究所 外科, Sapporo Hokuyu Hospital, 2) テルモ株式会社研究開発センター, Terumo Corporation.  
札幌北楡病院 〒003札幌市白石区東札幌6-6-11-3, Sapporo Hokuyu Hospital,  
6-6-11-3 Higashisapporo, Shiroishi-ku, Sapporo 003, Japan.  
論文受付96年7月18日, 再受付97年3月10日, 受理97年3月19日.

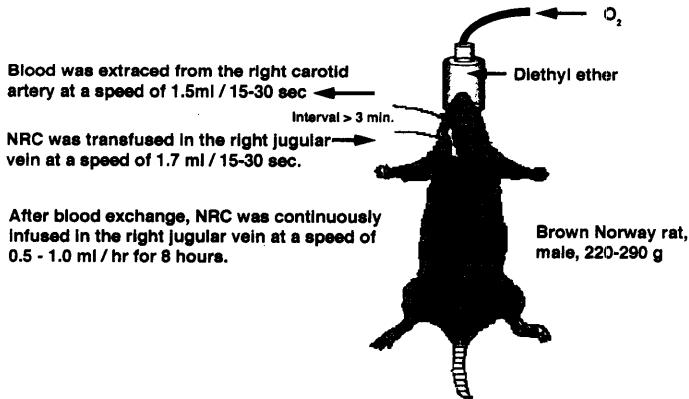


Fig.1. Schema of blood exchange model.

動物を用いた実験系で確認されている<sup>1-4)</sup>。しかし、ラットにおける血液交換モデル<sup>5)</sup>は文献的に見ても再現性が確認できていない。われわれは、NRCを用いて、より有効なtotal body rinseを目的に、自己赤血球のみでは生存不可能なほど高度なラット血液交換モデルを作成した。

## 2. 方法

### 2.1. Neo Red Cellの調製

TERUMOより供与された、NRC(NRC濃度7%として、5% bovine serum albuminを加えて膠質浸透圧が300-310mOsm/Lになるように調整されたもの)を用いた。

### 2.2. 血液交換

実験動物として、体重220-290gのBrown Norway(BN)雄性ラットを用いた(n=6)。ラットはエーテルの吸入麻酔(酸素投与)下に右頸部に小切開を加え、頸動脈にそれぞれシリコンラバーカテーテルを挿入、頸動脈側から15-30秒かけて1.5mLの脱血を行い、頸静脈側から同スピードで1.7mLのNRCを注入するという操作を8-15回繰り返すことによって血液交換を行った<sup>6)</sup>。この操作は最低3分間のインターバルをおいて行った(Fig.1)。交換率はヘマトクリットを指標として計算し、75-85%まで交換した(Fig.2)。交換後は速やかに頸動脈側のカテーテルを抜去し、頸静脈側のカテーテルより、シリンジポンプを用いてNRCを1mL/hrの速度で8時間持続静注した。その後、頸静脈側のカテーテルは抜去し、通常のケージ内で固体飼料、水分にて飼育を継続した。血液交換前、直後、およびその後、経時に採血し、一般末梢血、血液ガス分析を行った。

## 3. 結果

高度の血液交換の結果、失血性ショックによる直接的な死亡はなかった。麻酔終了後、全例30分以内に覚醒し、歩行や飲水を開

$$\text{Exchange rate}(\%) = \frac{\text{Ht before blood exchange} - \text{Ht after blood exchange}}{\text{Ht before blood exchange}} \times 100$$

Fig.2. The formula of the rate of blood exchange.

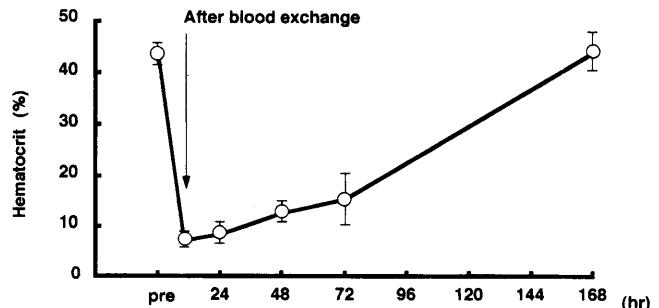


Fig.3. The change of hematocrit after blood exchange.

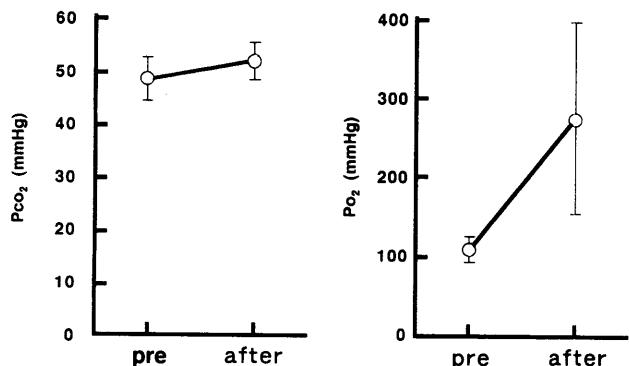


Fig.4. The change of Pco<sub>2</sub> and Po<sub>2</sub> after blood exchange.

始した。

NRCを用いた血液交換により、赤血球 $801.3 \pm 44.1 \times 10^6/\mu\text{L}$ 、ヘマトクリット(Ht) $43.5 \pm 1.9\%$ 、血小板 $86.0 \pm 5.4 \times 10^3/\mu\text{L}$ はそれぞれ $128.8 \pm 25.9 \times 10^3/\mu\text{L}$ 、 $7.1 \pm 1.5\%$ 、 $35.0 \pm 17.5 \times 10^3/\mu\text{L}$ へと低下し、Ht値から血液交換率は $83.5 \pm 3.8\%$ と計算された(最低78.7%，最高87.3%)(Fig.3)。

動脈血ガス分析では酸素分圧は $112.3 \pm 17.0 \text{ mmHg}$ から $274.0 \pm 123.1 \text{ mmHg}$ へ、二酸化炭素分圧は $49.7 \pm 4.4 \text{ mmHg}$ から $52.4 \pm 3.5 \text{ mmHg}$ へと変化した(Fig.4)。また、base excess(B.E.)は $-1.37 \pm 1.10 \text{ mM}$ から $-7.77 \pm 0.35 \text{ mM}$ へと変化し、血液交換により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(Fig.5)。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、 $7.1 \pm 1.5$ 、 $8.5 \pm 1.9$ 、 $12.7 \pm 2.2\%$ 、 $15.5 \pm 5.4$ 、 $44.1 \pm 3.3\%$ であり、24-48時間以後、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(Fig.3)。

6例中、急性期死亡はなかったが、2例が6日目(No.6)と7日目(No.4)に死亡した。死亡例の肝、脾組織を正常例(1週間目に犠牲死させた、No.2)のそれと比較した。生存例においては肝では類洞が若干拡張していたが、ほぼ正常に保たれており、Kupffer細胞の貪食像はほとんど観察されなかった。また、脾ではマクロ

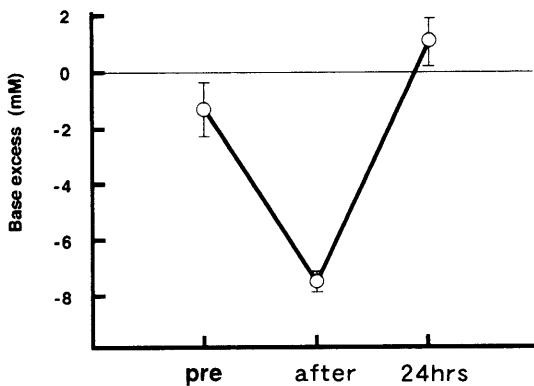


Fig.5. The change of base excess after blood exchange.

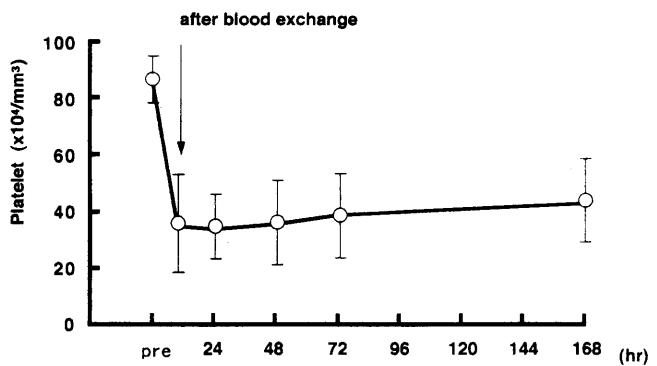


Fig.7. The change of platelet after blood exchange.

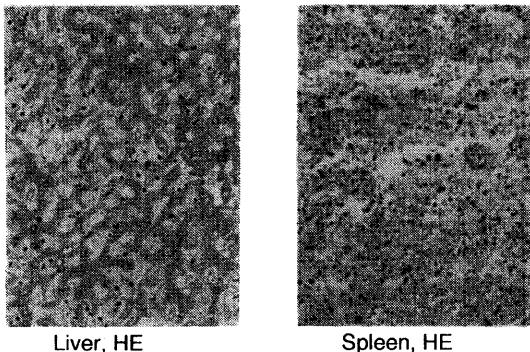


Fig.6-a. Normal rat sacrificed 7 days after blood exchange. Slight dilatation of sinusoid (liver) and phagocytosis by macrophage (spleen) are observed.

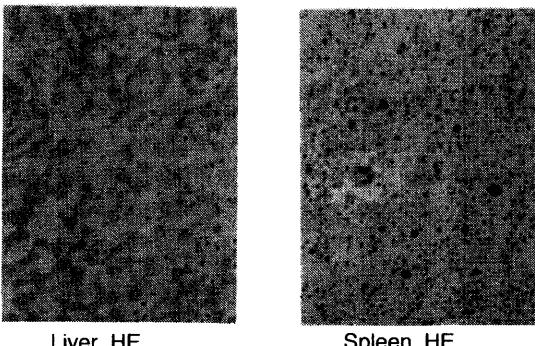


Fig.6-b. Histological representation of rat dead 7 days after blood exchange. Marked dilatation of sinusoid (liver) and phagocytosis by macrophage (spleen) are observed.

ファージに若干の貪食像が見られた。一方、死亡例においては肝では類洞の著しい拡張、グリソン構造の破壊が観察され、脾ではマクロファージに著明な貪食像が観察された(Fig.6a,b)。

他の生存例3例は1ヶ月以上の長期生存が得られている。

#### 4. 考察

人工酸素運搬体として開発されたNRCはイヌ、ラビットなどの中動物に対する投与実験、血液交換実験においてはその安全性と有効性が確認されている。われわれは、ラットにおける高度血液

交換モデルを作成した。

膠質輸液であるヘスパンダーで血液交換を行った場合、交換率が50%以下でも24時間以上生存したのは5例中1例であり、50%以上の血液交換を行ったものは5例全て12時間以内に死亡した。そこで、血液交換用いたNRCは厳密に浸透圧を300-310Osm/Lに調製したものを用い、交換操作は脱血およびNRC返血を緩徐に行うことによって留意した。さらに、返血量は脱血量よりも若干多め(1.7/1.5倍)にした。血液交換後の不安定な循環動態を改善するためにシリンジポンプを用いてNRCを1mL/hrの速度で持続注入したが、初期の観察でラットの状態が安定するまで5-8時間の持続注入を要したため、本実験では血液交換後のNRC持続静注時間を8時間に設定した。

血液交換前後でHt値は $43.5 \pm 1.9\%$ から $7.1 \pm 1.5\%$ へと低下し、血液交換率は $83.5 \pm 3.8\%$ と計算された(最低78.7%，最高87.3%)。血液交換の操作中、ラットの呼吸状態は不安定になることがあり、促拍・頻呼吸や、逆に緩徐呼吸が見られた。しかし、前者はエーテルの直接作用による過呼吸と思われ、後者は麻酔深度を適切に調節することで問題のないレベルであると考えられた。

血小板数は $86.0 \pm 5.4 \times 10^4/\mu\text{L}$ から $35.0 \pm 17.5 \times 10^4/\mu\text{L}$ へと低下するが、その後の回復は予想よりも低く、1週間後でも前値の47%に過ぎなかった(Fig.7)。NRC投与による直接的な血小板に対する抑制的な作用はないとされている<sup>9)</sup>ので、この結果は赤血球と血小板の産生速度の違いによるものと思われる。しかし、85%の血液交換を行っても、出血傾向が現れることもなく、凝固線溶系には異常を来していないように思われた。

血液交換操作によって循環動態が不安定になる。そのため、脱血分をNRCにより即座に置き換えたとしても、いわゆる失血性のpreshock状態となつたことから、代謝性アシドーシスが進行した。しかし、24時間以内に速やかに回復することは、粒子径が小さく、粘性の低いNRCが末梢まで行き渡り、循環不全に陥ることを防ぐとともに、確実に末梢組織に酸素を運搬していたことの裏付けとなっていたと思われた。

坂口ら<sup>8)</sup>の研究では血中からのNRCの消失は主として網内系の貪食作用によるものであり、網内系でのヒトヘモグロビンは7日以内に検出されなくなり、速やかに分解されるとしている。本研

究で見られたラットの死亡は6日目、7日目に見られたものであったが、組織像は、肝では類洞の拡張、また脾ではマクロファージの著しい貪食像が見られた。NRCの組織に対する毒性的な変化とは思われなかつたが、今後、NRCの体内での濃度の推移、消失率をNRCcritなどの計測から明確にし、組織に対する影響を検討する必要があると思われた。

## 5. 結論

血液交換後さらにNRC持続静注を加えることにより、ラットでNRCによる約85%の高度血液交換が可能であった。Ht値が前値の50%に回復するまで、48-72時間要するが、その期間中NRCは有効な酸素運搬体として機能していると思われた。血液交換後1週間でHt値はほぼ前値に回復し、1ヶ月以上の長期生存も得られた。

## 参考文献

- 薄場 彰、宮沢正紹、三浦純一、遠藤幸男、井上仁、元木良一、坂口圭介、鈴木一比好、上谷利治。人工血液"ネオレッドセル(NRC)"の性能と安全性。人工臓器 1993;22:554-9。
- Usuba A, Motoki R, Sakaguchi K, Suzuki K, Kamitani T. Effect of NEO RED CELLS on hemodynamics and blood gas transport in

canine hemorrhagic shock and its safety for vital organs. Art Cells Blood Subs and Immob Biotech 1994;22:503-16.

- 緒方嘉貴、後藤博、坂口圭介、鈴木一比好、上谷利治。高度血液交換モデルにおけるネオレッドセル(NRC)の機能と安全性。人工臓器 1993;22:1157-61。
- Usuba A, Motoki R, Suzuki K, Sakaguchi K, Takahashi A. Study of effect of the newly developed artificial blood "NEO RED CELLS (NRC)" on hemodynamics and blood gas transport in canine hemorrhagic shock. Biomater Art Cells Immob Biotech 1992;20: 531-5.
- 宮内雄二、鈴木一比好、岡本武、高橋晃、沢本二郎、大崎健一、土田英俊、大野弘幸。ネオレッドセルの血液交換実験。人工臓器 1988;17:729-32。
- 酒井宏水、泉陽太郎、山畠健一、濱田健一、武岡真司、西出宏之、小林紘一、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。
- 坂口圭介、宮内雄二、鈴木一比好、高橋晃。ネオレッドセルが血液凝固系・補体系に及ぼす影響。人工臓器 1993;20:620-5。
- 坂口圭介、緒方嘉貴、鈴木雅博、鈴木一比好、上谷利治。人工赤血球(NRC)静脈内投与後の体内分布および網内系貪食能に対する影響。人工臓器 1993;22:560-5。

—ヒト エリスロボエチン製剤—

**エスパー® 皮下用**

6000・9000・12000・24000

(劇)(指)(要指) 一般名:エボエチンアルファ(遺伝子組換え)

●効能・効果 一括料一

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** • 製造元  
〒101 東京都中央区日本橋本町二丁目  
麒麟麦酒株式会社  
〒101 東京都中央区新川二丁目  
95 (貯)

原著

## 出血性ショックモデルを用いた人工酸素運搬体、 ヘモグロビン小胞体の酸素運搬能の検討

吉津 晃<sup>1)</sup>, 山畠 健<sup>1)</sup>, 泉 陽太郎<sup>1)</sup>, 堀之内宏久<sup>1)</sup>, 小林紘一<sup>1)</sup>,  
朴 晟翼<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>

## The Oxygen Transporting Capability of Hemoglobin Vesicle, an Artificial Oxygen Carrier, Evaluated in a Rat Hemorrhagic Shock Model

Akira Yoshizu<sup>1)</sup>, Takeshi Yamahata<sup>1)</sup>, Yotaro Izumi<sup>1)</sup>, Hirohisa Horinouchi<sup>1)</sup>, Kouichi Kobayashi<sup>1)</sup>,  
Sung Ick Park<sup>2)</sup>, Hiromi Sakai<sup>2)</sup>, Shinji Takeoka<sup>2)</sup>, Hiroyuki Nishide<sup>2)</sup>, Eishun Tsuchida<sup>2)</sup>

出血性ショック(循環血液量の50%)に対して人工酸素運搬体、ヘモグロビン小胞体(HbV)を投与し、その酸素運搬能を検討した。HbVはヒト赤血球から精製したヘモグロビン溶液を脂質二分子膜で被膜した人工酸素運搬体である。動物種はWistar系ラットを用いた。内頸動脈に各々カテーテルを挿入し、動脈より脱血と採血、静脈より試料の投与を行った。酸素運搬の指標として動脈血液ガス、平均体圧(MAP)、骨格筋(頸二腹筋)および腎皮質の組織酸素分圧(PtO<sub>2</sub>)を測定した。試料としては5%アルブミンで調製したヘモグロビン(Hb)濃度10g/dLのHbV(HbV群)、対照として5%アルブミン(ALB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(RBC群)を用いた。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HbV群では100%、RBC群では120%まで回復したが、ALB群では80%に留まり前2群より有意に低かった。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HbV群では80%、RBC群では90%まで回復したが、ALB群では60%に留まり前2群より有意に低かった。代謝性アシドーシスは脱血後全群で認められたが、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。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HbV群とRBC群では同程度でありALB群と比べて良好であった。これよりHbVの酸素運搬能は出血性ショックにおいて赤血球とほぼ同等であったと考えられた。

The oxygen carrying capability of an artificial oxygen carrier Hemoglobin Vesicle(HbV) was evaluated in a rat hemorrhagic shock model(50% of circulating blood volume was withdrawn). Catheters were inserted into the jugular vein for infusion and the carotid artery for bleeding and blood sampling. As indices of oxygen transport, arterial blood gases, mean arterial pressure(MAP), tissue oxygen tensions(PtO<sub>2</sub>) of skeletal muscle and renal cortex were measured. The materials infused were HbV reconstituted in 5% albumin with hemoglobin(Hb) concentration of 10g/dL(HbV group), 5% albumin(ALB group), and washed rat red blood cells reconstituted in 5% albumin with Hb concentration of 10g/dL, equivalent to that of HbV(RBC group). In all the groups, MAP decreased to 20% of the initial value after bleeding. After infusion, MAP recovered to 100% of the initial value in the HbV group, 120% in the RBC group but remained at 80% in the ALB group, which was significantly lower than the other groups. Skeletal muscle and renal cortical PtO<sub>2</sub> decreased to 40% of the initial value after bleeding in all the groups. After infusion, skeletal muscle and renal cortical PtO<sub>2</sub> recovered to 80% in the HbV group, 90% in the RBC group but remained at 60% in the ALB group, which was significantly lower than the other groups. Metabolic acidosis was observed in all the groups after bleeding which recovered 30 minutes after infusion with no significant differences among groups. From the fact that the recovery of MAP and PtO<sub>2</sub> measurements after infusion were similar in the HbV and RBC groups and significantly better compared to the ALB group, we conclude that the oxygen carrying capability of HbV was comparable to that of red blood cell. —Key words: Hemorrhagic shock, Artificial oxygen carrier, Hemoglobin vesicle, Renal cortical tissue oxygen tension, Skeletal muscle tissue oxygen tension, Oxygen transport.

1) 慶應義塾大学医学部外科, Department of Surgery, School of Medicine, Keio University, 2) 早稲田大学理工学総合研究センター高分子化学研究室, Department of Polymer Chemistry, Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University.  
慶應義塾大学医学部外科, 〒160 東京都新宿区信濃町35, Department of Surgery, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan.

論文受付97年3月7日, 受理97年3月21日.

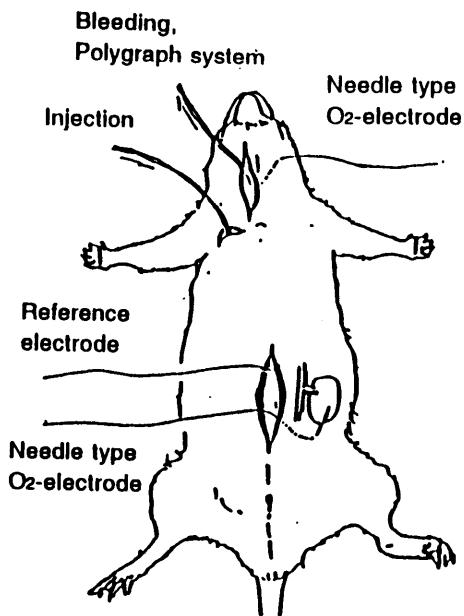


Fig. 1. The representative diagram of the experiment.

Table 1. Characteristics of HbV

[Hb](g/dL)	10
[Lipid](g/dL)	6.2
Hb/Lipid(g/g)	1.61
diameter(nm)	251±87
P <sub>50</sub> (mmHg)	32
Hill number	2.2
pH(at 37°C)	7.4
Viscosity(cP, at 230 s-1)	2.6
HbCO(%)	2
metHb(%)	3
initial rate of metHb formation(%/h)*	1.4
*at 37°C, PO <sub>2</sub> =149Torr	

## 1.はじめに

出血に対する赤血球輸血は、臨床医学に多大な貢献を示した。しかしながら赤血球膜には血液型物質が存在するため血液型の判定や投与に際して交差試験が必要であり、またAIDSをはじめとする感染の問題が近年注目されている。赤血球に関してはその保存についても様々な制約がある。こうした諸問題を取り除き輸血のもつ酸素運搬能に関する効果のみを残す方法が模索された。

臨床応用可能な人工酸素運搬体に必要な条件としては、1)肺で酸素化された酸素を組織まで運搬し、組織でこれを放出できること、2)循環血液中に一定時間留まり酸素運搬体としての機能を全うできること、3)重要臓器に対する毒性がないこと、などが挙げられる。期限切れヒト赤血球から精製して得られる高純度ヘモグロビン(Hb)溶液(99.9%以上)を脂質二分子膜で被覆したヘモグロビン小胞体(HbV)はこれらの条件を満たす可能性を有する人工酸素運搬体の一つである。その物性における特徴としては粒径が0.2μmと小さく、コロイド浸透圧の調節が可能で長期保存が容易

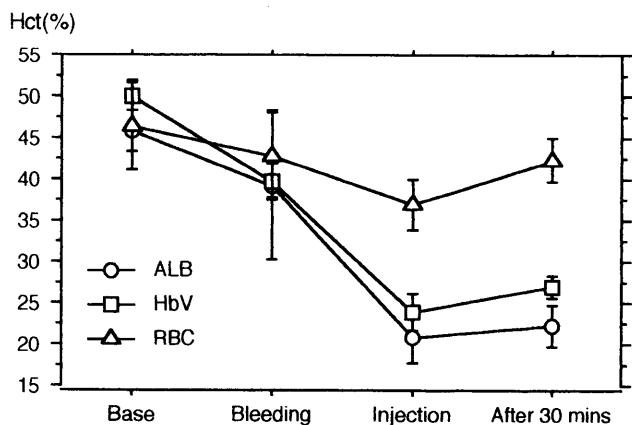


Fig. 2. Changes in hematocrit (Hct).

MAP(%)

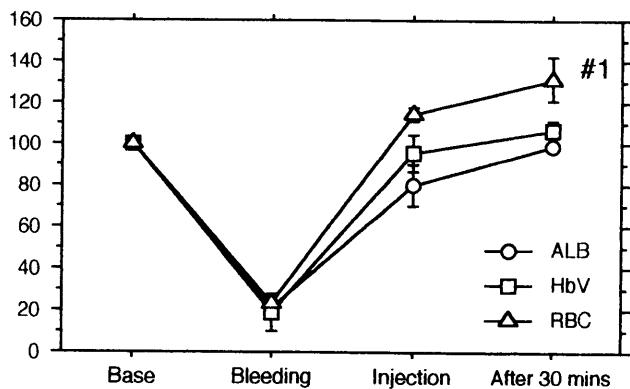


Fig. 3. Changes in mean arterial pressure (MAP).

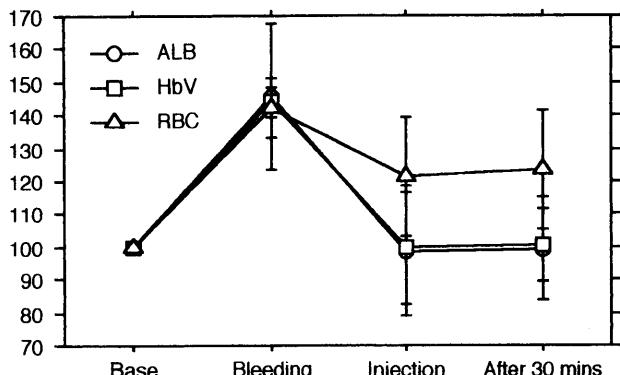
#1=P<0.05 RBC vs HbV, ALB.

であり、さらに溶液中のHb濃度を高めることが可能、しかも粘度が4cpと低いということ、P<sub>50</sub>は32Torrと酸素親和度は赤血球よりも低く組織における酸素放出量が大きいということ等がある。以前我々はラットを用いた交換輸血モデルにおいて腎皮質組織酸素分压を中心としたHbVの酸素運搬能の評価をおこなった。この実験においてHbVは赤血球とほぼ同等の酸素運搬能を有すると考えられた。人工酸素運搬体は救急医療においてもその保存に関する利点、交差試験が不要であること等から応用が期待され、その第一の適応は出血性ショックに対する投与であると考えられた。本実験ではラットを用いた出血性ショックモデルにおいてHbVの投与効果を腎皮質および骨格筋組織酸素分压を中心に検討した。

## 2.方法と対象

### 2.1. HbVの調製

詳細は他の報告<sup>2-6</sup>に譲りここでは概略を述べる。Hbの精製は期限切れ濃厚赤血球(北海道赤十字センターより供与)より行った。HbVは無菌条件にて調製した。赤血球内のHbを一酸化炭素化したのち、有機溶剤処理、加熱処理、透析、濃縮をへて濃厚な精製

PaO<sub>2</sub>(%)Fig.4. Changes in arterial oxygen tension (PaO<sub>2</sub>).

pH

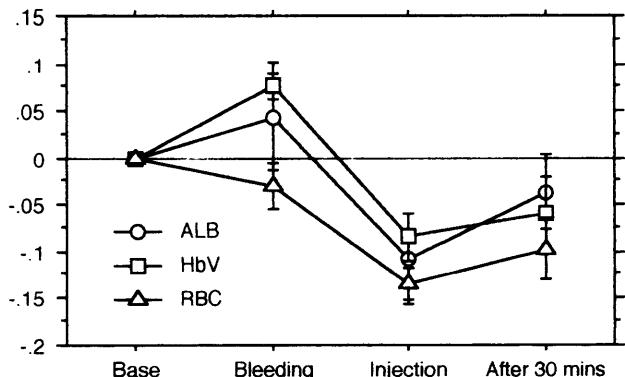
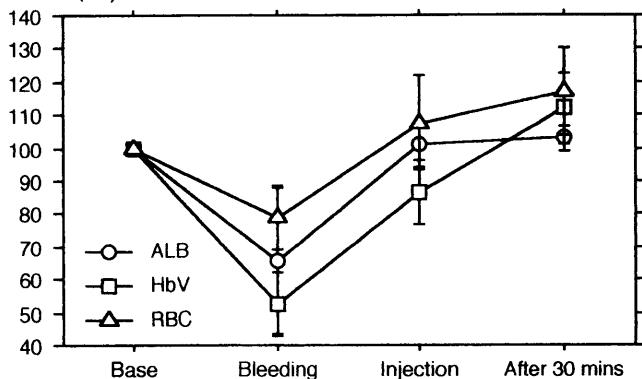


Fig.6. Changes in arterial pH.

PaCO<sub>2</sub>(%)Fig.5. Changes in arterial carbon dioxide tension (PaCO<sub>2</sub>).

B.E.(mmol/l)

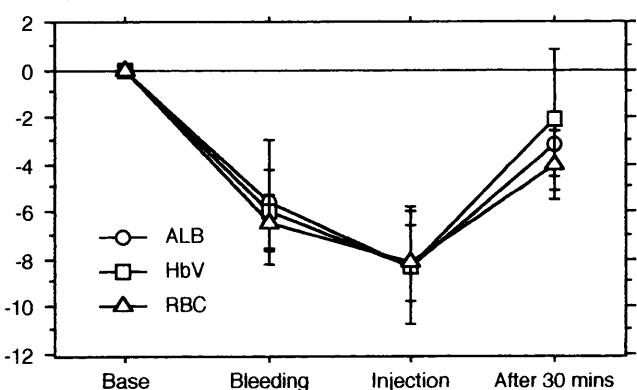


Fig.7. Changes in arterial base excess (BE).

HbCO溶液(40g/dL)を得た。これにDL-homocysteine(Hcy, Aldrich)を15mM, pyridoxal 5'-phosphate(PLP, Merck)をHbに対して3倍mol添加した。HbVの膜成分には、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine(DPPC), cholesterol, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol(DPPG), および $\alpha$ -tocopherol( $\alpha$ -Toc, Merck)を用い、組成比をDPPC/cholesterol/DPPG/ $\alpha$ -Toc=10/10/2/0.2(モル比)とした。この混合脂質をHbCO溶液に分散して得られた多重層小胞体をエクストルージョン法により最終的に孔径0.22μmのフィルターを透過させて粒径を0.25μmに制御した。外水相のHbを洗浄除去後、酸素気流下HbVが形成する液膜に可視光照射することによりHbCOをHbCO<sub>2</sub>に変換し、5%アルブミン(pH7.4, 37°C)に分散させてHb濃度を10g/dLに調節した。

## 2.2. HbVの特徴(Table 1)

粒径は251±87nmに制御された。メトヘモグロビン(metHb)濃度は3%以下、HbCO濃度は2%以下であった。酸素親和度(P<sub>50</sub>)は32Torrに調節した。Hb濃度を10g/dLとしても脂質濃度は6.2g/dLと低く抑えられた。なお今回用いた試料は5%アルブミン溶液で調製したため粘度は8-9cp(230 s<sup>-1</sup>)と血液よりかなり高かった。

## 2.3. 洗浄赤血球の調製

ヘパリン加ラット脱血液を遠心し上澄を除去した後5%アルブミンで2回洗浄しラット洗浄赤血球を得た。Hb濃度はHbVと同様に10g/dLとした。また、投与前に交差試験により凝集が起らぬることを確認した。

## 2.4. 対象

動物種は雄、ウイスターラット12匹(体重376±15g)を対象とした。

## 2.5. 実験方法(Fig.1)

麻酔はpentobarbital sodiumの腹腔内注入(50mg/kg)で行った。麻酔後仰臥位に固定し、呼吸は自発呼吸とした。右鎖骨上部を切開し右頸動脈と頸静脈にそれぞれカテーテル(PE-20, 内径0.5mm×外径0.8mm)を挿入した。右頸動脈カテーテルは圧トランステューサーに接続し、血圧測定装置(日本光電, Polygraph System)にて平均体血圧(MAP)を連続的に測定、記録した。また、同カテーテルから採血、脱血をおこなった。右頸静脈カテーテルより各試料の注入をおこなった。頸二腹筋および左腎皮質に針型酸素電極(POE-10N, インターメディカル社)を挿入し同部の組織酸素分压(PtO<sub>2</sub>)を連続的に測定、記録した。実験操作は1mL/minの速度で

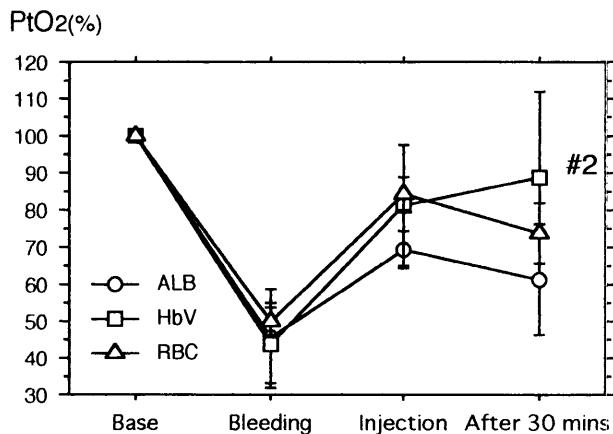


Fig.8. Changes in renal cortical tissue oxygen tension (PtO<sub>2</sub>). #2=P>0.05 HbV vs ALB.

頸動脈カテーテルより推定循環血液量(56mL/kg)の50%を脱血後頸静脈カテーテルより同じ速度で各試料の注入をおこなった。注入量は脱血量と同量とした。試料としては5%アルブミンで調製したHbV(HbV群, n=4)および対照として5%アルブミン(ALB群, n=4), 5%アルブミンで調製したラット洗浄赤血球(RBC群, n=4)を用いた。脱血前, 脱血後, 試料投与後, 試料投与30分後に頸動脈カテーテルより採血しヘマトクリット(Ht)の測定, 血液ガス分析(Corning pH/blood gas analyzer, Corning Medical Co., Ltd.)を行った。

## 2.6. 数値解析

初期値からの変化を各群間で比較するため, MAP, PtO<sub>2</sub>, 動脈血酸素分圧(PaO<sub>2</sub>), 動脈血二酸化炭素分圧(PaCO<sub>2</sub>)に関しては初期値を100%とした時の変化率として, またpH, 塩基余剰(BE)に関しては初期値からの変化量として表記した。測定値および計算値はすべてmean±SD(標準偏差)を用い, 有意差の検定にはFisherのPLSD (Protected Least Significant Difference) テストを用いた。有意水準は5%とした。

## 3. 結果

### 3.1. Hct値の変化(Fig.2)

試料投与後, Hct値はALB群とHbV群において前値の約50%に低下した。これは、推定循環血液量から計算した脱血量が実際に循環血液量の約50%であったと思われた。

### 3.2. MAPの変化(Fig.3)

脱血により全群で前値の約20%までの低下が認められた。試料投与により全群で改善が認められた。試料投与終了時RBC群ではMAPは他の2群に比べ、有意に高値(114.1±3.4%)であった。HbV群はALB群より高値(95.5±8.7%)を示したが有意差はなかった。試料投与30分後においても同様であった。

### 3.3. PaO<sub>2</sub>の変化(Fig.4)

脱血終了時, 全群で過呼吸によると思われる上昇が認められたが、試料投与後は再び低下した。いずれの群間にも有意差は認め

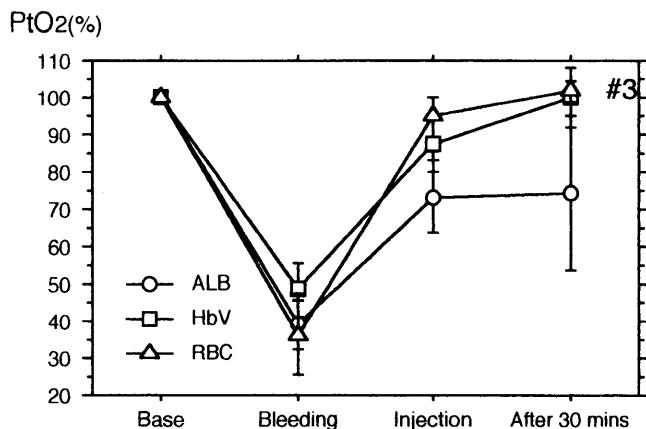


Fig.9. Changes in skeletal muscle tissue oxygen tension (PtO<sub>2</sub>).

られなかった。

### 3.4. PaCO<sub>2</sub>の変化(Fig.5)

脱血終了時, 全群で低下が認められた。PaO<sub>2</sub>と同様脱血により誘発された過呼吸によるものと思われた。試料投与により全群で再上昇が認められた。各群間に有意差は認められなかった。

### 3.5. pHの変化(Fig.6)

脱血終了時には標準偏差の増大はあるものの各群において前値と比べ有意な変化は認められなかった。試料投与後pHはむしろ低下し30分後も全群で若干の上昇が認められるのみであった。

### 3.6. 塩基余剰(BE)の変化(Fig.7)

脱血終了時全群で低下が認められ試料投与終了後もさらに低下した。試料投与終了30分後には全群で改善が認められるものの前値には至らなかった。いずれの時点においても各群間に有意差は認められなかった。

### 3.7. 腎皮質酸素分圧の変化(Fig.8)

脱血とともに全群で前値の約45%まで低下した。試料投与終了時HbV群とRBC群では各々前値の81.3±16.3%, 84.4±4.3%まで回復したがALB群では69.6±5.0%までにとどまった。HbV群, RBC群とALB群の3群の間に有意差は認められなかった。ただし投与終了後30分ではHbV群とALB群の間に有意差が認められた。

### 3.8. 骨格筋酸素分圧の変化(Fig.9)

腎皮質の酸素分圧と同様, 脱血時全群で低下が認められ試料投与により回復が認められている。試料投与終了時HbV群とRBC群(87.5±7.6%, 94.8±5.6%)はALB群(73.4±9.9%)に比べ有意に高値であった。これは投与終了後30分においても同様であった。

## 4. 考察

出血性ショックの病態は循環血液量の減少, 体血压の低下から静脈灌流量の減少, さらに心拍出量の減少をきたすことによってもたらされる<sup>7)</sup>。従ってその治療の主眼は循環血液量の回復に置

かかる。しかし循環血液の損失が高度であり赤血球の減少により血液中の酸素含有量の低下が無視できなくなると、循環血液量が充足されても組織への酸素運搬は不十分となる。通常はこの時点で赤血球輸血が必要となり、Hct 20%前後がその臨界点といわれている<sup>8)</sup>。

本実験ではPaO<sub>2</sub>は各群ではほぼ同様に推移し、呼吸状態に関しては各群間で差は無かったと考えられた。また末梢組織の代謝の指標として測定したpHとBEについても各群間でその推移に差は見られなかった。ただし、これらの指標の評価にはもう少し長い観察期間が必要であると思われた。MAPについては、HbV群はALB群と比較し試料投与後の値は高く保たれたが有意差は無かった。またRBC群に比しては有意に低値であった。腎皮質および骨格筋PtO<sub>2</sub>においてはALB群と比較し、HbV群はRBC群とともに高い傾向にあり、骨格筋PtO<sub>2</sub>では有意な差を認めた。

これらの結果より、HbV群はALB群に比べRBC群により近いデータが得られたが有意差が認められたのは腎皮質、骨格筋PtO<sub>2</sub>のみであった。一方RBC群においてもALB群との間で有意差が認められたのは腎皮質、骨格筋PtO<sub>2</sub>以外にはMAPのみであった。本実験で行った循環血液量の50%における出血は、短時間であれ、生体が無治療で耐え得る出血量の限界であると考えられる。このとき同量の試料投与後のHctは約20%まで低下した。これは酸素運搬に必要とされる下限値であるが、ALB群において末梢組織の代謝の指標として測定したpHとBEが比較的良好に保たれた原因の一つは残存赤血球により酸素が運搬されたことによると思われた。このことは同時に急性期における酸素運搬の評価に出血性ショックモデルを用いることの一つの限界を表わしていると考えられた。一方、骨格筋や腎皮質におけるPtO<sub>2</sub>は末梢組織への酸素運搬量の指標となることが報告されている<sup>9-15)</sup>。本実験において各群間に差の認められたPtO<sub>2</sub>は出血性ショック時にも末梢の酸素運搬状況を鋭敏に反映する指標となる可能性が示唆された。HbVの有する酸素運搬能により、HbV群のPtO<sub>2</sub>はRBC群のそれと比較し近い値で推移したと考えられた。

以上よりHbVは赤血球輸血を必要とする出血性ショックに対し有用である可能性が示唆された。

## 5. 結論

- 1) pH、BE、PaO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub>については全群ではほぼ同様の推移が認められ各試料間にはあきらかな差は認められなかった。
- 2) 平均体圧については、HbV群はALB群と比較し試料投与後の値は高く保たれたが、RBC群はHbV群に比して有意に高値であった。
- 3) 腎皮質酸素分圧、骨格筋酸素分圧においてはALB群と比較しHbV群はRBC群とともに高い傾向にあり、骨格筋酸素分圧では有意な差を認めた。
- 4) 総合的にみてALB群とHbV群の差が明瞭に現われたとは言えないが、HbV群ではRBC群により近いデータが得られた。50%出血性ショックという病態に対しHbVの投与は酸素運搬能の面で赤血球投与と同様の効果があると思われた。

本論文の要旨は第3回日本血液代替物学会にて発表した。

## 謝辞

本研究の一部は文部省科学研究費補助金(07508005)によって

行った。

## 参考文献

1. Izumi Y, Sakai H, Hamada K, Takeoka S, Yamahata T, Kato R, Nishide H, Tsuchida E, Kobayashi K. Physiologic responses to exchange transfusion with hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier in anesthetized rats: Changes in mean arterial pressure and renal cortical tissue oxygen tension. Crit Care Med 1996;24:1869-74.
2. Sakai H, Takeoka S, Hamada K, Nishide H, Tsuchida E. Physical properties of hemoglobin vesicles as red cell substitutes. Biotechnol Prog 1996;11:119-25.
3. Takeoka S, Terase K, Yokohama H, Sakai H, Nishide H, Tsuchida E. Interaction between phospholipid assemblies and hemoglobin (Hb). J Macromol Chem Pure Appl Chem 1994;A31:97-108.
4. 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.
5. Sakai H, Takeoka S, Seino Y, Tsuchida E. Suppression of metHb formation by glutathione in a concentrated hemoglobin solution and in a hemoglobin-vesicle. Bull Chem Soc Jpn 1994;67:1120-5.
6. 郷主恩, 濱田健一, 酒井宏水, 武岡真司, 土田英俊. ヘモグロビン液膜のカルボニルヘモグロビンからオキシヘモグロビンへの配位子交換. 日本化学会 1995;2:123-7.
7. 緒方博丸, 羅小星, 卜部和昌. 出血性ショック時の心・循環動態に及ぼす20%高張食塩水の影響. 麻酔 1992;41:1133-9.
8. Messmer K, Brendel W, Sunder-Plassmann L, Holper K. The use of colloidal solution for extreme hemodilution. Bibl Haematol 1969; 33:261-9.
9. Lent V, Kesseler M. Cortical oxygen pressure during acute venous kidney obstructions. Urol Res 1982;10:7-11.
10. Littoty F, Fuchs R, Hunt TK. Tissue oxygen as a renal-time measure of oxygen transport. J Surg Res 1976;20:321-5.
11. Furuse A, Brawley RK, Struve E, Gott VL. Skeletal muscle gas tension: Indicator of cardiac output and peripheral tissue perfusion. Surgery 1973;74:214-22.
12. Kram HB, Appel PL, Fleming AW, Shoemaker WC. Assessment of intestinal and renal perfusion using surface oximetry. Crit Care Med 1986;14:707-13.
13. Gutierrez G, Marini C, Acero AL. Skeletal muscle PO<sub>2</sub> during hypovolemia and isovolemic anemia. J Appl Physiol 1990;68:2047-53.
14. Tremper KK, Waxman K, Shoemaker WC. Effects of hypoxia and shock on transcutaneous PO<sub>2</sub> values in dogs. Crit Care Med 1979;7: 526-31.
15. Murakawa K, Kobayashi A. Effect of vasoresponse on renal tissue gas tension during hemorrhagic shock in dogs. Crit Care Med 1988; 16:789-92.

## 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こと。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。
- 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, Andracci 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。それを超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. 5 (1) 1997年3月31日発行

〒169 東京都新宿区大久保3

早稲田大学理工学総合研究センター55S棟701号

TEL (03)5286-3120 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