

人工血液

第6巻 第1号 1998年3月

目次

- 総説 血小板代替物の意義と開発の現状 村田 満 1
大気中炭酸ガス濃度の上昇からみた赤血球カーボニックアンヒドラーゼの生理的意義 友田燁夫 6
Blood Program and the Possibility of Applying Red Cell Substitutes in Thailand ラチャニー・オチャロエン 11
- 原著 リポソーム内包型ヘモグロビンによる全血由来炎症性サイトカイン産生の修飾 池淵研二 13
- 講演会 「人工赤血球の開発状況」から 池淵研二 17
- 学会報告 IBC's 5th Annual Conference, BLOOD SUBSTITUTES Latest Pre-clinical and Clinical Developmentsに参加して 渡辺真純 20

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 6 No. 1 March, 1998

Contents

- Review: Development and Clinical Implications of Platelet Substitutes*
..... Mitsuru Murata 1
Physiological Significance of Red Cell Carbonic Anhydrase Related with the Increased Concentration of Atmospheric Carbon Dioxide
..... Akio Tomoda 6
Blood Program and the Possibility of Applying Red Cell Substitutes in Thailand Rachanee O-charoen 11
- Original Article:*
Modification of Inflammatory Cytokine Production in Whole Blood by Liposome-encapsulated Hemoglobin Kenji Ikebuchi 13
- Lecture: Current Status on the Development of Red Cell Substitutes*
..... Kenji Ikebuchi 17
- Report: IBC's 5th Annual Conference, BLOOD SUBSTITUTES Latest Pre-clinical and Clinical Developments* Masazumi Watanabe 20

会告

第5回日本血液代替物学会年次大会

テーマ

「人工血液，輸血のリスクをなくするために」

会長：関口 定美（北海道赤十字血液センター所長）

会期：1998年9月4日(金)，5日(土)

会場：かでの 2・7

〒060-0002

札幌市中央区北2条西7丁目

応募用紙：人工血液1998年第6巻1号に綴じ込み
(又は下記にご請求下さい)

演題募集：一般演題

演題締切：1998年5月29日(金)消印有効

演題送付先・連絡先

：〒063-0002 札幌市西区山の手2-2

北海道赤十字血液センター内

第5回日本血液代替物学会年次大会

大会長 関口 定美

Phone 011-613-6640 FAX 011-613-4131

e-mail sekiguti@hokkaido.bc.jrc.or.jp

血小板代替物の意義と開発の現状

Development and Clinical Implications of Platelet Substitutes

村田 満, 池田康夫

Mitsuru Murata, Yasuo Ikeda

1. はじめに—人工血小板はなぜ必要か

血小板輸血は、癌・造血器腫瘍などの治療や、外科手術における欠くことの出来ない補助治療法として非常に重要な位置を占めており、現在その使用量が年間約10%も増加していることや、21世紀に於ける医療の展開を考えると、その重要性は一層増すことが予想される。しかし、血小板輸血には解決すべき2つの大きな課題がある。一つはその需要の増加と血小板の短い保存期間の為に起こる供給不足・緊急時供給体制の不備であり、もう一つは他の血液製剤と同様、血小板製剤による輸血後のウイルス感染症をはじめとする輸血副作用発現の危険性である。これらの重要な課題を解決するため、学会が中心となって血小板輸血の適応に関するガイドライン作成に取り組み、不必要な輸血を減少させるよう努力がなされているが、赤血球輸血と異なり、自己血輸血の推進は図れず、その意味でウイルス感染症などの副作用発現の危険性を有する同種血を可及的に回避し得る人工血小板・血小板代替物の開発・臨床応用は、21世紀の医療の当然目指すべき方向といえる。血小板は常温で数日間保存可能であるが、その後は急速に機能の喪失をきたす¹⁾。現在血小板製剤の有効期限は献血後72時間とされているがこの間に検査を迅速に行い、型のあった製剤を提供することは、献血体制がよく整備されドナーの協力もよい我が国においては、通常の場合問題ないように見えるが、僻地や災害発生時は別である。常時使用可能な人工血小板・血小板代替物を開発することは、血液事業の効率化のみならず、緊急災害時の備えという観点からも重要であり、さらに輸血後感染症の回避を解決し得る点でのインパクトは非常に大きい。

2. 血小板代替物に必要な機能

血小板の機能は粘着、凝集、放出、血餅退縮、向凝固活性など非常に多岐にわたり、これをすべて兼ね備える人工代替物の開発は非常に困難と考えられる。しかし出血部位で効率よく働き、粘着や凝集を起こすことにより血管の穴を閉鎖し、放出反応はなくても近傍に少数残存する正常血小板の機能を補助し止血効果を増強出来るもので良い。

血小板機能の最も基本的かつ重要なものは粘着と凝集である。これは粘着や凝集を欠如する出血性疾患Bernard-Soulier症候群や血小板無力症(血小板膜糖蛋白の先天性欠損症)に於いて出血傾向

が強く認められることから想像できる。従って最も単純な人工血小板は、これら膜受容体蛋白を担体に固相化したものであると思われる。問題点は(1)担体を何にするか(2)固相化する機能発現物質に何を選ぶかであろう。前者については、適当な大きさを持ち、異物としての認識が少なく、かつ担体として機能蛋白を十分に固定できるものがよく、後者では、粘着に重要なフォンビルブランド因子(vWF)の受容体であるGPIIb/IXまたはコラーゲン受容体であるGPIaIIaや凝集に必須なGPIIb/IIIaなどがその候補となる(Fig.1).

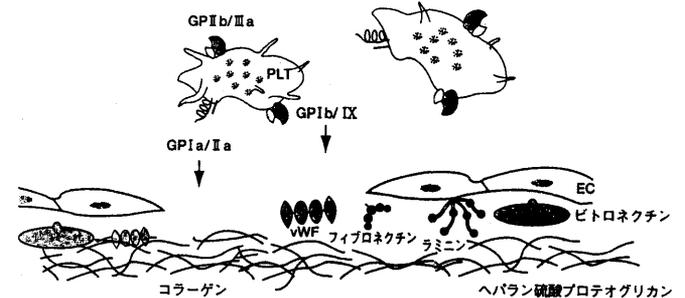


Fig.1 Major adhesive ligands in subendothelial tissues and their platelet receptors. Glycoprotein(GP)IaIIa and GPIIb/IX are receptors for collagen and von Willebrand factor(vWF), respectively. GPIIb/IIIa binds to several substances including fibrinogen, vWF and fibronectin.

3. 血小板代替物開発の現状

人工血小板・血小板代替物の開発の状況を一言で言えば、「始まったばかりである」と言うことが出来る。1996年、FDA、AHAなどの共催でUS Army Combat Casualty Care Research Program, Naval Medical Research and Department Commandらが、Washington DCで第一回の“Frozen Platelets and Platelet Substitutes in Transfusion Medicine”と題する会合を持ち、その必要性、評価方法などについて、初めて議論がなされると共に、これまでの研究がレビューされた。リポソームを担体とし、デオキシコレートで可溶化した血小板膜糖蛋白をそれに固定化したもの(Rybak et al⁵⁾), 赤血球を利用し、その膜表面に血小板と結合し得るフィブリノーゲンやRGDペプチドを固定し、赤血球と血小板の凝集を促進させることを目的としたもの(Coller et al⁶⁾, Agam G and Livine

慶應義塾大学医学部内科, 〒160-0016 東京都新宿区信濃町35. Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0016, Japan.

AA⁷⁾などが狭義の意味の人工血小板・血小板代替物として挙げられるが、これらはin vitroの実験系や動物実験で血小板代替物としての可能性が僅かに示されたに過ぎず、生体での止血の分子機構の理論に基づいて緻密にデザインされたものではなく、その後の研究の展開は無い。1997年の米国血液学会の際、Cypress Bioscience Incと The Scripps Clinic and Research Foundationとの協賛で、“Current Advances in Platelet Substitutes”と題されたシンポジウムが開かれた。ModeratorとしてScrippsのTJ Kunickiが、speakerとして、JN George, D Petz, T Leid, R Aster, H Enright, A Bode, C Schiffer, J Fratantoniらが参加した。1996年春に上述のFrozen Platelets and Platelet Substitutes in Transfusion Medicineカンファレンスに参加し、米国で人工血小板への関心が高く、真剣に議論されていることを周知していた筆者は、今回それから2年近く経過しており、この分野がどれだけの進歩を遂げたか楽しみあった。しかし結果はやや期待はずれで、結局、それぞれの専門家が、血小板機能の理論、血小板輸血の現状と問題点、lyophilized plateletや血小板の低温保存、現在まで開発途上にある血小板代替物のoverviewを行ったにとどまった。以前、PRP社が開発していたInfusible Platelet Membrane™(IPM)は、現在Cypress Bioscience Incが、「Cyplex™」という名のもとで臨床治療を行っており、このデータが比較的詳細に紹介されたにとどまった。

4. 開発途上の血小板代替物(Table 1, Fig.2参照)

Table 1とFig.2にこれまでに血小板代替物としての可能性が示唆された物質を示した⁸⁾。Agamら⁷⁾は担体として正常ヒト赤血球を用い、フィブリノーゲンを共有結合的に赤血球に固相化した。この赤血球は正常血小板と混合すると凝集塊の中に巻き込まれることを示し、さらにこの赤血球を血小板減少ラットに輸注するとラットの出血時間が短縮することを報告した。この赤血球は無処理赤血球と形態学的に差異を認めず、また浸透圧脆弱性、ヘモグロビン量、アセチルコリンエステラーゼ活性、マクロファージによる貪食などの点でも変化がなかったという。またCollerら⁹⁾はthromboerythrocyteと呼ばれる赤血球を作製した。これはフィブリノーゲンのアミノ酸配列でGPIIb/IIIaとの結合に関係するRGD配列をもった合成ペプチドAc-CGGRGDF-NH₂を共有結合で赤血球膜に固定したものであり、この赤血球は活性化血小板(GPIIb/IIIa)と特異的に反応し凝集に参画することが判明した。ThromboerythrocyteはADP存在下で凝集を引き起こし、この凝集が抗GPIIb/IIIaモノクローナル抗体である10E5で抑制されることから、GPIIb/IIIaを介した特異的凝集であることがわかった。またthromboerythrocyteはコラーゲン上に粘着した血小板に対して粘着性を示し、血小板減少時に血管損傷部位で血小板粘着を補強する可能性が示された。作製時の体外処理による溶血は認めず、浸透圧脆弱性も問題なかったとされている。自己の赤血球を体外で処理して体内に戻すことにより、血小板減少症に於ける出血傾向を緩和しうる点は注目された。また最近Rybakら⁵⁾はplateletsomeと呼ばれる、リポソームを担体とした血小板代替物を作製した。これはdeoxycholateで可溶化した血小板膜蛋白をリポソームに固定したもので、GPIb, GPIIb/IIIa, GPIVなど15種類以上の膜蛋白が

Table 1 Substances developed for potential use for platelet substitutes.

名称	内容
Fibrinogen-RBC	フィブリノーゲンを固相化した正常ヒト赤血球
Thromboerythrocyte	RGD配列をもつペプチドを共有結合させたヒト赤血球
Plateletsome	可溶性血小板膜蛋白を固相化したリポソーム
Infusible Platelet Membrane	正常ヒト血小板を破壊、加熱処理後、乾燥させたもの
Thrombosphere	ヒトアルブミン粒子の表面にヒトフィブリノーゲンを固相化
rGPIb α -Liposome	遺伝子組換えGPIb α をリポソームに固相化

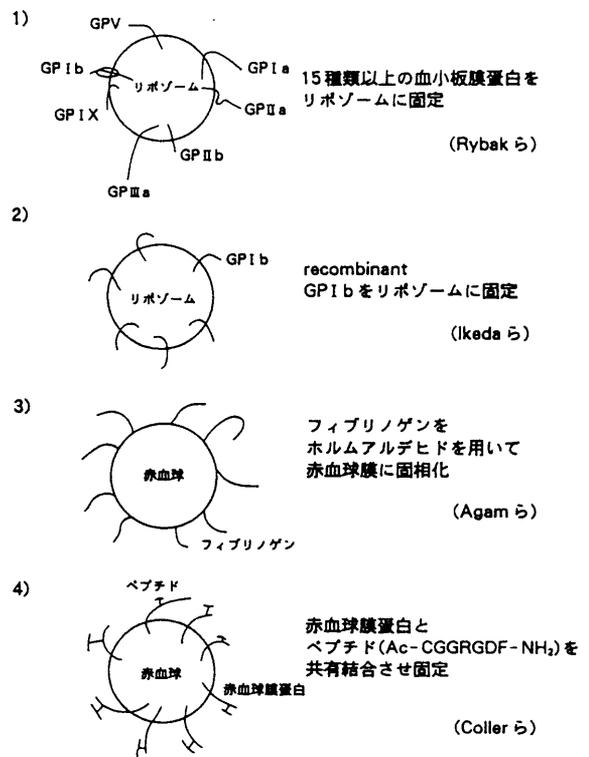


Fig.2 Substances developed for potential use for platelet substitutes (see Table 1).

- 1)Plateletsome 2)rGPIb α -liposome 3)Fibrinogen-RBC
4)Thromboerythrocyte

含まれている。これを放射線照射により血小板減少を起こさせたラットやstorage pool deficiencyで血小板機能異常を有するラットに輸注すると、尾切後の出血量が軽減するというものである。in vitroにおける血小板機能の抑制や亢進作用も示さず、特に重篤な副作用もないことから血小板代替物の1つのモデルとして興味深い。

一方、米国PRP社はInfusible Platelet Membrane™(IPM)なるヒト血小板由来物質から成る粉末製剤を開発した^{9,10)}。前述のように

これは現在ではCyplex™と呼ばれているがこの製剤は期限切れ血小板輸血製剤を反復凍結融解させることにより破壊し、加熱処理後乾燥させたもので、4°Cで約36か月保存可能であるという。構成成分の詳細な発表はないが、リン脂質と糖蛋白が主成分であり、その粒子の大きさは正常血小板の約10分の1である。ELISAによりGPIbが同定されているが、他の糖蛋白(GPIIb/IIIaなど)は検出されない。この理由は不明であるが作製過程で構造変化などにより抗原性が失われたものと想定されている。また血小板向凝固活性(procoagulant activity)を有する(170-330U/mg protein)。他の凝固因子(V, VIII, IX, Xなど)の活性はなく、またHLA抗原も陰性である。動物実験ではbusulfan投与で血小板減少となったラビットに2mg/kgを投与したところ、出血時間の短縮をみたという。この効果は約6-7時間続き、その後は出血時間は元のレベルに戻るとされる。毒性試験では数種の動物が試されたが、生化学的検査、病理組織検査をも含めて一切異常は観察されていない。血栓形成誘発作用は認めず、またラビットのエンドトキシン誘発DICを悪化させることもなかった。ヒトに投与される時はウイルスの伝播が懸念される所だが、熱処理による実験的virus decontaminationではSV40, HIV, CMVでの実験でそれぞれ約6 logの減少が観察された。第I相試験では74人の正常人にIPMが数種類の用量(最大6mg/kg)で投与されたが、臨床上市に問題なく生化学的、凝血的検査に於ても異常を認めていない。アスピリン服用者で出血時間の延長が見られたものについてはIPM投与により出血時間が短縮したという。Cyplexに対する抗体の出現についても追跡調査されたが、いずれも抗体の出現は認められずHLA抗体の出現もなかったという。臨床第II相試験では血小板数5万以下かつactive bleedingを認める患者にCyplexまたは対照として血小板輸血が施行された。血小板輸血に反応する患者14人中10人に、また血小板輸血不応患者12人中7人に出血症状の改善をみたという(Fig.3)。Cyplexは(1)加熱処理が可能であり感染症のリスクが少ない(2)HLA(特にclass II)が認められないため、免疫原性が少ない(3)保存可能期間が長い(36か月)(4)白血球の混入がないことから発熱などの反応がない(5)血小板輸血不応患者にも効果を認める可能性があるなどの利点を有する一方、その作用機序が明確にされていない点が問題である。恐らくはGPIb抗原を含む粒子が出血部位の内皮下組織に粘着し、あるいは血漿vWFをその粒子上に集めることにより残存正常血小板の血栓形成を容易にする、または血栓を大きくする、などによって止血効果を発揮するものと思われる。また血小板向凝固活性が止血に効いている可能性もある。

最近我々は遺伝子組み換えGPIb α を導入したリポソーム(rGPIb α -liposome)を作製し、in vitroでの成績を得ている¹¹⁻¹³⁾。rGPIb α -liposomeはCHO細胞にヒトGPIb α ¹⁻³⁰²をコードするcDNA導入して得られたrGPIb α を、アフィニティーカラムで精製し、これをN-glutaryl-phosphatidyl ethanolamine(NGPE)を用いて卵黄レシチン:コレステロール:フォスファチジルグリセロール(モル比10:5:2)で構成されるリポソームに導入したものである。rGPIb α 導入リポソームのリン脂質最終濃度は約1.4mg/mL、rGPIb α の蛋白濃度は1mg/mL、リポソームの平均粒子径は330nmとなった。リポソームへのrGPIb α の導入の確認はフローサイトメトリーを用いて行なった。このrGPIb α -liposomeとGPIbのリガンドであるvWFの反応を検討するため、rGPIb α -liposomeにvWFを終濃度50 μ g/mL添

加し、リストセチン1 mg/mLでリポソームの凝集を観察したところrGPIb α -liposomeとvWFを混合しただけでは凝集せず、リストセチン添加後にリポソーム凝集が起こっていることが分かった。しかもこの凝集は抗vWFモノクローナル抗体で完全に抑制されており、特異的凝集であることが示唆された。さらにこの凝集は、ローダミン標識リポソームを用いて形態学的に確認された。これらの成績はGPIb α がリポソーム表面上で機能を持ち、しかも可溶

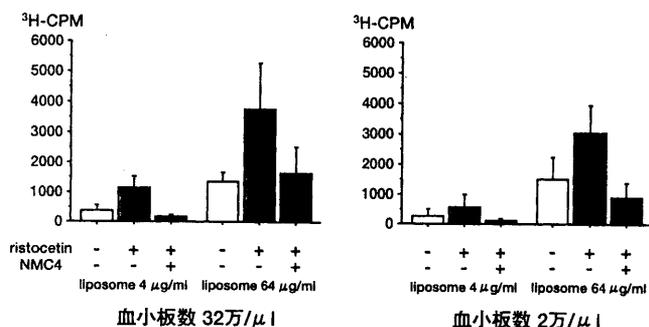


Fig.3 Involvement of rGPIb α -liposome into platelet aggregates. ³H-labeled rGPIb α -liposome was first mixed with platelet rich plasma, then ristocetin was added to the mixture to induce platelet aggregation. After centrifugation, pellet was counted for radioactivity. Involvement of rGPIb α -liposome to platelet aggregates was evident. This was inhibited by a monoclonal anti-vWF antibody NMC4(kindly provided by Dr. Yoshioka at Nara Medical University), suggesting that the reaction is specific.

Cyplex™ Phase I Data

- 6 studies, 74 subjects
- Safety: No dose-limiting toxicity
No side effect
No thrombotic events
- Immunogenicity: No antibody formation
(anti-IPM, anti-PLTs)

Cyplex™ Phase II Pilot Study

- 7 institutions, 31 patients with active bleeding
- Open-labeled, randomized(Cyplex™: Platelets=5:1)
- ITP, TTP, DIC were excluded
- Single dose Cyplex™(2, 4, 6mg/kg) or platelet transfusion
- End-point: Control of bleeding

↓

Positive response for Cyplex™ was seen in
65%(10/14) of patients who were platelet responders
58%(7/12) of patients who were refractory to platelets

Fig.4 Clinical trials of Cyplex™. Phase II pilot study has been completed by the end of 1997. Phase II will be continued in 1998.

性vWFと自然には反応せずリストセチンを必要としていることから血小板上と同様の調節機構が働いている可能性がある。これはin vivoに投与した際に血小板と同様に流血中では勝手に凝集せず、構造変化したvWF(例えば内皮下組織に固相化されたvWF)と粘着凝集する可能性を示している。さらに我々はこのリポソームが正常血小板と反応し、その凝集塊に巻き込まれることを見いだした。Fig.4は³H標識rGPIIb α -liposomeをplatelet rich plasmaと混合し、リストセチン凝集を惹起した際の血小板凝集塊中の放射活性を調べたものであるが、rGPIIb α -liposomeが特異的に取り込まれていることがわかる。そしてこの際、rGPIIb α -liposomeは用量依存的に血小板凝集を増強させることも判明し(図なし)¹³⁾、このリポソームの止血補助機能に期待がもたれた。

5. 日本における人工血小板開発の将来

血小板代替物を臨床使用するにあたって、何をどこまで代替物に期待するかは重要なポイントである。これまでに数々の人工臓器組織が開発されてきたが、これらには、その難易を規定する幾つかの要素があると思われる。すなわち、代用すべき臓器(組織)の機能と複雑さ、またその機能が常に発揮しているのかそれとも必要な場合だけ発揮されるべきか(機能のコントロール)、また対象とする臓器(組織)の機能の一部代用か100%代用か、永久に代行するか一時的に代行するか、などである。また代用物としてはハイブリッド型人工臓器(生体物質と人工物の共存)と完全人工臓器が考えられる。血小板代替物としては、細胞融合や遺伝子操作の進歩により、生体組織(細胞)と人工物質を組み合わせることにより、より自然に近い形で血小板機能を代行する物質が開発されるであろう。実際は人工物質のみで血小板のもつ止血作用を遂行させることは困難と考えられ、血小板の調節機能(出血部位だけに効率よく血栓が形成され、しかも組織修復後には血栓は溶解しなくてはならない)をもたせるには、ハイブリッド型がより現実的であると思われる。

輸血による感染症の伝播がないことは血小板代替物に求められる必要条件である。また実地臨床、特に僻地医療で重要な点は比較的長期間保存可能で、必要時に即使用可能であること、また輸注すればある程度効果が持続し繰り返し使用しても免疫により効果が減少しない、重大なアレルギー反応が発生しないことが必要である。さらに重要な点は、輸注された人工血小板は流血中で勝手に機能してはならない(血栓を作ってはならない)ことである。これは人工赤血球や他の移植臓器とは異なる血小板に特異な点である。すなわち傷害血管部位で初めてその機能が発揮されることが大前提である。血小板表面にはその機能発現に重要な膜糖蛋白受容体が存在するが、これらは通常、非活性化状態にあり、出血部位などで内皮下組織が露呈された部分で機能し血小板血栓を作る。理想的には人工血小板にもこの調節機構が備わるべきである。また人工血小板により形成された血栓は止血完了、組織修復の後、正常血小板血栓と同様、溶解吸収されるべきである。さらに人工血小板の存在が正常血小板の機能を抑制しないこと、フィードバックによる正常血小板産生の抑制がないこと、などが条件となる。

血小板機能は赤血球などに比べれば多彩であり粘着、凝集、放出、向凝固活性などが必要な時に必要な場所で起らねばならず

(調節機構の必要性)、また形成された血栓は生体で処理されねばならない。これらをすべて満足する人工代替物の開発は非常に困難と考えられるが、しかし人工血小板代替物それ自身だけで十分な止血効果を得ることは困難でも、生体に残存する生理的止血能(少数ながら残っている血小板や凝固因子など)をうまく利用して止血効果を発揮すれば臨床での目的は達成される。

人工血小板の研究の歴史は、国内外共に浅く、探索的研究を着実に積み重ねて行く努力を通じて、臨床応用可能な人工血小板・血小板代替物の作成を目指すことが必要である。平成9年度にわが国において世界にも類をみない大規模かつ本格的な研究班が厚生省高度先端医療研究事業により組織された。この研究班の特徴は、理想的な人工血小板・血小板代替物を作成するにあたり、流体力学・血栓止血学の基礎理論を確立し、それを重視することであり、また作成されたものの臨床的有用性を適切に評価し得る評価系を別に確立することにより、開発プロセスが効率よく進むように工夫されていることである。研究班がスタートした平成9年度は最大の目標を血管損傷部位に特異的に集積する粒子を創ることとし、血管内皮下組織のコラーゲン、vWFを標的としてそれに粘着し得るリポソームの作製に力が注がれた。vWFのレセプターであるGPIIb α を遺伝子組み換え技術により大量に精製し、それを固相化したリポソーム(rGPIIb α -liposome、上述)が予想通り、粘着能を保持し、ヒト正常血小板とも凝集し得ることが示されたことより、そのin vivoに於ける止血能の評価が計画されている。流動状態下におけるコラーゲンへのヒト血小板粘着を連続的に測定する系が確立され、血小板膜 α 2 β 1インテグリンを介したコラーゲンへの血小板粘着の重要性が明らかとなったことより、 α 2 β 1インテグリンを可溶性蛋白複合体として遺伝子組み換え技術で作製し、liposomeに導入(α 2 β 1-liposome)、GPIIb α -liposomeと同様の機能評価が計画されている。

一方、生体内半減期の短さ、単球などによる貪食など、リポソームのもつ担体としての問題も明らかにされる必要があり、それらを補う方法の開発の他、リポソーム以外の担体として、蛋白重合体も考慮に入れ、止血能を有する蛋白重合体の作製の実験も計画されている。その他、わが国の進んだ凍結乾燥技術を利用して、応用可能な凍結乾燥血小板を創ること¹⁴⁾や、巨核球より分離した細胞胞体が止血能を有し、血小板代替物としての機能を果たし得るかどうかが¹⁵⁾、確認する実験が計画されている。人工赤血球と異なり、人工血小板・血小板代替物の作成は研究が緒に着いたばかりであるが、動物実験を通じて、止血能を有する人工物作成の方向性についての基礎的データが確立し、それに基づいて人工血小板のプロトタイプ像が明らかとなった段階ではその形状・物理化学的性状などについて有効かつ効率の良い血小板代替物の臨床応用を目指して、改変を加えて行く必要がある。そのために、流動状態下におけるヒト血小板の挙動や、血小板代替物となり得る微小粒子の運動について、流体力学理論やモデル実験に基づいた知識を整理することが重要である。本研究班のアプローチは血管傷害部位への効率良い集積と、血小板減少時に想定される血管壁の脆弱性の補強を目指し、血小板粘着の分子機構の理解に基づく人工血小板・血小板代替物の作成であり、独創的アプローチである。血小板の持つ複雑な機能全てを有する人工血小板・血小板代替物を作成することは不可能であるが、これまでの研究からそ

の重要な一部の機能を有するのみでも止血能を発揮し得ると考えられている。そこで、血小板粘着の分子機構に注目し、血管壁に存在する基質蛋白とそれに対応する血小板膜糖蛋白レセプターのペアの同定も並行して研究を進めていかねばならない。一方、血管傷害部位への特異的な集積を考えると、その部位に大量に存在するコラーゲンと反応する血小板膜糖蛋白レセプターの同定とそれを介した粘着機構の解析は重要であり、その情報に基づいて人工血小板・血小板代替物の作成をすることが計画されている。今後、特に血小板減少モデル動物を用いたin vivoの止血能評価には繰り返しの実験が必要である。人への投与という観点に立って、その利点・欠点の解析を行うと同時に、流体力学的研究の作成理論班の研究成果も考慮し、血小板代替物プロトタイプの変更が行われる予定である。

参考文献

- George JN. Changes in platelet membrane glycoproteins during blood bank storage. *Blood Cells* 1992;18:501-11.
- Eaton LA et al. Glycoprotein Ib assays. Activity levels in Bernard-Soulier syndrome and in stored blood bank platelets. *Arch Pathol Lab Med* 1991;115:488-93.
- 半田 誠 他. 可溶性血小板膜蛋白—血小板保存の分子マーカー. 関口定美 編. 血小板輸血の展望. 札幌:エフ・コピント富士書院, 1993;41-50.
- Kickler TS. Improving the quality of stored platelets. *Transfusion* 1991;31:1-3.
- Rybak M and Renzulli LA. A liposome based platelet substitute, the Plateletsome, with hemostatic efficacy. *Biomater Art Cells & Immob Biotech* 1993;21:101-18.
- Coller BS et al. Thromboerythrocyte. In vitro studies of a potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusions. *J Clin Invest* 1992;89:546-55.
- Agam G and Livine AA. Erythrocytes with covalently-bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia. *Eur J Clin Invest* 1992;22:105-12.
- 村田 満, 池田康夫. 血小板代替物—その開発と臨床応用の可能性—. *臨床血液* 1996;37:1353-61.
- Goodnough LT et al. A phase I study of safety and efficacy for Infusible Platelet Membrane in patients. *Blood* 1995;86:610a.
- Seigliano E et al. Infusible platelet membrane for control of bleeding in thrombocytopenic patients. *Frozen Platelets and Platelet Substitutes in Transfusion Medicine(meeting abstract)* 1996;29.
- Murata M et al. Site-directed mutagenesis of a soluble fragment of platelet glycoprotein Ib α demonstrating negatively charged residues involved in von Willebrand factor binding. *J Biol Chem* 1991;266:15474-80.
- 北口哲也 他. Recombinant GPIb α のリボソームへの導入について. *Int J Hematol* 1996;63:301.
- Kitaguchi T et al. Liposomes carrying von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib α enhance ristocetin-induced platelet aggregation. *Thromb Haemostas* 1997;77(Suppl): 181(abstract).
- 高橋恒夫, 仲井邦彦, 佐藤典治, 藤川清三, 田所憲治, 十字猛夫, 村田 満, 池田康夫. 凍結乾燥ヒト血小板の機能. *人工臓器* 1997; 26:637-40.
- Tajika K, Ikebuchi K, Suzuki E, Okano A, Hirashima K, Hirose K, Nakahata T, Asano S. A novel aspects of the maturational step of megakaryocytes in thrombopoiesis: Bundle formation of microtubules in megakaryocytes. *Exp Hematol* 1996;24:291-8.

大気中炭酸ガス濃度の上昇からみた赤血球カーボニックアンヒドラーゼの生理的意義

Physiological Significance of Red Cell Carbonic Anhydrase Related with the Increased Concentration of Atmospheric Carbon Dioxide

友田 燁夫

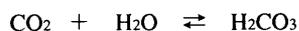
Akio Tomoda

Physiological significance of red cell carbonic anhydrase to metabolize high concentration of inhaled carbon dioxide was discussed in terms of the increased concentrations of atmospheric carbon dioxide. We found that urinary bicarbonate and pH were extensively increased when normal adults were exposed to the increased concentrations of atmospheric carbon dioxide (e.g., when they stayed in a cinema or a car with all windows closed for 3 hours, where carbon dioxide increased extensively). These findings were explained by the metabolism of carbon dioxide to carbonate, and to bicarbonate in blood, resulting in the extensive excretion of bicarbonate into urines.

カーボニックアンヒドラーゼとは

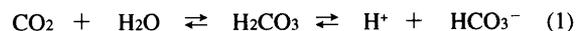
カーボニックアンヒドラーゼは酵素としては水や空気のような存在である。グルコースやアミノ酸を代謝するのではなく、生化学的代謝の要となって働いているものではなく、通常はその存在が忘れられている。しかし、生体の酸塩基平衡を考えるうえでは最もキーパーソンとなっている酵素である。その発見は比較的早く、動物では赤血球や腎臓に存在し、炭酸ガスの血液への溶解にはなくてはならない。また、植物では葉緑素が炭酸ガスを固定する場合に必要な重要な酵素でもある。近年、化石燃料の膨大な消費による大気汚染により、大気中の炭酸ガスが高濃度になりつつあることが強く懸念されている。私達の体はこのような高濃度の炭酸ガスにもかなり耐えられるようになってきているが、それは赤血球カーボニックアンヒドラーゼの存在が見逃せない。私達は大気中の炭酸ガスの増加とともに、尿中の重炭酸イオン濃度が増加することを思いだしており、これはとりもなおさず血液カーボニックアンヒドラーゼが機能して、大気から呼吸により吸収した炭酸ガスを血液中で重炭酸イオンまで代謝して、過剰な重炭酸イオンが尿まで排泄されていることを示している。

生体において炭酸ガスは末梢組織においてカルボン酸の脱炭酸反応、アミノ酸の脱炭酸反応などで生成され、血液中へ排泄される。しかしながら、炭酸ガスの血液への溶解度は非常に低いので、末梢組織で生成される多量の炭酸ガスを血液に一気に溶解させて、肺まで移動させることは不可能である。この問題を解消しているのが、赤血球に含まれるカーボニックアンヒドラーゼである。このカーボニックアンヒドラーゼは循環血にあって、末梢組織で生成される炭酸ガスを



という反応で、炭酸ガスを水と水和させて炭酸(H_2CO_3)に変える。炭酸は血液中では化学平衡($\text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$)により重炭酸イオン(HCO_3^-)になる。重炭酸イオンは静脈血を移動し、肺動脈血では炭酸に変化し、さらにカーボニックアンヒドラーゼの作用で炭酸ガスとなって、肺から呼気に含まれて排出される。

一方、近年大気中の炭酸ガス濃度の増加が、地球温暖化の問題と関連して指摘されている。私達は1992年より大気中の炭酸ガス濃度を測定するとともに、尿中の重炭酸イオン濃度の測定を行ってきた。これは、もし大気中の炭酸ガス濃度が上昇すれば、呼吸による炭酸ガス吸入量が増え、その結果血液中の重炭酸イオン濃度が増加し、その結果尿に排泄される重炭酸イオン濃度が増加するのでないかという考えに基づいたものである。この場合にも、赤血球のカーボニックアンヒドラーゼの存在が重要なポイントとなる。すなわち、呼吸により多量に吸入された炭酸ガスは



の反応で、炭酸を経て重炭酸イオンになる。この場合、水素イオンも形成される。この反応の生理的意義を理解するには、次の過呼吸症候群の患者の簡単な救急治療法の説明で十分であろう。

過呼吸症候群の患者では呼吸による炭酸ガスの排出が多いので、血液中では(1)式の反応は左方向にすすみ、血液中の水素イオン濃度は減少し、血液のpHは弱アルカリ性に傾く。いわゆるアルカリ血症が過呼吸症候群の患者では起こる。このような過呼吸症候群の患者の治療には、患者の顔に紙袋やビニール袋をあてることが行われる。それは、患者の呼吸により呼気に排出された炭酸ガスが、ビニール袋にたまと、患者は逆に濃い炭酸ガスを吸入することになる。その結果、肺から血液中に炭酸ガスが溶解し(赤血球カーボニックアンヒドラーゼの作用による)、(1)式の反応は右方向に進み、水素イオン濃度が増加して血液は弱アルカリ性から中性に戻る。

東京医科大学生化学 〒160 東京都新宿区新宿6-6-1, Department of Biochemistry, Tokyo Medical College, 6-1-1, Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160, Japan.

大気中炭酸ガス濃度と年次推移

1990年代に入ってから、日本における石油消費量は飛躍的に増加した。それに従って大気中の炭酸ガス濃度が増加している。私達は1993年12月から毎年12月を中心に東京周辺の炭酸ガス濃度を測定してきた。1993年12月では450ppmであった炭酸ガス濃度が1997年12月現在では550ppmから600ppmまでの値をとるようになってきている。また、締め切った室内で灯油ストーブを焚いたり、重油によるスチームを使用したりすれば必然的に室内の炭酸ガス濃度は増加する。私達の測定結果から冬場の室内では、東京においては1,200~2,000ppmまで増加していることが示された。この場合、呼吸から排泄される炭酸ガスも締め切った部屋では炭酸ガスの充満に貢献していると考えられる。このような濃度の高い炭酸ガスの吸入により、血液中に重炭酸イオンが増加すると、この重炭酸イオンは必然的に尿に排泄されることになるであろう。私達は東京の大気中の炭酸ガス濃度を測定するとともに、東京の健康成人における尿の重炭酸イオン濃度および尿のpHについて測定を行ってきた^{1,3)}。以下にこれらの結果について述べ、赤血球のカーボニックアンヒドラーゼの役割と地球の環境問題を併せて考えてみたい。

1994年12月の東京周辺および石川県金沢市の路上測定による大気中炭酸ガス濃度の測定結果をTable 1に示す。金沢市での大気中炭酸ガス濃度は当時は概して350ppmであり、世界の標準値(ハワイ島上空1万メートルの大気中の炭酸ガス濃度、日本においては岩手県綾里での大気中の炭酸ガス濃度)とほぼ同じ値を示していた。一方、東京における炭酸ガス濃度はいくつかの測定点において450ppmであり、世界の標準値よりかなり高い値を示していた。

このような大気中の炭酸ガス濃度の違いにより、尿中の重炭酸イオン濃度や尿のpHが変動していないかどうかを私達は検討した。これは高い濃度の炭酸ガスを吸入することにより、赤血球のカーボニックアンヒドラーゼが作用して、尿に重炭酸イオンの排泄が増え、その結果尿のpHが上昇するのでないかという考えがベースにあったからである。また、50年前に尿中の重炭酸イオン濃度の測定を詳しく検討した米国のPitts博士によると⁵⁾、血液中の重炭酸イオン濃度は常に一定に保たれるようになっていて(28ミリモル濃度を越えない)、もし血液中に重炭酸イオンが28ミリモル濃度を越えて増加すれば(例えば重曹を大量に服用した場合)、その分は尿中に排泄され、尿のpHは上昇する。

1992年の4月から6月までに金沢と東京で成人について尿の重炭酸イオン濃度を測定した¹⁾。金沢の成人155名については尿の重炭酸イオン濃度は 2.83 ± 0.36 ミリモル濃度であった。ところが、東京の成人435名については尿の重炭酸イオン濃度は 4.74 ± 0.30 ミリモル濃度であった。これらの値は統計的に有意の差があり、東京の住人の方が尿の重炭酸イオン濃度に関して金沢の住人の場合と比べて高いことが明らかとなった。Table 2はそのときの、東京の成人の内訳を示す。尿の重炭酸イオン濃度が10ミリモル濃度以上の人たちは全体の12%を占めていた。

今から50年前では、大気中の炭酸ガス濃度は約300ppmであるといわれている⁴⁾。その当時に測定された尿中の重炭酸イオン濃度はほとんどゼロであり、尿のpHは約5.5であったと記載されている(Pitts et al., 1949)⁵⁾。ところが、東京および金沢の住人におい

ても1994年の末で、尿の重炭酸イオン濃度およびpHはかなり上昇していた(後述)。350ppmから450ppmまでの大気中の炭酸ガス増加が果たして尿中の重炭酸イオン濃度の変動に反映されるかどうかについては、1992年から1994年に測定を行っていた当時は半信半疑であった。生活形態あるいは摂取した食物、飲み物などの因子も当然考慮されなければならないからである。しかしながら、その後の測定結果はこのような考えが基本的に間違っていないことを裏付けている。

Table 1 1995年、1996年12月における東京の大気中炭酸ガス濃度

December 6, 1995	
Campus of Tokyo Medical College	600ppm
Yasukuni Street, Shinjuku, Tokyo	550ppm
A street in Kabukicho, Shinjuku	550ppm
A subway station, Shinjuku	850ppm
In a subway train	1800ppm
In a cinema, Shinjuku	1050ppm
December 9, 1996	
Haneda Airport(outdoors)	600ppm
Metropolitan highway, Tokyo	
Near Odaiba	550ppm
Near Ooi-minami	700ppm
Near Tsukishima	1400ppm
Inside the Iikura tunnel	1200ppm
Campus of Tokyo Medical College	600ppm
December 12, 1996	
Campus of Tokyo Medical College	600ppm
Subway 1. (a station, crowded with many passengers)	3800ppm
Subway 2. (a station, crowded with many passengers)	2000ppm
Main street, Ginza, Tokyo	600ppm

Table 2 東京の成人(435名)の尿中重炭酸イオン濃度(1992年測定)

Urinary bicarbonate	Number of individuals	Relative proportion(%) of individuals
0~1.0mM	140	32.2%
1.1~2.0mM	79	18.2%
2.1~3.0mM	45	10.3%
3.1~4.0mM	33	7.6%
4.1~5.0mM	16	3.6%
5.1~10.0mM	70	16.1%
10mM <	52	12.0%

閉鎖環境下での変化

Fig.1は1995年の12月(13名の成人男子: Fig.1A)および1996年の12月(8名の成人男子および5名の成人女子: Fig.1B)に2週間(午前および午後)にわたり測定した尿の重炭酸イオン濃度と尿のpHとの関係を示す³⁾。その結果、1995年の12月、1996年の12月における尿の重炭酸イオン濃度は尿のpHの変化にほぼ完全に比例し($r = 0.945$, $p < 0.01$)、しかも半数程度の尿試料において尿中の重炭

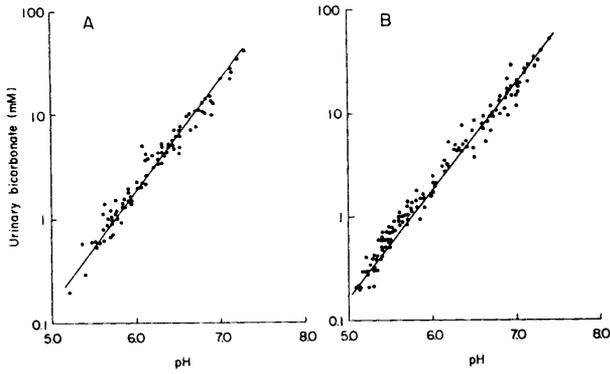


Fig.1 健康な成人の尿のpHおよび重炭酸イオン濃度 A:1995年, 12月6日から15日まで, 13名の健康成人(男子)より毎日, 採尿して測定した. B:1996年, 12月6日から17日まで, 13名の健康成人(8名の男子, 5名の女子)より, 毎日, 採尿して測定した.

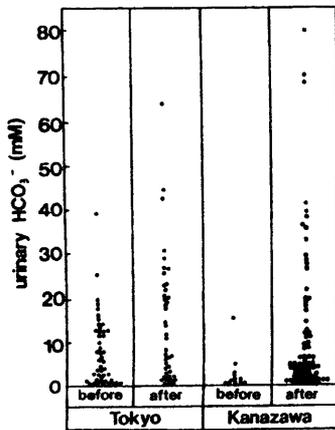


Fig.2 東京および金沢の大学学生の尿中重炭酸イオン濃度の変動(試験開始前と試験終了後の比較)

酸イオン濃度は2ミリモル濃度以上であり, 尿のpHは6.0以上であった. 1950年頃までは尿の重炭酸イオン濃度がほぼゼロであり, 尿のpHは5.5であったことを考えると, 環境因子の変化(特に外気および室内の炭酸ガス濃度の変化)の影響が大きいことを示唆している.

Fig.2は1994年12月に行われた東京と金沢における医学生の実験の最中における尿中の重炭酸イオン濃度の変動を示す²⁾. 東京では91名の医学生がこの調査に協力したが, 試験が行われる前では尿の重炭酸イオン濃度は平均8.07ミリモル濃度, 尿のpHは平均6.34であった. 大気中の炭酸ガス濃度は試験が行われた部屋の外では400ppmであったが, 部屋の中では試験開始前では700ppmであった.ところが, 試験が終了した時点で, 教室内の炭酸ガス濃度は1,200ppmまで上昇していた. このような状態で2時間ほど試験が行われたのであるが, 試験終了後に学生の尿を分析したところ次のような結果となった. 尿の重炭酸イオン濃度は平均14.34ミリモル濃度であり, 尿のpHは6.66であり, 両方の測定値は試験前と比べて有意に増加していた. とくに, 一部の学生では

重炭酸イオン濃度は68ミリモル濃度, 尿のpH7.7と生理的には通常みられないような値まで増加していた. これらの学生が試験を受ける前に異常を訴えていたとか, 試験後に気分が悪くなったということは特になかった. 金沢で同じ時期に行われた医学生の試験においてもほぼ同様な結果が得られた. とくに金沢の医学生は試験を受ける前の尿の重炭酸イオン濃度は東京の医学生と比べて非常に低かったにもかかわらず, 試験が終了した2時間後には非常に高い値を示した. 最高濃度を示した医学生は80.3ミリモル濃度まで上昇していた. この場合, 尿のpHは7.66であった. また, 試験が行われた部屋の炭酸ガス濃度は, 開始前の700ppmから終了後の1,500ppmまで上昇していた. これらの結果は, 室内の炭酸ガス濃度の増加により尿の重炭酸イオン濃度の増加とpHの上昇が明らかに引き起こされていることを示している.

Table 1は1995年12月, 1996年12月における, 東京の路上と室内での炭酸ガス濃度を示す. 東京の路上の炭酸ガス濃度は世界の標準値350ppmより大幅に高く, 550ppm以上を示していた. また, 室内では, 1,200ppm以上のところが多かった. そこで, 私達は大気中の炭酸ガス濃度が上昇した状態にいた場合に, 尿中の重炭酸イオン濃度および尿のpHがどのように変動するかについて, いくつかの条件下で調査を行った(Fig.3およびFig.4). Fig.3は炭酸ガス濃度が比較的高く, 一定である東京の映画館(滞在中ほぼ1,200ppmであった)に3時間滞在した場合に, 尿中の重炭酸イオン濃度とpHを測定した結果を示している. ほとんどの学生において, 尿の重炭酸イオン濃度およびpHは有意に増加した. なお, 測定した日の外の大気中炭酸ガス濃度は550ppm(1995年12月)であった. なお, 映画館で1,200ppmの炭酸ガス濃度が測定されたが, 冬場では, 締め切った住宅内やビルなどではこのような状態が至る所で形成されており, 狭い部屋では5,000ppmにも達することがある.

Fig.4は窓を締め切った状態で車を3時間走行させた状態を設定して, 室内の炭酸ガス濃度と, その影響について検討した結果を示す. 1996年12月に4名の医学生と著者が, また1997年12月に5名の医学生が乗用車に乗って3時間, 東京周辺を走行した. 車内の炭酸ガス濃度は最初は550ppmであったのが, 窓を締め切って走行を始めて30分以内に2,000ppmとなり1時間で5,000ppm以上と

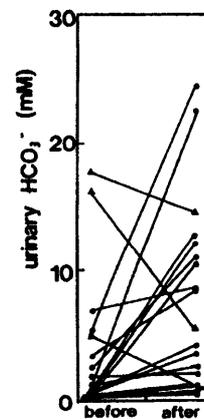


Fig.3 映画館3時間滞在前後の尿中重炭酸イオン濃度の変動

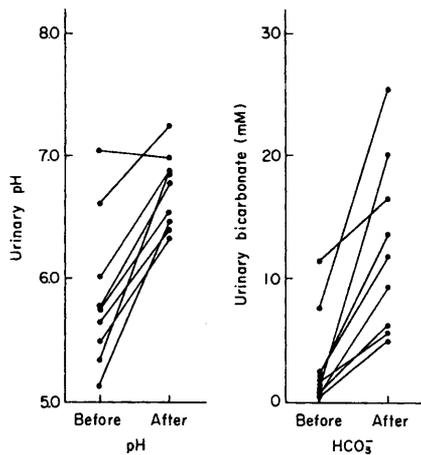
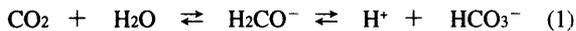


Fig.4 車に3時間滞在前後の尿中重炭酸イオン濃度の変動(窓を締め切って走行している車に3時間滞在した)

なった。これは車の滞在者が呼吸により排出した炭酸ガスが室内に蓄積したためである。このような高い炭酸ガス濃度を吸いながら車の室内に滞在するとFig.4に示す結果が得られた。すなわち、出発前では尿の重炭酸イオン濃度はほとんどが1ミリモル濃度程度であったものが、3時間走行後では5ミリモル濃度以上に上昇していた。尿のpHも同様に上昇していた。

このように、大気中の炭酸ガス濃度の増加により、そこに滞在した人達の尿の重炭酸イオン濃度と尿のpHは上昇することが明らかになった。尿への重炭酸イオンの増加は第一義的には血液中の重炭酸イオン濃度の増加により説明できる。血液中の重炭酸イオン濃度の増加は赤血球内に多く含まれるカーボニックアンヒドラーゼの作用：



により、大気中から呼吸により吸入された炭酸ガスが水和され、代謝された結果であろう。Pittsら⁵⁾は血液中の重炭酸イオンの濃度は28ミリモル濃度を越えることはなく、これを越える量が血液で生成された場合は尿中へと排泄されることを示した。尿へ排泄された重炭酸イオンは通常は尿細管で再吸収されるが、血液中の重炭酸イオン濃度が高い場合は、重炭酸イオンの尿への排泄量が、再吸収量を上回ることになる。尿のpHの上昇については重炭酸イオンが弱アルカリ性であることで説明される。また、血液中には水素イオンが取り残される(上記(1)式)と考えられるので、炭酸ガスを高濃度に吸収した場合は血液は弱酸性に傾くと考えられる。本調査で極端に尿の重炭酸イオン濃度が高く、尿のpHが8.0近くの成人が何名かいたが、これらの人達では一過性に酸性血症になっている可能性がある。しかしながら、カーボニックアンヒドラーゼの作用により、反応(1)が左方向に急速に進行して、呼吸による炭酸ガスの排出により、通常は血液の水素イオンのアンバランスは迅速に解消されていると考えられる。カーボニックアンヒドラーゼは血液の酸塩基平衡に重要な役割を果たしていることは従来から良く知られているが、大気中の炭酸ガスがかなり高濃度になった場合でもこの酵素が作用する結果、過剰な重炭酸

イオンは尿に排泄されて、血液の重炭酸イオンは28ミリモル濃度を越えないように保たれていると考えられる。

炭酸ガス濃度と臨床像

これまで、衛生学的に炭酸ガス濃度が増加した場合の副作用について検討されており、大気中(室内)の炭酸ガスが5,000ppmを越すと不快感を与え、10,000ppmを越すと危険性が増すことが知られている。東京では地下鉄の車両内では炭酸ガス濃度は非常に増加しており、満員電車内では5,000ppmを越していると考えられる。このような高濃度の炭酸ガスに曝されて1~2時間も通勤する東京のサラリーマンや学生が気分が悪くなって駅に運び込まれる姿がしばしば目撃される。これは憶測ではあるが、一時的に血液が酸性血症になっている可能性が高い。また、長距離ドライバーで運転中に突然死亡する例が報告されているが、この場合も車内に蓄積した高濃度の炭酸ガス濃度の影響が関与している可能性もあり、今後十分に検討する余地があると考えられる。なお、高濃度の炭酸ガスによる集団酩酊(群衆毒)が起こった有名な例としてロンドンデリー号事件が知られている⁶⁾。

地球環境への提言

今後、大気中の炭酸ガス濃度は増加の一途を辿ると考えられるが、地球温暖化の問題はもちろん、人体への影響度も大きくなっていくと推測される。なお、気象庁公表の過去100年間の東京における12月の平均気温をみると、100年の間に大きく変動はしているが、その最低ラインは着実に戦後は切り上げて来ている。戦前では12月の平均の最低気温は3℃までであったのが、戦後は上昇して、1980年以降は7℃を下っていない。このことは東京ではここ50年の間に平均気温は5度以上も上昇していることに他ならない。このような気温の上昇が東京や世界大都市を含む地域の大気中の炭酸ガス濃度の増加と直接関係しているのかについては議論のあるところかも知れない。しかしながら、炭酸ガス濃度が増加していることは、温暖化に関する他の揮発性ガス(メタンなど)の発生も大きく、またその地域の熱発生量が多いことを示している。いずれにせよ炭酸ガス濃度の増加が人類の21世紀における活動を大きく制限する可能性が高く、これを解決する技術の開発が現在の私達に課せられた緊急の課題であろう。

謝辞

本研究の一部は旭硝子財団の研究助成金の援助を得て行われた。記して謝意を表したい。

参考文献

1. Hamashima H, Yamada K, Mukai M, Nakajima O, Hashimoto K, Horiguchi M, Minami M, Katsumata M, Inagaki H, Tomoda A. Rises in urinary bicarbonate contents and pH of adult Tokyo citizens. *Tohoku J Exp Med* 1993;169:257-9.
2. Tomoda A, Yamanaka S, Kawai H, Ito H, Katsumata M, Minami M, Hashimoto T, Tanii H, Hashimoto K. Variation of urinary pH and bicarbonate concentrations of students in metropolitan and rural areas of Japan. *Arch Environ Health* 1995;50:457-61.
3. Tomoda A, Kazuka M, Yashima K, Niiyama K, Muro D.

Significance of rises in urinary bicarbonate contents and pH related with increased atmospheric carbon dioxide in Tokyo. *Tohoku J Exp Med* 1997; 183:67-73.

4. Chan YS. Long-term changes in amplitudes of atmospheric CO₂ concentrations at Ocean. Station P and Alert, Canada. *Tellus* 1990; 42B:330-41.
5. Pitts RF, Ayer JL, Schiess WA. The renal regulation of acid-base balance in man III. The reabsorption and excretion of bicarbonate. *J Clin Invest* 1949;28:35-43.
6. 和田 攻. 大気の変化が人に及ぼす影響とその対策. 衛生・公衆衛生. 東京:メジカルビュー社, 1987;249.

Blood Program and the Possibility of Applying Red Cell Substitutes in Thailand

Rachanee O-Charoen

Abstract

Thailand is a country in Southeast Asia with approximate area of 202,000 sq. miles and total population of 60 millions. Bangkok is the capital city with 6 million inhabitants.

Thai national blood program is managed by Thai Red Cross Society. The main centre namely National Blood Centre(NBC) is situated in Bangkok. There are 6 branches in Bangkok and 141 branches throughout the country. The NBC operates on a comprehensive blood transfusion service and supply blood components to cover the need of patients in Bangkok and nearby provinces. The branches at each province operate to meet their own provincial demand of blood components.

In 1996, 330,000 units of blood were collected by NBC while the total collection of blood from the whole country was 1 million units. All of them were collected from volunteer un-paid donors. Every unit was tested for ABO grouping, Rh typing, screening of atypical antibodies, screening for syphilis(VDRL), HBsAg(EIA), anti-HCV(EIA), anti-HIV(EIA) and HIV Ag(EIA). The HIV Ag testing was introduced since September 1991. It can reduce transfusion-associated HIV transmission from 11.4 per million down to 2.5 per million. However, we have to spend US\$ 101,594.36 in order to detect one unit of blood which is only HIV Ag positive but not anti-HIV positive.

Other efforts and measurements to reduce transfusion-associated HIV are also time consuming and costly such as education, donor recruitment and retention, predonation counselling and donor self exclusion. Blood substitute may be the only answer to solve the problems.

Introduction

Thailand is a country in Southeast Asia, bordering by the Indian Ocean, Myanmar, Laos, Cambodia, Gulf of Thailand and Malaysia. It has a total area of 518,000 sq.km or 202,000 sq.miles. The population is 60 millions with 6-10 millions in Bangkok which is the capital of Thailand.

The national blood program is responsible by Thai Red Cross Society. It was started in 1966 as a mission designated by the government. The program has been slowly but consistently developed. In 1996, we have one main centre called National Blood Centre(NBC) in Bangkok. There are another 6 branches in Bangkok and 141 branches

Assistant Director, National Blood Centre, Thai Red Cross Society, Bangkok Henri Dunant Road, 10330, Thailand.

throughout the country. Also 3 regional centres have been newly set up.

The formulation of national blood program policies are as follows:

1. NBC Thai Red Cross Society(TRC) is the only organization responsible for national blood program with support from the government and close co-operation with Ministry of Public Health. The main responsibility of NBC-TRC is to supply adequate and safe blood components and products for hospital use.
2. Blood collection should come from voluntary non-paid donors and self-sufficiency should be aimed at each province.
3. Before dispatch for use, every unit of blood must be tested according to national standard to maximize safety of blood.
4. Appropriate use of blood components must be encouraged.
5. Users(clinicians) and providers(blood transfusion service)(BTS) must be mutually co-operate to maximize blood collection and minimize wastage.

Development of blood program

phase I

- 1966-1976
- Emphasize on donor recruitment to convert existing paid donors to un-paid donors
 - Establishment of provincial branches throughout the country
 - Basic blood component separation

phase II

- 1976-1986
- Strengthening of non-paid donors
 - Preparation of blood components
 - Pilot scale of plasma fractionation

phase III

- 1986-1996
- Apheresis products
 - Frozen red cells
 - Irradiated blood products
 - Leukocyte depleted components
 - Production of monoclonal blood group reagent

Donor recruitment and retention

The donor recruitment and donor retention programs are being done through several mechanisms such as

1. The Committee for Recruitment and Promotion of Voluntary Blood Donors.

This committee consists of 20-24 members appointed by HRH Princess Maha Chakri Sirindhorn, Vice President of The Thai Red

Cross Society to serve as a task force to motivate public for blood donations.

2. Public Relations and Donor Recruitment Section of the NBC.

There are fulltime staffs who are responsible for making appointment for mobile blood collection. They also campaign towards general public through various forms of mass media.

In 1996, we collected 330,000 units at NBC and 1 million units for the whole country.

Safety measurements to prevent transmission of viruses are as follows

- 1.Safe blood donor
- 2.Laboratory screening for transmissible diseases
- 3.Inactivate(viral) wherever possible

Policy for safe blood donation

- 1.Un-paid general donation rather than replacement
- 2.Retain regular donors rather than first time donors
- 3.More female donors
- 4.Defer donation
 - 4.1 donor with high risk behavior
 - drug addicts(IV)
 - prisoners
 - homosexuals
 - commercial sex worker and her partners
 - known positive for HBV, HCV, HIV, Malaria
 - 4.2 donor during window period of HIV infection, 22 days of the last(unsafe) sexual contact.

Blood collection and component separation

350-450 mL of blood is collected in single, double or triple plastic blood bags. 60% of them are separated into 4 basic components, namely PRC, PC, FFP and cryoprecipitate. Apheresis components such as single donor platelet, single donor granulocyte and apheresis plasma are also available. Leukocyte depleted components such as PRC and PC are also prepared through automated component separator or prestorage filtre.

Statistics of HIV Ag positive and anti-HIV negative units at NBC

Year	No. of units	HIV Ag ⁺ (neutralization)	HIV Ag ⁺ anti-HIV ⁻	HIV Ag ⁺ anti-HIV ⁺
1991 (Sept-Dec)	82,354	12	5	7
1992	267,814	25	6	19
1993	274,099	25	8	17
1994	273,431	20	4	16
1995 (Jan-June)	<u>140,331</u>	10	<u>3</u>	7
	1,038,029		<u>26</u>	

Cost analysis(1995)

The cost for routine screening for p24 HIV Ag can be divided to

1.Capital cost	29.16%
2.Material cost(reagent)	55.63%
3.Labour cost	15.27%

Total cost for 1,038,029 units

Capital cost	15,104,198.89 Baht.
Material cost	51,707,647.10 Baht.
Labour cost	7,909,341.68 Baht.
Total	74,811,341.68 Baht.

Cost/unit	=74,811,341.68/1,038,029
	=72.07 B= (US\$ 2.88)

Cost/p24 HIV Ag ⁺ anti-HIV ⁻ unit	= 74,811,341.68/26
	= 2,877,359.29 B (US\$ 115,094.36)

Although we have spent a lot of money for p24 HIV Ag testing, we still are unable to pick up all window period cases. In spite of having implemented HIV Ag testing for all units, we still find transfusion-transmitted AIDS cases. Moreover, other transfusion-associated adverse reactions are also still occurred. A new system for blood service with artificial blood including red cell substitutes may be the only solution. I wish to have the opportunity to study and implement red cell substitutes to Thai BTS.

リポソーム内包型ヘモグロビンによる全血由来 炎症性サイトカイン産生の修飾

池淵研二, 丹羽光一, 藤原満博, 阿部英樹, 若本志乃舞, 伊藤貴俊, 山口美樹, 関口定美

Modification of Inflammatory Cytokine Production in Whole Blood by Liposome-encapsulated Hemoglobin

Kenji Ikebuchi, Koichi Niwa, Mitsuhiro Fujihara, Hideki Abe, Shinobu Wakamoto,
Takatoshi Ito, Miki Yamaguchi, Sadayoshi Sekiguchi

The effects of liposome-encapsulated hemoglobin, Neo Red Cells(NRC), were studied on tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6(IL-6) production in the human whole blood assay system. The treatment with lipopolysaccharide(LPS) for 24 hours increased the production of TNF- α and IL-6 in a dose-dependent manner. Pretreatment of blood with NRC for 24 hours enhanced LPS-stimulated TNF- α and IL-6 production. The plateau level of cytokine production occurred earlier in the pretreatment setting than co-stimulation setting. Northern blot analysis of total RNA from whole blood proved the enhanced expression of TNF- α mRNA in response to LPS by pretreatment with NRC.

はじめに

赤血球代替物の開発に関する研究が広く行われている。ヒト赤血球と違い人工的な赤血球の代替物は輸血時の血液型検査, 交差適合検査を必要とせず, 従来の血液製剤より長期の保存を可能とするなど, 臨床的に利用するに当たり多くの利点を有している。またその開発は同種血輸血の問題として指摘されている同種抗原感作, 非溶血性発熱反応, ウイルス感染症の伝播, 等を回避することをも可能とする。

赤血球代替物開発のターゲットとして大きく2つの方向がある。1つはヘモグロビン分子を種々修飾し, 酸素解離機能を修飾し, 有効な酸素運搬能を保持させるものである。他方, ヘモグロビンを脂質二重膜内に濃縮して保持し, ヘモグロビン分子が直接血流に暴露しないような形にするタイプである。このタイプではヘモグロビンの自己酸化を抑えるよう各種の抗酸化剤を同時に内包させることも可能である。ヘモグロビン分子はそのまま血管内に投与されると, 容易に4量体が解離し2量体となり, 低分子量となるため腎臓の糸球体から排泄され, しかる後に濃縮され間質性腎炎を惹起することが知られている¹⁾。また血管内皮細胞の細胞間の隙間を通り血管内皮下組織に達し, そこで血管内皮から産生される血管内皮由来血管弛緩因子, endothelium-derived relaxing factor(EDRF), あるいは一酸化窒素(NO)をトラップし不活化し, 血管平滑筋の弛緩を障害し, 血管トーンスの亢進, 収縮を誘導することも知られている^{2,4)}。またその他神経細胞への障害作用, 細菌毒素の作用増強なども実験的には報告されている³⁾。

北海道赤十字血液センター研究部 〒063-0002 札幌市西区山の手2-2,
Research Division, Hokkaido Red Cross Blood Center, 2-2 Yamanote, Nishi-ku,
Sapporo 063-0002, Japan.

論文受付98年2月20日, 受理98年3月12日。

我々はヘモグロビン分子を表面に出さず, 人工膜に内包させたタイプのものが, 生体に投与した際のin vivo適合性が高いと予想しこれまで検討してきた。ただし他の研究報告によれば, リポソーム内包型ヘモグロビンといえども血中半減期が約20時間であり, 意外に早く血中から消失することから, その処理を担当するであろう網内系への影響を調査する必要があるとも考えた。すなわち網内系の機能として代表的な炎症性サイトカインの産生状態を, in vivoにできるだけ近似した系, すなわち全血アッセイ系で検討した^{6,7)}。

方法

1.リポソーム内包型ヘモグロビンとしてNeo Red Cells(NRC)をテルモから供与を受けた。リポソームは大豆水添ホスファチジルコリン, コレステロール, ミリスチン酸, α -トコフェロールをモル比7:7:2:0.28で構成させてある。内部にヘモグロビンを含まない空リポソームもコントロールとして用いた。NRCの粒径は250nmで, リポソーム同士の凝集を防ぐために, ポリエチレングリコール結合ホスファチジルエタノールアミンでリポソーム表面を修飾してある。

2.健康人より末梢血をヘパリン加注射器で採血した。血液を4mlづつ6穴プレートに分注し, 容量比5%でそれぞれ生食, NRC, 空リポソームを添加した。プレートは37°C, 炭酸ガス培養器にて培養した。実験によってはリポポリサッカライド(LPS, Sigma)を終濃度0.1-1,000ng/mlで添加し, サイトカイン産生を刺激した。

3.一定期間培養した後, 検体を回収し, 遠心後上清を回収した。サイトカインとしてTNF- α , IL-6をELISA法を用いて測定した。

(R&D Systems, MN, USA). TNF- α , IL-6の測定感度はそれぞれ4.4pg/ml, 0.7pg/mlであった。

4.一定期間培養後細胞を回収し, 全RNAを市販のキット(RNeasy Blood Mini Kit, QIAGEN Inc, CA, USA)を用いて回収した。各々同量のRNA(4 μ g)を2.2Mフォルムアルデヒドを含むアガロースゲルを用い電気泳動し, 分離されたRNAバンドはNytran膜(S&S, Dassel, Germany)にプロットした。LPS刺激ヒト単球のRNAより, RT-PCR法にてTNF- α cDNAを増幅した。in vitro転写用ベクターに組み込んだ後, 32 P-UTPによりラベルし, ハイブリダイゼーションに用いた。

結果

1.全血を5%生食, 5%NRC存在下に8, 24時間培養した後, 遠心にて培養上清を回収し, サイトカインをELISAキットにて測定した(Fig. 1)。TNF- α レベルは生食群, NRC群において培養8時間目, 24時間目いずれも測定限界以下のレベルであった。IL-6レベルは培養8時間目が24時間目より高値を示し, 生食群に比しNRC添加群で抑制される傾向がみられた。

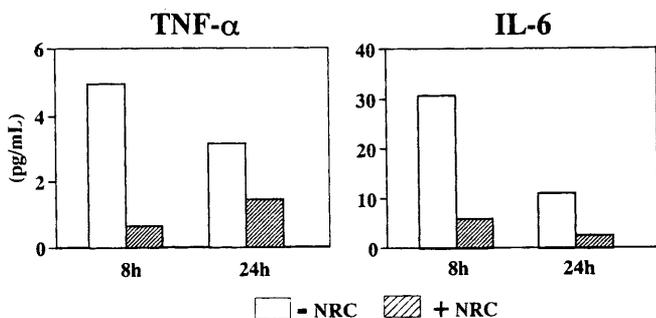


Fig. 1. Effects of NRC on constitutive production of TNF- α and IL-6. Whole blood samples were incubated with 5% saline(open bar) or NRC (hatched bar) for 8 or 24 hours. Representative data are shown from three experiments.

2.培養系にサイトカイン産生を増強させる目的でLPSを添加し, この系へのNRCの影響を検討した。Fig.2に示すようにTNF- α の産生量はLPS濃度依存性に増加し, NRCの添加により培養8時間後, 24時間後と産生の増強が観察された。LPSによるIL-6の産生に対してもTNF- α 同様, NRC添加による増強傾向が見られた(データ示さず)。

3.全血系でのサイトカイン産生に及ぼすNRCとLPSの作用機序をさらに明らかにする目的で, NRCとLPSを最初から共存させて培養する系と, 最初の24時間はNRC存在下で培養した後LPSでさらに刺激する系を作成し, サイトカイン産生の経時変化を検討した。Fig.3のconcurrent treatmentと表した系はNRCとLPSの共存系を示し, pretreatmentと表した系はNRCによる前刺激系を示す。NRC群, コントロール群とも培養後8時間, ないし12時間後にサイトカイン産生量のピークが出現し, NRC共存群の産生量が有意に増加を示した。またpretreatment系においてもNRC群, コントロール群ともサイトカイン産生のピークが4-8時間目に認められピークがやや早まる傾向を示し, NRCで前刺激した群でサイトカ

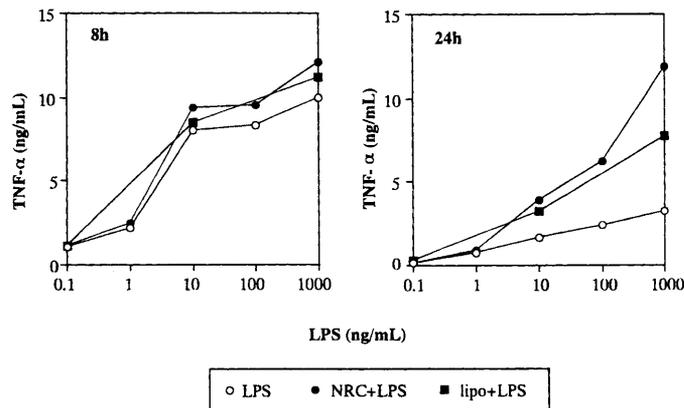


Fig. 2. Effects of NRC and liposome on LPS-induced production of TNF- α . Whole blood samples containing LPS(open circle), 5%NRC plus LPS (closed circle), and 5%liposome plus LPS(closed square) were incubated for 8 or 24 hours. Representative data were shown from three experiments.

イン産生量が有意に増加を示した。この場合コントロール群でのサイトカイン産生レベルは低かった。

4.NRCのサイトカイン産生に及ぼす作用がリポソームそのものが細胞表面に接着あるいは貪食されて刺激を及ぼすのか, あるいは貪食後に内包されているヘモグロビンおよびその代謝産物が刺激を及ぼしているのかを検討する目的で, NRCと脂質構成を同じに調整した空のリポソームを作成し, NRCとの比較を行った。Fig. 2, 3に示したようにLPS単独群に比べ, 空リポソーム群はNRC群と同様, あるいは場合によってはそれ以上にTNF- α の産生増強を示した。なお図には示していないがIL-6の場合においても同様の効果がみられた。従ってサイトカイン産生に関してはリポソームそのものが細胞と接着あるいは細胞に貪食されることが機序として働いている可能性が示唆された。

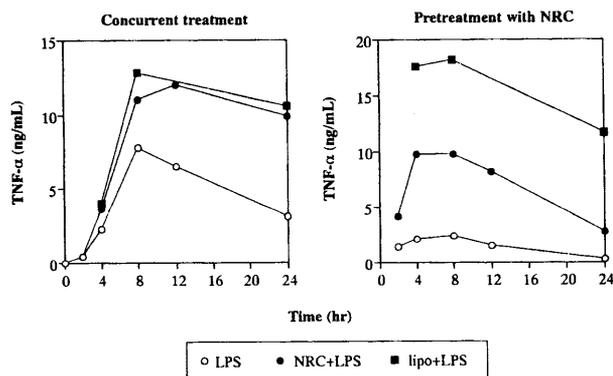


Fig. 3. Effects of NRC and liposome on the time course of changes in LPS-induced production of TNF- α . In the concurrent treatment protocol, whole blood samples containing LPS(open circle), 5%NRC plus LPS (closed circle), and 5%liposome plus LPS(closed square) were incubated for 24 hours. In the pretreatment protocol, whole blood samples were preincubated with three combinations, then further incubated for 24 hours with LPS. Representative data were shown from three experiments.

5. サイトカイン産生の変化をタンパク量以外にmRNAレベルでも検討する目的で、NRCによる前処置を加えた後、LPSを添加し2, 4時間後の細胞を回収し、その全RNAを抽出した。TNF- α mRNAの発現をノーザンブロットにて解析した。Fig.4に示したようにmRNAの発現は2時間目にピークを示し、NRC前処置群でそのバンドの増強が確認された。

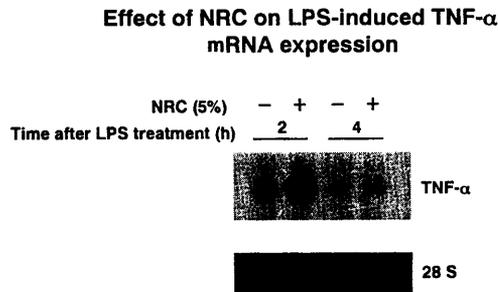


Fig.4. Effects of NRC on LPS-induced expression of TNF- α mRNA. Whole blood samples were preincubated with 5% saline or NRC for 24 hours and incubated with LPS for a further 2 or 4 hours. Staining of 28S ribosomal RNA with ethidium bromide is shown as a loading control.

考察

人工赤血球開発が着々と進んでいる。ヘモグロビン分子の修飾による適正な酸素運搬能の付与、4量体の維持、高分子化による腎臓からの排泄抑制や血管収縮の回避など、この分野で得られた情報は単に人工赤血球の開発にとどまらず基礎的な生化学や循環生理の分野へも多くの知見を提供した。実際開発中の人工赤血球を前臨床試験へと展開するにつれ、予想したとおりの成果が出る一方で、未だクリアーされない問題点も指摘されるようになってきている。

最近酸素運搬治療薬という概念が提唱されつつある。血流の乏しい腫瘍局所に酸素を行き渡らせ放射線照射や抗ガン剤治療の効果を高めること、敗血症発生時のショックのトリガーとなる一酸化窒素のスカルベンジャーとして利用すること、臓器移植時の再灌流障害時の活性酸素のスカルベンジャーとして利用すること、酸素を運ぶ検査診断薬として利用すること、臓器保存液として利用すること、細胞培養液として利用すること、など多くの活用方法が提唱されつつある。人工赤血球は本来は出血に際し、血液型検査、交差適合検査を必要とせず、血液に比べ保存期間が長い利点を生かし、緊急時に対応できる製剤であることが求められてきた。また同時に同種血輸血に関連する種々の副作用(ウイルス伝播、同種抗原感作など)を回避できる代替輸血用製剤と考えられてきた歴史がある。輸血製剤の代替えという立場に立てば、赤血球なみに酸素を運搬させるには出血量に見合った量の投与が必要であること、一旦少量の投与でショックを切り抜けても、一旦下がった赤血球量が本人の造血系の能力で回復するまでの数週間持たすためには、繰り返し投与する可能性があること、できるだけ異物認識されないこと、など条件が付いてくる。そこで投与された際の生体に対する適合性が検討される必要がある。

生体適合性としてこれまで、補体系、凝固系、血球系、代謝系などへの影響が検討されてきた。生体膜に類似したリポソームに内包させたタイプの製剤の血中半減期が数時間から24時間程度であると報告されていることから、この製剤のクリアランスを考える上で重要な貪食細胞系への影響を検討した。その指標として末梢血単球の産生する炎症性サイトカイン、TNF- α とIL-6を用い、またできるだけin vivoでの状況に近似するため全血の培養系にNRCを添加する系を採用した。そのため培養液やウシ胎児血清などを持ち込まず、系の中には赤血球、血小板、リンパ球などの血球や血漿中のあらゆる成分が持ち込まれている。in vivoにできるだけ近づけるにはさらに循環の系を持ち込み、細胞間の相互の動きをまねる必要があるが、今回はそこまで検討できていない。

さて全血にNRCのみを添加する系では構成的に産生されるサイトカインレベルの低下が観察された。しかしレベルそのものが数pgから数10pg程度と低いため、特別の意味付けはできないと思われる。Rudolphらはヒト末梢血から精製した単球や単球系細胞株RAW264.7を用い、恒常的なIL-6の産生が抑制されたと報告している⁹⁾。しかし逆にRollwagenはマウス腹腔にリポソーム型ヘモグロビンを投与しIL-6の産生が亢進することを報告し、Zhuらはマクロファージ系細胞株P388D1を用いIL-6のmRNAが増加することも報告している^{9,10)}。成績の違いには系の設計の違いが大きく関係していると考えられ、我々が採用した全血培養系での成績とは単純に比較はできないと考えている。

また系にLPSを添加する系は、サイトカイン産生細胞に刺激を加えるという意味と、もう一つ、実際に人工赤血球が投与される場合、患者には種々の病態、例えば細菌感染が合併していることが想定されるため、それを近似するという意味があると考えている。交通事故、外傷時の細菌感染、あるいはショック時の消化管細菌フローラからの細菌侵入など生じることが想定される。NRCの存在はLPS添加時のサイトカイン産生を増強すること、またNRCで前処置しその後LPS刺激を加えるとサイトカイン産生が増強することが観察された。リポソームを貪食することから発生する刺激とLPSに由来する刺激がどのように関わっているか、その詳細は検討の余地を残しているが、同時投与でのサイトカイン産生のピークが8-12時間後、前投与系ではLPS添加後4-8時間後にサイトカイン産生のピークが認められ、時間のズレがあり、リポソームの処置が次の刺激に対して準備状態のようなものを誘導している可能性はあると考えている。TNF- α の産生増加はそのmRNAレベルの増強としても観察された。Langdaleらはウサギ肺胞マクロファージを用い、リポソーム型ヘモグロビンがTNF- α の産生を抑制すること、mRNAレベルでは変化がないため転写後の抑制が主因であると報告した¹¹⁾。またRudolphはヒト単球で、Zhuはマウス単球系細胞株でのTNF- α の産生抑制を観察している^{8,10)}。しかしBankeyはin vivoで投与されたリポソーム型ヘモグロビンがTNF- α の血清レベルを増加させ、そのラットから調整した肝臓クッパー細胞においてLPS刺激でのIL-6、TNF- α 産生の増加を報告している¹²⁾。

以上まとめると、今回ヒト末梢血の全血を用い、LPS刺激での炎症性サイトカイン産生に及ぼすNRCの作用を、NRCの同時添加、NRCの前処置の2系で検討したところ、いずれの系も増強効果が認められ、前処置ではサイトカイン産生のピークに時間的な

変化が認められた。これまでの報告には一致するもの、相反するものがあり一括して結論を出せないが、ともかくリポソーム型へモグロビンを投与することで炎症性サイトカイン産生に修飾がもたらされるのは間違いないと考えられる。さらにin vivoに近い系での検討が必要と考える。なぜなら血液代替物として投与を考えると、数100-1,000mlレベルの製剤が投与されるであろうし、食細胞系に大きな負担をかけるのは間違いないと感じるからである。

謝辞

本研究の一部は、平成9年度厚生科学研究費補助金高度先端医療研究事業(人工血液開発研究分野)によって行われた。記して謝意を表す。

参考文献

1. Winslow RM: Hemoglobin-based red cell substitutes. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1992.
2. Motterlini R, MacDonald VW: Cell-free hemoglobin potentiates acetylcholine-induced coronary vasoconstriction in rabbit hearts. *J Appl Physiol* 1993;75:2224-33.
3. Hess JR, MacDonald VW, Brinkley WW: Systemic and pulmonary hypertension after resuscitation with cell-free hemoglobin. *J Appl Physiol* 1993;74:1769-78.
4. Nakai K, Ohta T, Sakuma I, Akama K, Kobayashi Y, Tokuyama S, Kitabatake A, Nakazato Y, Takahashi TA, Sekiguchi S: Inhibition of endothelium-dependent relaxation by hemoglobin in rabbit aortic strips: Comparison between acellular hemoglobin derivatives and cellular hemoglobins. *J Cardio Pharmacol* 1996;28:115-23.
5. Regan RF, Panter SS: Neurotoxicity of hemoglobin in cortical cell culture. *Neurosci Lett* 1993;153:219-22.
6. Nerad JL, Griffiths JK, Van der Meer JWM, Endres S, Poutsika DD, Keusch GT, Bennish M, Salam MA, Dinarello CA, Cannon JG: Interleukin-1b(IL-1b), IL-1 receptor antagonist, and TNF- α production in whole blood. *J Leukoc Biol* 1993;52:687-92.
7. Bouma MG, Jeunhomme TMMA, Boyle DL, Dentener MA, Voitenok NN, van den Wildenberg FAJM, Buurman WA: Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood. *J Immunol* 1997;158:5400-8.
8. Rudolph AS, Cliff RO, Spargo BJ, Spielberg H: Transient changes in the mononuclear phagocyte system following administration of the blood substitute liposome-encapsulated haemoglobin. *Biomaterials* 1994;15:796-804.
9. Rollwagen FM, Gafney WCM, Pacheco ND, Davis TA, Hickey TM, Nielsen TB, Rudolph AS: Multiple responses to administration of liposome-encapsulated hemoglobin(LEH): Effects on hematopoiesis and IL-6 levels. *Exp Hematol* 1996;24:429-36.
10. Zhu XL, Gafney WCM, Pacheco ND, Rollwagen FM: Kinetics of cytokine gene expression in macrophage and endothelial cell lines following liposome encapsulated haemoglobin(LEH) treatment in vitro. *Cytokine* 1996;8:541-7.
11. Langdale LA, Maier RV, Wilson L, Pohlman TH, Williams LG, Rice CL: Liposome-encapsulated hemoglobin inhibits tumor necrosis factor release from rabbit alveolar macrophages by a posttranscriptional mechanism. *J Leukoc Biol* 1992;52:679-86.
12. Bankey P, Beecherl E, Bibus D, See D, McIntyre K: Liposome modulate Kupffer cell endotoxin response. *Arch Surg* 1995;130:1266-72.

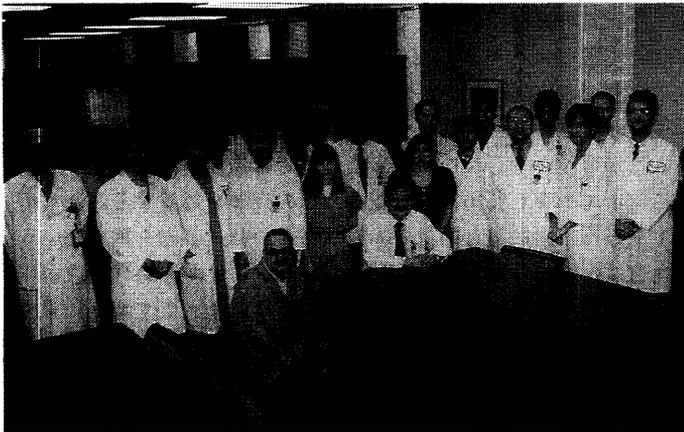
「人工赤血球の開発状況」から

北海道赤十字血液センター

池淵研二

はじめに

今回厚生省高度先端医療研究事業の中で、人工臓器、人工血液の開発のバイオニアであるアメリカ ベイラー大学能勢教授を日本にお招きすることが実現した。能勢教授は早稲田大学、慶應大学で講演をされ、引き続き北海道赤十字血液センター、北海道大学、旭川医科大学でも多くの臨床医、研究者、学生に迫力ある講演をされた。人工血液開発を進める上で大変貴重な提言を行われ、是非本学会誌に講演内容を紹介したいと考え、先生からも許可をいただいたので先生の講演を要約した。



能勢教授とそのスタッフ

中央のイスに座っておられるのが能勢教授

1. フルオロカーボンの経験

これまで人工血液の開発に携わってきた。フルオロカーボン製剤を出血性ショックモデルのイヌに投与したところ、ほぼ全てのイヌは短期的にも長期的にも生存が維持された。2頭のイヌはフルオロカーボンを200g、20g投与しそのまま1年間生存させたが、いずれも最後には貧血、白血球増加、発熱が出現し死亡した。解剖所見の特徴は2頭とも薬剤性肺炎を呈していたことであった。イヌの全身を塩酸で処理し、生体に蓄積しているフルオロカーボンを定量したところ、200g投与イヌでは146g、20g投与イヌでは16gのフルオロカーボンが残留していることが明らかになった。フルオロカーボンは呼気中にガスとなって排泄されると考えられ、生体内での蓄積量は少ないと考えられていたが、投与量の殆どが1年後にも残留していることが明らかになった。フルオロ

北海道赤十字血液センター研究部、〒063-0002 札幌市西区山の手2-2、Research Division, Hokkaido Red Cross Blood Center, 2-2 Yamanote, Nishi-ku, Sapporo 063-0002, Japan.

カーボン製剤は粒径0.1ミクロンまで小さく調製できるが、一旦生体内に入ると表面にタンパクなどの物質が付着し、サイズが増加し、肺組織に取り込まれ薬剤性肺炎を惹起したのと考えられた。この研究結果より、生体には異物を入れてはいけないと考えられるようになった。

2. 出血性ショック時の循環動態

出血性ショックで血圧が下がると、いわゆる動脈-静脈シャントができてしまう。生体は微小血管を閉じ、その結果赤血球が通過できず血漿の一部しか流れられないような状態に陥る。従って組織を低酸素状態から離脱させるためには血漿の酸素化がどうしても必要となる。

3. 呼吸生理から考えられること

肺胞ガスの性状は酸素分圧100mmHg、二酸化炭素分圧40mmHg、水蒸気圧47mmHg、窒素分圧573mmHgである。吸気中の酸素は外層肺胞上皮、中間の水層、内層肺胞上皮の3層を通過し、血漿を通り赤血球の膜を越え赤血球内へ拡散によって到達する。拡散性の高い二酸化炭素が約0.1秒で通過するのに比べ、酸素は約0.5秒を要する。赤血球がかろうじて通過できるような毛細血管では肺胞上皮と赤血球膜とはこすれあいながら接触するため、もう少し到達時間は早いものと考えられる。

さてこうして肺を通過した血液は100mL当たり、酸素を赤血球内に19mL、血漿中に0.3mL含んでいる。静脈血ではそれぞれ14mL、0.13mLと計算される(Fig.1)。このように赤血球内には酸素が十分含まれても、出血性ショックに陥った毛細血管、つまり血漿しか循環できなくなった血管内では0.3mLの非常に少ない量

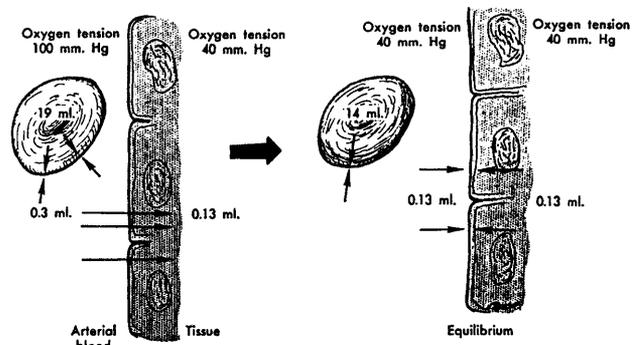


Fig.1 Interdependency of oxygen between plasma and red cells.

の酸素しか運ばれていない。

循環血液量を5,000mL、動脈血と静脈血の比を1:4と考えると、血液中の酸素の分布はTable 1のような数字になる。

Table 1 Oxygen distribution in red blood cells and plasma

	Red blood cells	Plasma
Arterial blood	$19 \times 50 \times 1/5 = 190$	$0.3 \times 30 \times 1/5 = 1.8$
Venous blood	$14 \times 50 \times 4/5 = 560$	$0.13 \times 30 \times 4/5 = 3.12$
	(mL)	

以上の数値から分かることは、酸素は血漿全体の中にわずか5mL程度しか含まれていないことである。血漿の酸素含量を高めるためには、高圧酸素治療を用いても、溶存酸素を増加させることには限界があり、先ほどのフルオロカーボンが一つの候補であったが、既に述べた理由で採用できない。

体から排泄されるべき二酸化炭素の分布はTable 2のようである。

Table 2 Carbon dioxide content in blood

Carbon dioxide Pressure(mmHg)	Arterial blood	Venous blood
	40	46
In solution	3mL/100mL	3+0.5= 3.5
Carbamino	3mL/100mL	3+0.7= 3.7
Bicarbonate	42mL/100mL	42+2.8= 44.8
Total	48mL/100mL	52

主要な重炭酸は透析で取り除けるので、あまり問題とはならない。

以上の理由からショック時の対応として最も重要なことは、血漿中の酸素含量を増加させることであると考えた。

4. ヘモグロビン修飾体の開発

ヘモグロビン分子を直接血管内に投与すると、4量体は容易に解離し2量体となり、腎臓の糸球体から漏れ腎臓毒性を惹起する。また酸素親和性を維持するための2,3-DPGを失い、酸素解離曲線が右方に偏位し、酸素を組織で離せなくなる。この問題のためビタミンB6で分子内を架橋することを考え、ピリドキシル化ヘモグロビンを開発した。また腎臓からの排泄を避けるため、分子量を大きくするためポリオキシエチレンを結合させた。分子量は9-12万であり、フィブリノーゲン(分子量40万)、ガンマグロブリン(分子量15万)よりは小さい分子だが、アルブミン(分子量6.8万)、ストローマフリーヘモグロビン(分子量6.445万)よりは大きな分子に設計された。

ヘモグロビン濃度を上げるとコロイド浸透圧が高くなり、灌流液として適さないため、ヘモグロビン濃度は6.3g/dL、コロイド浸透圧38mmHg、P₅₀ 24.2mmHg、粘度2.7cp、メトヘモグロビン濃度3.5%液として最終調整した。

この液を例えば100mL投与すると、その中には6.3gのヘモグロビンが存在する。動脈血100mL中にはヘモグロビンが15g、酸素が19mL存在することから計算すると、6.3gのヘモグロビンは酸素を $19 \times 6.3/15 = 7.98$ mL含む計算になる。先ほど述べたように、

体全体で血漿中に酸素が約5mLしか存在していないことと合わせて考えると、 $100 \times 5/7.98 = 63$ mL程度を投与すると十分な血漿酸素含量を維持できることになる。この製剤の血中半減期は約36-48時間であるため、2日毎に同じ量を投与すれば恒常性を維持できる計算になる。

5. 人工酸素運搬体の投与量の考え方

これまで赤血球代替物の投与の考え方として、失った量に相当する量を補うことが原則のように考えられてきた。例えば1,000mL出血した際には約1,000mL分の代替物を補うようにである。これをヘモグロビン修飾体で行うと、一挙に大量のヘモグロビン分子が投与され、その代謝はどうなるのか、代謝臓器に悪影響は出ないのか、免疫系に影響は出ないか、など心配されていた。またリポソーム内包ヘモグロビンでこの量を補うことを考えると、処理にあたる貪食細胞、網内系は大丈夫か、補体の活性化は大丈夫か、などネガティブな面での研究も行われていた。今回示したように血漿中の酸素含量を通常レベルに維持するには1回に数10mLの投与で十分であることが示され、赤血球が通過できない動脈-静脈シャントの部分に酸素を運ぶ、酸素運搬高分子、言い換えれば薬として登場させることが可能であると考えている。またこの薬は生体由来であり異物でないことも強みである。

動物実験ではヘモグロビン濃度を2g/dLに低下させても、造血系の回復で約4週間後にはヘモグロビン濃度は復帰する。この間の危険な時期を2日に1回、少量の酸素運搬体を補うことで乗り切ることが可能かもしれない。また最近では造血回復を増強するエリスロポエチンも利用できるため、この期間を短縮することも可能であろう。出血量と同量の赤血球あるいは代替物を補うという考え方は根底から変更されるかもしれない。また赤血球輸血が現在のような考え方で行われて良いか、真剣に考え直す時期に来ているかもしれない。

6. 人工心臓の話題

これまで人工心臓の開発はいかにして血栓を造らない、拍動式の人工心臓を開発するかが主要なテーマであった。拍動式では拍動回数を増加させるのに限界があり、容量の大きな拍動力の大きな装置を造らざるを得なかった。最近考え方を改め、小さいポンプで高速の定常流を作成し、これで循環を維持するシステムを開発した(Fig.2, Fig.3)。装置の小型化が図れ、患者のQOLも大変改善する。

拡張型心筋症の患者に補助心臓としてこの装置を用いたところ、それまで心不全のため全身状態も悪かった患者が改善し、実際に脳死心臓移植を行う時には全身状態が良くなっているため、移植の成績も向上する。また補助心臓を用い心筋症に陥った心臓をある期間休ませることができるため、補助心臓を止めた時点で患者の心臓の機能が改善している例も経験された。人工物で臓器を置き換えるという考え方ではなく、欠陥のある臓器を一時休ませ、改善させるために人工臓器を利用するという考え方が出てくる可能性もある。また冠動脈閉塞症の症例に補助心臓プラス酸素運搬マクロモレキュールを同時に利用すると、心筋の回復に好影響を与えることも期待できる。

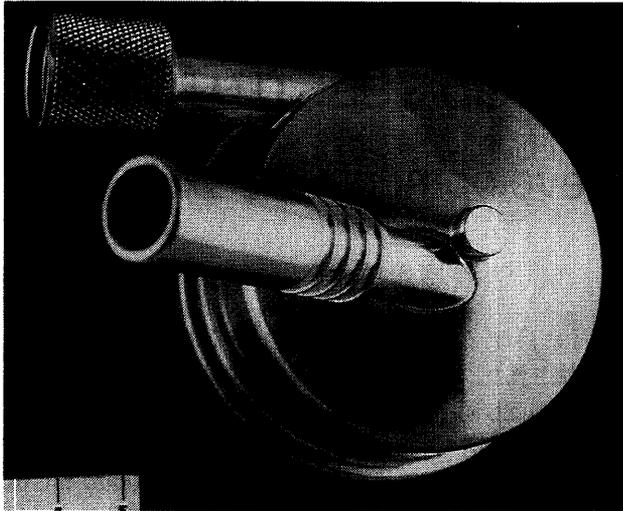
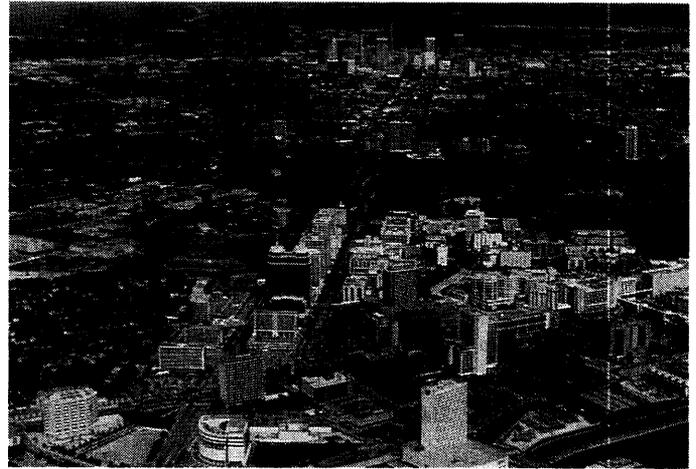


Fig.2 Artificial heart(Gyro PI 702).



テキサス医療センター方向からのぞむヒューストンの街なみ。
このセンターのなかにベイラー大学がある

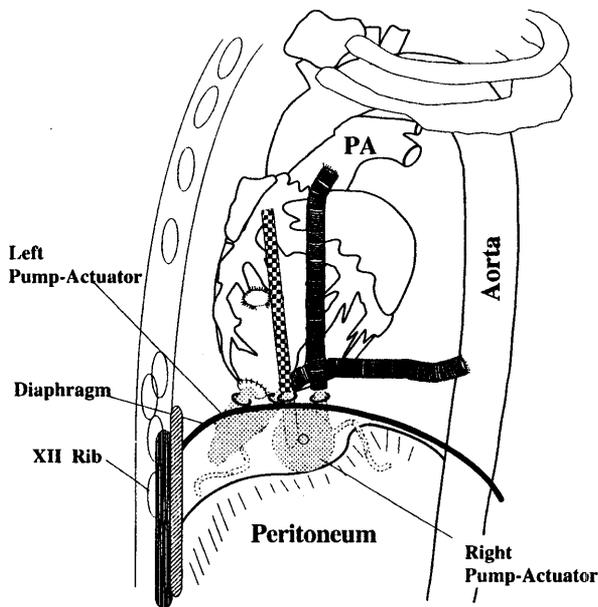


Fig.3 Schematic drawing of a functional TAH.

7. アメリカ医療からの話題

人工腎臓が医療に用いられるようになり、慢性腎不全の患者の予後は伸びた。10年前の平均予後は約10年であったが、最近この期間が5年に短くなり残念に思っている。理由として医療費の国民総生産に占める割合が約20%となり、その縮小が図られていることが考えられる。

私の所属するベイラー医療センターも総ベッド数が1,600床から800床に縮小した。しかし実際の患者数は増加している。人員を減少し、入院期間を短縮させ、入院治療で対応していたものを外来治療で対応する努力をした。例えば整形外科では全股関節置換術のみ入院期間4日に対応するが、他の手術は外来で実施して

いる。患者は手術前日病院近くのホテルに宿泊し、外来で手術を済ませたホテルに戻るというスタイルで対応できている。約100億円あった赤字は逆に100億円の黒字に改善された。

中国の古典には医師を上医師、中医師、下医師と分けた記載がある。下医師は病気を治す。中医師は病気にならないようにする。そして上医師は社会を治す。これからの医師はそのいずれもできる医師たることが望まれている。頑張ってください。

IBC's 5th Annual Conference, BLOOD SUBSTITUTES Latest Pre-clinical and Clinical Developmentsに参加して

慶應義塾大学医学部外科 渡辺 真純

第5回Blood Substitutes年次大会(International Business Communications, IBC)はEnzon Inc.のDr. Shorrの主催により米国マサチューセッツ州ケンブリッジで11月20, 21日の両日に開催された。学会はボストン対岸のチャールス川に面したRoyal Sonesta Hotelで行われた。11月中旬ではあったが、高緯度のボストンでは初雪が道端に降りつもっており、晩秋というよりはまさに冬の始まりといった気候であった。しかし、短い晴れ間に学会場のテラスから見えた雪をかぶったボストンの町並みはたいへん美しく、参加者にとって心なむ光景であった。

IBCという会の性格上、米国企業関係者を中心に約100名の参加者があり、比較的小規模な会場ながら、会議では熱気のこもった発表、討論が繰り広げられた。日本からは筆者を含め3名の参加があった。演題は17題(うちポスター4題)で大まかに分類すると総論的演題3題、ヒトへ血液代替物を投与した臨床試験に関する演題6題、前臨床的な動物実験に関する演題7題、新しい物質の作製に関する演題1題であった。このうち外科医である筆者にとって特に興味深かった演題をいくつか取り上げてみたい。

・PolyHeme™: A large volume O₂-carrying blood replacement (R DeWoskin, Northfield Laboratories Inc.)

PolyHeme™はヒト赤血球から精製したヘモグロビンをグルタルアルデヒドを用いて重合させたものであるが、これを使用した臨床試験についての発表であった。PolyHeme™のhealthy volunteerに対する安全性はこれまでに確認されており、今回は外傷患者(n=44)および待機手術(腹

部大動脈瘤)患者(n=240)に対するrandomized controlled studyが実施された。

PolyHeme™の投与上限を3,000mLとし同種血輸血群と比較して血圧、心拍数、各種臨床検査データなどに差はなく死亡率も同等であり、PolyHeme™投与により使用した同種血輸血量が減少したことを示している。現在5,000mLを上限とした投与試験が進行中とのことであった。この発表の一部はJ Trauma 1997;43:325-32に報告されている。

・PEG-Hemoglobin: Effects on tumor oxygenation and response to chemotherapy and radiation therapy (G Ara, Dana-Farber Cancer Institute)

悪性腫瘍に対する化学療法、放射線療法の効果を増強させる目的で腫瘍組織酸素分圧を上昇させる試みがこれまでもなされてきたが、PEG修飾Hbの投与と酸素吸入により抗腫瘍効果が増強することを示した動物実験データについての発表であった。ヒト腫瘍細胞を移植したラット、マウスにPEG-Hbを全身投与し腫瘍組織酸素分圧の上昇を確認した。これに引き続き、放射線照射あるいは抗癌剤(アドリアマイシン、サイクロフォスファミドなど)投与を行い、腫瘍増大速度の遅滞、肺転移個数の減少を示し、固形癌に対する放射線療法、化学療法におけるPEG-Hbの併用の有効性を報告している。

・Regional hyperoxemia with aqueous oxygen infusate (JR Spears, Wayne State University)

体外循環を用いて水溶性酸素(aqueous oxygen, AO)を灌流させ、生体局所の虚血再灌流障害を改善させることを目的とした動物実験に関する発表であった。AOは1-2 mL O₂/gを含んだ気泡のない超飽和酸素溶液であり、灌流モデルでは局所の動脈血酸素分圧を500-1,000mmHgに保つこ

とができる。イヌ冠動脈の閉塞・再灌流モデルでAOによる再灌流群では通常の再灌流群(PaO₂ 100mmHg)と比較して左心室機能の改善、不整脈発生頻度の減少、冠微小血管の血流改善を認めたとしている。今後の臨床応用が期待される発表であった。

・Transgenic plants as an alternate source of hemoglobin (MC Marden, Inserm U299)

遺伝子工学に基づく新しいrecombinant Hb合成に関するポスター発表であり、Nature 1997;386:29-30に報告されているので詳細はそちらに譲るが、トランスジェニック植物のタバコにヘモグロビンを発現させることに成功した。発現したヘモグロビン(4量体)は酸素運搬体として基本的な機能を有していたとの発表であった。

そのほかの発表もいずれも新しい知見に基づく高いレベルのものであり、大変有意義な内容であった。一方、今回のカンファレンスでは現在わが国で積極的に研究・開発が進められているリポソーム型人工酸素運搬体に関する発表はなく、cellular Hbとacellular Hbの差異について等のdiscussionはみられなかった。今後、わが国を中心としたcellular Hbの開発が進み、臨床治療レベルでの活発な討議が繰り広げられることを期待したい。

またこの様な国外の学会、特に米国での学会に参加するとたびたび思うことであるが、各発表者の時にはジョークを交えウィットに富んだプレゼンテーションの巧みさに感心させられた。二日間あわせて20時間近い会議中、参加者を飽きさせず自分の発表に注目させるテクニックには見習う点が多くあった。

参考までにプログラムを掲載した。

IBC's 5th Annual Conference BLOOD SUBSTITUTES Latest Pre-clinical and Clinical Developments

November 20-21, 1997 Royal Sonesta Hotel, Cambridge, MA

Thursday, November 20, 1997

- | | |
|--|---|
| <p>7:45 Registration, Poster/Exhibit Set-Up, Coffee and Breakfast Bakeries</p> <p>8:30 Conference Chairperson's Welcome</p> <p style="padding-left: 20px;">Robert GL Shorr, PhD, DIC, Vice President for Science and Technology, Enzon, Inc.</p> <p>8:45 Chairperson's Opening Remarks</p> <p style="padding-left: 20px;">Timothy N Estep, PhD, Vice President, Research and Development, Blood Substitutes Program, Baxter Healthcare Corporation</p> <p>8:50 Current Status of Research in Therapeutic Oxygen Carriers</p> <p style="padding-left: 20px;">Robert Winslow, MD, Professor of Medicine, University of California - San Diego, San Diego VA Medical Center</p> <p>9:25 PEG-Hemoglobin: Effects on Tumor Oxygenation and Response to Chemotherapy and Radiation Therapy</p> <p style="padding-left: 20px;">Beverly A Teicher, PhD, Associate Professor of Medicine & Radiation Oncology, Dana-Farber Cancer Institute</p> <p style="padding-left: 20px;">PEG-Hemoglobin as an Adjuvant to Palliative External Radiation Therapy</p> <p style="padding-left: 20px;">Robert Lustig, MD, Clinical Associate Professor, Robert Wood Johnson Medical School, Department of Radiation Oncology, Cooper Hospital</p> <p>10:30 Poster/Exhibit Viewing and Refreshment Break</p> <p>11:00 Prevention of Tissue Hypoxia Using Perflubron Emulsion as a Temporary Oxygen Carrier</p> <p style="padding-left: 20px;">Peter E Keipert, PhD, Program Director, Oxygen Carriers Development, Alliance Pharmaceutical Corporation</p> <p style="padding-left: 20px;">Clinical Applications of Perfluorochemical Emulsions</p> <p style="padding-left: 20px;">Linda Stehling, MD, Medical Consultant</p> | <p>12:15 Luncheon</p> <p>13:45 Chairperson's Remarks</p> <p style="padding-left: 20px;">Robert Winslow, MD, Professor of Medicine, University of California - San Diego, San Diego VA Medical Center</p> <p>13:50 The Use of Pyridoxalated Hemoglobin Polyoxyethylene Conjugate (PHP) in the Treatment of Nitric Oxide-Induced Shock</p> <p style="padding-left: 20px;">Joseph DeAngelo, MS, Vice President of Research, Apex Bioscience, Inc.</p> <p style="padding-left: 20px;">Daniel J Traber, PhD, Professor of Anesthesiology, University of Texas - Galveston</p> <p>14:50 Regional Hyperoxemia with Aqueous Oxygen Infusates</p> <p style="padding-left: 20px;">J Richard Spears, MD, Professor of Medicine, Wayne State University</p> <p style="padding-left: 20px;">Paul Zalesky, PhD, COO, TherOx</p> <p>15:35 Poster/Exhibit Viewing and Refreshment Break</p> <p>16:00 Experience with Polymerized Purified Bovine Hemoglobin-Based Oxygen Therapeutics-Manufacturing, Veterinary and Human</p> <p style="padding-left: 20px;">Maria S Gawryl, PhD, Vice President, Research and Development, Biopure Corporation</p> <p style="padding-left: 20px;">William D Hoffman, MD, Director, Surgical Intensive Care Unit, The Cleveland Clinic Foundation</p> <p style="padding-left: 20px;">Virginia T Rentko, VMD, Dipl ACVIM, Director, Veterinary Medicine, Biopure Corporation</p> <p>17:10 Close of Day One</p> |
|--|---|

Friday, November 21, 1997

8:00	Poster/Exhibit Viewing, Coffee and Breakfast Bakeries	Steven A Gould, MD, President, Northfield Laboratories Inc.
8:30	Chairperson's Remarks	11:55 Lunch on Your Own
	Robert GL Shorr, PhD, DIC, Vice President for Science and Technology, Enzon, Inc.	13:15 Chairperson's Remarks
8:35	α -Raffinose Poly Hemoglobin-Hemolink™	Peter E Keipert, PhD, Program Director, Oxygen Carriers Development, Alliance Pharmaceutical Corporation
	Anthony A Magnin, PhD, Senior Vice President, Hemosol Inc.	13:20 Current Status of the Clinical Evaluation of HemAssist™- A Hemoglobin Therapeutic
	George P Biro, MSc, PhD, MD, Vice President, Research, Hemosol Inc.	Timothy N Estep, PhD, Vice President, Research and Development, Blood Substitutes Program, Baxter Healthcare Corporation
	J Rod Davey, MD, FRCP (C), Acting Head, Division of Orthopedic Surgery, The Toronto Hospital, Canada	DCLHb Traumatic Hemorrhagic Shock Program
9:50	Polynitroxyl-Hemoglobin (PNH) as an Oxygen Carrier and Ischemic Reperfusion Therapeutic	Edward P Sloan, MD, MPH, Research Development Director, Department of Emergency Medicine, University of Illinois College of Medicine
	Carleton JC Hsia, PhD, Chairman and Chief Executive Officer, SynZyme Technologies, Inc.	15:30 Blood Safety-Emerging Issues [Special Closing Keynote Address]
10:30	Poster/Exhibit Viewing and Refreshment Break	Harvey G Klein, MD, Chief, Department of Transfusion Medicine, Warren G Magnuson Clinical Center, National Institutes of Health
10:55	PolyHeme™: A Large Volume O ₂ -Carrying Blood Replacement	16:15 Close of Conference
	Richard DeWoskin, Chairman and Chief Executive Officer, Northfield Laboratories Inc.	



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

文庫請求先 日本赤十字社中央血液センター医療情報部
〒150 東京都渋谷区広尾4-1-31 TEL.03-5441-6601

—ヒト エリスロポエチン製剤—

エスポ[®] 皮下用

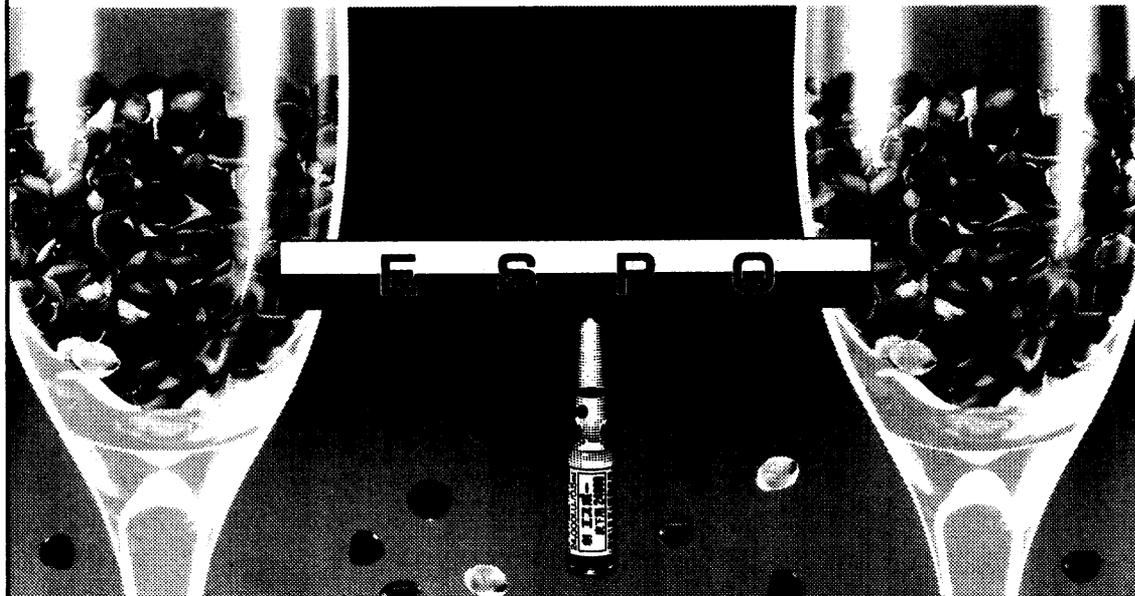
6000・9000・12000・24000

(劇)(指)(要指) 一般名：エポエチンアルファ(遺伝子組換え)



●効能・効果 —抜粋—

①貯血量が800ml以上で1週間以上の貯血期間を予定する手術施行患者の自己血貯血



用法・用量、及び使用上の注意等は添付文書をご覧ください。

販売元・調剤請求先
三共株式会社
〒100 東京都中央区日本橋本町一丁目

製造元
麒麟麦酒株式会社
〒100 東京都中央区新川二丁目

95-410

●編集後記●

「人工血液」の発刊も6巻を迎え、編集委員一同もさらに気を引き締め、内容の充実を図るべく努力しております。最新の情報を提供すべく内外の関連学会、シンポジウムなどの見聞録を掲載し、研究のリーダーの諸先生に総説をお願いし、また今年度からは人工赤血球の臨床試験成績に関する論文の紹介も計画しています。先般血液代替物学会理事会とバクスター社、テルモ社との会見に出席しましたが、両社とも臨床展開に向け熱意を傾けていることを実感いたしました。「人工血液」が多くの研究者、臨床

医、関係者の方々に向けた情報の発信源になるよう、ますます努力していきたいと願っております。

さて2月に行った編集委員会で編集委員の一部変更を提案させていただくことになりました。生化学の分野で友田先生、血漿タンパクの分野で山内紘一先生に参加していただきます。これまでお忙しい中編集に御協力願った柿崎先生、横山先生には大変お世話になりました。引き続きご支援賜りたいと思いますと共に、この紙面で感謝の気持ちをお伝えしたいと思います。(KI)

投稿規定 Short Version

本誌は、血液代替物開発研究に貢献する論文、関連する情報、学会会員のための会報、学会諸規定等を掲載するが、形式にはこだわらず創意ある投稿を広くを集める。本誌への投稿者は本学会会員であることが望ましいが、投稿を希望する者は誰でも投稿することが出来る。原稿掲載の採否は編集委員会が決定する。原著論文について、他誌に既発表あるいは投稿中の論文は掲載しない。

執筆規定

DTP (Macintosh)による編集作業によって作製するため、ワープロを用いフロッピーによる投稿を原則とする。ただし、手書き原稿による投稿でも受け付ける。欧文による投稿を歓迎する。

- 1) 原稿はワープロを用いて作成し、使用したソフト名を記載してフロッピーにより提出すること。その際、ハードコピー2部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。Macintosh以外を用いるときは、テキストファイル形式でも保存し提出すること。
- 2) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著者名、全著者所属、英文著者名、英文所属、ついで筆頭著者の住所、英文住所を記入する。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。

- 3) 総説、原著、および報告については、第2頁以降に和文抄録、Keywords (英文で6個程度)を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること。英文抄録は英文ワープロを用いて、別の「ABSTRACT」ファイルとしてハードコピーとともに提出しても構わない。
- 4) 句読点はコンマ(,)ピリオド(.)とする。
- 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbol フォントを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめること。
- 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μ m, L, mL, μ L, mol, g, mg, μ g, ng, pg, fg, N/10などを用いる。
- 7) FigureとTable: 引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は全て英文とすること。本文ハードコピー上に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。
- 8) 文献: 本文に引用した順序に番号を付け、文中では2), 3-5), 1, 4-6)などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名。論文題名。誌名。西暦発行年; 巻数:

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

1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
 2. 砂本順三, 岩本 清. リポソームの調製. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編. リポソーム. 東京: 南江堂, 1988;21-40.
 3. Fowler SA, Andracki M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22:27-42.
 4. Reichert CM, Kelly VL, Macher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985;111-60.
- 9) 論文中的略語は初出の際に省略しないこと。
- 10) 既発表の図表、その他を引用、転載する場合には、あらかじめ著作権所有者の許可を得ること。また、掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

掲載料は無料とし、論説、総説、原著、報告等については別刷り30部を贈呈する。それを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, 武岡真司, 友田輝夫, 西出宏之, 宮尾秀樹, 山内紘一、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 株式会社 高山

人工血液 vol. 6 (1) 1998年3月31日発行

〒169-8555 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

〒063-0002 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)613-6615 FAX (011)613-4131

〒113-0034 東京都文京区湯島1丁目1番地12号

TEL (03)3253-5311 FAX (03)3251-5339

再生紙を使用