

人工血液

第6巻 第3号 1998年8月

目次

第5回年次大会プログラム	48
総説 微小循環動態の観測と赤血球代替物の評価	酒井宏水 76
トロンボポエチン開発の現状と臨床応用の可能性 ...	宮崎 洋 88

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 6 No. 3 August, 1998

Contents

<i>Annual Meeting Program</i>	48
<i>Review: Efficacy of Red Cell Substitutes in Microcirculation</i>	<i>Hiromi Sakai</i> 76
<i>Current Status of the Development of Thrombopoietin and Its Therapeutic Potential</i>	<i>Hiroshi Miyazaki</i> 88

第5回日本血液代替物学会年次大会

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

テーマ

「人工血液，輸血のリスクをなくするために」

大会長 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 かでる2・7

〒060-0002 札幌市中央区北2条西7丁目

Phone: 011-231-4111

Fax: 011-271-9827

年次大会長挨拶

ヒト血液をめぐる問題は常に社会問題として取り上げられ、1980年以降の薬害エイズ禍はその最たるものである。血液に対するNational Policyは先進国のみならず途上国においてもその実行を強く求められている。すなわち献血による血液の国内自給、血液の安全性である。血液の自給が困難であれば、当然ヒト血液によらない血液代替物、すなわち血液の人工物が求められるし、ヒト血液によって輸血の安全が確保できないのであれば、ヒト血液によらぬ人工物が求められることになる。いつ、どこでも得られ、血液型に関係なく輸血できる人工血液は、長い間人類の希望であった。血液のNational Policyとともに人工血液の開発は非常に重要であり、本学会の存在意義がここにある。

本第5回日本血液代替物学会のテーマは「人工血液、輸血のリスクをなくするために」とした。大会長講演は私が血液センターに所属していることもあり、「輸血代替療法により血液事業は変わるか」とした。特別講演として、一つはGreenburg教授(Brown University, USA)による「血液代替物の臨床応用」、二として土田教授(早大)による「酸素輸液の展開状況」、三には池田教授(慶大)に「血小板の止血機構および代替物の可能性」をお願いした。教育講演としては人工血液の開発理由の一つにもなっている、「プリオン病と予防対策」として田代教授(北大)に、西岡先生(日赤)には「輸血感染症に残された課題」について講演をお願いした。その他シンポジウムでは、人工赤血球(人工酸素運搬体)はすでに臨床第Ⅲ相試験を終了寸前のものもあり、残された開発のポイントを明確化するために、ヘモグロビン溶液のウイルス不活化、人工赤血球の保有する諸機能、活性酸素障害とその対策、微小循環と人工赤血球、生体適合性等を取り上げ討議する予定である。またシンポジウム2として、開発途上の種々な血液代替物の臨床応用に向けて、酸素運搬体利用は酸素治療か、あるいは補液治療か、酸素運搬体が期待される病態は何であるか等とともに同種血輸血回避のための試みである、輸血のトリガー、造血サイトカインの応用、さらには体外造血系の可能性等も発表してもらうことにしている。このほか、一般演題を企画しているが、実際に研究している参加者が十分な時間を駆使して議論できるよう考えてスケジュール配分したつもりである。

本学会を通じて今後人工血液開発、研究がますます促進されれば、学会を担当した私としても望外の喜びである。ぜひ初秋の北海道に来られ、参加されることを希望している。

第5回日本血液代替物学会年次大会会長

関口 定美

(北海道赤十字血液センター所長)

お知らせとお願い

■参加者の方へ

1. 開場および受付開始

かでのる2・7の開場、受付開始は2日間とも午前9時となります。

2. 参加登録

参加登録は、午前9時よりかでのる2・7の総合受付(1F)において行います。参加費は10,000円(懇親会参加費を含む)です。ネームカード(兼領収書)をお渡ししますので所属、氏名を各自でご記入の上ご着用下さい。会期中、開場へのご入場の際には必ずネームカードをご着用下さい。

3. 年会費および新入会受付

日本血液代替物学会に未入会の方は、総合受付(1F)にて入会手続きをおとり下さい。年会費は10,000円です。

4. 抄録集

抄録集は会員全員に事前送付しております。それ以外にご入用の方は、総合受付において1部1,500円にて販売いたしますが、部数に限りがあります。

5. 懇親会

参加者相互の親睦をはかるため、第一日目、9月4日(金)午後6時半よりホテルニューオータニにて懇親会を開催いたします。

6. 呼出・伝言

会場内での呼び出しは、緊急の場合に限り、総合受付(1F)にお申し出下さい。また、1Fロビーにインフォメーション・ボードを用意致しますのでご利用ください。

7. 食堂

会場内には軽食喫茶(2F)がございますが、昼食時には混み合うことが予想されます。会場外の食堂もご利用下さい。

8. その他

かでのる2・7 1Fロビー内にて各種ドリンクをサービスしますのでご利用下さい。ただし、大ホールなどの学会会場内での飲食はかたくお断り致します。会場内は所定の場所以外での喫煙は禁止となります。クロークは、かでのる2・7大ホール横にあります。

■演題発表される方へ

1. シンポジウム

口演者は、スライドを口演予定時刻の1時間前までに、スライド受付にて試写の上、ご提出下さい。口演時間は15分、討論は5分です。スライドの枚数には制限はありませんが、時間厳守をお願い致します。プロジェクターは1台のみ用意致します。スライドは口演終了後スライド受付にて返却致します。

2. 一般演題

口演者は、スライド受付にて試写の上、ご提出下さい。口演時間は7分、討論は3分です。口演終了1分前に時間をお知らせ致します。スライドの枚数には制限はありませんが、時間厳守をお願い致します。プロジェクターは1台のみ用意致します。スライドは口演終了後スライド受付にて返却致します。

■司会、座長へのお願い

総合受付に、少なくとも開始30分前までにご参会の旨をお知らせいただき、連絡事項を確認の上、待機ください。口演会場では次座長席にご着席下さい。

■大会事務局

第5回日本血液代替物学会 年次大会会長 関口 定美

〒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

Phone : 011-613-6640

Fax : 011-613-4131

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

第1日目 9月4日(金)

9:20-9:30 開会の辞

関口 定美

9:30-10:50 【一般演題】

座長 友田 輝夫(東京医科大・内科)

仲井 邦彦(東北大院・医・環境保健医学)

1. ヘモグロビン利用の赤血球代替物の特徴と酸素の輸送動力学

武岡 真司(早大・理工学総合研究センター)

2. 近赤外分光法を用いたラット脳におけるヘモグロビンリポソーム包接体の酸素運搬機能の測定

坂野上 淳(北大・電子科学研究所)

3. 出血性ショックモデルにおける人工酸素運搬体—ヘモグロビン小胞体(HbV)—の小腸に対する酸素運搬能の検討

吉津 晃(東京都立駒込病院外科)

4. 人工酸素運搬体NRC(Neo Red Blood Cell)を用いた部分液体換気の有効性についての検討

田島 敦志(慶大・医・外科)

5. 分離肝細胞を充填したモデル肝臓における人工酸素運搬体(NRC)の評価

黒澤 尋(山梨大・工・物質/生命工学)

6. 亜硝酸によるヒトオキシヘモグロビンの酸化の過程で生じる一酸化窒素(NO)産生量のpH変化による影響

馬島 英輔(東京医科大・第三内科)

7. S-Nitrosohemoglobinの作製

仲井 邦彦(東北大院・医・環境保健医学)

8. S-Nitrosohemoglobinが循環系機能に与える影響

佐久間 一郎(北大・医・循環器内科)

10:50-11:30 【教育講演-1】

司会 宮崎 保(札幌逡信病院)

プリオン病と予防対策

田代 邦雄(北大・医・神経内科)

11:30-13:10 昼食 (11:30-12:30 理事会、12:30-13:10 評議員会)

13:10-13:30 総会

13:30-14:00 【大会長講演】

輸血代替療法により血液事業は変わるか

司会 阿岸 鉄三（東女医大腎臓病総合医療センター）

関口 定美（北海道赤十字血液センター）

14:00-14:40 【特別講演-1】

Clinical Implications of Blood Substitutes

司会 関口 定美（北海道赤十字血液センター）

A. Gerson Greenburg, M.D., Ph.D.
(Department of Surgery, Brown University, USA)

14:40-15:20 【特別講演-2】

酸素輸液の展開状況

司会 小林 紘一（慶大・医・外科）

土田 英俊（早大・理工学総合研究センター）

15:20-15:50 休憩

15:50-18:10 【シンポジウム-I】 血液代替物開発のポイント

座長 小室 勝利（国立感染症研究所）

武岡 真司（早大・理工学総合研究センター）

1. ヘモグロビン溶液のウイルス不活化

阿部 英樹（北海道赤十字血液センター）

2. 人工赤血球の保有する諸機能

西出 宏之（早大・理工学部）

3. 活性酸素障害とその対策

藤井 順逸（阪大院・医・生化学／分子生物学）

4. 微小循環動態の観測による赤血球代替物評価

酒井 宏水（早大・理工学総合研究センター）

5. Biocompatibility Assessment of Diaspirin Crosslinked Hemoglobin (DCLHb)

Kenneth E. Burhop, Ph. D. (Baxter Healthcare Co., USA)

6. 前臨床試験でクリアすべき課題

高折 益彦（岡山県赤十字血液センター）

7. 人工血小板の開発と課題

村田 満（慶大・医・内科）

18:30-20:30 懇親会

第2日目 9月5日(土)

9:30-11:20 【一般演題】

座長 渡辺 真純(慶大・医・外科)

宮尾 秀樹(埼玉医大・総合医療センター)

9. アルブミン-ヘム複合体の酸素結合能

小松 晃之(早大・理工学総合研究センター)

10. 脱血ショックモデルを用いた全合成系人工酸素運搬体、アルブミンヘム(HSA-FeP)の生体内における酸素運搬能の検討

田島 敦志(慶大・医・外科)

11. ヘモグロビン小胞体表面へのポリオキシエチレン修飾効果

宗 慶太郎(早大・理工学総合研究センター)

12. USTH法によるSFH中のメトヘモグロビン還元酵素系への影響

木村 哲寛(テルモ株式会社・研究開発センター)

13. ヘモグロビン系酸素運搬体による血小板作用

藤井 聡(北大・医・循環器内科)

14. In vitroにおける人工酸素運搬体(NRC)の抗原提示能、好中球走化能、血小板凝集能への影響

藤原 満博(北海道赤十字血液センター)

15. Perfluorochemical (FC43)の補体活性化作用とラット肝異種移植における生着延長効果

田中 三津子(札幌北楡病院・外科)

16. ラットピューロマイシンアミノヌクレオシド腎症モデルにおける遺伝子組換えヒト血清アルブミンの腹水改善効果

塚田 稔(吉富製薬株式会社・研究本部)

17. 人工リンパ球の開発：抗白血病抗体とアポトーシス誘導分子を固相化したゼラチンビーズによる抗白血病効果の検討

宮村 耕一(名大・医・第一内科)

18. 血小板代替物としての固定血小板の可能性 I. パラホルムアルデヒドを用いた固定方法および保存条件の検討

山口 美樹(北海道赤十字血液センター)

19. エホバの証人から見た輸血の代替療法の意義

有賀 友則(ものみの塔聖書冊子協会)

11:20-12:00 【教育講演-2】

司会 湯浅 晋治(順天堂大・輸血)

輸血感染症に残された課題：Residual RiskとSatisfactory Margin of Safety

西岡 久壽彌(日本赤十字社・技術顧問)

12:00-13:00 昼食

13:00-13:40 【特別講演-3】

司会 清水 勝（東女医大・輸血）

血小板の止血機構および代替物の可能性

池田 康夫（慶大・医・内科）

13:40-16:00 【シンポジウム-II】 血液代替物の臨床応用に向けて

座長 西出 宏之（早大・理工学部）

川村 明夫（札幌北楡病院）

1. Oxygen Carrying TherapeuticsかReplacementか

小林 紘一（慶大・医・外科）

2. 代用赤血球が期待される病態

阿岸 鉄三（東女医大・腎臓病総合医療センター）

3. 輸血のトリガー

清水 勝（東女医大・輸血）

休憩（14:40-15:00）

4. 造血サイトカインにより同種血輸血は回避できるか

別所 正美（埼玉医大・第一内科）

5. 体外造血系の可能性：血小板代替物を目指した巨核球の大量培養の試み

平山 文也（北海道赤十字血液センター）

6. 無細胞型ヘモグロビンによる肝微小血管収縮反応の増強効果：COおよびNOの役割

末松 誠（慶大・医・医化学）

16:00 閉会の辞 関口 定美

輸血代替療法により血液事業は変わるか

関口 定美
北海道赤十字血液センター

血液事業におけるNational Policyは、献血による国内血液の自給と血液の安全性確保である。わが国においては、輸血用血液は昭和39年の閣議決定以降完全に献血により自給されているが、分画製剤の原料としての血漿は、ほとんど献血と無関係に、製品あるいは原料血漿として外国から輸入されていた。このため1982年以降取り返しのつかない薬害エイズ禍となり、国および国民にとって多大の反省が求められることとなった。

一方、血液製剤がPL法の適用を受けることとなり、より血液製剤の安全性が求められ、riskゼロを最終の目標とし血液製剤の安全性確保の対策が考えられている。しかしながら、ヒト血液を使う現在の血液製剤は、避けることのできない免疫学的副作用およびウイルス感染などが存在している。このような状況から、National Policyである自給および血液の安全性確保の対策として、ヒト血液によらない血液の代替である人工血液が求められる結果となっている。わが国ではすでに組み換え第VIII因子が導入され、第VIII因子使用量の50%以上を占め、急激にヒト由来第VIII因子の需要が減少している。献血による自給率25%であるアルブミンについても、すでに組み換えアルブミンの第III相試験が終了し、予定では生産開始が2000年7月で、年100万バイアル(1バイアル=12.5g)が生産されるという。

また、輸血用血液製剤では、同種血輸血の回避が輸血のコンセプトとして理解され、血液の使用量が漸減する可能性がある。とくに赤血球輸血の開始時点を表す輸血のトリガーはヘモグロビン量7.0g/dlが一般的に認められるようになり、赤血球の需要も減少する可能性がある。これに対し、現在最も開発が進んでいる人工酸素運搬体(人工赤血球)は、すでに第III相試験が終了し、おそらく現在適応とされる赤血球輸血の一部を占めるようになると考えられる。血小板については現在血液製剤中最も需要の高いものであるが、有効期間が72時間と短いため、円滑な供給に不安が持たれている。人工血小板の研究はまだ緒についたばかりであるが、血小板輸血の代替として利用されるとすれば、血小板輸血に大きな影響をもたらすであろう。

将来の輸血にとってヒト血液によらぬ人工代替物はヒト由来の副作用を完全に排除するものであり、将来の輸血にとって同種血回避と同時に大きな影響をおよぼすことは確実である。

CLINICAL IMPLICATIONS OF BLOOD SUBSTITUTES

A.GERSON GREENBURG, MD PhD
DEPARTMENT OF SURGERY
BROWN UNIVERSITY, PROVIDENCE,
RHODE ISLAND, USA

Red cell substitutes have been proposed for use in medicine for nearly a century. The clinical implications of the use of red cell substitutes are manifold including changes in practice patterns and education as well as assessing the benefits of these materials in clinical use.

The "ideal blood substitute" has many of the characteristics of red cell blood transfusions and may have additional properties with augmented clinical benefit. Replacement of vascular volume and provision of oxygen carrying capacity are the primary traits of the substitutes now in clinical testing. Whether use will be according to current "transfusion guidelines" awaits exploration. The use of red cell substitutes will decrease some of the current transfusion risks but not all. These solutions and their use will have some inherent risks as yet not completely defined. The net benefit to the risk trade-off when "substitutes" replace or augment red cell transfusions is yet to be defined.

The many additional properties of substitutes--viscosity, scavenging of nitric oxide, improved perfusion of the microcirculation-- have clear positive clinical implications generally and in specific patient populations; these issues will be discussed in the context of patient care.

How will red cell substitutes impact current transfusion practice? By using a detailed analysis--the elements of which will be discussed--perhaps 60% of the current use of red cell transfusion in the surgical environment can be replaced by substitutes. This conclusion is based on application of current transfusion guidelines to a model of transfusion use in surgical patients where alternatives to banked blood, as designated in the guidelines, are considered. Given the wide ranging clinical implication on current practice this construct will be discussed in some detail.

On balance the future is bright for the use of red cell substitutes as the benefits are generally perceived to out weigh the risks.

酸素輸液の展開状況

土田 英俊

(早稲田大学理工学総合研究センター)

臨床で汎用されている血漿増量剤は、循環血液量の補充が目的である。これに酸素輸送のできる成分を添加すれば、体組織に酸素供給が可能な「酸素輸液、Oxygen infusion」となる。これが理想的な応用を計るとすれば、いわゆる人工赤血球が実現することになる。

ヒトヘモグロビンを利用した赤血球代替物については従来から国際的進展が計られている。いわゆる修飾ヘモグロビンの応用は、ここ両三年欧米で臨床試験も実施され、可成り様子がはっきりして来た。しかし、その多くは輸血代替というよりは、いわゆるヘモグロビン治療薬としての応用の検討である。例えば、血圧上昇の副作用を昇圧剤として期待するなどの内容であり、最近もその結果についての議論が報道されたばかりである。

他方、ヒトヘモグロビンを高濃度に詰め込んだ細胞型のヘモグロビン小胞体(直径250nmφ)は、酸素親和度、膠質浸透圧、比較的大粒径などの項目についての調節が容易であるので、長時間に亘る血流中での機能発現が可能となる利点がある。細網内皮系への取込み速度と、粒径および表面状態との関係などの解明に焦点が移っている。

しかし、酸素輸液の普遍的供給が望ましいとの観点から、ヒトヘモグロビン、リコンビナントヘモグロビンから離れた、「リポドーム集合体」の具体化も重要である。ポルフィリンの酸素結合部位を修飾したリポドームをリン脂質分子と共集合させた小胞体系、リポドーム分子の単独集合系、そしてヒトアルブミン(HSA)に担持させた複合系などは、酸素輸液として役立つことが明確にされている。これらを体内投与した場合、一定時間の酸素輸送能が維持でき、血液に近似した溶液物性に加え毒性も低く、容易に代謝系に受入可能との期待から、新しい酸素輸液としての試験が強力に開始されている。

血小板の止血機構および代替物の可能性

池田 康夫

慶應義塾大学医学部内科

血小板輸血は臨床上欠くことの出来ない補助治療手段として、その重要性が益々認識されるようになった。我々は血小板輸血が抱える問題点を解決する一つの方法として、血小板代替物創製に着手している。本講演では、これらの背景を念頭に、血小板の止血機構における役割について、その分子レベルで最近の知見を述べる。

血小板は止血以外、炎症、癌の転移などにも深い係わり合いをもっているが、止血機構に関する機能としては、粘着・凝集・放出・凝固亢進作用がある。血管内皮細胞が脱落し、内皮下組織が露出すると、その構成成分であるコラーゲンやそれに結合するvWFを標的にして血小板は粘着する。この反応は血小板膜糖蛋白GPIa/IIa、GPIb/IX/V複合体を介して起こる。粘着により活性化シグナルが細胞内に伝えられ、血小板はspreadingを起こし、同時に放出反応が惹起され、セロトニン、ADPなどを血小板外へ放出する。GPIIb/IIIa複合体(αIIbβ3インテグリン)の細胞内ドメインに伝えられたシグナルによって、この複合体は立体構造の変化を来し、フィブリノゲンやvWFなどに対する受容体機能を発現しその結果、これらの粘着性蛋白を介して血小板凝集塊が形成される。また、このように活性化された血小板膜表面では陰性荷電を有するリン脂質が露出し、血液凝固反応進展の場を提供し、フィブリンが形成される。血小板凝集塊の形成とフィブリン生成は相互作用を及ぼし止血血栓形成を完了させる。

このような血小板機能を全て有する血小板代替物を創製することは不可能に近く、このうちどのような機能を代替することが生体内で止血機能を発揮し得る血小板代替物となり得るかについても述べてみたい。

プリオン病と予防対策

田代邦雄
北海道大学医学部神経内科

1997年度のノーベル医学・生理学賞はプリオン蛋白(PrP)を発見し、この異常によりプリオン病が発症するという仮説を提唱したカリフォルニア大学のPrusiner教授が受賞したというニュースが世界中を駆け廻った。

プリオンは正常の動物の細胞質に普通に存在する蛋白質であり、その役割は不明とされている。そのプリオンが何らかの原因で異常化し、その細胞を死滅させ、また他の個体に感染する。この異常プリオン(蛋白質性感染粒子 proteinaceous infectious particle, PrP^{Sc})により感染することが明らかにされているものをプリオン病という。

プリオン病は遺伝性のものと非遺伝性のものに大別される。非遺伝性のプリオン病の代表的疾患は、散発性のCreutzfeldt-Jakob病(CJD)で、世界中に分布しその有病率は人口100万人当たり1人とされている。しかし医原性のCJDとしては従来からCJD罹患患者からの角膜移植、下垂体ホルモン製剤、人工硬膜、鼓膜移植などが報告されていた。

一方、1996年3月の英国政府諮問委員会の声明に端を発し、いわゆる狂牛病と英国で発生した青少年層に発病している新変異型CJDとの関連が注目されている。

本邦では1996年に厚生省による「クロイツフェルト・ヤコブ病等に関する緊急全国調査研究班」が調査を実施し、本邦では新変異型CJDは認められなかったが、ヒト乾燥硬膜移植を受けた患者から43例にも及ぶCJD発病者が判明していたのである。

CJDが発病すればそれを治療する手段はない。従って感染を予防することが最も重要となる。血液製剤との関連については確実な関与は明らかでないとされていたが1995年に肝移植とアルブミン投与を受け、2年後に発病した症例、そして1998年には大動脈冠動脈バイパス時に25%アルブミン3単位を受けた症例でのCJDが報告されている。因果関係は不明とされているが注目すべきであろう。

CJDの自験例、厚生省全国調査、そして感染予防対策について言及する。

輸血感染症に残された課題：Residual RiskとSatisfactory Margin of Safety

西岡 久壽彌
日本赤十字社 技術顧問

1998年7月21日、極めて困難な情勢のもと、関口会長の指命によりこの講演をひきうけた。全身全霊をささげてわが国の血液事業の推進に挺身されている会長の熱意に応じるからにはほかならない。

現在わが国における輸血血液、血漿分画製剤は国民の善意の献血、検査技術の向上、供給体制の整備、国、地方自治体の支援により日本赤十字社が中心となって医療の現場に世界最高のレベルで、史上最高の安全性をもって医療の現場に届けられている。

しかし、ヒト由来の血液、リコンビナント製剤、化学合成品、いずれも100%安全であることは有り得ない。残された危険性(Residual Risk)を0に近づける努力が日夜血みどろになって続けられている。

今迄、先人の努力で築き上げられてきた献血体制を護持して、至上命令である患者の生命を救うため、現在の時点で実行可能な到達できる限界内での安全性(Satisfactory Margin of Safety)について、医療担当者、患者、血液事業担当者間のコンセンサスと信頼のもとに保健医療を推進するより外に道はない。

血液事業推進の先進国とされていた米、加、英がいずれも資本主義的契約社会の通弊を露出して、IVIGの不足、血液事業からの撤退、あるいは献血から売血への逆戻りなどの混乱に陥っている。わが国はなお、過去、現在、反省、改善すべき点は多々あるもののその経験を教訓として、前者の轍をふむことなく、Residual Riskを十分に分析し、Satisfactory Margin of Safety: 医療の原点にさし戻って安全且つ安定な血液事業の推進を願ってお話させていただきたい。

ヘモグロビン溶液のウイルス不活化

阿部英樹, 池淵研二, 関口定美
北海道赤十字血液センター

人工赤血球の保有する諸機能

西出 宏之
早稲田大学 理工学部

人工酸素運搬体の原料として現在は、遺伝子組換えにより製造されるリコンビナントヘモグロビンと、ヒト赤血球から分離、精製されるストローマフリーヘモグロビン(SFH)が主として用いられている。特にSFHの場合にはヒト由来であるため、開発する人工酸素運搬体の形態(ポリエチレングリコール修飾型, リボソーム包埋型, 等)如何にかかわらず、感染性因子に対する高い安全性が求められている。SFHの製造には献血由来の赤血球製剤が用いられていることから、感染性因子、特に輸血を介して感染するウイルスについてはすでに高い安全性が確保されているが、検査技術の問題、ウイルス感染後現行の検査でウイルス陽性と判定できない期間(ウインドウピリオド)の問題があり、より安全なSFHを調製するためには、積極的なウイルス除去、不活化技術の開発及び導入が必須である。本演題では、SFHに適用可能な代表的なウイルス除去、不活化法について述べる。

加熱処理法は、血漿分画アルブミン製剤のウイルス不活化法として古くから用いられており、その条件60℃, 10時間ではヒト免疫不全ウイルス, B型及びC型肝炎ウイルスを確実に不活化することが可能である。一方この処理をSFHにそのまま適用すると、ヘモグロビンのメト化が促進され、基本的機能である酸素運搬機能が損なわれてしまう。そこで一酸化炭素でHbを安定化させた後、加熱処理を行う等の工夫がなされている。

新たな不活化法として、光増感色素メチレンブルーと光照射を組み合わせた光不活化法が考案されている。ヘモグロビンの光吸収帯は600 nm以上には無いことから、660 nmに光吸収ピークを持つメチレンブルーが用いられる。その機序は光照射により励起したメチレンブルーの作用により活性酸素の一種である一重項酸素が生成し、それがウイルスを傷害して感染性を低下させると考えられている。一方でヘモグロビンの傷害も懸念されるが、メト化はそれほど起こらないようである。

もう一つの考え方は、ヘモグロビンとウイルス粒子を物理的に分離する方法である。その為ウイルス粒子をも除去できる性能を持つ中空糸膜(BMM)を用いる。上記に述べた二つの方法がノンエンベロープウイルスであり粒子径の最も小さいヒトパルボウイルスB19を十分不活化できないのに対し、BMMではヘモグロビン回収率を高く維持しつつ高率にパルボウイルスを除去することができる。

SFHの安全性を高めるためには、以上に述べた様な方法のどれか一つに頼るのではなく、機序の異なる方法を組み合わせ、それぞれの利点を生かして用いることが重要であると考える。

人工赤血球あるいは酸素運搬液として満足すべき性能を、ここでは主に臨床試験まで進んだセルフリーヘモグロビン修飾体(表1)を例にとり、見直してみたい。第一の酸素運搬量は、Hb濃度、酸素親和性 p_{50} 、ヒル係数、Hbメト化率で表現される。動脈での酸素過剰放出による血管収縮の指摘から、 p_{50} も単に赤血球と同程度に大き(酸素親和性が低)ければよい訳ではない。分子径の大小、均一溶液か懸濁液かは、血中滞留にとって宿命の課題である。また極微小径と低い粘性は末梢循環の改善につながる利点とされているが、逆に毛細血流量などの減少は前々から議論されている。コロイド浸透圧上昇の可否もある。いわゆるヘモグロビン毒性の抑制法も要件である。

表1 セルフリーヘモグロビン修飾体の代表例

修飾形式 企業名	高分子結合		重合		分子内保護		参照 ヒト血液
	膜の厚み/Apoc	Enzym	Biopure	Hemoseal	Baxter Somatogen	HiB1.1	
膜厚・ 面積	PHP	PEG-Hb	MEMOPURE	HemoLink	DCLHb HemAssist	HiB1.1 Otro	
Hb原料	ヒト	ウシ	ウシ	ヒト	ヒト	ヒト	ヒト
酸素性調節剤	ヒト・特効薬	無	無	57/1-2	57/1-2	57/1-2	57/1-2
結合成分	ヒト・特効薬	ヒト・特効薬	ヒト・特効薬	ヒト・特効薬	ヒト・特効薬	ヒト・特効薬	ヒト・特効薬
製剤	ヒト・特効薬	ヒト・特効薬	ヒト・特効薬	ヒト・特効薬	ヒト・特効薬	ヒト・特効薬	ヒト・特効薬
分量	9万	<12万	65万	12.8~57.6万	6.5万	6.5万	6.5万
Hb濃度(g/dl)	6	6	13	10	10	5	15
[結合Hb濃度]	[7.8]	[8]	—	—	—	—	—
酸素性 p_{50} (mmHg)	24	15	38	34	32	29	28
ヒル係数 n	1	1.2	1.1	1	2.8	2.3	2.8
メトHb(%)	3.5	<10	3	<10	3	<10	<1
加圧・浸透圧(mmHg)	38	<80	20	24	42	30	25
溶液粘性(cP)	2.7	4.5	<4	1	1.3	<1	4.5~5.0
血中半減期	44	48	24	6~18	12~18	数~12	(120日)
(投与量 g/kg, 動物)	(1.2~1.3)	(0.5, ヒト)	(0.75, ヒト)	(2, ヒト)			

活性酸素障害とその対策

藤井順逸、松本明郎、大角紋子、谷口直之
 大阪大学大学院医学系研究科B1、生体制御医学
 生化学・分子生物学

赤血球は酸素分圧の高い肺で酸素を結合し末梢の組織に分配するまで、他の組織では見られない高レベルの酸素に曝されている。赤血球はそれに起因する酸化障害からの防御機構として、分子量数百の低分子化合物から数万の高分子タンパク質にまで及ぶ各種抗酸化物質を多量にもち自らを防御している。低分子量の抗酸化物質としては、各種抗酸化ビタミンに加え、システインやグルタチオンなどのチオール基を有するアミノ酸やペプチドがある。また、酸化的障害をもたらす活性酸素種やその生成物を除去するためにスーパーオキシドディスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)といった一連の抗酸化酵素を多量に含んでいる。さらに、酸化された物質を除去もしくは再生する系も発達しており、NADPH依存性にグルタチオンを還元する酵素(GR)、チオレドキシンの還元酵素

(TR)、そしてタンパク質や脂質の過酸化の結果生じるカルボニル化合物に作用するアルド・ケト還元酵素などが存在する。ヒトの成熟した赤血球には核がなく新たなタンパク合成はほとんど起こらないため、こうした抗酸化酵素の機能がなんらかの原因で低下した場合には赤血球の働きや寿命を低下させることとなる。赤血球は周りを大量の血漿に取り囲まれた特殊な組織であり血漿中の酸化剤の影響を直接受ける。これは赤血球中の抗酸化物質のみならず血漿中の抗酸化物質も赤血球の機能維持に重要なことを意味するが、多くの低分子抗酸化物質ならびにSODやGPxなどの抗酸化酵素が実際に血漿中にも存在する。更に、最近見出された一群の抗酸化酵素・ペルオキシレドキシンはチオレドキシンを電子供与体とし、GPx/GR系とのアナロジーを形成しているが、これにもやはり血漿型が存在する。GPxならびにTRは微量金属元素のセレンウムを含有する21番目のアミノ酸セレノシステインを活性中心に有し、セレンウムの抗酸化作用発現の経路となっている。しかし、酸化的ストレスが持続する場合にはNADPHの消費が合成を上回ってレドックス系のバランスに破綻をきたし、細胞機能の維持が困難となる。このような赤血球をとりまく酸化的ストレスと抗酸化物質の作用についての最近の知見を概説する。

微小循環動態の観測による赤血球代替物評価

酒井宏水¹、原弘之¹、武岡真司¹、土田英俊¹
 Marcos Intaglietta²
¹早稲田大学 理工学総合研究センター
²Dept. Bioengineering., Univ. California, San Diego

【緒言】 赤血球代替物の評価系として、微小循環動態(血流、血管径、毛細管密度、酸素分圧)を支配する抵抗血管の動態を非侵襲で直接顕微鏡観測する方法を確立した。構造の異なる赤血球代替物を投与し、この抵抗血管の動態に与える影響を比較検討した。

【方法】 Hamster dorsal skinfold法を用い、無麻酔非侵襲下50%出血ショック(45分)と返血蘇生を実施。他方、全血の10%容量の代替物($\alpha\alpha$ 架橋Hb, POE-Hb, Hb小胞体, albumin)を投与した。微小血管系を抵抗血管(小動脈 A_0 , 120~160 μ m径), 細動脈($A_{1,2,3,4}$, 8~60), 細静脈(V_C, L , 20~80), 小静脈(V_0 , 300~400)に分類し、それらの管径と血流速度の変動を顕微鏡画像から解析した。また体動脈圧、頸動脈血ガスパラメータも同時に測定した。

【結果および考察】 50%出血ショック後、 A_0 , V_0 は各々前値の50%, 70%に収縮し、血流量は20%以下に低下した。脱血液を返血させると、血圧はほぼ回復するものの、 A_0 径は前値の75%迄、血流量は50%迄の回復に留まった。 A_1 - A_4 , V_C , V_L の径は殆ど変化が無いかに逆に弛緩した。従って、抵抗血管である A_0 の収縮は、虚血時の主要臓器への血液の再分配と血圧の維持に寄与し、微小循環動態を支配する重要な部位と考えられた。

全血の10%容量の赤血球代替物を投与した場合、 $\alpha\alpha$ 架橋Hbで35 mmHgの血圧亢進と、 A_0 のみ20%の収縮が同時観測され、3時間以上持続した。POE-Hbでは15 mmHgの血圧亢進と15%の A_0 収縮となり、またalbuminでは収縮しなかった。他方Hb小胞体では、15%の A_0 収縮が持続したが、血圧は10mmHg程度の一過性上昇であった。Hbを内包しない空の小胞体では、 A_0 収縮も血圧亢進も認められなかった。抵抗血管の収縮には、血管内皮由来弛緩因子であるNOのHbによる捕捉が関与していると考えられており、今回の結果は赤血球代替物の構造とNOとの反応性の相違を反映しているものと思われる。更には酸素過多による自動調節機能などの可能性もあり、赤血球代替物の物性決定に重要と考えられる。

BIOCOMPATIBILITY ASSESSMENT OF DIASPIRIN CROSSLINKED HEMOGLOBIN (DCLHb).

Kenneth E. Burhop
Baxter Healthcare Corporation

DCLHb is a highly purified, intramolecularly cross-linked hemoglobin solution currently under late phase clinical evaluation as a hemoglobin therapeutic agent. Over 100 major preclinical studies have been performed in which DCLHb was infused into a variety of animal species including rats, rabbits, dogs, sheep, swine, and primates. Hemoglobin doses in a range from as low as 50 mg/kg to doses as high as 112,000 mg/kg in repeat dose studies have been evaluated.

The results of *in vivo* studies demonstrate that DCLHb: 1) does not cause significant complement activation, 2) does not alter circulating platelet concentrations *in vivo* or alter their ability to aggregate in response to challenge with collagen or ADP, 3) does not alter normal coagulation parameters in plasma such as PT, APTT, or fibrinogen levels, 4) does not alter red cell or platelet morphology, and 5) does not affect circulating or differential white blood cell counts. In addition, DCLHb does not appear to be immunogenic. Primates receiving repetitive infusions of DCLHb do not develop antibodies to DCLHb and do not demonstrate any immediate or delayed hypersensitivity.

The results of a variety of *in vitro* preclinical studies completed using human blood demonstrate that DCLHb: 1) does not affect the response of normal human platelets to collagen or ADP, even when the platelets are diluted by 50% with DCLHb, 2) does not produce activation of human serum complement proteins C3, C4 and C5, and 3) does not adversely affect the immunohematology profile (i.e., typing, antibody screen, or cross-matching reactions). In addition, no pre-existing antibodies to DCLHb could be detected in normal human volunteer sera and to date, no antibodies to DCLHb have been detected in patients infused with DCLHb.

In conclusion, these results suggest that DCLHb appears to be well tolerated and biocompatible in a wide variety of models and experimental settings both *in vivo* and *in vitro*.

前臨床試験でクリアーすべき課題

高折益彦
岡山県赤十字血液センター

すでに欧米においては赤血球代替物、人工血液として diaspirin 架橋ヒトヘモグロビン (DCLHb)、牛ヘモグロビン重合体 (HBOC-201) などが第2、3相の臨床試験に入っている。将来、我が国においてもこれらの製品について臨床試験を行なう可能性がある。また我が国においては独自にリボゾーム包埋ヒトヘモグロビンが開発され、すでに前臨床試験でその有効性が認められている。そして次に臨床試験に入る際には、ヒトと他の動物との種族間の差にともなう予想できない失効現象や有害事象の発現を除いて、前臨床試験で可能なかぎり、その製品の将来性を確認しておくことがきわめて大切なことである。これらの要点は以下の3点にある。

すなわち、1。血液代替物として有効であることで、a) 酸素運搬機能が十分にある、b) 血管内に適当時間留まる、c) 毛細血管内を流れることで、そして2。副作用がないことである。すなわち a) その製品の投与により循環機能に悪影響を与えないことが第一である。すなわち (i) 心筋収縮力に影響を与えない、(ii) 赤血球など血球に凝集を起こさせない、(iii) 循環血液の全身血管内分布に変化を与えない、(iv) 肺血管を含む全身血管に拡張・収縮を与えない、である。そして b) 抗体産生を含む、免疫反応を生じない、c) 網内系を含む免疫機能を抑制しない、d) 止血機能に影響しない、e) 肝、腎機能を初め、全ての生体機能を障害しない、ことなどが要求される。そして最後に3。工業生産に関する条件を満足することであろう。すなわち a) 可及的化学的に合成され、もし自然界から得る場合には有害物質の除去が容易なこと、b) 製品の均一性が得られること、c) 室温下で2年以上貯蔵でき、さらに d) 現在の血液製剤より低価格、少なくとも同等価格であることである。すでに前臨床試験、そして臨床試験で1、2。の項目中の数点に問題を残しているものがある。しかし人工血液に対しての医療面、社会面からの必要性に応じ、また付帯している問題の程度に応じて、場合によっては認容する可能性があることも忘れられない。

人工血小板の開発と課題

村田 満、西谷孝子、池田康夫
慶應義塾大学医学部内科

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はじめて機能し血小板血栓を作る(機能調節機構)。また形成された血栓は溶解吸収されるべきなど代替物開発に於いて克服すべき問題は多い。血小板代替物としては生体組織(細胞)と人工物質を組み合わせたハイブリッド型がより現実的であろう。最も単純な人工血小板は、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。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GPIb/IX/V複合体、コラーゲン受容体であるインテグリン $\alpha 2\beta 1$ や凝集に必須な $\alpha 11b\beta 3$ などがその候補である。

1996年、FDA、AHAなどの共催で血小板代替物に関する第一回研究会が開かれ、人工血小板の必要性、評価方法などが始めて議論され、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可溶性血小板膜糖蛋白を固相化した"plateletsome"(Fybakら)、赤血球表面に血小板と結合し得るフィブリノゲンを共有結合させたもの(Agamら)や"thromboerythrocyte"と呼ばれるRGDペプチドを固定した赤血球(Collerら)などが狭義の人工血小板・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ない。一方、米国PRP社は Infusible Platelet Membrane™ なるヒト血小板由来物質からなる粉末製剤を開発した。これ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ある。現在「Cypex™」という名で臨床試験進行中で、第III相試験の結果がまとめられているが、いわゆる人工血小板代替物ではない。

最近我々は遺伝子組み換えGPIb/IX/V複合体の一部(rGPIb α)を導入したリポソーム(rGPIb α -liposome)を作製し、in vitroで良好な成績を得ている。rGPIb α は可溶性vWFと自然結合せず固相化vWFと結合する。すなわち血小板上の分子と同様の調節機構が働いている。このリポソームは正常血小板と反応し、その凝集塊に巻き込まれること、用量依存的に血小板凝集を増強することも判明しており、in vivoの効果に期待もたれている。

我国では平成9年度より厚生省高度先端医療研究事業により人工血小板研究班が組織されている。ここでは上述のrGPIb α -liposomeのほか $\alpha 2\beta 1$ インテグリンを介したコラーゲンへの血小板粘着に着目し、組み換え $\alpha 2\beta 1$ インテグリンを導入したリポソームの機能評価などが計画されている。一方、生体内半減期の短かさ、単球などによる貧食など、リポソームの問題点も克服される必要があり、リポソーム以外の担体(例えば蛋白重合体)の開発も同時に進められるであろう。

出血部位で効率よく血管壁に粘着、凝集することにより血管の穴を閉鎖し、近傍に少数残存する正常血小板の機能を補助できれば止血能が増強し代替物としての目的はある程度達せられる。人工血小板の開発はようやくその第一歩を踏み出したばかりである。

Oxygen carrying therapeuticsかReplacementか

小林 紘一
慶應義塾大学医学部外科

ヘモグロビン(Hb)の役目は組織に酸素を運搬することであるが、血管内に人工酸素運搬体が投与された時の酸素運搬量は次式により求められる。 $TO_2 = CO \times (HbS + HbB) \times 1.34 \times \%SatO_2 + 100$ (ml/min)。ここで、 TO_2 は酸素運搬量(ml/min)、COは心拍出量(ml/min)、HbSは自己のヘモグロビン(g/dl)、HbBは人工酸素運搬体の濃度を、 $\%SatO_2$ は動脈血酸素飽和度(%)を表わす。

人工酸素運搬体における酸素の担体にはヘモグロビンや全合成されたヘムの使用が考えられ、これらを利用した人工酸素運搬体は架橋や重合により作成したヘモグロビン溶液(acellular type)と liposome などにより capsule 化した cellular type のものに分けられる。また組織での酸素の放出はそれぞれの持つ酸素解離曲線によるが2,3-DPG、 CO_2 、pHや体温にも影響を受ける。

acellular typeのうち架橋型の場合はHb濃度を高めると膠質浸等圧が高まるので酸素運搬量に問題が残るが、一方nitric oxideのscavengerとしての昇圧作用を持っていることが報告され、酸素運搬機能とともに治療上有用な他の生理学的機能をも持ったものとして oxygen carrying therapeutics と呼ばれている。cellular type のものは未だ臨床試験まで行っているものは無いがHb濃度としては問題はないとされている。大量出血の際のようにHbAが極端に低下した際には replacementが必要であり cellular type の人工酸素運搬体の方が効用が高いであろう。一方低体温下での体外循環など人為的に作り出した病態では必要最小限の酸素供給でもよくこのような場合には acellular type のものでも対処が可能と考えられる。

人工酸素運搬体に求められる本来の機能は replacementにあるが病態に応じた oxygen carrying therapeutics としての効用も考えた人工酸素運搬体の開発の方が幅広い展開が期待できる。

代用赤血球使用が期待される病態

輸血のトリガー

阿岸鉄三, 船越陽一

東京女子医科大学腎臓病総合医療センター
外科清水 勝
東京女子医科大学 輸血科

赤血球由来ヘモグロビンを基本的酸素運搬体とする代用赤血球の開発が進み、欧米ではすでに、臨床使用の治験が行われている。わが国においても、近い将来、治験に始まる臨床使用の開始が予期されている。臨床使用が期待される病態を列記する。

1.外科領域：大量出血を伴う手術、非手術時消化管大量出血、出血性ショック、体外循環灌流液など。

救命救急領域：広範囲熱傷による体液喪失、出血性ショック、腎・肝・心・肺・多臓器不全、虚血再循環障害、潜水病、一酸化炭素中毒など。

産婦人科領域：大量性器出血、出産時など。

内科領域：各種貧血、急性心筋梗塞、冠動脈血管形成術後、脳梗塞、脳出血など。

臓器移植領域：臓器灌流液、臓器保存液など。

血液代替物については、既に人工膠質液としてデキストランやハイドロキシエチル澱粉(HES)が実用化され、さらに人工酸素運搬体として重合同型ヘモグロビン(Hb)や包埋型Hbが実用化寸前にきており、人工血小板についての研究も進展しつつある。このような状況を踏まえて、従来の輸血用血液あるいは血漿分画などの治療用血液との適応上の兼ね合い、つまり相互の使い分けをも考えて行かなければならない。その為には、先ず現在行なわれている輸血の妥当性についての検討が不可欠である。就中、輸血の開始点(トリガー)の問題は、特に重要であると考えられる。今回は、手術時の輸血で大部分を占める、問題なく終了し得た待機的手術症例の赤血球輸血について、その評価の在り方を「輸血の予測確立(P)」に基づいて症例ごとに検討した結果を述べることにしたい。このモデルでは、Pが0.6以上を輸血妥当例とし、もし無輸血であった場合にはundertransfusionの観点からの評価を行ない、一方Pが0.4以下では無輸血が妥当であり、もし輸血をしたとすればovertransfusionの観点からの評価を行ない、それぞれの原因を究明して、以後の輸血に役立てようとするものである。なお、Pが0.4~0.6の間は境界領域として輸血の有無について検討し、将来的には上下いずれかに組み入れるようにする。このような検討により、現在術中の赤血球輸血の適応の在り方が必ずしも合意に達しえていない状況を、克服しうる一つの手段を提供できるものと考えられる。さらに、術中輸血についても、成分輸血の徹底を図ることが医学的合理性を持つとの観点から、Lundsgaard-Hansenの模式図を基本として、若干の変更を加え、その在り方の妥当性についても検討することにする。

輸血の開始点について、人工酸素運搬体には通常の赤血球とは異なった特性がありうることから、一般の輸血よりも適応を拡大しうる可能性もあるが、基本的には赤血球輸血と変わるものではないとの認識を持って対処すべきであると考えられる。

造血サイトカインにより同種血輸血は回避できるか

別所正美

埼玉医科大学第1内科

体外造血系の可能性：

血小板代替物を目指した巨核球の大量培養の試み

平山文也, 山口美樹, 大河原順一, 池淵研二

関口定美

北海道赤十字血液センター

造血に関与するサイトカイン（造血因子）は現在約20種類以上が知られているが、その遺伝子クローニングはすべて終了し、リコンビナント製剤の大量生産が可能になっている。これに伴い本邦では1990年からエリスロポエチン（EPO）が、1991年からはマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）と顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）が認可され、広く臨床応用されている。また、現在、これら造血因子の適応拡大が検討される一方、トロンボポエチン（TPO）、interleukin-11（IL-11）などの新しい造血因子の臨床応用についても検討が進められている。

1. 赤血球輸血に関して

同種赤血球輸血の回避に関してはEPOが主役である。特に、腎性貧血や未熟児貧血における同種血輸血の回避、また自己血貯血における補助療法としてEPOの果たす役割は大きい。この他、慢性関節リウマチ、エイズ、悪性腫瘍などに伴う anemia of chronic disorders（ACD）、また癌の化学療法などに伴う貧血においてもEPOの有効性が明らかになっている。さらに、輸血に依存することの多い再生不良性貧血や骨髓異形成症候群を始めとする血液疾患においてもEPOの投与によって同種血輸血が回避あるいは節減できる例のあることが報告されている。また、これら疾患ではG-CSFの併用によってEPOの有効性が高まることも判明している。この際、治療開始前の内因性EPO濃度の比較的低い例、血中トランスフェリンレセプターの比較的高い例にEPOの有効性が期待できる。EPOは問題となる副作用も少なく、種々の貧血性疾患の治療に際し、有力な選択肢となるものと期待される。

2. 血小板輸血に関して

IL-11は化学療法後の血小板減少症における血小板輸血の回避、TPOは化学療法後および再生不良性貧血や骨髓異形成症候群の血小板減少症における血小板輸血の回避を期待して臨床治験が進められており、その結果が注目されている。

巨核球前駆細胞に作用しその増殖、分化を支持するThrombopoietin（TPO）が発見されて以来、TPOに各種サイトカインを組み合わせることによって、巨核球の前駆細胞あるいはそれよりやや未熟な前駆細胞を増殖、分化させ、*ex vivo*で巨核球数を著明に増幅させることが可能となってきた。そのため大量に培養した巨核球を血小板代替物として使用できる可能性も生まれてきた。しかし、従来の巨核球培養法では、成人で日々およそ 10^{11} 個も産生される血小板を補うのに十分な数の巨核球を得ることは容易ではない。そこで、我々は自己再生能を持つ造血幹細胞あるいはそれに近い未熟な造血前駆細胞の数をまず増幅し、その後従来からの巨核球の増幅方法を組み合わせるという2段階の増幅過程をとることによって、従来よりも効率的に巨核球を増幅できる培養法の樹立を試みた。

(1) CD34⁺CD38⁻未熟造血前駆細胞の増幅：ヒトCD34⁺CD38⁻未熟造血前駆細胞をTPOとFlt3リガンドの存在下に造血支持能を持つストローマ細胞株MS-5の単層培養層上で培養した。CD34⁺CD38⁻という未熟造血前駆細胞の形質を示した細胞の数は培養開始4週後には培養前の1000倍に達し、以後も著明に増加した。また、実際に成熟血球に分化できる造血前駆細胞（コロニー形成細胞）の数も同様に著明に増加した。

(2) 巨核球の増幅：CD34⁺細胞を種々のサイトカインと共に14日間培養し、巨核球の細胞表面マーカーであるCD41を発現している細胞の増加を検討した。TPOにStem cell factor, IL-3を組み合わせる事により巨核球を数100倍に増幅する事ができた。

現在、あらかじめ増幅したCD34⁺CD38⁻未熟造血前駆細胞を材料にして巨核球の増幅を試みた場合、果たして従来以上の巨核球の増幅が可能であるかを検討している。

無細胞型ヘモグロビンによる肝微小血管収縮反応の増強効果：CO および NO の役割

末松 誠¹、武岡真司¹、京兼隆典¹、石村 巽¹、土田英俊²、
¹慶應義塾大学医学部医化学、
²早稲田大学理工学部高分子化学

無細胞型修飾ヘモグロビン(Hb)は人工酸素運搬体(人工赤血球)としての臨床応用が期待されているが、分子の大きさが100Åに満たないためfenestrationを持つ臓器微小血管床での挙動は血管トーンスの恒常性や運搬体の代謝に伴う高ビリルビン血症の発症に多大の影響を及ぼすと考えられる。正常およびLPS処理ラット肝(LPS;4mg/Kg body wt, i. p. 6時間)においてHbとmetHb、およびリポソーム封入Hb(HbV)を投与した際の血管抵抗および胆汁内ビリルビン(BR)分泌量を比較検討した。両群ラットより分離灌流肝を作成しそれぞれに対し、Hb, metHb, HbVをHb濃度を1.5g/dlで15分間持続的に門脈より注入した。内毒素処理により肝臓では誘導型酵素の上昇によるものと思われるNOの上昇とともにHeme oxygenase(HO)-1の共誘導が起こり、灌流液中のCOと胆汁中の基礎BR分泌が数倍に上昇した。HO-1は肝実質細胞とKupffer cellに主に発現が見られた。一方Hb投与により正常肝では全肝血管抵抗は50%程の上昇であったのに対し、LPS処理肝では100%にまで達し、有意な差が認められた。metHb投与では正常肝では有意な昇圧反応は認めなかったが、内毒素肝では25%程度の昇圧を認めた。また、内毒素肝ではHb投与によるBR排泄量が、正常群に比べ40%程度上昇した。metHb投与ではこの差はさらに増強し、内毒素群では正常群の数十倍にも達した。これらの変化はHbV投与に際しては、正常肝では全肝血管抵抗はほとんど上昇せず、LPS処理肝でも16%程度上昇したにすぎず、ビリルビン排泄に関しては、正常肝、内毒素肝とも緩徐なBR上昇を認めるのみであった。正常肝では昇圧効果のないNOS阻害剤であるaminoguanidineが内毒素肝では昇圧反応を示すこと、COを捕捉せず、NOを捕捉できるmetHbが内毒素肝のみで有意な昇圧反応を認めたことから、内毒素肝ではおもに血管外空間のNOが血管抵抗を低く保つ役割を担っており、分子状Hbはこれを捕捉することにより血管収縮を起こすものと考えられた。またHO-1が血管外空間に誘導された肝臓ではHb, metHbの酸化的分解が加速されるため人工酸素運搬体の体内半減期の短縮や高ビリルビン血症のリスクを十分に考慮する必要があるものと思われる。

ヘモグロビン利用の赤血球代替物の特徴と酸素の輸送動力学

武岡 真司, 大川 春樹, 湯浅 美菜子, 酒井 宏水,
 土田 英俊
 (早稲田大学 理工学総合研究センター)

【緒言】ヘモグロビン(Hb)を利用する赤血球代替物にはアセル型の修飾Hbとセル型のHb小胞体に大別される。その構造的な相違が影響する物性(粘度, 膜透過度, 膠質浸透圧)を整理すると共に, 特に酸素の輸送動力学を比較する。Hbに対する酸素結合解離の動力学は詳細に研究されているが, 水相の酸素濃度の動力学的測定は困難であった。本研究では, 新規に開発したストップフローフラッシュ(SFFP)法を用いて, 赤血球代替物の酸素輸送を動力学的に解析した。

【方法】アセル型赤血球代替物として, 分子内架橋Hb, POE結合Hb, スターチ分子間架橋Hbを用いた。また, セル型としてHb小胞体を用いた。溶液のHb濃度は全て10g/dLに統一した。SFFP法では, 酸素プローブとしてアルブミン担持亜鉛テトラフェニルポルフィリン(HSA-ZnTPP)を用いた。脱酸素化させたプローブ溶液と任意の酸素分圧で飽和させた赤血球代替物を等量瞬間混合後の任意時間経過時点で閃光照射し, 励起三重項寿命から水相 PO_2 の推移を測定した。

【結果及び考察】分子内架橋Hbと比較して, POE結合Hbあるいはスターチ分子間架橋Hbでは分子量の増大と共に粘度が増大し, 均一孔径を持つメンブランフィルターの透過度は低下した。膠質浸透圧はPOE鎖結合本数の増加と共に増大する傾向が認められ, 他方, 分子間の架橋により低下した。粒径0.25 μ mのHb小胞体では, 孔径0.2 μ mのフィルターは透過しない。粘度はPOE鎖修飾にて凝集を抑制することにより血液と同等に調節できた。また, 膠質浸透圧は1Torr以下であった。

SFFP法にて解析した酸素解離過程では, 分子内架橋Hbでは速やかに水相の酸素分圧が上昇するのに対して, Hb小胞体では二成分の酸素放出過程が認められた。ストップフロー法にて求めた小胞体内水相のHb酸素飽和度では一成分系の推移を認め, 0.5秒以内に一定となったことを考慮すると, 第一成分(0.15秒以下)は, 二分子膜近傍のHbから酸素が解離し拡散層を形成するまでの過程, 第二成分(0.15~1秒)は酸素が外水相全体に拡散して平衡に達するまでの遅い過程を示している。従って, 酸素動力学は酸素運搬体の構造因子に大きく影響され, この相違が微小循環動態や血漿への酸素輸送効率と深く関連しているものと思われる。

近赤外分光法を用いたラット脳におけるヘモグロビンリポソーム包接体の酸素運搬機能の測定

坂野上淳¹, 田村守¹, 仲井邦彦²,
佐久間一郎³, 北島顕³

¹北海道大学 電子科学研究所 超分子分光分野,
²東北大学大学院 医学系研究科 環境保健医学,
³北海道大学 医学部 循環器内科学講座

【はじめに】これまで、多くの人工血液が提案されてきたが、それらの酸素運搬機能を生体内で直接測定した例はほとんど無い。本実験は生体における透過率の高い近赤外光を用いて、ヒトヘモグロビンリポソーム包接体により血液置換したラットの頭部における細胞の酸素化度を評価した。

【実験】ヒトヘモグロビンリポソーム包接体としてテルモ社製 Neo Red Cells (NRCs, Hb:5%/wt, P₅₀O₂:60 Torr) を用いた。ラットの頭皮を切開し、4波長近赤外分光測定器(ユニソク社製)により酸素化ヘモグロビン(oxy-Hb)、脱酸素化ヘモグロビン(deoxy-Hb)、全ヘモグロビン(total-Hb)、チトクロームオキシダーゼ (Cyt. oxi) を同時に計測した。NRCs による血液交換は 100% O₂ 人工呼吸管理下において最終的に 80%まで行った。交換終了後、呼吸酸素濃度 (FiO₂) を徐々に減少させ細胞内の酸素化状態への影響を測定した。測定中は全身血圧および自発脳波を同時にモニターした。

【結果】NRCs により 80% 置換されたラットの血中ヘモグロビン量は約 60%に減少したが、血圧の上昇などによる補償効果で脳内のヘモグロビン量はさほど変化をしなかった。また、呼吸酸素濃度を下げていくと脳内の酸素化ヘモグロビンが50%以下になるまでチトクロームは還元されなかった。この傾向は血液を置換しないラットと同じである。

以上から近赤外分光法が人工血液に置換された組織の酸素化度の評価に応用可能であると分かった。また、NRCs の脳への酸素運搬機能が確認できた。

出血性ショックモデルにおける人工酸素運搬体ーヘモグロビン小胞体 (HbV) ーの小腸に対する酸素運搬能の検討

吉津 晃¹, 田島 敦志², 泉 陽太郎², 渡辺真純², 堀之内宏久², 小林紘一², 朴 晟翼³, 濱崎将臣³, 酒井宏水³, 武岡真司³, 西出宏之³, 土田英俊³
現東京都立駒込病院¹
慶應義塾大学医学部外科²
早稲田大学理工学総合研究センター高分子研究室³

【目的】出血などにより急激に循環血液量が減少すると、消化管血流量、とくに粘膜血流量は著明に低下する。そして、組織低酸素症から粘膜損傷を来し、粘膜のバリア機能が破綻する。循環血液量の減少を補うためには輸液を行わなければならない。輸液を構成する物質が循環血液量を補うだけでなく酸素運搬能力を有していれば組織損傷の回復に有利であると考えられる。人工酸素運搬体であるヘモグロビン小胞体 (HbV) は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溶液 (99.9%以上) を脂質薄膜で被覆したものであるが出血性ショックモデルに対し本剤を投与し、ショック状態からの回復の程度を小腸を中心に検討した。【方法】全身麻酔下に日本白色種ウサギを用い、内頸動脈より圧トランスデューサーに接続、平均体血圧 (MAP) を連続的に測定、また、採血、脱血を行った。上腸間膜動脈に血流量計プローベを装着し血流量や心拍数を測定した。腸間膜静脈より静脈血採血を行った。小腸にトノメーター(消化管粘膜内pH測定用カテーテル) を挿入し小腸粘膜のpHを、針型酸素電極を小腸管壁に挿入し組織酸素分圧をそれぞれ計測した。まず循環血液量の40%相当の脱血を行い、つぎに試料を脱血量に相当するまで投与する。同様にもう一度脱血後、試料を投与し30分間経過を観察した。動静脈血液ガス分析は脱血前、1回目脱血後、1回目投与後、2回目脱血後、2回目投与後、30分後に、小腸粘膜内pH測定は脱血前、2回目脱血後、2回目投与後、30分後に行った。試料としてHbV(N=6, HbV群)、5%アルブミン(N=6, ALB群)、ラット洗浄赤血球(N=6, RBC群)を用い、3群を比較した。【結果】それぞれ30分後を比較するとMAP, 腸間膜動脈血流量, 心拍数, 動脈血酸素分圧はほぼ同様に推移し3群間に差は認められなかった。しかし小腸粘膜内pHはHbV群, RBC群が完全に回復したのに対しALB群は7.00までしか回復せず有意に低かった。小腸壁組織酸素分圧もHbV群, RBC群が完全に回復したのに対しALB群は40%にまでしか回復しなかった。Systemic Base ExcessはALB群が-19.4であったのに対し、HbV群は0.57、RBC群は-7.6にまで回復した。【考察】MAP、心拍数、腸間膜動脈血流量は3群間に差はなく循環血液量としてはアルブミン単独で充分であったと思われる。小腸粘膜内pH、小腸壁組織酸素分圧、Systemic Base ExcessはHbV群、RBC群においてALB群と比較し有意に高かった。以上よりHbVは洗浄赤血球と同等の酸素運搬能をもつと考えられた。

人工酸素運搬体NRC (Neo Red Blood Cell) を用いた部分液体換気の有効性についての検討

田島敦志, 儀賀理暁, 河野光智, 桑原克之, 安彦智博,
岩丸有史, 澤藤誠, 渡辺真純, 堀之内宏久, 川村雅文,
小林紘一
慶應義塾大学医学部外科

【目的】実験的に肺表面活性物質(surfactant)を除去して作成した傷害肺と、オレイン酸を静注することで作成した傷害肺に対し、リポソーム包埋ヘモグロビン(liposome encapsulated hemoglobin, Neo Red Cell : NRC)を用いた部分液体換気(Partial Liquid Ventilation, PLV)を施行した時のガス交換と循環動態の変化につき検討した。NRC(テルモ社)は期限切れの人赤血球から抽出したヘモグロビンを磷脂質膜であるリポソームで包埋した人工酸素運搬体である。Hb濃度は約6.0g/dL, 平均粒子径は約0.20 μ m, 粘度は約2.0cPと血液の1/3, P50は45~55torrで酸素運搬能力は血液とほぼ同等である。【方法】体重約2.5kgの日本家兎を用い、静脈麻酔を施し、気管切開後、人工呼吸器に接続し、FiO₂=1.0で換気を行った。肺傷害は生理食塩水で肺を4~6回洗浄し、surfactantを洗い出すことにより作成したものと、オレイン酸を0.1ml/kg/hrで30分間静注し作成したものを準備した。NRCを用いてPLVを施行する洗浄肺NRC-PLV群(n=6)と、オレイン酸NRC-PLV群(n=6), PEEPをかけて通常の換気を行う洗浄肺コントロール群(n=6)と、オレイン酸コントロール群(n=6)に分け検討した。4群とも90分間、心拍数, 大動脈圧, 動脈血酸素飽和度を経時的に測定した。【結果】肺傷害作成後のPaO₂は洗浄肺では49.3 \pm 13.3torr, PaCO₂は43.3 \pm 14.9torr, オレイン酸では43.8 \pm 5.7torr, PaCO₂は54.8 \pm 6.2torrであった。この後、コントロール群では、洗浄肺もオレイン酸もPaO₂に改善はみられず、オレイン酸では43 \pm 8分で心停止に至った。しかし、NRC-PLV群では、PaO₂はPLV開始後30分で洗浄肺では252.9 \pm 61.4torr, オレイン酸では211.3 \pm 3.65torrと改善が認められ、90分間ほぼ安定していた。

【考察】NRCは、酸素解離曲線が赤血球中のヘモグロンと同じであるために、酸素運搬能の点で優れている。これは肺表面活性物質(surfactant)を除去して作成した傷害肺においても、オレイン酸の注入で作成した傷害肺においても証明できた。NRCは粒子径が小さく、懸濁液として用いるため肺胞中でのガス交換を容易にできることは理論的である。【結語】二種類の異なった方法により実験的に作成した傷害肺に対して、NRC-PLVは、循環動態に大きな影響を及ぼさず、ガス交換を改善できることが示された。

分離肝細胞を充填したモデル肝臓における人工酸素運搬体(NRC)の評価

黒澤 尋¹, 木村哲寛², 緒方嘉貴², 天野義文¹
¹山梨大学工学部、²テルモ株式会社

【緒言】我々は先に、リポソームタイプの人工酸素運搬体 Neo Red Cell (NRC, 4.2%-Hb)を含む培地が、通常の培地に比べて約10倍量の酸素を保持できることを報告した。さらに、NRCが再酸素化される過程を動力学的に解析した¹⁾。本研究では、肝細胞を充填したモデル肝臓(人工肝)とNRCの再酸素化装置(人工肺)を連結したNRC循環系を用いて、NRCの酸素供給能の評価を行った。

【方法】ポリウレタン膜(直径30mm, 厚さ6mm, 開口率90%)に、コラゲナーゼで処理して分離精製したラット肝実質細胞を2.5 \times 10⁷ cells/cm³の密度で充填した。3%-Hb濃度のNRCを含むWilliams' E medium (WE培地)を調製し、人工肺(中空糸の表面積160cm²)を通過させた後、上記ポリウレタン膜を装填した人工肝に供給した(流速5ml/min)。人工肺には95% Air / 5% CO₂ (pO₂=20% or 150 mmHg)を300ml/minで供給した。人工肝の入口と出口の酸素濃度を酸素電極で測定した。

【結果】NRCを含まないWE培地を循環した場合、出口側のpO₂はほぼゼロとなり、充填された細胞の約半分の酸素要求しか満たせない状態となった。これに対しNRCを含むWE培地を供給した場合は、出口側においてもpO₂を6%に保つことができた。人工肺によりNRCは十分に再酸素化され、入口側でのpO₂は19%に保たれた。入口-出口間の酸素分圧変化(pO₂=19% \rightarrow pO₂=6%)でNRCから放出される酸素は、その保持量のおよそ50%であった。3%-Hbでは酸素放出量は0.93 mmol/lと推算された。この値は人工肝内の細胞による酸素消費量を上回っていた。

【考察】肝細胞は酸欠状態及び高酸素濃度に長時間曝されると傷害を受け、肝機能が失われる。NRCを用いると、入口側の酸素分圧を極端に高めることなく、細胞の酸素要求を充足できることが示された。NRCの流路が確保されるならば、ヒト肝組織(細胞密度1.6 \times 10⁸ cells/cm³)に対しても、十分な酸素供給を行えるものと期待される。

1) International Symposium on Blood Substitutes (7-ISBS), Program & Abstracts, p.49, 2A-07 (1997. 9)

亜硝酸によるヒトオキシヘモグロビンの酸化の過程で生じる一酸化窒素 (NO) 産生量の pH 変化による影響

馬島英輔¹、新妻知行¹、林 徹¹、村上栄一²、友田輝夫³

¹東京医科大学内科学第三講座、²インターメディカル(株)、³東京医科大学学生化学教室

【緒言】亜硝酸によるオキシヘモグロビンの酸化の過程で一酸化窒素 (NO) が発生することが NO 選択性電極を用いて示された。本研究では上記反応におけるオキシヘモグロビンの酸化速度および NO の産生量を種々の pH で比較し、pH 依存性の有無を検討した。【方法】2. 2 ml のヒト精製ヘモグロビン (ヘム換算で 270 μM、10 mM のリン酸カリウム溶液に溶解) 溶液を石英セルに入れた後、最終濃度 1 mM の亜硝酸ナトリウム溶液を添加して、亜硝酸によるオキシヘモグロビンの反応を開始させた。この場合、石英セルには予めミキュロマグネット (乾電池式のスターラーで攪拌) を入れて反応中、溶液を攪拌させた。1つの反応溶液系 (ヘモグロビン溶液の pH はセファデックス G-25 カラムに通過させ、予め 6.6; 7.0; 7.4; 7.8; 8.2 に調製してある) については、分光学的に 630 nm の吸収の変化でヘモグロビンの酸化反応を測定した。もう1つの反応溶液系 (同様に pH の調製が行われている) には NO 選択性電極と対照電極を予めセットしておき、亜硝酸の添加と同時に NO の産生を測定した。発生する NO の濃度は NOC-5 を用いた検量線から算出した。このように、種々の pH における亜硝酸によるヘモグロビンの酸化反応と、その過程での NO の発生の変化を経時的に追った。【結果】1. 亜硝酸によるヘモグロビンの酸化反応の分光学的追跡: 亜硝酸をヘモグロビン溶液に添加すると、酸性側で急速に酸化反応が起こり、pH 6.6 では反応は初期の lag time を伴って S 字状に進行し、5 分以内に終了した。pH 7.0, 7.4 でも同様なプロセスが観察された。アルカリ性側では亜硝酸によるヘモグロビンの酸化反応は非常に遅くなり、pH 8.2 では終了までに 50 分以上かかった。このような亜硝酸によるヘモグロビンの酸化反応に対する pH の影響については従来の報告と一致した結果が得られた。2. 亜硝酸によるヘモグロビンの酸化反応過程における NO の発生量の測定: 亜硝酸の添加の後、NO の発生は急速に起こり、ピークに達した後、徐々に減少した。このような NO の変動は分光学的測定における lag time と一致して変動した。また、NO の産生量は中性および酸性で著しく、pH 7.4 で 43.1 μM、pH 7.0 で 24.6 μM、pH 6.6 で 18.5 μM であった。なお、pH 6.6 での NO の減少速度は 7.4 と比べて著しかった。【考察】分光学的に追跡した亜硝酸によるオキシヘモグロビンの酸化反応と pH 依存性は、従来の方法と一致している。本研究ではさらにこのような条件下での NO の発生を経時的に測定した。その結果、NO の産生量は pH に依存しており、さらに NO はヘモグロビンの酸化過程において初期に発生し、ヘモグロビンが急速に酸化される burst phase に先行して減少が始まることが示された。このことは、NO がヘモグロビンの酸化反応に重要な役割を果たしていることを示唆している。

S-Nitrosohemoglobin の作製

仲井邦彦¹、佐久間一郎²、富樫広子³、坂野上淳⁴、田村守⁴、吉岡充弘³、佐藤洋¹、北島顕²

¹東北大院 医環境保健医学、²北大医 循環器内科、³北大医第 1 薬理、⁴北大電子研

ヘモグロビン (Hb) 系酸素運搬体による副作用として、血管収縮、腸管収縮、血小板活性化などが指摘されるが、その背景には Hb による血管内皮由来弛緩因子不活性化が示唆される。一方、末梢循環においてこの EDRF は赤血球内 Hb の β 鎖 SH を S-ニトロソ化 (SNO-Hb) し、血行動態および酸素運搬を制御する可能性が最近報告された (Jia et al. Nature 380:221, 1996)。即ち SNO-Hb は機能的な NO 放出能を有すると考えられ、Hb による EDRF 不活性化を代償しうる可能性がある。そこで今回、SNO-Hb の作成について検討を行ったので報告する。

【方法】Stroma-free Hb を赤血球製剤より限外ろ過法により作製し Hb 材料とした。NO ドナーとして S-nitroso glutathione (GSNO) を使い、0.1 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸緩衝液中にて S-ニトロソ化し、生成物を生理食塩水に対し透析、濃縮した。SNO-Hb は、Akaike ら (J Biochem 122:459, 1997) の方法により、検体をゲルろ過 HPLC により分離後、RSNO を Hg イオンによって分解し生じた NO⁺ を Griess 試薬にて NO²⁻ として定量した。

【結果】GSNO による Hb の S-ニトロソ化はアルカリ条件下で効率が高く、Hb : SNO-SG のモル比 1 : 5、pH 8.5、4℃、12 時間の反応でテトラマー当り 1.8 個の NO の結合が観察された。Hb メト化は 1-3% 以内であった。Hb と GSNO の比率、反応時間により、S-ニトロソ化率は変動した。SNO-Hb の安定性について、透析後 4℃、24 時間放置した場合 90% 以上、凍結ではほぼ 100% の回収であった。

【考察】SNO-Hb は、金属イオンのキレート、アルカリ条件、低分子チオール存在下、で作製可能であり、生成物である SNO-Hb は透析後も安定で半減期は比較的長いことが示唆された。SNO-Hb を酸素運搬体として用いるには、分子量制御ならびに酸素運搬能確保が重要であり、今後その開発評価が必要である。

【結論】GSNO を NO ドナーとして SNO-Hb の作製に成功した。SNO-Hb の半減期は長く、冷凍保存が可能であった。SNO-Hb は Hb 系酸素運搬体の新しい素材として有望と思われた。

S-Nitrosohemoglobinが循環系機能に与える影響

佐久間一郎¹、富樫広子²、仲井邦彦³、藤井聡¹、坂野上淳⁴、田村守³、佐藤洋³、吉岡充弘²、北島顕¹

¹北大医循環器内科、²北大医第1薬理、
³東北大院医環境保健医学、⁴北大電子研

ヘモグロビン(Hb)系酸素運搬体による副作用として、血管内皮由来弛緩因子(EDRF)不活性化に伴う血管収縮、腸管収縮、血小板活性化などが危惧される。最近、末梢血赤血球内に存在が示唆されたS-ニトロソHb(SNO-Hb)は、機能的なNO代謝物を放出し、HbのヘムによるEDRF不活性化を代償しうると期待される。今回SNO-Hbを作成し、特に循環機能への影響を検討したので報告する。

【方法】常法により作成したstroma-free Hbを材料とし、NOドナーとしてS-nitroso glutathioneを用い、HbのS-ニトロソ化を行った。生成物を生理食塩水に対し透析、濃縮後Hb濃度5 g/dLとして用いた。動物実験は、雄性Wistar系ラットを用い、大腿動静脈にカニューレを挿入、それぞれ血圧モニターならびに採血とHb投与に用いた。SNO-Hbの対照は未修飾Hbとした。Hb投与量は125 mg/kgとした。Hb投与後、血圧変動ならびに末梢血漿NOxをHPLCにより測定すると共に、マイクロダイアリシス法により脳海馬領域から試料を採取し同様にNOxを測定した。

【結果】未修飾Hbによる昇圧反応はHb投与125 mg/kgでほぼプラトーに達し、これまでの報告に一致した。この時ラット平均血圧は38%上昇し、血漿NOxは26%増加した。一方、SNO-Hbを投与した場合、平均血圧は13% (S-ニトロソ化率37%、メト化率2%)、NOxは130%増加した。海馬領域NOx量は、未修飾Hbで4.8%減少し、SNO-Hbでは16.1%増加した。

【考察及び結論】SNO-Hbによる昇圧反応は明らかに小さく、また脳海馬領域でNOx上昇が観察されたことから、SNO-HbよりNO代謝物が放出され、血管弛緩に作用したことが示唆された。SNO-HbによるNO代謝物の放出機構やEDRF様作用の本態は未解明であり、今後の解析が待たれるが、SNO-Hbは新しい酸素運搬体の材料となりうることを期待された。

アルブミン-ヘム複合体の酸素結合能

小松晃之、浜松和芳、Jian Wu、土田英俊
(早稲田大学理工学総合研究センター)

【緒言】アルブミンの非特異的多分子結合能を利用して、合成ヘム誘導体(FeP)の複数個をヒト血清アルブミン(HSA)の疎水ドメインに包接して得たアルブミン-ヘム複合体(HSA-FeP)が、生理条件下で酸素を可逆的に結合解離できる人工酸素輸液として機能することを明らかにしてきた。他方、遺伝子組換えヒト血清アルブミン(rHSA)は、その物理化学的特徴、高次構造がHSAと同等であり、発現量、純度の点からもHSA代替製剤としての供給が期待されている。

本講演では、このrHSAにFePを効率良く包接させて得たrHSA-FeP複合体について、その構造、溶液物性、酸素結合能を明らかにしたので報告する。

【方法】rHSAのPBS溶液(pH 7.3)とFePのエタノール溶液を混合し、限外濾過、透析後、定容して赤色のrHSA-FeP溶液([rHSA]: 5wt%, FeP/HSA: 1-8(mol/mol))を調製した。IEF電気泳動により等電点(pI)を決定、溶液粘度はキャピラリー粘度計を用いて測定した。rHSAの二次構造はCDスペクトルから検討。また、可視吸収スペクトル、レーザーフラッシュフォトリス分光法から、酸素親和性(P_{50})、結合解離速度定数(k_{on} , k_{off})を算出した。さらに共鳴ラマンスペクトルを用いて、酸素結合に伴う、FePの軸配位構造変化を解析した。

【結果及び考察】得られたrHSA-FeP溶液は6ヶ月後も沈殿・凝集は見られない。結合FePの定量から、rHSA 1分子に対するFePの最大結合数: 8を決定した。包接されているFePの数に依らず、rHSA-FePのpI値(4.8)、CDスペクトルのパターン、及びそのモル楕円率の極小値に変化が見られないことから、FePが結合してもrHSAの表面電荷、高次構造は変わらないものと考えられる。これらの結果は、FeP分子の包接が疎水性相互作用のみによることを示唆している。また、5wt%溶液の粘度もrHSAのみの値(1.0 cP at 230 s⁻¹)と同等であった。

rHSA-FePの P_{50} は何れの系でも33-37Torr(37°C)であったが、 k_{on} はFeP/HSA:8の場合 2.5×10^7 (M⁻¹s⁻¹)、FeP/HSA:4では 1.9×10^7 (M⁻¹s⁻¹)となり、FeP/HSA:8の方が高い。これは、5-8番目に結合したFePがrHSAの表面近傍に位置しているためと考えられる。

さらに、rHSA-FePの共鳴ラマンスペクトルにおける $\nu(\text{Fe-O}_2)$ (564 cm⁻¹)のピークから酸素配位を実証、配位した酸素の電子構造はヘモグロビンと同等であることも明らかにした。

脱血ショックモデルを用いた全合成系人工酸素運搬体、アルブミンヘム (HSA-FeP) の生体内における酸素運搬能の検討

田島敦志¹, 岩丸有史¹, 渡辺真純¹, 堀之内宏久¹
 小林紘一¹, 浜松和芳², 小松晃之², 土田英俊²
¹慶應義塾大学医学部外科
²早稲田大学理工学部高分子研究室

【目的】われわれは酸素運搬体であるポルフィン鉄錯体(ヘム)を合成し、これに5%ヒト血清アルブミンを結合させたアルブミンヘム(HSA-FeP¹)が全合成系の人工酸素運搬体として機能することを見出した。本実験では脱血ショックに対するその投与効果を検討し、生体内における酸素運搬能の評価を試みた。

【方法】Wistar rat(雄、体重339±11g)を用い、pentobarbital sodiumによる全身麻酔下に右頸動静脈にカテーテルを挿入し、平均体血圧(MAP)を連続的に測定した。骨格筋(左頸二腹筋)および左腎皮質に針型酸素電極を挿入し、それぞれの組織酸素分圧

(P_{tmO2}, P_{trO2})を測定した。腹部大動脈にドップラー血流量計を装着し、大動脈血流量(BF)を計測した。先ず推定循環血液量の70%を5%ヒト血清アルブミンで交換し、次に40%の脱血を行いショック状態とした。その後脱血量と同量の試料を投与し30分間観察した。交換前後、脱血前後、投与前後、投与後30分にそれぞれ動脈血、静脈血を採取し、血液ガス(PaO₂, PaCO₂, BE, pH, PvO₂, PvCO₂)と、ヘマトクリット(Hct)を測定した。試料としては、HSA-FePを用いた群(HSA-FeP群, n=6)と、対照として5%ヒト血清アルブミンを用いた群(HSA群, n=6)に分けて比較検討した。

【結果および考察】HSA群では試料投与後30分以内に全例が死亡したのに対し、HSA-FeP群では全例生存し、試験終了後については12時間の生存も確認した。脱血ショック時迄の経過においては両群とも同様の結果が得られ、Hctに関しては12%まで低下した。試料投与直後のデータを比較すると、MAPはHSA群ではほとんど回復しないのに対し、HSA-FeP群では基準値の90%まで回復した。BFはHSA群では30%の上昇に留まるが、HSA-FeP群では脱血前値まで戻った。pHはHSA群では大きな低下を認めるが、HSA-FeP群では脱血前に近い値を保った。PaO₂はHSA群では、急激な低下を認めるが、HSA-FeP群では、低下は軽度に留まり、30分後には回復していた。組織酸素分圧(P_{tmO2}, P_{trO2})に関しても、HSA群では、改善がなかったのに対し、HSA-FeP群では、酸素供給の維持と改善を認めた。以上の結果よりHSA-FePは生体内において酸素を運搬していると考えられる。

ヘモグロビン小胞体表面へのポリオキシエチレン修飾効果

宗 慶太郎, 油谷賢一, 酒井宏水, 武岡真司,
 土田英俊
 (早稲田大学 理工学総合研究センター)

【緒言】ヘモグロビン小胞体表面をポリオキシエチレン(POE)鎖で修飾すると分散安定度が向上する。本報では、ヘモグロビン内包効率の低下を回避するため、外表面のみをPOE修飾する後導入法について検討し、微小熱量分析による導入過程の解析と表面修飾POE鎖の定量から安定導入に最適な小胞体膜成分とPOE脂質の組合せを決定する。また、アルブミン存在下での凝集を回避できるPOE脂質の導入量を明らかにする。

【方法】リン脂質小胞体[DPPC/cholesterol/DPPG, あるいはHSPC/cholesterol/DSPG, 5/5/1 モル比(日本精化)]分散液にPOE-DPPE, POE-DSPE(POE鎖平均分子量: 5,000(日油リポソーム))分散液を滴下して小胞体表面を修飾した。等温滴定型微小熱量計(MCS ITC, Microcal)を用いて、導入速度定数、エンタルピー変化を計測、また超遠心分離(10万g, 60min)にて未導入POE脂質を除去した後、¹H-NMRからPOE脂質導入量を測定した。所定量のPOE脂質を導入したヘモグロビン小胞体についてキャピラリー粘度計(DCR, Anton Paar)による溶液粘度測定、動的光散乱(N4 SD COULTER)により粒径を測定し、更に長期保存安定度試験を実施した。

【結果および考察】POE脂質が小胞体外表面に後導入される過程は発熱反応であるので、発熱量の経時変化から導入速度を求めたところPOE-DPPE, POE-DSPEは各々2.0x10², 0.6x10² s⁻¹程度であった。導入率はPOE-DSPEがDPPC/cholesterol/DPPGに導入された系が最も高く99%であり、POE-DPPEがHSPC/cholesterol/DSPGに導入された系では40%であった。従って、二分子膜構成脂質よりアシル鎖の長いPOE脂質が導入される組合せが後導入に適しており、二分子膜中心部までPOE脂質アシル鎖が導入されるためと考察される。

アルブミン存在下で小胞体は凝集し溶液粘度が上昇するが、0.07mol%以上POE脂質が導入されると粘度上昇は完全に抑制された。粒径測定からも0.07mol%以上では凝集体が観測されないことを確認した。また、POE脂質を0.3mol%導入したヘモグロビン小胞体では4, 23, 40℃の何れの温度においても1カ月保存後でも凝集体の形成は認められなかった。

USTH法によるSFH中のメトヘモグロビン還元酵素系への影響

木村哲寛, 清木恵美子, 緒方嘉貴
テルモ株式会社 研究開発センター

【緒言】人ヘモグロビン(SFH)を原料とした人工酸素運搬体の開発において、ウイルス除去、不活化は必須の技術である。そこで我々はフィルターによるウイルス除去工程を検討し、12logs以上のクリアランスレベルであることを確認した。しかし今後さらに安全性を高めるために異なる方法によるウイルス不活化を組み合わせる必要があると考え、我々は、Ultra Short Time Heating(USTH)法を用いたウイルスの不活化法を候補の一つし、USTH処理がSFH中のヘモグロビン(Hb)及びメトHb還元酵素系に及ぼす影響について検討した。

【方法】Hb濃度を4%に調整したSFHを70℃から105℃の温度範囲においてUSTH処理を行ない、処理後のSFHの、Hb回収率及びメト化測定を行った。

【結果】USTH処理したSFHのHb回収率は、加熱温度88℃までは98%以上であったが、それ以上の温度では、急激に低下した。また、加熱処理によるHbのメト化は、90℃処理温度まではほとんど認められなかった。しかし、それ以上の処理温度では、メト化が促進され、蛋白変性物も多く存在した。次に、USTH処理したSFHにグルコース、アデニン、イノシン、NADを加え、24時間37℃でインキュベートしたところ、加熱処理温度が高くなるに従ってSFHのメト化抑制効果が低下していた。特に88℃以上の加熱処理では、24時間における最大メト化率にまで達していた。

【考察】SFH中の解糖系酵素群は、USHT処理によりダメージを受けていることが推定された。特に90℃以上の処理温度では、酵素群の失活が考えられた。しかし、処理温度90℃以下では、SFHを濃縮することによりHbのメト化が抑制され、この処理温度以下処理したSFHのメトHb還元機構は機能することが確認された。さらにHb濃度を高めることで還元機構の機能も高まると考えられUSHT処理は、SFH製造工程中におけるウイルス不活化方法として期待できる。

ヘモグロビン系酸素運搬体による血小板作用

藤井聡¹, 佐久間一郎¹, 仲井邦彦², 富樫広子³,
吉岡充弘³, 佐藤洋², 北島顕¹

¹北大医 循環器内科、²東北大院医 環境保健医学、
³北大医 第1薬理

ヘモグロビン(Hb)系酸素運搬体による副作用として、最近、分子内架橋型Hb投与により血小板粘着が亢進することが報告され(Circulation 93:327, 1996)、Hbによる血小板活性化の可能性が指摘された。EDRFは血小板活性化抑制に働いており、HbによるEDRF不活性化がその背景にあると思われる。我々はHbによる血小板機能への影響を検討する目的で一連の実験を行っており、今回その一部を報告する。

【方法】Hbとして、ヒトまたはウシ赤血球よりstroma-free Hbを調製し、透析後実験に使用した。Hb投与は、Hb濃度5%、投与量125 mg/kgとし、対照群は同量の生理食塩水とした。血小板機能として、in vitro凝集能検査、血小板cGMP測定を行った。

凝集能は、Wister系雄性ラットに大腿静脈よりHbを投与し、経時的にCPD採血し多血小板血漿(PPP)を調製した。凝集素にADPおよびcollagenを用いた。

血小板cGMPは、日本白色系雄性ウサギにカルバコールを投与後、耳静脈よりHbを投与、およそ15分後にEDTA及びIBMXを抗凝固剤として採血し、Tyrode液により洗浄血小板を作成、RIAにより測定した。

【結果】凝集能検査の結果、対照群に比較して、Hb投与群で凝集能の若干の低下傾向が観察された。血小板cGMPはHb投与群で若干減少する傾向が観察された。

【考察及び結論】これまでの成績から、Hb投与による血小板機能の何らかの変化が示唆されるものの、その変化量は小さく、またその意義も明らかではない。血小板はcGMP代謝を含めその機能が極めてダイナミックに制御されており、現在の評価系ではHbの影響を十分に把握できていない可能性がある。さらに、酸素運搬体の適応は健康体ではなく様々な病態生理下で使用されることを念頭において、各種病態モデルでの検討が重要と考えられる。今後、例数を増やすとともに、より鋭敏な血小板活性化マーカーの採用により評価系を再検討し、Hbによる血小板作用の解明を進める必要がある。

In vitro における人工酸素運搬体(NRC)の抗原提示能、好中球走化能、血小板凝集能への影響

藤原満博¹、東寛¹、若本志乃舞¹、伊藤貴俊¹、池淵研二¹、武岡真司²、土田英俊²、関口定美¹

¹北海道赤十字血液センター

²早稲田大学理工学総合研究センター

【緒言】ヘモグロビンを利用した人工酸素運搬体として、リポソーム型ヘモグロビン(NRC、テルモ)が開発されている。ヘモグロビンをリポソームに包埋することで、血中半減期の延長、膠質浸等圧の調製、さらにアロステリック因子や酵素を封入することでヘモグロビンの酸素親和性やメト化の抑制等が可能になる利点を持ち、出血性ショックの動物モデルにおいて有効性が示されている。これまで我々は、NRCの生体適合性に関し、ヒト単球、好中球の活性酸素産生能やサイトカイン産生への影響を検討してきた。今回、その継続として、抗原提示能、好中球の走化能、さらに血小板凝集能に対する影響をin vitroで検討を試みた。

【方法】1.末梢血単核球(PBMC)の抗原提示能の測定は、one-way MLRを用いた。刺激細胞としてPBMCを0-5%NRC存在下に0-20時間インキュベート後、 γ 線照射した。2.400mL全血由来のパフィーコートからデキストラランにより好中球を調製した。ケモタキシスチャンバールウエルの下室にfMLPを、上室にあらかじめ0-10%NRC存在下に30分インキュベートした好中球を添加し、その走化能を測定した。3.400mL全血由来濃厚血小板(PC)を、Hepes Tyrode's buffer (+PGE1)で2回洗浄後、Hepes Tyrode's bufferに浮遊させた。血小板を、HbAo、 α - α 架橋型Hb、NRC(各1 μ M)と37 $^{\circ}$ C、3分間インキュベートした後、thrombinを添加し、血小板の凝集能を測定した。collagen凝集の場合は、血小板をAB型 plasmaに浮遊させた。

【結果】1.刺激細胞としてPBMCを0-5%NRC存在下に0-20時間インキュベートさせた範囲内では、抗原提示能になんら影響がみられなかった。2.NRC存在下に30分インキュベートした好中球の走化能は、著しく抑制された。3.thrombin(0.025-0.1U/mL)、及びcollagen(0.75-5 μ g/mL)による血小板凝集反応に対し、1 μ MのHbAo、 α - α 架橋型Hb、NRCの影響はいずれも見られなかった。

【考察】NRCが好中球の活性酸素産生を促す一方で、走化能には抑制的に働くことから、細菌感染等による好中球の防御機構へのNRCの影響を更に検討する必要があると示唆された。

Perfluorochemical(FC43)の補体活性化作用とラット肝異種移植における生着延長効果

田中三津子¹、玉置透¹、川村明夫¹、此枝義記¹、横田亘弘¹、林隆則¹、石倉浩²、吉木敬²

¹北榆会 人工臓器・移植・遺伝子治療研究所

²北海道大学医学部病理学

【緒言】Perfluorochemical 乳剤の一つで酸素運搬体であるFC43は、補体、とくにalternative pathwayの活性化によって起きると考えられているモルモットラット間異種移植の超急性拒絶反応を抑制することが報告されている。今回、FC43の補体活性化作用とモルモットラット間の異種肝移植における超急性拒絶反応遷延効果を検討した。

【方法】FC43の補体活性化作用の検討として、未処置LEWラット(n=3)にFC43 10.0 μ l/gを経静脈的に投与して経時的にCH₅₀、ACH₅₀、C3を測定した。異種肝移植拒絶反応遷延効果の検討は、Hartley系モルモットをドナー、Lewis系ラットをレシピエントとして用い、肝移植術はラット同種肝移植法に準じて同所性に行った。FC43は血流再開前30分に単回あるいは血流再開直後に反復して経静脈的に投与した。FC43投与実験群は以下の通りとした。1群(n=5)：対照群、2群(n=4)：FC43, 5.0 μ l/g。3群(n=7)：FC43, 10.0 μ l/g。4群(n=7)：FC43, 5.0 μ l/g+5.0 μ l/g。肝移植後の移植片生着時間、血流再開後1時間のHE染色、免疫組織染色(IgG, IgM, C3)を検討した。【結果】FC43投与後、CH₅₀は30分後に80%、ACH₅₀は10分後に10%まで抑制された。C3は、投与後一過性に上昇した後、2時間後から60%まで低下した。肝移植片生着時間は、1群が4.23 \pm 0.89時間であったのに対し、2-3群では7.30 \pm 2.25、8.06 \pm 1.45、9.45 \pm 3.64時間(p<0.05, 0.005, 0.01 vs 1群)と有意に延長した。HE所見においては、1群では肝細胞変性と類洞の鬱血が認められ、FC投与群ではほぼ正常の細胞構築であった。免疫染色では1群にC3の著明な沈着が認められたのに対し、FC投与群では軽度であった。IgMは1群に軽度認められたのみで、IgGの沈着はいずれの群にも見られなかった。【結語】FC43には著明な補体とくにalternative pathwayの活性化作用が認められた。FC43投与によってモルモットラット間異種肝移植片の生着時間は有意に延長し、病理組織学的所見においてもC3の沈着は著明に抑制された。FC43異種移植における新しいstrategyとなる可能性が示唆された。

ラットピューロマイシンアミノヌクレオシド腎症モデルにおける遺伝子組換えヒト血清アルブミンの腹水改善効果

塚田稔、松井智彦、丸山智之、結城隆、花田秀一、
中島 常隆、中村憲史
吉富製薬株式会社研究本部

【緒言】ネフローゼ症候群の浮腫改善にはフロセミド等の利尿薬が用いられるが、利尿薬に抵抗性を示す患者があり、その場合にはヒト血清アルブミン (nHSA) が併用される。しかし、nHSA の原料となるヒト血漿には限界があるため、nHSA に代わる新しい HSA 製剤が望まれている。我々は今回、*P. pastoris* で発現した遺伝子組換えヒト血清アルブミン (rHSA) を用い、ラットピューロマイシンアミノヌクレオシド (PAN) 腎症モデルの腹水軽減効果を検討した。

【方法】ラットに PAN (20 mg/kg/日) を 5 日間連続投与後、PAN 投与開始 9 日目から 11 日目までの 3 日間 1 日 1 回被験薬物を投与した。被験薬物投与開始から 2 時間の尿量及び 3 回目の被験薬物投与開始から 22 時間後の腹水量を測定した。被験薬物は rHSA (1、2 g/kg) あるいは nHSA (1、2 g/kg) 単独投与、フロセミド (1、3、10、30 mg/kg) 単独投与、及びフロセミド (5 mg/kg) と rHSA (1 g/kg) の併用投与の効果について検討した。

【結果】rHSA (1、2 g/kg) あるいは nHSA (2 g/kg) の単独投与により、PAN 腎症ラットの腹水量は有意に減少した。一方、フロセミド (1~30 mg/kg) の投与では利尿作用はみられたが、有意な腹水量の減少はみられなかった。フロセミド (5 mg/kg) への rHSA (1 g/kg) の併用ではフロセミド (5 mg/kg) 単独に比べて有意な腹水量の減少がみられた。

【結論】PAN 腎症ラットは腹水量の改善においてフロセミドに抵抗性を示す傾向にあった。rHSA の投与は本モデルの腹水量減少に有効であり、PAN 腎症ラットの腹水軽減には血中膠質浸透圧の改善が重要であると考えられた。今回の結果から、利尿薬抵抗性を有するネフローゼ患者の腹水や浮腫改善において、rHSA は nHSA に代わる HSA 製剤として有望であることが期待された。

人工リンパ球の開発: 抗白血病抗体とアポトーシス誘導分子を固相化したゼラチンビーズによる抗白血病効果の検討

¹宮村耕一、¹横澤敏也、¹飯島也万、¹谷本光音、
²森山和重、²藤野隆一、¹斎藤英彦
¹名古屋大学医学部第一内科
²富士レビオ株式会社中央研究所

細胞傷害性 T 細胞(CTL)の抗腫瘍作用のメカニズムとして T 細胞受容体(TCR)による白血病細胞へのターゲッティングおよび機能分子によるアポトーシス(細胞死)の誘導が想定される。機能分子の一つとして FasL があり、標的細胞上の Fas に結合し、それらを重合させ細胞内のアポトーシスのシグナルが伝達されると考えられている。我々は FasL のかわりに抗 Fas 抗体(CH11、米原伸博士)、TCR のかわりに抗急性リンパ性白血病抗体(抗 CD10 抗体、NL1、上田龍三博士より供与)を固相化したゼラチンビーズを作成し、各種細胞株に対する細胞傷害性を PI 法および LDH リリースアッセイを用いて検討した。最初に CH11 のみを固相化したビーズの U-937 に対する効果を検討した。同濃度の free の CH11 との比較では、ビーズ/細胞比= 10、20、40、80 において、free の CH11 は 3.3、3.6、4.1、5.1%、Fas の付いたビーズは 14.4、15.9、22.9、31.5%と free の CH11 に比べて細胞傷害性が明らかに増加した。次に CD10(+) の NALM-6 に対しては、CH11 と同時に固相化する NL1 の濃度を 0、x1、x10 と増すことにより、NL1 の濃度に従って顕微鏡での観察で細胞へのビーズの付着が増加し、細胞傷害性もそれぞれ 9.5%、10.1%、14.0%と顕微鏡の結果と同様に増強した(ビーズ/細胞比=20)。以上よりビーズ上への固相化により抗 Fas 抗体の細胞傷害性の増加が示された。また抗 CD10 抗体による特異性の増加も確認された。我々の開発したビーズはナチュラルの CTL のもつ分裂、成熟など特性は欠如するものの、ターゲッティングと細胞障害性において CTL と同様の働きを示した。

血小板代替物としての固定血小板の可能性

I パラホルムアルデヒドを用いた固定方法および保存条件の検討

山口美樹、池淵研二、平山文也、東寛、関口定美
(北海道赤十字血液センター)

【はじめに】パラホルムアルデヒド(PFA)を用いた血小板の固定は、血小板の基本機能である血管内皮下組織への粘着およびリストセチン凝集能などの各種機能を温存できる。しかし、その固定条件は各報告者間で異なっている。一方、この固定血小板を凍結乾燥することで長期保存も可能であるが、使用時に洗浄操作等が必要とされ輸血現場での迅速な使用、特に緊急時の対応には適さない。そこで今回我々は、固定血小板を浮遊液として長期保存することを目的に最適な固定条件及び浮遊液として保存した後の血小板機能について検討した。

【材料・方法】健常人 400ml 献血由来濃厚血小板を用い、血小板を PFA で固定した。その際 PFA 濃度、固定時間、固定後の洗浄法について検討した。固定後は PBS あるいは 1%アルブミン加 PBS で 4℃保存した。血小板機能はリストセチン凝集能で評価した。

【結果】固定時間を 1 時間とした場合、PFA 濃度 0.25、0.5、1.0%では固定直後で凝集能は 80%以上であるものの 7 日後にはいずれも 20%以下と低下した。これに対し、2.0、4.0%では固定直後、7 日後のいずれにおいても 60%以上に保たれた。固定時間が 30 分の場合、PFA 濃度いずれの場合も固定直後の凝集能は良く保たれるが、7 日後では 20%以下と低下した。固定後の洗浄は 2 回以上必要であった。固定血小板の機能は保存液中のヒアルミンの有無に関係なく 4℃で 3 カ月以上維持し続けた。

【結論】2～4%の PFA を用い 1 時間固定、固定後 2 回以上洗浄する事によって良好なリストセチン凝集能を保った固定血小板液が 3 カ月以上保存できた。

エホバの証人から見た輸血の代替療法の意義

有賀 友則

ものみの塔聖書冊子協会

ホスピタル・インフォメーション・サービス

エホバの証人は命と健康を大切にしており、輸血以外の良質の医療を進んで受け入れる。したがって、輸血の代替療法はエホバの証人にとって重要な意味を持つ。また近年、エイズや肝炎、GVHDなど、輸血に伴う数多くの危険が知られるようになり、一般の人々もできるだけ輸血を避けたいと願うようになっている。したがって、人工血液を含む代替療法の研究や開発は、エホバの証人のみならず、すべての患者に恩恵をもたらすに違いない。

輸血の副作用について、厚生省の「血液行政の在り方に関する懇談会報告書」(平成9年12月)は、血液製剤が「現在の最高水準の科学技術をもってしても、ウイルス等の感染や、免疫反応等による副作用の危険性を絶えずはらんでいる」ことを認めている。その上で同報告書は、「医療現場で血液製剤を使用するに当たっては、医療上は有効であっても安易に第一選択の治療法として用いるべきではなく、他に代替的な手段がなく真に必要な場合に、必要量に限って使用されるべきである」と指摘している。また、「今後、安全性を十分確認しつつ遺伝子組換え製剤や人工血液の開発等が積極的に行われる必要があり、国もこれを積極的に支援することにより、将来的にはできるだけ人の血液に依存しないような医療を目指すべきである」と報告している。

同報告書はまた、輸血に対するインフォームド・コンセントの必要性を指摘している。患者が宗教上の理由や他の理由で輸血を受け入れない場合、輸血の代替療法は患者の選択の幅を広げ、患者に自らの価値観に沿った治療を受ける機会を与えることになる。

輸血に伴う危険を回避することに加え、患者の価値観を尊重した全人的医療が求められている現在、患者の望む選択肢を広げるという点で、安全で有効な輸血の代替療法の研究・開発は、エホバの証人だけではなく、すべての患者にとってますます大きな意義を持つことになろう。この分野における医師や研究者の努力を深く感謝すると共に、今後の進展や成果を大いに期待したい。

微小循環動態の観測と赤血球代替物の評価

Efficacy of Red Cell Substitutes in Microcirculation

酒井 宏水¹⁾, マルコス・インタリエッタ²⁾, 土田 英俊¹⁾

Hiromi Sakai¹⁾, Marcos Intaglietta²⁾, Eishun Tsuchida¹⁾

1. 緒言

心臓から伸びる大動脈は末梢で分岐して細動脈になり、更に網状の毛細血管に分岐する。毛細血管は合流して細静脈となり、大静脈を経て心臓に戻る。顕微鏡でしか見ることができない微小血管中の血液循環を微小循環(Microcirculation)という。血液循環の主目的がホメオスタシス、つまり全身の各組織細胞に対する物質供給と代謝物の除去であるならば、微小循環こそ循環系で最も本質的な役割を担う部位である。今日ではあらゆる病態の根底に微小循環の障害が深く関わっていると認識されている。微小循環には形態と機能のいずれの面においても器官特異性があり、全てを一律に論じることはできない。しかしある一部位の直接観測によって得られる情報(血流速、血管径、血球数、酸素分圧勾配、管壁透過性など)を数値化し、心拍出量や血液ガスパラメータなど全身反応と連動させることで、薬物投与に対して急性から慢性の薬理効果や代謝過程も分析でき、人工血液全般の開発において不可欠の評価基準になりうる。

赤血球代替物の投与が他の薬物投与と異なる点は、血液の大半を置き換えるくらいの大量投与を前提としていることであり、生体に与える影響は大きい。代替物は赤血球と同様に末梢組織に酸素を運ぶのであるから、全身反応と共に組織の血流動態(Microhemodynamics)を動的比較することは機能評価のために重要である。酸素結合と解離の速度は、形態上、赤血球よりも代替物のほうが迅速であることが物理化学的に明らかになっているにも拘わらず、体内では複雑な生理作用のため酸素輸送能が赤血球と同じにはならない場合が多い。この意味でも、末梢組織で何が起きているのか、血球成分の鮮明画像から正確に情報を得ることが求められる。

本報では、そのような観点から先ず赤血球代替物を投与した場合の微小循環動態について報告例をまとめた。また、微小循環動態を決定しうる部位として、毛細血管に入る手前の抵抗血管(小動脈、細動脈)の動態(収縮、弛緩)が重要である。抵抗血管収縮因子を整理し、赤血球代替物の設計に際し重要と思われる点について述べる。

2. 微小循環動態の観測法

ヒトの身体の微小循環を測定する方法としては、近赤外線を利用するレーザードップラー血流計が良く知られている^{1,2)}。プローブを皮膚または臓器表面に密着させ、その部位の血流を測定する。血管系を直接見ることができない定性的手法であるが、欧州では診断用に比較的広く用いられている。また、Capillaroscopy(毛細管顕微鏡検査)では、唇、または爪根部の爪溝に近い部位を顕微鏡観察すると血球の流れが観測でき、末梢循環障害(播種性血管閉塞症、糖尿病)の診断に使われる³⁾。

動物実験系では、毛細管だけでなく細動静脈も観測するために、微小循環動態の観測部位としては主に齧歯類の腸間膜や骨格筋、頬袋、提睾筋、耳、皮弁など当然の事ながら麻酔と侵襲を伴う測定が一般的で、脳(cranial window)や摘出臓器、肺表面、眼底の毛細管などを観測する方法も良く知られている。しかし麻酔は循環器系の神経性調節に変化をもたらす。無麻酔でしかも侵襲を与えない方法としては、コウモリの翼を透過光で顕微鏡観察する特異な例があるが⁴⁾、条件に恵まれた場合の話である。一方で、齧歯類の背部皮膚に直径1cmの硝子窓を取りつける方法が今のところ最も日常的に実験できる無麻酔の手法と思われる^{5,7)}。硝子窓の取り付け自体は侵襲を伴うが、数日間でその影響が無くなる。また、実験は無麻酔下に行う。

そこでIntagliettaらが開発した微小循環動態の鮮明画像を得るための手法の一つを紹介する。Hamsterは皮膚に弾力性があり、つり上げても余裕がある上に皮膚が薄いため、片側の皮膚を切り抜いて取りつけた硝子窓を通して透過光での実体顕微鏡観測が可能である⁹⁾(Fig.1)。細動脈、細静脈および毛細管中を流れる血球が極めて鮮明に観測できる(最近では小動脈と小静脈も観測可能となった(後述))。頸動静脈に挿管し、これを頸部皮下経由で背部から取り出し、頸動脈からの採血と血圧測定、頸静脈からの試料投与が可能となる。微小循環動態はCCDカメラ搭載顕微鏡にて解析する。赤血球速度、血管径変動、血流速度、有効毛細管密度、血管内及び組織酸素分圧、そのほか毛細管壁透過性、白血球接着、酸素輸送のメカニズム解析など、全身反応と対応させて種々の情報を解析することができる¹⁰⁻¹³⁾(Fig.2)。

1)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, Waseda University, 2)カリフォルニア大学サンディエゴ校 生体工学部, Department of Bioengineering, University of California, San Diego.

早稲田大学理工学総合研究センター高分子化学研究室, 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1, Department of Polymer Chemistry, Advanced Research Institute, Waseda University, 3-4-1 Ohkubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan.

論文受付1998年7月9日。

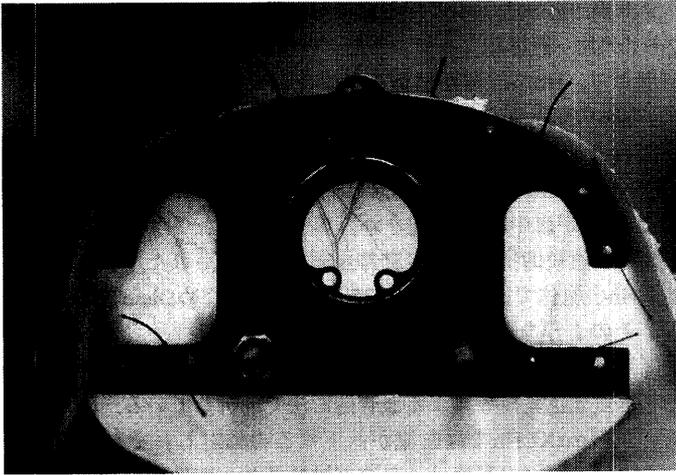


Fig.1 Dorsal skinfold chamber in a Syrian golden hamster used to visualize microvessels in the subcutaneous tissue. A pair of largest vessels are small artery (diameter, ca. 150 μm) and small vein (350 μm).

具体的に測定法を述べると、血管径は画像剪断法(Digital video image shearing monitor)にて、赤血球速度はフォトダイオード-cross-correlation法によって赤血球通過によって変化するコントラスト(明暗)をもとに測定、血流速度(Q, nL/s)は、血管径(D)と赤血球流速(V)から式: $Q=V/R_v \cdot \pi \cdot (D/2)^2$ より算出。R_vは血管中心の血流速度と血管全体の血流速度の比である。有効毛細管密度(Functional capillary density)は、選定視野の毛細血管数を数え前値とし、操作後赤血球が通過している毛細血管数を前値に対する相対値として算出する。血管内、および組織酸素分圧pO₂の測定は、燐光色素(bovine albumin/Pd-meso-tetra(4-carboxyphenyl) porphyrin複合体)の燐光寿命のpO₂依存性を利用する。静脈内投与した燐光色素は時間とともに組織細胞間質にまで浸透する。燐光はXeパルス光(30 Hz)により励起、pO₂測定部位はスリットで自在に制限する。燐光はフォトマルにて検出、消光曲線を一次指数関数として外挿、Stern-Volmer式からpO₂を算出する。この方法は、赤血球代替物などの投与物の評価だけでなく、微小循環動態の生理学的実験や、腫瘍組織の循環動態¹⁴⁾の観測などにも使用されている。

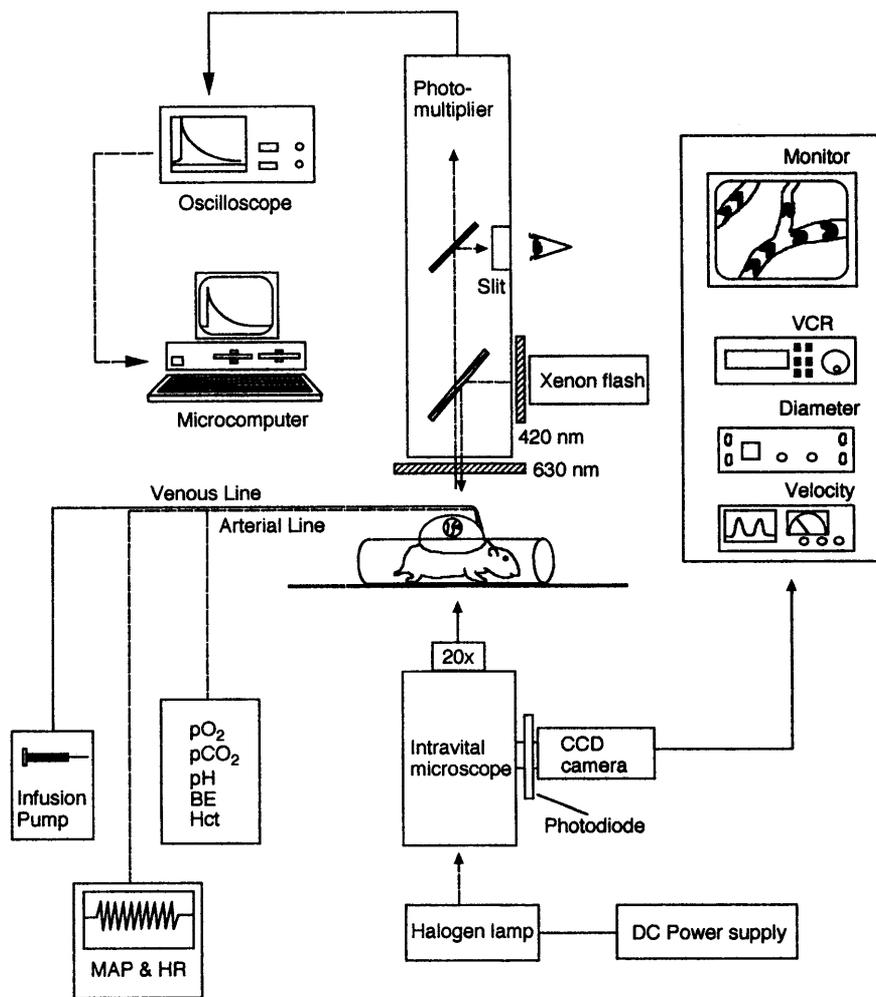


Fig.2 Schematic diagram of a system used to measure hemodynamic parameters and oxygen tensions in microcirculation.

3. 赤血球代替物の微小循環動態

3.1. Hb小胞体

筆者らは上述のhamster modelを用いpolyoxyethylene(POE)で表面を修飾したセル型のHb小胞体(Hb=10 g/dL, P_{50} =32 Torr, in 5% albumin)の80%交換輸血を実施、投与の効果について顕微鏡下、血管形状、血管内および組織酸素分圧、血流動態を解析し、非修飾型のHb小胞体系と比較した³³⁾。血圧、心拍数、血液ガス全てにおいて両群共に安定した値を示し、比較のalbumin投与群よりも勝っていた。POE修飾系は血管内がHbの吸収で全て暗く写っていることから、小胞体は凝集しておらず、血漿相に分散していた。一方、未修飾群は、毛細管内および細静脈内で凝集体が観測された(Fig.3)。特に細静脈内など流速の遅い部位では、凝集体の大きな塊が確認された。血流速度、有効毛細管密度、酸素分圧共にPOE修飾群が非修飾群に比較して極めて高い値を推移した。従ってPOE修飾による凝集抑制が皮下微小循環に不可欠である。しかし、POE修飾群でも交換前に比較して血液流量が徐々に低下し、酸素分圧も劣っていた。本実験では細動脈(径60 μ m以下)の血管収縮は特に認められないことから、観測組織の血流はもっと上流の抵抗血管(後述)などで支配されていることを示唆した。

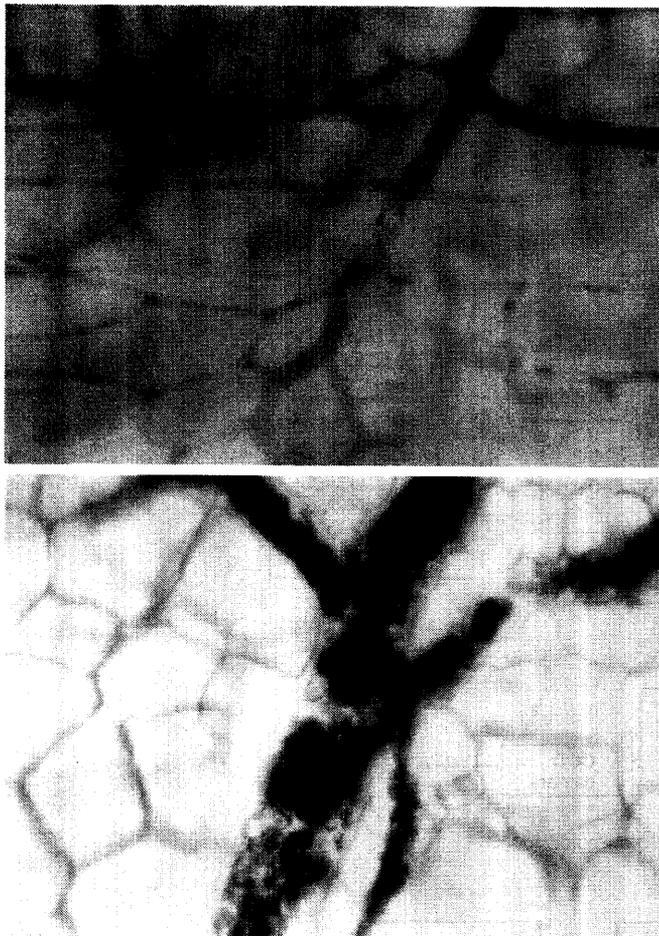


Fig.3 Micrographs of microvasculature after 80% exchange with POE-HbV/HSA and unmodified HbV/HSA. (top) Microvasculature are blackened owing to the homogeneous distribution of POE-HbV in the plasma phase. (bottom) The aggregates of HbV forms blocks in collecting venules.

ラット摘出肝臓灌流中の微小循環の動態は、末松らによって検討された^{34,35)}。肝細胞ミトコンドリア内NADHの蛍光強度(450nm)の観測から、Hb小胞体が組織を酸素化していることが確認された。肝臓中ではhemeoxygenaseが産生する一酸化炭素(CO)が、血管弛緩因子として血管内壁のIto細胞に作用する。HbAoの投与では、Disse腔にHbが侵入しHbの代謝亢進によるbilirubin排泄の亢進、またCOが血中Hbに捕捉され、血管抵抗が20%増大し、同時に類洞の不連続的狭小化と流動停止領域が確認された。一方でセル型のHb小胞体では、粒径が0.25 μ mと大きいためDisse腔に侵入せず、そのようなことが起こらない。

米国海軍研究所のRudolphらは、兎眼球脈絡膜の毛細血管内血流動態を蛍光色素投与による血管造影法で解析している。陸軍研究所の試料 $\alpha\alpha$ XLHbでは血流が低下するのに対し、それをリポソームで包んだLEH型では、血流が維持され、有効毛細管密度が正常値を示した。これは血管内皮由来弛緩因子の捕捉に関する結果と考えられ、カプセル化の有用性が明らかである。しかし本実験法では、組織の形態学上の問題のため、毛細管が見えるのみで、上流の細動脈や小動脈が観測できず、血流低下が何によるのか説明に欠ける。

3.2. 非セル型ヘモグロビン

現在欧米では7社が臨床試験を進めている段階であるが、微小循環を詳細に検討している例は意外と少ない。直接観測している報告例、あるいは、間接的に微小循環に関する知見を得ている報告例も含め以下に紹介する。

(a) $\alpha\alpha$ 鎖間架橋Hb (Baxter, 米国陸軍研究所)

Hb分子内の $\alpha\alpha$ サブユニット間をbis(3, 5-dibromosalicyl)fumarate (DBBF)で架橋した分子内架橋Hbは、当初Baxter Healthcare社とLetterman 陸軍研究所との共同で応用研究が進められた。しかしその後両者は分断し、陸軍研究所の $\alpha\alpha$ XLHbとBaxterのDCLHb (HemAssist)が共存している。

米国陸軍研究所の $\alpha\alpha$ XLHbの微小循環動態観測は、Intagliettaらが上述の無麻酔ハムスターモデルで最初に実施している^{15,16)}。高度交換輸血試験では、交換率の上昇につれ、有効毛細管密度および毛細管内赤血球速度が低下し、対照のdextranと比較しても有意に低い値を示した。これについて考えられる理由は、血管内皮由来弛緩因子(NO)の捕捉による血流の低下だけでなく、非セル型のHb溶液は酸素放出速度が速いため、細動脈で酸素感受性の自動調節機構が働いた、或いは低粘度溶液との大量交換で血管壁の剪断応力が低下してNOを含むEDRF産出量が減少し血管収縮が起こり下流の血流が低下した(後述)、ものと推論している。

BaxterのDCLHb(HemAssist)に関しては、Messmer(独)らが同様の無麻酔ハムスターモデルで検討している¹⁷⁻¹⁹⁾。少量の投与(5 mL/kg)で1時間以上の血圧上昇と心拍数の低下、酸素電極で測定した組織酸素分圧は僅かな低下を認めた。数分間の細動脈(内径41 μ m)の収縮を認めているが、これが数時間の血圧上昇に寄与しているとは考えにくい。40%交換輸血後は、血圧上昇と投与30分後に血流の増大、組織酸素分圧の僅かな低下、細静脈内の接着白血球数の増大を示し活性化されているものと考えられる。出血ショックモデルの蘇生試験では、DCLHb投与群は細動静脈径に

変化は無く、血流速度、組織酸素分圧も自己血投与群には劣るものの、デキストラン群よりは高い値まで回復した。

(b) glutaraldehyde重合-牛Hb (Biopure)

Biopure社が開発したglutaraldehyde重合牛Hbの溶液²⁰⁾(Hb.=13 g/dl, P_{50} =30~35 mmHg, oncotic pressure=25~30 mmHg)を用いた高度交換輸血(Hct<4%)では、羊で血圧上昇および肺血管抵抗の増加が認められ²¹⁾、犬では血圧上昇は僅かであるが心拍出量の低下と末梢血管抵抗が増大する²²⁾。ラット高度交換輸血(Hct<3%)および出血ショック蘇生モデルでは^{23, 24)}、脳内灌流速度の増大により酸素消費量が維持されるが、これは全身末梢血管抵抗が増大し、脳への血液が増大したものと考えられる。また摘出腎臓の灌流試験では²⁵⁾血流および形態を維持し、何等副作用を認めていない。しかし脳虚血モデル兔への投与では血管収縮の為に逆に梗塞部位が拡大するとも報告され²⁶⁾、効果が疑問視されている。臨床試験では、腹部大動脈手術前の血液希釈に用いた場合(3mL/kg)²⁷⁾、血圧と末梢血管抵抗の増大、心拍出量と酸素運搬量/消費量の低下など良い結果が得られていない。獣医学領域でも人工血液は注目されており²⁸⁾、極く最近になって獣医学領域の使用に限ってFDAより許可され、1998年に商品名Oxyglobinとして13g/dL濃度の溶液(二年間棚置き保存可能)の販売を開始した²⁹⁾。

(c) polyoxyethylene結合ヘモグロビン (味の素-Apex)

味の素のpolyoxyethylene結合ヘモグロビン(PHP, 現在はApexが開発)に関しては、西、木田が各臓器灌流試験結果の詳細を本誌にまとめているので、そちらを参照して頂きたい³⁰⁾。一酸化窒素(NO)は血管内皮由来弛緩因子(EDRF)以外に、末梢神経の伝達物質としての役割も知られている。PHP投与による血圧上昇の原因は、EDRFとしてのNO捕捉だけでなく、血管調節神経系への影響も検討する必要があるとしている。

これとは別に、Mackenzieらは出血ショック犬モデルで投与直後に肺動脈圧上昇を示し³¹⁾、同時に赤血球が凝集することを認めている。赤血球凝集は、末梢循環の低下を引き起こすと推察している³²⁾。筆者らが合成したPOE結合Hb(POE鎖の結合様式が多少異なる)も、血液と混合したときに赤血球凝集惹起を認めているが、これはPOE鎖の高い排除体積効果によると考えられる。混合比が高いときにこの現象が顕著であることから、投与量に限界があると思われる。

その他、Somatogen社やBucciらが開発している分子内架橋Hbの投与においても、血圧上昇が認められ、臓器により血流分布が変化すること(肝、腎、腸は低下、脳と心臓は増加)がマイクロスフィア法などによって明らかとされている。しかしどの実験系においても血管系のどの部位が作用して血流を制御しているのか、具体的に示した例が無い。

4. 抵抗血管の重要性

微小循環に血液が到達する前の小動脈および細動脈で血流血圧の半分以上が低下する(Fig.4)。この血管は抵抗血管(resistance vessels)と呼ばれ^{36, 37)}、壁が比較的厚く平滑筋が発達し血管運動神経支配も豊富である。血管抵抗はアドレナリン作動性血管収縮、

平滑筋で直接作用する代謝性、オータコイド性収縮等によって制御され^{38, 40)}、血管内径が変化して血流血圧が調節されるとする機序があり、下流の微小循環動態を支配する極めて重要な部位である。小静脈或いは細静脈は組織を循環してきた血液の集約だけでなく血液貯蔵の役割を果たし、容量血管(capacitive vessel)とも呼ばれる。太さの異なるこれら微小血管が、アドレナリン作動薬、pH、EDRF、代謝条件に対して異なった反応を示し、特に抵抗血管でその感受性が強いことが知られている⁴¹⁻⁴⁴⁾。抵抗血管の部位が比較的体内の奥深くにあり、また中途半端な大きさであるため、これらの知見は、microradiographyや摘出血管を用いるなど、麻酔と侵襲を伴う実験から得られたものである。当然、過去の赤血球代替物を投与後の微小循環動態の研究で抵抗血管径と血流を同時に無麻酔下、直接観測している例はまだ無かった。

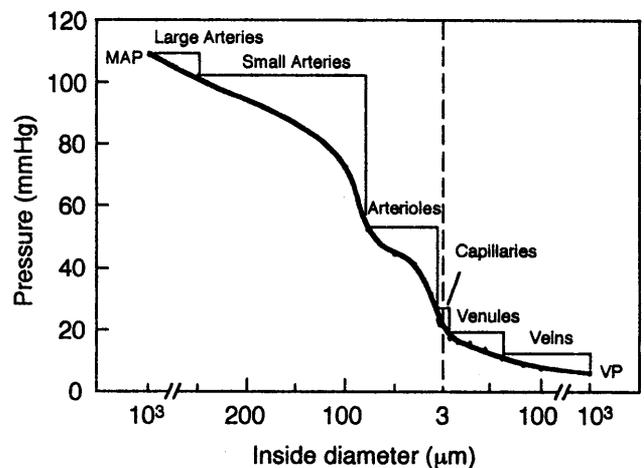


Fig.4 Pressure drop across the vascular system in the hamster cheek pouch. MAP, mean arterial pressure; VP, venous pressure (cited from Davis et al, *Am. J. Physiol.* 250, H291, 1986)

上述のhamster背部皮下微小循環動態の観測法は、無麻酔下非侵襲条件で実体顕微鏡観察ができる最適の方法である⁵⁻⁷⁾。硝子窓枠は通常太い血管を避けて装填していたため、細動脈径はせいぜい60μmであった^{18, 33, 45)}。赤血球代替物を投与した場合に、観測範囲で血管径の変化があまり無くても血流が著しく低下することがあり、観測範囲外のより大きな血管の動態が重要と考えられた。そこで窓枠をこの太い血管上に装填し、小動脈(A_0 , 径, $156 \pm 23 \mu\text{m}$)と小静脈(V_0 , $365 \pm 64 \mu\text{m}$)の観測を可能とした⁴⁶⁾(Fig.1)。これらの血管は、人体のcircumflexa scapulaの支流に相当する。皮膚が薄く、照射光の透過性が高いので、血管径だけでなくフォトダイオード法による血流測定も可能なことが本法の最大の利点である。

先ず8%濃度ヒト血漿アルブミン溶液(HSA)で80%の血液希釈を行ったところ、血流速度は一様に低下し続け、前値の20%以下となった。各血管($A_{0,1,2,3,4}$, $V_{C,L,0}$)の変動は部位によって異なり、 A_0 , V_0 はそれぞれ約35%、30%も収縮したのに対して、逆に細動脈は弛緩する傾向が認められた(Fig.5)。 A_0 の著しい収縮は血圧の維持に、また容量血管である V_0 の収縮は、皮膚から主要臓器に血

液を再分配させることに寄与していると考えられる。細動脈は弛緩することで血流を促進しようとするが、上流の血管収縮による供給量低下のため必要量を満たすことができず、完全に低酸素状態に陥った。洗浄赤血球をHSAに分散させたRBC/HSA群では、そのような血管収縮の傾向は認められず、血流は維持され高い組織酸素分圧を示した。二つの溶液の物理的相違は酸素含有量だけでなく、粘度にもある。血管壁に作用するずり応力は粘度に影響される。HSAが血管内皮弛緩因子産生量を低下させ、血管収縮させたとも考えられる(後述)。この簡単な実験から明らかのように、抵抗血管の変動が顕著であり赤血球代替物の評価に極めて重要な意味を示すと考えられる。

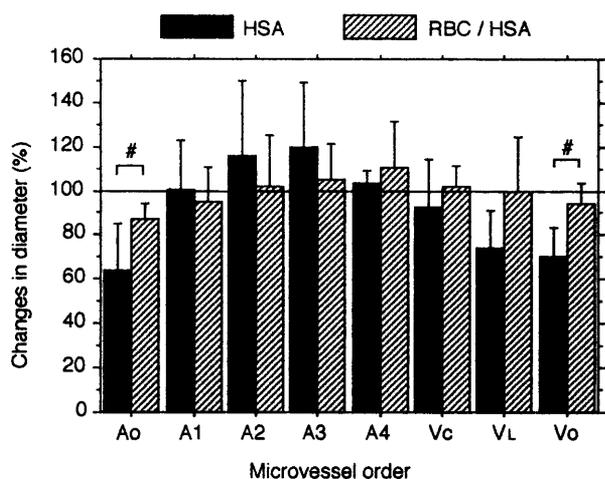


Fig.5 Heterogeneous diameter changes of microvasculature in conscious hamster dorsal skinfold preparation after 80% hemodilution with 8% human serum albumin (HSA) and washed RBCs suspended in HSA (RBC/HSA) with hemoglobin concentration of 10%. Baseline diameters (in μm); A_0 (ca. 150); A_1 (50); A_2 (20); A_3 (10); A_4 (8); V_c (30); V_L (80); V_0 (350). Values are mean \pm standard deviation. # significant difference ($p < 0.05$).

非セル型赤血球代替物である修飾Hb溶液を投与した場合の代表的な副作用は、血圧の上昇である^{47, 48}。修飾Hb溶液の血管内皮由来弛緩因子: NOに対する親和性が著しく高いためこれを捕捉し、弛緩抑制するとする説が最も有力である⁴⁹。摘出血管の収縮に関しては報告例があるが、意外にも無麻酔下、具体的に血管収縮部位を示している報告はなかった。我々の試験例では、独自に合成した $\alpha\alpha$ XLHb溶液をhamsterに少量投与(350 mg/kg)した直後から血圧上昇が認められた(Fig.6)。また上述の小動脈(径, 150 μm)が20%程度の著しい収縮を示した。その下流の細動脈(径, 60 μm 以下)には径の顕著な変化は認められなかった。対照のアルブミン投与ではこのような反応は全く見られなかった。

予期した通り、この抵抗血管が血圧と下流の血流制御に影響を与えていることが明らかとされた。現在、筆者らはこの抵抗血管に注目し、構造と物性の異なる各種赤血球代替物を投与した場合の動態を比較検討している。

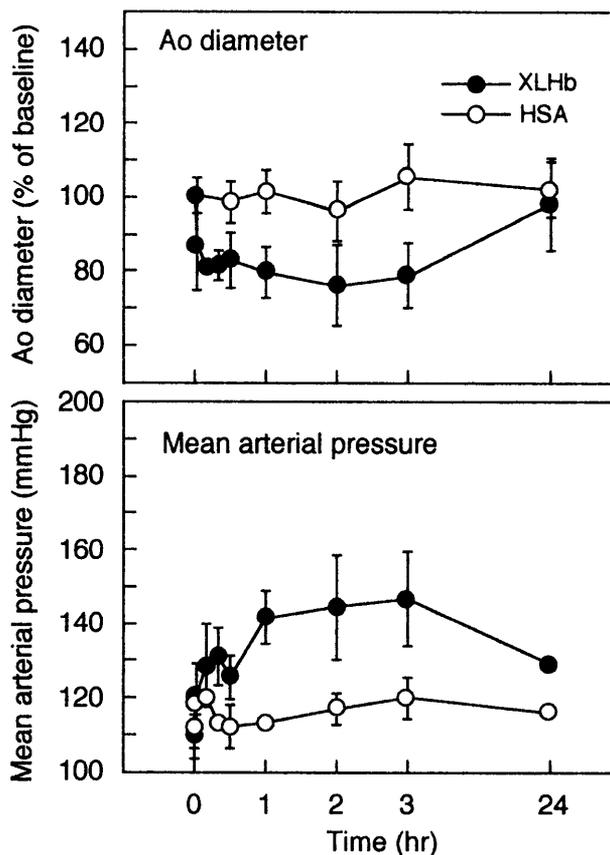


Fig.6 Changes of A_0 diameter and mean arterial pressure after 10% volume toploading of intramolecular crosslinked hemoglobin (5%-XLHb) and albumin (5%-HSA).

5. 血管収縮のメカニズム

5.1. 血管内皮由来弛緩因子:一酸化窒素捕捉による血管収縮とその他の要因

NOはHbに対する親和性が極めて高く、COの1500倍、 O_2 の30万倍である⁵⁰。OxyHbはNOが存在すると直ちに結合してHbNOとなり、すぐ酸化されてMetHbとなる。修飾Hbの投与に際し上述の血圧異常上昇や^{47, 48}、血管床への血小板の沈着などの副作用⁵¹が認められている。修飾Hb(特に分子内架橋Hb)は赤血球と比較すると極めて小さいので血管内平滑筋近傍に接近でき、NOを捕捉し弛緩機能が低下する。このとき、血小板内のグアニレートサイクラーゼの活性も低下し血小板凝集が促進される。血管収縮は末梢循環を阻害し、十分量の酸素が組織へ供給されなくなる。

Hbの毛細管内皮細胞透過性は、アルブミンに比較して100倍大きい。従って投与した架橋Hbは次第に内腔から血管外に漏出する。NO合成酵素は血管内皮細胞だけでなく、神経系や筋肉系など体の至る部位に存在するので、漏出HbがNOを捕捉して他の副作用を示す可能性を否定できない。事実、臨床試験でも明らかとされた修飾Hb投与後の食道括約筋の蠕動運動の異常⁵²⁻⁵⁴、腸管平滑筋の異常は、NO捕捉に関連していると考えられている。一方でNO捕捉による血圧上昇の性質を逆に利用し、敗血症患者に見られる過剰NO産生による血圧低下の際、NO捕捉剤として修飾

Hbを投与して昇圧する方法^{55,56)}, 血液透析や大動脈手術の際は血圧安定化剤に用いることが検討されているが^{57,58)}, その効果については疑問視もされている。

一方、直径約0.2~0.5 μ mのカプセル構造をしているHb小胞体では血管外漏出はなくまた平滑筋まで接近できずNO結合反応は抑制され、血圧の異常上昇は起こらない。実際、兎大動脈断片を用いたin vitro試験では、架橋Hbに比較して活性度が100分の1程度と低く、赤血球と同等であることが仲井, Rudolphらによって確認されている^{59,60)}。

α 架橋Hb(XLHb)による血管収縮と血圧上昇が、EDRFとしてのNO捕捉反応に依るだけでなく、アドレナリンやendothelinが関与している事が報告された⁶¹⁻⁶³⁾。XLHbの昇圧効果は、中枢神経系ではなく末梢血管系で引き起こされている。XLHbは、norepinephrine, phenylephrine, clonidineの昇圧効果を強める効果があり、このことは末梢血管系の α -受容体の感受性を増強していることを示している。XLHbの昇圧効果は、 α_1 遮断薬のprazosin, α_2 遮断薬のyohimbine投与で低下する。また、proendothelinがendothelinになる反応を抑制するphosphoramidonの投与でも昇圧効果が低下する。これらのレセプターの詳細な部位や機構についてはまだ検討が必要と思われるが、一般的に抵抗血管の部位にアドレナリンレセプターが比較的多く存在していることが知られているので⁶⁴⁾, この部位が下流の微小循環を支配していると考えられる。Hbのグロビン鎖の断片(peptide)が昇圧効果を示すとも報告され⁶⁵⁾, 純度や代謝過程も影響すると考えられる。

ここ数年、赤血球代替物を投与した際の血管収縮の原因についてこの他にも幾つかの説が報告され、単純なNO-Hb捕捉反応だけではもはや説明ができなくなっている。以下に血管収縮とそれによる微小循環の悪化を起し得る要因を抵抗血管との関連から議論した。理想とする赤血球代替物の分子設計に役立てればと思う。

5.2. 酸素依存性の血管収縮

血液循環量は、組織の酸素代謝に必要な酸素を十分量供給するように維持されている。血液中の酸素溶解量が増大すると、血管収縮や有効毛細管密度が低下する⁶⁶⁻⁷⁰⁾。この血管収縮は、血管内皮由来弛緩因子であるprostacyclin産生量が低下したことによるとも考えられている。最近、内皮酸素センサー系の存在が明らかにされた。cytochrome P450酵素がアラキドン酸カスケードを活性化させ、収縮剤であるヒドロキシアラキドン酸を産生する⁷¹⁾。組織への酸素供給が過剰になるとそれを抑制しようとして血管収縮により血液供給量を低下させる。

非セル型修飾Hb溶液またはセル型のHb小胞体からの酸素放出は、赤血球に比較して極めて迅速である。このことは、窒素置換した亜ニチオン酸溶液と高速混合後のHbのオキシ体からデオキシ体に変化する時のスペクトルシフトの測定(stopped-flow法)から明らかである(Fig.7)⁷²⁾。この速度の相違は形態の相違に由来する。赤血球の場合は酸素分子は粘稠なHb溶液内を拡散し、更に酸素溶解度の低い血漿相の障壁を拡散して目的の血管壁に到達する⁷³⁾。一方、血漿相に均一に分散したHb溶液の場合、血漿相の障壁は無いため、酸素を迅速に放出する。Hellumsらも人工血管を作成してこのことを確認している⁸⁾。Hb小胞体は赤血球と同様の

セル型構造ではあるが、粒径が小さく(250 nm)比較的均一分散しているため酸素放出は速い。酸素親和度が低い(P_{50} が大きい)ほど酸素放出は速いので、全ての修飾HbはストローマフリーHbよりも速いという事になる。このような赤血球よりも速い酸素放出は利点のように思われるが、酸素の促進輸送に対して血管内皮は酸素過多と判断して血管収縮を招来するという説が有力視されている⁷⁴⁻⁷⁶⁾。

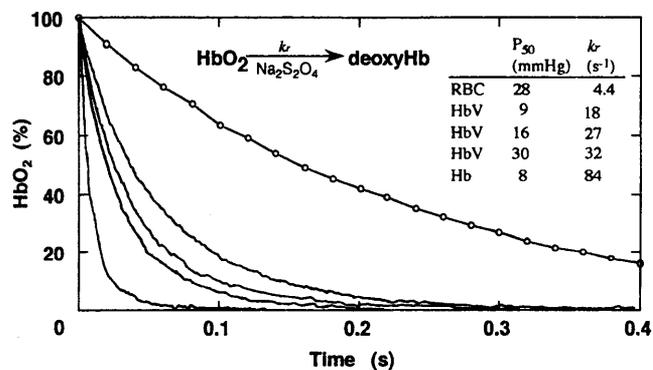


Fig.7 Time courses of oxygen release by RBC, Hb-vesicles(HbVs), and HbAo, measured with a stopped-flow method, mixing an air equilibrated Hb containing sample (Hb, 10 μ M) and deoxygenated sodium dithionite solution (50 mM), r.t., in 50 mM phosphate buffered saline (pH 7.4). From top to bottom: RBC, HbV (P_{50} =9, 16, and 30 mmHg), and HbAo. The curve of human RBC was cited from Vandegriff & Olson (J. Biol. Chem. 259: 12619,1984.).

Hbの酸素放出速度以外に、酸素結合解離平衡反応に基づいた血管収縮の理論もある。赤血球膜の透過性を上げる工夫により inositol hexaphosphateなどのアロステリック因子を内部に導入すると、赤血球内のHb酸素親和度が低下、酸素結合解離曲線が右側シフトする。結果として酸素飽和度のA-V較差を増大させ酸素放出量を増大させるとする理論である。この右側シフトさせた赤血球の投与試験では、血圧が一定のもと心拍出量が低下、酸素供給量の過剰のために血管収縮し末梢血管抵抗が増大した⁷⁷⁻⁷⁹⁾。この場合組織酸素供給は正常に保たれており、末梢血管抵抗の増大は血流の低下以外、何等不都合を意味している訳ではない。酸素放出が迅速な赤血球代替物を投与した時に過剰反応となれば問題である。

低酸素親和度Hb小胞体(P_{50} =53 mmHg)を用いて交換輸血を行い、hamster背部下皮微小循環の測定を行ったところ、直径50 μ m以下の細動脈が多少弛緩するにも拘わらず、血流は低下した。しかしながら、上流の直径150 μ mの動脈は著しく収縮した。この小動脈が下流の微小循環を制御していることが明らかである。酸素結合解離曲線をhamster血液と比較すると、この小動脈部分の通常の酸素分圧60 mmHgにおいて、Hb小胞体の曲線の傾きのほうが赤血球の場合よりも大きい。従ってこの部位でHb小胞体のほうが赤血球よりも酸素を多量に放出しやすいことになり、血管収縮を引き起こしたとも考えられる。一方で、高酸素親和度Hb小

胞体 ($P_{50}=16$ mmHg) は高い血流を維持する傾向を示した⁷²⁾。

これらの結果は、酸素運搬体を設計する上で重要な事を示している。赤血球は実は酸素放出、結合が極めて非効率になるような巨大粒子構造をしている。そして赤血球は微小循環系に到達するまでは酸素を放出しないように酸素結合解離曲線が調節されている。赤血球代替物の場合、右側シフトは必ずしも微小循環を維持して組織を十分に酸素化するわけではない。各々の赤血球代替物に各々の症例に対応した最適の酸素親和度が存在すると考えられる。赤血球のような巨大な粒子にしない限り酸素放出速度を赤血球と同等にすることは難かしいが、最近、合成ヘムの酸素結合部位にキャップを取り付けることで酸素放出を遅くすることが試されており、興味深い⁸⁰⁾。

5.3. 血管壁上の剪断応力と血管内皮弛緩因子

血液の流れそれ自体が血管弛緩を導く信号である⁸¹⁾。血液流速の増大につれ、血管径が大きくなることが多く報告されている⁸²⁾。この血流依存の血管弛緩は内皮依存性で、NO 或いは prostacyclin により誘導される^{83,84)}。血管内皮上での剪断応力が血管を弛緩させていることが報告された。剪断応力は簡単に $8 \cdot \eta \cdot V_m / D$ として表せる。ここで V_m は平均赤血球速度、 η は粘度、 D は血管径を示す。抵抗血管の部位で特に剪断応力が高く、EDRF 活性が高いことが Griffithらにより報告されている⁸⁵⁾。通常の代用血漿での血液希釈は血液粘度を低下させ、結果的に剪断応力が低下する。例えば50%血液希釈をすると粘度は約半分になるが、血流速度は2倍にはならない。剪断応力を維持するには、粘度を維持しなければならない。高分子量デキストランを併用して粘度を高めることにより、末梢循環が維持されたことが Intagliettaらによって確認された^{86,87)}。血液よりも粘度の低い非セル型の修飾Hb溶液は、低剪断応力のために血管収縮を引き起こす可能性がある⁸⁸⁾。粘度を血液と同等にするのであれば、高分子量Hb均一溶液系、或いはHb小胞体などの懸濁溶液系となる。しかし高分子量体は赤血球凝集を引き起こす可能性もあり、注意を要する。

5.4. 赤血球から放出されるATPが末梢血流を制御する

ヒト赤血球は、僅かながら adenosine 5'-triphosphate(ATP) を放出する。ATPは、末梢循環系の内皮表面のレセプターに結合すると、強力な血管弛緩剤であるNOと prostacyclin を放出する⁸⁹⁾。Ellsworthらは、赤血球のATPの産生量が低 P_{O_2} 及び低pHの条件で増大することを明らかとした⁹⁰⁾。この環境は、酸素輸送が不十分な部位、或いは通常の末梢部位に相当する。直径 $140 \pm 60 \mu\text{m}$ の抵抗血管に相当する小動脈内にATPを局所投与すると血管弛緩と下流への血流量の増大を認めている。私見では、ATPを静脈内投与した場合、著しい低血圧が認められたので、局所的な作用が必要と思われる。赤血球はATPを放出して自ら進む道を作っているかのようなのである。Hbを用いた赤血球代替物の殆どの場合、赤血球からHbを精製する段階で解糖系を含む全酵素系を除去している。従って血管弛緩剤であるATPの放出量は血液交換率が高くなるに連れて低下する。Hb精製の過程で取って酵素系を除去しないようにすれば⁹¹⁾、Met Hb還元酵素系が機能するだけでなく、同様に血管弛緩剤ATP放出を維持できる可能性がある。

Feolaらは、ATPで分子内架橋した後、o-adenosineで分子間結合

させた修飾Hbを開発した⁹²⁾。従来の glutaraldehyde や DBBF 架橋型と比較して投与後の炎症反応(過酸化水素、過酸化脂質、Anaphylatoxin, thromboxane 産生量)と腎毒性が軽減された⁹³⁾。ラット出血ショックモデル蘇生試験では、血圧上昇も認められず、返血した場合よりも組織酸素分圧が高い⁹⁴⁾。架橋剤のATP, adenosineが末梢で血管弛緩剤として働き、末梢循環を促進しているためと推論している。

5.5. 補体活性の影響

Anaphylatoxinは血液中に異物が侵入したり炎症反応が起こったときに補体が活性化されて産生される、薬理活性ペプチドである。第3補体が分解してC3aが産生されると、平滑筋が収縮したり、マスト細胞から histamine が放出されて毛細管透過性が亢進する。C3a または histamine を投与すると、両者とも細動脈を収縮させることが hamster で確かめられている⁹⁵⁾。別の anaphylatoxin : C5a は、血小板を活性化させて血管収縮作用がある thromboxane A_2 放出を促進する。

非セル型の修飾Hb溶液では、アナフィラキシー様反応が過去に多数報告されたが、これは赤血球膜成分や内毒素などが残存して精製が不十分のときに起こったものと現在では理解されている⁹⁶⁾。Fluosol-DA や、臨床治験中の癌治療用 liposome 製剤の投与後に、アナフィラキシー様反応による血小板数減少と thromboxane A_2 産生亢進が認められ^{97,98)}、Hb小胞体が補体活性を示すことも米国海軍研究所から報告された⁹⁹⁻¹⁰¹⁾。¹¹¹In ラジオラベルした血小板の動態は、Hb小胞体投与後に肺と肝臓に一過性に集簇し肺動脈圧と体動脈圧の上昇の原因となったあと、血中に戻る¹⁰²⁾。末梢血管抵抗が増大したことから、血管収縮の可能性がある。補体活性を抑制するには、高純度物質を用いること、抗炎症剤の prednisolone, indomethacin, 或いは補体受容体を投与することが方法として挙げられる¹⁰³⁾。膜成分のリン脂質親水部に抗リン脂質抗体が結合することが補体活性の原因であることも米国海軍研究所から報告されているので¹⁰⁴⁾、Hb小胞体表面を polyoxyethylene(POE) で覆うのも、血漿蛋白との相互作用を低下させて補体活性を低減させる有効な方法と考えられる。POEがHb小胞体分散液のレオロジー特性に寄与していることは早稲田グループとテルモ社によって示されている。テルモ社のネオレッドセルをヒト血漿と混合したときの anaphylatoxin 測定から、補体活性が無いことが報告されている¹⁰⁵⁾。しかし補体活性は動物種によって異なること、個人差があることなどもあり、多角的に検討する必要がある。補体活性を呈しやすいラットでPOEにより補体活性低減がみられたことについては、先般の第7回国際血液代替物学会において米国海軍研究所グループ(Dr. Phillip)から報告があった。

5.6. 活性酸素種と血管活性

血管内皮細胞は xanthine dehydrogenase/oxidase を有し、活性酸素種を放出するが¹⁰⁶⁾、内皮細胞内の superoxide dismutase や catalase 等によって失活される。細胞内の活性酸素種濃度が低いときには cyclooxygenase が活性化され、それにより生じた superoxide (O_2^-) が内皮からの prostacyclin 産生に関与し、血管弛緩を誘発することが幾つかの組織で確認されている。しかし、活性酸素種の濃度が高

すぎるとNOが失活, またアラキドン酸カスケードが抑制されて prostacyclin産生量が低下する. 更にはこれらの酵素系を破壊することがあるが, thromboxane A₂ synthetase のみ耐性を示し, 全体的に血管収縮の方向に傾く^{107,108}. 同時に活性酸素種は過酸化物を生じ, これも酵素系に悪影響を与える. 通常, prostaglandin(弛緩剤)とthromboxane A₂(収縮剤)の産生量の間に, またNOと活性酸素種の産生量の間に平衡関係が成り立っており, 末梢の血液循環を制御している.

Hb利用赤血球代替物の共通の課題として, 血流中での比較的速度いメト化の問題が挙げられる. OxyHbは生理条件下徐々にメト化する. 酸素親和度が低い(P₅₀が大きい)ほどメト化が速くなるというジレンマがある. この際ヘム中心鉄から電子が一つ酸素に移動し, superoxide(O₂⁻)を生起する. これが更に不均化反応或いは superoxide dismutaseによって過酸化水素(H₂O₂)を生起する. Hbのサブユニット4個の一部が酸素化しているとき, つまり末梢や静脈を循環中にMetHb生成が促進される^{109,110}. MetHbが更に変性するとヘムや鉄イオンを遊離するが, これらがFenton反応によるH₂O₂からのhydroxy radical(OH[•])発生を促進する¹¹¹. 活性酸素種は不飽和脂質過酸化などの細胞毒性も誘発する. またoxyHbが直接H₂O₂と反応し, 更に毒性の高いフェリルHbを生成する¹¹². 修飾Hb投与後に過酸化脂質が著しく増大したことが報告されている¹¹³. 虚血再灌流障害では, O₂⁻とNOが反応してperoxy-nitrite(ONOO⁻)を産生, プロトン化で容易にOH[•]を生じ, 極めて強い細胞毒性を示す¹¹⁴.

培養血管内皮細胞にHbAoやααXLHbを添加すると, ストレス蛋白のhemeoxygenaseの活性増加¹¹⁵, 内皮細胞内のヘム濃度と乳酸脱水素酵素が増大し, 細胞に損傷が加えられていることが示された¹¹⁶. 鉄イオン捕捉剤deferoxamineの添加で低減されることから, Hbのメト化とヘムの分解による活性酸素の生成が原因とされている. また, Hbをラットに投与した後, 肺のhemeoxygenaseとferritinが増加することから, hemeが内皮細胞に取り込まれていることが示唆された¹¹⁷. Hbをカプセル化したHb小胞体ではHbと内皮細胞の直接的な接触を防ぐため, 細胞毒性が軽減されることが期待される. 更にメト化の進行を抑制させれば, 酸素運搬能の延長化だけでなく, 細胞毒性や血管収縮性を示す活性酸素種産生量を低下させることができる.

赤血球内にはcytochrome b₅, NADPH-flavinなどの還元酵素系, glutathioneとascorbic acidによる直接還元系, 及びsuperoxide dismutaseやcatalaseなどの活性酸素失活系が存在する. これら赤血球内に本来存在する酵素系をそのまま用いることはメト化とO₂産生の抑制する為の一つの方法である¹¹⁸. しかしHb精製過程(加熱滅菌など)でこれらの酵素は変性除去される. 非セル型Hbは血流中で, 赤血球膜中の還元酵素や赤血球から滲出するascorbic acid等の還元剤と直接反応してある程度酸化が抑制されるが¹¹⁹, 投与量が多い場合は限界があると思われる. 更に向上させるためにcatalaseやsuperoxide dismutaseを直接Hbと共有結合させて活性酸素種生成量を低減させることができる¹²⁰. セル型のHb小胞体の場合は, 所定量の還元剤や酵素を封入してメト化を抑制できる^{110,121}. これらの方法は, 代替物自体からの活性酸素種生成の抑制, さらには虚血再灌流障害の時に生成する活性酸素の消去にも有効に作用すると考えられる.

6. 終わりに

血液に最も多く含まれる蛋白質であるHbはX線構造解析された最初の蛋白質であり, またアロステリック効果も早くから明らかにされたように, 最も詳細に研究されてきた蛋白質の一つである. そして今, 赤血球代替物の研究が盛んな中, Hbの生理作用も恐らく他の蛋白質よりも極めて明瞭になったと思われる. Hbを利用した赤血球代替物の構想が生まれた時には, この生理作用の多くは未だ明らかにされていなかった. 本物の血液とそっくりなものを造る必要は無いが, 満足できる機能を有する赤血球代替物が誕生するには, 血液の機能と微小循環により維持される生体のホメオスタシスを十分に理解した上で, 分子設計することが必要である.

謝辞

本研究推進にあたり, 実験協力と積極的な御討論を頂いたDr. S. Takeoka, Dr. H. Hara, Dr. A. G. Tsai(UCSD), Dr. M. Suematsu(慶大医)の各位に感謝する. 本研究の一部は, 厚生科学研究費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.

参考文献

1. Fagrell B, Intaglietta M. Microcirculation: its significance in clinical and molecular medicine. *J Intern Med* 1997;241:349-62.
2. Riva C, Ross B, Benedek GB. Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. *Invest Ophthalmol* 1972;11:936-44.
3. Brulisauer M, Bollinger A. Measurement of different human microvascular dimensions by combination of videomicroscopy with Na-fluorescein (NaF) and indocyanine green (ICG) in normals and patients with systemic sclerosis. *Int J Microcirc Clin Exp* 1991;10:21-31.
4. Slaaf DW, Reneman RS, Wiederhielm CA. Pressure regulation in muscle of unanesthetized bats. *Microvasc Res* 1987;33:315-26.
5. Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA. A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 1979; 18:311-8.
6. Endrich B, Asaishi K, Götz A, Messmer K. Technical report - A new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med* 1980;177:125-34.
7. Intaglietta M, Johnson PC, Winslow RM. Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res* 1996;32:632-43.
8. Page TC, Light WR, McKay CB, Hellums JD. Oxygen transport by erythrocyte/hemoglobin solution mixtures in an in vitro capillary as a model of hemoglobin-based oxygen carrier performance. *Microvasc Res* 1998;55:54-64.
9. Intaglietta M. Whitaker Lecture 1996: microcirculation, biomedical engineering, and artificial blood. *Ann Biomed Eng* 1997;25:593-603.
10. Intaglietta M, Tompkins WR. Microvascular measurements by video image shearing and splitting. *Microvasc Res* 1973;5:309-12.
11. Intaglietta M, Silverman NR, Tompkins WR. Capillary flow

- velocity measurements in vivo and in situ by television methods. *Microvasc Res* 1975;10:165-79.
12. Torres Filho IP, Intaglietta M. Microvascular P_{O_2} measurements by phosphorescence decay method. *Am J Physiol* 1993;265 (Heart Circ Physiol 34):H1434-8.
 13. Kerger H, Torres Filho IP, Rivas M, Winslow RM, Intaglietta M. Systemic and subcutaneous microvascular oxygen tension in conscious Syrian golden hamsters. *Am J Physiol* 1995;2671 (Heart Circ Physiol 37):H802-10.
 14. Torres Filho IP, Leuning M, Yuan F, Intaglietta M, and Jain RK. Noninvasive measurement of microvascular and interstitial oxygen profiles in a human tumor in SCID mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:2081-5
 15. Tsai AG, Kerger H, and Intaglietta M. Microcirculatory consequences of blood substitution with $\alpha\alpha$ -hemoglobin. In: *Blood substitutes, Physiological basis of efficacy.* (Ed. by Winslow RM, Vandegriff K, and Intaglietta M.) pp.155-74, Birkhäuser, Boston, 1995.
 16. Tsai AG, Friensenecker B, Sakai H, Kerger H, Intaglietta M. The mechanism of tissue oxygenation and the design of oxygen carrying plasma expanders. In: *Advances in blood substitutes: industrial opportunities and medical challenges.* (Ed. by Winslow RM, Vandegriff K, and Intaglietta M.) pp.189-206, Birkhäuser, Boston, 1995.
 17. Nolte D, Botzlar A, Hecht R, Csapo C, Menger MD, Messmer K. Diaspirin crosslinked hemoglobin: elevation of effects on the microcirculation of striated muscle. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 1994;22:587-92.
 18. Nolte D, Botzlar A, Pickelman S, Bouskela E, Messmer K. Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb™) on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster: a study on safety and toxicity. *J Lab Clin Med* 1997;130:314-27.
 19. Nolte D, Steinhäuser P, Pickelman S, Berger S, Härtl R, Messmer K. Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb™) on tissue oxygen tension in striated skin muscle: An efficacy study in the hamster. *J Lab Clin Med* 1997;130:328-38.
 20. Vlahakes GJ, Lee R, Jacobs Jr. EE, LaRaia PJ, Austen WG. Hemodynamic effects and oxygen transport properties of a new blood substitute in a model of massive blood replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990;100:379-88.
 21. Lee R, Neya K, Svizzero A, Vlahakes GJ. Limitations of the efficacy of hemoglobin-based oxygen carrying solutions. *J Appl Physiol* 1995;79:236-42.
 22. Standl TG, Reeker W, Redmann G, Kochs E, Werner C, Shulte am Esch J. Haemodynamic changes and skeletal muscle oxygen tension during complete blood exchange with ultrapurified polymerized bovine haemoglobin. *Intensive Care Med* 1997;23: 865-72.
 23. Waschke K, Schrock H, Albrecht DM, Van Ackern K, Kuschinsky W. Local cerebral blood flow and glucose utilization after blood exchange with a hemoglobin-based O_2 carrier in conscious rats. *Am J Physiol* 1993;265 (Heart Circ Physiol 34): H1243-8.
 24. Waschke KF, Albrecht DM, Van Ackern K, Kuschinsky W. Autoradiographic determination of regional cerebral blood flow and metabolism in conscious rats after fluid resuscitation from haemorrhage with a haemoglobin-based oxygen carrier. *Brit J Anaesth.* 1994;73:522-8.
 25. Willinger CC, Schramek H, Pfaller K, Joannidis M, Deetjen P, Pfaller W. Ultrapure polymerized bovine hemoglobin improves structural and functional integrity of the isolated perfused rat kidney. *Renal Physiol. Biochem* 1995;18:288-305.
 26. Chu D, Oglivly CS. Isovolemic hemodilution with purified and polymerized bovine hemoglobin in a rabbit model of focal cerebral ischemia. *Chinese J Physiol* 1997;40:63-9.
 27. Kasper SM, Walter M, Grune F, Bischoff A, Erasmi H, Buzello W. Effects of a hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC-201) on hemodynamics and oxygen transport in patients undergoing preoperative hemodilution for elective abdominal aortic surgery. *Anesth Analg* 1996;83:921-7.
 28. Maxson AD, Gigler U, Sweeney CR, Tomasic M, Saik JE, Donawick WJ, Cothran EG. Use of a bovine hemoglobin preparation in the treatment of cyclic ovarian hemorrhage in a miniature horse. *J Am Vet Med Assoc* 1993;203:1308-11.
 29. Biopure homepage. <http://www.oxyglobin.com>.
 30. Nishi K, Kida Y. Effects of hemoglobin-based oxygen-carrying artificial blood substitutes on the circulatory system. *Artif Blood* 1994;2:82-93.
 31. Sprung J, Mackenzie CF, Barnas GM, Williams JE, Parr M, Christenson RH, Hoff BH, Sakamoto R, Kramer A, Lottes M. Oxygen transport and cardiovascular effects of resuscitation from severe hemorrhagic shock using hemoglobin solutions. *Crit Care Med* 1995;23:1540-53.
 32. Alonzoana GLG, Elfath MD, Mackenzie C, Gregory LC, Duh SH, Trump B, Christenson RH. In vitro interference of the red cell substitute pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene with blood compatibility, coagulation, and clinical chemistry testing. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997;11:845-50.
 33. Sakai H, Tsai AG, Kerger H, Park SI, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E, and Intaglietta M. Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with a red cell substitute consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J Biomed Mater Res* 1998;40:66-78.
 34. Suematsu M, Kashiwagi S, Sano T, Goda N, Shinoda Y, Ishimura Y. Carbonmonoxide as an endogenous modulator of hepatic vascular perfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205: 1333-7.
 35. Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T. Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 1998;101:604-12.
 36. Whitmore RL. *Rheology of the circulation.* Pergamon Press,

Oxford, 1968.

37. Davis MJ, Ferrer PN, Gore RW. Vascular anatomy and hydrostatic pressure profile in the hamster cheek pouch. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* 1986;250:H291-303.
38. Meininger, G.A., Fehr, K.L., and M.B. Yates. Anatomic and hemodynamic characteristics of the blood vessels feeding the cremaster skeletal muscle in the rat. *Microvasc Res* 1987;33: 81-97.
39. Ohyanagi M, Nishigaki K, Faber JE. Interaction between microvascular α_1 - and α_2 -adrenoreceptors and endothelium-derived relaxing factor. *Circ Res* 1992;71:188-200.
40. Fenger-Gron J, Mulvany MJ, Christensen KL. Intestinal blood flow is controlled by both feed arteries and microcirculatory resistance vessels in freely moving rats. *J Physiol Lond* 1997;498: 215-24.
41. Faber JE. In situ analysis of α -adrenoreceptors on arteriolar and venular smooth muscle in rat skeletal muscle microcirculation. *Circ Res* 1988;62:37-50.
42. Hirata S, Ninomiya I. Nonuniform effects of sympathetic nerve and alpha-receptor blockade on internal diameter of small arteries in the rabbit ear. *Clin Hemorheol* 1982;2:229-41.
43. Leech CJ, Faber JE. Differential sensitivity of venular and arteriolar alpha-adrenergic receptor constriction to inhibition by hypoxia: role of receptor subtype and coupling heterogeneity. *Circ Res* 1996;78:1064-74.
44. Griffith TM, Edwards DH, Davies RL, Henderson AH. The role of EDRF in flow distribution: a microangiographic study of the rabbit isolated ear. *Microvasc Res* 1989;37:162-77.
45. Kerger H, Tsai AG, Saltzman DJ, Winslow RM, Intaglietta M. Fluid resuscitation with O₂ vs. non-O₂ carriers after 2 h of hemorrhagic shock in conscious hamsters. *Am J Physiol* 1997; (Heart Circ Physiol 41): H525-37.
46. Sakai H, Hara H, Tsai AG, Tsuchida E, Johnson PC, Intaglietta M. Changes in resistance and capacitance vessels during hemorrhagic shock and resuscitation in conscious hamster model. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)* in press.
47. Schultz SC, Grady, B, Cole F, Hamilton I, Burhop K, Malcolm DS. A role for endothelin and nitric oxide in the pressor response to diaspirin cross-linked hemoglobin. *J Lab Clin Med* 1993;122: 301-308.
48. Keipert PE, Gonzales A, Gomez GL, Macdonald VW, Hess JR, Winslow RM. Acute changes in systemic blood pressure and urine output of conscious rats following exchange transfusion with diaspirin-crosslinked hemoglobin solution. *Transfusion* 1993;33:701-8.
49. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs HA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991;43: 109-42.
50. Sakai H, Tsuchida E. Physiological roles of messenger molecules (NO, CO). *Chemistry* 1996;51:62-3.
51. Olsen SB, Tang DB, Jackson MR, Gomez ER, Alaya B, Alving BM. Enhancement of platelet deposition by cross-linked hemoglobin in a rat carotid endarterectomy model. *Circulation* 1996;93:327-32.
52. Murray JA, Ledlow A, Launspach J, Evans D, Loveday M, Conklin JL. The effect of recombinant human hemoglobin on esophageal motor function in humans. *Gastroenterology* 1995; 109:1241-8.
53. Chakder S, Rosenthal GJ, Rattan S. In vivo and in vitro influence of human recombinant hemoglobin on esophageal function. *Am J Physiol* 1995;268(Gastrointest Liver Physiol 31): G443-50.
54. Conklin JL, Murray J, Ledlow A, Clark E, Hayek B, Picken H, Rosenthal G. Effects of recombinant human hemoglobin on motor functions of the opossum esophagus. *J Pharmacol Exp Therap* 1995;273:762-7.
55. Bone HG, Schenarts PJ, Booke M, McGuire R, Harper D, Traber LD, Traber DL. Oxalated pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate normalizes the hyperdynamic circulation in septic shock. *Crit Care Med* 1997;25:1010-8.
56. Rhea G, Bodenham A, Mallick A, Przybelski R, Daily E. Vasopressor effects of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in critically ill patients. *Crit Care Med* 1996;24:A39.
57. Poli de Figueiredo LF, Mathru M, Solanki D, Macdonald VW, Hess J, Kramer GC. Pulmonary hypertension and systemic vasoconstriction may offset the benefits of acellular hemoglobin blood substitutes. *J Trauma* 1997;42:847-56.
58. Swan SK, Halstenson CE, Collins AJ, Colburn WA, Blue J, Przybelski RJ. Pharmacological profile of diaspirin cross-linked hemoglobin in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1995;26: 918-23.
59. 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 Cardiovasc Pharmacol* 1996;28:115-23.
60. Rudolph AS, Sulpizio A, Hieble P, MacDonald V, Chavez M, Feuerstein G. Liposome encapsulation attenuates hemoglobin-induced vasoconstriction in rabbit arterial segments. *J Appl Physiol* 1997;82:1826-35.
61. Gulia A, Rebello S. Role of adrenergic mechanisms in the pressor effect of diaspirin cross-linked hemoglobin. *J Lab Clin Med* 1994; 124:125-33.
62. Sharma AC, Gulati A. Yohimbine modulates diaspirin crosslinked hemoglobin-induced systemic hemodynamics and regional circulatory effects. *Crit Care Med* 1995;23:874-84.
63. Gulia A, Sen AP, Sharma AC, Singh G. Role of ET and NO in resuscitative effect of diaspirin cross-linked hemoglobin after hemorrhage in rat. *Am J Physiol* 1997;273(Heart Circ Physiol 42):H827-36.
64. Ohyanagi M, Nishigaki K, Faber JE. Interaction between microvascular α_1 - and α_2 -adrenoreceptors and endothelium

- derived relaxing factor. *Circ Res* 1992;71:188-200.
65. Moisan S, Harvey N, Beaudry G, Pascale F, Burhop KE, Drapeau G, Rioux F. Structural requirements and mechanism of the pressor activity of Leu-Val-Val-hemorphin-7, a fragment of hemoglobin β -chain in rats. *Peptides* 1998;19:119-31.
 66. Pries AA, Heide J, Ley K, Klotz K-F, Gaehtgens P. Effect of oxygen tension on regulation of arteriolar diameter in skeletal muscle in situ. *Microvasc Res* 1995;49:289-99.
 67. Lindbom L, Tuma RF, Arfors KE. Influence of oxygen on perfused capillary density and capillary red cell velocity in rabbit skeletal muscle. *Microvasc Res* 1980;19:197-208.
 68. Messina EJ, Sun D, Koller A, Wolin MS, Kaley G. Increases in oxygen tension evoke arteriolar constriction by inhibiting endothelial prostaglandin synthesis. *Microvasc Res* 1994;48:151-60.
 69. Jackson WF, Duling BR. The oxygen sensitivity of hamster cheek pouch arterioles. *Circ Res* 1983;53:515-25.
 70. Detar R, Bohr DF. Oxygen and vascular smooth muscle contraction. *Am J Physiol* 1968;214: 241-4.
 71. Harder DR, Narayanan J, Birks EK, Francois Liard J, Imig JD, Lombard JH, Lange AR, Roman RJ. Identification of a putative microvascular oxygen sensor. *Circ Res* 1996;79:54-61.
 72. Sakai H, Hara H, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Microvascular responses to hemodilution with Hb-vesicles as red cell substitutes: Influence of oxygen affinity. *Am J Physiol* (submitted).
 73. Vandegriff KD, Olson JS. Morphological and physiological factors affecting oxygen uptake and release by red blood cell. *J Biol Chem* 1984;259:12619-27.
 74. Vandegriff KD, Winslow RM. A theoretical analysis of oxygen transport: A new strategy for the design of hemoglobin-based red cell substitutes. in *Blood Substitutes: New Challenges*, Winslow RM, Vandegriff KD, Intaglietta M (eds.), Birkhäuser, Boston, 1996, pp. 124-31.
 75. Biro GP, Anderson PJ, Curtis SE, Cain SM. Stroma-free hemoglobin: its presence in plasma does not improve oxygen supply to the resting hindlimb vascular bed of hemodiluted dogs. *Can J Physiol Pharmacol* 1991;69:1656-62.
 76. Johnson PC, Richmond K, Shonat RD, Toth A, Pal M, Tischler ME, Lynch RM. Oxygen delivery regulation: implications for blood substitutes. in *Blood Substitutes: Physiological Basis of Efficacy*, Winslow RM, Vandegriff KD, Intaglietta M (eds.), Birkhäuser, Boston, 1995, pp. 175-86.
 77. Liard JF, Kunert MP. Hemodynamic changes induced by low blood oxygen affinity in dogs. *Am J Physiol* 1993;264 (Regulatory Integrative Comp Physio. 33):R396-401.
 78. Kunert MP, Liard JF, Abraham DJ. RSR-13, an allosteric effector of hemoglobin, increases systemic and iliac vascular resistance in rats. *Am J Physiol* 1996;271(Heart Circ Physiol 40):H602-13.
 79. Kunert MP, Liard JF, Abraham DJ, Lombard JH. Low-affinity hemoglobin increases tissue PO_2 and decreases arteriolar diameter and flow in the rat cremaster muscle. *Microvasc Res* 1996;52:58-68.
 80. Collman JP, Herrmann PC, Fu L, Eberspancher TA, Eubanks M, Boitrel B, Hayoz P, Zhang X, Brauman JI, Day VW. Aza-crown-capped porphyrin models of myoglobin: studies of the steric interactions of gas binding. *J Am Chem Soc* 1997;119:3481-9.
 81. Kamiya A, Togawa T. Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in canine carotid artery. *Am J Physiol* 1980;239 (Heart Circ Physiol 28):H14-21.
 82. Pohl U, Herlan K, Huang A, Bassenge E. EDRF-mediated, shear-induced dilation opposes myogenic vasoconstriction in small rabbit arteries. *Am J Physiol* 1991;261(Heart Circ Physiol 28): H2016-23
 83. Frangos JA, Eskin SG, McIntire LV, Ives CL. Flow effects on prostacyclin production in cultures human endothelial cells. *Science* 1985;227:1477-9.
 84. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow induced release of endothelium derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250 (Heart Circ Physiol):1145-9.
 85. Griffith TM, Edwards DH, Davies RL, Henderson AH. The role of EDRF in flow distribution: a micrographic study of the rabbit isolated ear. *Microvasc Res* 1989;37:162-77.
 86. Wit C, Schäfer C, Bismarck P, Bolz SS, Pohl U. Elevation of plasma viscosity induces sustained NO-mediated dilation in the hamster cremaster microcirculation in vivo. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 1997;434:354-61.
 87. Tsai AG, Friesenecker B, McCarthy M, Sakai H, Intaglietta M. Increased viscosity during extreme isovolemic hemodilution lowers vascular resistance. *Ann Biomed Eng* 1997;25:S-14.
 88. Tsai AG, Friesenecker B, Sakai H, Kerger H, Intaglietta M. Biophysical criteria for microcirculatory efficacy of blood substitutes. in *Present and future perspectives of blood substitutes*, Ed. by E. Tsuchida, Elsevier, 1998 (in press).
 89. Corr L, Burnstock G. Analysis of P_2 -purinoceptor subtypes on the smooth muscle and endothelium of rabbit coronary artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;23:709-15.
 90. Ellsworth ML, Forrester T, Ellis CG, Dietrich HH. The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *Am J Physiol* 1995; 269(Heart Circ Physiol 38): H2155-61.
 91. Ogata Y, Okamoto T, Suzuki K, Kamitani T. The development of neo red cells (NRC) with enzymatic reduction system of the methemoglobin. *Artif Blood* 1994;2:62-6.
 92. Simoni J, Feola M, Tran R, Buckner M, Canizaro PC. Biocompatibility of hemoglobin solutions. II. The inflammatory reaction of human monocytes and mouse peritoneal macrophages. *Artif Organs* 1990;14:98-109.
 93. Feola M, Simoni J, Tran R, Canizaro PC. Nephrotoxicity of hemoglobin solutions. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1990; 18:233-49.
 94. Simoni J, Simoni G, Newman G, Feola M. An improved blood substitute: in vivo evaluation of its hemodynamic effects. *ASAIO*

- J 1996;42:M773-82.
95. Mahler F, Intaglietta M, Hugli TE, Johnson AE. Influences of C3a anaphylatoxin compared to other vasoactive agents on the microcirculation of rabbit omentum. *Microvasc Res* 1975; 9:345-56.
 96. Kaca W, Roth R. Activation of complement by human hemoglobin and by mixtures of hemoglobin and endotoxin. *Biochim Biophys Acta* 1995;1245:49-56.
 97. Watanabe M, Ohyanagi H, Saitoh Y. Experimental study on anaphylactic effects by Fluosol-DA. *Jpn J Artif Organs* 1988;17: 1513-22.
 98. Laing RBS, Milne LJR, Leen CLS, Malcom GP, Steers AJW. Anaphylactic reactions to liposomal amphotericin. *Lancet* 1994; 344:682.
 99. Abudullah F, Whiteford M, Ovidia P, Neville LF, Rudolph AS, Grillo S, Rabinovici R. Effect of liposome encapsulated hemoglobin on serum triglyceride, total cholesterol, LDL and HDL cholesterol measurements. *Lipids* 1997;32:377-82.
 100. Szebeni J, Wassef NM, Spielberg H, Rudolph AS, Alving CR. Complement activation in rats by liposomes and liposome-encapsulated hemoglobin: evidence for anti-lipid antibodies and alternative pathway activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;205:255-63.
 101. Rabinovici R, Rudolph AS, Vernick J, Feuerstein G. Lyophilized liposome encapsulated hemoglobin: evaluation of hemodynamic, biochemical, and hematologic responses. *Crit Care Med* 1994; 222:480-85.
 102. Phillips WT, Klipper R, Frense D, Rudolph AS, Javors M, Goins B. Platelet reactivity with liposome-encapsulated hemoglobin in the rat. *Exp Hematol* 1997;25:1347-56.
 103. Szebeni J, Wassef NM, Hartman KR, Rudolph AS, Alving CR. Complement activation in vitro by the red cell substitute, liposome-encapsulated hemoglobin: mechanism of activation and inhibition by soluble complement receptor type1. *Transfusion* 1997;37:150-9.
 104. Szebeni J, Wassef NM, Rudolph AS, Alving CR. Complement activation in human serum by liposome-encapsulated hemoglobin: the role of natural anti-phospholipid antibodies. *Biochim Biophys Acta* 1996;1285:127-30.
 105. Sakaguchi K, Miyauchi Y, Suzuki K, Takahashi A. Effects of the neo red cell on the blood coagulation system and the complement system. *Jpn J Artif Organs* 1991;20:620-5.
 106. Davies MG, Hagen PO. The vascular endothelium. A new horizon. *Ann Surg* 1993;218:593-609.
 107. Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250(Heart Circ Physiol 19):H822-7.
 108. Katusic ZS, Vanhoutte PM. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol* 1989;257 (Heart Circ Physiol 26):H33-7.
 109. Lavy A, Zhang L, Rifkind JM. Hemoglobin: a source of superoxide radical under hypoxic conditions. *Oxy-radicals Mol Biol Pathol Proc Upjohn-UCLA Symp* 1988:11-25.
 110. Takeoka S, Sakai H, Kose T, Mano Y, Seino Y, Nishide H, Tsuchida E. Methemoglobin formation in hemoglobin vesicles and reduction by encapsulated thiols. *Bioconjugate Chem* 1997;8: 539-44.
 111. Puppo A, Halliwell B. Formation of hydroxyl radicals in biological systems: does myoglobin stimulate hydroxyl radical formation? *Free Radic Res Commun* 1988;4:415-22.
 112. Alayash A, Fratantoni JC, Bonaventura C, Bonaventura J, Buccì E. Consequences of chemical modification on the free radical reactions of human hemoglobins. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298:114-20.
 113. Biro GP, Ou C, Ryan-McFarlane C. Oxyradical generation after resuscitation of hemorrhagic shock with blood or stroma-free hemoglobin solution. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 1995;23:631-45.
 114. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991;266:4244-50.
 115. Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K, Eaton JW, Vercellotti GM. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:9285-9.
 116. Motterlini R, Foresti R, Vandegriff K, Intaglietta M, Winslow RM. Oxidative-stress in vascular endothelial cells exposed to acellular hemoglobin solutions. *Am J Physiol* 1995;269(Heart Circ Physiol 38):H648-55.
 117. Balla J, Nath KA, Balla G, Juckett MB, Jacob HS, Vercellotti GM. Endothelial cell heme oxygenase and ferritin induction in rat lung by hemoglobin in vivo. *Am J Physiol* 1995;268(Lung Cell Mol Physiol 12):L321-7.
 118. Ogata Y, Okamoto T, Suzuki K, Kamitani, T. The development of the Neo Red Cells(NRC) with enzymatic reduction system of the methemoglobin. *Artif Blood* 1994;2:62-6.
 119. McGown EL, Lyons MF, Marini MA, and Zegna A. Reduction of extracellular methemoglobin by erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1990;1036:202-6.
 120. D'Angillo F, Chang TMS. Reduction of hydroxyl radical generation in a rat hindlimb model of ischemia-reperfusion injury using crosslinked hemoglobin-superoxide dismutase-catalase. *Artif Cells Blood Substitute Immobilization Biotechnol* 1997;25: 163-80.
 121. Sakai H, Takeoka S, Seino Y, Tsuchida E. Suppression of methemoglobin formation by glutathione in a concentrated hemoglobin solution and in a hemoglobin vesicle. *Bull Chem Soc Jpn* 1994;67:1120-5.

トロンボポエチン開発の現状と臨床応用の可能性 Current Status of the Development of Thrombopoietin and Its Therapeutic Potential

宮崎 洋
Hiroshi Miyazaki

1. はじめに

近年の遺伝子工学の発達に伴って、造血幹細胞から血液細胞への分化過程を調節するさまざまなサイトカイン(造血因子)が相次いでクローニングされ、造血機構に関する理解が急速に進みつつある。そのような造血因子の中で、いわゆる血球3系統のうちの赤血球系を制御するエリスロポエチン(EPO)と顆粒球系を制御する顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)は1980年代にクローニングされ、それぞれ貧血改善薬および好中球減少改善薬として既に臨床応用されている。もう1つの血小板系を特異的に制御するトロンボポエチン(TPO)については、1950年代後半に存在が推定されたにもかかわらず、長い間その実体は不明であったが、1994年になって、我々と米国の3つの研究グループがそれぞれ独自のアプローチによってクローニングに成功した^{1,4)}。クローニング後の活発な研究によって、TPOの生理作用、分子構造、産生調節機構、あるいはシグナル伝達機構などに関する基本的な知見が続々と得られている。さらに、血小板減少動物モデルにおいて、TPOが著明な血小板回復促進作用を示すことから、遺伝子組換え型因子を用いた臨床試験も開始されている。化学療法や骨髄移植後の血小板造血回復を促進させる治療薬として臨床応用可能となれば、血

小板輸血の代替治療として登場するであろうし、また血小板輸血に伴う、必ずしもゼロではない輸血副作用を回避できるようになる点で果たす役割は大きい。

2. TPO発見の経緯(Table 1)

我々は、ラット骨髄から純化した巨核球系前駆細胞を用いた *in vitro* アッセイ系⁵⁾での活性を指標として、放射線照射により血小板減少状態にしたラット約1,100匹分の血漿約7Lから11ステップのクロマトグラフィーを用いて約1.7 μgのラットTPO高純度精製標品を取得し、その部分アミノ酸配列を決定した⁴⁾。続いて、そのアミノ酸配列情報を利用して、TPO産生ラット肝細胞株⁶⁾のcDNAライブラリーからラットTPOcDNAをクローニングし⁷⁾、次にその塩基配列とのホモロジーに基づいてヒト成人肝臓cDNAライブラリーからヒトTPOcDNA⁴⁾、さらにヒト染色体DNAライブラリーからヒトTPO遺伝子をクローニングした⁸⁾。また、MITのグループは、ブスルファン投与で血小板を減少させたヒツジの血漿からMegapoietin(=TPO)を精製したが、遺伝子クローニングには至らなかった⁹⁾。

Table 1 TPO発見の経緯

研究グループ	精製材料	方法	精製されたTPOの分子量 (SDSポリアクリルアミド電気泳動法)	バイオアッセイ	文献
キリンビール	放射線照射 ラット血漿	精製(11ステップ)/内部アミノ酸配列 →ラットTPO産生臓器検索 →ラットcDNAクローニング →ヒトcDNAクローニング	19 kDa	ラット巨核球系前駆細胞 から増殖、分化した巨核球 によるセロトニンの取り込み	4), 6)-8)
MIT	Busulfan投与 ヒツジ血漿	精製(11ステップ)/内部アミノ酸配列 (遺伝子クローニング未達)	31.2 kDa	ラット巨核球のPloidy測定	9)
Genentech Mayo Clinic	放射線照射 ブタ血漿	c-Mpl-IgGアフィニティ精製/N末端 アミノ酸配列 →ブタ・ヒト染色体遺伝子 クローニング →ヒトcDNAクローニング	28-32 kDa, 18-20 kDa	Mpl発現Ba/F3細胞の増殖	1)
AMGEN	放射線照射 イヌ血漿	c-Mplアフィニティ精製/N末端 アミノ酸配列 →イヌcDNAクローニング →ヒトcDNAクローニング	25 kDa, 31 kDa	Mpl発現32D細胞の増殖	3)
ZymoGenetics Univ. of Washington		自己増殖性Mpl発現Ba/F3細胞のスクリーニング →マウスcDNA/発現クローニング →ヒトcDNAクローニング		Mpl発現Ba/F3細胞の増殖	2)

キリンビール株式会社医薬探索研究所・薬品評価グループ、〒370-1295 高崎市宮原町 3. Pharmaceutical Research Laboratory, Kirin Brewery Co Ltd, 3 Miyahara-cho, Takasaki-shi, 370-1295, Japan. 論文受付1998年6月8日。

一方, Genentech¹⁾, ZymogeneticsとUniversity of Washington²⁾, およびAmgen³⁾の3グループはいずれも, TPOのクローニング以前から知られていたレセプター蛋白質, c-Mplに対するリガンドとしてTPOをクローニングした。

3. TPOの構造

Fig.1にヒトTPOの模式図を示す⁴⁾。ヒトTPOは332アミノ酸残基

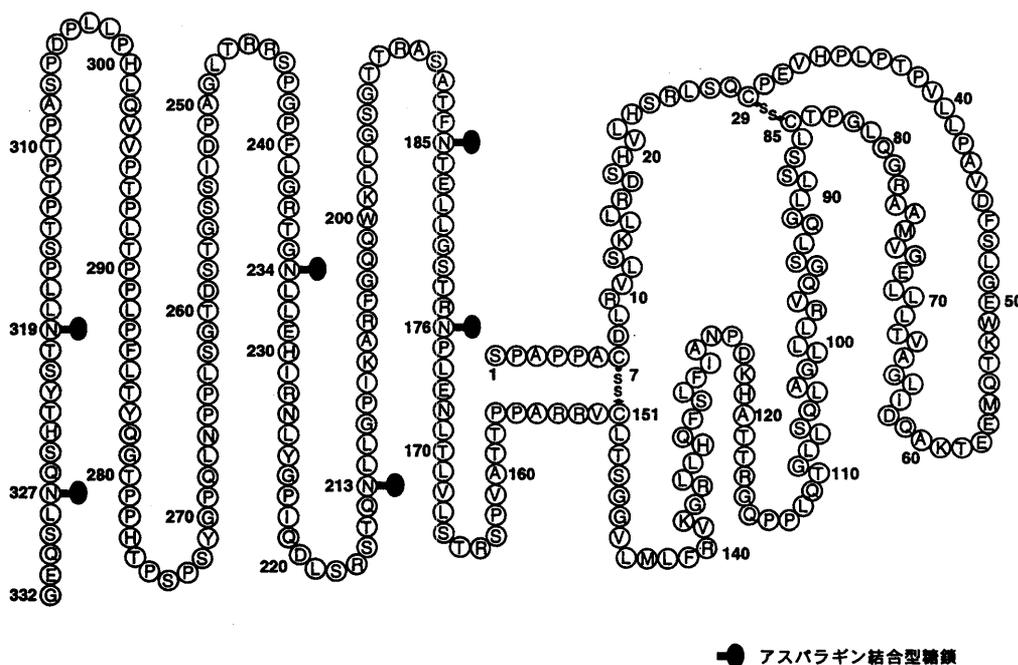


Fig.1 ヒトTPOの構造

からなり, そのN末端側半分を占める領域(N末端側領域)ではアミノ酸配列が種を越えて比較的良く保存されており, EPOと最も高いホモロジーを示す。N末端側領域だけに4つのシステイン残基が存在し, それらが2組のジスルフィド結合を形成している。TPOの活性発現に必須の領域はN末端側領域に存在し, C末端側領域が欠失しても活性は保たれる。

一方, C末端側領域は, N末端側領域に比べて種間でのアミノ酸配列のホモロジーは低く, しかも他に類似する蛋白質は認められないが, 糖鎖が豊富である。ヒトTPOのアミノ酸配列を解析すると, アスパラギン結合型糖鎖付加部位がC末端側領域だけに6ヶ所存在し, セリン/スレオニン結合型糖鎖付加部位は分子の各所に存在する。実際, 我々がラット血漿から精製した部分長TPOにはセリン/スレオニン結合型糖鎖の存在が示唆されている⁴⁾。また, ヒトTPOcDNAを動物細胞で発現させると, TPOは両方のタイプの糖鎖を有する糖蛋白質として産生される。ヒト血液中存在するTPOの構造は解明されていないが, 最近我々が行った解析において, 健康人と再生不良性貧血患者の血漿から部分精製した

TPOの大部分が全長サイズに匹敵する分子量を有していたことから¹⁰⁾, 血液を循環しているTPOの代表的な分子形態は全長サイズと考えられる。

4. TPOによる血小板産生調節機構(Fig.2)

臓器レベルでのTPO遺伝子の発現は, 肝臓, 腎臓, 骨格筋, 脳, 小腸などで認められる⁶⁾。また, 発現量は少ないが, 骨髄で

の発現も報告されている。これらの中で肝臓での発現が最も高いことから, 肝臓が主要なTPO産生臓器であり, 肝臓の中では肝実質細胞が主なTPO産生細胞である¹¹⁾。血小板が減少しても肝臓におけるTPO遺伝子の発現レベルが変化しないことから, おそらく肝臓からのTPO産生は末梢血中の血小板数とは無関係に常に一定と考えられる。TPOノックアウトマウスの解析結果からも同様のことが示唆されている¹²⁾。

それでは生体内のTPOレベルはどのように制御されているのであろうか。血液中のTPO濃度は, 血小板や巨核球の細胞表面に存在するTPOレセプター(c-Mpl)によって調節されていると考えられている⁹⁾。すなわち, 血小板や巨核球の数が増加するとTPOレセプターに捕捉されるTPOが増加するために血中TPOレベルが低下し, 逆に血小板や巨核球の数が減少するとTPOレセプターに捕捉されるTPOが減るために血中TPOレベルが上昇するというものである。我々が確立したサンドイッチ酵素抗体法¹³⁾で, 白血病化学療法¹⁴⁾や骨髄移植¹⁵⁾を施された患者の血中TPO濃度を調べた結果では, 血中TPO濃度と血小板数に明確な鏡像関係が認められてお

り、この仮説を支持している。ただ最近になって、血小板減少症患者の骨髄ストローマにおけるTPO遺伝子の発現亢進が報告されており、造血の場である骨髄においては血小板の増減に応じたTPOの産生調節が行われている可能性もある。

体内においてTPOはさまざまな代謝を受けていると考えられる。我々は最近、血小板に捕捉されたTPOの代謝に蛋白質分解酵素スロンピンが関与していることを明らかにした¹⁶⁾。ヒトTPOのアミノ酸配列から予測される6ヶ所のスロンピン切断部位のうちの2ヶ所で、全長ヒトTPOがスロンピンによって段階的に切断され、最終的に不活性化される¹⁶⁾。

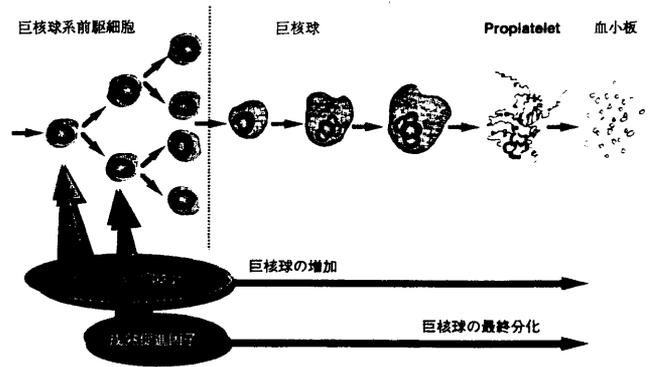


Fig.3 巨核球造血とTPOの作用

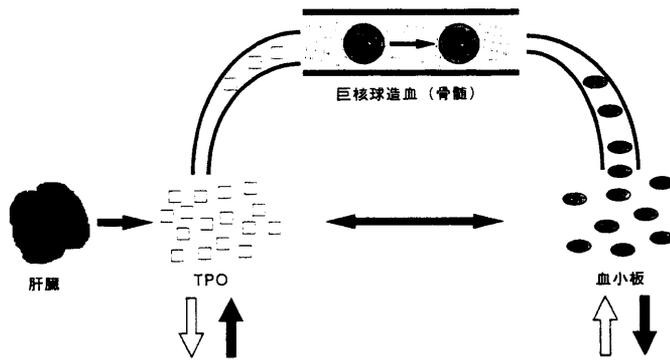


Fig.2 TPOによる血小板産生調節機構

5. TPOの*in vitro*生物活性

Fig.3に巨核球造血の過程を示す。造血幹細胞から派生した巨核球系前駆細胞は巨核球へと分化し、続いて巨核球は細胞分裂せずに多倍体化し(核が2Nから4N, 8N, 16Nとふえる)、さらに細胞質成熟を遂げて最終的に血小板を産生する。

このような巨核球造血において、TPOは巨核球系前駆細胞に対して巨核球コロニー刺激因子(Meg-CSF)として作用し、半固形の培養液(軟寒天, メチルセルロースなど)中で巨核球コロニー形成を誘導する(Fig.3)^{17,18)}。巨核球系前駆細胞レベルでのTPOの主要な標的細胞は、CD41(GPIIb/IIIa)陽性の分化後期の前駆細胞である^{17,18)}。さらに、TPOは強力な巨核球成熟促進因子(Meg-POT)としても作用する(Fig.3)。ラット骨髄から精製したGPIIb/IIIa陽性のラット巨核球系前駆細胞をTPO存在下に液体培養すると、多倍体化の進んだ成熟巨核球(最大で256N)が生成し、続いて一部の成熟巨核球が細長く伸ばした細胞質突起からなるproplateletへと劇的な変化を遂げる(Fig.4)¹⁹⁾。この細胞質突起は血小板様のビーズが連結したような形態をしており、培養液中で自発的に血小板様断片へと切断される。この血小板様断片は機能的にも形態的にも血液中の血小板にきわめて類似している²⁰⁾。一方、TPOは巨核球系前駆細胞から分化した成熟巨核球からのproplatelet形成を促進せず、むしろ高濃度では抑制する¹⁹⁾。このような結果から、最終的な血小板産生をもたらすTPOの作用は、巨核球系前駆細胞レベルで発揮されることが明らかとなった(Fig.3)¹⁹⁾。

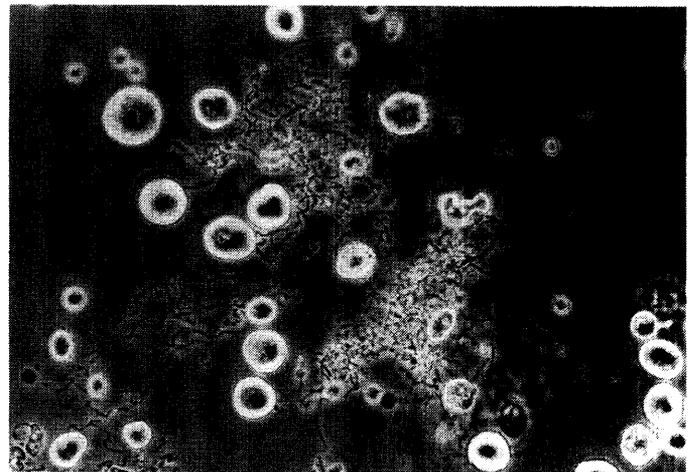


Fig.4 巨核球とproplatelet

GPIIb/IIIa陽性のラット巨核球系前駆細胞からTPOによって誘導された巨核球(丸い細胞)と巨核球が形態変化して生成したproplatelet(数多くの細長い細胞質突起が絡み合っている)。

TPOは、幹細胞因子(SCF)、あるいはインターロイキン-3といった他の造血因子と協同して未分化造血前駆細胞の増殖、分化を促進する^{21,22)}。また、TPOは、EPOの共存下に赤芽球系前駆細胞の増殖を促進する²³⁾。このような結果から、TPOの作用は巨核球-血小板系に限定されたものではなく、造血系の他の系統にまで広範囲にわたることが明らかとなった。

6. TPOの*in vivo*活性と血小板減少改善効果

6.1. 正常マウスにおける血小板増加作用

組換えヒトTPO(rhTPO)や組換えヒトTPOの活性領域をポリエチレングリコールで化学修飾したPEG-rHuMGDFは、これまでに

をクローニングされた造血因子の中で最も強力な血小板増加作用を示す。正常マウスの皮下にPEG-rHuMGDFを5日間連日投与すると、投与量に依存して最終投与の3日後をピークとして末梢血の血小板だけが増加する²⁴⁾。高投与量では血小板数は正常値の4~5倍にも増加する。このような遅効性の作用は、前述の*in vitro*の解析結果から明らかなように、PEG-rHuMGDF投与による血小板増加が巨核球系前駆細胞の増殖、分化によってもたらされることを示している。

6.2. 末梢血への造血前駆細胞動員作用

G-CSFと同様に、TPOの単独投与により末梢血へ各種造血前駆細胞が動員される。正常マウスの皮下にPEG-rHuMGDFを5日間連日投与した場合、最終投与の翌日から2日後にかけて動員前駆細胞数がピークとなる(Fig.5)。最大の造血前駆細胞数を動員させるためには、血小板を増加させるための至適用量より多くの投与量を必要とする。また、PEG-rHuMGDFとG-CSFあるいは制癌剤との併用により動員前駆細胞数が相乗的に増加する。PEG-rHuMGDF投与で前駆細胞を動員させたドナーマウスの血液を致死線量の放射線を照射したレシピエントマウスへ移植すると、ドナーへのPEG-rHuMGDF投与量とレシピエントへの移植血液量に依存してレシピエントマウスの生存日数が延長する。今後、PEG-rHuMGDF投与によって長期骨髄再構築能を有する造血前駆細胞が動員されるかどうかに興味を持たれる。

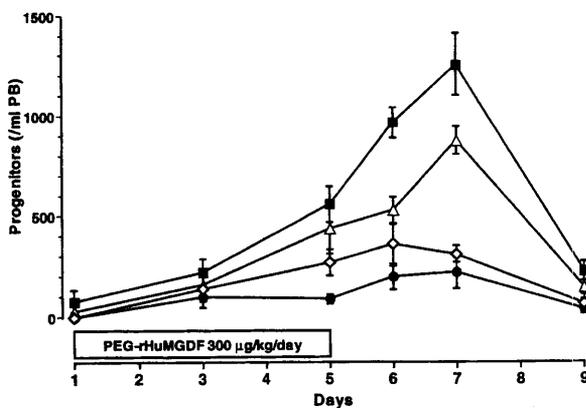


Fig.5 PEG-rHuMGDFによる末梢血への造血前駆細胞の動員
正常マウスへ300 µg/kg/dayのPEG-rHuMGDFを5日間連日投与し、末梢血中の各種造血前駆細胞をコロニーアッセイにて調べた。

- ：顆粒球系-マクロファージ系前駆細胞
- △：巨核球系前駆細胞
- ：赤芽球系前駆細胞
- ：赤芽球系前駆細胞を含む多能性造血前駆細胞

6.3. 血小板減少改善効果

制癌剤投与や放射線照射などによる骨髄抑制動物モデルに対して、rhTPOあるいはPEG-rHuMGDFは著明な血小板減少改善効果を示す^{25)~28)}。たとえば、制癌剤カルボプラチンと放射線で処置したマウスへ翌日からPEG-rHuMGDFを連日投与すると、投与量に依存して血小板減少が著明に軽減され、血小板回復が促進される。骨髄では巨核球系細胞の減少が抑制され、正常レベルへの回復が促進される。また、赤血球と白血球の回復も促進される。これは、骨髄抑制に伴って体内で増量した内因性のEPOやG-CSFがPEG-rHuMGDFと相乗的に作用した結果と考えられる。同じマウスモデルでPEG-rHuMGDFの総投与量を一定にして、処置翌日の単回投与あるいは処置翌日の投与を含む複数回の投与を行うと、いずれの投与スケジュールでもほぼ同程度の血小板回復が認められる(Fig.6)。すなわち、単回投与でも十分に有効である。さらに放射線照射マウスで単回投与について詳細に検討した結果では、放射線照射からPEG-rHuMGDF投与までの時間が短いほど、血小板をはじめとする3血球系統の回復促進がより顕著である²⁸⁾。その場合、骨髄においては、血球回復に先立って巨核球系前駆細胞だけでなく、多能性造血前駆細胞や赤芽球系前駆細胞などの各種造血前駆細胞の回復促進が観察される。骨髄抑制動物モデルに対してPEG-rHuMGDFとG-CSFを併用すると、モデルによっては、血小板減少と好中球減少のそれぞれに対する相乗的な改善効果が

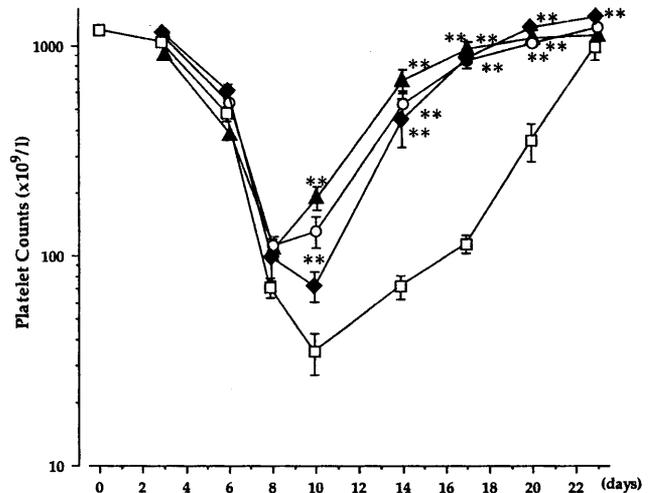


Fig.6 PEG-rHuMGDFの血小板減少改善効果

Day 0に放射線照射とカルボプラチン投与でマウスを処置した後、翌日(day 1)からPEG-rHuMGDFを総投与量を一定にして、3通りのスケジュールで皮下投与し、末梢血血小板数を測定した。

- ：媒体投与群
- ◆：3 µg/kg/day PEG-rHuMGDF投与群(day 1から day 7まで毎日)
- ：7 µg/kg/day PEG-rHuMGDF投与群(day 1, day 3と day 5)
- ▲：21 µg/kg/day PEG-rHuMGDF投与群(day 1のみ)

認められる²⁹。制癌剤ニムスチンで化学療法を施したカニクイザルにおいても、rhTPOあるいはPEG-rHuMGDFは同様の血小板減少改善効果を示すが、投与期間中に血清アルブミンなどの血清生化学値、急性期蛋白質C-reactive protein、血液凝固系パラメーターに変化は認められていない²⁷。

7. TPOの臨床応用の可能性

血小板減少動物モデルを用いた実験結果は、PEG-rHuMGDFやTPOの血小板減少症治療における有用性を示唆しており、既に米国、オーストラリア、ヨーロッパ、およびわが国において遺伝子組換え技術を利用して生産された本因子の臨床試験が開始されている。オーストラリアで実施された化学療法前の癌患者を対象とした臨床試験において、PEG-rHuMGDFの投与量に依存して正常な形態と機能を有する血小板が増加し、血小板のピークに先立ってreticulated plateletの割合が増加した^{29,30}。また、PEG-rHuMGDF投与による副作用は特に認められなかった²⁹。米国で実施された非小細胞性肺癌患者を対象とした臨床試験においては、化学療法後にPEG-rHuMGDFを連日、皮下投与したところ、プラセボ群に比べてPEG-rHuMGDF投与群でベースラインまでの血小板回復に要する期間が短縮された³¹。一方、米国におけるde novo白血病患者の寛解導入療法後にPEG-rHuMGDFを投与した臨床試験では、PEG-rHuMGDF投与群とプラセボ群の血小板回復期間に有意差が認められていない。今後、投与スケジュール、投与方法などについて詳細な検討が必要と思われる。

PEG-rHuMGDFの臨床試験はまだ始まったばかりであるが、今後は、化学療法後の血小板減少症に加えて、他の血小板減少症、末梢血への造血前駆細胞の動員、あるいは血小板採取のための血小板の増加などへも臨床試験の範囲が広がるものと思われる。血小板産生を制御する主要な血小板増多因子TPO(PEG-rHuMGDF)が血小板輸血を代替できるかどうか、今後の臨床試験の進展が注目される。

参考文献

1. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang W-J, Oles KJ, Hultgren B, Solberg LAJ, Goeddel DV, Eaton DL. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994;369:533-8.
2. Lok S, Kashansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM, Bell LA, Sprecher CA, Blumberg H, Johnson R, Prunkard D, Ching AFT, Mathewes SL, Bailey MC, Forstrom JW, Buddle MM, Osborn SG, Evans SJ, Sheppard PO, Presnell SR, O'Hara PJ, Hagen FS, Roth GJ, Foster DC. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 1994;369:565-8.
3. Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li Y-S, Lu HS, Martin F, Chang M-S, Samal B, Nichol JL, Swift S, Johnson MJ, Hsu R-Y, Parker VP, Suggs S, Skrine JD, Mereweher LA, Clogston C, Hsu E, Hokom MM, Hornkohl A, Choi E, Pangelinan M, Sun Y, Mar V, McNinch J, Simonet L, Jakobsen F, Xie C, Shutter J, Chute H, Basu R, Selander L, Trollinger D, Sieu L, Padilla D, Trail G, Xu W, Castillo JD, Biron J, Cole S, Hu MC-T, Pancifici R, Ponting I, Saris C, Wen D, Yung YP, Lin H, Bosselman RA. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 1994;77:1117-24.
4. Kato T, Ogami K, Shimada Y, Iwamatsu A, Sohma Y, Akahori H, Horie K, Kokubo A, Kudo Y, Maeda E, Kobayashi K, Ohashi H, Ozawa T, Inoue H, Kawamura K, Miyazaki H. Purification and characterization of thrombopoietin. *J Biochem* 1995;118:229-36.
5. Miyazaki H, Horie K, Shimada Y, Kokubo A, Maeda E, Inoue H, Kato T. A simple and quantitative liquid culture system to measure megakaryocyte growth using highly purified CFU-MK. *Exp Hematol* 1995;23:1224-8.
6. Shimada Y, Kato T, Ogami K, Horie K, Kokubo A, Kudo Y, Maeda E, Sohma Y, Akahori H, Kawamura K, Miyazaki H. Production of thrombopoietin (TPO) by rat hepatocytes and hepatoma cell lines. *Exp Hematol* 1995;23:1388-96.
7. Ogami K, Shimada Y, Sohma Y, Akahori H, Kato T, Kawamura K, Miyazaki H. The sequence of a rat cDNA encoding thrombopoietin. *Gene* 1995;158:309-10.
8. Sohma Y, Akahori H, Seki N, Hori T, Ogami K, Kato T, Shimada Y, Kawamura K, Miyazaki H. Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Lett* 1994;353:57-61.
9. Kuter DL, Beeler DL, Rosenberg RD. The purification of megapoeitin: A physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11104-8.
10. Matsumoto A, Tahara T, Morita H, Usuki K, Ohashi H, Kokubo A, Matsumoto E, Tsunakawa H, Ogami K, Miyazaki H, Urabe A, Kato T. The native human thrombopoietin in blood: Some properties of the endogenous thrombopoietin of the normal and patients with hematopoietic disorders. *Blood* 1996;88 (suppl 1): 544.
11. Nomura S, Ogami K, Kawamura K, Tsukamoto I, Kudo Y, Kanakura Y, Kitamura Y, Miyazaki H, Kato T. Cellular localization of thrombopoietin mRNA in the liver by in situ hybridization. *Exp Hematol* 1997;25:565-72.
12. de Sauvage FJ, Carver-Moore K, Luoh S-M, Ryan A, Dowd M, Eaton DL, Moore MW. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J Exp Med* 1996;183:651-6.
13. Tahara T, Usuki K, Sato H, Ohashi H, Morita H, Tsumura H, Matsumoto A, Miyazaki H, Urabe A, Kato T. A sensitive sandwich ELISA for measuring thrombopoietin in human serum: serum thrombopoietin levels in healthy volunteers and in patients with haematopoietic disorders. *Br J Haematol* 1996;93:783-8.
14. Usuki K, Tahara T, Iki S, Endo M, Osawa M, Kitazume K, Kato T, Miyazaki H, Urabe A. Serum thrombopoietin level in various hematological diseases. *Stem Cells* 1996;14:558-65.

15. Ishida A, Miyakawa Y, Tanosaki R, Wakui M, Ueno H, Watanabe R, Awaya N, Tahara T, Kato T, Miyazaki H, Oda A, Kizaki M, Okamoto S, Ikeda Y. Circulating endogenous thrombopoietin, interleukin-3, interleukin-6 and interleukin-11 levels in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Int J Hematol* 1996;65:61-9.
16. Kato T, Oda A, Inagaki Y, Ohashi H, Matsumoto A, Ozaki K, Miyakawa Y, Watarai H, Fujii K, Kokubo A, Kadoya T, Ikeda Y, Miyazaki H. Thrombin cleaves recombinant human thrombopoietin: One of the proteolytic events that generates truncated forms of thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:4669-74.
17. Kato T, Horie K, Hagiwara T, Maeda E, Tsumura H, Ohashi H, Miyazaki H. GpIIb/IIIa⁺ subpopulation of rat megakaryocyte progenitor cells exhibits high responsiveness to human thrombopoietin (TPO). *Exp Hematol* 1996;24:1209-14.
18. Hagiwara T, Kodama I, Horie K, Kato T, Miyazaki H. Proliferative properties of human umbilical cord blood megakaryocyte progenitor cells to human thrombopoietin. *Exp Hematol* 1998;26:228-35.
19. Horie K, Miyazaki H, Hagiwara T, Tahara E, Matsumoto A, Kadoya T, Ogami K, Kato T. Action of thrombopoietin at the megakaryocyte progenitor level is critical for the subsequent proplatelet production. *Exp Hematol* 1997;25:169-76.
20. Choi ES, Hokom MM, Bartley T, Li Y-S, Ohashi H, Kato T, Nichol JL, Skrine J, Knudten A, Chen J, Hornkohl AC, Grampp G, Sleeman L, Cole S, Trail G, Hunt P. Recombinant human megakaryocyte growth and development factor (rHuMGDF), a ligand for c-Mpl, produces functional human platelets in vitro. *Stem Cells* 1995;13:317-22.
21. Kobayashi M, Laver JH, Kato T, Miyazaki H, Ogawa M. Thrombopoietin supports proliferation of human primitive hematopoietic cells in synergy with steel factor and/or interleukin 3. *Blood* 1996;88:429-36.
22. Itoh R, Katayama N, Kato T, Mahmud N, Masuya M, Ohishi K, Minami N, Miyazaki H, Shiku H. Activity of the ligand for c-mpl, thrombopoietin, in early haemopoiesis. *Br J Haematol* 1996; 94: 228-35.
23. Kobayashi M, Laver JH, Kato T, Miyazaki H, Ogawa M. Recombinant human thrombopoietin (Mpl ligand) enhances proliferation of erythroid progenitors. *Blood* 1995;86:2494-9.
24. Kabaya K, Akahori H, Shibuya K, Nitta Y, Ida M, Kusaka M, Kato T, Miyazaki H. In vivo effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor on hematopoiesis in normal mice. *Stem Cells* 1996;14:651-60.
25. Akahori H, Shibuya K, Ozai M, Ida M, Kabaya K, Kato T, Miyazaki H. Effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor on thrombocytopenia induced by a new myelosuppressive chemotherapy regimen in mice. *Stem Cells* 1996;14:678-89.
26. Kabaya K, Shibuya K, Torii Y, Nitta Y, Ida M, Akahori H, Kato T, Kusaka M, Miyazaki H. Improvement of thrombocytopenia following bone marrow transplantation by pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor in mice. *Bone Marrow Transplant* 1996;18:1035-41.
27. Akahori H, Shibuya K, Obuchi M, Nishizawa Y, Tsuji A, Kabaya K, Kusaka M, Ohashi H, Tsumura H, Kato T, Miyazaki H. Effects of recombinant human thrombopoietin in non human primates with chemotherapy-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol* 1996;94:722-8.
28. Shibuya K, Akahori H, Takahashi K, Tahara E, Kato T, Miyazaki H. Multilineage hematopoietic recovery by a single injection of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor in myelosuppressed mice. *Blood* 1998;91: 37-45.
29. Basser RL, Rasko JE, Clarke K, Cebon J, Green MD, Hussein S, Alt C, Menchaca D, Tomita D, Marty J, Fox RM, Begley CG. Thrombopoietic effects of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHuMGDF) in patients with advanced cancer. *Lancet* 1996;348: 1279-81.
30. O'Malley CJ, Rasko JE, Basser RL, McGrath KM, Cebon J, Grigg AP, Hopkins W, Cohen B, O'Byrne J, Green MD, Fox RM, Berndt MC, Begley CG. Administration of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor to humans stimulates the production of functional platelets that show no evidence of in vivo activation. *Blood* 1996;88:3288-98.
31. Fanucchi M, Glaspy J, Crawford J, Garst J, Figlin R, Sheridan W, Menchaka D, Tomita D, Ozer H, Harker L. Effects of polyethylene glycol-conjugated recombinant human megakaryocyte growth and development factor on platelet counts after chemotherapy for lung cancer. *N Eng J Med* 1997;336: 404-9.

—ヒト エリスロポエチン製剤—

エスポー[®] 皮下用

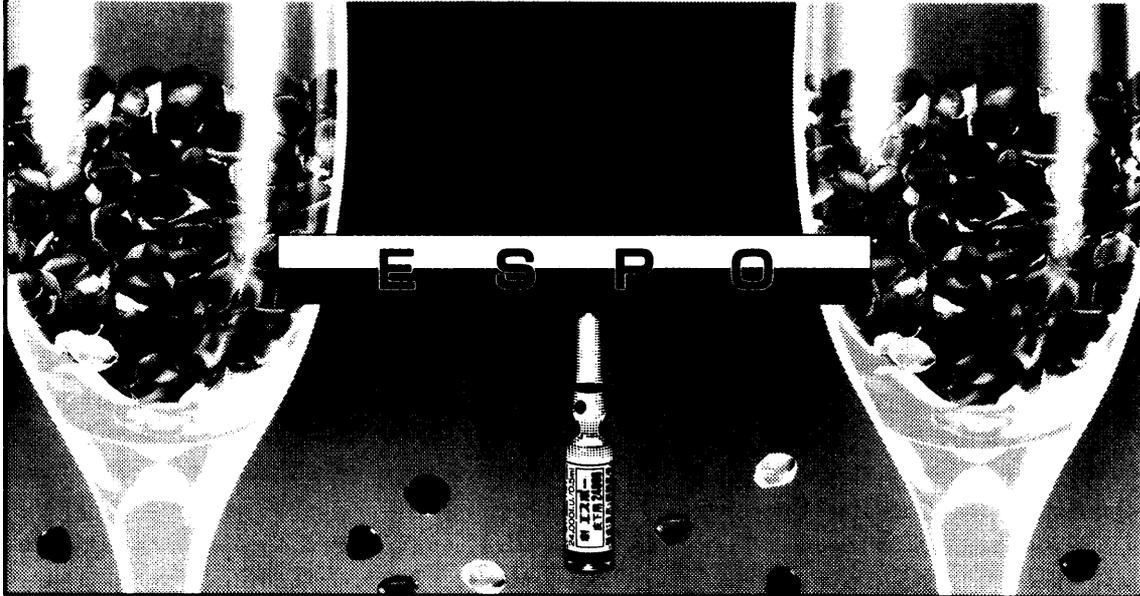
6000・9000・12000・24000

(劇)(指)(要指) 一般名：エポエチンアルファ(遺伝子組換え)



●効能・効果 —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・調剤会社
三共株式会社
〒100 東京都中央区日本橋本町一丁目二番地
製造元
麒麟麦酒株式会社
〒100 東京都中央区新川二丁目一丁目

私もあなたの
力になりたい!



この赤十字は世界のひとりひとりの
あたたかい心でできているのでは
ないでしょうか
あなたのやさしさが人を救う——献血——

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9年度 東京都内小・中学生「献血の絵」 小学生高学年の部・金賞
大田区立入新井第四小学校6年 矢嶋 万由奈

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 〒105-8521 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
〒150-0012 東京都渋谷区広尾4-1-31 TEL.03-5485-6607

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。
- 9) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
- 10) 既発表の図表、その他を引用、転載する場合には、あらかじめ著作権所有者の許可を得ること。また、掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

掲載料は無料とし、論説、総説、原著、報告等については別刷り30部を贈呈する。それを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 (3) 1998年8月10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