

人工血液

第6巻 第4号 1998年12月

総説	前臨床試験でクリアーすべき課題	高折益彦	94
	血液のレオロジーと赤血球代替物	丹羽光一	101
	エホバの証人から見た輸血の代替療法の意義	有賀友則	106
原著	リコンビナントアルブミン-ヘム複合体の物性と酸素結合能	小松晃之	110
	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 (Neo Red Cell: NRC) の評価	黒澤 尋	115
事務局たより			120

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 6 No. 4 December, 1998

<i>Review: Laboratory Assessment for Erythrocyte Substitutes before Preliminary Clinical Use</i>	Masuhiko Takaori	94
<i>Blood Rheology and Red Cell Substitutes</i>	Koichi Niwa	101
<i>The Significance of Blood Alternatives from the Viewpoint of Jehovah's Witnesses</i>	Tomonori Ariga	106
<i>Original Article:</i>		
<i>Dioxygen-binding Ability of Recombinant Albumin-heme Hybrid</i>	Teruyuki Komatsu	110
<i>Evaluation of Oxygen Carrying Capacity of Neo Red Cells (NRC) in a Bioartificial Liver Module Packed with Rat Hepatocytes</i>	Hiroshi Kurosawa	115

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

指クロスエイトM250 指クロスエイトM500 指クロスエイト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

前臨床試験でクリアーすべき課題

Laboratory Assessment for Erythrocyte Substitutes before Preliminary Clinical Use

高折 益彦

Masuhiko Takaori

近年、従来の輸血製剤における安全性の観点から、またその生産量限界に対する懸念から血液代替物の開発、臨床応用への要望が高まっている。とくに赤血球代替物開発への要望は高く、すでに2, 3の製品では臨床試験段階に入っているものもある。そしてその他のものも臨床試験へ移行しようとしている。しかし現段階でもう一度、どのような条件を前臨床試験段階でクリアーしておくべきか見直しておくことは大切なことであろう。そしてそれには、

1.有効性, 2.安全性, 3.工業生産性の3点が検討されるべきである(Table 1)。

1. 赤血球代替物(赤代物)となりうる条件

有効性として第一は酸素を肺から、末梢組織に運搬する能力があることである。すなわち、まず肺で相当量の酸素を抱合することである。ヘモグロビン重合赤代物(CLHb)、リポゾーム包埋ヘモグロビン(LEHb)赤代物で十分その機能を有している^{1,2)}。そして最近の過弗化炭水素赤代物(PFC)でも空気呼吸下でも十分この機能を有している³⁾。むろんリコンビナントヒトヘモグロビン(rhHb:tetramer型)でも⁴⁾、重合牛ヘモグロビン(CBHb)においても⁵⁾この機能を保っている。そしてそれらが末梢組織にて酸素を放出することが必要であるが、この点も認められている。しかし、そのためにはこれらの赤代物が末梢循環系において実際に組織細胞に酸素を供給する毛細血管内を流れることが必要である。そして毛細血管よりも太い血管では軸流(axial)中にあることである。我々がLEHbにて血液交換実験をおこなった際には赤血球の毛細血管内分布に変化を生じることなく、共存するLEHbも毛細血管内を流れていることが推測された⁶⁾。そしてCLHbを使用した際の機能的毛細血管分布では自己血、デキストランに比較して多少その分布減少がみられたが⁷⁾(Fig. 1)、いずれの赤代物を使用した場合でも組織酸素分圧に変化なく、生理的状态を保っていることが認められている^{3,5,8-9)}。これに反しその血管内滞留時間においては将来への問題を残している。すなわち多くのCLHbの血中半減期は3-4時間であり¹⁰⁾、CBHbで8-19時間¹¹⁻¹²⁾、LEHbで20-24時間¹⁰⁾である。むろん赤代物の適当な血中滞留時間はその臨床使用状況により異なるが、急性貧血時での赤血球生産量、1mL/kg・dayを考

Table 1 Laboratory assessments of erythrocyte substitutes before preliminary clinical use

1. Effectiveness as Erythrocyte Substitute
sufficient oxygen delivery
good oxygen uptake in the lungs
good oxygen release in the peripheral tissues
axial flow in the arterioles and passage through the capillaries
adequate intravascular retention time
2. Absence of Adverse Effects
no depressant effect on circulatory function
maintaining myocardial contractility
no aggregation of erythrocyte, leukocyte and platelet
no change in distribution of the circulating blood
no vasomotor activity
no immunological reaction
no inhibitory effect on the physiological vital defence system
no hemostatic disorder
no adverse effect on the hepatic, renal and other vital organ functions
no interaction with other clinical drugs
3. Good Manufacturing
possibility for absolutely chemical synthesis
easy elimination of contaminated substances, if obtained from natural source
possible mass production
strict homogeneity in product
possibility for long termed storage at room temperature
reasonable cost comparable with the present blood products

慮すれば、赤代物の血中半減期は少なくとも24-36時間が必要と考えられる。そのためLEHbでももう少しの滞留時間の延長が望まれる。またそれに関連して循環血液量を少なくとも出血に対する血液補填後、できれば数時間、ないし12時間は出血前値、あるいはそれ以上に維持しうることが望ましい。ただしこの血液量維持の面ではLEHb⁶⁾、PEG-CLHb¹³⁾(Fig. 2)ともに部分的にその要求を満足していると思われる。

岡山県赤十字血液センター、〒700-0012 岡山市いずみ町3-36. Okayama Red Cross Blood Center, 3-36 Izumi-cho, Okayama 700-0012, Japan.
論文受付1998年9月14日。

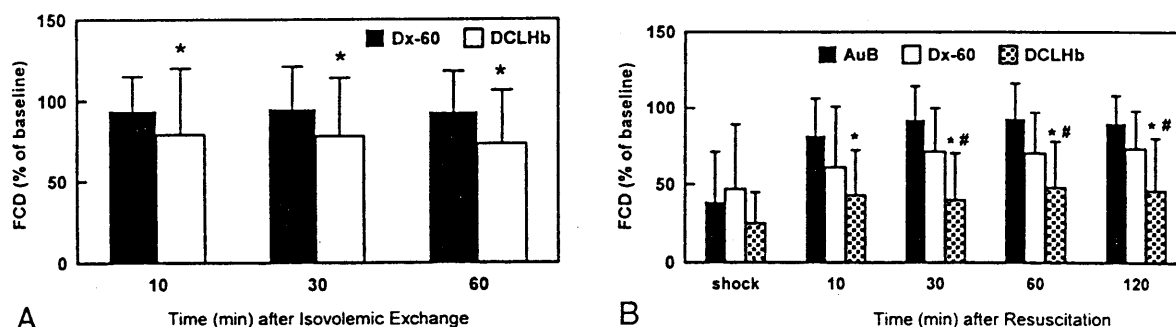


Fig. 1 Changes in functional capillary density following hemodilution or fluid resuscitation with either dextran, autologous blood, or DCLHb after hemorrhagic shock

(Nolte D, Steinhauser P, Pickelmann S, et al. Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb) on local tissue oxygen tension in striated skin muscle: An efficacy study in the hamster. *J Lab Clin Med* 130:328-38, 1997.)

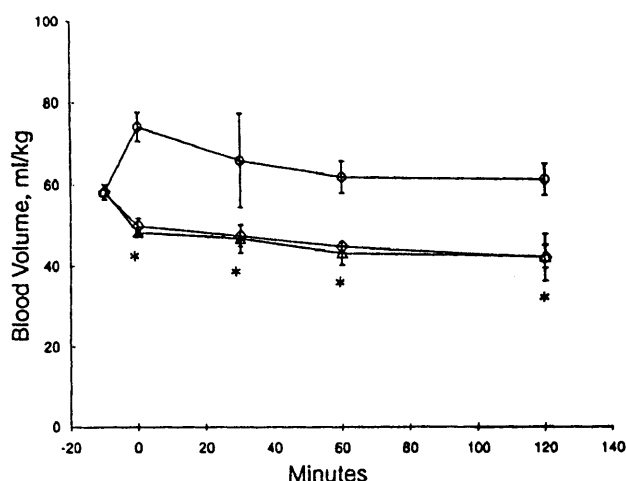


Fig. 2 Changes in the blood volume following PEGHb, alpha-alpha conjugated Hb or lactated Ringer's solution

Total blood volume after 50% exchange transfusion with Ringer lactate(Δ), PEGHb($\circ$), or $\alpha\alpha$ Hb($\diamond$). Blood volume rises after exchange transfusion in PEGHb-treated animals but drops in $\alpha\alpha$ Hb- and Ringer lactate-treated animals. Values are means $\pm$ SE; n=5 for each group. *Significant differences between $\alpha\alpha$ Hb- and PEGHb- treated animals ($P<0.05$). (Migita R, Gonzales A, Conzales, ML, et al. Blood volume and cardiac index in rats after exchange transfusion with hemoglobin-based oxygen carriers. *J Appl Physiol* 82:1995-2002, 1997.)

2. 安全性(副作用がないこと)の条件

薬物を使用して副作用を生じるか否かは、その薬物の本質的な毒性のみならず、その薬物の使用量に関係することは明らかである。したがって前臨床段階での検討、すなわち動物実験での結果の評価においてもこの点を十分考慮しておくことが肝要であろう。

1997年、Przybelski¹⁴⁾は赤代物を臨床の場で用いる際、副作用としてチェックすべき項目を提示し、その各々についてその程度を4段階に区別し、安全性の評価の規準とした。今回、我々はこの提言を参考とし、別個に考察することとした。

1)循環機能への影響に関しては、

(1)心筋収縮力への影響を端的に示した研究成績は少ない。しかし少なくとも赤代物の投与により心拍出量が減少したとする結果は少なく、むしろ増加をきたすとした報告が多い^{2,4,13,15)}。そしてPEG-CLHbを用いたMigitaら¹³⁾の成績ではFig. 3にみられるように、心拍出量の増加が循環血液量に依存している。すなわちFrank-Starlingの法則が維持されていることを示しているの、PEG-CLHbの投与が心筋機能そのものにはほとんど影響していないものと思われる。

(2)微小循環を正常に維持し、末梢組織、細胞に酸素を十分供給する観点から赤血球、白血球、血小板の相互凝集、あるいは血管壁への付着に関しても検討しておくことが大切である。Nolteら⁷⁾のCLHbでの研究ではCLHbの方が自己血やデキストランよりも上記の好ましからざる現象を抑制することが認められている。しかしPhillipsら¹⁶⁾、Goinsら¹⁷⁾のLEHbでの検討では一過性に血小板が循環血液中で減少し(Fig. 4-1)、末梢血管系、とりわけ肺、肝臓にトラップされる現象が認められている(Fig. 4-2)。そしてこれには後述するように補体系の関与が示唆されている。

(3)循環血液の体内分布に影響を与えないかどうかはいまだ検討されていない。しかし前述したこれら赤代物投与後の心拍出量の変化、F cell ratioの変化(Table 2)から推察するに、少なくとも循環血液の血管内分布に著しい変化は生じないものと推測される。

(4)肺を含む全身血管の弛緩・収縮運動性への影響に関して、すでにCLHbにおいて血管内皮の一酸化窒素との反応から血管収縮をきたすことが認められている¹⁸⁻²⁰⁾。そしてHbをリポソームで包埋することによりその作用が抑えられることもRudolphら²¹⁾により認められている(Fig. 5)。しかしこれ以外に交感神経系、エンドテリンなどの関与も示唆されていて、今後検討の対象となっていく。

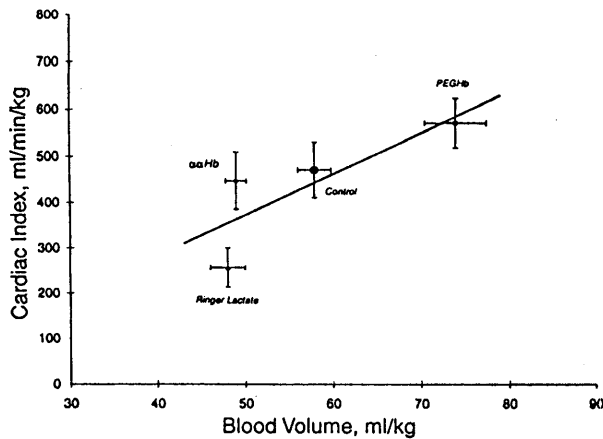


Fig. 3 Changes in cardiac output following PEGHb, alpha-alpha conjugated Hb or lactated Ringer's solution

Blood volume and cardiac index immediately after exchange transfusion ($r^2=0.66$). (Migita R, Gonzales A, Conzaes, ML, et al. Blood volume and cardiac index in rats after exchange transfusion with hemoglobin-based oxygen carriers. *J Appl Physiol* 82:1995-2002, 1997.)

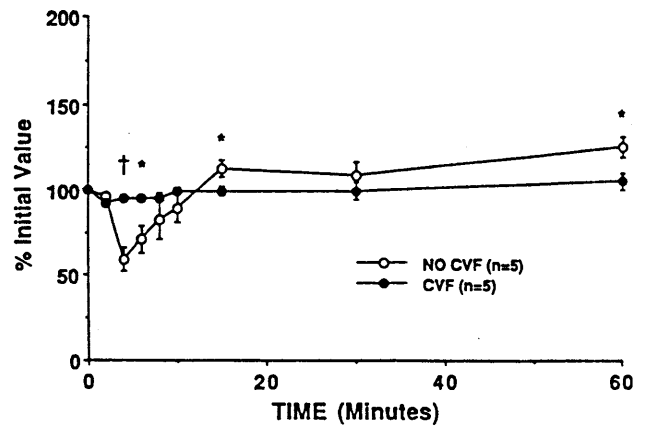


Fig. 4-1 Changes in the circulating platelet count after LEHb infusion

CVF:Cobra venom factor

(Goins B, Phillips WT, Klipper R, et al. Role of complement in rats injected with liposome-encapsulated hemoglobin. *J Surg Res* 68:99-105, 1997.)

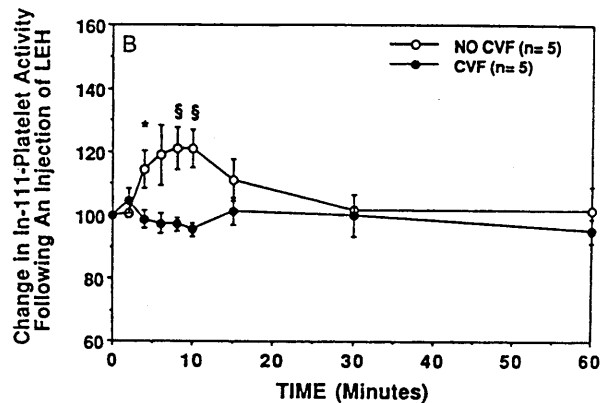
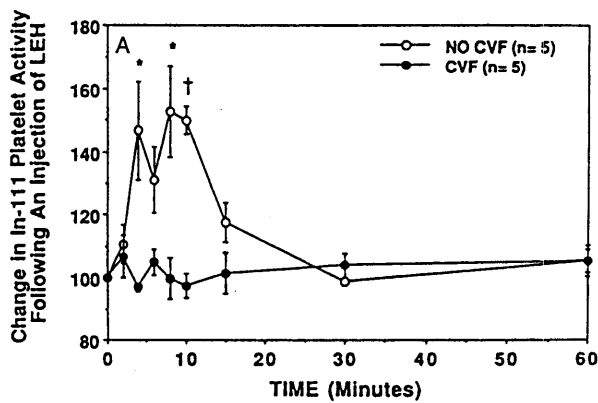


Fig. 4-2 Accumulation of the circulating platelets in the lung and liver

Fig. A:lung

Fig. B:liver

CVF:Cobra venom factor

(Goins B, Phillips WT, Klipper R, et al. Role of complement in rats injected with liposome-encapsulated hemoglobin. *J Surg Res* 68:99-105, 1997.)

Table 2 Intravascular components after the treatment with LEHb, hydroxyethyl starch or fresh autologous blood for hemorrhagic (40 mL/kg) shock

		Before hemorrhage	Hemorrhage and first infusion	After the second infusion
hematocrit	NH	36.6±3.2	28.8±2.9	30.4±2.5
%	NH	36.2±3.5	31.2±2.6	28.9±3.6
	AH	37.1±2.9	34.9±2.2	32.8±2.9
F cell ratio	HN	0.93±0.05	0.89±0.05	0.88±0.06
	NH	0.93±0.06	0.85±0.06	0.91±0.07
	AH	0.91±0.06	0.88±0.05	0.86±0.06
RCV	HN	28.8±2.3	21.4±2.1	22.6±2.3
mL/kg	NH	28.4±2.2	22.1±2.1	22.0±2.3
	AH	27.8±1.5	24.9±1.4	23.9±2.9
PV	HN	54.7±2.5	61.9±3.8	62.2±3.1
mL/kg	NH	55.8±2.5	60.2±3.3	62.0±3.4
	AH	56.0±3.0	58.4±3.0	62.3±3.2
BV	HN	83.5±2.6	82.1±2.2	84.5±3.0
mL/kg	NH	84.3±2.6	82.4±2.4	84.0±3.1
	AH	84.5±2.2	84.0±2.4	85.9±3.2

HN:20mL/kg HES+20mL/kg NRC, NH:20mL/kg NRC+20mL/kg HES

AH:20mL/kg autologous blood+20mL/kg HES

(高折益彦, 福井 明:評価委員会-評価報告書. 日本血液代替物学会 1996 p26).

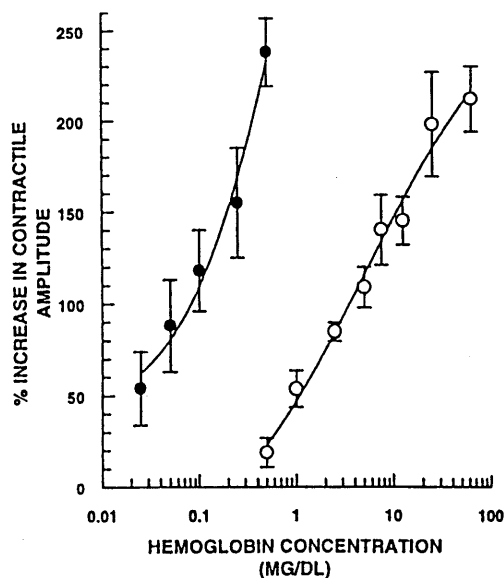


Fig. 5 Modulation of vasoconstrictive reaction with alpha-alpha conjugated Hb by liposome encapsulation

Concentration-response curves of enhancement of electrical stimulation-induced contraction amplitude in perfused rabbit ear artery produced by acellular $\alpha\alpha$ -Hb (●, n=6) and encapsulated $\alpha\alpha$ -Hb (○, n=4). Each point represents mean $\pm$ SE. (Rudolph AS, Sulpizio A, Hieble P, et al. Liposome encapsulation attenuates hemoglobin-induced vasoconstriction in rabbit arterial segments. *J Appl Physiol* 82:1826-35, 1997.)

Nolteらの研究⁷⁾では総合的な酸素運搬・供給の判断の資料となる末梢機能的毛細血管密度の変化はデキストランや自己血よりもCLHbの方がやや劣っている。しかし組織の酸素分圧の変化では自己血との比較で著しい差を認めていない(Fig. 6)⁸⁾。これに対してCBHbを使用した場合にはむしろ自己血よりも優れていることがStandlら⁴⁾により認められている。そしてperflubronを使用したHablerの研究³⁾では自己血輸血と同等、あるいは多少優れている結果を得ている。またLEHbを用いた慶応大学での成績⁹⁾でも十分な末梢組織の酸素分圧の維持が認められている。その結果全身酸素消費量はCLHbでもLEHbでも十分維持されている^{2,4,22)}。

2)抗体産生, 免疫反応, 補体活性に関し, CLHbを用いたPatelら²³⁾の臨床研究では抗体産生が認められない(Fig. 7)。またCBHbを用いたStandlら¹²⁾の研究でも一過性にIgGの上昇を認めたが, 3ヶ月後には正常値に変化したことが報告されている。これに対してLEHbでの補体活性は認められている。そのため前述した血小板への影響も認められる。しかしこの血小板の反応は蛇毒を使用して補体反応を抑制しておくことにより抑えられる(Fig. 4)。これに対してliposome膜の補強, あるいはpolyoxyethyleneによる表面修飾でそのような補体活性が抑制されることも認められている²⁴⁾。

3)網内系を含み, 免疫機能への影響に関して, なお十分な検討がなされていない。少なくともCBHb, rhHbでも, CLHb, LEHbでもその使用により網内系細胞がこれらの赤代物を捕捉し, それにより飽和され

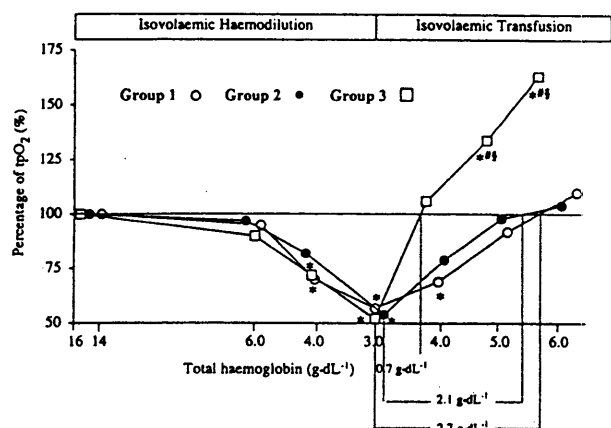


Fig. 6 Tissue oxygen partial pressure after the hemodilution with stored autologous blood, fresh homologous blood or CBHb

Group 1: stored autologous blood

Group 2: fresh homologous blood

Group 3: CBHb

(Standl T, Horn P, Wilhelm S, et al. Bovine haemoglobin is more potent than autologous red blood cells in restoring muscular tissue oxygenation after profound isovolemic hemodilution in dogs. *Can J Anaesth* 43:714-23, 1996).

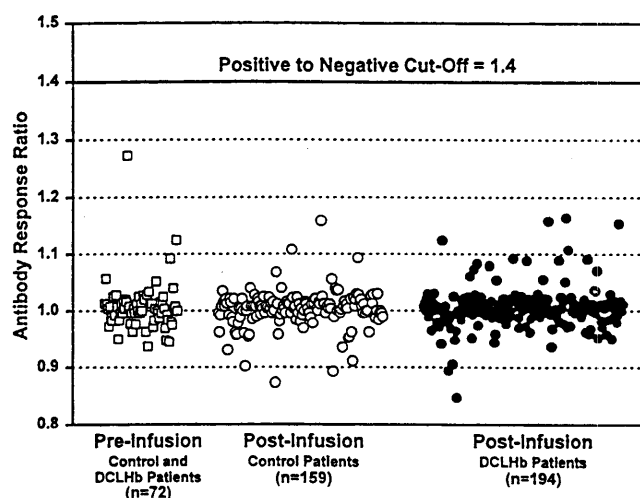


Fig. 7 Antibody in the plasma after DCLHb infusion

Antibody response in patients exposed to DCLHb or control solution. Antibody response ratio is the OD ratio of patient serum applied to DCLHb-coated wells relative to that of patient serum applied to carbonate buffer-coated wells. (Patel MJ, Webb EJ, Shelbourn TE, et al. Absence of immunogenicity of diaspirin cross-linked hemoglobin in humans. *Blood* 91:710-6, 1998.)

ること、そしてマクロファージなどの異物処理機能低下が生じることが問題となる。同様にLaneら²⁵⁾はPFC投与後に多核球の遊走能が低下することを報告している。そして阿部ら²⁶⁾が示したLEHbによる白血球からの不必要な活性酸素放出や、逆に藤原ら²⁷⁾が示したような活性酸素産生低下を生じる現象は今後さらに検討を要する。さらにZuckermanら²⁸⁾は内毒素血症にあるマウスではrhHb投与がその生存率を低下させる(Fig. 8)ことを報告している。そして吉田はCLHbが内毒素投与によるTNF産生を増強することを報告している²⁹⁾。そのため一般的にこれらの赤代物は生体免疫機能を抑制すると考えられる。しかしその抑制作用の持続時間は明らかとなっていない。またその臨床的意義についても十分検討されていない。今後は(a)いかにこの抑制を最小とさせるか、(b)いかなる症例でこれら赤代物を使用するか、禁忌とするか、(c)その使用量の制限をどこに設けるか、検討することが課題となる。

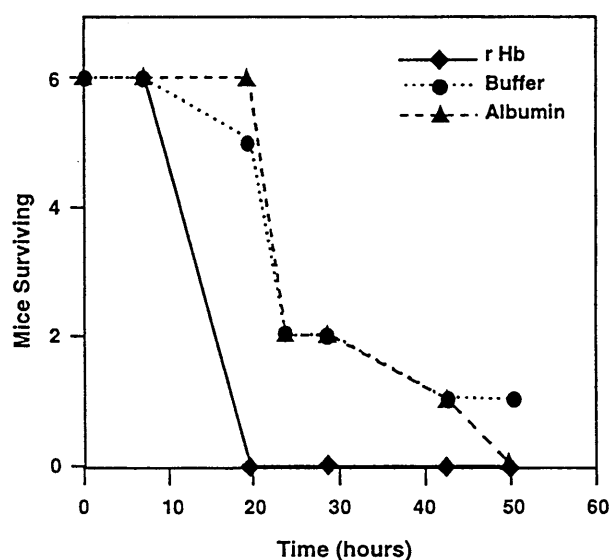


Fig. 8 Effect of rhHb 1.1 infusion on survival rate in septic(endotoxine treated) mice

(Zuckerman SH, Evans GF, Bryan N. Interactions of recombinant hemoglobin(rHb 1.1) and endotoxin in vivo: Effects on systemic tumor necrosis factor and interleukin-6 levels in lethal and sublethal murine models of endotoxemia. *J Lab Clin Med* 130:427-35, 1997.)

4)止血機能への影響に関してはPhillipsら¹⁶⁾のLEHbの血小板への影響、Standlら¹²⁾のCBHbの凝固系への影響などの研究があるが、一応その程度は軽度と判定されている。

5)肝、腎機能への作用に関し、いずれの赤代物ともその影響が軽微であることが報告されている³⁰⁾。そしてすでに臨床試験において部分的にこの面での安全性が認められている。しかし前述したようにいずれの赤代物も網内系への蓄積が認められるので、各

種臓器機能に全く影響がないとは断言できない。すなわち前述したようにその投与量に大きく影響されることになろう。

6)そして最後に他の薬剤とのinteractionの有無についての検討が要求される。実際に赤代物と同時使用される薬物、薬剤の数はおびただしくその全てについて検討することは困難である。しかし非常に使用頻度が高いもの、出血やそれにとまなうショックの際にしばしば使用される薬剤、たとえば代用血漿、昇圧剤などとのinteractionについてin vitro, in vivoで検討しておくことが必要であろう。すでにPFCについては直接各種薬剤と結合することが知られている³¹⁾、ヒトヘモグロビン(stroma free hemoglobin)の注入は各種薬剤の代謝(pharmacokinetics)に影響を及ぼすことが知られている³²⁾。

3. 工業生産で満たすべき条件

この条件はとくにpreclinicalで満たすべき条件に該当するとは限らないが、少なくとも臨床研究に入る以前に確立しておくべき条件である。たとえば長期保存の条件もpreclinicalな状態では特定の設備を用意することができても、臨床治験の時点では必ずしも可能とならないことがある。したがってTable 1に提示した諸点は現段階で確立しておくことが要求される。

4. おわりに

このように赤代物を臨床で用いるまでには、なお、かなりの検討項目が残されている。しかし赤代物に対しての医療面、あるいは社会面からの必要性に応じ、また解明すべき問題の重要性、とりわけ臨床の場での重要性に応じ、そして赤代物の臨床現場での使用量での制限を付帯することなどによって、場合によっては臨床治験への開始を容認する可能性があることも忘れられない。

本論説の要旨は第5回日本血液代替物学会年次大会(平成10年9月4日-5日、札幌)において発表した。

参考文献

1. Ulatowski JA, Bucci E, Nishikawa T, Razynska A, Williams MA, Takeshima, R, Traystman, RJ, Koehler, RC. Cerebral O₂ transport with hematocrit reduced by cross-linked hemoglobin transfusion. *Am J Physiol* 1996;270:H466-75.
2. Takaori M, Fukui A. Treatment of massive hemorrhage with liposome encapsulated human hemoglobin(NRC) and hydroxyethyl starch(HES) in beagles. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1996;24:643-54.
3. Habler OP, Kleen MS, Hutter JW, Podtschaske AH, Kemming GI, Welte MV, Corso CO, Batra S, Keipert PE, Faithfull NS, Messer KFW. Hemodilution and intravenous perflubron emulsion as an alternative to blood transfusion : effects on tissue oxygenation during profound hemodilution in anesthetized dogs *Transfusion* 1998;38:145-55.
4. Standl T, Horn P, Shilhelm S, Creim C, Freitag M, Freitag U, Sputtek A, Jacobs E, Schulte am Esch J. Bovine haemoglobin is more potent than autologous red blood cells in restoring muscular tissue oxygenation after profound iso-volemic haemodilution in dogs. *Can J Anaesth* 1996;43:714-23.
5. Looker D, Abbott-Brown D, Cozart P, Durfee S, Hoffman S, Mathews A, Miller-Roechrich J, Shoemaker S, Triple S, Fermi, G. A human recombinant haemoglobin designed for use as a blood substitute. *Nature* 1992;356:258-60.
6. 高折益彦, 福井 明. 赤血球代替物 NRC 投与と血液量変化. 日本血液代替物学会-評価報告資料集 1996;72-4.
7. Nolte D, Botzlar A, Pickelmann 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.
8. Nolte D, Steinhäuser P, Pickelmann S, Berger S, Haertl R, Messmer, K. Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb) on local tissue oxygen tension in striated skin muscle : An efficacy study in the hamster. *J Lab Clin Med* 1997;130:328-38.
9. 吉津 晃, 山畑 健, 泉陽太郎, 堀之内宏久, 小林絃一, 林 晟翼, 酒井宏水, 武岡真司, 西出宏之, 土田英俊. 出血性ショックモデルを用いた人工酸素運搬体, ヘモグロビン小包体の 酸素運搬能の検討. *人工血液* 1997;5:18-22.
10. 関口定美, 仲井邦彦. 人工血液の開発と臨床応用. *日輸血学誌* 1995;41:131-8.
11. Hughes GS, Antal EJ, Locker PK, Francom SF, Adams WJ, Jacobs EE. Physiology and pharmacokinetics of a novel hemoglobin-based oxygen carrier in human. *Crit Care Med* 1996;24:756-64.
12. Standl T, Burmeister M-A, Horn E-P, Wilhelm S, Knoefel WT, Schulte am Esch J. Bovine haemoglobin-based oxygen carrier for patients undergoing haemodilution before liver resection. *Br J Anaesth* 1998;80:189-94.
13. Migita R, Gonzales A, Gonzales ML, Vandergriff KD, Winslow RM. Blood volume and cardiac index in rats after exchange transfusion with hemoglobin-based oxygen carriers. *J Appl Physiol* 1997;82:1995-2002.
14. Przybelski RJ, Daily EK, Stern KN, Mattia-Golderrg C. A Graded scale for assessment of safety of blood substitutes. *Transfusion* 1997;37:749-51.
15. Abassi Z, Kotob S, Pieruzzi F, Abouassali M, Keiser HR, Fratantoni JC, Alayash AI. Effects of polymerization on the hypertensive action of diaspirin cross-linked hemoglobin in rats. *J Lab Clin Med* 1997;129:603-10.
16. Phillips WT, Klipper R, Rudolph AS, Javors M, Goins JB. Platelet reactivity with liposome-encapsulated hemoglobin in the rat. *Exp Hematol* 1997;25:1347-56.
17. Goins B, Phillips WT, Klipper R, Rudolph AS. Role of complement in rats injected with liposome-encapsulated hemoglobin. *J Surg Res* 1997;68:99-105.
18. Westenberger U, Thanner S, Ruf HH, Gersonde K, Sutter G, Trentz O. Formation of free radicals and nitric oxide derivative of hemoglobin in rats during shock syndrome. *Free Rad Res Commun* 1990;11:167-78.

19. 仲井邦彦, 佐久間一郎, 北畑 顕. ヘモグロビン系酸素運搬体による血管反応. 人工血液 1998;6:25-36.
20. 酒井宏水, Intaglietta M, 土田英俊. 微小循環動態の観察と赤血球代替物の評価. 人工血液 1998;6:76-87.
21. 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;82:1826-37.
22. Gulati A, Sen AP. Dose-dependent effect of dapsirin cross-linked hemoglobin on regional blood circulation of severely hemorrhaged rats. Shock 1998;9:65-73.
23. Patel MJ, Webb EJ, Shelbourn TE, Mattia-Goldberg C, George AJT, Zhang F, Moore EG, Nelson DJ. Absence of immunogenicity of dapsirin cross-linked hemoglobin in humans. Blood 1998;91:710-6.
24. 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 type 1. Transfusion 1997;37:150-9.
25. Lane TA, Lamkin GE. Paralysis of phagocyte migration due to an artificial blood substitute. Blood 1984;64:400-5.
26. 阿部英樹, 丹羽光一, 藤原満博, 平山順一, 稲波 修, 桑原幹典, 池淵研二, 関口定美. リポソーム型人工酸素運搬体による好中球からのスーパーオキシド産生. 日輸血学誌 1998;44:235.
27. 藤原満博, 山口美樹, 阿部英樹, 丹羽光一, 池淵研二, 関口定美. 単球の活性酸素産生能及びコストイミュラトリー分子発現に対するリポソーム型ヘモグロビンの影響. 日輸血学誌 1998;44:234.
28. Zuckerman SH, Evans GF, Bryan N. Interactions of recombinant hemoglobin (rHb1.1) and endotoxine in vivo : Effects on systemic tumor necrosis factor and interleukin-6 levels in lethal and sublethal murine models of endotoxemia. J Lab Clin Med 1997; 130:427-35.
29. 吉田 稔, Su G. Cell-free hemoglobin による endotoxin の致死毒性の増強. 日輸血学誌 1998;44:234.
30. Cases A, Stulak JM, Katusic Z, Villa E, Romero JC. Hemodynamic and renal effects of cross-linked hemoglobin infusion. Am J Physiol 1997;272:R793-9.
31. Ravis WR, Hoke JF, Parsons DL. Perfluorochemical erythrocyte substitutes : Disposition and effects on drug distribution and elimination. Drug Metab Rev 1991;23:375-411.
32. Kemner JM, Snodgrass WR, Worley SE, Hodges GR, Melethil S, Hignite CE, Tschanz C. Effect of oxygen-carrying resuscitation fluids on the pharmaco-kinetics of antipyrine, diazepam, penicillin, and sulfamethazine in rats. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1984;46:381-400.

血液のレオロジーと赤血球代替物

Blood Rheology and Red Cell Substitutes

丹羽 光一

Koichi Niwa

血液は非ニュートン流体であり、剪断速度によって粘度が変化する。血液の粘度は血漿蛋白、ヘマトクリット、赤血球の凝集や変形能などによって決まる。赤血球代替物は血液と混ざることによってこれらの要素に影響を及ぼし、血液の粘度を変化させる。本稿では血液の粘度を理解する上で必要な流体力学の基礎的理論を概説し、赤血球代替物が血液粘度に及ぼす効果について考察する。

The effect of red cell substitutes on blood viscosity has been one of topics in many researchers. Blood is a non-Newtonian fluid, viscosity of which changes as a function of shear rate. Blood viscosity is determined by several factors such as plasma protein, hematocrit, and erythrocyte aggregation and deformability. Red cell substitutes have various effects on these factors owing to their chemical structure. To understand blood rheology, basic knowledge of fluid dynamics is essential. In this paper the author describes the fundamental theory of fluid dynamics and discusses the effect of red cell substitutes on blood viscosity.—Key words: blood substitutes, rheology, blood viscosity.

1. はじめに

赤血球代替物の研究開発分野では、臓器に対する侵襲、免疫能への影響、血液成分への影響など多くの生体適合性が検討されているが、そのひとつに血液の粘度への影響がある。血液の粘度は血漿成分、血球成分、血流速度など様々な要因に支配される物理的性状であり、これを理解するには液体の流動特性に関する基本原理を知ることが必要である。液体の流動特性は主にレオロジーという分野で研究されており、特に血液の流動特性に関する研究をヘモレオロジーという。本稿では液体の流動特性に関する基礎的な理論と血液の粘度について概説し、赤血球代替物が血液の粘度に及ぼす影響について紹介する。

2. 液体の流動特性に関する基礎原理

2.1 剪断応力、剪断速度と粘度

液体の粘度は直感的には粘っこさとして理解できよう。例えば水よりもサラダ油のほうがねばねばしており、容器から注ぐときにも水の方が早く容器からなくなる。このとき、我々は水よりサラダ油のほうが粘度が高いと考える。ここで粘度を定量的に表す理論を概説する。

Fig. 1のように、二つの平行平板AとBの間に満たされた液体を考える。平板間の距離Yは十分小さいものとする。ここで平板Aに矢印Fのような力が働いたとすると、平板直下の液体はファンデルワールス力などの内部摩擦により負荷した力に追随してある速度で移動する。ところが表面から離れるに従って液体の速度は減衰し平面Bの表面では速度は最小となり、ある地点Pとその直

下の液面の間には速度勾配 du/dy が生じる。このとき負荷した単位面積当たりの力を剪断応力(ずり応力) τ 、速度勾配を剪断速度(ずり速度) G と呼び、両者の関係は次式で表すことができる。

$$\tau = \mu \cdot G \quad \cdots(1)$$

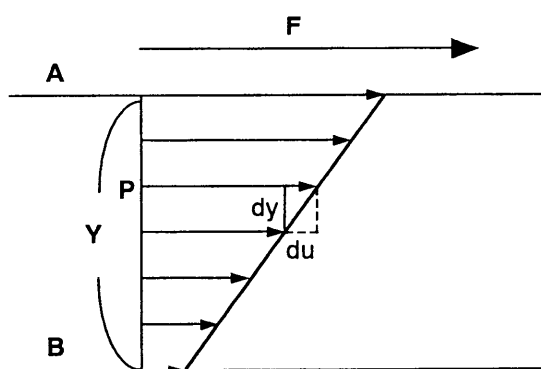


Fig.1 剪断速度と剪断応力

この関係をニュートンの粘性法則といい、係数 μ が一定、すなわち剪断速度と剪断応力が正比例の関係にある流体をニュートン流体という(後述)。係数 μ を粘性係数または粘度と呼び、これは液体を構成する分子間の摩擦によって生ずるものである。剪断応

力は単位面積当たりの力であるので dynes/cm^2 、剪断速度は単位距離当たりの速度変化であるので $1/\text{s}$ という単位を持つ。式(1)より粘度は剪断応力を剪断速度で除したものであるから、 $\text{dynes} \cdot \text{s}/\text{cm}^2(\text{g}/\text{cm} \cdot \text{s})$ の単位を持ち、ポアズ[P]あるいはその100分の1の単位であるセンチポアズ[cP]で表記する。

2.2 ニュートン流体と非ニュートン流体

ニュートンの粘性法則すなわち式(1)は係数 μ が定数のときFig. 2aのように表される。図から分かるように剪断速度と剪断応力の関係は線形であり、剪断速度が変化しても粘度は変わらず常に一定である。このようにニュートンの粘性法則において係数 μ が一定である液体をニュートン流体(Newtonian fluid)と呼ぶ。水や油などはニュートン流体の代表である。これに対し、剪断速度と剪断応力の関係が直線的でない液体、言い換えると剪断速度あるいは剪断応力に応じて粘度が変化するような液体を非ニュートン流体(non-Newtonian fluid)と呼ぶ。非ニュートン流体は粘度が剪断速度に依存しており剪断速度によって無数の粘度が与えられるため、ある剪断速度における粘度を見かけ粘度と呼ぶ。ポリアクリルアミドやカルボキシメチルセルロースなど高分子物質の溶液は非ニュートン流体である。血漿は一般にニュートン流体として扱われるが、血球成分を含む全血は非ニュートン流体であり(Fig. 2b)、血管の太さや血流などの条件によって異なった粘度を呈する。非ニュートン流体は血液のように剪断速度が大きくなると粘度が低下するものや逆に増加するものなど数種類に区別されるが、ここでは扱わない。ニュートン流体であるシリコンオイルと、非ニュートン流体である血液の粘度の実測例をFig. 3に示した。血液の非ニュートン性は血漿成分、血球成分および両者の相互作用に由来する。次項では血液の粘度を決定する様々な要因について解説する。

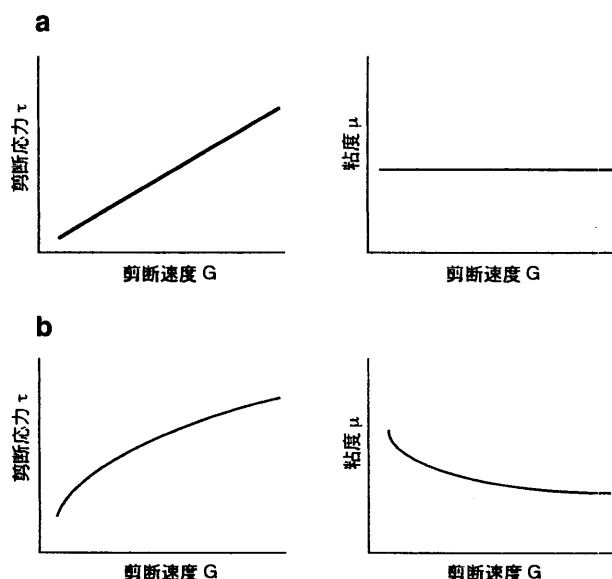


Fig. 2 ニュートン流体(a)と血液(b)の流動特性

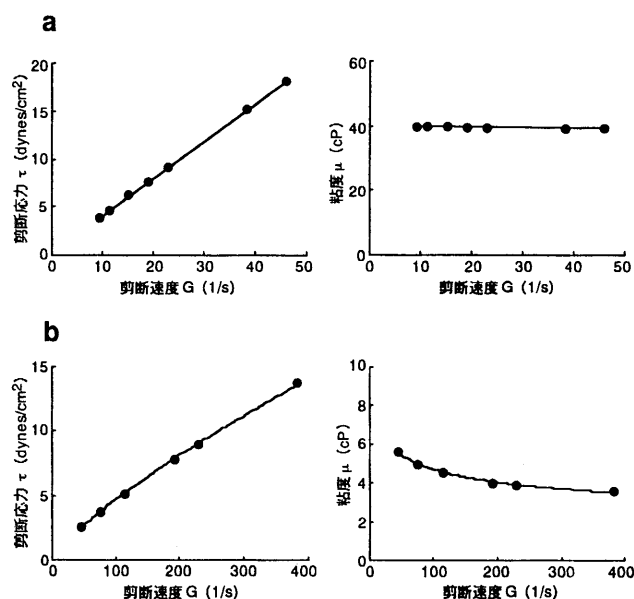


Fig.3 シリコンオイル(a)とクエン酸採血したヒト血液(b)の粘度。コーンプレート型回転粘度計を用いて測定した。

3. 血液の粘度

全血あるいは血漿粘度の測定にはコーンプレート(円錐-平板)型あるいは円筒型の回転式粘度計が広く用いられている。前項で述べたとおり血液は非ニュートン流体であり剪断速度に依存して粘度が変化する。このため何点かの剪断速度のもとで粘度を測定することが必要となるが、回転式粘度計は様々な剪断速度における血液粘度を簡便に測定することができる。糖尿病や高血圧、マクログロブリン血症など様々な病態で血液粘度が増加して循環障害を引き起こすことが知られており、血液粘度測定は臨床的に重要な意義を持つ。全血の粘度は 37°C 、剪断速度 $230/\text{s}$ においておよそ $3.5 \sim 4\text{cP}$ 、血漿粘度は $1.3 \sim 1.4\text{cP}$ である。

血液は血漿中に血球成分が浮遊するサスペンションであり、主として次の要素によって粘度が決まる。

- 血漿粘度
- ヘマトクリット
- 赤血球の凝集
- 赤血球の変形能

血漿は様々な蛋白質の水溶液と見なすことができる。蛋白質溶液の粘度は蛋白質の濃度、分子量、分子形態によって決まり、血漿蛋白ではフィブリノーゲン、グロブリン、アルブミンの順に粘度に与える影響が大きい。血球成分には赤血球の他白血球と血小板がありそれぞれのレオロジー的研究も多いが、通常は占有体積の大きい赤血球が血液粘度に最も大きな影響を及ぼす。ヘマトクリットが大きくなると血液粘度は上昇し、剪断速度に依存した粘度の変化すなわち非ニュートン性が大きくなる。

血液を自己血漿で希釈して顕微鏡下で観察すると、赤血球どう

しが衝突した後に面と面が結合してコインを重ねたような連鎖(rouleaux)を形成する。さらに時間をおくと長い連鎖が互いに結合し、三次元的な凝集が形成される。赤血球の集合は血漿蛋白であるフィブリノーゲンやグロブリンが赤血球の膜と膜の間を架橋することによって生じるのであって、洗浄して生理食塩水に再浮遊した赤血球では集合は生じない。人工高分子であるデキストランやヒドロキシエチルスターチ(HES)も赤血球集合を引き起こす。赤血球凝集は可逆的であり流れが緩やかでないと生じないため、低剪断域の測定における血液の粘度や非ニュートン性に寄与する。ある病態下では赤血球凝集が促進していることが知られている。赤血球凝集の測定機器も開発されているが、臨床的には簡便な赤血球沈降速度(erythrocyte sedimentation rate, ESR)が凝集の指標として用いられる。

赤血球は、その長径以下の直径の毛細血管を容易に通抜けれることから分かるように、大きな変形能を有する。赤血球の変形能は膜の弾性、赤血球の内部粘度、ヘモグロビンやATPの含有量など様々な要因によって決まる。グルタルアルデヒドなどで赤血球を硬化させると剪断速度に依存した粘度の低下が起こらなくなることから、赤血球変形能は主に高剪断域における血液の粘度低下に寄与していると考えられる。赤血球変形能を評価する方法はいろいろあるが、3あるいは5 μm の孔を持つポリカーボネートの膜を赤血球サスペンションが通過するのに必要な時間、あるいは圧力を指標とすることが多い。

なお流体と血液レオロジーに関する詳細は文献1-4)を参照されたい。

4. 赤血球代替物と血液粘度

4.1 修飾ヘモグロビン

ヘモグロビン分子はそのままでは体内残留時間が短いことや酸素親和性が高いことなどから、様々な修飾を施した分子が赤血球代替物として用いられる。通常のヘモグロビン水溶液は濃度が高くなると非ニュートン性を呈するが、赤血球代替物として用いられる7g/dL前後の濃度ではニュートン流体であり、生理食塩水に7g/dLのヘモグロビンを溶かした溶液の粘度は1.2cP程度である^{5,7)}。ヘモグロビン分子を修飾することによって溶液の粘度は変わってくる。例えば3量体の人工ヘモグロビン溶液は通常の4量体ヘモグロビン溶液に比べ粘度が低い⁸⁾が、デキストランで修飾したヘモグロビンの溶液は粘度が高くなる⁹⁾。実際に輸注する際の液体の粘度はアルブミンなどを加えることにより容易に変えることができ、これは他の赤血球代替物でも同様である。

ヘモグロビンや3量体ヘモグロビンは赤血球の凝集に殆ど影響を与えなかったと報告されている^{5,8)}が、次のように修飾することで赤血球凝集が影響を受ける。1)HESで修飾したヘモグロビンはESRを促進した⁶⁾。2)デキストラン修飾したヘモグロビンは赤血球凝集を促進した⁹⁾。3)ピリドキシル化したヘモグロビンは血液のスタンプスメア(塗抹標本)で容量依存性に赤血球の連鎖を増加させた¹⁰⁾。4)ピリドキシル化したヘモグロビンをイヌに輸注した後の血液スタンプスメアでは、赤血球凝集が増加していた¹¹⁾。このようにヘモグロビンは修飾の仕方によっては赤血球凝集を促進し、低剪断域における血液粘度を上げる可能性を持つ。赤血球の変形能と修飾ヘモグロビンの関係に関する報告は殆どないが、3

量体のヘモグロビンを用いた研究では、赤血球変形能に影響を与えなかったことが報告されている⁸⁾。しかし前述のごとくHESなどで修飾したヘモグロビンは赤血球凝集を促進することから赤血球膜表面に分子が付着していると考えられ、変形能にも影響を与える可能性がある。

4.2 リポソーム内包型ヘモグロビン(LEH)

LEHを含む溶液は非ニュートン流体で、血液のように剪断速度が低くなると粘度が上昇する性質を持つ¹²⁾。水溶液中のLEH濃度が高くなると粘度が上昇し、同じLEH濃度の場合、含有するヘモグロビン量やLEHを構成するリポソームの組成によって溶液の粘度やニュートン性が変わってくる。空のリポソームは剪断速度に応じた粘度変化が大きい¹³⁾が、ヘモグロビンを内包することでこの粘度変化は小さくなりニュートン流体に近づく¹³⁾。またLEHは内包するヘモグロビン濃度が高くなると粘度が上昇することが確かめられている¹⁴⁾。リポソームにコレステロールを含有したLEHは含有していないLEHに比べて剪断速度に依存した粘度変化が小さくなるが、溶液の粘度そのものは上昇する¹³⁾。LEHの脂質表面をポリエチレングリコール(PEG)で修飾するとLEH溶液の粘度が半分以上に低下し、またニュートン流体に近づくことが報告されている。この現象はPEGがリポソーム同士の凝集を防ぐためだと考えられている。実際、LEHを輸注したハムスターの微小循環を観察すると、通常のLEHでは血管内でLEHの凝集が観察されたが、PEG修飾したLEHでは凝集が見られず、局所血流量や酸素飽和度もPEG修飾したLEHの方が良好であったという¹⁵⁾。

LEHが赤血球の凝集や変形能に及ぼす影響は殆ど調べられていないが、表面修飾を施していないLEHが赤血球凝集には影響を及ぼさなかったという報告がある¹⁶⁾。

4.3 パーフルオロケミカル(PFC)

PFCは水溶性ではないので、リン脂質などによって乳化したエマルジョン(懸濁液)として使用される。PFCエマルジョン粒子の直径は0.1~0.2 μm で、代替物として用いられるエマルジョンは基本的にニュートン流体とされるが、エマルジョン粒子の大きさや濃度によって非ニュートン流体と成りうる¹⁷⁾。PFCの種類によって赤血球の変形能に対する影響が違ってくることを示す報告がある。PFCとしてperfluorotributylamineを含むOxypherol(Fluosol43)と全血を混合してインキュベーションした後では、赤血球変形能の低下が認められた。しかしPFCとしてperfluorotripropylamineを含むFluosol-DAではこのような変形能の低下は認められなかった¹⁸⁾。後のNMRを用いた研究で、Oxypherolによる変形能の低下はエマルジョン粒子が赤血球膜に付着したために起こることが示唆された¹⁹⁾。なおOxypherolを洗浄赤血球と混合してインキュベーションしても変形能の低下は見られなかったことから、Oxypherolが赤血球膜に付着して赤血球変形能の低下を引き起こす効果は血漿蛋白に仲介されると考えられている¹⁹⁾。

PFC(Fluosol)が赤血球凝集を低下させたとする報告がある²⁰⁾。しかしこの報告では20%の血漿をPFCで置換してESRを測定したものであり、血漿フィブリノーゲン濃度が低下した結果赤血球凝集が減少したと考えられ、PFCの直接効果かどうかは定かではない。

4.4 赤血球代替物とhemodilution

以上見てきたように、現在分っているだけでも赤血球代替物が血液レオロジーに及ぼす影響は一様ではない。さらに実際の輸注ではさまざまなplasma expanderと併用される可能性もあり、そのときの総体的な影響も考慮しなければならない。赤血球代替物は出血時における循環血液量の確保という目的だけでなく、脳血流障害などの局所循環改善のためのいわゆるhemodilutionに用いられる可能性も高いことから、血液粘度に及ぼす影響すなわちレオロジー的な研究は詳細に行われる必要がある。一般にhemodilutionは血液粘度を低下させ血流の増加を期待するものである。赤血球代替物には微視的には血液粘度を上昇させる効果を持つものもあるが、溶液の粘度自体は容易に変えられ、また酸素運搬能が大きいことからhemodilutionの用途に適すると見なされている²¹⁾。実際、脳血管障害を有する患者²²⁾や実験的脳虚血の猫²³⁾でPFCによるhemodilutionを施したところ、脳血流量が増加し血管拡張が認められたという報告もあり、今後も単純な輸血以外の適用が模索されていくと思われる。しかし一方、ラットに重合ウシヘモグロビン溶液を輸注した場合と、polyvinylpyrrolidoneを添加して粘度を4倍に高めた溶液を輸注した場合とでは脳血流量および血中酸素量には差が認められなかったとする報告がある²⁴⁾。すなわち輸注する溶液粘度が脳血流量の決定要因にはならないという。Intaglietta²⁵⁾も血液粘度の低下と血中酸素の上昇は血管収縮を促進することから、低粘度の赤血球代替物によるhemodilutionは必ずしも血流の改善に効果的でないと述べ、今後赤血球代替物の微小循環への影響を詳しく検討する必要があるとしている。赤血球代替物を輸注した実験では循環機能が改善されたという報告が多いが、Intaglietta²⁵⁾が指摘しているとおり微小循環に対する影響まで調べられたものは少なく、単純に低粘度だから好ましいと考えるのは早計であろう。また各代替物の稿で紹介したように血液レオロジーに与える影響についても検討が十分に なされているとは言い難い。個々の製剤の流体力学的特性、他の物質と混合したときの性状、血液の流動特性、特に微小循環に及ぼす影響などをさらに明らかにしてゆく必要がある。

参考文献

1. 磯貝行秀. クリニカルヘモレオロジーの現状と展望. 日本バイオレオロジー学会誌 1996;10:1-26.
2. 村上謙吉. やさしいレオロジー. 東京: 産業図書, 1986.
3. 岡小天. バイオレオロジー. 東京: 裳華房, 1974.
4. 谷田好通. 流体の力学. 東京: 朝倉書店, 1994.
5. Cerny LC, Stasiw DM, Cerny EL. Biophysical properties of resuscitation fluids. Crit Care Med 1982;10:254-60.
6. Cerny LC, Cerny EL, Cerny ME, Baldwin JE, Gill B. Mixtures of whole blood and hydroxyethyl starch-hemoglobin polymers. Crit Care Med 1983;11:739-43.
7. DeVenuto F. Hemoglobin solutions as oxygen-delivering resuscitation fluids. Crit Care Med 1982;10:238-45.
8. Stetter MN, Baerlocher GM, Meiselman HJ, Reinhart WH. Influence of a recombinant hemoglobin solution on blood rheology. Transfusion 1997;37:1149-55.
9. Menu P, Donner M, Faivre B, Labrude P, Vigneron C. In vitro effect of dextran benzene-tetra-carboxylate hemoglobin on human blood rheological properties. Art Cells Blood Subs Immob Biotech 1995;23:319-30.
10. Alonsozana GL, 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 Cardiothor Vasc Anesth 1997;11:845-50.
11. 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.
12. Deshpande SV, Beissinger RL. Liposome-encapsulated hemoglobin using film hydration processing to form artificial red blood cells. Biomat Art Cells and Immob Biotech 1993;21:135-51.
13. Jopski B, Pirkel V, Schmidt KH. Viscosity measurements of suspensions of hemoglobin containing liposomes of varying lipid composition. Biomat Art Cells Art Organ 1990;18:345-58.
14. Chung TW, Chu SN, Chen WK, Lee CJ. A rheological equation to express the relations among hemoglobin contents, hematocrits, and viscosity of hemosome. Art Cell Blood Subs Immob Biotech 1995;23:153-61.
15. Sakai H, Tsai AG, Kerger H, Park SI, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E, 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.
16. Nakachi O, Tokuyama S, Satoh T, Tsuchida E. Characteristics of poly lipid/Hb vesicles (ARC) (in vitro and in vivo test). Biomat Art Cells Immob Biotech 1992;20:635-40.
17. Djordjeovich L, Kashani A, Miller IF, Ivankovich AD. Measurements of viscosity of synthetic erythrocyte suspensions. Biorheology 1987;24:207-17.
18. Holloway GM, O'Rear EA, Fung BM. Plasma-mediated alterations of erythrocyte deformability by perfluorochemical blood substitutes. Blood 1986;67:173-6.
19. Tuliani VV, O'Rear EA, Fung BM, Sierra BD. Interaction between erythrocytes and a perfluorochemical blood substitute. J Biomed Mater Res 1988;22:45-61.
20. Kameneva MV, Borovetz HS, Antaki JF, Litwak P, Federspiel WJ, Kormos RL, Griffith BP. Effect of perfluorochemical emulsion on hemorheology and shear induced blood trauma. Possible mechanisms and future applications. Adv Exp Med Biol 1997;411:383-90.
21. 山本正博. Hemodilution. 日本バイオレオロジー学会誌 1997; 11:62-71.
22. Nagasawa S, Handa H, Yonekawa Y, Oda Y, Tsuda Y, Yokoyama K. Effects of a transfusion with a blood substitute (Fluosol-DA, 20%). Part II: Human cerebral blood flow. Neurol

Res 1983;5:19-30.

23. Peerless SJ, Ishikawa R, Hunter IG, Peerless MJ. Protective effect of Fluosol-DA in acute cerebral ischemia. *Stroke* 1981;12:558-63.
24. Waschke KF, Krieter H, Hagen G, Albrecht DM, Van Ackern K, Kuschinsky W. Lack of dependence of cerebral blood flow on blood viscosity after blood exchange with a Newtonian O₂ carrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994;14:871-6.
25. Intaglietta M. Whitaker Lecture 1996: microcirculation, biomedical engineering, and artificial blood. *Annal Biomed Eng* 1997;25:593-603.

エホバの証人から見た輸血の代替療法の意義

The Significance of Blood Alternatives from the Viewpoint of Jehovah's Witnesses

有賀 友則

Tomonori Ariga

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。エホバの証人が輸血以外の医療を選択するのは主として宗教上の理由によるが、同時に、輸血には数多くの医学的な危険が潜んでいることも周知の事実となっている。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大変意義深いことであると考ええる。また、こうした背景の中、近年世界中で「無輸血治療プログラムを持つ病院」が増加している。患者が宗教上の理由であれ、医学上の理由であれ、輸血に同意しない場合、輸血の代替療法は重要な役割を果たすことになる。さらに、患者の自己決定権を尊重することの必要性については、最近の裁判例によっても裏付けられている。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、安全で有効な人工血液を含む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ると考えられる。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。

Jehovah's Witnesses greatly cherish life and health. They therefore willingly accept quality nonblood medicine. Blood alternatives are also of great significance to them. They choose medical treatment without blood mainly because of religious reasons. At the same time, it is well known that blood entails various medical risks. Therefore, the study and development of blood alternatives will no doubt bring benefits not only to Jehovah's Witnesses, but also to all patients. In this background, hospitals with bloodless treatment programs are increasing in the world. When a patient does not consent to the use of blood for religious or medical reasons, blood alternatives have an important role. Also, recent court cases emphasized the necessity to respect the patient's right to self-determination. In addition to avoiding blood risks, many people today are requesting holistic medical treatment. Therefore, the study and development of safe and effective alternatives will increase in significance, for it enlarges the options for patients. We deeply appreciate the efforts that have been made in this regard by doctors and researchers, and hope for further success.— **Keywords:** Jehovah's Witnesses, Blood Alternatives, Patient's right to self-determination

1. はじめに

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。なお、エホバの証人が血液代替物としてどのようなものを受け入れるかについては、本誌1997年Vol. 5, No. 4に詳述したとおりであるが、エホバの証人は聖書の原則に基づき、全血はもちろんのこと、血液の主要成分とみなされる赤血球、白血球、血小板、血漿を受け入れない¹⁾。しかし、アルブミンや免疫グロブリン、凝固因子などの血漿分画製剤については、自らの良心に照らし受け入れられると判断するエホバの証人もいる。また、貯血式自己血輸血は受け入れないが、患

者の循環系と常時つながった状態が保たれ、血液の貯蔵を伴わない術中回収式あるいは希釈式自己血輸血は受け入れるエホバの証人もいる。本稿では特に、エホバの証人から見た輸血の代替療法の意義、医療現場での対応、関係する法的側面について論じる。

2. 輸血の危険

エホバの証人が輸血以外の医療を選択するのは主として宗教上の理由によるが、医学的な面からも一般に輸血を極力用いないことが望ましいと言われている。The Royal College of Surgeons of Englandは、1996年に発行したCode of Practice for the Surgical Management of Jehovah's Witnessesの中で、「輸血に伴う危険を考

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、〒243-0496 神奈川県海老名市中新田1271。

Watch Tower Bible and Tract Society, Hospital Information Services, 1271 Nakashinden, Ebina, Kanagawa Pref, 243-0496, Japan. 論文受付1998年11月2日。

えると、できる時にはいつでも代替処置について検討することが望ましい」²⁾と述べている。

さらに、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、「血液製剤は、人体由来の血液を原料とするため、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」³⁾と述べている。また、「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、必要量に限りて使用されるべきである」と指摘している。そして今後、「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」としている。したがって、安全で有効な人工血液を含む輸血の代替療法の研究や開発は、エホバの証人だけではなく、すべての患者に益をもたらす大変意義深いことであると言える。実際に、1996年2月にカナダで行なわれたギャラップ調査によると、カナダ国民の89%が輸血に代わる方法を望むという結果が出ている。また、「東京新聞」1997年8月30日付の夕刊の第1面には、「輸血なしの手術受け付けます」と題して、希望する患者に心臓血管系の無輸血手術を施している新東京病院に関する記事が掲載された。その記事では、同病院の患者の8割が無輸血手術を望むと報じられている。American Hospital Associationが出版するAHA News誌が述べるとおり、「宗教的信条として始まったものが、現在では、医療上の好ましい選択、また先端技術へと進展している。無輸血の医療や手術は、エホバの証人の教理によって促されたという面もあるが、今では一宗教社会の必要という枠を超え、国中の手術室に取り入れられている」⁴⁾のである。

3. 無輸血治療プログラムを持つ病院

こうした背景の中、近年いわゆるbloodless center、つまりエホバの証人に限らず無輸血治療を望む患者との間で明確な医療契約を結び、様々な医療技術を駆使して同種血を用いずに治療を施す病院が増加している。現在、世界で約120の病院がこのようなプログラムを提供している。米国のタイム誌の1997年秋季特別号には、なぜ多くの医師が無輸血手術を奨励するかについて扱った記事が掲載された⁵⁾。「エイズへの恐れは理由の一つにすぎない」とその記事は述べている。同記事は特に、ニュージャージー州にある無輸血医療外科推進研究所でなされている事柄を取り上げた。タイム誌は次のように述べている。「同研究所は、供血血液を全く使用せずに、普通なら輸血が行なわれるような外科手術を幅広く提供している。さらに、失血を劇的に抑える、もしくはほとんど無くす技術も差し伸べている」。これらの病院は同種血の使用を回避するため、エリスロポエチン、術中回収式や希釈式の自己血輸血、アルゴン光線凝固装置、経皮的モニターなどを駆使している。

日本においては、現在、エホバの証人の治療に関して相談や移送に応じる医師の数は約1万6,000人に達している。無輸血治療プログラムを持つ病院が三つあり、ほかにも多数の病院がエホバの証人の意思を尊重して治療に当たるというガイドラインを作成

している。日本において無輸血治療プログラムを持つ病院の一つはそのパンフレットの中で、こうしたプログラムを設けるようになった背景について次のように述べている。「インフォームド・コンセントの概念もようやく日本にも定着しつつありますが、医療は基本的には医療行為を受ける側と施す側との信頼関係であり、いたわりの気持ちこそ不可欠のものです。私たちは患者さんに適切な医学的情報を公平に与えなければなりませんし、患者さんが望まないこと、承諾をしていないことは決してできません。私たちの目指すところは、患者さんの意思を十分に尊重した上で、安心できる最良の医療技術を提供することです。以上のような理念から私たちは、輸血を決して望まない方々のために無輸血治療、無輸血手術の態勢を整えて参りました。輸血を用いない治療をお望みになるのは、さまざまな理由があらわれることと思います。たとえばエホバの証人の方々のように真摯な宗教上の強い信念をお持ちなのかもしれません。或いは近年、大問題となってしまいました肝炎やエイズのような輸血による感染症の危険に将来さらされたくないと考えておられるのかもしれません。また、厚生省通達にありましたように致命的なGVHD(移植片対宿主病)などの新たな問題の発生を見るに及び、私たちも無輸血治療、無輸血手術に全精力を注ぐべきとの結論に達した次第です。とりわけ私たち外科医は安易な輸血に頼らず、一滴の血液さえもおろそかにしない丁寧な手術を心掛けねばなりませんし、ひいては無輸血手術こそが究極の技術的目標と考えています」⁶⁾。このような無輸血治療プログラムを持つ病院では、無輸血治療を施すことに同意した各科の医師たちが協力し、要請があるとき迅速に良質の無輸血治療を施す態勢を整えている。こうした病院が世界中で増加していることは、患者の意思を尊重するという倫理的観点からはもちろんのこと、医学的観点からも輸血の代替療法が時代の要請であることを示唆しているように思われる。

4. 輸血のコスト

前述のタイム誌は輸血の代替療法を考慮すべきもう一つの理由として、輸血の費用について指摘し、次のように述べている。「コストも考えなければならない。輸血の費用は、事務経費を除いても1回につき500ドルで、請求額の合計は毎年10億ドルから20億ドルに上っており、代替療法を考えさせるに十分の理由となっている」。輸血そのものの費用だけではなく、輸血の検査体制の強化にかかる費用、またエイズや肝炎など輸血後合併症の治療費なども考え併せると、安全で有効な代替療法は長期的に見てメリットが大きいと考えられる。

5. 治療の選択肢を広げる

1997年4月以降、各医療機関は厚生省の決定に従い、輸血を行なう際には文書による患者の同意を得るようになっていく。前述の「血液行政の在り方に関する懇談会」報告書も「医師は、輸血用血液製剤等を投与する際には、血液製剤が絶えず危険性をはらんでいるということを十分認識した上で、患者に対し安全性、必要性等に関する十分な説明をし、同意を得て投与する必要がある」と述べている。興味深いことに、1998年5月に日本輸血学会インフォームド・コンセント小委員会の報告書の中で紹介されている輸血に関する説明と同意書には、輸血に同意する欄だけでは

なく、拒否する欄も設けられている⁷⁾。これは、輸血同意書が単に同意を前提としたものではなく、十分な情報に基づき同意するか拒否するかを選択する機会を患者に与えるという、同意書本来の在り方を反映したものであると思われる。

エホバの証人のように、いかなる状況下でも輸血を受け入れないという立場を取る人はそれほど多くはないかもしれないが、いずれにしても、患者が宗教上の理由であれ、医学上の理由であれ、輸血に同意しない場合、輸血の代替療法は大変重要な意義を持つことになる。なぜなら、輸血に代わる良質の治療法は患者の選択の幅を広げ、患者に自らの価値観や願いに沿った治療を受ける機会を与えることになるからである。

6. エホバの証人の輸血拒否にかかわる裁判例

治療に当たって患者の価値観や願いを尊重することの重要性は、輸血にかかわる幾つかの裁判によっても裏付けられてきた。一つは、1985年に大分県で起きた事件である。患者は、骨肉腫に侵され、病院に入院中の成年男子であった。担当医師は左足の早期切断手術を勧めたが、患者はエホバの証人の宗教上の理由から、手術に伴って必要とされる輸血を拒否した。患者の両親はエホバの証人ではなく、切断手術およびそれに伴って必要とされる輸血処置を医師に委ねることの許可を裁判所に求めた。大分地方裁判所は、その申請を却下する決定を下した。裁判所はその理由として、患者が「正常な精神的能力を有する成人」であり、「輸血拒否によってもたらされる自己の生命、身体に対する危険性について十分知覚したうえで、なお輸血を拒み続けている」こと、患者が「真摯な宗教上の信念に基づいて輸血拒否」をしていること、「その行為も単なる不作為行動に止まる」ことなどの理由から輸血拒否行為には違法性がない旨を述べた。さらに、患者が「輸血を拒む以外切断手術を含む他のあらゆる治療を受け、その完治、生命維持を強く願望している」こと、また「治療方法としても、放射線療法や化学療法など他の方法も存在すること」などを挙げ、輸血拒否行為を生命の尊厳に背く自己破壊類似の行為と見ることはできないとした⁸⁾。

さらに、その上訴審(抗告審)である福岡高等裁判所は次のように述べて、患者の自己決定権に基づく輸血拒否行為が法律上尊重されるべきとの判断を示した。「およそ患者は、医療行為の客体としての一面を有すると同時に、人間として人権を尊重される主体的な存在であるから、医療行為の目的達成のために手術が必要とされる場合であっても、これにつき患者の承諾が必要とされるのであって、このことは、患者の有する自らの基本的人権にもとづく自己決定権を尊重する所以にほかならない。したがって、患者が右自己決定権を行使したときは、それが本人の自由な意思に基づくものであるかぎり、右意思は充分尊重されなければならない」⁹⁾。

輸血にかかわるもう一つの裁判は、1998年2月9日に東京高等裁判所が患者側勝訴の逆転判決を下した無断輸血事件に関するものである。1992年、当時63歳のエホバの証人の女性は、都内のある病院で肝臓に腫瘍があると診断されたものの、その病院で無輸血での治療ができないと断われた。その後、エホバの証人の無輸血治療に協力したことがあるという東京大学医科学研究所附属病院の医師を紹介された。患者は手術に先立って、担当医師らに

信仰上の理由から輸血を受け入れられないことを説明すると共に、輸血を受け入れないことによって生じるかもしれないかなる損害に対しても医師の責任は問わない旨を記した「免責証書」を提出した。医師たちは、「分かりました」と言ってそれを受け取った。しかし、医師たちは実際には無輸血手術のための準備はほとんど行わず、かえって輸血を準備して手術に臨み、術後管理が困難になるという理由で輸血を施した。医師たちは輸血の事実を患者やその家族に隠蔽していたが、その後内部告発によってそのことが明るみに出た。自らの意思に反して輸血が強行されたことを知った患者は甚大な精神的苦痛を受けたとして、病院側を相手に損害賠償請求の訴えを提起した。

第一審の東京地方裁判所の判決は患者側の請求を棄却した。裁判所は、手術中いかなる事態になっても輸血しないという合意は公序良俗に反すると判断した。そして、輸血を拒否するという患者の意思を知りながら、それを尊重するように見せかけて手術を行なったことは、患者の自己決定権や信仰上の良心を違法に侵害したとは言えず、さらに、輸血は患者の生命を救おうとして行なわれたものであるから違法性はないと判示した¹⁰⁾。

これに対し、東京高等裁判所は患者側逆転勝訴の判決を言い渡した。まず、無輸血治療契約の有効性については次のように述べた。「当事者双方が熟慮した上で右合意が成立している場合には、これを公序良俗に反して無効とする必要はないと考える。すなわち、人が信念に基づいて生命を賭しても守るべき価値を認め、その信念に従って行動すること……は、それが他者の権利や公共の利益ないし秩序を侵害しない限り、違法となるものではなく、他の者がこの行動を是認してこれに関与することも、同様の限定条件の下で、違法となるものではない。ところで、エホバの証人の信者がその信仰に基づいて生命の維持よりも輸血をしないことに優越的な価値を認めて絶対的無輸血の態度を採ること及び医師がこれを是認して絶対的無輸血の条件下で手術を実施することは、それが他者の権利を侵害するものでないことが明らかである」¹¹⁾。判決はこのように、いかなる事態になっても輸血しないという契約は法的に有効であり、それに基づく治療も許容されることを明確にした。

さらに、同判決は患者の自己決定権を明確に認め、次のように述べた。「[手術に対する患者の]同意は、各個人が有する自己の人生のあり方(ライフスタイル)は自らが決定することができるという自己決定権に由来するものである」。また、自己の生命の喪失につながるような自己決定権は認められないという医師たちの主張に対しては、「人はいずれは死すべきものであり、その死に至るまでの生きざまは自ら決定できるといわなければならない」。さらに、「仮に、本件輸血が[患者]の救命のために必要であったことをもって本件輸血の違法性が阻却されるものとすれば、同被控訴人らは、[患者]の意思にかかわらず、また、前記説明をするとしないとにかかわらず、およそ本件輸血は違法でないこととなるが、このような考え方は、前判示のとおり、救命のためという口実さえあれば医師の判断を優先することにより、患者の自己決定権をその限りで否定することとなるから、採用できない」とも論じている。

また、この判決は、本件における医師の説明義務違反を明確に認め、次のように述べた。「被控訴人医師らは、できる限り輸

血しないこととするが、輸血以外に救命手段がない事態になった場合には輸血する治療方針、すなわち、相対的無輸血の治療方針を採用してしながら、【患者】に対し、この治療方針の説明をしなかった」と述べた。さらに、インフォームド・コンセントにおける医師の情報提供の在り方についても言及し、「その説明の内容は、具体的な患者に則し、医師の資格をもつ者に一般的に要求される注意義務を基準として判断されるべきものである。……医師は、エホバの証人患者に対して輸血が予測される手術をするに先立ち、同患者が判断能力を有する成人であるときには、輸血拒否の意思の具体的内容を確認するとともに、医師の無輸血についての治療方針を説明することが必要であると解される」と判示した。医師側は損害額として弁護士費用5万円と合わせ計55万円の支払いを命じられた。この額について、多くの法律家は低すぎると述べている。この額は、日本社会においては一般に、宗教的信条などの人格的利益に対する評価が欧米に比べ極めて低いことと関係があるように思われる。現在、本件は医師側により最高裁に上告され、係争中であるが、この点に関するさらに踏み込んだ判断が期待される。

以上のように東京高裁判決がインフォームド・コンセントに関して示した判断は、エホバの証人の患者が関係する場合に限らず、広く医師—患者間の信頼関係の促進につながると考えられる。判決は、患者が自分の重要視する事柄を医師に明確に伝えたなら、医師はそれに関する自分の治療方針を十分に説明すべきであることを指摘した。また、医師が患者の意向を尊重して治療を行なうなら、医療過誤がない限り医師の責任が問われることはないことを明確に示した。医師と患者が十分なコミュニケーションを図って信頼関係を育み、協力して病気に立ち向かうなら、医師も患者も安心して治療に取り組めるに違いない。

朝日新聞1998年2月10日付は、この判決について次のように論評している。「東京高裁は9日、人生のあり方は自分で決めるという患者の自己決定権を重視して、同意を得ずに輸血したのは違法との判断を示した。医療現場で築かれてきたインフォームド・コンセント(十分な説明に基づく同意)の考え方を、司法の場で正面から取り上げ、患者の側に立って後押しする意味を持つと言える。一審判決は『生命を救うためにした輸血は、(同意がなくても)社会的に正当な行為で違法性はない』という立場をとった。しかし、こうした考えは、『救命のためという口実さえあれば、医師の判断を優先させることで、患者の自己決定権を否定することになる』(高裁判決)ともいえる。専門家の間では『インフォームド・コンセントの考え方を大きく後退させる』との批判があった。医療現場では、『どんな場合でも輸血を受けない』というエホバの証人の信者への対応が、患者側に立って進められてきた経緯がある。日本医師会の生命倫理懇談会は1990年、輸血をしないことを条件にした手術を行うこともやむを得ないとする見解を示した。患者の意思を尊重して緊急時でも輸血しないとの見解を発表した医療機関も、少なからずあった。今回の高裁判決は、こうした医療現場の動きに沿うものと言える」。

この判決について、民法学教授である山田卓生は同じ新聞記事の中で、「司法の場で患者の自己決定権を正面から認めた画期的な判決といえる。同意がない輸血は違法だという考え方は、インフォームド・コンセントの考え方が定着しつつある医療現場で

はすでに受け入れられている。逆に、医療の現場では『生命を救うためには同意がなくても輸血できる』と判示した一審判決を戸惑いを持って受け止めていたように思う。今回の判決は、病気を治すためには患者の意思を無視してもいいという考え方を明確に否定した」と述べている。

元ニューヨーク医科大学臨床外科教授である廣瀬輝夫はこの判決について次のように述べた。「これはインフォームド・コンセントの不備を理由にした判決といえる。医師や医療機関は、患者との契約条項はいかなる事情でも絶対に遵守すべきであり、患者の自己決定権を尊重した判決は当然である。私が無血人工心肺を開発し、大動脈弁不全症への大動脈弁置換に世界で初めて開心術を行った1966年から、すでに30年以上が経過している。この間、エホバの証人に対する無輸血手術を引き受ける医療機関や医師は、世界中でその数が増加している。……『宗教や信念は人それぞれ違っているもので、相手が間違っていると思っても、その人が他人に害を加えない限りその信条を尊重して、できるだけ救うべきである』」¹²⁾。

7. おわりに

現在、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を確立することは、時代の要請とも言えるものである。したがって、患者の望む選択肢を広げるという点で、安全で有効な人工血液を含む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るに違いない。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。

参考文献

1. リチャード・ベイリー、有賀友則. 輸血の代替療法に関するエホバの証人の見方. 人工血液 1997;5:47-50.
2. The Royal College of Surgeons of England. Code of Practice for the Surgical Management of Jehovah's Witnesses. 1996;1.
3. 厚生省. 血液行政の在り方に関する懇談会報告書 平成9年12月12日.
4. AHA News 1996 (January 22);7:1-2.
5. Time Special Issue. Fall 1997;74-6.
6. 稲毛病院のパンフレット.
7. 日本輸血学会インフォームド・コンセント小委員会. 日本輸血学会雑誌 1998;44:444-57.
8. 大分地裁昭和60年12月2日決定. 判例タイムズ 1986;570:30-2.
9. 福岡高裁昭和60年(ラ)第92号12月18日決定.
10. 東京地裁平成9年3月12日判決. 判例タイムズ 1998;964:82-92.
11. 東京高裁平成10年2月9日判決. 判例時報 1998;1629:34-42.
12. 廣瀬輝夫. エホバの証人 逆転勝訴の波紋—無輸血手術2万例の医師の立場から. ばんぼう 1998;4:83-4.

リコンビナントアルブミン-ヘム複合体の物性と酸素結合能

小松晃之, 浜松和芳, 松川泰子, 呉 健, 土田英俊*

Dioxygen-binding Ability of Recombinant Albumin-heme Hybrid

Teruyuki Komatsu, Kazuyoshi Hamamatsu, Yasuko Matsukawa,

Jian Wu, Eishun Tsuchida*

リコンビナントヒト血清アルブミン(rHSA)にテトラフェニルポルフィリン鉄(II)誘導体(FeP)を包接させて得たリコンビナントアルブミン-ヘム複合体(rHSA-FeP)が、生理的条件下(pH 7.4, 37°C)で酸素を可逆的に結合解離できる新しい合成ヘム蛋白質となることを実証した。FePはrHSA当たり最大8分子まで導入できる。rHSA-FeP溶液([rHSA]: 5g/dL)の粘度、膠質浸透圧、等電点、及びrHSAの二次構造はFePの結合数によらず一定であった。ヒト全血液と混合した場合でも凝集の惹起はなく、血液適合性も高い。酸素の通気に伴い速やかに酸素錯体を形成し、その酸素配位構造を共鳴ラマンスペクトル測定($\nu(\text{Fe-O}_2)$: 560 cm^{-1})から確認した。また、酸素親和性($P_{1/2}$: 33 Torr, n: 1.0)、酸素結合解離速度定数(k_{on} : 2.5×10^7 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), k_{off} : 5.6×10^2 (s^{-1}))を決定し、rHSA-FeP溶液が人工酸素輸液(赤血球代替物)としての機能を有することを明らかにした。

Incorporation of tetraphenylporphyrinato-iron(II) derivatives (FeP) into recombinant human serum albumin (rHSA) provides a new type of artificial hemoprotein (rHSA-FeP), that binds and releases dioxygen reversibly under physiological conditions (in aqueous media, pH 7.4, 37°C). The rHSA host adsorbs a maximal eight FeP molecules. The viscosity, colloid osmotic pressure, surface charge distribution, and second-order structure of the rHSA-FeP hybrid ([rHSA]: 5 g/dL, FeP/HSA = 1~8 (mol/mol)) are constant and independent of the binding numbers of FePs. Furthermore, the obtained solution showed good blood compatibility. The O_2 -coordination structure of FeP embedded into certain hydrophobic domains of the albumin was confirmed by resonance Raman spectroscopy ($\nu(\text{Fe-O}_2)$: 560 cm^{-1}). The O_2 -binding affinity ($P_{1/2}$: 33 Torr, n: 1.0) and O_2 -association and -dissociation rate constants (k_{on} : 2.5×10^7 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), k_{off} : 5.6×10^2 (s^{-1})) are also determined. These results show that rHSA-FeP hybrid has an ability to act as synthetic O_2 -infusion (red cell substitute). —Key Words: Tetraphenylporphyrinato-iron(II) derivative, Recombinant human serum albumin, Heme, Dioxygen-binding, Artificial hemoprotein, O_2 -infusion, Blood substitute.

1. 緒言

ヒト血清アルブミン(HSA, Mw: 66.5 kD)は血漿蛋白質の約60%を占め、血液の膠質浸透圧維持のほか、種々の薬物または代謝産物を非特異的に結合し体内の目的箇所へ運搬する輸送蛋白質としての役割を果たしている^{1,2)}。この非特異的多分子結合能への関心は、永年に亘ってHSAの分子包接に関する研究を促進してきた^{3,4)}。また、1989年にはHSAのX線結晶構造が解明され、ついにその立体構造の全容が明らかにされた⁵⁻⁷⁾。HSAは従来考えられていた長楕円型ではなく、正三角形に近いハート型(幅: 8 nm, 深さ: 3 nm)であった。9個のループと17個のジスルフィド結合から構成される3つのドメイン(I~III)からなり、さらにその各々は2つのサブドメイン(A, B)に分けられる。ヘモグロビンから遊離したヘミ

ン(プロトポルフィリン鉄(III)錯体)はサブドメインIB~IIAに結合し肝臓に運ばれる。結合定数(K_D)は $10^6 \sim 10^9$ (M^{-1})と報告されており⁸⁻¹⁰⁾、いわゆるポルフィリン鉄を含有するヘム蛋白質系を構成するが、従来このアルブミン-ヘミン複合体の機能応用について検討された例はほとんどなかった¹¹⁾。我々は、独自に分子設計・合成した軸塩基(イミダゾリル基)を有するテトラフェニルポルフィリン鉄(II)誘導体(FeP, Fig. 1)をHSAの疎水ドメインへ包接させると、安定なヘム複合体(アルブミン-ヘム(HSA-FeP))が得られることを明らかにしている^{12,13)}。FePの結合サイトは、サブドメインIB, IIA, IIIB他が推定されており、HSA当たり最大8分子までのFePが包接される¹⁴⁾。さらにこの合成ヘム蛋白質は、ヘモグロビンやミオグロビンと同様に生理的条件下(pH 7.4, 37°C)で酸素分

*To whom correspondence should be addressed.

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 for Sci & Eng, Waseda University, 3-4-1 Okubo, Shinjuku, Tokyo 169-8555, Japan.

論文受付98年11月5日, 受理98年11月26日.

子を可逆的に結合解離することができるので、赤血球代替物としての利用が期待されており、現在その機能評価が進められている。

また近年、ピキア酵母(*Pichia pastoris*)によるリコンビナントヒト血清アルブミン(rHSA)の大量産生技術が確立された¹⁵⁾。構造、アミノ酸配列、物理化学的特徴はHSAと完全に一致しており、HSA代替製剤としての供給を目指して2000年の上市が予定されている。我々はごく最近、このrHSAにFePを包接させたいわゆる完全合成型のヘム蛋白質、リコンビナントアルブミン-ヘム複合体(rHSA-FeP)を新たに作製し、この溶液が人工酸素輸液としての十分な機能を具有することを実証した。本報文では、rHSA-FeP複合体の物理化学的特徴と酸素結合パラメータについて報告する。

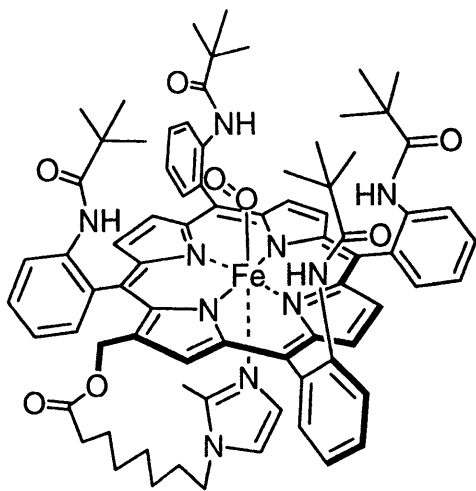


Fig. 1 Tetraphenylporphyrinato-iron(II) derivative with a covalently bound axial imidazole (FeP).

2. 実験方法

2.1 rHSA-FeP溶液の調製

FePは著者らの前報文に従い合成し¹⁶⁾、rHSA(25 g/dL (3.75 mM))は吉富製薬社製を使用した。FePのエタノール溶液([FeP]: 0.15 mM)にCO下でアスコルビン酸(AsA)水溶液を添加(AsA/FeP: 1 mol/mol)すると、中心鉄がFe(II)に還元されFeP(CO)体得られる。これをrHSAのリン酸生理緩衝溶液(10 mM, pH 7.3, [rHSA]: 18.8 μM)に滴下混合し、すぐにエタノールを減圧除去する。限外ろ過(限外分子量: 5万、圧力: 4 kg/cm²)、透析(透析膜: 分画分子量 12,000~14,000、再生セルロース)により、エタノール、酸化型デヒドロアスコルビン酸を除外し、赤色透明のrHSA-FeP(CO)溶液([rHSA]: 5 g/dL (5 wt%))を得た。異なるFeP結合比(FeP/HSA: 1, 4, 8 (mol/mol))の試料を調製し、測定に供した。得られたrHSA-FeP(CO)を酸素通気下で光照射(500W ハロゲンランプ, 5 min)すると、COが脱離しその可視吸収スペクトルはoxy型となる。さらにそこへ窒素を通気すると可視吸収スペクトルはdeoxy型へ移行し、酸素の吹き込みに伴い再びoxy型へ戻った。

HSAの定量はプロモクレゾールグリーンによる色素定量法(ア

ルブミン-テストワコー、和光純薬)により行った。

2.2 物理化学測定

等電点電気泳動はPhastsystem (Pharmacia)、CDスペクトルは円二色性分光計J-720W (JASCO)を用いて測定した¹⁴⁾。rHSA-FeP(5g/dL)のコロイド浸透圧、及び粘度は、各々コロイド浸透圧計 4420 COLLOID OSMOMETER (WESCOR)、キャピラリー粘度計 DCS300 (Anton Paar)を用いて決定した¹⁴⁾。ヒト全血液はEDTAを含む採血管で採取し、同量のrHSA-FeP溶液と混合した後、すぐに粘度測定に供した。また、共鳴ラマンスペクトルは共鳴ラマン分光光度計 NRS-2000 (JASCO)を用い、oxy体、deoxy体について測定した(励起波長: 457.9 nm (Ar⁺イオンレーザー))¹⁴⁾。

2.3 酸素親和性、及び酸素結合解離速度定数の測定

rHSA-FeP溶液([FeP]: 15 μM)に異なる酸素分圧の酸素/窒素混合ガスを吹き込み、その時の可視吸収スペクトル変化から、酸素親和性($P_{1/2}$)を決定した。酸素結合反応の熱力学パラメータ(ΔH , ΔS)は van't Hoffプロットから算出し、酸素の結合解離速度定数(k_{on} , k_{off})はレーザーフラッシュフォトリシス分光装置TSP-601 (UNISOKU)を用いて決定した¹³⁾。酸素錯体半減期($\tau_{1/2}$)はoxy体(552 nm)の吸光度の経時変化から算出した。

3. 結果および考察

赤色のrHSA-FeP([rHSA]: 5 g/dL)は調製6ヵ月後(4°C保存)でも沈殿や凝集は認められず、さわめて安定な溶液である。可視吸収スペクトルにおける427 nmの吸光度とFeP分子のモル吸光係数から、rHSAには最大8分子までのFePが導入できることを明らかにした。これは従来のHSA-FeP系の場合と同様であり、FePの逐次平衡定数は K_1 : 10^6 (M⁻¹)~ K_8 : 10^4 (M⁻¹)程度と考えられる¹⁴⁾。

一般にアルブミンへ界面活性剤などが結合した場合、高次構造変化が誘発される¹⁷⁾。しかし、rHSA-FePのCDスペクトルパターン、及びその強度はrHSA単独の場合と同様で、 $[\theta]_{208}$ の値から算出した α -helix含量¹⁸⁾も約60%であった。また、結合したFePによる誘起CD¹⁹⁾が400 nm付近に観測されなかったことから、rHSAへのFeP分子の取り込みは疎水性相互作用のみによるものと推定される。

rHSA-FePの等電点(pI)、コロイド浸透圧は、FePの結合比(1~8)に関わらず4.8(Fig. 2)、18 mmHg([rHSA]: 5 g/dL)であり、rHSAの値と同等であった。すなわちFePの結合に伴う表面電荷の変化はなく、これはアルブミン自身の本来有する特性(膠質浸透圧調整や血漿増量作用)が損われないことを意味する。さらに、rHSA-FeP溶液の粘度曲線はニュートン性であり、測定ずり速度範囲(0~350 s⁻¹)内にて一定の低粘度(1.1 cP)を示した(Fig. 3)。ヒト全血液と混合しても凝集や沈殿の惹起は見られなかった。さらに混合溶液を光学顕微鏡で観察したが、赤血球の形状に全く変化はなく、高い血液適合性が明らかとなった(Fig. 4)。

rHSA-FePのdeoxy体溶液に酸素を通気すると、可視吸収スペクトル(λ_{max} : 443, 542, 567 nm)は速やかにoxy体のスペクトル(λ_{max} : 426, 552 nm)へ移行し、その酸素結合解離は可逆的であった(Fig. 5)。続いて一酸化炭素を通気すると安定なcarbonyl体(λ_{max} : 427, 539 nm)を形成した。酸素錯体の半減期($\tau_{1/2}$)は、8hr(25°C)、2hr

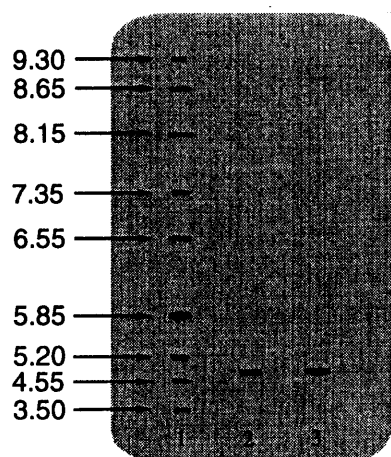


Fig. 2 IEF patterns of rHSA and rHSA-FeP. Lane 1: markers, lane 2: HSA, lane 3: HSA-FeP (8) from the left.

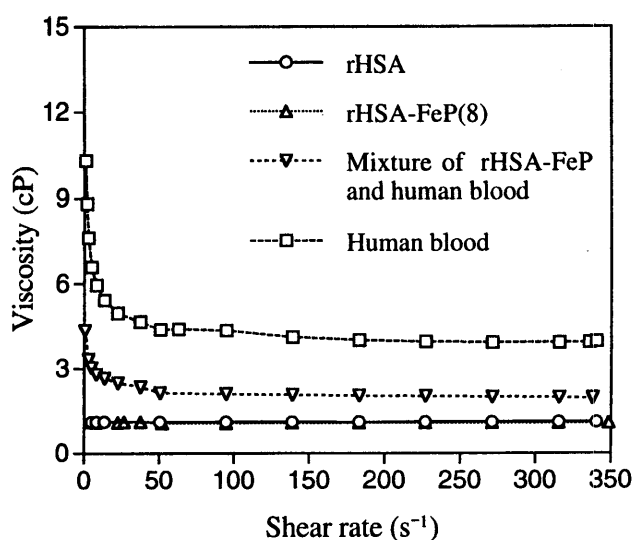


Fig. 3 Change in the viscosity of rHSA-FeP at various shear rates.

(37°C)であり、従来のHSA-FeP系と同等であった¹⁴⁾。この $\tau_{1/2}$ の値については、*in vivo*で大きく延長するという興味ある結果も得ている²⁰⁾。

次いで、共鳴ラマンスペクトル測定から、FePの配位構造、配位酸素の電子状態を確認した(Fig. 6)。deoxy型のスペクトルに見られる 198 cm^{-1} のピークは、イミダゾール基が分子内配位した5配位高スピンFe(II)錯体の $\nu(\text{Fe-Ne})$ に相当する²¹⁾。酸素の通気に伴い、新たに $\nu(\text{Fe-O}_2)$ 由来の吸収が 560 cm^{-1} に出現したことから、酸素配位錯体の形成が明らかとなった。これはヘモグロビンやミオグロビンで観測される値と類似しており、酸素分子がいわゆるend-on型で中心鉄に結合している構造を示唆する^{22,23)}。さらに、

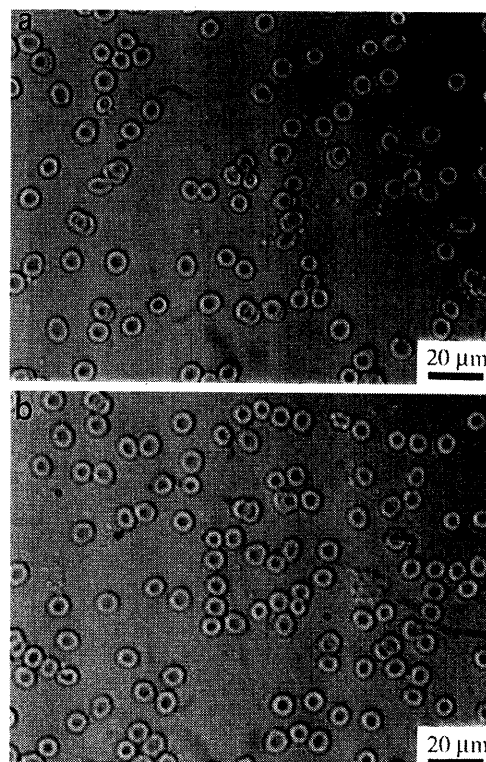


Fig. 4 Optical microscopic observation of (a) rHSA + human whole blood and (b) rHSA-FeP(8) + human whole blood.

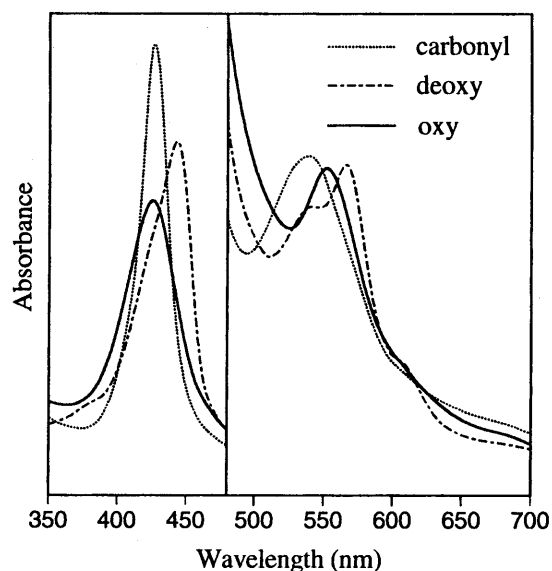


Fig. 5 Visible absorption spectral changes of rHSA-FeP in phosphate buffer (pH 7.4) at 25°C.

ポルフィリン環に基づく高強度の伸縮振動(ν_4 , ν_8)^{21,24)}も各々 1346, 370 cm^{-1} (窒素雰囲気下)から, 1364, 394 cm^{-1} (酸素雰囲気下)に移行し, deoxy体からoxy体への変換を示した。

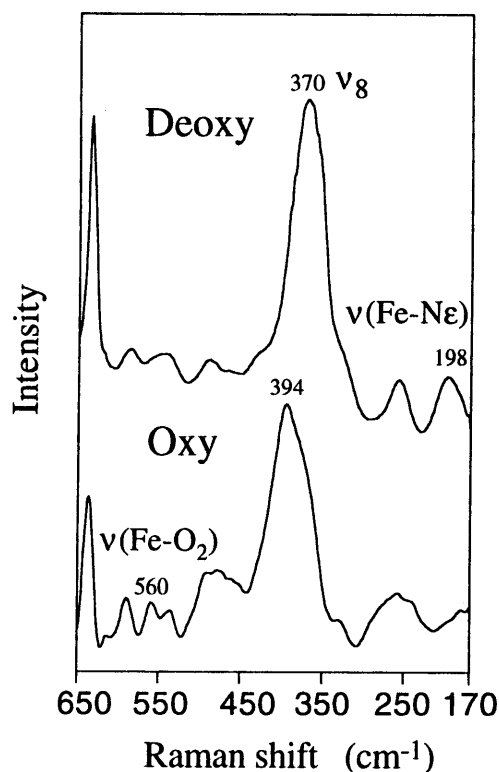


Fig. 6 Resonance Raman spectra of rHSA-FeP solution at 25°C.

rHSA-FePの酸素結合解離曲線(Fig. 7)から酸素親和性を算出した($P_{1/2}$: 33~37Torr). ヘモグロビンのような酸素結合の協同効果は見られない(Hill係数は1.0)⁸⁾, 肺(P_{O_2} : 110Torr)一末梢組織(P_{O_2} : 40Torr)間における酸素運搬効率は22%で, 赤血球の値(23%)に匹敵する十分な酸素輸送能力を有する。また, rHSA-FePの酸素結合における熱力学パラメータ (ΔH , ΔS) は, 各々 -61 kJ/mol, -114 J/K·molで, ヘモグロビンの値と同等であった(Table 1)。

Table 1 O_2 -binding parameters of rHSA-FeP at 25°C

	$P_{1/2}$ ¹⁾ (Torr)	$10^{-7}k_{on}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$10^{-2}k_{off}$ (s^{-1})	ΔH (kJ/mol)	ΔS (J/K·mol)
rHSA-FeP(4)	13 (37)	1.9	4.3	-61	-114
rHSA-FeP(8)	13 (33)	2.5	5.6	-61	-115
Red blood cell	9 (27)	0.0011	0.0016	—	—
Hb(T-state) α	40	0.29	1.8	-57 — -65	-116 — -113

¹⁾ at 37°C in parenthesis.

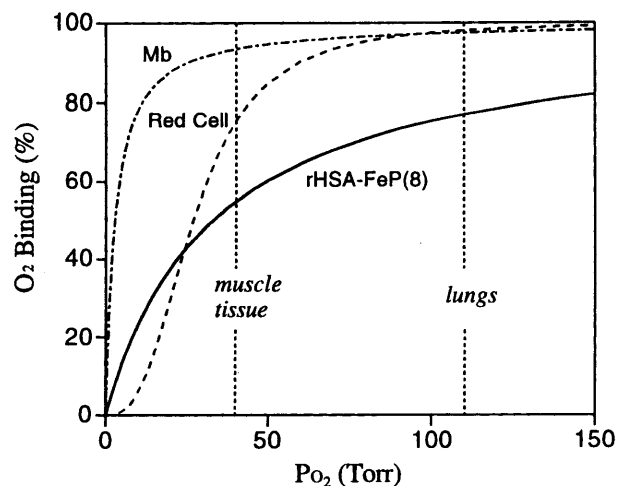


Fig. 7 O_2 -binding equilibrium curve of rHSA-FeP(8) at 37°C.

レーザーフラッシュフォトリシス法から決定したrHSA-FePの酸素結合解離速度定数(k_{on} , k_{off})は血液の値よりも10³倍大きく, 酸素を迅速に吸脱着できることが明らかとなった(Table 1). これらの結果から, rHSA-FePはヘモグロビンと同じ機構で酸素分子を結合しており, 完全合成型酸素輸液としての必要条件を兼ね備えていると考えられる。現在 *in vivo* 酸素輸送能の評価が行われているほか, より高濃度の酸素輸送を目指して多量化アルブミン-ヘム系の合成も進行している。

4. 結語

FePはrHSAに最大8分子まで包接され、得られたrHSA-FeP複合体の溶液物性はrHSA自身と変わらない。これはFePのrHSAへの結合が疎水性相互作用によるためと考えられる。rHSA-FeP溶液は高い血液適合性を示し、生理的条件下で可逆的に酸素を結合解離できる。酸素配位構造はヘモグロビンやミオグロビンと同じend-on型であると推定された。酸素結合パラメータ, 酸素輸送効率は赤血球と比較して遜色なく, rHSA-FePが酸素輸液としての機能を具有することを実証した。

謝辞

本研究の一部は厚生科学研究費補助金(高度先端医療研究事業(人工赤血球))により行われた。記して謝意を表する。

参考文献

1. Peters Jr T. All about albumin. Biochemistry genetics and medical applications. New York: Academic Press, 1996.
2. Brown JR. Serum albumin: amino acid sequence. In: Rosenoer VM, Oratz M, Rothschild MA, eds. Albumin structure, function and uses. New York: Pergamon Press, 1976;27-51.
3. Kragh-Hansen U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. Pharmacological Reviews 1981;33:17-53.
4. Peters Jr T. Serum albumin. Adv Protein Chem 1985;37:161-245.
5. Carter DC, He X-M, Munson SH, Twigg PD, Gernert KM, Broom

- MB, Miller TY. Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science* 1989;244:1195-8.
6. He X-M, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 1992;356:209-15.
 7. Carter DC, Ho JX. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem* 1994;45:153-204.
 8. Beaven GH, Chen S-H, D'Albis A, Gratzer WB. A spectroscopic study of the haemin-human-serum-albumin system. *Eur J Biochem* 1974;41:539-46.
 9. Muller-Eberhard U, Morgan WT. Porphyrin-binding proteins in plasma. *Ann NY Acad Sci* 1975;244:625-50.
 10. Adams PA, Berman MC. Kinetics and mechanism of the interaction between human serum albumin and monomeric haemin. *Biochem J* 1980;191:95-102.
 11. Bonaventura J, Brouwer M, Brouwer T, Cashon B, Caneron S. presented in part at the 11th congress ISABI, Boston, July 1994.
 12. Komatsu T, Ando K, Kawai N, Nishide H, Tsuchida E. O₂-transport albumin: a new hybrid-haemoprotein incorporating tetraphenylporphyrinatoiron(II) derivative. *Chem Lett* 1995;1995: 813-4.
 13. Tsuchida E, Ando K, Maejima H, Kawai N, Komatsu T, Takeoka S, Nishide H. Properties of and oxygen binding by albumin-tetraphenylporphyrinatoiron(II) derivative complexes. *Bioconjugate Chem* 1997;8:534-8.
 14. Komatsu T, Hamamatsu K, Matsukawa Y, Wu J, Tsuchida E. Physicochemical properties and O₂-coordination structure of human serum albumin incorporating tetrakis(*o*-pivalamido) phenylporphyrinatoiron(II) derivatives. *Bioconjugate Chem* 1998; 9: in press.
 15. Sumi A, Ohtani W, Kobayashi K, Ohmura T, Yokoyama K, Nishida M, Suyama T. Purification and physicochemical properties of recombinant human serum albumin. In: Rivat J, Stoltz JF, eds. *Biotechnology of Blood Proteins*. Montrouge: John Libbey Eurotext, 1993;227:293-8.
 16. Komatsu T, Kumamoto S, Ando K, Nishide H, Tsuchida E. Synthesis and O₂-binding properties of tetraphenylporphyrinatoiron (II) derivatives bearing proximal imidazole covalently bound at the β -pyrrolic position. *J Chem Soc Perkin Trans 2* 1995;1995:747-53.
 17. Aoki K, Okabayashi H, Maezawa S, Mizuno T, Murata M, Hiramatsu K. Raman studies of bovine serum albumin-ionic detergent complexes and conformational change of albumin molecule induced by detergent binding. *Biochim Biophys Acta* 1982;703:11-16.
 18. Greenfield N, Fasman GD. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* 1969;8:4108-16.
 19. Casella L, Gullotti M, Poli S, DeGioia L. Heam-protein interactions. The binding of heam complexes to serum albumin. *Gazzetta Chimica Italiana* 1993;123:149-54.
 20. Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E. unpublished data.
 21. Hori H, Kitagawa T. Iron-ligand stretching band in the resonance Raman spectra of ferrous iron porphyrin derivatives. Importance as a probe band for quaternary structure of hemoglobin. *J Am Chem Soc* 1980;102:3608-13.
 22. Wu J, Komatsu T, Tsuchida E. Resonance Raman studies of dioxygen binding to *ortho*-substituted tetraphenyl- and tetranaphthyl-porphyrinatoiron(II) derivatives with a covalently linked axial imidazole. *J Chem Soc Dalton Trans* 1998;1998: 2503-6.
 23. Hirota S, Li T, Philips Jr GN, Olson JS, Mukai M, Kitagawa T. Perturbation of the Fe-O₂ bond by nearby residues in heme pocket: observation of ν Fe-O₂ Raman bands for oxymyoglobin mutants. *J Am Chem Soc* 1996;118:7845-6.
 24. Desobois A, Momenteau M, Lutz M. Resonance Raman spectroscopy of iron(II) super structured porphyrins: Influence of porphyrin distortion on CO and O₂ ligand dissociation. *Inorg Chem* 1989;28:825-34.

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 (Neo Red Cell: NRC) の評価

黒澤 尋¹⁾, 木村哲寛²⁾, 緒方嘉貴²⁾, 天野義文¹⁾

Evaluation of Oxygen Carrying Capacity of Neo Red Cells (NRC) in a Bioartificial Liver Module Packed with Rat Hepatocytes

Hiroshi Kurosawa¹⁾, Tetsuhiro Kimura²⁾, Yoshitaka Ogata²⁾, Yoshifumi Amano¹⁾

人工酸素運搬体(Neo Red Cell: NRC)の酸素供給能を, モデル肝臓としての人工肝臓と再酸素化装置としての人工肺とを組み合わせた灌流型細胞培養系において評価した. 人工肝臓に充填した肝細胞の密度は 2.5×10^7 cells/cm³(全細胞数 8×10^7 cells)であった. この細胞培養系を用いて, モデル肝臓の入口及び出口における酸素濃度を測定した. 通常培地(Williams' E medium)を循環した場合は, 入口側の酸素分圧(pO_{2in})20%に対して出口側の酸素分圧(pO_{2out})は1.5%(11.4mmHg)となった. この出口側の酸素分圧は肝細胞の臨界溶存酸素濃度(pO_2 3%)よりも低いので, 肝細胞は酸素不足の状態であった. 循環液を3%-Hb NRCに切り替えると, pO_{2out} は約6%(45.6mmHg)にまで回復し, 肝細胞への酸素供給不足は解消された. この時 pO_{2in} は19%~20%で安定していた. 酸素分圧が19%から6%に変化するとき3%-Hb NRCから放出された酸素は, 酸素解離曲線より0.95mmol/Lと見積もられた. この値は通常培地の飽和溶存酸素量である0.217mmol/Lに比べ4倍以上高いものであった. 単純に酸素を付加した培地を灌流すると細胞の酸素要求は充足されたが, pO_{2in} が極端に高くなってしまい, 酸素ストレスによる細胞障害が懸念された. それに比してNRCは多量の酸素を吸蔵するが, バルク液中の溶存酸素濃度は高くなり, 細胞への酸素ストレスは問題とならなかった. NRCの優れた酸素運搬能は, 細胞の灌流培養系でも十分に発揮されることが示された.

Oxygen supply efficiency of artificial oxygen carrier (Neo Red Cell: NRC) was evaluated in a perfusion culture system composed of an oxygenator and a model liver device (bioartificial liver). Rat hepatocytes were immobilized in the model liver device at the cell density of 2.5×10^7 cells/cm³ (total 8×10^7 cells). Dissolved oxygen (oxygen partial pressure: pO_2) was measured in inlet (pO_{2in}) and outlet (pO_{2out}) of the model liver. In the perfusion of normal medium (Williams' E medium), dissolved oxygen concentration was decreased from 20%- pO_{2in} to 1.5%- pO_{2out} . Since the 1.5%- pO_{2out} was lower than critical oxygen concentration (pO_2 3%), hepatocytes were supposed to be under oxygen-deficient condition. Changing the perfusing liquid from the medium to 3%-Hb NRC, pO_{2out} was markedly increased from 1.5% to 6.0% while pO_{2in} was constant at 19%. The amount of oxygen released from 3%-Hb NRC between 19%- pO_2 and 6%- pO_2 was estimated at 0.95 mmol/L based on the oxygen equilibrium curve, which was more than four times that in the medium alone. When oxygen-enriched medium was perfused to the model liver, oxygen deficiency was removed, but hepatocytes immobilized near inlet of the model liver were exposed to the stress of hyper-tension oxygen. In the perfusion of NRC, reasonable pO_2 level was maintained for culturing hepatocytes throughout the model liver device. The NRC delivered outstanding performance in the perfusion culture system. —Keywords: Oxygen, Oxygen carrier, Artificial blood, Hemoglobin, Bioartificial liver, Hepatocyte.

1. はじめに

Neo Red Cell(NRC)は赤血球由来ヘモグロビンをリポソームに包埋したセル型の赤血球代替物であり, 人工酸素運搬体として実用化すべく様々な研究及び評価試験が行われている¹⁻³⁾. これまで, NRCに関する物理化学的研究及びNRCの動物体内での動態試験等⁴⁾が精力的に進められているが, 細胞培養系での試験はほ

とんど為されていない. 本研究では, 細胞培養によりin vitroに擬似的な組織を再現したシステムを構築して, これをNRCの評価に利用することを試みた. 細胞培養系におけるNRCの評価試験は, 動物個体へNRCを投与して試験するよりも, 簡便で不確定要素の少ない評価系であると考えられる.

肝細胞は酸素要求性の高い動物細胞の一つであり, 肝臓は酸素

1)山梨大学工学部物質生命工学科, Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering, Yamanashi University,

2)テルモ株式会社研究開発センター, Terumo Corporation R & D Center.

山梨大学工学部物質生命工学科, 〒400-8511 山梨県甲府市武田4-3-11, Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Faculty of Engineering, Yamanashi University, 4-3-11 Takeda, Kofu-shi, Yamanashi 400-8511, Japan.

論文受付98年10月28日, 受理98年11月30日.

の欠乏には非常に弱い臓器であるとされている。in vitroの培養でも酸素が欠乏すると細胞の接着伸展が抑制され、肝機能が損なわれることが知られている⁵⁾。また、肝細胞は長時間高酸素濃度下におかれると、酸素ストレスにより障害を受けることが明らかになっている。このように肝細胞は酸素に影響を受けやすい細胞であることから、本研究では肝細胞を用いた人工肝臓を作製し、これをモデル肝臓として利用することによりNRCの酸素供給能の評価を行った。

2. 方法

2.1. 人工酸素運搬体

本実験で使用した人工酸素運搬体は、テルモ社製のNeo Red Cell: NRCで、ヘモグロビン(Hb)濃度6%, pH7.6, 平均粒径286nm, P_{50} 値47.6 mmHg, ヒル係数1.16であった。このNRCを適倍濃度で調製したWilliams' E(WE)培地で希釈して、Hb濃度が3%及び5%となるようにした。

2.2. 肝細胞

7週齢(150~170g)のWistar系ラット(雄)から、Seglen⁶⁾のコラゲナーゼ灌流法により、肝実質細胞を調製した。トリパンプルー色素排除法により、90%以上の生存率を有する肝細胞を実験に供した。

2.3. モデル肝臓(人工肝臓)

ポリウレタン製の膜(テルモ社製:直径30mm, 厚さ6mm, 開孔率90%)をプラスチック製のホルダーに装着、膜厚を80%に圧縮してポリウレタン膜の容積を3.2cm³とした。分離精製した肝実質細胞

を再懸濁し、細胞濃度 2.0×10^6 cells/mLの細胞懸濁液を調製した。この懸濁液40mLをシリンジポンプ(Terumo, STC-523)を用いて、液速度15mL/minでホルダー内に注入し、細胞を充填した。注入細胞の99%以上がポリウレタン膜に捕捉されたことから、膜内の細胞密度は 2.5×10^7 cells/cm³, 全細胞数は 8×10^7 cellsとなった。

2.4. スピナーフラスコ回分培養系

125mL容のスピナーフラスコにWE培地又は5%-Hb NRCを60mL入れ、37℃, 100rpmの搅拌下、培地上面に混合ガス(95% air + 5% CO₂)を通気した。溶存酸素濃度が平衡に達したところで通気を停止し、ここに分離した肝細胞を培地内での細胞密度が 10^6 cells/mLとなるように播種した。播種直後からの液中の溶存酸素濃度の変化を酸素電極(YSI Co. Inc., Model 5300)で測定し、チャート紙上に記録した。

2.5. モデル肝臓灌流培養系

モデル肝臓としての人工肝臓及びNRCを再酸素化するための人工肺を含む循環系(Fig. 1)を作製した。系内の循環液量は80mL, 液流速は5mL/minとした。WE培地及びNRCの再酸素化は、pO₂ 20%の混合ガス(95% air + 5% CO₂)を人工肺(ポリプロピレン製中空糸, 内径250μm, 長さ10cm, 200本, 膜表面積160cm²)に300mL/minで供給することで行った。溶存酸素濃度の変化は、人工肝臓前後において酸素電極(YSI Co. Inc., Model 5300)を用いて測定した。また、WE培地においては供給するガス中の酸素分圧をpO₂ 95%, pO₂ 57%とした場合についても行った。測定系の温度は37℃に保持した。

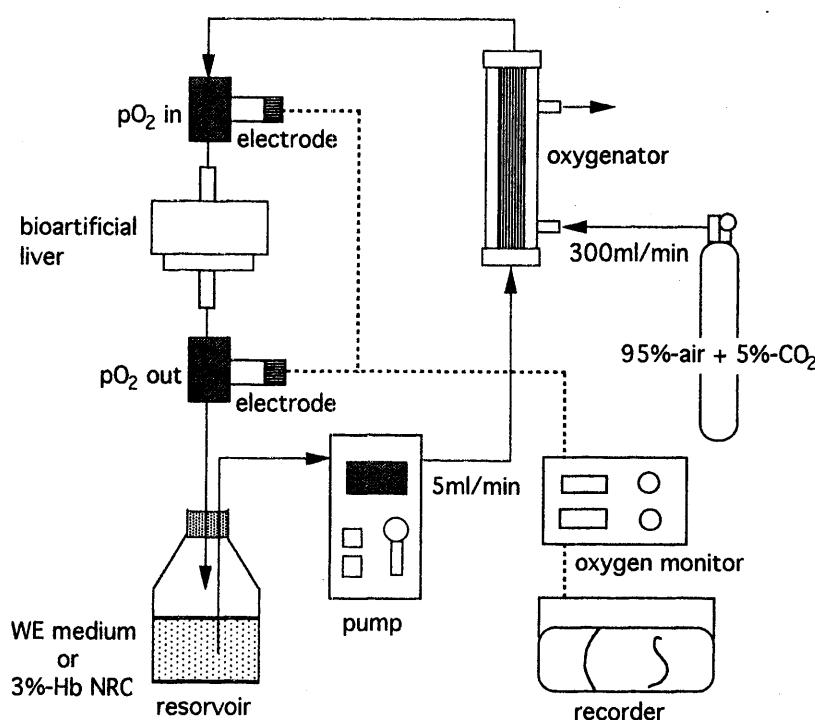


Fig. 1 Schematic diagram of a perfusion culture system for the evaluation of oxygen transport efficiency of NRC.

3. 結果

3.1. スピナーフラスコ細胞培養系におけるNRCの酸素供給能

スピナーフラスコに細胞を播種した直後からの培地中の溶存酸素濃度の変化をFig. 2に示した。WE培地においては細胞は4.7分

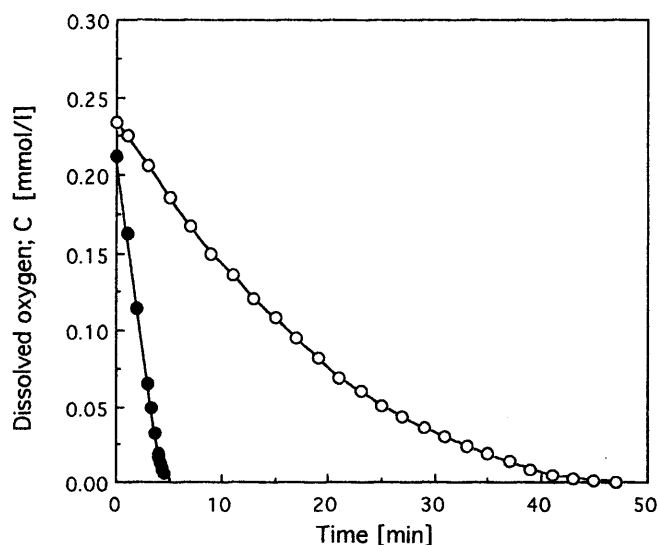


Fig. 2 Time courses of oxygen consumption by hepatocytes in WE medium (●) and 3%-Hb NRC (○) in a spinner vessel without aeration. Cell density is 10^6 cells/mL.

では全溶存酸素(0.215mmol/L)を消費した。WE培地における酸素消費経過の直線部分より、酸素消費速度は2.7mmol/L/hと算出された。系内の肝細胞濃度は 1×10^6 cells/Lであるので、肝細胞1個の呼吸速度(最大比呼吸速度 Q_{O_2})は約 2.7×10^{-9} mmol/cell/hと見積もられた。また、呼吸速度が低下し、溶存酸素減少の直線性が失われる境界となる溶存酸素濃度(臨界溶存酸素濃度: C_{crit})はおよそ0.035mmol/L(酸素分圧 pO_2 3%に相当)であった。

5%-Hb NRCにおいては酸素消費は緩やかなものとなり、全溶存酸素が消費されるのに約40分を要した。NRC添加系において溶存酸素が約10倍長く維持されたのは、5%-HbがWE培地の10倍量の酸素を保持していたためと考えられた。それを確かめるために、NRCの代わりにHbを内包しないリポソーム(空リポ)を添加して同様の実験を行った。その結果、WE培地の場合とほぼ同様の酸素消費経過が得られたことから、NRCを添加した系でも肝細胞は同様の速度で酸素を消費していると考えられた。したがって、NRCはWE培地よりも多くの酸素を含有していることになる。しかし、NRCのバルク液中の溶存酸素濃度は、気相部の酸素分圧と平衡状態にあり、初発の溶存酸素濃度はWE培地とほぼ同じレベルに保たれていた。

3.2. モデル肝臓におけるNRCの酸素供給能

Fig. 1に示した循環系において、初めWE培地を循環させて定常状態が得られたところで循環液を3%-Hb NRCに切り替え、その時のモデル肝臓の入口・出口における溶存酸素濃度を測定して

チャート紙上に記録した。再酸素化は人工肺に pO_2 20%のガスを供給することで行った。

モデル肝臓の入口側の酸素分圧は、循環液を切り替えても殆ど変化が見られず pO_{2in} 19~20%(152~144 mmHg)を維持していた。これに対してモデル肝臓の出口側では、溶存酸素濃度はFig. 3に示したチャートのように変化した。WE培地を循環した場合は、

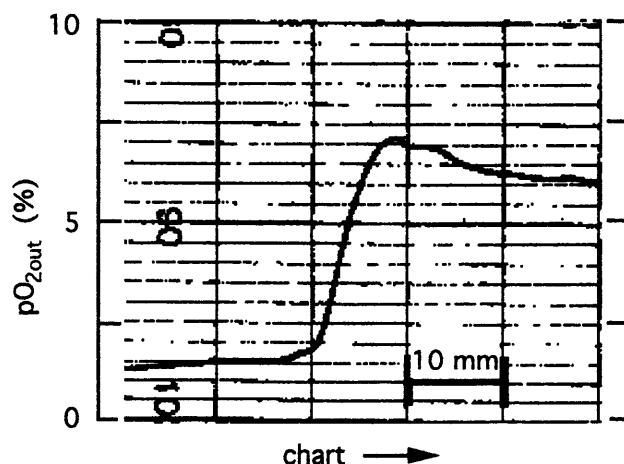


Fig. 3 Change in the oxygen partial pressure in the outlet of the bioartificial liver when the circulating liquid was switched from WE medium to 3%-Hb NRC. Chart speed was 10mm/min. The liquid circulating rate was 5.0 mL/min.

出口側の pO_{2out} は1.5%(11.4mmHg)であったが、循環液を3%-Hb NRCに切り替えると顕著かつ速やかな溶存酸素の上昇が認められ、 pO_{2out} は約6%(45.6mmHg)にまで回復した。

WE培地の循環では再酸素化のガス分圧を pO_2 57%及び pO_2 95%に高めた場合についても実験を行った。 pO_2 57%のガス通気時は pO_{2in} 54%, pO_{2out} 19.5%であった。 pO_2 95%のガス通気時は pO_{2in} 95%, pO_{2out} 40%であった(Table 1)。これら pO_{2in} と pO_{2out} のデータを

Table 1 Dissolved oxygen concentrations in inlet and outlet of the bioartificial liver and evaluation of oxygen consumption to the bioartificial liver.

Medium	Mixed gas	pO_{2in}		pO_{2out}		Oxygen consumption
		pO_2 (%)	(%) (mmHg)	(%)	(mmHg)	
NRC	20	20.0	152	1.5	11.4	0.20
Medium	57	54.0	410	19.5	148	0.37
	95	95.0	722	40.0	304	0.60
NRC	20	19.0	144	6.0	45.6	0.95

基に、それぞれの条件でモデル肝臓内で消費された酸素量を求め、それを酸素消費量としてTable 1に合わせて示した。WE培地では、 pO_{2in} と pO_{2out} の分圧差から、モデル肝臓への培地容積1L当

たりの酸素消費量を推算した。推算には37℃における水に対する酸素の溶解度の指標であるHenry定数(920.5atm/L/mol-O₂)を用いた⁷⁾。pO₂ 20%のガス通気時は、pO_{2in}が152mmHgであるので、

$$(152 \times 1000) / (760 \times 920.5) = 0.217 \text{ mmol/L} \quad (1)$$

この時pO_{2out}は11.4mmHgであるので、

$$(11.4 \times 1000) / (760 \times 920.5) = 0.016 \text{ mmol/L} \quad (2)$$

(1)(2)の差より、酸素消費量は0.20 mmol/Lとなる。同様に、57%及び95%ガス供給時の酸素消費量は、それぞれ0.37, 0.60 mmol/Lと算出された。NRCではHbと酸素の解離曲線(Fig. 4)を基にして、モデル肝臓内でNRCから放出される酸素量を、ヘモグロビン1分子に4分子の酸素が結合すると仮定して計算した。3%-Hb中の

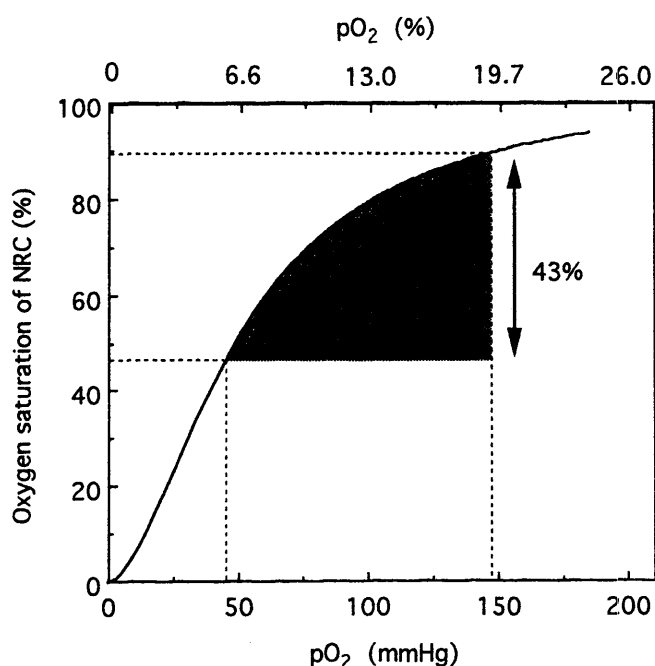


Fig. 4 Oxygen equilibrium curve of NRC. A 43% of the binding oxygen of NRC was released when the oxygen partial pressure varied between 144 mmHg and 45.6 mmHg.

ヘモグロビンのモル濃度は、ヘモグロビンの分子量64450より

$$3\% \text{Hb} = 30\text{g-Hb/L} = 0.465 \text{ mmol-Hb/L}$$

である。したがって飽和時にNRCが含有している酸素量は

$$0.465 \times 4 = 1.86 \text{ mmol-O}_2/\text{L}$$

となる。pO₂ 19%→pO₂ 6%の分圧変化で、NRCから解離する酸素は飽和時の43%であったので、この時の酸素放出量は

$$1.86 \times 0.43 = 0.80 \text{ mmol-O}_2/\text{L}$$

と算出される。したがって、溶存酸素の変化によりバルク液から放出された酸素量0.15mmol/Lを考慮すると、3%-Hbを循環させた時にはモデル肝臓内において合計0.95mmol/Lの酸素消費が為されたことになる。

4. 考察

一般に細胞の呼吸速度と溶存酸素濃度の関係はMonod型の式で表される。溶存酸素濃度が臨界溶存酸素濃度(Ccrit)値よりも高いときには、細胞は最大の呼吸速度を示すが、溶存酸素がCcrit値より低い場合は、呼吸速度は溶存酸素濃度に依存して低下する。すなわちCcrit値以下の溶存酸素濃度のもとでは細胞は十分に呼吸を行えない酸素欠乏の状態になると考えられる。

モデル肝臓を用いた実験において、pO₂ 20%のガスで再酸素化を行いつつWE培地を循環した場合は、出口側酸素分圧(pO_{2out})は1.5%となった。これは本実験のスピンナーフラスコで求めた肝細胞のCcrit値(pO₂ 3%)よりも低いために、肝細胞は酸素欠乏の状態になっていると考えられた。これに対して、循環液を3%-Hb NRCに切り替えた場合はpO_{2out}は6.0%となり、Ccrit値を上回った。したがって、3%-Hb NRCを循環した場合は、pO₂ 20%のガスで再酸素化を行っても酸素不足に陥ることなく肝細胞を培養できることが示された。

WE培地循環系においても、再酸素化のガス分圧をpO₂ 57%及びpO₂ 95%に高めるとpO_{2out}をCcrit値以上に維持することができた。しかし、pO_{2in}の酸素レベルは極めて高いものになってしまい、細胞に対する酸素ストレスが懸念された。NRC循環時はpO_{2in} 19%、pO_{2out} 6%であり、入口側での酸素ストレス及び出口側での酸素欠乏は問題とならなかった。

モデル肝臓での酸素消費量の推算結果(Table 1)より、WE培地では再酸素化のガス分圧をpO₂ 20%, 57%, 及び95%とした場合の酸素消費量はそれぞれ0.20mmol/L, 0.37mmol/L, 及び0.60mmol/Lであった。前述の肝細胞の最大比呼吸速度QO₂ = 2.7 × 10⁻⁹ mmol/cell/hを基にモデル肝臓内の肝細胞の酸素消費量C_{cons}を計算すると、

$$C_{\text{cons}} = QO_2 \cdot X \cdot (V/F) = 0.72 \text{ (mmol/L)}$$

となる。但し、X = 細胞密度、V = モデル肝臓の容積、F = 循環液速度である。Table 1に示した換算値はいずれもC_{cons}の値よりも小さいことから、WE培地では酸素分圧を高くしたガスで再酸素化してもモデル肝臓の酸素要求を満たせなかったと考えられる。特に、再酸素化のガス分圧がpO₂ 57%及び95%では、pO_{2out}に余裕があるにも拘わらず十分な酸素供給が行われなかった。これは、高酸素濃度によるストレスにより細胞が何らかの障害を受けたか、モデル肝臓内での物質移動が制限されたために酸素が細胞に有効に利用されなかったのではないと思われる。これに対してNRCを循環した場合には0.95mmol/Lの酸素が消費されたことになり、肝細胞に十分な酸素供給が行われたものと推測される。

5. 結論

NRCは肝細胞への酸素運搬体として理想的な特性を有し、培養細胞への効率的な酸素供給が行えることがわかった。このことはNRCが人工肝臓への酸素運搬体としても利用可能であることを示唆するものである。人工肝臓の開発においては、装置の更なるコンパクト化と高機能化が求められており、モジュールに充填する細胞の更なる高密度化を達成しなければならない状況にある。高密度に充填された細胞に酸素を供給するには従来の酸素供給法では不十分であり、このような問題を解決する一手段としてNRCを利用することは極めて有効であると思われる。

参考文献

1. Tsuchida E, Takeoka S. Stabilized hemoglobin vesicles. In: Tsuchida E, eds. *Artificial Red Cells*. John Wiley & Sons, Chichester, 1995;35-64.
2. Usuba A, Motoki R. Safety and efficacy of encapsulated hemoglobin in hemorrhagic shock. In: Tsuchida E, eds. *Artificial Red Cells*. John Wiley & Sons, Chichester, 1995;65-92.
3. 緒方嘉貴, 岡本武, 鈴木一比好, 上谷利治. Methemoglobin 還元機構を有した人工赤血球(NRC)の開発. *人工血液* 1994;2:62-6.
4. 酒井宏水, Intaglietta M, 土田英俊. 微小循環動態の観測と赤血球代替物の評価. *人工血液* 1998;6:76-87.
5. Rotem A, Toner M, Bhatia S, Foy BD, Tompkins RG, Yarmush ML. Oxygen is a factor determining in vitro tissue assembly: Effects on attachment and spreading of hepatocytes. *Biotechnol Bioeng* 1994;43:654-60.
6. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976;13:29-83.
7. Doran PM. Mass transfer. In: Doran PM, eds. *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press, London, 1995;190-217.

●事務局たより

日本血液代替物学会 第5回 定期総会 議事録

日時：平成10年9月4日(金) 13:10-13:30

会場：かでの2・7(札幌)

1. 開会

2. 会長挨拶

3. 議事

- 1) 平成9年度事業報告承認(資料1にて承認)
 - 2) 平成9年度収支決算承認(資料2aおよび2bにて承認)
 - 3) 平成10年度事業計画および収支予算案決議(資料3aおよび3bにて承認)
 - 4) 臨床評価ガイドライン作成委員会中間報告(委員長 阿岸 鉄三)
 - 5) 平明(鹿児島大 医)教授が評議員として推薦され、承認された。
 - 6) 第6回年次大会開催(大会長 池田 康夫)平成11年9月10, 11日 於 東京京王プラザホテル(東京)
4. 閉会

資料1—平成9年度事業報告(平成9年4月1日～平成10年3月31日)

- 1) 第4回定期総会—平成9年9月7日(日)リーガロイヤルホテル早稲田
- 2) 第7回血液代替物国際会議 兼 第4回年次大会(大会長 土田 英俊)—平成9年9月7日(日)～10日(水)早稲田大学国際会議場
招聘講演14件、招待講演24件、口頭発表26件、ポスター発表53件。参加者 延べ273名。
- 3) 会誌「人工血液」の発行—第5巻2号(116頁)、第5巻3号(26頁)、第5巻4号(18頁)、第6巻1号(26頁)各1000部発行。
- 4) 理事会
97/1: 平成9年6月18日(水)収支決算/事業計画/予算の承認/役員人事
97/2: 平成9年9月7日(日)国際会議実施及び収支見込/会則
97/3: 平成9年11月28日(水)会則変更/評価委員会の件/国際会議報告
97/4: 平成10年1月9日(金)収支決算見込/予算案/事業計画/年次大会
拡大: 平成10年2月5日(木)、6日(金)臨床ガイドライン作成/維持会員(2社)開発状況
- 5) 評議員会
平成9年9月7日(日)平成8年度事業報告・収支決算/9年度事業計画/予算
- 6) 編集委員会
97/1: 平成9年4月18日(金)ISBSの抄録/北海道輸血シンポ
97/2: 平成9年5月28日(水)進行状況/調整/抄録号発行期限
97/3: 平成9年11月5日(水)掲載案検討/調整
97/4: 平成10年2月20日(金)掲載案検討/年次大会会告/抄録集
- 7) 第7回血液代替物国際会議委員会
第1回募金委員会: 平成9年6月18日(水)
プログラム委員会 準備会: 平成9年5月16日(金)
第1回プログラム委員会: 平成9年5月28日(水)
第1回拡大組織委員会: 平成9年6月18日(水)

第2回拡大組織委員会: 平成9年11月28日(金)

8) 臨床評価ガイドライン作成委員会

準備会: 平成9年11月28日(金)

第1回: 平成10年1月9日(金)

第2回: 平成10年2月5日(木)、6日(金)

資料2a—平成9年度会計報告収支決算表(自平成9年4月1日 至平成10年3月31日)

収入		支出	
摘要	金額	摘要	金額
前期繰越金	2,896,409	会誌出版費	2,912,029
正会員会費	1,020,000	集会・委員会費	1,605,284
賛助会員会費	2,600,000	国際会議補助金	1,000,000
維持会員会費	6,000,000	ガイドライン委員会費	1,395,294
購読会員会費	96,000	事務人件費	3,282,860
広告代・雑収入	277,930	事務費	666,752
寄付	850,000	次期繰越金	2,900,517
利息	22,397		
合計	13,762,736	合計	13,762,736

資料2b—貸借対照表(平成10年3月31日現在)

貸方		借方	
摘要	金額	摘要	金額
現金	531,510	基金	8,000,000
銀行普通預金	1,674,095	次期繰越金	2,900,517
銀行預金(編集)	694,912		
銀行定期預金	8,000,000		
合計	10,900,517	合計	10,900,517

資料3a—平成10年度事業計画(平成10年4月1日～平成11年3月31日)

- 1) 第5回定期総会の開催—平成10年9月4日(金)かでの2・7
- 2) 第5回年次大会の開催(大会長 関口 定美)—平成10年9月4日(金)、5日(土)かでの2・7
- 3) 「人工血液」の発行—第6巻2号(6月)、3号(9月)、4号(12月)、第7巻1号(3月)の発行予定。1000～1200部印刷。
- 4) 会議—総会 1回、評議員会 1回、監事会 1回、理事会 4回、会誌編集委員会 4回、臨床ガイドライン作成委員会 4回

資料3b—平成10年度予算(自平成10年4月1日 至平成11年3月31日)

収入		支出	
摘要	金額	摘要	金額
前期繰越金	2,900,517	会誌出版費	2,900,000
正会員会費	1,100,000	集会・委員会費	1,800,000
賛助会員会費	2,600,000	年会補助金	1,000,000
維持会員会費	6,000,000	ガイドライン委員会費	800,000
購読会員会費	96,000	事務人件費	2,800,000
広告代・雑収入	270,000	事務費	700,000
利息	22,000	予備費	2,988,517
合計	12,988,517	合計	12,988,517

●事務局たより

資料4—日本血液代替物学会 役員名簿

顧問	尾形 利郎	東海大学 医学部 教授
	高久 史麿	自治医科大学 学長
	堀 原一	筑波大学 名誉教授
	遠山 博	埼玉医科大学 総合医療センター 所長
会長	土田 英俊	早稲田大学 理工学部 教授
副会長	関口 定美	北海道赤十字血液センター 所長
庶務理事	小林 紘一	慶應義塾大学 医学部 教授
会計理事	池田 康夫	慶應義塾大学 医学部 教授
理事	阿岸 鉄三	東京女子医科大学 教授
	清水 勝	東京女子医科大学 教授
	友田 輝夫	東京医科大学 教授
	湯浅 晋治	順天堂大学 医学部 教授
(事務局長)	西出 宏之	早稲田大学 理工学部 教授
(会誌担当)	池淵 研二	北海道赤十字血液センター 副所長
監事	桜井 靖久	東京女子医科大学 教授
	藤村 一	生産開発科学研究所 学術顧問

日本血液代替物学会 評議員名簿

阿岸 鉄三	東京女子医科大学 教授	平 明	鹿児島大学 医学部 教授
浅野 茂隆	東京大学 医科学研究所 教授	高折 益彦	川崎医科大学 名誉教授
阿部喜代司	医療技術短期大学 教授	高久 史麿	自治医科大学 学長
飯塚哲太郎	理化学研究所 主任研究員	高橋 晃	テルモ(株) 常務取締役
池田 康夫	慶應義塾大学 医学部 教授	高橋 恒夫	東京大学 医科学研究所 教授
池淵 研二	北海道赤十字血液センター 副所長	田中 勸	防衛医科大学 教授
大柳 治正	近畿大学 医学部 教授	土田 英俊	早稲田大学 理工学部 教授
岡田 浩佑	広島大学 保健センター 教授	土屋 喜一	早稲田大学 理工学部 教授
尾形 利郎	東海大学 医学部 教授	遠山 博	埼玉医科大学 総合医療センター 所長
鍵谷 昌男	吉富製薬(株) 取締役	豊田 忠之	東部地域病院 院長
川村 明夫	札幌北榆病院 理事長	友田 輝夫	東京医科大学 教授
ブライアン・クルーガー	バクスター(株) バイotech事業部長	中井 一士	血液製剤調査機構 理事
小林 紘一	慶應義塾大学 医学部 教授	西 勝英	熊本大学 医学部 教授
小室 勝利	国立感染症研究所 部長	西出 宏之	早稲田大学 理工学部 教授
齋藤 英彦	名古屋大学 医学部 教授	馬場 正三	浜松医科大学 教授
酒井 清孝	早稲田大学 理工学部 教授	平澤 博之	千葉大学 医学部 教授
桜井 靖久	東京女子医科大学 教授	藤巻 道男	東洋公衆衛生学院 学院長
鮫島 達也	青山学院大学 理工学部 教授	藤村 一	生産開発科学研究所 学術顧問
四釜 慶治	東北大学 理学部 教授	堀 原一	筑波大学 名誉教授
清水 勝	東京女子医科大学 教授	宮尾 秀樹	埼玉医科大学 総合医療センター 助教授
十字 猛夫	日本赤十字社中央血液センター 所長	宮崎 保	札幌通信病院 院長
杉田 良樹	茨城県立医療大学 教授	元木 良一	福島県立医科大学 学長
関口 定美	北海道赤十字血液センター 所長	湯浅 晋治	順天堂大学 医学部 教授

(敬称略, ア順)

—ヒト エリスロポエチン製剤—

エスポー[®] **皮下用**

6000・9000・12000・24000

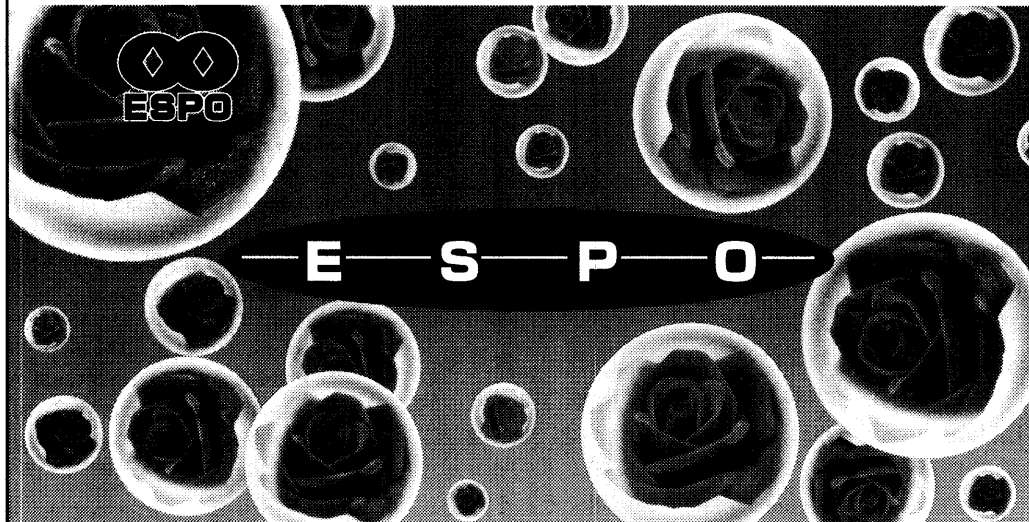
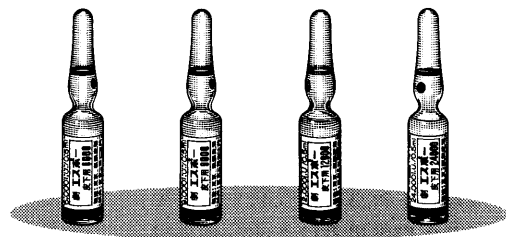
一般名:エポエチンアルファ(遺伝子組換え) ●薬価基準収載●劇薬●指定医薬品●要指示医薬品(注意—医師等の処方せん・指示により使用すること)

6000

9000

12000

24000



効能・効果、用法・用量及び使用上の注意は添付文書をご覧ください。

【禁忌】

(次の患者には投与しないこと)
本剤又は他のエリスロポエチン製剤に過敏症の患者。

製造元
麒麟麦酒株式会社
〒104 八二八 東京都中央区新川二丁目一
販売元・資料請求先
三共株式会社
〒103 八四六 東京都中央区日本橋本町三丁目一

98.9(総)

●編集後記●

9月4, 5日に札幌で第5回日本血液代物学会が開催された。一昨年の年次大会ではその抄録号が大会前日に発刊という綱渡りの状況であったのに比べ、今年度は約3週間前に会員に郵送でき、編集委員としては胸をなでおろしほっとできた。学会は関口会長の選ばれたメインテーマ「人工血液、輸血のリスクをなくするために」に従い、会長講演には「輸血代替療法により血液事業は変わるか」、特別講演にはGreenburg先生の「血液代替物の臨床応用」、土田先生の「酸素輸液の展開状況」、池田先生の「血小板の止血機構および代替物の可能性」の講演が行われた。また教育講演として田代先生の「プリオン病と予防対策」、西岡先生の「輸血感染症に残された課題」の講演が行われた。シンポジウムが2つ生まれ、「血液代替物開発のポイント」、「血液代替物の臨床応用に向けて」が熱心に議論された。一般演題も19題を集め、なかなかの盛況であった。ただ学会直前に一部明らかにされた、Baxter社の臨床試験中断のニュースも講演合間のホットな話題であった。

この年次大会後、一般演題で発表のあった先生方から5題の投稿があり、編集委員会としては作業の楽な号でもあった。引き続

き投稿していただけることを期待します。また新委員として加わっていただいた友田先生、山内先生からも新企画が提案され、順調にいけば今以上に話題提供ができる雑誌になっていくと思います。ご期待下さい。

さて、大変残念な報告をふたつ申し上げなければなりません。学会活動はもちろん、編集委員としても創刊以来ご尽力いただいております薄場先生が9月末に突然逝去されました。学会ではお顔を拝見していたので、あまり急なことで言葉も出ませんでした。

また、明けて1月6日には本学会の副会長で、第5回大会の大会長も務められた関口先生も急逝されました。ご不自由な体をおして人工血液の研究に情熱を傾けておられる姿を身近で見ていた者として、あまりの突然の死に呆然自失し、どのように会員の皆様にお知らせしたらよいか戸惑っております。人工血液研究における大きな柱を失い、今後どのように進んでいったらよいか、残された者として関口先生の情熱をどのように引継いでいったらよいか、大きな課題をいただいた、と感じております。

お二人の先生のご冥福を心よりお祈り申し上げます。

(KI)

投稿規定 Short Version

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

執筆規定

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

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

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

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

1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
2. 砂本順三, 岩本 清. リボソームの調製. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編. リボソーム. 東京: 南江堂, 1988;21-40.
3. Fowler SA, Andracki M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22:27-42.
4. Reichert CM, Kelly VL, Macher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985;111-60.
- 9) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
- 10) 既発表の図表、その他を引用、転載する場合には、あらかじめ版權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), 武岡真司, 友田燐夫, 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 (4) 1998年12月31日発行

〒169-8555 東京都新宿区大久保3

早稲田大学理工学総合研究センター55S棟701号

TEL (03)5286-3120 FAX (03)3205-4740

〒063-0002 札幌市西区山の手2条2丁目

北海道赤十字血液センター内

TEL (011)613-6615 FAX (011)613-4131

〒113-0034 東京都文京区湯島1丁目1番地12号

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

再生紙を使用