

## 目 次

# 人工血液

第7巻 第1号 1999年3月

追悼	故関口定美先生 御逝去を追悼して ..... 土田英俊	
	関口先生を偲んで ..... 湯浅晋治	
	関口定美先生の死を悼む ..... 阿岸鉄三	
	関口定美先生のご冥福を祈る ..... 清水 勝	
	関口定美先生を偲んで ..... 小林紘一	
	薄場 彰君を悼む ..... 元木良一	
第5回年次大会大會長講演		
	輸血代替療法により血液事業は変わるか ..... 関口定美	1
総説	赤血球代替物性能評価の方法の開発と臨床試験 ..... 藤井ひとみ	7
原著	イヌ出血性ショックモデルにおける遺伝子組換えヒト血清アルブミンの循環動態改善効果 ..... 木戸秀明	16
	ヘモグロビン小胞体存在下におけるヒト末梢血単核細胞の各種サイトカイン産生の挙動 ..... 江口圭介	28
海外文献紹介		
	Electron Microscopic Demonstrations of Filamentous Molecular Sieve Plugs in Capillary Fenestrae ..... 宮尾秀樹	34

## Contents

# ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 7 No. 1 March, 1999

Lecture of the President - The Fifth Annual Meeting of the Society of Blood Substitutes, Japan: How the Blood Substitute Therapy Gives Impact on the Blood Program ..... Sadayoshi Sekiguchi	1
Review: Development of Methods to Evaluate the Efficacy of Red Blood Cell Substitutes and Clinical Trial ..... Hitomi Fujii	7
Original Article:	
Effect of Recombinant Human Serum Albumin on Hemodynamics in a Canine Model of Hemorrhagic Shock ..... Hideaki Kido	16
Stimulation of Cytokine Production from Human Peripheral Mononuclear Leukocytes by Hemoglobin Vesicles ..... Keisuke Eguchi	28
Topics: Electron Microscopic Demonstrations of Filamentous Molecular Sieve Plugs in Capillary Fenestrae ..... Hideki Miyao	34

# 会告

## 第6回日本血液代替物学会年次大会

### テーマ

### 「血液代替物の臨床応用へ前進」

会長：池田 康夫（慶應義塾大学医学部内科教授）

会期：1999年9月10日(金), 11日(土)

会場：京王プラザホテル

〒160-8330

東京都新宿区西新宿2-2-1

応募用紙：人工血液1999年第7巻1号に綴じ込み  
(又は下記にご請求下さい)

演題募集：一般演題（口演）

演題締切：1999年5月29日(土)消印有効

演題送付先・連絡先

：〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部内科

第6回日本血液代替物学会年次大会

大会長 池田 康夫

Phone 03-3353-1211 FAX 03-3226-6623

## 一般演目

### 第6回日本血液代替物学会年次大会抄録用紙

#### 1. 演題形式

希望する演題形式に○印をつけて下さい。  
(シンポジウム、ワークショップ、一般演題)

#### 2. 応募方法

本抄録用紙の右枠内におさまるように、タイプあるいは日本語ワードプロセッサーを用いて、演題名、氏名、所属、抄録本文の順に印字して下さい。ワードプロセッサーを用いる場合、演題名は14ポイント程度、氏名、所属、抄録本文は12ポイント程度が適当です。(このポイント数で印字すると、抄録本文は1行25字程度が35行程度、合計800～900字程度の印字が可能です。)印刷は80%縮小されます。原本1部にコピー2部を添えて、下記の申し込み先まで期日厳守で郵送して下さい。

#### 3. 申し込み先

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部内科

第6回日本血液代替物学会年次大会

大会長 池田 康夫

Phone 03-3353-1211

Fax 03-3226-6623

#### 4. 申し込み締め切り日

1999年5月29日(土)(消印有効)





演題名
氏名
所属
TEL: FAX:
連絡先（コピーして通信に使いますので宛先を明瞭にご記入下さい） 〒

---



# 故関口定美先生を偲んで



## 【学歴・職歴】

昭和33年3月	北海道大学医学部卒業
昭和40年6月	医学博士
昭和41年7月 ～昭和43年6月	米国タフト大学大学院外科学研究科に留学
昭和43年9月	米国マスター・オブ・サイエンスの学位を授与
昭和44年8月 ～昭和50年3月	北海道大学医学部附属病院講師（第1外科） 輸血部副部長
昭和50年4月 ～昭和59年6月	旭川医科大学助教授（外科学第2講座）
昭和59年6月～	北海道赤十字血液センター所長
昭和62年4月 ～平成5年3月	日本赤十字社血漿分画センター所長（兼務）
平成6年9月～	早稲田大学客員教授（理工学総合研究センター）
平成8年11月～	北海道大学客員教授（先端科学技術共同研究センター）

## 【公職】

1. 日本赤十字社血液センター連盟会長
2. 昭和天皇記念血液事業基金運営委員会委員
3. 国際輸血学会カウンセラー
4. 日本輸血学会幹事・評議員
5. 日本輸血学会北海道支部会会長
6. 日本血液代替物学会副会長・理事
7. 日本アフェレシス学会理事
8. 日本低温医学会理事
9. 日本造血細胞移植学会理事
10. 日本医科器械学会評議員
11. 日本光カード医学会評議員
12. 日本医工学治療学会評議員

## 【研究】

臨床輸血学・輸血副作用・人工血液  
血液の有効利用に関する研究など

# 故関口定美先生 御逝去を追悼して

早稲田大学理工学部高分子化学研究室 土田英俊

本会会員の皆様に謹んで、日本血液代替物学会副会長・理事関口定美先生が、1999年1月6日(午前0時38分)急性呼吸不全により、享年67才をもって御逝去になられましたことを御報告申し上げます。

皆様御存知のように、先生は数年前より車椅子の生活を余儀なくされておられました。その不自由なお体にも拘らず、北海道基幹血液センター所長としての公務に加えまして、持前の強い使命感と責任感から、内外の沢山の会議や研究集会に出席され、誠に精力的な活躍をして来られました。私共会員一同先生の精神力には常々頭の下がる思いでおりましたが、御心労の蓄積は計り知れないものがあったと拝察しております。

1997年9月には日本で最初の血液代替物国際会議(第7回)が、先生の御推進と多大の御協力により開催でき、大きな成果を挙げました。また、翌1998年9月には、日本血液代替物学会年次大会を札幌で、関口先生が大会長として、多くの講演や研究発表の運営企画を主催され、成功裡に

情報交換と成果取りまとめの実を挙げて載くことができました。そして本年4月からは日本血液代替物学会会長として、新しく誕生して来るであろう人工血液(酸素輸液、人工血小板、人工免疫)の具体的普及を目指し、この分野の先端研究の陣頭指揮を執って載く予定が決まっていた 것입니다。

この最も大切な時期に副会長関口定美先生を喪いましたことは、当学会にとりましては勿論、日本の血液代替物の研究と実用化展開に関し、誠に大きな損失であります。顧みますと、先生は現在の輸血システムの確立と定着に渾身の御努力をされて来ただけなく、医科学者の良心から将来を見越した人工血液の実現に精根を傾けられ、日本血液代替物学会の設立(1991年)に尽力され、設立以来足かけ9年間に亘り副会長として貢献されました。先生の人類愛に満ちた血液事業に対する献身は、日常の御仕事に加え、車椅子に拠って日本赤十字社や厚生省、或いは関係各学会などの血液関連の各種委員

会に実に精力的に参加され、将来指針の御審議や、新分野開拓に情熱を注いだ研究活動に、終生変わることなく尽力されました。

1997年12月初旬にセンターに御伺いした折、期せずして先生の御病状に関連し問わず語りに「進行して嚥下困難や器官閉塞が私の最後」という御話をされ、その凄絶な状況と御覚悟の程を承知し、大変な衝撃に慄然と致しながらも、御意志の程を充分に理解させて戴きました次第です。正に予見通りの結果となりまして、酸素輸液が未完成の現状が情なく、切歎扼腕の思いを致しております。先生の御意志を継いで1日も早い実現を期したい気持でおります。

この領域の先駆者として足跡を残された先生が、尊い命を賭けて戴いた関口定美先生御自身の人生に対し、心からの尊敬、それに限りない謝意と哀悼をここに記し、御冥福を御祈り致します。

# 関口先生を偲んで

埼玉県赤十字血液センター(前順天堂大学医学部輸血学) 湯浅晋治

昨年の暮れもおし迫った御用納めの日、一年のしめくくりにと、関口先生に電話を入れたのが最後の会話となるとは夢にも思わなかった。それにしても余りに突然の悲報であった。ここ数年間、車椅子の生活を強いられ、どれ程の苦痛と苦労をされたことか。しかし一度も苦情を口にせず、いつも笑顔をたやさなかつた。あの温和なほほえみが忘れられない。今や人生80年代に、それは余りにも早い他界であった。しかし、先生はその短い一生を人一倍情熱を持って生き、驚嘆する程多くの仕事をやり、また多くの学会の発展につくられた。

同種血輸血に代わるべく、先生は高度先端医療としての人工血液の必要を説き、土田先生と共に血液代替物学会を設立され、副会長として指導的役割を果たした。

日本輸血学会では幹事、北海道支部長として、学会の発展のみならず国際学会、特にWestern Pacific Regionの理事としてアジアとの交流発展に貢献された。小生は先生の悲報を直ちに国際輸血学会の

理事らにFAXしたが、会長、副会長からは先生の多くの偉業に対し、また学者と共にすぐれた管理指導者であったことに、敬意と哀悼の意を表された。また大きな転換期を迎えている血液事業では全国の血液センター連盟の会長として指導力を遺憾なく發揮されると共に、主催された北海道輸血シンポジウムは国際的にも高く評価されるものとなった。

小生と関口先生は同輩として互いに相通じるものを持っていた。同じ時期にボストンで過ごしたこと、先生はタフト大学外科で、私はマサチューセッツ総合病院の外科研究員として、二人とも外科から輸血医学の道へ歩みを変えたこと。そして研究面、特にCryobiology(低温医学)では共に赤血球の凍結保存の研究をした。私は凍害保護液のグリセリンを用いた緩速法を行い、関口先生は解凍後の凍害保護剤の除去を必要としないですむ、液体窒素液面に直接赤血球を滴下し、急速凍結させるDroplet法を開発された。また先生は臓器保存の一環として遊離肝細胞の凍結保存の研究も行った。これは肝細胞

のもつ代謝、解毒などの機能を利用して人工肝の一部に肝細胞を組み込み、一時的でも致命的な障害肝に代わって機能を果たすことを期待するものであった。30年も前の研究であるが、今思えば実に先駆的な研究であった。小生は現在、北海道大学低温科学研究所が母体となって発展してきた低温生物工学会の会長を務めさせて頂いているが、関口先生にはこの学会の理事としていつも貴重な助言をいただいたことを心より感謝している次第である。

最後に私にとって、最も忘れることができないのは、小生は第24回国際輸血学会で会長の重責を務めたが、総会が大成功に終わったことは、ひとえに事務局長としての関口先生の統括的な采配と適切な指示、支援によるものであり深く感謝しているところであります。

先生は温厚な笑顔の内にも強靭で不屈な信念の持ち主であった。

今ここに改めて生前の多くの御指導に感謝すると共に心から先生の御冥福をお祈り致します。

# 関口定美先生の死を惜む

東京女子医科大学 阿岸鉄三

関口定美先生が、1999年1月6日に亡くなられた。数年前より、下肢から始まった筋肉の萎縮性疾患に悩んでおられたのは知っていましたが、病気の始まりの頃に病態不明の奇病とご自身から伺ったきりで、筋萎縮性側索硬化症であったとは1月18日の北海道血液センター葬まで知りませんでした。同じ医師として、この病名の持つ意味、すなわち、不良な生命予後と終末時の予測される状況を自ら知りながら生きられた時間の苦悩と、そして、それに耐えながら最後まで仕事に励まれた先生の執念とも思える使命感に深い感銘を覚え、生前の交流を振り返りながら追悼したいと思います。

関口先生との交際が始まったのは、私が1960年に北大第1外科（三上外科）に入局したときで、先生は“せきさん”と通称呼ばれる、ときには優しく、ときにはにらみを利かせる1年上の先輩でした。それから1968年まで“同じ医局の飯を食った仲”であった訳ですが、先生は通称、肝臓研究班、私は人工内臓研究班で、お互いに相手の研究成果をちょっと気にしながら切磋琢磨し合う関係であったといえましょう。

その後、私は一足先に第1外科を辞し、神戸大学から現在の東京女子医科大学と移り、関口先生も旭川医科大学に移られて、没交渉の状態が20年近くも続きました。そのうち、1980年代中頃からと思いますが、関口先生がなにかでっかい仕事

をしておられるというようなことが聞こえてきましたが、専門が違えば、風の便りというしかなく、今にして思えば、北海道血液センター所長という要職について、世界にも有数の血液センターを育てられ、活躍されていたのでした。そのうち、不思議なことに、10数年前から関口先生との仕事の上での交際が再開しました。私は、三上外科の頃から血液浄化という、簡単にいうと血液を体の外に引き出して毒性物質を取り除く医療技術に関する仕事を専門的に研究していましたが、そのなかで、アフェレシスという濾過器を使って血液から血紫成分を分離し浄化する技術が、1970年代末から発展してきました。遠心分離器を使うアフェレシスは、実は、血液センターでは先行の技術であったので、共通の研究・臨床応用について、いろいろと情報を交換し、論議する場ができたのでした。それは、主に治療的アフェレシス研究会、現在の日本アフェレシス学会においてでした。そこで、関口先生は、血液センター関連の各種のアフェレシス技術の研究開発に従事され、先生が所長として導かれる北海道血液センターは、血液の収集から血液製剤の分配といった日常的血液事業ばかりでなく、血液に関する基礎研究にいたる広い分野で、日本では他の追随を許さない、また、国際的にも高く評価されている血液センターであることを明確に認識しました。関口先生の強力な指導力

に依るところが大きいと評価されていました。

さらに、密接な関係が新たにできました。私は1970年代の神戸大学にいた頃から、白い血液と呼ばれた酸素を溶解して運搬するperfluorochemicalに興味をもって研究をしていました。それは、さらに発展してその後、人の赤血球のヘモグロビンを利用する、いわゆる代用赤血球、あるいは人工酸素運搬体(物)と一般的に呼ばれるものになりました。近い将来、我が国での臨床応用を視野に入れながら、これを専門的に研究する場として、1994年に日本血液代替物学会が役立されました。ここでも関口先生と接触をもつようになりました。関口先生はその中心的創立メンバーとして、最初は土田英俊会長を強力に補佐する副会長として活躍され、ついで新年度からは会長として学会を主導されることが期待されていたのですが、それも叶わぬこととなりました。

関口先生は、その日のあることを責任ある医師として冷静に予断し、事後の混乱が起らないようにいろいろに配慮されていたと聞いています。なかなかできないことで、深い感銘を覚えます。

現代のような長寿社会では、まだまだご活躍が期待できるお年で亡くなられたことを惜しみながら、安らかにお休みくださるよう祈念する次第です。

# 関口定美先生のご冥福を祈る

東京女子医科大学中央検査部輸血科 清水 勝

お屠蘇気分も抜けやらぬ1月6日の朝に、関口先生のご逝去の報に接し、やるせない痛恨の想いで胸が一杯になった。常々良き相談相手を努めてくれていたからである。幾多の支援を受け、また判断に迷うときには現実に即した的確な方針を提示してくるなど、私にとっては、大変に有り難い、また得難いアドバイザーであった。先生の訃報は誠に残念の極みである。

先生の研究面での守備範囲は広範囲に及び、人工赤血球の研究課題もその一つであった。昔からの研究テーマであったとのことで、本学会の設立にも大いに尽力された。本学会のある研究テーマと共に取り組んでいたときには、既に車椅子の生活を余儀なくされておられたが、ご自身も積極的に研究に加わられ、検討会では貴重な助言をも大いに頂戴することが出来た。しかしながら、その臨床応用の成果をみるとなく身罷られたことは、先生自身にとってもさぞかし心残りであったのではないかと思われる。

一方、先生の本来業務である血液事業の現状は、1986年に新しい採血基準が導入されて以来の大きな変革期を迎えている。対応を誤れば、21世紀に大きな禍根を残すことになるであろう。このような重大な時期に、先生のような優れた構想力と実行力のある正に「有言実行」の人を失ったことは計り知れない損失であると言わざるを得ない。

想えば、先生と私の出会いは、20年以上も昔に遡る。当時先生は旭川医大に勤務されており、私が輸血についての講演会に招かれて、出向いた折りが、最初の出会いであった。既に寒風の吹き荒れるような季節で、夕暮れに近い時間帯であったが、講演会後に駅前一杯飲み屋で盃を酌み交わし、強く印象づけられたことを今でも鮮明に覚えている。

その後、先生が北海道赤十字血液センターの所長になられてからは、学会を始め種々の会合で意見を交換する機会が増えた。これらの会議では、傾聴に値する自らのご意見をはっきりと披瀝されることが印象深かった。特に鮮明な印象の一つで、はっとさせられたことは、厚生省のある委員会で、日本の血液事業のありようを東京の血液事業のそれと一緒にしてもらつては困るとの発言であった。ともすると、東京が総てであるかのごとき錯覚に陥りがちな在京者には胸を突かれる想いであった。このようなことをばりと言ってくれる人は、ともすれば敬して遠避けられることを慮って、黙りを決め込むことの多いわが国の現実をみるに付け、誠に得難い存在であった。物事を真にあるべき姿に近付けるには、現実を直視し、実態をより明らかに伝えていく努力が欠かせないからである。

さらに、先生は臨床医としての経験からして、血液事業は患者のためにあるとの立場を鮮明にされ、多くの先達や同僚

の中でも特に強く意識されていたことは特筆に値すると言えよう。そのことは先生の血液センターの運営方針や手がけた幾多の研究テーマが、よりよい輸血療法を推進し、確立していく上で不可欠なものであったことに如実に現れている。このような理念を推進することによって、血液センターの所長に就任されてから、数年を経ずして国内の血液事業面ではもとより、世界の輸血学界においても、日本の北海道に関口有りとの評価を確立してしまった。今にして思えば、既に当時から今日のあることを予期していたのであろうか。一陣の風が吹き抜けていったのかとの想いに駆られる。

先生の企画力や構想力の豊かさは、恒例となった北海道輸血シンポジウムの開催に際しても、遺憾無く発揮されてきた。毎年のテーマごとに国内ばかりでなく、多くの国外の研究者をも招いて毎回充実した内容の会にされ、的を得た演者の選任は、本当に素晴らしい、常々敬服させてきた。この一事をもってしても、関口先生が、少なくともわが国の輸血領域においては掛け替えの無い逸材であったことは明らかであろう。

このような先生の急逝を心から悼むとともに、昨夏の北海道輸血シンポジウムでの銘酒「定美」で共に交わした最後の乾杯を懐かしみつつ心より先生のご冥福を祈る次第である。合掌。

# 関口定美先生を偲んで

慶應義塾大学医学部外科

日本血液代替物学会会長 小林絢一

私が関口先生とお付き合いをさせて頂くようになったのはもう10年以上前のことになります。最初の頃は先生が外科のご出身であることを存じませんでしたので内科の先生にしては豪快なところのある方だなと思っていました。そういう目でみると今度は外科医らしくなく周囲によく気を使われる繊細な面を兼ね備えておられたので驚きました。私も外科の出身であることから関口先生には外科医としての心構え、生き方を教えていただき、また人工酸素運搬体のことだけでなく人工臓器や広く外科一般の学問的知識についてもいろいろと教えて頂きました。同窓ではないにも拘わらず師弟のような関係が結べ、関口先生を尊敬していました。

関口先生が1991年に編集された「Red Cell Substitutes」には早稲田大学の土田英俊先生との共著の私の論文も収められていますが、その本の表紙は燃え輝くような赤色で先生の人工酸素運搬体の開発にかける情熱をそのまま表現したような素

晴らしい色合いでした。私は毎日1回は書棚にあるその本を意識して眺め、自分を励ましておりました。関口先生がご逝去された後は毎日また違った感慨をもって眺め、人工酸素運搬体の研究が進むよう自分自身を鼓舞しています。あたかも関口先生が叱咤激励して下さっているような感じがします。

先生は会議での発言もいつも穏やかでありながらその内容は全体を見渡した先見性のあるものでした。モントリオールやサンディエゴでの国際学会の折、関口先生、土田先生、西出先生達と摂った夕食での楽しかった会話が彷彿としてきますが、関口先生の優しい笑顔と気配りが目に浮かびます。

医師である先生はご自身の病気について、どのようなことが起こるかお分かりになっていたことと想います。委員会でお会いする毎に機能や体力の衰えが目立つようになった先生を拝見し、関口先生がそこまでして頑張っておられるのだから若い我々はもっと頑張らなければとい

つも気を引き締めていました。人の命は永遠ではありませんがそれでも関口先生のご逝去はまだまだ若過ぎ、もっと血液事業のためにご活躍して頂き、またいろいろのことを教えて頂きたかったと残念でなりません。

先生のご急逝により不肖の私が先生の後を引き継いで日本血液代替物学会の会長になることになってしまいましたが、ライフワークとされた人工酸素運搬体の臨床応用を間近にご逝去された先生の無念なお気持ちを想う時、後を継ぐ私たちが夢の実現に向かって邁進しなければとあらためて身の引き締まる思いがします。関口先生どうぞ私たちの活動を見ていて下さい。関口先生に見つめて頂いているということを励みの1つに人工酸素運搬体の研究開発に精を出します。

関口先生と知り合え、いろいろ教えて頂けたことは私の人生にとって大変意味のあることでした。関口先生どうも有り難うございました。どうぞ安らかにお休み下さい。

# 故 薄場 彰先生を偲んで



## 【学歴・職歴】

昭和49年3月	福島県立医科大学卒業
昭和55年12月	医学博士
昭和56年4月	福島県立医科大学第1外科講座助手
昭和56年11月 ～昭和57年11月	米国シカゴ大学に留学
平成元年4月 ～平成10年3月	福島県立医科大学第1外科講座講師
平成10年4月 ～平成10年9月	福島南循環器科病院外科部長
平成10年10月	福島西部病院院長

## 【公職】

- 日本血液代替物学会評議員
- 「人工血液」編集委員

## 【研究】

人工血液 フロロゾールDAの研究  
人工赤血球 ネオレッドセルの研究  
侵襲時の逸凝固状態(hypercoagulability)に対するプロテアーゼインヒビターの効果

# 薄場 彰君を悼む

福島県立医科大学 元木良一

日本血液代替物学会機関誌“人工血液”の編集委員であった薄場彰君は、昨秋、平成10年10月3日、心筋梗塞のため急逝いたしました。まことに惜しみても余りある早々の旅立ちであり、彼の無念さを思うとき、涙を禁じ得ません。長い間、共に人工血液研究に携わってきた共同研究者として、私から皆様にご報告とご挨拶を申し上げます。

薄場君は若い頃から人工血液に関心を持っており、フロロゾールDA(FDA)の臨床応用の一環として、人工心肺の充填液として用いるための実験を重ねておりました。某日、血液型Rh(-)O型の患者が大量胃出血のため、ショック状態で搬送されてまいりまして、血液型の一致する輸

血用血液が隣県から到着するまでのつなぎとして、手元のFDAを投与し、何とか救命するという離れ技を演じてくれました。図らずもこれが世界初の人工血液臨床応用例となりました。その後もFDAの臨床応用へ向けての検討を続け、そのなかでFDAの性能や利点、避けなければならない問題などを明らかにした彼の業績は決して小さくなかったと思っています。

その後も、彼は縁あって、Neo Red Cell(NRC)の開発に関与することになりましたが、FDAの経験を生かし、テルモのグループと文字通り一体となって高性能の人工赤血球の実現に情熱を傾けていたようです。彼の外科領域の研究テーマの1つ

に高度侵襲下の生体における凝固能亢進の機序とその対策があり、NRCの持つ、赤血球をしのぐ酸素運搬能や、末梢血管抵抗の低減効果は、ショック時の末梢循環を改善する有力な手段になりうると考え、実験を進めていたところでした。

人工血液の研究がようやく世の関心を集めているとき、FDA、NRCなどの豊富な研究経験をもつ薄場君を失ったことは学会にとって誠に大きな損失であります、今はただ彼のご冥福を祈るばかりであります。

最後に、彼に活躍の場を与えて下さった本学会に、故人に代わって衷心より御礼申し上げてご挨拶とさせていただきます。



# 輸血代替療法により血液事業は変わるか How the Blood Substitute Therapy Gives Impact on the Blood Program

関口 定美

Sadayoshi Sekiguchi

## 編者前書き

本学会副会長関口定美北海道赤十字血液センター所長が本年1月6日急逝されました。奇しくも、私共に「明日第5回年次大会の原稿を書くよ」と言って帰られたその翌日のできごとでした。本稿はその第5回年次大会での総会長講演の内容を、残された原稿(先生はいつもきっちりと講演原稿を準備していました)を元に編者らがまとめたものです。原稿には極力手を加えておりません。先生のお声を思い出させていただき、人工血液にかけられた情熱を感じ取っていただければ幸いです。

## 1. はじめに

人工血液開発の目標は、古くから、いつ、どこででも、必要な時に、血液型に関係なく輸血できる人工的代替物を開発することである。

一方、1980年代後半の薬害エイズ禍のため、血液に関するnational policyとして、献血による血液の国内自給、および安全な血液確保の対策が、先進国、発展途上国ともに求められることになった。

近年の人工血液開発の目標は、このnational policyを補完するものとして、考えられるようになり、この開発の成否は国の血液の安全対策、すなわち安全な輸血医療の確保に対する成果と密接に関連している。

## 2. 血液の国内自給

まず、わが国における献血による輸血用血液の国内自給の状況を紹介したい(Fig. 1)。

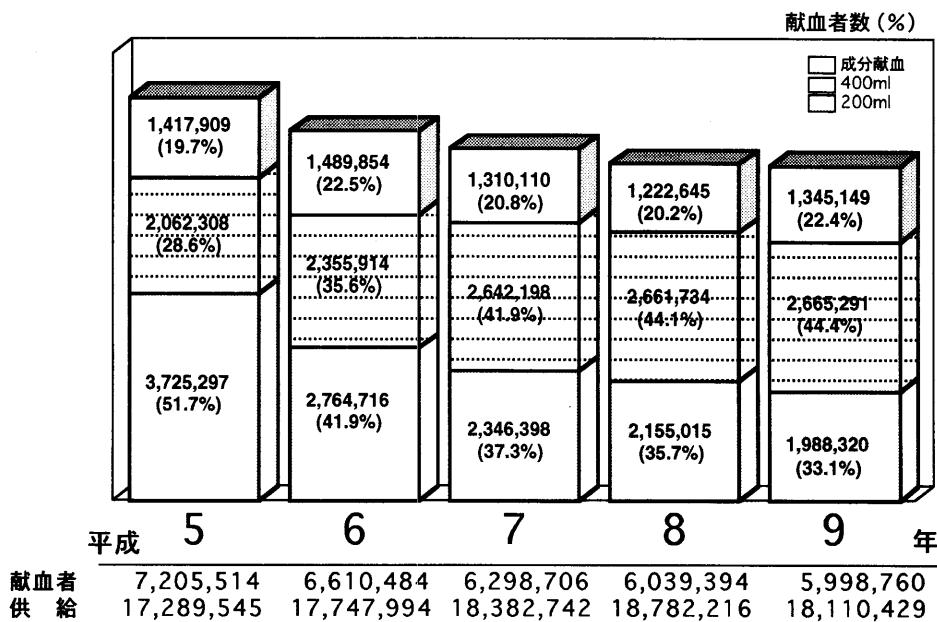


Fig. 1 年別献血

北海道赤十字血液センター, 〒063-0002 札幌市西区山の手2-2. Hokkaido Red Cross Blood Center, Yamanote 2-2, Nishi-ku, Sapporo 063-0002, Japan.  
論文受付1999年1月25日。

平成9年には約600万件の献血があった。これを検査・調製し、200mLを1単位として換算すると約1,800万単位の輸血用血液が血液センターから病院へ供給された。一方、4年前の平成5年には720万人の献血者で1,730万単位の血液が供給されている。

この4年間で120万人の献血者が減ったが、ほぼ100万単位多い血液が供給されることになる。これは200mL全血献血が170万件減少しても、400mL全血献血が約60万件増加したことにより、総量としての血液は十分確保されたことを意味する。

Table 1は、各成分製剤の供給の各年毎の実態を示す。どの製剤とも、いわゆる高単位の製剤が次第に多く使われていることがわかる。輸血のガイドラインでは、輸血あたりの供血者数を減らすことが重要と謳われており、このように高単位の血液を使うことは、輸血副作用の予防に大きく貢献している。

これに要する血漿量は約270万Lと推定されるので、献血による自給率は大変低くなっている。

血液の自給という目標からすれば、人工的な蛋白製剤の開発を急がなければならないと思われる。

最近、旧ミドリ十字、現吉富製薬は組み換えアルブミンの開発を完成し、千歳に製造工場を設立、2000年7月より生産を開始するとのニュースが報道された。

年間100万バイアル、1バイアル12.5gのアルブミンとすると、12,500kgの組み換えアルブミンが市場に出現することになり、大きく献血による自給率を変えることになる。

ともかく、わが国のアルブミン使用量が他国に対して多いことは、以前から指摘されている。血液使用についてヨーロッパと比較してみると、赤血球製剤、静注用 $\gamma$ グロブリン製剤においてはほとんどその使用量に違いはないが、異なるのは新鮮凍結血漿と

Table 1 年別献血成分製剤供給

	平成5年	6年	7年	8年	9年
全血					
200mL	384,473	259,387	177,522	125,823	87,658
400mL	126,587	125,131	107,918	88,582	72,026
赤血球製剤					
1 u*	2,286,504	1,816,272	1,618,124	1,555,453	1,389,681
2 u**	1,440,971	1,757,619	1,987,805	2,085,070	2,078,450
血小板製剤					
1 u*	536,025	150,171	43,155	10,386	736
2 u**	460,825	240,922	140,381	74,754	21,136
5 u***	303,079	255,644	173,062	114,228	67,734
10 u***	256,487	357,352	412,629	449,945	476,046
15 u***	41,717	60,105	80,252	101,108	102,163
20 u***	7,640	16,786	29,274	39,814	38,503
血漿#					
1 u*	2,258,220	1,751,668	1,431,615	1,223,410	1,039,767
2 u**	1,213,839	1,438,956	1,628,634	1,686,086	1,582,739
5 u***	96,189	111,241	120,398	122,934	136,450

\* : 200mL全血献血由来

# : 主として新鮮凍結血漿

\*\* : 400mL全血献血由来

u : 単位

\*\*\* : 成分献血由来

Table 2は1997年の輸血のほかに分画製剤の原料となった血液の内訳である。この年の総使用量は65万Lの血漿であるが、各製剤別の献血による自給率をみると、第VIII因子製剤は50%となっている。

しかし第VIII因子製剤のほぼ半数50%に組み換え第VIII因子が使われているので、血液由來の製剤としては100%献血で自給していることになる。その他第IX因子製剤は約70%，アルブミン製剤は約26%，静注用 $\gamma$ グロブリン製剤は約60%の自給率である。ここで問題なのは、非常に多く使用されているアルブミン製剤で、

アルブミンの使用量である(Table 3)。ともに日本はヨーロッパの2倍量以上を使用しており、ヨーロッパ並のレベル、すなわち1万人あたり3kgのアルブミン使用量に減らすことができれば、現在の原料血漿必要量の半分となり、ヒト血漿からできるアルブミンと、組み換えアルブミンがあれば、第VIII因子同様、アルブミンも献血による国内自給が完成することになる。

わが国の血液事業における血液の不足量は、蛋白の部分だけであることから、組み換え第VIII因子、組み換えアルブミンが提供されることによって、量的には自給が解決されることになる。

Table 2 献血による血漿分画製剤の製造量(1997年)

使用血漿量		約65万L*
製剤内訳	製剤量	献血による自給率
1. 第VIII因子製剤	1億1,000万u	55%
2. 第IX因子製剤	2,000万u	67%
3. アルブミン製剤	16,600kg	26%
4. 静注グロブリン製剤	1,600kg	57%

\*アルブミン製剤血漿換算量

Table 3 血液使用におけるヨーロッパとの比較

	ヨーロッパ (CE人口4億8千万人)	日本 (人口1億2千万人)
赤血球製剤	350 単位/万人	330 単位/万人
新鮮凍結血漿	72 単位/万人	180 単位/万人
アルブミン	3 kg/万人	6 kg/万人
IVIG	250 g/万人	260 g/万人
第VIII因子	26,500 単位/万人	12,000 単位/万人

### 3. 血液の安全性

次に血液の安全面からの血液事業を考えてみる。

最近、輸血副作用が発生した場合、当該血液を供給した血液センターに報告をすることになっている。これを日赤中央血液センター医薬情報部で集計し公表している。1994年より1997年の4年間の集計ではB型肝炎とされたものは15例、C型肝炎は2例、HIVは1例発生している。年間の総輸血例数が確定していないので、われわれが推定した年間輸血例100万件をもとに計算してみると、B型肝炎は27万件に1例、C型肝炎は100万件に1例、HIVは400万件に1例の頻度である(Table 4)。

Table 4 主な輸血感染症の発生頻度

主な輸血 副作用	医療機関から血液センターへの副作用報告 (1994~1997年)		
	報告数(解析可能数)	輸血との因果関係 が深い症例数	発生頻度*
B型肝炎	114 (72)	15	1/27万
C型肝炎	104 (41)	2	1/100万
HIV	1**	1**	1/400万
HTLV-I	0	0	0

輸血情報(9705-37), 日本赤十字社中央血液センター

〃 (9807-46), 〃

\* 年間輸血件数を100万として計算した

\*\* 1997年報告による

Table 5は、アメリカにおける輸血によるウイルス感染の推定リスクを示す。Schreiberの報告が最近最も多く引用されているので、彼らの算定式で日本での感染推定リスクの算定を試みたが、基礎となるデータがわが国では全国的に集計されていないので、北海道におけるデータから求めた推定リスクを比較した。

B型肝炎ウイルスではほぼ2倍の推定リスクとなり、HCVについては2分の1の推定リスクとなっている。HTLV-Iはほぼ3倍のリスクであるが、輸血によるHTLV-I感染の報告はされていない。推定リスクがさきに述べた副作用報告からの推定頻度と大きく異なっているが、算出に使われた要因と算出方法の違いによるものであり、われわれは献血による血液の輸血から、献血者のデータをもとに計算された推定リスクが正しいと判断している。

Table 5 輸血によるウイルス感染の推定リスク

Virus	Estimated risk of viral infection	
	U.S.A. <sup>1)</sup>	Hokkaido Block <sup>2)</sup>
HBV	1 in 63,000	1 in 30,000
HCV	1 in 103,000	1 in 236,000
HIV	1 in 493,000	N.D. <sup>3)</sup>
HTLV	1 in 641,000	1 in 207,000

1) George B. Schreiber et al.: N Engl J Med 1996;334:1685-1690.

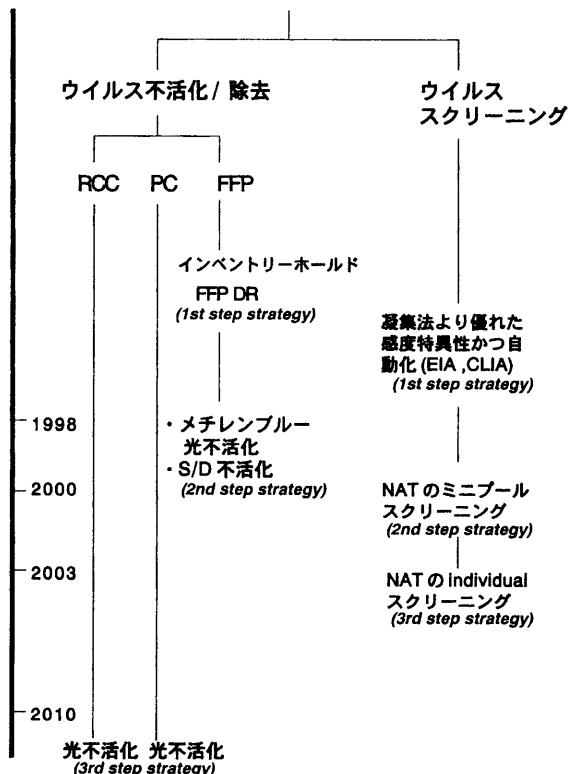
2) We calculated the risks in the same manner as Dr. Schreiber et al. in Hokkaido Block Red Cross Blood Centers, 1995-1997.

3) N.D.:no data; no seroconverted donor to HIV seropositivity was observed during this study period.

4) No case of transfusion-transmitted HTLV infection has been reported since the introduction of seroscreening in Japan.

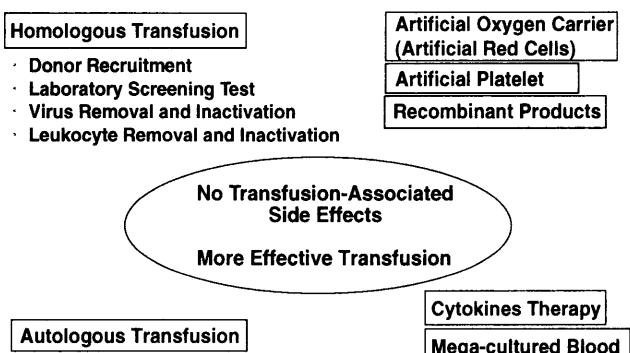
輸血に用いる血液がヒト由来である以上、どうしても除くことのできない輸血副作用の原因が存在するが、血液中の感染性ウイルスについては副作用予防対策としてのウイルススクリーニングの強化、ウイルス不活化/除去が考えられる。ウイルススクリーニングでは、究極のスクリーニング法としてウイルスの遺伝子の一部、すなわち核酸を增幅して検査する方法が考えられ、開発が進められている。これによると、極めて少ない量のウイルスが存在してもそれを見出すことができる。ウイルス感染は著しく少なくなるものと考えられる。

一方、ウイルス不活化/除去は血漿分画製剤では普通に行われる対策であるが、輸血用の成分製剤では難しく、唯一血漿製剤にこの方法が試みられつつある。感染症をゼロにするには、血漿分画製剤、とくにアルブミン製剤レベルの安全性確保が必要と考えている。Fig. 2のような戦略によって2000年前半には安全な輸血用血液製剤が提供されるものと考える。



#### 4. 将来の輸血と人工赤血球

このような状況を踏まえて将来の輸血を考えてみたい。その焦点となるのは、輸血は副作用のない効果的な輸血医療でなければならない点である。このためにヒト由来血液の安全対策を進め、自己血輸血の促進によって、ヒトの血液を使う輸血に代わって、ヒトの血液を使わないで済ませる代替療法を考えながら、少なくとも副作用においては対策として代替療法に匹敵する安全処置がなされていなければならぬであろう。また、人工血液、人工赤血球、人工血小板、組み換え蛋白製剤も重要な輸血の手段となることは間違いない、これらについてもヒト由来製剤と異なる因子での安全性が確保されねばならないのは当然であり、これが確認されてはじめて輸血の手段として登場してくるものと考える(Fig. 4)。



しかしながら、安全性には限界があることは明らかであり、100%の安全はあり得ない。すなわち前述の戦略で候補として挙げられる対策については、自ずと満足しなければならないmargin of safetyが存在する。これは技術的問題ばかりではなく、cost vs safety relationがあるために、どれほどお金をかけてもsafetyの上限が望めない場合があるからである(Fig. 3)。ヒト由来血液の安全性の限界を常に考えておく必要がある。

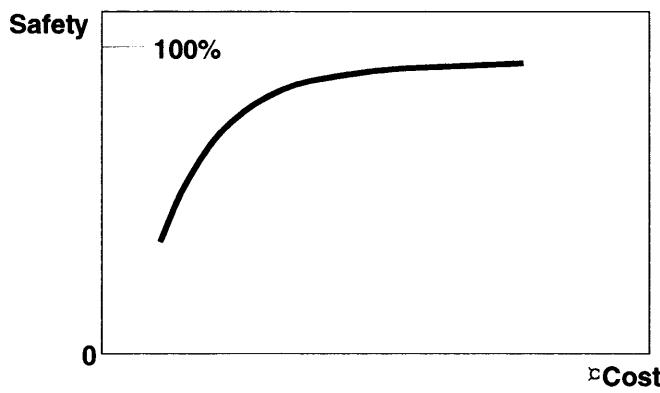


Fig. 4 Blood transfusion in future

現在、血液の人工物として実際に使われ、あるいは開発途上、さらにはアイデアに留まっているもの等がある(Fig. 5)。前述のごとく、組み換え第VIII因子製剤はすでに臨床応用されており、組み換えアルブミンは臨床第III相試験が終了している。

このことから、組み換え蛋白製剤については今後とも安全性を確認しながら、実際の輸血医療に大きく貢献するものと考える。

これに対し、早くから研究されていたが、やっと第III相臨床試験に突入したのは、いわゆる人工的酸素運搬体、人工赤血球である。

また、血小板の人工物は、開発研究が緒に就いたばかりであり、その将来を洞察するのは非常に難しい。したがって、人工血液の、血液事業の今後に対する影響は、赤血球代替物開発の状況をみることが適切であると思う。

臨床試験に達した人工酸素運搬体、すなわち人工赤血球はすべて北米の企業によるものである(Table 6)。このうち第III相臨床試験を行っているものが、Baxter Healthcareの分子内架橋型のHemAssistであり、多くの臨床分野にわたり多くの臨床投与成績が集計されている。

血漿成分	電解質溶液 血漿增量剤 組み換え第VIII因子	
	組み換えアルブミン	
赤血球成分	人工的酸素運搬体 人工赤血球	
血小板成分	人工血小板	
<input type="checkbox"/> 臨床応用		

Fig. 4 血液の働きをする人工物

Table 6 米国における人工酸素運搬体開発の到達点  
－第3相臨床試験(途中経過)から－

Baxter Healthcare社(分子内架橋型)HemAssist™ 1992年から12種類の臨床第1相、2相試験を実施し、完了 一般外科、整形外科、心臓血管外科手術、ICU、ストローク、腎透析症例を対象 臨床第3相試験は700例完了、新たに3種類、1500例を対象とした試験を開始
Northfield社(分子内架橋型)PolyHeme™ 臨床第2相試験は10単位まで完了 臨床第3相試験は緊急外科手術、外傷症例250例を対象に6単位まで検討 完了まで1年を予定

しかしこのうち最も重視している適応は、外傷とか、緊急手術に対するものであるが、必ずしも満足すべき成績が得られているわけではない。

同じくNorthfield社による分子間架橋型のPolyHemeも第Ⅲ相臨床試験が行われており、前者同様、緊急手術例とか外傷例を適応とし、同種血輸血が回避できるということで、このものの利点を挙げている。

その他、第Ⅰ、Ⅱ相臨床試験中のものをスライドに示すが、それぞれ先進研究の開発結果を参考にして進められ(Table 7)、今後の発展が期待されている。

Table 7 米国における人工酸素運搬体開発の状況

－第1相、第2相臨床試験中－

Somatogen社(リコンビナントヘモグロビン)Oproto™  
外科手術症例を対象に臨床第1相試験は100g投与まで完了  
臨床第2相試験(早期)は血液希釈、心臓バイパス症例で進行中

Enzon社(PEG修飾ウシヘモグロビン)  
臨床第1相試験は放射線照射ガン症例を対象に完了  
臨床第2相試験進行中

Hemasol社(分子間架橋型)Hemolink  
カナダで臨床第1相試験

Apex Bioscience社(ピリドキシル化ヘモグロビン)PHP  
NOスカベンジャーとして敗血症ショック、重症ICU症例を対象に臨床第1相試験

SynZyme社(ポリニトロキシル化ヘモグロビン)PNH  
酸素運搬治療薬、ラジカルスカベンジャーとして1998年より臨床試験計画

以上述べたいろいろな人工赤血球の開発は、ヒトヘモグロビンを利用するとか、組み換えヘモグロビンを利用するとか、あるいはウシヘモグロビンの利用を考えたものであるが、この形態はすべて非細胞型のacellularのものである。特に分子内架橋型のHemAssistにおいては、血管内皮細胞由来弛緩因子(EDRF)の不活性による血圧上昇、あるいはヘモグロビンの有する膠質浸透圧の限界から投与量が制限されるため、このものの適応を酸素輸液として位置付けている。

したがって、ヒト血液の持つ酸素運搬能、血中生存期間、あるいは赤血球のもつ特徴的なスカベンジャー機能等を考えると、現在開発されている人工酸素運搬体、あるいは人工赤血球においては、赤血球の機能と比べるまでもなく劣るものであり、その代替物としての適応を明確にするには、なお時間を要するものと考える。

一方、赤血球輸血では、輸血のトリガーは、今まで考えられていたヘモグロビン量10g/dLから7g/dLと低下し、赤血球輸血の適応となる範囲は非常に狭まってきていると考えられる。赤血球輸血のために代替物が適応とされるのは、少なくとも赤血球の持ついろいろな機能が付加されていなければならないし、赤血球の機能をできるだけ付加するのであれば技術的には、liposome encapsulated細胞型ヘモグロビンなどの開発を考えなければならないであろう。

以上のような理由から、現在開発されている人工酸素運搬体、あるいは人工赤血球の適応を考えると、もちろんヒト血液に代わりうるものであれば、副作用予防のために利用されようし、また古来からの希望であった、血液型に関係のない輸血あるいはヒト血液に勝る長期保存、あるいは特殊な応用として微小循環の改善

に使われる可能性はある。

## 5.まとめ

将来の血液事業における人工血液、特に人工赤血球の位置付けを考えると、赤血球の需要は減少し、赤血球製剤はより純化され、また保存期間も延長する工夫がなされるだろうことから、今後人工赤血球の血液事業における位置付けとしては、ヒト赤血球にまったく置き換えられるものではなく、長期保存、緊急時対策、災害時対策用などの危機管理用血液としての位置付けが適正と考えてよいのではないだろうか(Table 8)。

Table 8 血液事業で血液製剤に求められること

- 
1. 赤血球製剤の需要は減少
  2. より安全な、純化された血液製剤として、献血は赤血球アフェレシスが主流となるであろう
  3. 保存期間をより延長する工夫がなされるであろう

以上の状況から人工赤血球の血液事業における位置づけは、ヒト赤血球にまったく置き換えられるものではないことから、長期保存、救急時対策、災害対策等の危機管理用血液として位置づけられるであろう。

---

以上、血液代替物が輸血療法、ひいては血液事業に与える影響について概説した。私は常日頃「21世紀になっても献血は必要である」と述べているが、われわれの代替物研究および開発とその応用が、血液スクリーニングの高精度、高感度化等と手を携え、本論で述べたような住み分けにより、輸血療法をより安全かつ効果的な医療とすることを切に願い、講演を終えたい。

# 赤血球代替物性能評価の方法の開発と臨床試験

## Development of Methods to Evaluate the Efficacy of Red Blood Cell Substitutes and Clinical Trial

藤井ひとみ<sup>1)</sup>, 藤井聰<sup>2)\*</sup>, 仲井邦彦<sup>3)</sup>, 佐久間一郎<sup>2)</sup>, 北畠顕<sup>2)</sup>, 劍物修<sup>1)</sup>

Hitomi Fujii<sup>1)</sup>, Satoshi Fujii<sup>2)</sup>, Kunihiko Nakai<sup>3)</sup>, Ichiro Sakuma<sup>2)</sup>, Akira Kitabatake<sup>2)</sup>, Osamu Kenmotsu<sup>1)</sup>

### はじめに

最近筆者らは、「赤血球代替物性能評価の方法の開発と臨床試験」というテーマについて、米国バーモント大学医学部付属病院内科ソーベル教授、麻酔科シャピロ教授、外科シャックフォード教授の指導下に、外傷性・出血性ショックモデルを用いて修飾ヘモグロビン製剤の臨床応用への前段階としての動物実験を行った。また、「大量出血が予測される高リスクな麻酔症例の診断と対策について」というテーマについて、主に最新の文献学的調査さらに、バーモント大学を中心に周辺の研究機関の見学、研究者との面会調査を行ったのでその詳細を報告する。

### 1. 赤血球代替物性能評価の方法の開発と臨床試験

#### 1.1 外傷性出血性ショックモデル

バーモント大学では外傷性出血性ショックモデルを用いて修飾ヘモグロビン製剤の救急蘇生時における有用性について解明中である<sup>1-3)</sup>。その実験のプロトコールについてはTable 1にまとめた。修飾ヘモグロビン製剤DCLHb(Diaspirin cross-linked hemoglobinダイアスピリン・クロスリンク・ヘモグロビン：以下DCLHbと省略)はHBV, HCV, HIV陰性で期限切れ輸血用ヒト濃厚赤血球製剤を加熱処理後に、その赤血球からヒトヘモグロビンを取り出しさらに化学的に修飾したものである。DCLHbの第3相臨床試験の準備として、ブタを用いた外傷性・出血性ショックモデル実験を行っている。出血量調節出血性ショック実験モデル(動脈カニューレからの脱血+液体窒素による脳冷凍損傷)と出血量非調

節出血性ショック実験モデル(人為的脾臓破裂による腹腔内出血)の二つを作り、それぞれの救急蘇生における修飾ヘモグロビン製剤(DCLHb)の有用性を検証している。これらの実験モデルの設定は、車社会といわれるアメリカでは交通事故が多く、中でも大量出血を伴う頭部外傷は死亡率が特に高く、幸い救命し得ても蘇生に手間取った場合などは重篤な後遺症が起きることを背景にしている。また、交通事故による腹部外傷では脾臓破裂が高率に起こり、かつ急速な大量出血を伴うため予後不良な出血性ショックを起こし易く、速やかな救急蘇生を要する事も問題になっているためである。

各実験モデルには、比較対照群として無処置群、スタンダード蘇生群(電解質輸液+輸血)、膠質浸透圧製剤投与群、昇圧薬投与群の4群をおき、修飾ヘモグロビン製剤(DCLHb)投与による蘇生群との間において、全身の循環動態および末梢臓器変化、中でも脳の血流と代謝状態の差の有無を解明している。

実験動物にブタを用いる。動物の実験室搬入、麻酔、測定用機器の設置、人為的外傷作成、蘇生、緊急開腹手術、および術後回復期の一定時間毎の測定を行う。一回の実験には24時間をする。この実験プロトコールは、自動車事故などによって致命的な頭部外傷あるいは腹部外傷を負った患者が事故発生後、救急病院に搬入されて救急蘇生、診断および緊急開腹手術を受けるといった外傷患者の実際的な救急救命医療の場合を想定して作られたものである<sup>4-7)</sup>。各実験群に8頭ずつのブタを用いる計画(2モデル×5群×8頭=80頭)で現在までに48頭の実験を完了した。

\*To whom correspondence should be addressed.

1)北海道大学医学部麻酔科, Department of Anesthesiology, Hokkaido University School of Medicine, 2)北海道大学医学部循環器内科, Department of Cardiovascular Medicine, Hokkaido University School of Medicine, 3)東北大学大学院医学系研究科環境保健医学分野, Department of Environmental Health Sciences, Tohoku University School of Medicine.

北海道大学医学部循環器内科, 〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目, Department of Cardiovascular Medicine, Hokkaido University School of Medicine, N15 W7 Kitaku, Sapporo, 060-8638, Japan.

論文受付1998年12月3日。

Table 1 外傷性出血性ショックモデルの実験プロトコール

## 1-1 外傷性脳外傷・出血性ショックモデル(出血量調節性)の実験プロトコール

各群8頭のアダルト : 40-45kg、雄雌、液体窒素脳外傷、大腿動脈内カテーテルより用手的脱血(約1500mL)

	準備時間	安静時間	事故発生	救急蘇生	病院搬入	手術室	術後観察
時間(分)	動物搬入、麻酔 <sup>1)</sup> 、コントロール値測定 <sup>2)</sup> 、各種機器を装着	事故発生、発見、通報、救急隊到着まで	救急隊員による救急病院搬入、診察、診断へ搬送	緊急開腹手術(止血)	緊急開腹手術(止血)	術後経過観察 <sup>3)</sup>	術後経過観察
時間経過(分)	-240	-90	0	20	30	20	30 2h
データー採取時間		(コントロール) (H1)	(20) (H2)	(50) (H3)	(70) (R1)	(70) (R2)	
蘇生運延群	(L/R <sup>4)</sup> 4-5mL/kg輸液)	(L/R4-5mL/kg輸液)	無処置	無処置	無処置	無処置	一定時間毎に測定
スタンダード蘇生群 : L/R	(L/R 4-5mL/kg輸液)	(L/R 4-5mL/kg輸液)	L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	必要に応じて輸液、輸血 <sup>7)</sup>
スタンダード蘇生群 : DCLHb <sup>5)</sup>	(L/R 4-5mL/kg輸液)	(L/R 4-5mL/kg輸液)	無処置	DCLHb250mL投与 + L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	必要に応じて輸液、輸血 <sup>7)</sup>
スタンダード蘇生群 : 高張性食塩水 + デキストラン	(L/R 4-5mL/kg輸液)	(L/R 4-5mL/kg輸液)	無処置	高張性食塩水 + デキストラン投与 + L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	必要に応じて輸液、輸血 <sup>7)</sup>
スタンダード蘇生群 : フェニレフリン	(L/R 4-5mL/kg輸液)	(L/R 4-5mL/kg輸液)	無処置	フェニレフリン 80μg/min投与 + L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	必要に応じて輸液、輸血 <sup>7)</sup>

1) ケタミンで麻酔導入、パンクリオニウムで気管内挿管、1.5-2.0%ハロセンド麻酔維持、人工呼吸。

2) 平均動脈血圧、中心静脈圧、肺動脈圧、心拍出量、心拍出率、尿量、動脈血ガス分析(Pao<sub>2</sub>, Paco<sub>2</sub>, pH, 乳酸), 電解質、ヘモグロビン量、脳局所血流量。

3) 術後約2時間まで必要な処置を行いながら術後経過観察。2時間後に屠殺し心臓、肺、脳、腎臓を摘出し秤量し肉眼的観察を行う。

4) L/R = 乳酸化リソジル液の略語。

5) DCLHb = Diaspirin Cross-Linked Hemoglobinの略語。

6) MAPがコントロール値の±10%内になるように輸液速度を調節。

7) 循環動態を安定保持するよう輸液、輸血速度を調節。

1-2 外傷性出血性ショックモデル(出血量非調節性)の実験プロトコール  
各群8頭のマウス:40-45kg、雄雌、脾臓損傷による腹腔内出血

	準備時間	安静時間	事故発生	救急蘇生	病院搬入	手術室	術後観察
時間(分)	動物搬入、麻酔 <sup>1)</sup> 、コントロール値測定用各種機器を装着	事故発生、発見、通報、救急隊到着まで	救急隊員による救急蘇生下に病院へ搬送	救急病院搬入、診察、診断	緊急開腹手術 (止血、脾臓摘出)	術後経過観察 <sup>3)</sup>	
時間経過(分)	-240	-90	0	20	30	20	30 24h
データー採取時間			(コントロール) (H1)	(20) (H2)	(50) (H3)	(70) (R1)	(100) (R24)
蘇生運延群 : L/R		(L/R <sup>4</sup> 4-5mL/kg輸液)	(L/R 4-5mL/kg輸液)	無処置	無処置	必要に応じて輸液、輸血 <sup>7)</sup>	一定時間毎に測定(R1, 2, 6, 12, 24)
スタンダード蘇生群 : DCLHb <sup>5)</sup>		(L/R 4-5mL/kg輸液)	(L/R 4-5mL/kg輸液)	L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	必要に応じて輸液、輸血 <sup>7)</sup>	
スタンダード蘇生群 : 高張性食塩水+デキストラン		(L/R 4-5mL/kg輸液)	(L/R 4-5mL/kg輸液)	無処置	DCLHb250mL投与 +L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	必要に応じて輸液、輸血 <sup>7)</sup>
スタンダード蘇生群 : フェニレフリン+デキストラン		(L/R 4-5mL/kg輸液)	(L/R 4-5mL/kg輸液)	無処置	高張性食塩水 +デキストラン投与 +L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	L/Rの急速輸液 <sup>6)</sup>	必要に応じて輸液、輸血 <sup>7)</sup>

- ケタミンで麻酔導入、パンクリオニウムで気管内挿管、1.5-2.0%ハロタンで麻酔維持、人工呼吸。
- 平均動脈血圧、中心静脈圧、肺動脈圧、心拍出量、心拍出係数、尿量、動脈血ガス分析(Pao<sub>2</sub>, Paco<sub>2</sub>, pH, 乳酸), 電解質、ヘマトクリット、ヘモグロビン量、脳局所血流量。
- 術後24時間まで必要な処置を行なながら術後経過観察。24時間後に屠殺し心臓、肺、脳、腎臓を摘出し秤量し肉眼的観察を行う。
- L/R = 乳酸リシンゲル液の略語。
- DCLHb = Diaspirin Cross-Linked Hemoglobinの略語。
- MAPがコントロール値の±10%内になるように輸液速度を調節。
- 循環動態を安定保持するよう輸液、輸血速度を調節

今までの実験の途中結果から考えて、修飾ヘモグロビン製剤(DCLHb)は救急蘇生時に使用すると血圧上昇作用[内因性血管拡張作用物質である一酸化窒素Nitric Oxide(以下、NOと略す)を強く吸着するため末梢血管収縮が生じるといわれている]を有するため血圧の保持が容易になり、また腎臓への血流量減少があるにも関わらず尿流出量は保持される(作用機序は不明)ことから、出血性ショックの救急蘇生時における使用はかなり期待できる。しかし、救急蘇生の成否を決める脳機能保持作用については、修飾ヘモグロビン製剤(DCLHb)の使用は他の蘇生方法に比較して明らかな優位性があるとはまだいえない。脳組織は独自の血流量自動調節能を有しており、相当の危機的状況に陥るまでは脳の酸素消費量を補うに必要な酸素供給を得るべくその血流量を微妙に調節するといわれている。そのために実験群間に大きな違いが出にくいのであろうと考えられる<sup>8-11)</sup>。

## 1.2 修飾ヘモグロビン製剤DCLHbの副作用

DCLHbの副作用に関する研究では、細菌性エンドトキシンショックの増悪、血小板の凝集能亢進による血栓性増悪、および冠動脈収縮増悪の可能性が指摘されている<sup>12-15)</sup>。

外傷患者では外傷部位からの細菌感染の可能性が高いと考えられる。そのため、外傷性ショックの救急蘇生に修飾ヘモグロビン製剤(DCLHb)を用いた場合には、細菌性エンドトキシンショックの増悪による予後の悪化(死亡率の増加)が重要な問題になる。作用機序として以下の点が考えられている。①酸素供給体としてのヘモグロビンが何らかの機序で細菌の血液中での増殖を促進する。②修飾ヘモグロビン製剤(DCLHb)との共存が何らかの機序によりエンドトキシン(LPS:リポポリサッカライド)の心臓血管に対する毒性作用を強める(NO吸着が関与しているという研究報告がある)。③網様内皮細胞系(赤血球の生理的代謝臓器である脾臓に多く含まれる)によるエンドトキシンの捕捉が妨げられ血液中に滞留する時間が長くなつて、エンドトキシンの毒性が長時間に亘り生体に害を及ぼす<sup>16-20)</sup>。

また、修飾ヘモグロビン製剤(DCLHb)は血管内皮細胞あるいは血小板そのもののNOを吸着する作用があるため、あるいはその他の未だ解明されていない作用機序によって血小板凝集・粘着を促進して、血栓塞栓症を増悪する危険性があるといわれている。さらに冠動脈収縮増悪の可能性も指摘されている<sup>21-23)</sup>。これらのことは、修飾ヘモグロビン製剤(DCLHb)が高齢者に使用された場合、患者の予後を大きく左右する問題となると考えられる。なぜなら、高齢者の基礎疾患として脳動脈硬化症や冠動脈硬化症が高率に見られるのはよく知られたことであり、上記の機序によりこれらの基礎疾患の再燃や増悪(脳梗塞、心筋梗塞の合併)に伴う後遺症や死亡率の増加)などが想定されるからである<sup>24-26)</sup>。

## 1.3 最近の開発状況

平成9年に米国で行われた酸素運搬体に関する最新開発状況を話し合う会議の報告書を米国陸軍病院血液学部門教授アービング先生(現在ワシントン癌研究所)に頂いた。以下その要約をまとめた(赤血球代替物開発の進歩、米国サンフランシスコ市、カリフォルニア大学医学部、レヴィン教授)。

赤血球代替物の製剤化の研究開発は、最近10-15年の間に目覚

しく進歩した。大きく分けて2種類の酸素運搬体製剤が臨床研究の段階に達している。ヘモグロビンを基にした酸素運搬体(以下HBOCと省略)とパーカルオロカーボン乳剤(以下PFCと省略)である。臨床的評価が現在行われているもののみ示した(Table 2)。

上記のHBOCやPFCは、末梢組織へ酸素を有効に運搬・放出していることが示されている。一般的には、それらの投与は重篤な副作用を起こしていない。しかし、HBOCは中等度の血圧上昇、消化管蠕動不全、酵素上昇などの副作用を起こし得る。PFCは中等度の血小板減少を起こしたとの報告がある。また両者は単核球/マクロファージ系の機能に影響を及ぼすとも言われている。

これらの製剤はTable 2のように広い適応範囲での臨床的な評価を受けている。中でも大変有望なのはHBOCを血液希釈に用いる方法である。手術開始前にHBOCを酸素運搬体として投与しながら赤血球が豊富な自己血を可及的多量に体外に貯血し、後に患者に使用できることを可能にするからである。この方法は主に、出血や外傷による急激な血液損失に伴う低血圧症やショック状態の患者の救急蘇生治療に用いられるであろう。HBOCやPFCは粘稠性が低いので、鎌状赤血球症や冠状動脈カテーテル挿入時に起きる小血管の部分的閉塞による限局性局所虚血部位へも有効な酸素供給を可能にするかもしれないという点で興味深い。固形性腫瘍は酸素化によって放射線感受性が上がると報告されているので、HBOCやPFCが腫瘍の放射線療法の有効性を上げるかもしれない。HBOCはNOを吸着するので、細菌性ショック患者の血圧を上昇させる。PFCは人工心肺バイパス使用手術中におきる空気やその他の気体による微小塞栓を血液循環から取り除くのに有効かもしれない。

しかしあつかのデーターが示すように、これらの製剤は毛細血管床を拡張させるため、末梢組織の酸素化が不十分になるのでその利用が制限されるかもしれない。この生理学的に重要な事項の解明のためにさらなる実験が必要である。これらの製剤の安全性は一応確立されたように見受けられる。しかしいろいろな文献上議論されているとおり、有効性評価のための基準設定は難しいようだ。より正確に言えば、赤血球輸血の有効性評価の基準は未だもって確立されていないといえる。なお、リポソーム封入ヘモグロビン(LEH)は、臨床試験が行われていないのでここでは論じられていない。

Table 2に示したように赤血球代替製剤が様々な分野で臨床試験されているということは、少なくともそれらの一分野において有効性が証明されるであろう事を示唆する。最近、第2相が行われたり第3相臨床試験が開始された製剤が増えているので、今世紀の終わりまでには重要な試験結果が出そろうと期待できる。これらの臨床試験の結果、赤血球代替製剤が有効だとなると、その供給源確保の問題、特にヒト赤血球からヘモグロビンを得る場合に十分な原料が得られるかどうかが大きな課題になるであろう。以前注目されていた牛赤血球を用いて赤血球代替製剤を作る方法は、牛海綿状脳炎がヒトに感染するかもしれないという危険性により疑問視されるようになってきた。一方、リコンビナント修飾ヒトヘモグロビンはこれらの観点からすると有望であるが、もしより広く使用されるようになれば十分な生産とコストの面で今後検討されなければならないであろう。

生理学的な有効性を証明されたHBOCやPFCは、臨床医学的に

Table 2 臨床研究されている製剤

製品名 (製薬会社)	組成	適応	臨床研究の段階 (1997年現在)
PHP (Apex Biosciences)	ポリオキシエチレンに結合されたピリドキシル化ヒトヘモグロビン	細菌性ショック	第1, 2相
HemAssist*1 (Baxter Healthcare)	ビスマール酸で分子間クロスリンクされたヒトヘモグロビン(本文中DCLHbと省略されているものと同じ製剤)	出血性ショック 手術中	第3相 第3相
Hemopure (Biopure)	グルタールアルデヒドでポリマー化された牛ヘモグロビン	血液希釈法 錐状赤血球症	第2相b段階 第1, 2相
PEG-Hemoglobin (Enzon)	ポリエチレングリコールに結合された牛ヘモグロビン	固形性腫瘍の放射線増感法	第2相a段階
Hemolink (Hemosol)	オルト・ラフィノーズでクロスリンクされたポリマー化ヒトヘモグロビン	手術中 血液希釈法	第2相
PolyHeme (Northfield Laboratories)	グルタールアルデヒドでポリマー化されたヒトヘモグロビン	外傷 手術中	第2相 第3相
Optro (Somatogen)*2	リコンビナント・ディアルファ・ヒトヘモグロビン	血液希釈法 赤血球造血	第2相 第1, 2相
Oxygent (Alliance Pharmaceutical)	乳化パーフルオロカーボン	血液希釈法 人工心肺バイパス術	第2相 第2相
Oxyfluor (HemaGen/PFC)	乳化パーフルオロディクロロオクタン	人工心肺バイパス術	第2相

## 訳者注

\*1 1998年9月研究開発を中止した。

\*2 Baxter Healthcareにより買収された。

も有効性を秘めているとの大きな期待が持たれる。十分な輸血製剤の供給が困難な国々や遠隔地域(宇宙船の中や他惑星上などの宇宙空間も含む)でも赤血球代替製剤が使用できるようになれば、甚大な益をもたらすことが期待できる事を最後に付け加えたい。

本調査で注目すべき点は以下の如くである。1)修飾ヘモグロビン製剤(DCLHb)は臨床試験第3相施行の承認が得られた。2)修飾ヘモグロビン製剤(DCLHb)を開発している製薬会社(Baxter Healthcare Corporation)がリコンビナントヘモグロビン(Somatogen: 感染性ウイルス混入の危険性のないより安全な修飾ヘモグロビン製剤)を開発している会社を最近買収したとの報告がある。3)代用赤血球製剤の臨床応用で特に期待されることは手術中の血液希釈時の使用により輸血量の軽減を図れる事、緊急災害および宇宙開発現場での輸血代用品としての使用が期待できることである。

今後さらに赤血球代替物の開発がさらに進むものと思われる。

## 1.4 人工血液開発事業における本研究の役割

現在米国では数箇所の研究施設で、外傷に伴う出血性ショック患者に対する救急蘇生用製剤として、修飾ヘモグロビン製剤(DCLHb)の安全性と有効性の解明が強力に進められている。

DCLHbを筆頭としていざれかの修飾ヘモグロビン製剤が赤血球輸血に代わる有用な製剤として近い将来臨床の場に登場することは確実である。今回の研究によってバーモント大学における最先端の実験研究に参加できたことにより、修飾ヘモグロビン製剤の日本での臨床研究に際し本派遣研究は先駆的役割の一端を担うことができるであろう。

## 2. 大量出血が予測される高リスクな麻酔症例の診断と対策…術中術後の同種血輸血の減少を目指して

大量出血が予測される高リスクな麻酔症例には、(1)外傷性出血

症例の緊急手術、大血管手術、肝臓切除術、周囲組織浸潤の激しい悪性腫瘍の摘出術など手術操作そのものによる術中および術後に大量出血を起こしうるもの、(2)少量あるいは中等量出血のみが予想される手術においても血友病患者などのように患者側の原因で術中および術後止血が困難な場合などがある。

麻酔科医は術前に診断名、予定術式名、術前合併症の有無を総合的に検討し、もし術前に全身的な問題がある場合はその異常の程度が手術侵襲に耐えられるものかどうか、また耐えられない場合には何らかの治療を施すことによって術前により良い状態にできないかどうかを判断する必要がある。とくに、既往歴(血液疾患の既往、外傷や歯科治療時の異常出血の既往、女性患者の場合には月経異常の有無など)や一般的な出血凝固系検査結果を検討することによって出血凝固異常を疑うことができる場合は、さらに特殊な検査を行い確定診断を下して最も適切な治療を選択する。

さて日本においても、昨今、ウィルス性肝炎やHIV感染性後天性免疫不全症候群(AIDS)など輸血製剤に伴う感染が社会的に大きな問題になっている。今回の研究において、AIDSの蔓延が深刻な米国での同種血輸血を減少するために取られている方法を調査したので報告する。

## 2.1 術中出血量を減少させる方法

- 術前の出血凝固系異常患者の発見と補充療法(詳細は後述)。
- 手術対象疾患の適切な診断…病名診断。画像診断技術を駆使した正確な重症度診断(たとえば腫瘍の大きさ、浸潤の程度、栄養血管の位置・走行の確認)。栄養血管の術前塞栓術施行、手術侵襲度と予後判定を鑑みて適切な手術術式を決定する。
- 血管処理の確実化。レーザーメスなどの使用により切斷面からの出血量を極力減少させる。フィブリン製剤の局所的使用により止血効果を上げる<sup>27, 28)</sup>。
- 四肢の手術の場合、主要手術操作中はトニケット使用が有效である。
- 低血圧麻酔の応用。

## 2.2 輸血療法の適応基準の明確化<sup>29, 30)</sup>

- 成分輸血…濃厚赤血球、新鮮凍結血漿、濃厚血小板などを臨床症状に応じて適切に投与する。
- 輸血開始時期の判定を慎重にする…患者の全身状態が許せば輸液療法などで循環動態を保ちながら、ヘモグロビン量7g/dLあるいはヘマトクリット値21%までなるべく輸血を回避する努力をする。

## 2.3 自己血輸血の準備(出血量が1,000mLを超えることが予想される場合)<sup>31)</sup>

- 術前に自己血を保存(4°Cで最長42日間保存できる。術前ヘモグロビン量が11g/dL以上あるいはヘマトクリット値が33%以上の症例で虚血性心疾患や脳血管血流障害が否定されるもの。エリスロポエチン投与による赤血球造血能の促進療法は、軽度貧血患者まで適応の幅を広げ、また短期間

内に比較的多量の自己血保存を可能にすると言われている)。

- 急性等量血液希釈法(Acute isovolemic hemodilution)…麻酔導入後、電解質輸液または膠質輸液で循環血液量を補いながら、他方の末梢静脈路から自己血を脱血し貯蔵する(目標ヘマトクリット値:27%)。それにより、術中は希釈された血液が出血として失われ、止血操作が成功した時に貯血しておいた自己血を輸血することができるため赤血球・血小板・凝固因子など血液中の重要な成分の損失が最小限度に抑えられる。また血液希釈効果のために心拍出量が軽度増大し、さらに血液濃度減少のため粘度が低下して末梢循環改善効果も期待できるので、末梢組織の代謝を十分に維持できるといわれている。
- セル・セーバーの使用…手術野からの出血を吸引して集め赤血球成分のみ回収し洗浄後に生理的食塩水に再浮遊させて患者に戻す方法。
- 術後創部出血を清潔操作下にフィルターを通して回収し、赤血球浮遊液の形で患者に戻す。この方法は簡便、安価、かつ安全であるとの報告がある。

## 2.4 術前の出血凝固系異常患者の発見と補充療法

今までに報告してきた出血凝固系疾患には以下のようなものがあり、現在推奨されている治療法もあわせて報告する。

### (1)血小板数の減少による易出血性疾患<sup>32)</sup>

- 原因…骨髄における血小板産生能低下(腫瘍細胞の骨髄浸潤、化学療法薬、放射線治療などによる骨髄造血機能抑制)
- 脾機能亢進による血小板破壊の増加(門脈圧亢進症、骨髄系あるいはリンパ球系異常細胞の脾臓浸潤などによる脾臓肥大)
- 免疫性血小板減少(血小板が抗体や抗体抗原結合物、補体などに被われているため脾臓やその他の臓器での单核球系細胞に貪食されやすい)
- 非免疫性血小板減少(血管異常、フィブリン血栓、人工弁など)
- 薬物誘発性血小板減少(化学療法薬、大量アルコール摂取、サイアザイド系利尿薬など)
- 特発性血小板減少症(各種感染症後、自己免疫疾患に随伴する)
- 検査…血小板数低下、出血時間延長、骨髄液検査、原疾患に伴う異常所見
- 治療法…原因疾患の治療、薬物療法(ステロイド剤、免疫抑制剤など)、脾臓摘出、血小板輸血、抗体中和性免疫グロブリン製剤、血小板産生促進物質(トロンボポエチン)<sup>33)</sup>
- 周術期の管理…上記内科的治療によって血小板数を増加させ手術に臨む。術後も手術創部治癒期間中は必要な血小板数を保つように血小板輸血などで補う。

### (2)血小板機能異常による止血異常

原因… フォン・ウィルブランド病(Ⅰ型, Ⅱa型, Ⅱb型, Ⅲ型, 血小板型)  
後天性フォン・ウィルブランド病(自己免疫疾患やリンパ球増殖性疾患に随伴するもの。なかでも産後女性の甲状腺炎患者で甲状腺機能低下に伴って起きる出血素因が注目されている)  
アスピリンやその他の非ステロイド系消炎鎮痛解熱剤による血小板機能低下

検査… 出血時間延長, 活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の軽度延長, フォン・ウィルブランド因子低下, リストセチンコファクター活性低下など(但し, 検査結果と術中術後異常出血の頻度および出血量とは直接相関しないことが多い)

治療法… フォン・ウィルブランド因子が豊富なクリオプレシピテートあるいは第VIII因子濃縮製剤(Humate-P®:高度精製加熱処理済み製剤でHIVが不活化されている)。女性患者で月経過量の場合は経口避妊薬治療。Ⅰ型フォン・ウィルブランド病ではデスマプレシン(1-desamino-8-D-arginine vasopressin:DDAVP)が有効なことあり。後天性フォン・ウィルブランド病では原因疾患の治療を行う。とくに甲状腺機能低下に伴う症例では甲状腺ホルモン補充療法が奏効し血小板機能が改善することあり。

#### 周術期の管理…

開腹手術などかなりの生体侵襲が予想される主要な手術の場合は、クリオプレシピテートあるいは第VIII因子濃縮製剤を一日2回ずつ投与し術後48-72時間まで続ける。

#### (3)血管壁の異常

原因… 溶血性尿毒症症候群, ヘーノッホ・シェーライン紫斑病, 熱性疾患, 高グロブリン血症, クリオグロブリン血症, 壊血病(ビタミンC欠乏症), クッシング病やステロイド治療による結合組織の脆弱化, マルファン症候群, エラース・ダンロース症候群, オスラー・ウェーバー・レンデュー病, カサバッハ・メリット症候群など

検査… 原疾患に伴う異常所見

治療… 可能であれば原因疾患の治療。壊血病でビタミンC補充療法が有効であるのを除いてはいずれも治療法は確定されていない。

#### 周術期の管理…

上記治療法の項を参照

#### (4)凝固因子の異常<sup>34)</sup>

原因… 先天性凝固因子異常症(血友病A: 第VIII因子欠乏症, 血友病B: 第IX因子欠乏症, 第XI因子欠乏症, その他)の凝固因子欠乏症: 第V, VII, X, II因子, 無フィブリノーゲン血症, フィブリノーゲン異常症), ビタミンK欠乏症, 播種性血管内血液凝固症(DIC), 肝臓機能不全に伴う凝固因子生成障害

検査… 血友病典型例ではプロトロンビン時間(PT)延長, APTT延長, 血小板数正常を示すが凝固因子活性の障害が軽度の場合はこれらの値が正常範囲内のことがあるので気を付けなければならない。原因疾患に伴う検査結果の異常。

治療法… 血友病A: 第VIII因子が豊富な血漿由来製剤(クリオプレシピテートなど)。精製第VIII因子製剤(Humate-P®: 高度精製加熱処理済み製剤でHIVが不活化されている。リコンビナント製剤), ときにデスマプレシン(1-desamino-8-D-arginine vasopressin:DDAVP)が有効なことあり。

血友病B: 新鮮凍結血漿あるいは第IX因子の豊富な血漿分画。高度精製モノクロナールあるいはリコンビナント第IX因子製剤は臨床試験段階にある。プロトロンビン・コンプレックス濃縮製剤の使用は議論が多い(本製剤を投与するとアンチトロンビンIII活性が亢進するので凝固能亢進をおこすことがあると報告されている)。

#### 第XI因子欠乏症:

出血傾向のある場合には新鮮凍結血漿の連日投与。

#### その他の凝固因子欠乏症(第V, VII, X, II因子):

新鮮凍結血漿療法。プロトロンビン・コンプレックス濃縮製剤の使用も考慮される。

#### ビタミンK欠乏症:

ビタミンK製剤の非経口投与で8-10時間後には凝固因子生成は正常化するといわれている。緊急に凝固能を正常化するには新鮮凍結血漿投与が有効。

DIC: 各種病態に応じた治療法を試みる。確立した治療法は残念ながらまだない。

#### 肝臓機能不全に伴う凝固因子生成障害:

原疾患の治療、ビタミンK製剤投与、新鮮凍結血漿投与など病態に応じた治療を施す。DICを伴っていることもあるので治療法は画一的には論じられない。

#### 周術期の管理…

上記製剤を術前に投与し各凝固因子活性を最低でも正常の20%(時に50%)に保つようにする。また術後も10-14日間、凝固能を維持するように治療し術後出血を防ぐ。

#### (5)術前に異常がないにも拘わらず術中や術後に突然異常出血を起こした場合<sup>35-38)</sup>

#### 考えられる病態…

患者に潜在的な異常がある場合(上記各種先天性あるいは後天性出血凝固異常が術前から存在していたにも拘わらず、

その異常が軽微で術前の既往歴に易出血性がみられなかつたり、検査においても正常範囲内の結果であったが、手術操作に伴う大きな侵襲に対しては不十分な止血能である場合)。逆に術中や術後の異常出血の原因検索によって上記のような基礎疾患が発見される場合がある(軽・中等度の血友病やファン・ウィルブランド病)<sup>39)</sup>。

手術中に何らかの原因で大量出血し大量輸血をした症例…

血小板や凝固因子が希釈された場合

開心術で人工心肺時間が長時間化した症例…

血小板や凝固因子に異常がおこることが多い。

緊急治療法…

新鮮凍結血漿や濃厚血小板液の輸血、抗線溶製剤(アミノカブロン酸、トラネキサム酸)

術中および術後の検査…

原因の推定が難しい場合には必要な検査をし原因疾患を診断

## 2.5 大量出血が予測される高リスクな麻酔症例における酸素運搬体の使用の可能性について

現在の状況では、緊急手術の場合や自己血輸血の準備をせずにいて思いがけなく大量出血に直面することがある。その場合は、救命を第一に考え電解質輸液や膠質輸液で循環血液量を補充しながら輸血製剤搬入を血液センターに依頼しなければならない。しかし将来、HBOCなどの酸素運搬体が臨床使用可能になるとそれらを蘇生に用いながらセル・セーバーなどの準備をする時間的余裕が生じ、また各臓器組織に必要最低限の酸素を供給できるぎりぎりまで酸素運搬体で対応できるので、可及的に同種血輸血を減らすことになると考える。

宗教的な理由により輸血あるいは血液製剤の投与を拒否するエホバの証人信者は、アメリカには現在約百万人いると推定されている。このグループの患者で特に医療上問題になるのは(1)術前に貧血状態である場合、(2)人工心肺を使用する場合、(3)外傷などで緊急手術を必要とする場合などである<sup>40,41)</sup>。現在応用可能な限り、輸血節約のための医療技術(エリスロポエチン投与や鉄剤の使用、栄養強化を図ることによって術前および術後の赤血球造血能を増進させ貧血の改善あるいは予防をする、急性等量血液希釈法、セル・セーバー法、術後創部出血血液を回収して患者に戻す、低プライミング量人工心肺の使用、アプロチニン製剤やDDAVPで凝固能を改善させたり抗線溶製剤を使用して術中後の出血を減少させる、低血圧麻酔、ICUでの酸素需要低下療法—低体温療法、人工呼吸管理下の鎮静を伴う筋弛緩療法)を駆使して、輸血あるいは血液由来製剤の投与をせずに良好な術後成績を発表している報告もある。エホバの証人といっても信仰条項は画一的ではない。場合によっては上記の輸血節約策も一切拒否することもあるし、一方では生命危機の状況では同種血輸血をも受け入れることもあるので患者ごとの対処法を講ずる必要がある。現在開発中の酸素運搬体の多くはヒトあるいは牛などの血液を原材料にしていたり、リコンビナント製剤の場合でもバクテリアなどの生命体を用いているので“生命を有するものから得られたもの”ということでエホバの証人患者の一部ではその使用をも拒否する可能性がある。そのため、人工血液の導入が必ずしも利益に

なるとは言い難い可能性もあるであろう。

## 謝辞

本研究を指導して下さった米国バーモント州バーリントン市バーモント大学医学部付属病院内科学部長ソーベル教授、麻酔科学部長シャピロ教授、外科学部長シャックフォード教授、ならびに支援下さった財団法人ヒューマンサイエンス振興財団に心から感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Ogden JE, Parry ES. The development of hemoglobin solutions as red cell substitutes. *Int Anesthesiol Clinics* 1995;33:115-29.
2. 小林紘一. 人工血液. *臨床麻酔* 1997;21:1265-70.
3. Rudolph AS. Encapsulated hemoglobin: current issues and future goals. *Art Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994;22:347-60.
4. Shackford SR, Mackersie RC, Holbrook TL, Davis JW, Hollingsworth-Fridlund P, Hoyt DB, Wolf PL. The epidemiology of traumatic death: a population-based analysis. *Arch Surg* 1993;128:571-5.
5. Wald SL, Shackford SR, Fenwick J. The effect of secondary insults on mortality and long-term disability after severe head injury in a rural region without a trauma system. *J Trauma* 1993;34:377-82.
6. Shackford SR, Mackersie RC, Davis JW, Wolf PL, Hoyt DB. Epidemiology and pathology of traumatic deaths occurring at a level I trauma center in a regionalized system: the importance of secondary brain injury. *J Trauma* 1989;29:1392-7.
7. Pietropaoli JA, Rogers FB, Shackford SR, Wald SL, Schmoker JD, Zhuang J. The deleterious effects of intraoperative hypotension on outcome in patients with severe head injuries. *J Trauma* 1992;33:403-7.
8. Chappell JE, McBride WJ, Shackford SR. Diaspirin Cross-Linked hemoglobin resuscitation improves cerebral perfusion after head injury and shock. *J Trauma* 1996;41:781-8.
9. Chappell JE, Shackford SR, McBride WJ. Effect of hemodilution with diaspirin cross-linked hemoglobin on intracranial pressure, cerebral perfusion pressure, and fluid requirements after head injury and shock. *J Neurosurg* 1997;86:131-8.
10. 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.
11. Ulatowski JA, Bucci E, Nishikawa T, Razynska A, Williams MA, Takeshima R, Traystman RJ, Koehler RC. Cerebral O<sub>2</sub> transport with hematocrit reduced by cross-linked hemoglobin transfusion. *Am J Physiol* 1996;270:H466-75.
12. Olsen SB, Tang DB, Jackson MR, Gomez ER, Ayala B, Alving BM. Enhancement of platelet deposition by cross-linked hemoglobin in a rat carotid endarterectomy model. *Circulation* 1996;93:327-32.
13. Marcus AJ, Broekman MJ. Cell-free hemoglobin as an oxygen carrier removes nitric oxide, resulting in defective

- thromboregulation. *Circulation* 1996;93:208-9.
14. Donghui SU, Robert IR, Yoshida M, Levin J. Hemoglobin increases mortality from bacterial endotoxin. *Infection and Immunity* 1997;65:1258-66.
  15. Ulatowski JA, Nishikawa T, Matheson-Urbaitis B, Bucci E, Traystman RJ, Koehler RC. Regional blood flow alterations after bovine fumaryl  $\beta\beta$ -crosslinked hemoglobin transfusion and nitric oxide synthase inhibition. *Crit Care Med* 1996;24:558-65.
  16. Yoshida M, Robert IR, Levin J. The effect of cell-free hemoglobin on intravascular clearance and cellular, plasma, and organ distribution of bacterial endotoxin in rabbits. *J Lab Clin Med* 1995; 126:151-60.
  17. Kaca W, Roth RI, Levin J. Hemoglobin, a newly recognized lipopolysaccharide (LPS)-binding protein that enhances LPS biological activity. *J Biol Chem* 1994;269:25078-84.
  18. Kilbourn RG, Joly G, Cashon B, DeAngelo J, Bonaventura J. Cell-free hemoglobin reverses the endotoxin-mediated hyporesponsivity of rat aortic rings to alpha-adrenergic agents. *Biochem Biophys Res Comm* 1994;199:155-62.
  19. Roth RI, Levin J, Chapman KW, Schmeizl M, Rickles FR. Production of modified crosslinked cell-free hemoglobin for human use: the role of quantitative determination of endotoxin contamination. *Transfusion* 1993;33:919-24.
  20. Krishnamurti C, Carter AJ, Maglasang P, Hess JR, Cutting MA, Alving BM. Cardiovascular toxicity of human cross-linked hemoglobin in a rabbit endotoxemia model. *Crit Care Med* 1997;25: 1874-80.
  21. Alayash AI. Effects of intra- and intermolecular crosslinking on the free radical reactions of bovine hemoglobins. *Free Radical Biol Med* 1995;18:295-301.
  22. Macdonald VW, Motterlini R. Vasoconstrictor effects in isolated rabbit heart perfused with bis(3, 5-dibromosalicyl)fumarate cross-linked hemoglobin (alpha alpha Hb). *Art Cells Blood Subst Immobil Biotechnol* 1994;22:565-75.
  23. Hess JR, Macdonald VW, Gomez CS, Coppes V. Increased vascular resistance with hemoglobin-based oxygen carriers. *Art Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994;22:361-72.
  24. Bowes MP, Burhop KE, Zivin JA. Diaspirin cross-linked hemoglobin improves neurological outcome following reversible but not irreversible CNS ischemia in rabbits. *Stroke* 1994;25:2253-7.
  25. Motterlini R, Macdonald VW. Cell-free hemoglobin potentiates acetylcholine-induced coronary vasoconstriction in rabbit hearts. *J Appl Physiol* 1993;75:2224-33.
  26. Hess JR, Macdonald VW, Brinkley WW. Systemic and pulmonary hypertension after resuscitation with cell-free hemoglobin. *J Appl Physiol* 1993;74:1769-78.
  27. Jackson MR, Friedman SA, Carter AJ, Bayer V, Burge JR, MacPhee MJ, Drohan WN, Alving BM. Hemostatic efficacy of a fibrin sealant-based topical agent in a femoral artery injury model: a randomized, blinded, placebo-controlled study. *J Vasc Surg* 1997; 26:274-80.
  28. Jackson MR, MacPhee MJ, Drohan WN, Alving BM. Fibrin sealant: current and potential clinical applications. *Blood Coag Fibr* 1996;7:737-46.
  29. Przybelski RJ, Daily EK, Stern KN, Mattia-Goldberg C. A graded scale for assessment of safety of blood substitutes. *Transfusion* 1997;37:749-51.
  30. Dzieczkowski JS, Anderson KC. Transfusion biology and therapy. *Harrison's Principles of Internal Medicine*-14th Ed, The MacGraw-Hill Companies, Inc, 1998;718-24.
  31. Etchason J, Petz L, Keeler E, Calhoun L, Kleinman S, Snider C, Fink A, Brook R. The cost effectiveness of preoperative autologous blood donations. *N Engl J Med* 1995; 332:719-24.
  32. Handin RI. Disorders of the platelet and vessel wall. *Harrison's Principles of Internal Medicine*-14th Ed, The MacGraw-Hill Companies, Inc, 1998;730-6.
  33. Kaushansky K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood* 1995;86:419-31.
  34. Handin RI. Disorders of coagulation and thrombosis. *Harrison's Principles of Internal Medicine*-14th Ed, The MacGraw-Hill Companies, Inc, 1998;736-43.
  35. Skerrett D, Spivack M. Intraoperative coagulopathies. In:Reed AP, ed. *Clinical Cases in Anesthesia*-2nd. Churchill:Livingstone, 1995; 229-35.
  36. Gettes M. Blood replacement. In:Reed AP, ed. *Clinical Cases in Anesthesia*-2nd. Churchill:Livingstone, 1995;237-46.
  37. Parmet JL, Horow JC. Hematologic diseases. In:Benumof JL, ed. *Anesthesia & Uncommon Diseases* 4th Ed. W.B. Saunders Company, 1998;275-315.
  38. Close HD, Kryzer TC, Nowlin JH, Alving BM. Hemostatic assessment of patients before tonsillectomy: a prospective study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;111:733-8.
  39. Aylesworth CA, Smallridge RC, Rick ME, Alving BM. Acquired von Willebrand's disease: a rare manifestation of postpartum thyroiditis. *Amer J Hematol* 1995;50:217-9.
  40. Victorino G, Wisner DH. Jehovah's witnesses: unique problems in a unique trauma population. *J Amer Coll Surg* 1997;184:458-68.
  41. Rosengart TK, Helm RE, DeBois WJ, Garcia N, Krieger KH, Isom OW. Open heart operations without transfusion using a multimodality blood conservation strategy in 50 Jehovah's witness patients: Implications for a "Bloodless" surgical technique. *J Amer Coll Surg* 1997;184:618-29.

## イヌ出血性ショックモデルにおける遺伝子組換えヒト血清アルブミンの循環動態改善効果

木戸秀明, 久保佳史, 林一孝, 井上理,  
内田武, 花田秀一, 中村憲史

### Effect of Recombinant Human Serum Albumin on Hemodynamics in a Canine Model of Hemorrhagic Shock

Hideaki Kido, Yoshiji Kubo, Kazutaka Hayashi, Satoru Inoue,  
Takeshi Uchida, Shuichi Hanada, Norifumi Nakamura

Wiggersらの方法に準じて平均血圧(MBP)を1時間にわたり40mmHgに低下させて作製したイヌ出血性ショックモデルにおける5% 遺伝子組換えヒト血清アルブミン(rHSA)の効果を循環動態を中心に検討し、乳酸加リンゲル液(LR)と比較検討した。5% rHSAを脱血量の2/3倍量および等量を輸注すると、共に速やかなMBPの上昇、心拍出量(CO)の回復がみられたが、等量輸注では左心室拡張終期圧(LVEDP)および平均中心静脈圧(CVP)が著明に上昇したことから、投与量としては2/3倍量が妥当と判断された。また、5% rHSAの2/3倍量の投与によりCOは脱血前値の約1.5倍に増加したが、LRを注入して同程度に増加させるのに必要なLRの投与量は約2倍量であった。5% rHSAは脱血により低下したMBPを生理食塩液よりも有意に回復させ、2/3倍量および2倍量のLRに比べても高値を示した。COは5% rHSAの投与による増加後の減衰は緩やかであり、投与後1~2時間後に脱血前値に回復したのに対し、晶質輸液では投与終了後に急速に減衰し、ショック時の心ポンプ失調状態に戻る傾向を示した。5% rHSAは肺動脈圧を脱血前の状態にまで引き戻し、心臓に対する負荷を一過性に増大させたが、60分後には回復させた。左心室機能の等容収縮・拡張機能には影響を及ぼさなかった。呼吸機能では薬剤投与後のPaO<sub>2</sub>の低下を抑制し、ショックにより惹起されたアシドーシスからの回復を早める傾向を示した。こうした出血性ショックにおける5% rHSAの呼吸循環動態改善作用は、本薬の安定した膠質浸透圧保持効果により導かれたものと推察された。以上のことから、5% rHSAは出血性ショックにおいて循環血液量を速やかつ持続的に是正することにより、晶質輸液を上回る血圧、心拍出量などの循環動態の改善を示すことが明らかとなった。

Effects of an infusion of 5% recombinant human serum albumin (rHSA) primarily on the hemodynamics were evaluated in comparison with the infusion of lactated Ringer's solution (LR) in a canine model of hemorrhagic shock prepared by reducing mean blood pressure (MBP) to 40 mmHg for 1 hour. When 5% rHSA was infused at 2/3 of the volume of bloodletting or the same volume as bloodletting, rapid increases in MBP and cardiac output (CO) were observed. However, in the isovolemic infusion group, left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) and mean central venous pressure (CVP) were increased markedly, and the recovery was delayed. Therefore, 2/3 the volume of blood loss was considered to be appropriate as its dose. On the other hand, about twice the volume of bloodletting was needed to induce similar recovery in CO by an infusion of LR, but CO decreased rapidly after the end of LR infusion, and the condition tended to return to the state of pump dystonia during shock. 5% rHSA induced a significantly greater recovery of MBP than physiologic saline and LR. 5% rHSA restored the pulmonary artery pressure to the level before bloodletting and transiently increased the cardiac load, but the cardiac load was normalized after 60 minutes. It had no effect on the isovolemic systolic or diastolic function of the left ventricle. Concerning the respiratory function, it prevented the decrease in PaO<sub>2</sub> after the administration and accelerated the recovery from acidosis induced by shock. These improvements in respiratory and hemodynamic parameters in hemorrhagic shock are considered to be derived from a consistent effect of 5% rHSA to maintain the colloid osmotic pressure (COP), and a successive restoration of the circulating blood volume rapidly and protractedly better than crystalloids. —Key Words: Recombinant human serum albumin, Hemorrhagic shock, Dog, Hemodynamics, Lactated Ringer's solution.

吉富製薬研究本部大阪研究所, 〒573-1153 大阪府枚方市招提大谷2-25-1, Pharmaceutical Research Division, Osaka Laboratories, Yoshitomi Pharmaceutical Industries, Ltd, 25-1, Shodai-Ohtani 2-chome, Hirakata, Osaka 573-1153, Japan.  
論文受付99年2月12日, 再受付99年3月5日, 受理99年3月11日。

## 1. 緒言

出血性ショックは外傷、手術および胸腹部大動脈瘤破裂など大量出血に伴う循環血液量の減少が引き金となって生じる。出血性ショックに対する治療は出来るだけ速やかにショックから離脱させるべく輸液療法が一般的に施行されているが<sup>1)</sup>、輸液療法には従来より晶質輸液の有効性を主張する意見<sup>2)</sup>と膠質輸液の有効性を主張する意見<sup>3)</sup>がある。前者では循環血液量の減少がみられると組織間質液がこれを補填する結果、細胞外液が減少することから、晶質輸液で細胞外液量を満たせば循環血液量も維持されるという理論を展開しているのに対し、後者では細胞外液と血管内液(血漿)とは区別して考え、膠質輸液で循環血液量を補う方が効率的であると述べており、今まで両理論が対立してきた。

膠質輸液のうち、血液より分画・精製したアルブミン(nHSA)はグロブリンなどの蛋白に比べ循環血液量保持効果が高く<sup>4)</sup>、血液中膠質浸透圧の約80%を担っている<sup>5)</sup>。また、nHSAの血中半減期は14~23日<sup>6)</sup>と長いことから、その効果は長時間持続する。しかしながら、nHSAには原料供給源の問題に加えて、未知のウイルスやプリオン蛋白などの混入を将来的に完全に否定することはできないという懸念がある。

遺伝子組換えヒト血清アルブミン(rHSA)はピキア酵母により高産生、高度精製された製剤である<sup>7,8)</sup>。本製剤はnHSAと同じ物理化学的性質を有し<sup>9)</sup>、今後はアルブミン製剤の主力となることが期待される。

今回、Wiggersら<sup>10)</sup>の方法に準じて作製したイヌ出血性ショックモデルにおけるrHSAの至適投与量を循環動態を中心に検討し、晶質輸液の乳酸加リンゲル液(LR)と改善効果について比較検討したので報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1. 動物

体重10~14kgの雄性ビーグル犬(東洋ビーグルおよびCSK)を用いた。動物は1群につき4ないし5頭を用いた。

### 2.2. 薬剤

rHSAは25%製剤(Lot No. RA003; ミドリ十字)を0.65%食塩液にて5倍に希釈して用いた。晶質輸液としては乳酸加リンゲル液(LR: Lot No. 118HD; ミドリ十字)を、また対照として生理食塩液(Lot No. K2G90; 大塚製薬工場)をそれぞれ用いた。

### 2.3. 出血性ショックモデルの作製

動物をペントバルビタール-Na 25mg/kg静脈内投与により麻酔した後、背位に固定し、気管にカニューレを挿入して人工呼吸器(NSH-34RH; Harvard Apparatus)により調節呼吸(20mL/kg, 15回/分)を行った。左側大腿動脈にポリエチレンカテーテルを挿入し、20mL/分の速度で脱血を行い、平均血圧(MBP)が40mmHgに到達するまで脱血を続け、以後脱血した血液を戻したり追加脱血することにより1時間にわたりMBPを40mmHgに保った。

### 2.4. 被験薬の投与

#### 実験1. 5%rHSAの至適投与量の設定

今回のイヌ出血性ショックモデルにおける5%rHSAの至適投与

量を求めるため、MBPを40mmHgに1時間維持させた後、5%rHSAを予備試験において血圧の回復がほぼ定常状態に達する脱血量の2/3量ならびに脱血量と等量を右側前肢静脈より持続投与した。投与時間は脱血量の2/3倍量を投与する場合は20分間、等量を投与する場合は30分間とした。投与終了後、2時間にわたる経過を観察した。

#### 実験2. 晶質輸液との比較

上記の実験1により5%rHSAの至適投与量が求まった段階で、5%rHSA、LRおよび対照薬の生理食塩液を投与量に揃えて接続静脈内投与し、その効果を比較検討した。なお、LRについては、5%rHSAの投与量と同じ量(2/3倍量)に加えて、5%rHSAの投与直後におけるCOの増加と同程度になるような輸液量を検討した結果、脱血量の約2倍量を投与することが必要であったことから、2倍量の効果についても比較検討することにした。2倍量を投与する場合は1時間とした。投与終了後、2時間にわたる経過を観察した。

## 2.5. 循環動態および血液パラメータの測定

MBPは右側大腿動脈に挿入したポリエチレンカテーテルより圧トランスデューサー(Statham P-50; Gould)を介し、血圧測定用アンプ(AP-641G; 日本光電)にて測定した。心拍数(HR)は血波波をtriggerとして瞬時心拍計ユニット(AT-601G; 日本光電)で計数した。平均肺動脈圧(mPAP)および肺動脈楔入圧(PCWP)は右側頸靜脈より肺動脈内に挿入した5F Swan-Ganzカテーテル(Viggo Spectramed)より、また平均中心静脈圧(CVP)は右側大腿静脈に挿入したポリエチレンカテーテルより圧トランスデューサーを介してそれぞれ測定した。心拍出量(CO)はSwan-Ganzカテーテルより熱希釈式心拍出量測定装置(MTC-6110; 日本光電)を介して測定した。これより、体血管抵抗(SVR)、肺血管抵抗(PVR)および一回拍出量(SV)を算出した。さらに右側総頸動脈を介して左心室内にカテーテルトランステューサー(TCP2RN136F30; 東海理化電機)を挿入し、左心室拡張終期圧(LVEDP)を測定すると共に、左心室内圧の変化から等容収縮機能のV<sub>max</sub>および等容拡張機能の時定数(T)をそれぞれ求めた。以上の項目はポリグラフ(RM-6000; 日本光電)に入力し、熱ペン式レコーダーおよびX-Yプロッター(オムニライト: 8M37; 日本電気三栄)上に記録した。

また、循環動態測定時に大腿動脈よりヘパリン採血を行い、血液pH、血液ガス(PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>)(以上IL 1306; Instrumentation Laboratory), ヘマトクリット値(Hct; KH-120A, クボタ製作所)および膠質浸透圧(COP: OSMOMAT 050; Vogel)を測定した。

測定はモデル作製(脱血)前、モデル作製直後および1時間後(被験薬投与前)、被験薬投与中ならびに投与終了後15, 30, 60および120分に行った。なお、被験薬投与中の測定ポイントは、脱血量の2/3倍量を輸注する場合は投与開始後5分(1/6倍量), 10分(1/3倍量)および20分(2/3倍量)、等量を輸注する場合は2/3倍量の測定ポイントに加え30分(等量)、2倍量を輸注する場合は投与開始後20分(2/3倍量), 30分(等量), 45分(1.5倍量)ないし60分(2倍量)とした。

## 2.6. 統計処理

得られた結果は平均土標準誤差で示した。5%rHSAの至適投与

量の検討では、脱血前値と各測定値との差をとり、一元配置分散分析(ANOVA)にかけて有意差が認められたものについて、脱血前を対照として対応のあるDunnett検定を行った。また、至適投与量における各被験薬の効果については、モデル作製1時間後を基準としてその後の変化について差を算出し、ANOVAの後、生理食塩液を対照としたDunnett検定を行った。いずれも危険率が両側5%未満の場合を有意差ありとした。なお、LRを脱血量の2倍量投与した群については、投与容量ならびに測定ポイントが前述の試験と異なることから検定の対象には加えなかった。

### 3. 結果

それぞれの試験群における平均脱血量は2/3倍量投与試験群で48mL/kg、5% rHSAの等量投与試験群で50mL/kg、LRの2倍量投与試験群で51mL/kgと差を認めず、モデルの重症度は全試験群でほぼ同じと考えられた。

#### 実験1. rHSAの投与量の設定

脱血によりMBPを40mmHgまで低下させ、この状態を1時間持続させると、循環動態においてCOならびに心臓に対する負荷

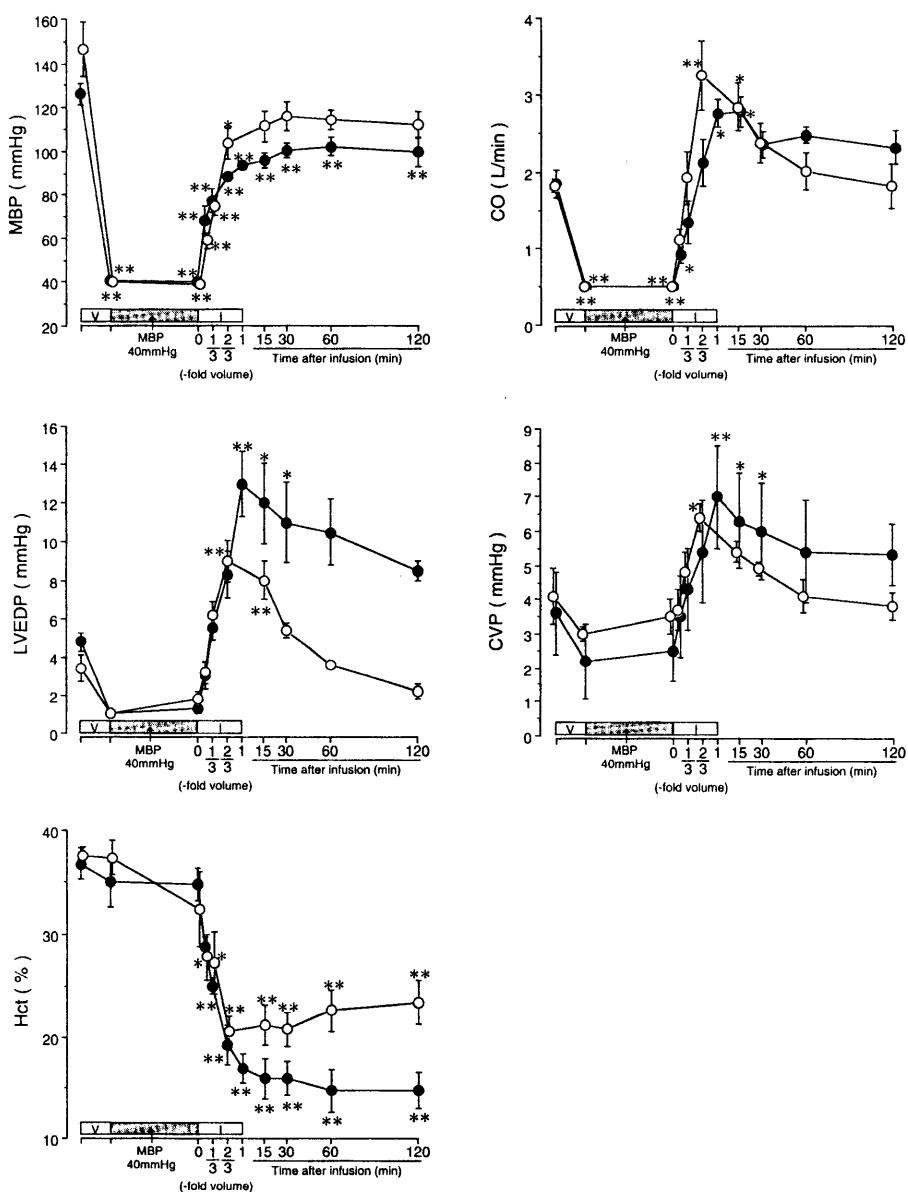


Fig. 1 Established foundation on the administration volume of 5% rHSA in a canine model of hemorrhagic shock. 5% rHSA were infused at 2/3-fold volume of bloodletting (○, n=4) or the same volume as bloodletting (●, n=5). V : venesection, I : infusion of 5% rHSA. All values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. \*:p<0.05, \*\*:p<0.01 : significantly different from the values before bloodletting (ANOVA following Dunnett's multiple-comparison test).

(LVEDP, CVP)が低下した。5% rHSAを脱血量の血漿量に近い2/3倍量を急速注入すると、MBPは脱血前の約80%にまで回復した。COは投与終了直後には脱血前よりも高値を示したが、投与終了後1ないし2時間で経過すると前値にまで復した。同様のことがLVEDPおよびCVPにおいても観察された。これに対し、等量輸注群では投与終了直後に脱血前以上に増加したCOが投与後2時間で経過しても高値を示し、LVEDPおよびCVPも投与により顕著に上昇し、かつ回復が2/3倍量投与群に比し遅延する傾向を示した。Hctは2/3倍量の輸注では約21%に低下したのに対し、等量輸

注では約15%にまで低下し、血液希釈が著しかった(Fig. 1)。以上のことから、イヌ出血性ショックモデルに5% rHSAを単剤で投与する場合、脱血量の等量を輸注するのは過負荷であり、2/3倍量が妥当と考えられた。

## 実験2. 晶質輸液との比較

### 3.1. 体循環系に及ぼす影響(Fig. 2)

脱血により低下したMBPは対照の生理食塩液の2/3倍量投与により前値の約62%にまで回復し、投与後2時間で経過しても大き

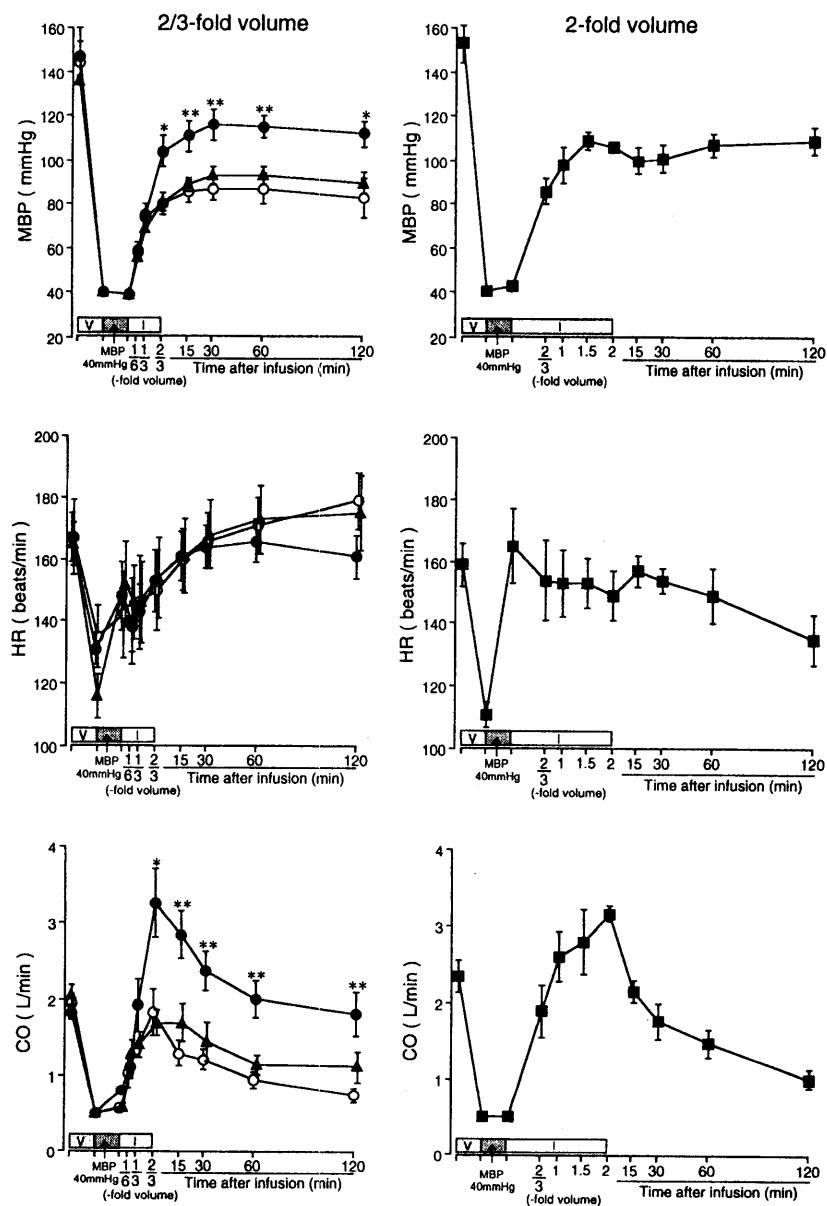


Fig. 2 Effects of 5% rHSA on systemic hemodynamics in a canine model of hemorrhagic shock. 5% rHSA (●, n=5) and saline (○, n=5) were infused at 2/3-fold volume of bloodletting. Lactated Ringer's solution was infused at 2/3-fold volume of bloodletting (▲, n=5) or the 2-fold volume of bloodletting (■, n=4). All values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. \*:p<0.05, \*\*:p<0.01 : significantly different from saline group (ANOVA following Dunnett's multiple-comparison test in 2/3-fold volume infused groups).

な変化はみられなかった。LRの2/3倍量投与群も投与により前値の約68%にまで回復し、対照群とほぼ同様の推移を示した。一方、LRの2倍量投与群でも脱血前の72%にまで回復したに過ぎなかった。これに対し、5% rHSA投与群では血圧は速やかに上昇して脱血前の約80%にまで回復し、投与後も安定した推移を示した。

HRは脱血直後には顕著に減少したが、1時間後には元の状態に戻る傾向を示した。薬剤注入中はいずれの群も大きな変化はなかったが、注入後は生理食塩液群およびLRの2/3倍量投与群は漸増する傾向を示した。これに対し、5% rHSA群では増加の程度は小さく、LRの2倍量投与群ではむしろ減少傾向を示した。

脱血により減少したCOは生理食塩液およびLRの2/3倍量投与により脱血前値にまで回復したものの、その後徐々に減少し、投与

後1時間を経過すると脱血前値の約半分にまで減衰した。生理食塩液群ではその後も減少する傾向を示した。一方、5% rHSAおよびLR2倍量投与群ではCOは速やかに増加し、投与終了時には脱血前値の約1.5倍にまで達した。5% rHSA群では投与後はゆっくりと減少し、2時間経過すると脱血前値にまで回復したのに対し、LRの2倍量投与群では投与終了後は急激に減少して15分後には脱血前値のレベルに達し、2時間経過した段階では2/3倍量投与群と同程度に低値を示した。

### 3.2. 肺循環系に及ぼす影響(Fig. 3)

mPAPは脱血により著明に低下し、生理食塩液の投与によっても脱血前値までは完全には回復しなかった。LRの2/3倍量投与群

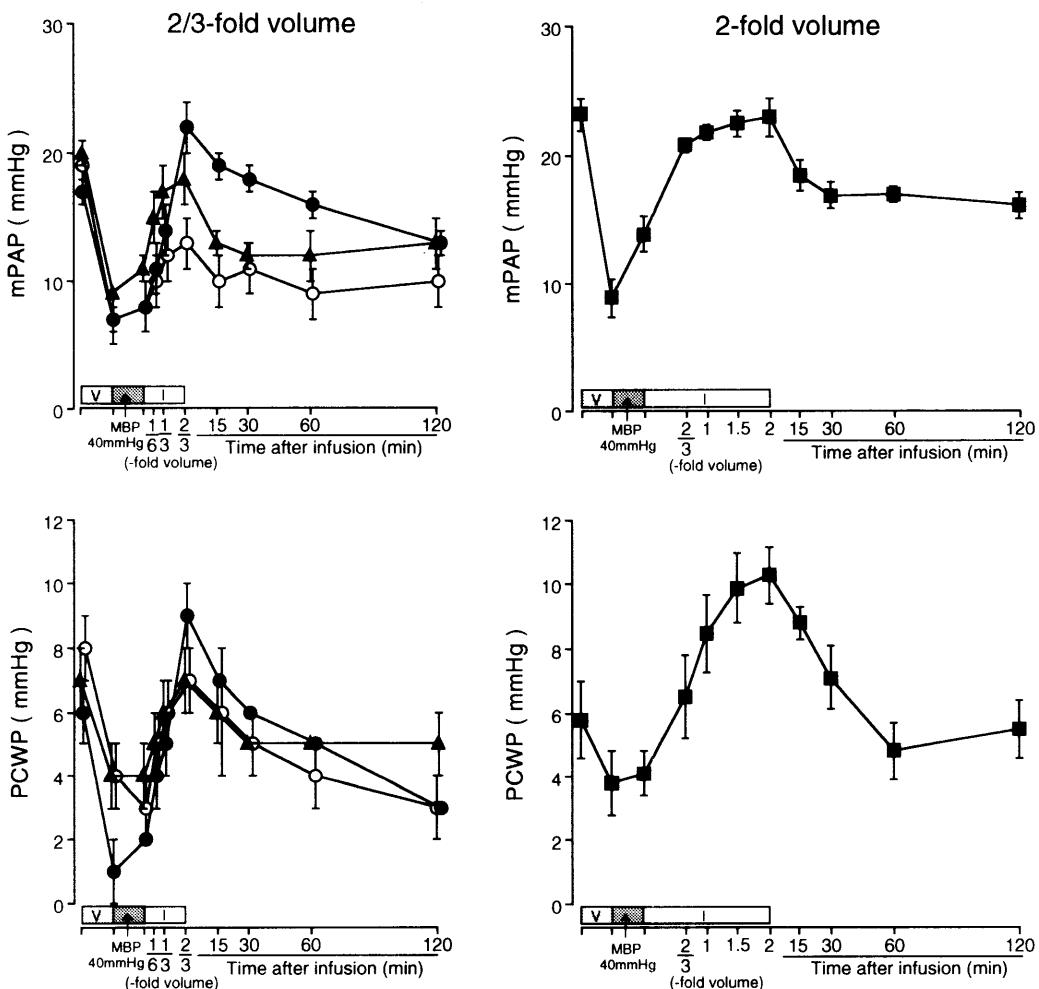


Fig. 3 Effects of 5% rHSA on pulmonary hemodynamics in a canine model of hemorrhagic shock. 5% rHSA (●, n=5) and saline (○, n=5) were infused at 2/3-fold volume of bloodletting. Lactated Ringer's solution was infused at 2/3-fold volume of bloodletting (▲, n=5) or the 2-fold volume of bloodletting (■, n=4). All values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. There were no significant difference among the groups (ANOVA following Dunnett's multiple-comparison test in 2/3-fold volume infused groups).

では投与終了直後には前値付近にまで回復するものの、投与後15分を経過するとmPAPは急速に低下した。一方、LRの2倍量投与群では2/3倍量を注入した段階でほぼ定常状態に達し、それ以上投与しても顕著な上昇は認められなかった。投与終了後は比較的速度やかに低下し、前値を下回った。これに対し、5% rHSAの投与では注入開始後よりmPAPは速やかに上昇し、投与終了時には脱血前値を上回った。しかしながら、その上昇は有意ではなく、終了後は緩やかに低下し、1時間後には脱血前値に復した。

PCWPもmPAPの推移とはほぼ同様であったが、LRの2倍量投与群では注入中には経的に上昇し、注入終了後1時間で前値まで回復した。

### 3.3. 心臓に対する負荷に及ぼす影響

#### 3.3.1. 左心室(Fig. 4)

左心室の前負荷の指標であるLVEDPは脱血により低下し、生理食塩液により脱血前値以上にまで回復したものの、その後急速に低下した。LRの2/3倍量投与群では投与による上昇は生理食塩液群よりもやや大きい傾向を示したが有意ではなかった。LRの2倍量投与群でも投与後の回復に多少の時間がかかった以外は大きな違いはなかった。5% rHSA投与群ではLVEDPは速やかに上昇して脱血前値にまで回復し、投与終了時から投与後30分まで対照の生理食塩液群に比し有意差を認めたが、1時間後には脱血前値に復した。

一方、後負荷の指標であるSVRは脱血による影響はみられず、

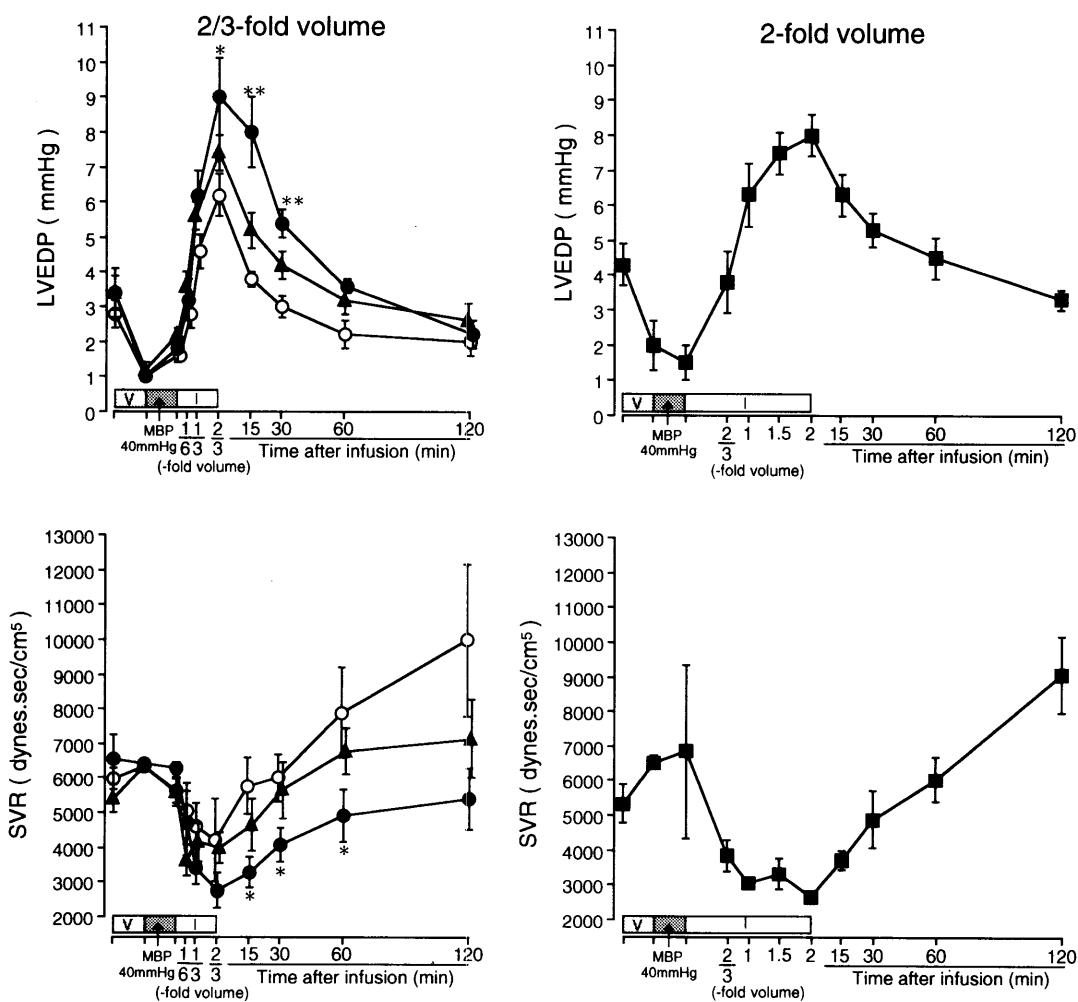


Fig. 4 Effects of 5% rHSA on left ventricular loadings in a canine model of hemorrhagic shock.

5% rHSA (●, n=5) and saline (○, n=5) were infused at 2/3-fold volume of bloodletting.

Lactated Ringer's solution was infused at 2/3-fold volume of bloodletting (▲, n=5) or the 2-fold volume of bloodletting (■, n=4). All values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M.

\*:p<0.05, \*\*:p<0.01 : significantly different from saline group (ANOVA following Dunnett's multiple-comparison test in 2/3-fold volume infused groups).

各薬剤の投与により著明に低下した。しかしながら、投与後は経時的に回復し、生理食塩液投与群では投与終了1時間以降は前値を上回った。LRでは2/3倍量および2倍量ともにこのようなSVRの上昇を十分には抑制出来なかったのに対し、5% rHSA投与群では有意に抑制し、投与後2時間を経過して脱血前値にまで回復した。

### 3.3.2. 右心室(Fig. 5)

右心室の前負荷に相当するCVPは脱血により低下し、各薬剤の投与により脱血前値ないしはそれ以上にまで上昇した。このうちLRの2倍量投与群でその上昇の程度が特に高かったが、投与終了後は急速に低下し、脱血前値のレベルにまで回復した。5% rHSA

投与群においても投与終了直後から30分後まで高値を示したが、有意ではなかった。

一方、後負荷の指標であるPVRは脱血により上昇する傾向を示し、各薬剤の投与により脱血前値ないしはそれ以下にまで低下した。生理食塩液投与群では2時間後には再上昇したが、LRの2/3倍量投与群および5% rHSA投与群では大きな変化はみられず、有意差が認められた。LRの2倍量投与群では、投与後にやや上昇する傾向がみられた。

### 3.4. 左心室機能に及ぼす影響(Fig. 6)

等容収縮機能の指標である $V_{max}$ は脱血により著明に低下したが、1時間経過後にはほぼ回復した。各薬剤の投与により脱血前

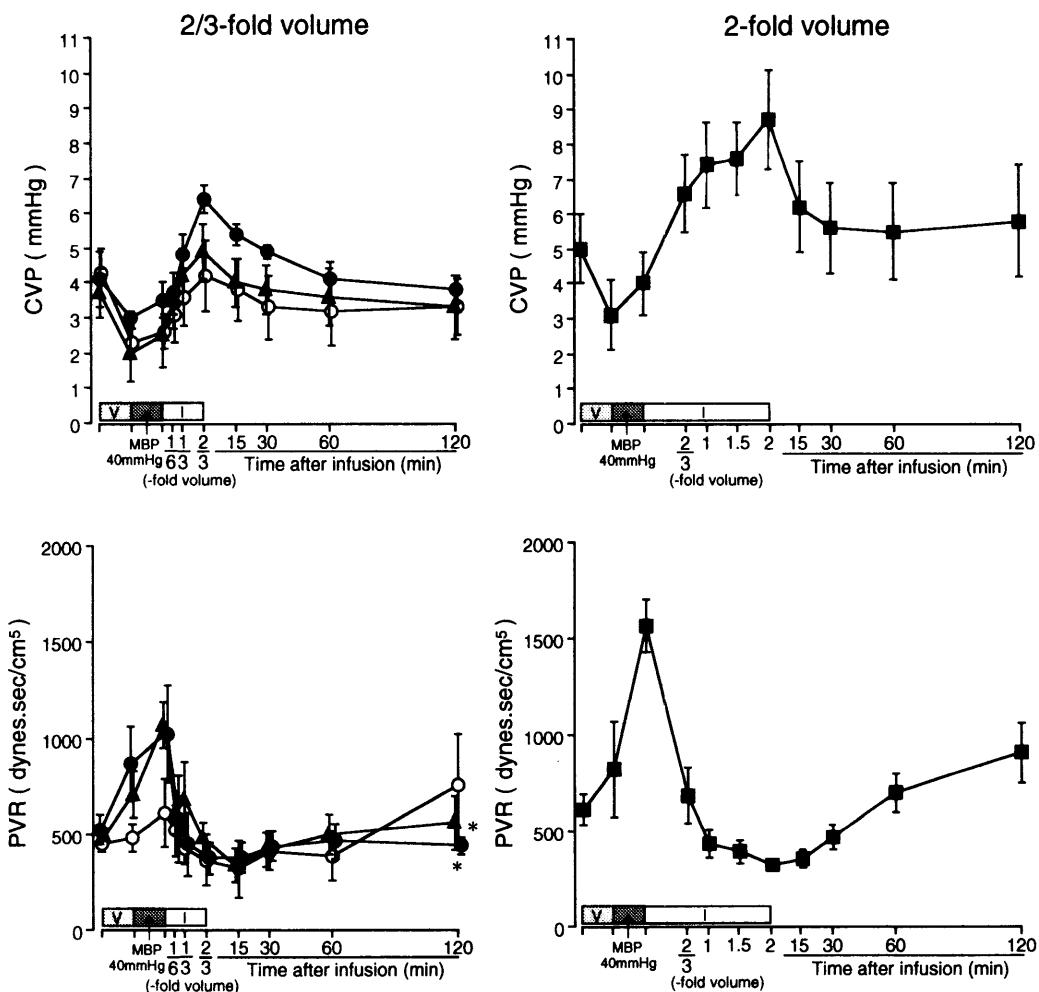


Fig. 5 Effects of 5% rHSA on right ventricular loadings in a canine model of hemorrhagic shock. 5% rHSA (●, n=5) and saline (○, n=5) were infused at 2/3-fold volume of bloodletting. Lactated Ringer's solution was infused at 2/3-fold volume of bloodletting (▲, n=5) or the 2-fold volume of bloodletting (■, n=4). All values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M.  
\*: p<0.05 : significantly different from saline group (ANOVA following Dunnett's multiple-comparison test in 2/3-fold volume infused groups).

値ないしはそれ以上にまで亢進し、投与後に徐々に回復する傾向を示したが、群間で大きな差を認めなかつた。

脱血により著明に低下した駆出機能の指標SVは、生理食塩液およびLRの2/3倍量投与により脱血前値にまで回復したが、投与後2時間の間に脱血時のSVに近い値にまで減少した。特に生理食塩液投与群における減衰が著しかつた。LRの2倍量投与群および5% rHSA投与群では脱血前値を上回る回復を示し、その後減少したが、5% rHSA投与群では2時間を経過して徐々に脱血前値にまで回復するのに対し、LRの2倍量投与群では投与終了後15分には

脱血前値に達し、以後は脱血前値を下回つた。

等容拡張機能の指標であるTは脱血により著明に延長したが、1時間後にはほとんど脱血前値にまで回復した。各製剤の投与により軽度の短縮がみられ、投与後は不变ないしは軽度に延長した。群間でほとんど差はみられなかつた。

### 3.5. 呼吸機能の変化(Fig. 7)

$\text{PaO}_2$ は脱血直後から1時間後かけて上昇した。晶質輸液の各群の投与中における変化は殆どなく、投与後は軽度の低下傾向が

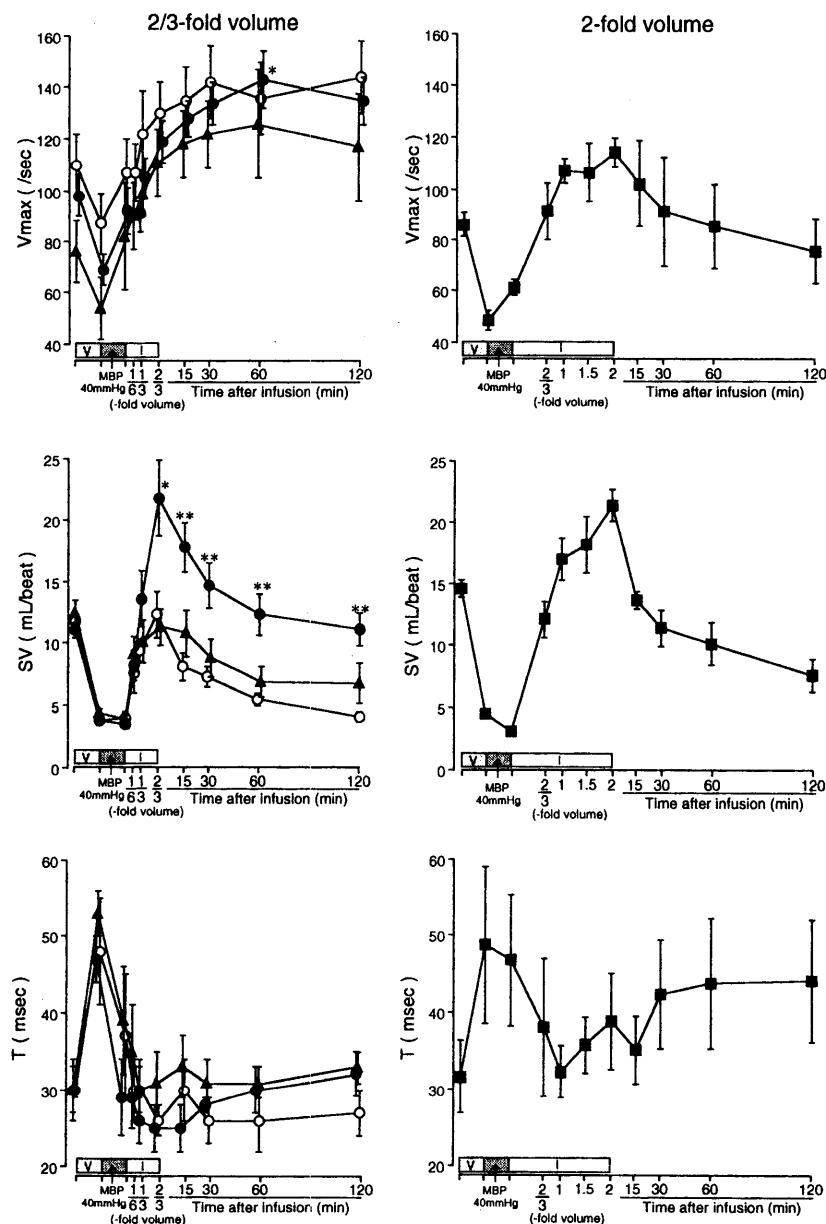


Fig. 6 Effects of 5% rHSA on left ventricular function in a canine model of hemorrhagic shock.  
5% rHSA (●, n=5) and saline (○, n=5) were infused at 2/3-fold volume of bloodletting.  
Lactated Ringer's solution was infused at 2/3-fold volume of bloodletting (▲, n=5) or the  
2-fold volume of bloodletting (■, n=4). All values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M.  
\*:p<0.05, \*\*:p<0.01 : significantly different from saline group (ANOVA following Dunnett's  
multiple-comparison test in 2/3-fold volume infused groups).

みられた。これに対し、5% rHSA投与群では極軽度に上昇する傾向を示し、対照の生理食塩液投与群に比し投与後2時間で有意差を認めた。

$\text{PaCO}_2$ は脱血直後には低下したものの、1時間経過後には軽度回復した。各薬剤の投与により脱血前値ないしはそれ以上にまで回復し、投与終了後は軽微に低下する傾向を示した。群間で差を認めなかった。

pHは脱血直後には変化がみられなかったものの、1時間経過後には著明に低下した。各薬剤の投与による変化は軽微であった

が、投与後は回復する傾向を示した。群間で大きな差異は認められなかつたが、5% rHSA群でやや高く、投与終了後30分および2時間で対照の生理食塩液投与群に比し有意差を認めた。

### 3.6. COPおよびHctの変化(Fig. 8)

COPは脱血により低下傾向を示し、5% rHSAを除いて薬剤投与によりさらに顕著に低下した。これら晶質輸液は投与後は緩やかに上昇する傾向を示したが、2時間を経過しても脱血前値にまでは復さなかつた。これに対し、5% rHSA投与群では投与終了時に

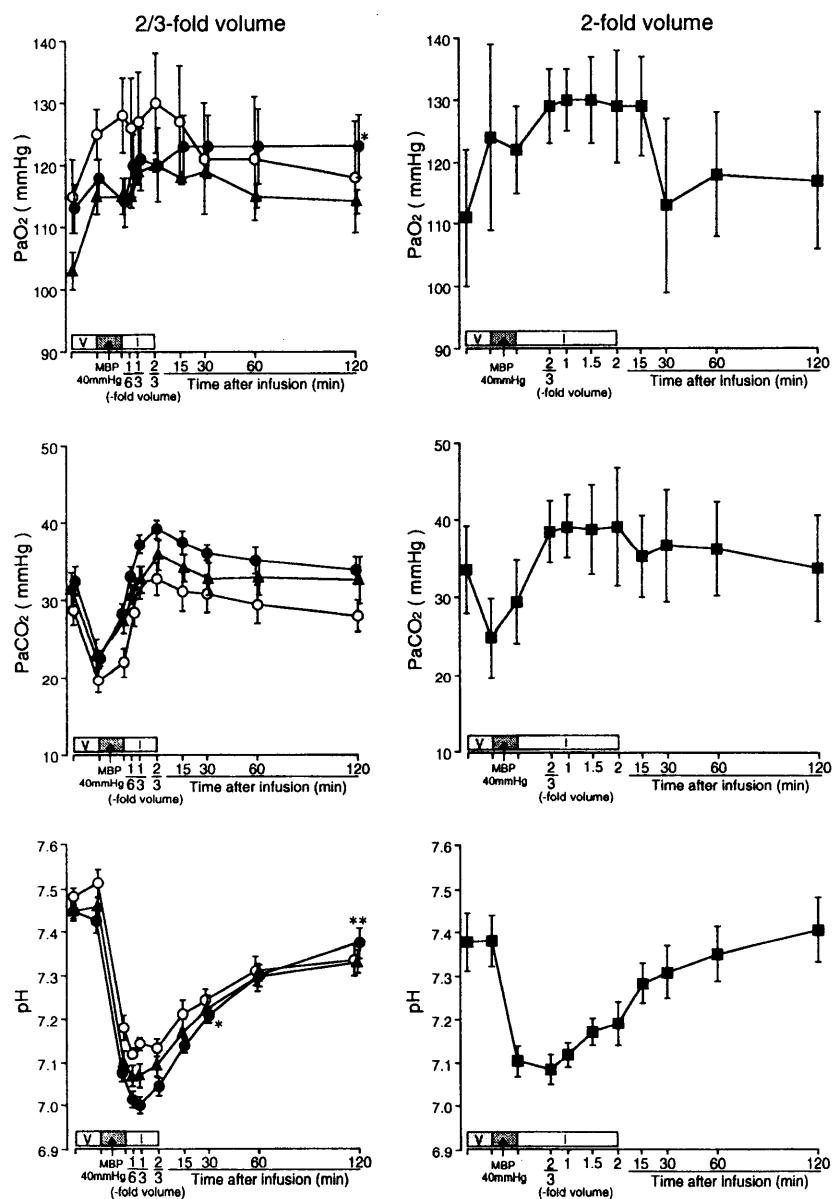


Fig. 7 Effects of 5% rHSA on respiratory function in a canine model of hemorrhagic shock. 5% rHSA (●, n=5) and saline (○, n=5) were infused at 2/3-fold volume of bloodletting. Lactated Ringer's solution was infused at 2/3-fold volume of bloodletting (▲, n=5) or the 2-fold volume of bloodletting (■, n=4). All values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M.  
\*: p<0.05, \*\*: p<0.01 : significantly different from saline group (ANOVA following Dunnett's multiple-comparison test in 2/3-fold volume infused groups).

はCOPは脱血前値以上にまで回復し、投与後も安定した推移を示した。

Hctは脱血によっては大きな影響を受けなかったものの、各薬物の投与により著明に低下し、以後徐々に回復するものの、脱血前値には復さなかった。中でも、5% rHSA投与群ではHctの低下が大きく、投与後2時間にわたり殆ど変化を認めなかった。

#### 4. 考察

正常人では500~1000mlの血液が失われても、血漿蛋白は肝臓における新生ならびに筋肉組織はじめ実質臓器間質からの遊離により24時間以内に補填されると言われている<sup>11)</sup>。この場合は乳酸加リンゲル液(LR)などの晶質輸液だけで維持管理ができる<sup>12)</sup>。しかしながら、失血量が多くなるにつれ生体内からの血漿蛋白の補

填は破綻を来たす。今回作製したイヌ出血性ショックはWeilら<sup>13)</sup>の重症度分類で判別すると重症に相当すると考えられる。この状態でLRを脱血量の2/3倍量ないしは2倍量を投与すると投与中は心拍出量などの循環動態が回復したもの、投与終了後には速やかに効果が減弱し、脱血によるショック時の状態近くまで逆戻りしてしまった。晶質輸液は細胞外液層に均等に分布するので、血管内に滞留するのは約1/4であり、循環血液量を維持する能力は低い。LRだけで蘇生を行う場合には出血量の4~5倍が必要であると言われており<sup>14)</sup>、今回の成績はそれを間接的に示唆する結果であった。しかしながら、晶質輸液はある一定以上注入しても血漿量の増加は望めないとも言われている<sup>15)</sup>。また、ショックの急性期に晶質輸液を大量に投与してCOPを低下させると、細胞間質浮腫を惹起し、特に肺ではCOPとPCWPとの差が8mmHg以下になる

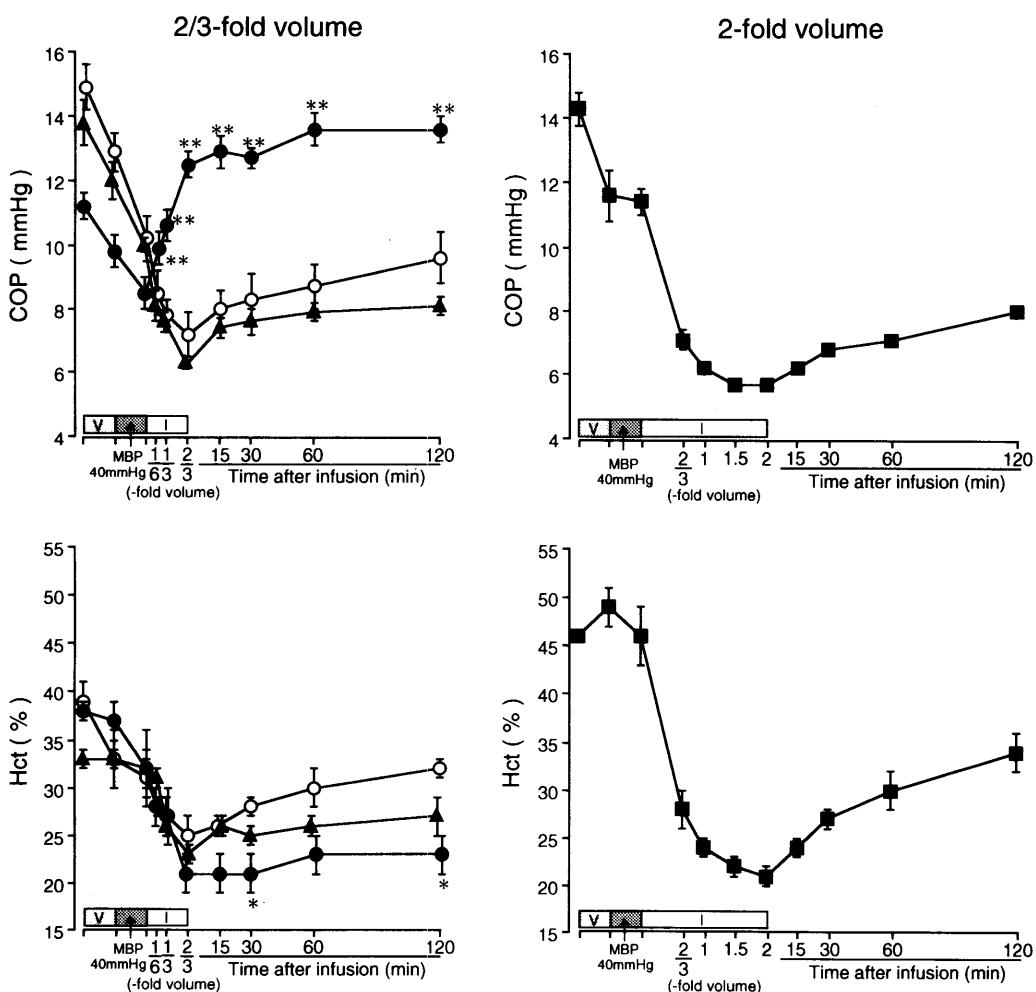


Fig. 8 Effects of 5% rHSA on colloid osmotic pressure (COP) and hematocrit (Hct) in a canine model of hemorrhagic shock. 5% rHSA (●, n=5) and saline (○, n=5) were infused at 2/3-fold volume of bloodletting. Lactated Ringer's solution was infused at 2/3-fold volume of bloodletting (▲, n=5) or the 2-fold volume of bloodletting (■, n=4). All values are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. \*:p<0.05, \*\*:p<0.01 : significantly different from saline group (ANOVA following Dunnett's multiple-comparison test in 2/3-fold volume infused groups).

と肺水腫が起こり易くなり<sup>16)</sup>、蘇生後の肺機能障害を合併する可能性がある<sup>3)</sup>ことから、重症な出血性ショックに際しては晶質輸液のみで蘇生させることは困難と考えられる。

5% rHSAは今回の重篤な出血性ショックモデルにおいて、脱血量の2/3倍量で血圧を晶質輸液に比べ良好に回復させ、投与後も作用は持続した。一方、脱血量と等量を輸注した群では同様の改善はみられるものの、LVEDPやCVPなどの心臓に対する負荷を脱血前以上に上昇させたことから、循環血液量の過大な増加により心臓に負荷がかかっていると推察される。脱血量よりも少ない輸液量で十分であるという結果は奇異に思われるが、肝臓や脾臓は正常時には循環に全く関与しない赤血球、すなわち測定し得ない赤血球を保有し、出血性ショックと共にこれを放出することから<sup>17)</sup>、過度な希釈がなければ血球成分は徐々に循環血液中に補填されてくるものと推察される。以上のことから、5% rHSAの至適投与量は脱血量の血漿部分に近似した2/3量で妥当と判断される。

5% rHSAは循環血液量を是正し、COPを維持させることにより、血圧、心拍出量、血管抵抗および心臓に対する負荷といった血行動態を晶質輸液に比べ良好に改善したが、左心室機能においては晶質輸液とほとんど差を認めなかった。Jacintoら<sup>18)</sup>やForresterら<sup>19)</sup>も脱血後、輸血(輸液)中および末期近くに至るまで、前負荷や後負荷が変化しても左心室における等容収縮期の機能は変化しなかったと述べている。しかしながら、ポンプ機能としてのCOやSVは次第に低下して不可逆性に陥り<sup>18,19)</sup>、心筋のコンプライアンスの低下から死亡に至ることもある<sup>20)</sup>。その原因の一つとして冠動脈血流量の減少<sup>21)</sup>が挙げられることから、5% rHSAはSVを脱血前値のレベルに長時間維持させ、こうした出血性ショック後の心不全死を予防する可能性がある。

5% rHSAはまた呼吸機能においても、輸液投与後のPaO<sub>2</sub>の低下を抑制すると共に、pHの回復を早める傾向を示した。膠質輸液を投与することにより酸素運搬体の赤血球はHctの推移から察すると晶質輸液を投与するよりも低下してしまう。しかしながら、Neesら<sup>22)</sup>が酸素運搬反応はLRよりも血漿蛋白で良好に機能し、長時間持続したと報告しているようにHctは必ずしも酸素運搬能の指標になるわけではないと考えられる。むしろ循環血液量を早期には是正したことがショックにより惹起されるアシドーシス<sup>23)</sup>からの回復を早めたと推察される。

## 参考文献

1. Better OS, Stein JH. Early management of shock and prophylaxis of acute renal failure in traumatic rhabdomyolysis. *N Engl J Med* 1990;322:825-9.
2. Shires T, Coln D, Carrico J, Lightfoot S. Fluid therapy in hemorrhagic shock. *Arch Surg* 1964;88:688-93.
3. Skillman JJ. The role of albumin and oncotic active fluids in shock. *Crit Care Med* 1976;4:55-61.
4. Shippy CR, Appel PL, Shoemaker WC. Reliability of clinical monitoring to assess blood volume in critically ill patients. *Crit Care Med* 1984;12:107-12.
5. Tullis JL. Albumin: 1. Background and use. *JAMA* 1977;237:355-60.
6. Ravid IS. Plasma expanders. *JAMA* 1952;150:10-3.
7. Yokoyama K, Ohmura T. Production of human serum albumin by biotechnology. *Jpn J Apheresis* 1995;14:19-20.
8. 大村孝男. バイオテクノロジーによるヒト血清アルブミンの生産. *バイオサイエンスとインダストリー* 1995;53:23-5.
9. Sumi A, Ohtani W, Kobayashi K, Ohmura T, Yokoyama K, Nishida M, Suyama T. Purification and physicochemical properties of recombinant human serum albumin. *Biotechnol Blood Proteins* 1993;227:293-8.
10. Wiggers CJ. The present status of the shock problem. *Physiol Rev* 1942;22:74-123.
11. Lister J, McNeill IF, Marshall VC, Plzak LF Jr, Dagher FJ, Moore FD. Transcapillary refilling after hemorrhage in normal man. *Ann Surg* 1963;158:698-712.
12. 渡邊千之, 石山賢. 出血性ショック. *臨床外科* 1992;11:14-5.
13. Weil MH. Diagnosis and treatment of shock. Baltimore:Williams and Wilkins Co, 1967.
14. Singh G, Chaudry KI, Chaudry IH. Crystalloid is as effective as blood in the resuscitation of hemorrhagic shock. *Ann Surg* 1992; 215:377-82.
15. Takaori M. Fluid therapy for the treatment of shock. *Biomed Ther* 1979;3:600-5.
16. Luz da PL, Shubin H, Weil MH, Jacobson E, Stein L. Pulmonary edema related to changes in colloid osmotic and pulmonary artery wedge pressure in patients after acute myocardial infarction. *Circulation* 1975;51:350-7.
17. Nakajo N, Ogawa Y, Takaori M. Changes in organ blood volume and blood flow following the treatments for hemorrhagic shock. *Masui* 1978;27:1047-53.
18. Jacinto SM, Jandhyala BS. Comparative evaluation of acute effects of oxygen free radicals on myocardial contractility in anesthetized dogs with those occurring in the early stages of splanchnic artery occlusion and hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med* 1994;17: 171-9.
19. Forrester JS, Amsterdam EA, Parmley WW, Sonnenblick EH, Urschel CW. Dissociation of myocardial contractility and pump performance in hemorrhagic shock: Correlation of in vivo measurements with assay of shock plasma in papillary muscle. *Cardiology* 1972;57:333-47.
20. Alyono D, Ring WS, Chao RY, Alyono MM, Crumbley AJ, Larson EV, Anderson RW. Characteristics of ventricular function in severe hemorrhagic shock. *Surgery* 1983;94:250-8.
21. Siegel HW, Dowling SE. Reduction of left ventricular contractility during acute hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 1970;218:772-9.
22. Nees JE, Hauser CJ, Shippy C, State D, Shoemaker WC. Comparison of cardiorespiratory effects of crystalline hemoglobin, whole blood, albumin, and Ringer's lactate in the resuscitation of hemorrhagic shock in dogs. *Surgery* 1978;83:639-47.
23. Gruber JE, Bar Or D, Marx JA, Moore EE, Winkler JV. Protracted metabolic acidosis: the impact of acute ethanol in hemorrhagic shock. *J Emerg Med* 1992;10:545-52.

# ヘモグロビン小胞体存在下におけるヒト末梢血単核細胞の各種サイトカイン産生の挙動

江口圭介<sup>1)</sup>, 三橋将人<sup>2)</sup>, 小林紘一<sup>3)</sup>, 酒井宏水<sup>4)</sup>, 武岡真司<sup>4)</sup>, 土田英俊<sup>4)</sup>

## Stimulation of Cytokine Production from Human Peripheral Mononuclear Leukocytes by Hemoglobin Vesicles

Keisuke Eguchi<sup>1)</sup>, Masato Mitsuhashi<sup>2)</sup>, Koichi Kobayashi<sup>3)</sup>, Hiromi Sakai<sup>4)</sup>, Shinji Takeoka<sup>4)</sup>, Eishun Tsuchida<sup>4)</sup>

Poly(oxyethylene)で表面修飾したリン脂質二分子膜小胞体に精製ヘモグロビンを内包したヘモグロビン小胞体(HbV)が、ヒト末梢血単核細胞を刺激してInterleukin(IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10およびTumor Necrosis Factor(TNF)- $\alpha$ を放出させることをin vitroで確認した。ヒト末梢血単核細胞をHbV存在下で4時間から16時間培養した上清からEnzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)法によりIL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10およびTNF- $\alpha$ を検出したが、IL-2, IL-4およびInterferon(IFN)- $\gamma$ は検出されなかった。またヒト臍帯静脈内皮細胞のHbV存在下での培養上清からはIL-6とIL-8を検出した。これらの結果は、HbVを実際のヒトに投与した際におこりうるサイトカインの産生が生体に与える影響について究明していく上で価値があるものと考えられた。

Poly(oxyethylene)-modified vesicles encapsulating purified hemoglobin(HbV) stimulated human peripheral blood mononuclear cells(HPMC) to release interleukin(IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$  in vitro. Incubation of HPMC with HbV stimulated HPMC to release IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$  into the supernate at 4 to 16 hours, though release of IL-2, IL-4 and interferon(IFN)- $\gamma$  into the supernate was not detected. HbV also stimulated human umbilical vein endothelial cells to release IL-6 and IL-8. These results indicate the importance of understanding biological response provoked by HbV infusion into human bodies. —Key words:Hemoglobin vesicles, Cytokine, Human peripheral blood mononuclear cell, HUVEC, ELISA, RT-PCR.

### 1. 緒言

ストローマフリーへモグロビン(SF-Hb)に化学的修飾を加えた酸素運搬体(非細胞型Hb)は現在欧米ですでに数多くの臨床試験が行われている段階にある<sup>1,2)</sup>が、生体投与により心血管反応を惹起することが明らかになり<sup>3)</sup>、その安全性は未解決のままである。高濃度の精製ヘモグロビンをリン脂質二分子膜小胞体中に内包させた細胞型のヘモグロビン小胞体(HbV)は、非細胞型Hbと比較して血管収縮活性が弱いなどの特性を持ち<sup>4)</sup>、かつ充分な酸素運搬能を有する<sup>5,6)</sup>ことが報告されているが、臨床試験の段階には至っていない。本研究は、HbVを投与した際におこる生体反応のひとつであるサイトカイン産生の挙動をヒト末梢血単核細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた培養系で調べ、人工酸素運搬体の生

体投与時の反応を理解するための一助とする目的とする。

### 2. 実験方法

#### 2.1. ヒト末梢血単核細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞

健康な3人の成人ドナーより採取した末梢血液からVACUTAINER CPT Cell Preparation Tube(Becton Dickinson, USA)を用いてメーカーのプロトコールに従い単核細胞分画を遠心分離した。96穴プレートの各ウェルに $2 \times 10^5$ 個の単核細胞を含む100 $\mu$ Lの10%FBS添加RPMI-1640(GIBCO, USA)培地を分注した。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC, Clonetics, USA)は4代培養したものを利用した。トリプシン処理したHUVECを10%FBS添加専用培地中に $2 \times 10^5$ /100 $\mu$ Lのsingle cell suspensionなるよう調製して

1)川崎市立川崎病院呼吸器外科, General Thoracic Surgery, Kawasaki City Hospital, 2)Department of Pathology, College of Medicine, University of California, Irvine, CA., 3)慶應義塾大学医学部外科, Department of Surgery, School of Medicine, Keio University, 4)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, ARISE, Waseda University.

Correspondence to;慶應義塾大学医学部外科 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35, Department of Surgery, School of Medicine, Keio University, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan.

論文受付99年3月12日, 再受付99年3月26日, 受理99年3月28日。

96穴プレートの各ウェルに分注した。37°C, 5%CO<sub>2</sub>下で1時間培養後、ヒト末梢血単核細胞にはリポソーム、ストローマフリーへモグロビン、ヘモグロビン小胞体を、ヒト臍帯静脈内皮細胞にはストローマフリーへモグロビン、ヘモグロビン小胞体を各実験でそれぞれ添加して培養実験をおこなった。

## 2.2. リポソーム

HbVの外殻に相当するリポソームの調製には混合脂質プレソームPPG-1(日本精化社)を用い、pH7.4に制御された生理食塩水に脂質濃度5.6g/dLとなるように調製した(脂質組成1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine:cholesterol:1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol=5:5:1)。この脂質濃度はHbV分散液におけるHb濃度10g/dLに相当し、粒径は229±55nmであった。また、1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidyl-ethanolamine-N-[Poly(oxyethylene)<sub>5000</sub>](POE-DSPE, Avanti, USA)を外表面膜に対して0, 0.035, 0.093, 0.176mol%の4種類の濃度となるようリポソーム分散液に添加し、37°Cにて30分攪拌におこないリポソーム外表面に導入したものを用意した。

## 2.3. ストローマフリーへモグロビン

HbVの原料となるストローマフリーへモグロビン(SF-Hb)をpH7.4に調製された生理食塩水に10g/dLの濃度となるように添加したものを使用した。

## 2.4. ヘモグロビン小胞体

HbVは、既報に従って調製した<sup>7)</sup>。SF-Hb溶液中に上記リポソームと同等の混合脂質を分散させて形成し、外表面に対して0.22mol%のPOE-DSPEを導入したものを用意し、磷酸緩衝生理食塩水により10g/dLに調節した。なお本実験で使用したリポソーム、ストローマフリーへモグロビン、ヘモグロビン小胞体のエンドトキシンレベルはいずれも無視できる程度であった。

## 2.5. 各種サイトカインの測定

2.1.で用意したヒト末梢血単核細胞を含む各ウェルに磷酸緩衝生理食塩水、POE-DSPEの修飾度の異なる4種類のリポソーム、SF-HbおよびHbV溶液100μLを添加して、0, 4, 8, 16時間37°C, 5%CO<sub>2</sub>下で培養した後、15000rpmで20分遠心をおこない、上清を回収し、測定まで-20°Cで保存した。

Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)法により、凍結保存した培養上清中のInterleukin(IL)-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, Tumor Necrosis Factor(TNF)-αおよびInterferon(IFN)-γの測定をおこなった。ELISA法はBIOTRAK ELISA system(Amersham, England)をプロトコールに従って使用し、450nmの波長でspectrophotometer(Molecular Devices, USA)を用いて測定した。

測定可能範囲はIL-1α; 10.24-400pg/mL, IL-1β; 10.24-400pg/mL, IL-2; 38.4-1500pg/mL, IL-4; 10.24-400pg/mL, IL-5; 15.7-1000pg/mL, IL-6; 10.24-400pg/mL, IL-8; 25.6-1000pg/mL, IL-10; 15.36-600pg/mL, TNF-α; 25.6-1000pg/mL, IFN-γ; 25.6-1000pg/mLであり、測定範囲を超過する高濃度の検体は、適当な希釈をして測定した。統計的な検討はWelch's t-testを用いて行い、P<0.01をもって有意差ありと判断した。

## 2.6. 各種サイトカインの遺伝子発現

2.1.で調製した細胞を2.5.と同様に各種サンプルとともに4時間培養し、2×10<sup>6</sup>個の細胞からTRIzol Reagent(GibcoBRL, USA)を用いてtotal RNAの抽出をおこなった。抽出したtotal RNAよりReverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)法を行いヒト各種サイトカインのmRNAの発現の有無を確認した。RT-PCR法はAmplimer Set(CLONTECH, USA)とRT-PCR用試薬(Perkin Elmer, USA)を使用してプロトコールに従って行い、2%アガロースゲルで電気泳動した。

## 3. 結果および考察

### 3.1. POE-DSPE修飾濃度の異なる各種リポソーム存在下における反応

ヒト末梢血単核細胞をリポソームの存在下で培養した結果、IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10およびTNF-αの産生が認められ、IL-2, IL-4, IL-5およびIFN-γの産生はいずれも認められなかった(測定範囲以下)。なおリポソームを添加せずにヒト末梢血単核細胞を同様に16時間まで培養したがいずれのサイトカインも測定範囲以下であった。POE-DSPE修飾濃度の異なる4種類のリポソームではIL-1αでPOE-DSPE修飾濃度0.176mol%のリポソームが未修飾のリポソームと比較して16時間値で有意に高値を示した(P=0.004)以外はほぼ同様の傾向を示し、POE-DSPEの修飾量の差が各種サイトカイン産生に与える影響はほとんど認められなかった(Fig.1)。

### 3.2. SF-HbとHbV存在下における反応

ヒト末梢血単核細胞をSF-HbとHbV存在下にそれぞれ培養した場合、リポソーム単体の場合と同種類のサイトカインの産生が認められた。HbVはSF-Hbを含有し、POE-DSPE修飾濃度が0.22mol%と高濃度となっているが、サイトカイン産生にはリポソーム単体の場合と比較してもほぼ影響はなかった。Hbがヒト末梢血単核細胞からIL-8とTNF-αの放出を刺激することについてはすでに報告があるが<sup>8)</sup>、SF-HbとHbVの存在下でのサイトカインの産生の違いを比較するとヒト末梢血単核細胞において、IL-1αの16時間値がSF-Hbで有意に高値を示し、TNF-αの4時間値と8時間値がHbVで有意に高値を示した(Fig.2)。またHUVECを用いた系ではSF-HbとHbV存在下でIL-6とIL-8の産生を認めた。HUVECのIL-8の産生はSF-HbとHbVの場合を比較してもほとんど差は認められなかったが、IL-6の産生はSF-Hbの4時間値から16時間値まで有意に高値示した(Fig.3)。

### 3.3. 各種サイトカインの遺伝子発現

ヒト末梢血単核細胞からの産生が認められたIL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10およびTNF-αについてHbV存在下に4時間培養後の各サイトカインのmRNAの発現をRT-PCR法で確認した。HbVを加えずに4時間培養した場合、IL-10以外はmRNAの発現は認められなかったが、HbV存在下で4時間培養した場合は、それぞれのサイトカインのmRNA発現を確認した(Fig.4上段)。TNF-αのバンドのシグナルが微弱であったが実際にサンプル中のコピー数が少なかったためかあるいはPCRの技術上の問題かは明確に判断できなかった。HUVECでは、HbVを加えずに4時間培養した場合、IL-6

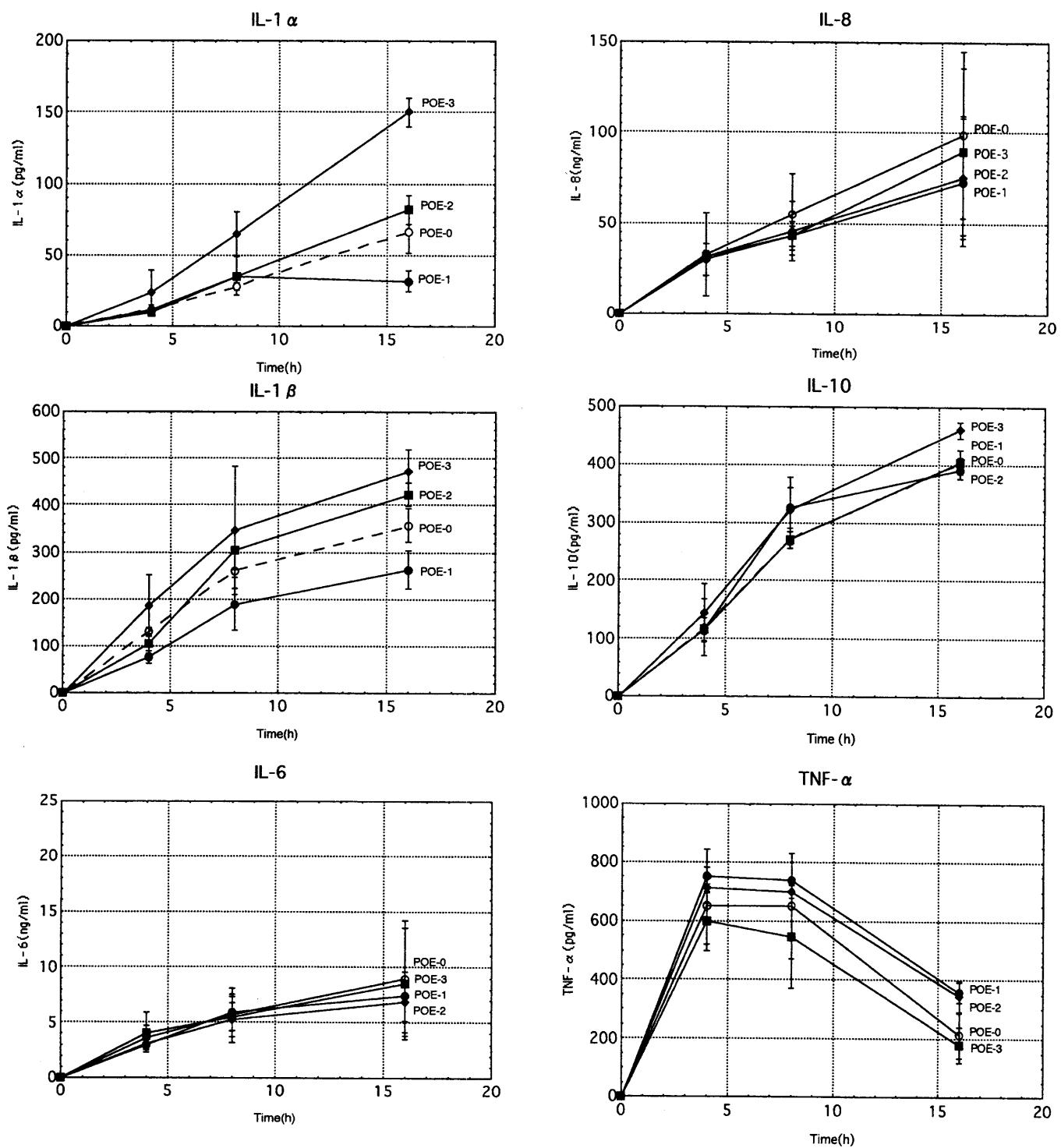


Fig. 1 Effect of co-incubation with surface modified liposomes with 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine -N-[poly(oxyethylene)<sub>5000</sub>](POE-DSPE) on cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells.  
POE-DSPE compositions of 4 types of liposomes( POE-0, POE-1, POE-2, POE-3 and POE-4) are 0, 0.035,0.093 and 0.176mol%, respectively.

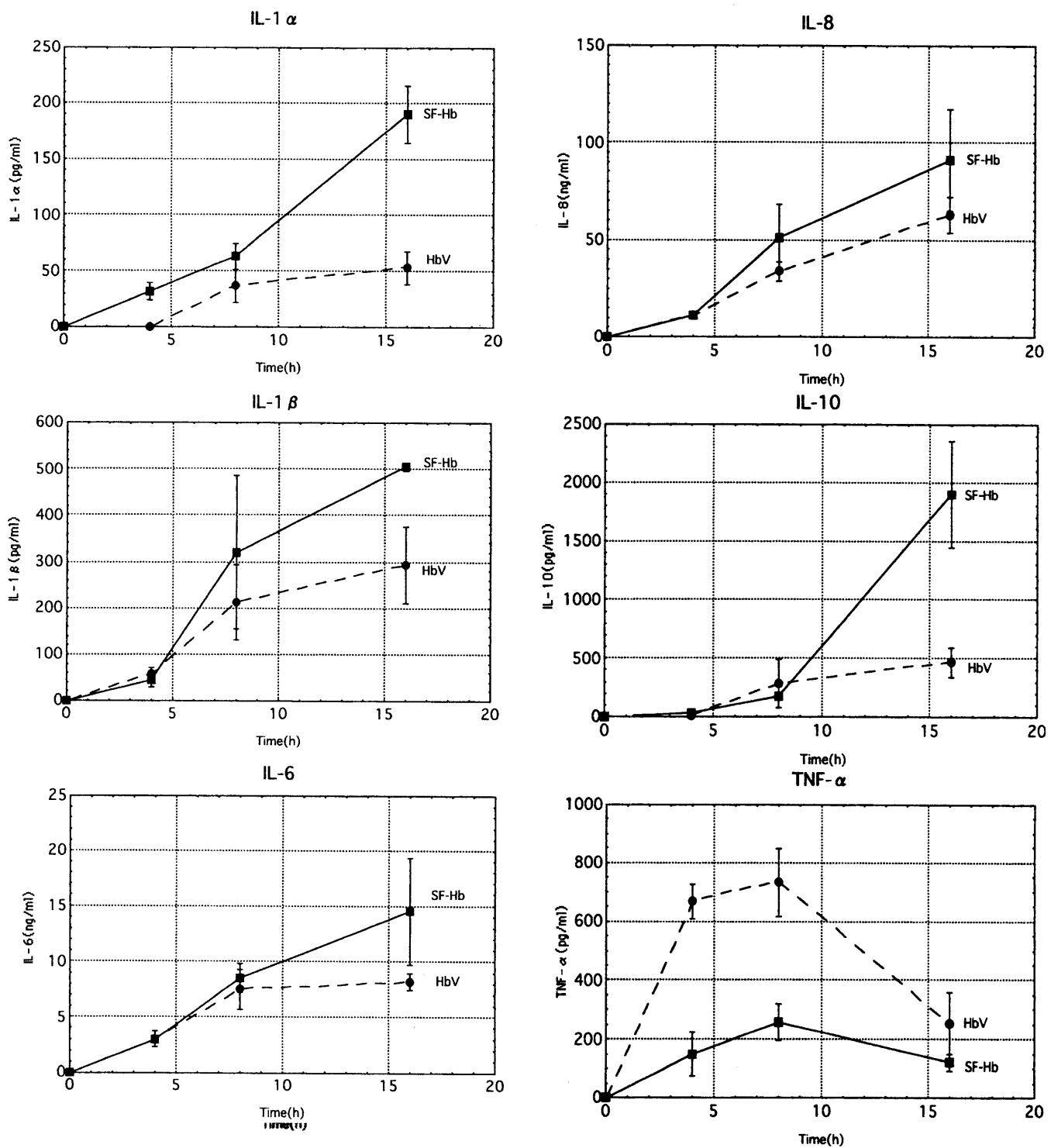


Fig.2 Effect of co-incubation with stroma free hemoglobin (SF-Hb) and Hemoglobin Vesicles (HbV) on cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells.

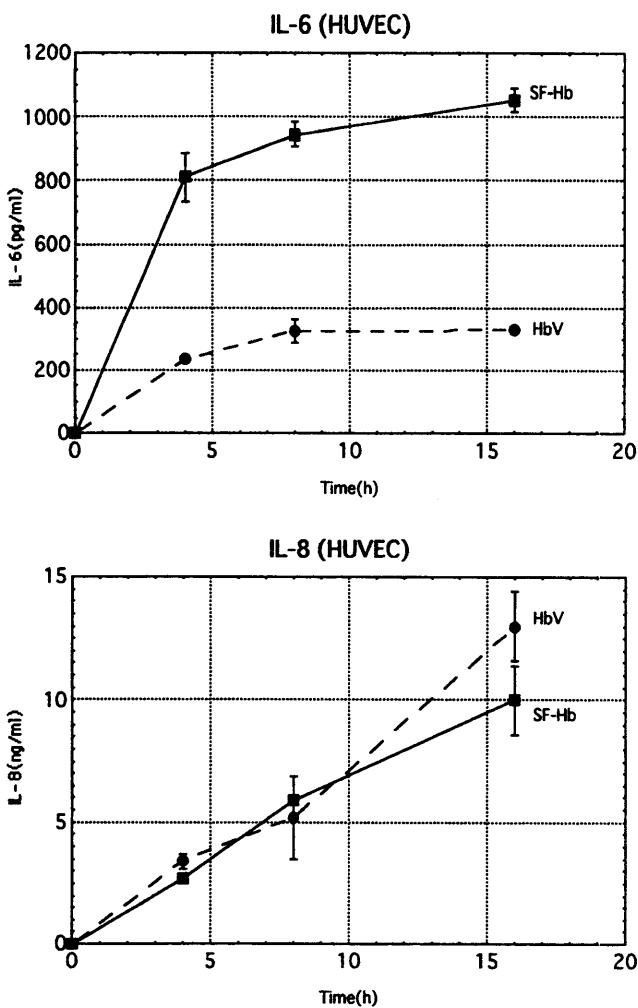


Fig. 3 Effect of co-incubation with stroma free hemoglobin (SF-Hb) and Hemoglobin Vesicles (HbV) on cytokine production of human umbilical vein endothelial cells.

とIL-8のmRNAの発現を認めた。HbV存在下で4時間培養した場合はIL-1 $\alpha$ , IL-6およびIL-8のmRNAの発現を認めた。HbVの存在の有無に関わらず、IL-1 $\beta$ , IL-10およびTNF- $\alpha$ のmRNAの発現は認められなかった(Fig.4 下段)。

Xiao-Lanらはリポソーム内包型ヘモグロビン存在下の培養によりげつ歯類のmacrophageとendotheliomaの細胞株のIL-6 mRNAの発現が増大することをsemiquantitative RT-PCRで確認している<sup>9</sup>。本研究のRT-PCRによる確認ではmRNAの定量的な検討について正確に言及できないが、タンパク質レベルでの量的な増大があることをあわせて考察すると、ヒト末梢血単核細胞の場合、HbVによってIL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8およびTNF- $\alpha$ の遺伝子転写レベル(以後)の調節に変化が起きていることが示唆された。タンパク質レベルでは検出範囲以下であったが、HbVの存在下でHUVECのIL-1 $\alpha$ のmRNAの発現が認められた。また、ヒト末梢血単核細胞のIL-10とHUVECのIL-6とIL-8はHbVの非存在下でもmRNAの発現を認めたことから、タンパク質レベルの産生あるいは分泌調

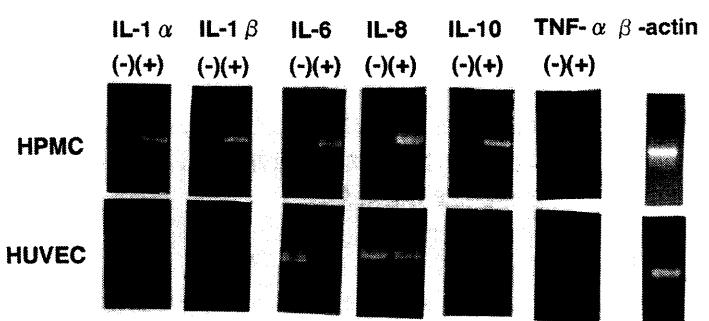


Fig. 4 Effect of co-incubation with Hemoglobin Vesicles (HbV) on cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells and human umbilical vein endothelial cells. human peripheral blood mononuclear cells; HPMC, human umbilical vein endothelial cells; HUVEC  
(-); incubation for 4 hours (without HbV), (+); co-incubation with HbV for 4 hours

節の存在が考えられるが、それらについてはさらなる検討が必要である。

#### 4.まとめ

人工酸素運搬体の臨床応用の一つとしては、緊急時の輸血が挙げられるが、そのような利用を可能とする為には外傷や外科手術などの際の急性の大量出血による出血性ショック状態(時に敗血症ショック状態を伴う)における投与を想定した開発が望まれる。生体に過大な侵襲が加わるとときさまざまなサイトカイン、特にIL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ などが高濃度に流血中に出現してこれらが相乘的に組織障害をひき起こすことについての報告がある<sup>10-12</sup>。Whitefordらはリポソーム内包型ヘモグロビンで10%血液を置換したラットにエンドトキシンを投与することで敗血症による死亡率、頻脈、白血球および血小板の減少、TNF- $\alpha$ 産生の変化などを認めたことを報告している<sup>13</sup>。

本研究でSF-HbとHbVは共にヒト末梢血単核細胞からIL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ の産生とHUVECからのIL-6, IL-8の産生の刺激となり得ることが明らかとなった。ヒト全血を用いた生体内ではさまざまな調節が働くため、これらのサイトカインの産生やSF-HbとHbVの反応性の違いが実際の生体に投与した際にどの程度影響を示すかはまだ明らかでない。池淵ら<sup>14</sup>はリポソーム内包型ヘモグロビン(NRC)を全血中に5%添加すると生食を5%添加した時に比較してIL-6およびTNF- $\alpha$ の産生が抑制されることを報告している。本研究では全血から単核細胞のみを分離してさらに高濃度のHbVを接触させていたため、全血に低濃度添加した時よりも多量のサイトカイン産生の反応が検出されることが考えられ、もちろん人体に治療に必要な量を投与した際の血中のサイトカイン濃度を反映するものではないが、たとえ全身か

らすれば少量でもサイトカイン産生細胞が集積する臓器または組織では病態に影響をおよぼす可能性は充分に考えられるため、HbVが末梢血単核細胞や血管内皮細胞などにたいしてどのようなサイトカイン産生の刺激になりうるかどうかという情報は今後重要な意味をもつと考える。今後はHbVの刺激によるサイトカイン産生がショック状態にある生体に投与した時にどのような影響を与えるかを明らかにし、臨床での使用条件に適した人工赤血球を開発することが必要であると考える。

### 謝辞

本研究の一部は、平成10年度厚生科学研究費補助金高度先端医療研究事業(人工血液開発分野)によって行われた。また、江口圭介は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団高度先端医療研究推進事業(人工血液開発分野)の外国への日本人研究者派遣事業より補助を受けた。記して謝意を表する。

### 参考文献

1. 関口定美. 人工酸素運搬体としての人工血液の開発と臨床応用. 日本臨床 1997; 55:2439-46.
2. 岩下雄二. 酸素運搬体臨床研究の現況. 人工臓器 1997;26:920-6.
3. Sheffield CL, DeLoach JR. Nonencapsulated hemoglobin-based red blood cell substitutes: An updated view. Biotechnol Appl Biochem 1991; 14:249-55
4. Nakai K, Ohta T, Sakuma I, Akama K, Kobayashi Y, Tokuyama S, Kitabatake A, Nakazato Y, Takahashi TA, Sekiguchi S. Inhibition of endothelium-dependent relaxation by hemoglobin in rabbit aortic strips: comparison between acellular hemoglobin derivatives and cellular hemoglobins. J Cardiovasc Pharmacol 1996;28:115-23.
5. Tsuchida E (ed). Blood Substitutes: Present and Future Perspectives. Elsevier, Amsterdam, 1998
6. Izumi Y, Sakai H, Hamada K, Takeoka S, Yamahata T, Kato R, Nishide H, Tsuchida E, Kobayashi K. Physiologic responses to exchange transfusion with hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier in anesthetized rats: changes in mean arterial pressure and renal cortical tissue oxygen tension. Crit Care Med 1996; 24 (11):1869-73.
7. Sakai H, Takeoka S, Park SI, Kose T, Nishide H, Izumi Y, Yoshizu A, Kobayashi K, Tsuchida E. Surface modification of Hemoglobin Vesicles with poly(ethyleneglycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. Bioconjugate Chem. 1997;8:23-30.
8. McFaull SJ, Bowman PD, Villa VM, Gutierrez-IMJ, Johnson M, Smith D. Hemoglobin stimulates mononuclear leukocytes to release interleukin-8 and tumor necrosis factor  $\alpha$ . Blood 1994;84(9):3175-81.
9. Xiao-Lan Z, Wilda CMG, Nancy DP, Florence.MR. Kinetics of cytokine gene expression in macrophage and endothelial cell lines following liposome encapsulated haemoglobin(LEH) treatment in vitro. Cytokine 1996; 8:541-47.
10. 相川直樹. 外科侵襲と臓器不全7. サイトカイン・ストームと多臓器不全. 日本外科学会雑誌 1996;97(9):771-7.
11. 藤島清太郎, 相川直樹. SIRSと多臓器不全の病原因子としてのサイトカイン. Biomedical Perspectives 1997;6(2):133-9.
12. Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connelly RJ, Dinarello CA. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. J Clin Invest 1988; 81: 1162-72.
13. Whiteford M, Spring A, Rudolph A, Neville L, Abdullah F, Feuerstein G, Rabinovici R. Effect of liposome-encapsulated hemoglobin on the development of endotoxin-induced shock in the rat. Shock 1998;9(6):428-33.
14. 池淵研二, 丹羽光一, 藤原満博, 阿部英樹, 若本志乃舞, 伊藤貴俊, 山口美樹, 関口定美. リポソーム内包型ヘモグロビンによる全血由来炎症性サイトカイン産生の修飾. 人工血液 1998;6 (1)13-6.

## 海外文献紹介

# Electron Microscopic Demonstrations of Filamentous Molecular Sieve Plugs in Capillary Fenestrae

Jorgen Rostgaard and Klaus Qvortrup. Microvascular Research 1997;53:1-13.

埼玉医科大学総合医療センター麻酔科 宮尾秀樹

### 訳者のコメント

この文献は血液代替物の直接的な研究ではないが、

- 組織固定液にfluorocarbonを混ぜることにより、固定過程での低酸素性組織変化を防止できるため、今後の組織固定法に人工酸素運搬体が使われる可能性がある。
- fenestrated capillary の解剖学的構造に新知見を見いだしたという点で、修飾ヘモグロビンの血管外漏出という問題に新しい展開をもたらす可能性がある。

の2点によりここに紹介する。

### Introduction

毛細血管はfenestrated typeとnonfenestrated typeに分けられ、消化管、腎、内分泌腺はfenestrated type、筋肉、皮膚、結合組織はnonfenestrated typeの毛細血管と言われている。そのfenestraeは直径60-80nmの円形で薄さ3-5nmのdiaphragmを持っている。fenestrated typeとnonfenestrated typeは蛋白などの高分子の透過性は変わらないが、水や小分子の透過性はfenestrated typeが圧倒的に高い。(従ってfenestrated capillaryのdiaphragmに小分子のみを通過させる構造があるはずである。)( )は訳者註、以下同)しかし多くの電子顕微鏡研究において、いまだにdiaphragmにこのような"channel structure"や"impermeable structure"の存在は示されていない。この理由として組織の固定過程において固定時の低酸素状態がfenestraeの構造になんらかの変化を起こしている可能性がある。この可能性を検討するた

めにratの灌流液にglutaraldehydeを含んだ酸素運搬血液代替物を使用して血管を固定した。それぞれのfenestraeに高さ300nmのbush-like structure(草叢構造)(20-40本の繊維状のプラグ)が明らかとなった。われわれはこの構造をfasciae fenestraeと仮称し、これが水や小分子の選択的濾過のバリアーとなっていると考えられる。

### Materials and Methods

20匹のratに麻酔をかけ、気管切開をし、開胸し、心尖部から左室にカテーテルを挿入した。下大静脈を切離後脈動流ポンプにて灌流圧120mmHgで固定液を灌流した。6kPa以下のPaO<sub>2</sub>を示したratは対象から除外した。固定液はfluorocarbon FC-75とPluronic F68とglutaraldehydeを0.05Mの磷酸ナトリウムバッファーに溶かしたものを使用し、PO<sub>2</sub>は50kPaとした。血管の灌流固定後空腸、胃、腎を切除し、電子顕微鏡検鏡用に2種類の方法で固定し(過程1: OsO<sub>4</sub>, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, cacodylate bufferを用いたもの。過程2: OsO<sub>4</sub>, cacodylate buffer, tannic acid, uranyl acetateを用いたもの)エタノールで脱水し、propylene oxideを経てエポンに包埋した。lead acetateとuranyl acetateで染色し、60kVで検鏡した。

### Results

採用した固定法により、全身が画一的に固定されミトコンドリアの破裂、endoplasmic reticulumの水疱変成、細胞の膨化等は認められなかった。肺血管を除いて全身の血管は脱血が完璧に行われ、血管内腔が保持され、灌流圧が十分で

あった事を示唆した。

### 小腸絨毛の毛細血管

直径9-12μmのfenestrated capillaryの内皮細胞間に、直径60-80nmの円形のfenestraeが多数認められた。fenestraeは5nmの厚さ(細胞膜の半分)の薄いdiaphragmで血管内外をしきっていた(過程1)。fenestraeは、高さ300-400nmのgooseberryの草叢様の放射状の繊維束(20-40本)により栓をされた状態であった(過程2)。また繊維状のsurface coatが管腔側に50nmの厚さで認められた。

### 胃粘膜の毛細血管

基本的には小腸の毛細血管と同じように見えたが、繊維束の高さがやや高く、diaphragmを2枚持った樽状のfenestraeが見られた。

### 腎の尿細管周囲の毛細血管

小腸の毛細血管と似ているが、長さが短い繊維束が波打っていて、表面にhomogeneous coatが認められた。

### 腎糸球体毛細血管

diaphragmを1枚か2枚もったfenestraeが認められた(過程1)。過程2では300nmの厚さをもち、細い繊維束をもった繊細なsurface coatが認められたが、小腸絨毛の毛細血管や腎の尿細管周囲の毛細血管で見られたようなgooseberryの草叢様の栓は綿密な検索を行っても認められなかった。

### Discussion

fenestrated capillaryの草叢様の放射状の

纖維束(fasciae fenestraeと仮称)はいままで発見されなかった。この研究の方法、すなわち低酸素状態を避けた固定法によってはじめて明らかにされた。纖維状のsurface coatはproteoglycanで負の電荷を持っていることがわかっている。このことからfasciae fenestraeも負の電荷をもつたproteoglycan分子である可能性を示唆する。アルブミンなどの大分子の通過にこのfasciae fenestraeが関与していると思われ、また水や小分子の濾過の生理学的なデータもこの論文の形態学的な発見を支持する。Pappenheimerの言う"small pore"が形態学的な意味でのfasciae fenestraeに相当すると著者等は想像している。臨床

的な観点から見ると、糖尿病などの代謝疾患はproteoglycanの合成に影響を与えfasciae fenestraeの形態学的な変化を来たし毛細血管の透過性を変化させる可能性があるかもしれない。腎系球体血管は教科書ではdiaphragmの無いfenestrated capillaryということになっているが本研究でdiaphragmの存在を証明した。また糸球体血管に腎の尿細管周囲の毛細血管にはあるfasciae fenestraeが認められなかつたのは糸球体血管の水分透過性に関与している。管腔側の纖維状のsurface coatは"prefilter"として作用しているのではないかと想像される。

#### 訳者のコメント

図は論文に載っているfasciae fenestraeのイラストであるが、驚くべき構造である。繰り返しになるが、この構造は特に修飾ヘモグロビンの血管外漏出という問題に新しい展開をもたらす可能性があると思われるし、組織の固定法に関して、固定時の低酸素を防ぐために人工血液が使われているということも興味深い。この方面的研究者は全文を読まれることをお勧めします。電子顕微鏡の写真が多く、普通のコピーではなかなか纖細な構造がわからないので雑誌そのもの、あるいは写真用のコピーでの閲覧を推奨します。

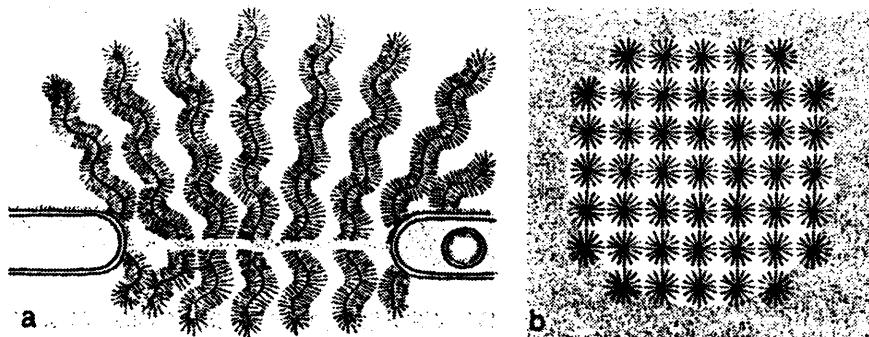


Fig. 1 Schematic drawings of capillary fenestrae containing filamentous molecular sieve plugs, tentatively named fasciae fenestrae. Midsagittal (a) and tangential (b) sections are shown. The filaments of the plugs are depicted as brush-like proteoglycan molecules—drawn to scale; they are composed of a protein core with glycosaminoglycan side chains.

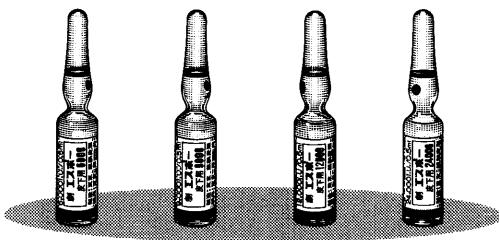
—ヒト エリスロポエチン製剤—

# エスパー<sup>®</sup> 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



【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  
販売元  
三井株式会社  
〒100-8188 東京都中央区日本橋本町三一五  
資料請求先

98.9(総)

E S P O

効能・効果、用法・用量及び使用上の注意は添付文書をご覧下さい。



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——

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  
指赤十字アルブミン

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。手書き原稿の場合には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, μm, L, mL, μL, mol, g, mg, μg, ng, pg, fg, N/10などを用いる。
- 7) FigureとTable：引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は全て英文とすること。本文ハードコピー上に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。
- 8) 文献：本文に引用した順序に番号を付け、文中では2), 3-5), 1, 4-6)などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名、論文題名、誌名、西暦発行年；巻数：

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

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

掲載料は無料とし、論説、総説、原著、報告等については別刷り30部を贈呈する。それを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、友田燁夫、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. 7 (1) 1999年3月31日発行

〒169-8555 東京都新宿区大久保3  
早稲田大学理工学総合研究センター55S棟701号  
TEL (03)5286-3120 FAX (03)3205-4740  
〒063-0002 札幌市西区山の手2条2丁目  
北海道赤十字血液センター内  
TEL (011)613-6615 FAX (011)613-4131  
〒113-0034 東京都文京区湯島1丁目1番地12号  
TEL (03)3253-5311 FAX (03)3251-5339

再生紙を使用