

目次

人工血液

第7巻 第3号 1999年8月

第6回年次大会プログラム59

総説 非溶血性輸血副作用と血液製剤の保存による生理活性物質の産生
.....藤原満博 87

Contents

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 7 No. 3 August, 1999

Annual Meeting Program..... 59

*Review: Nonhemolytic transfusion reactions and generation of bioactive
substances in blood products during storage.... Mitsuhiro Fujihara 87*

第 6 回日本血液代替物学会年次大会

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

テーマ

「血液代替物の臨床応用への前進」

大会長 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 南館4F扇の間

〒160-8330 東京都新宿区西新宿2-2-4

Phone : 03-3344-0111

Fax : 03-3345-7475 (期間のみ)

年次大会 大会長挨拶

National programとしての血液事業は21世紀を目前にして重要な転換期を迎えようとしています。輸血療法の実施に際し、「informed consent」をとることが義務づけられ、医師は勿論のこと、一般の人々の間にも輸血用血液の安全性についての関心が一層高まり、その意味では、「安全且つ有効な輸血」をより高いレベルで追求しようとする医療の流れは当然の成り行きといえます。献血という報酬を求めない善意の行為に立脚している血液事業には、供給調整という問題が常に付きまといますし、同種血の使用による避け難い輸血副作用の可能性とその解決法の模索など容易ならざる問題は少なくありません。

同種血によらない輸血療法として、自己血輸血には一定の限界があり、人類に大きな福音をもたらし得る物として「人工血液／血液代替物」の開発は長い間の夢でしたが、21世紀を間近にしてこれらの臨床応用へ向け、明るい光が見え始めています。

平成9年度から我が国では高度先端医療研究事業により大型の人工血液の開発研究班が組織され、人工赤血球（酸素輸液）、人工血小板、遺伝子組換えヒト抗体の開発に拍車がかかっています。我が国の人工血液／血液代替物研究は海外のそれに比して決して遅れをとることなく、むしろその先頭に立ってさえいます。また、これらの開発研究は我が国の血液事業の展開にとっても重要な領域であり、第6回を迎えた本学会の存在意義は益々大きくなっています。

第6回日本血液代替物学会のテーマは「血液代替物の臨床応用への前進」としました。臨床応用の早期実現を可能にするために、どのような基礎研究を遂行し、どのような臨床試験を念頭におけば良いかを考えてみる機会として、本年度の学会の特別プログラムを企画しました。会長シンポジウムでは「人工血液開発分野研究班」を中心として、我が国における人工血液／血液代替物研究の最前線を紹介し、シンポジウム「人工酸素運搬体 - 臨床応用に向けて」では臨床応用へ向けた具体的な問題解決について討論がなされることが期待されています。特別講演として海外から3名、国内から2名の方々を招聘しましたが、それぞれの講演者は人工血液／血液代替物研究の進展に示唆を与える素晴らしい講演をしてくれるものと確信しています。一般演題の内容も過去5回の大会に比べ、人工酸素運搬体と種々の病態との関連や、血小板代替物に関する演題などが増加して多彩となり、充実して来て居ります。

本大会が参加者全員にとって、実り多いものになることを期待しています。

第6回日本血液代替物学会年次大会大会長
慶應義塾大学医学部内科
池田 康夫

お知らせとお願い

■参加者の方へ

1. 開場および受付開始

京王プラザホテルでの受付開始は1日目（9月10日）は午前11時、2日目（9月11日）は午前8時30分となります。

2. 参加登録

参加登録は、総合受付（4F「扇の間」前）において行います。参加費は10,000円（懇親会参加費を含む）です。ネームカード（兼領収書）をお渡ししますので所属、氏名を各自でご記入の上、ご着用下さい。会期中、会場へのご入場の際には必ずネームカードをご着用下さい。

3. 年会費および新入会受付

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

4. 抄録集

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

5. 懇親会

参加者相互の親睦を図るため、第1日目、9月10日（金）午後6時30分より京王プラザホテル南館「錦の間」にて懇親会を開催致します。奮って御参加下さい。

6. 呼出・伝言

会場内での呼出は、緊急の場合に限り、総合受付にお申し出下さい。また、総合受付前にインフォメーション・ボードを用意致しますのでご利用下さい。

■演題発表される方へ

1. シンポジウム

口演者はスライドを口演予定時刻の1時間前までに、スライド受付（南館4F「扇の間」前）にて試写の上、ご提出下さい。講演時間は20分です。スライドの枚数には制限はありませんが、時間厳守をお願い致します。プロジェクターは一台のみ用意致します。スライドは口演終了後スライド受付にて返却致します。

2. 一般演題

口演者はスライド受付にて試写の上、スライドをご提出下さい。講演時間は8分、討論は2分です。口演終了1分前に時間をお知らせいたします。スライドの枚数には制限はありませんが、時間厳守をお願い致します。プロジェクターは1台のみ用意いたします。スライドは口演終了後、スライド受付にて返却致します。

■司会、座長へのお願い

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

■大会事務局

第6回日本血液代替物学会 年次大会大会長 池田康夫

160-8582

東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部内科 血液研究室 勝俣陽子

Phone: 03-5363-3784

Fax: 03-3226-6623

e-mail: yikeda@med.keio.ac.jp

第6回血液代替物学会年次大会日程

第1日目 (9月10日)

第2日目 (9月11日)

9:00		9:15	一般演題 IV (堀進悟)
10:00		9:55	一般演題 V (高橋恒夫)
		10:35	一般演題 VI (友田燐夫)
11:00	理事会 (宴)	11:15	特別講演 III Alan S Rudolph (西出宏之)
12:00	評議員会 (雅)		昼食
13:00	開会の辞 (池田康夫)	13:00	総会
	13:05 会長シンポジウム (池田康夫)	13:15	特別講演 IV 末松誠 (北畠顕)
14:00		13:55	特別講演 V Marcel Levi (長澤俊郎)
15:00		14:40	Coffee Break
	15:15 一般演題 I (仲井邦彦)	15:10	シンポジウム (小林紘一、池淵研二)
16:00	15:45 一般演題 II (宮尾秀樹)		
	16:15 一般演題 III (佐久間一郎)		
17:00	16:50 特別講演 I 平澤博之 (清水勝)	17:10	閉会の辞 (池田康夫)
18:00	17:30 特別講演 II Marcos Intaglietta (湯浅晋治)		
	18:30 懇親会 (錦)		

第1日目 9月10日(金)

11時00分～12時00分 理事会

12時00分～13時00分 評議員会

13時00分～13時05分 開会の挨拶 池田康夫 慶應義塾大学医学部内科

13時05分～15時15分 会長シンポジウム

血液代替物開発研究のUpdate、1999年 司会 池田康夫 慶應義塾大学医学部内科

1. 血液代替物開発研究に望むこと

中嶋正治 厚生省医薬安全局血液対策課

2. 人工赤血球(酸素輸液)

土田英俊 早稲田大学理総合研究センター

3. 血小板代替物

西谷孝子、村田満 慶應義塾大学医学部内科

4. 遺伝子組換えヒト血清アルブミン

小林 薫 吉富製薬(株)創薬研究所生物医薬研究部

5. 遺伝子組換えヒト抗体

黒澤良和 藤田保健衛生大学総合医科学研究所免疫学研究部門

15時15分～15時45分 【一般演題Ⅰ】 座長 仲井邦彦 東北大学医学系研究科環境保健医学

1. 人工酸素運搬体ヘモグロビン溶液からの中空糸膜によるヒトパルボウィルスの除去

阿部英樹 北海道赤十字血液センター

2. メチレンブルー及びジメチルメチレンブルーを用いたヘモグロビン溶液に対するウィルス光不活化

平山順一 北海道赤十字血液センター

3. 人工赤血球: ヘモグロビン小胞体の常温長期保存

宗 慶太郎 早稲田大学理工学総合研究センター

15時45分～16時15分 【一般演題Ⅱ】 座長 宮尾秀樹 埼玉医科大学総合医療センター麻酔科

1. ストレス誘導型heme oxygenase発現臓器におけるヘモグロビン修飾型酸素運搬体の血管機能修飾作用の解析

水城 啓 慶應義塾大学医学部医化学

2. Hemoglobin修飾体が自然発症糖尿病ラット(OLETF)の循環動態および血小板凝集能に及ぼす影響

佐久間一郎 北海道大学医学部循環病態内科

3. Increased capillary perfusion in extreme hemodilution after reinfusion with high-viscosity dextran in the microcirculation

Silvia Bertuglia Univ. Pisa, Clinical Physiology, Italy

16時15分～16時45分 【一般演題Ⅲ】 座長 佐久間一郎 北海道大学医学部循環病態内科

1. ヘモグロビン小胞体の細網内皮系への影響

酒井宏水 早稲田大学理工学総合研究センター

2. 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、小林紘一 川崎市立川崎病院呼吸器外科

3. 人工酸素運搬体の血小板活性化に及ぼす影響

藤井 聡 北海道大学医学部循環病態内科

16時50分～17時30分 特別講演(Ⅰ) 司会 清水 勝 東京女子医科大学輸血部
Critical careにおける輸血を巡る最近の話題

演者 平澤博之 千葉大学医学部救急医学

17時30分～18時15分 特別講演(Ⅱ) 司会 湯浅晋治 埼玉県赤十字血液センター
Molecular design of oxygen carrying plasma expanders

演者 Marcos Intaglietta University of California San Diego, USA

18時30分～ 懇親会(錦の間)

第2日 9月11日(土)

9時15分～9時55分 【一般演題Ⅳ】 座長 堀 進悟 慶應義塾大学医学部救急部

1. 近赤外分光法を用いた脱血ショック下におけるpolyethyleneglycol-conjugated s-nitrosohemoglobinの酸素運搬能の評価

坂野上 淳 北海道大学電子科学研究所

2. 開心術における大動脈遮断中の新しい心筋保護液—従来の心筋保護液に人工血液を混和させて—
小高桂子 東京女子医大麻酔科

3. 人工酸素運搬体NRC(Neo Red Cell)を用いた部分液体換気の有効性の検討
田島敦志 慶應義塾大学医学部呼吸器外科

4. エホバの証人が血液代替物を希望する理由
早崎史朗 ものみの塔聖書冊子協会

9時55分～10時35分 【一般演題Ⅴ】 座長 高橋恒夫 東京大学医科学研究所細胞プロセッシング研究部門

1. アルブミンマイクロスフェア利用の血小板代替物モデル
武岡真司 早稲田大学理工学総合研究センター
2. 抗HLA class I 抗体に対する反応性のない凍結乾燥血小板の開発
酒居一雄 東京大学医科学研究所
3. 遺伝子組換えGPIb/IX/Vのフラグメントを導入したリポソームと固定化vWFとの相互作用
西谷孝子 慶應義塾大学医学部内科
4. 遺伝子組換えGPIIb/IIIa及びGPIb/IX/Vのフラグメントを導入したリポソームの固定化コラーゲンへの粘着
西谷孝子 慶應義塾大学医学部内科

10時35分～11時15分 【一般演題Ⅵ】 座長 友田輝夫 東京医科大学生化学

1. S-Nitroso-Polyethylene glycol-Hemoglobin誘導体の開発
仲井邦彦 東北大学医学系研究科環境保健医学
2. 二量化アルブミン—ヘムの特徴と酸素結合能
小松晃之 早稲田大学理工学総合研究センター

3. 活性酸素から考察したヘモグロビン利用酸素輸液のセル構造の重要性

武岡真司 早稲田大学理工学総合研究センター

4. O/W型パーフルオロカーボンエマルジョンの新規調整法の開発と体内動態制御

福島昭二 神戸学院大学薬学部薬剤学

11時15分～12時00分 特別講演Ⅲ 司会 西出宏之 早稲田大学理工学総合研究センター

Liposome encapsulated hemoglobin; Current status and future challenges

演者 Alan S Rudolph Defense Advanced Research Projects Agency, USA

13時00分～13時15分 総会

13時15分～13時55分 特別講演Ⅳ 司会 北畠 顕 北海道大学医学部循環病態内科

微小循環動力学から見た人工血球の設計原理

演者 末松 誠 慶應義塾大学医学部医化学

13時55分～14時40分 特別講演Ⅴ 司会 長澤俊郎 筑波大学臨床医学系血液内科

Prevention and treatment of bleeding by fibrinogen-coated albumin microcapsules and other platelet substitutes

演者 Marcel Levi Univ. Amsterdam, Academic Medical Center, The Netherlands

14時40分～15時10分 Coffee Break

15時10分～17時10分 シンポジウム

”人工酸素運搬体—臨床応用に向けて”

司会 小林紘一 慶應義塾大学医学部外科

池淵研二 北海道赤十字血液センター

1. 生体内における酸素輸送から見た血液代替物の評価—臨床応用に向けて—

堀之内 宏久 慶應義塾大学医学部外科

2. セル型、非セル型酸素輸液の物性比較、および血圧亢進と抵抗血管収縮の相関の検討

酒井宏水 早稲田大学理工学総合研究センター

3. 人工酸素運搬体、Neo Red Cell の開発現況

緒方嘉貴 テルモ(株)研究開発センター

4. 血液代替物臨床評価ガイドライン

中島一朗 東京女子医科大学腎臓病総合医療センター第三外科、
日本血液代替物学会臨床評価ガイドライン作成委員会
ワーキンググループ

17時10分～17時15分 大会長挨拶

Critical Careにおける輸血を巡る最近の話題

平澤博之
千葉大学医学部救急医学

【緒言】本講演においてはcritical careにおける輸血を巡る最近の話題について、血液代替物に対する期待も含めて概説する。【赤血球輸血】Critical careにおける赤血球輸血の意義は最近変化してきている。すなわち循環管理の目標は組織酸素代謝を適切に維持することであるとの認識が普及し、赤血球輸血の必要量も酸素供給量の面から論じられている。またごく最近、Hb 7.0g/dLを目標に輸血量をある程度制限した方が、Hb 10.0g/dLを目標とする従来の方法より救命率などの面から有利であるとの興味深い論文が発表された。またこの領域においても人工赤血球に大きな期待が掛かっているが未だ広く臨床応用されてはいない。【血小板輸血】近年DICの病態概念は大きく変化し、凝固・線溶系異常は専ら血管内皮細胞障害として捉えられ、我々もDICにかわり、disseminated intravascular inflammation (DII)なる病態概念を提唱している。それに伴い血小板輸血に関する認識も変化し、従来に比較してその頻度は減少してきている。【血漿輸血】血漿輸血もまたcritical careにおいては不可欠の治療手段である。最近体液管理において血漿膠質浸透圧(COP)を適切に維持することの重要性が認識され、COPを測定しつつFFPやalbumin製剤を投与する体液管理が普及しつつある。この管理法はoncotic agentを大量に必要とするが、近い将来recombinant albuminが一般化してくれば、この治療法の臨床的意義も変化するのと考えられる。また急性肝不全に対して血漿交換(PE)は必須の治療方法であるが、成人間生体部分肝移植が最近可能となったことより、今や常に肝移植を視野に入れて治療する時代となっており、PEも移植までのbridge useとしての意味合いが強くなってきた。Bridge useとしてのPEを行う場合には、全身状態を可能な限り良好に保つことが特に必要であるが、そのためにはCOPの急速な変化、hypernatremia、metabolic alkalosisなど大量のFFP置換に起因する合併症に対処する必要があり、我々はPE施行時には腎不全の有無に拘わらず持続的血液濾過透析(CHDF)を併用し好成績をあげている。

微小循環動力学から見た人工血球の設計原理

末松 誠
慶應義塾大学医学部 医化学教室

微小循環系は径数百 μm の細動脈から毛細血管を経て細静脈に至る系を指し、全血管床面積の90%以上を占める機能的循環単位である。人工血球の安全な臨床応用が成されるためには、開発された血球を実際に投与した際の生理的な微小循環機能の維持が不可欠である。微小血管内腔を構成する内皮細胞の形態は臓器により異なり、肝臓に代表されるような篩板状小孔(fenestration: 径約100 nm)を持つもの、脳血管のような小孔を持たないものに大別できる。従って赤血球の酸素運搬能を代替するヘモグロビン修飾体や血小板の一次血栓形成を血小板減少時に補填できる人工粒子の設計のためには、分子あるいは粒子径の設定が微小血管内分布や体内代謝コンパートメントを決定する重要な要素となる。またヘモグロビンを利用した酸素運搬体の場合、生体において分子状酸素と極めて近い構造をもつガス状メデイエータである一酸化窒素と一酸化炭素の識別能の付与は、これらの物質が生理的機能を担う臓器の機能維持のためには必要不可欠と言える。一方血小板については最近まで個々の細胞の微小血管での動態が不明であったために、粒子形やサイズの設計に必要なパラメータの集積が望まれていた。演者らは超高感度超高速撮像管による微小循環観察法により、wall shear rateの高い細動脈では血小板が辺縁流を流れ、内皮細胞とミリ秒レベルの接着反応をくり返して流れること、そのメカニズムには血小板上の接着分子 GPIb を介した特異的な相互作用が関与することを明らかにした。本講演では厚生科学研究の支援下で開発された人工酸素運搬体や人工血小板粒子の生体内挙動のビデオ画像を交え、微小循環動力学的特徴について概説する。(本発表で用いた人工血球粒子は早稲田大学理工学部土田研究室、慶應義塾大学医学部内科 池田研究室より供与されたものである。)

MOLECULAR DESIGN OF OXYGEN CARRYING PLASMA EXPANDERS

M. Intaglietta

Department of Bioengineering, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093

Oxygen carrying plasma expanders (OCPE) have evolved in the attempt to reproduce the oxygen carrying capacity of blood, and under the premise that it is generally beneficial to lower blood viscosity. However, the cardiovascular system has excess oxygen carrying and delivery capacity, and is designed to operate at an optimal shear stress in all conditions. Therefore reproducing the oxygen carrying properties of blood is not as crucial as insuring that flow and viscosity, the determinants of shear stress, are maintained at physiological levels. The introduction in the circulation of an OCPE based on molecular solutions changes the transport properties of blood and affects the homeostatic balance when the changes cause the circulation to be outside of its self regulating capacity, a landmark termed the transfusion trigger (TT), corresponding to a loss of approximately half of the red blood cell mass. OCPE's are not need up to this point, volume restoration and maintenance being the sole requirement. Introduction of low viscosity OCPEs beyond the TT to restore oxygen carrying capacity and blood volume cause the circulation to be subjected to extreme hemodilution. The principal problem of this condition is that low blood viscosity causes vasoconstriction, which is a positive feedback situation, since the consequent low flow shear stress reduces the production of endothelial shear stress dependant dilators such as NO and prostacyclin. Additional evidence indicates that NO is not only required for hemodynamic autoregulation, but also for controlling mitochondrial oxygen consumption. Furthermore adequate levels of shear stress are needed for controlling endothelial expression of genes that regulate apoptosis as well as lowering microvascular damage due to inflammatory phenomena. These considerations suggest that OCPEs should strive to maintain blood viscosity to near normal levels, which poses the problem of how to maintain blood viscosity in the absence of red blood cells. A solution of this problem is to use large molecules, either singly or in combination. Polyethylene glycol conjugated hemoglobin, polymerized hemoglobin, hemoglobin combinations with colloids such as starch or dextran, liposome encapsulated hemoglobin provide potential solutions to this problem. These considerations are supported by recent experimental findings showing that the vasoconstrictor effect due to the presence of free hemoglobin in plasma is an inverse function molecular radius, and the result that high viscosity plasma expanders maintain functional capillary density in extreme hemodilution. These results provide the basis for a rational design of oxygen carrying plasma expander molecules that optimally match and preserve the transport properties of the circulation.

LIPOSOME ENCAPSULATED HEMOGLOBIN;
CURRENT STATUS AND FUTURE CHALLENGES

A. S. Rudolph

Defense Advanced Research Projects Agency, Arlington, VA 22203-1714

Liposome encapsulation of hemoglobin has been pursued for nearly 30 years. Over the course of these studies, significant information about the physicochemical properties, biodistribution, oxygen carrying characteristics, and interactions with the reticuloendothelial system and vascular compartment have been generated in a number of laboratories. This information reveals a pattern of effects largely dominated by the liposome size and character. The particulate nature of the material results in enhanced intravascular retention in a number of animal models (half-lives up to 48 hours) and can be modulated through surface modification with components such as polyethylene glycol. The reduced extravasation of liposome encapsulated hemoglobin is also manifest in reduced interactions with endothelial components responsible for maintaining vasotonia. This has been demonstrated in isolated aortic segment models and in isovolemic and normovolemic exchange transfusion in small animals and primates that show reduced pressor effects of encapsulated vs. free 64Kd hemoglobin. More recently, encapsulated vs. free cross-linked 64Kd hemoglobin have been compared in a model of high blood flow in the choroidal plexus of the rabbit eye. This study demonstrated vascular flow defects induced by the free and encapsulated hemoglobins as measured by indocyanine green angiography. The encapsulated hemoglobins showed reduced effects in this model compared to free hemoglobin administration over the course of 30-120 minutes. The interactions of encapsulated hemoglobin with other blood components including the complement system and platelets have also been the focus of many recent studies. These studies have suggested that liposomes activate the complement system and interact with platelets to effect mild but definitive changes in blood chemistries and platelet distribution. The outcome of these effects in relevant models of hemorrhagic shock remains to be determined and is the focus of current study. Finally, the pursuit of a commercially viable liposome encapsulated hemoglobin product remains elusive largely due to the economically feasible production of the material. This area has received less attention over the years, as the relatively low encapsulation efficiency constrains the cost-benefit of the potentially reduced side effects of hemoglobin administration. In order for a liposome encapsulated hemoglobin product to be realized, the physiologic properties of the solution must significantly outweigh the current cost of production. These technical issues will be reviewed and a course of future challenges that await encapsulation of hemoglobin will be presented.

Prevention and Treatment of Bleeding by Fibrinogen-Coated Albumin Microcapsules and Other Platelet Substitutes

Marcel Levi, and Jan Wouter ten Cate
University of Amsterdam, Academic Medical Center,
Dept. of Vascular Medicine & Internal Medicine,
The Netherlands

Severe thrombocytopenia frequently occurs in patients receiving chemotherapy or in patients with auto-immune disorders. Thrombocytopenia is associated with bleeding, which may be serious and life threatening. Current treatment strategies for thrombocytopenia may require transfusion of allogeneic platelets, which is associated with important drawbacks. These include the occurrence of anti-platelet antibodies, which may result in refractoriness to further platelet transfusions and the potential risk of transfer of blood borne diseases.

There are several means in which primary hemostasis can be improved avoiding the use of allogeneic platelets. Platelet substitute products may be a promising novel approach in that respect. We have recently developed a platelet substitute product (SynthocytesTM), which is composed of human albumin microcapsules with fibrinogen immobilized on their surface. We have shown that the intravenous administration of these microcapsules not only correct the prolonged bleeding time in rabbits rendered thrombocytopenic either by anti-platelet antibodies or by chemotherapy, but also reduces bleeding from surgical wounds inflicted in the abdominal skin and musculature. No potential systemic prothrombotic effect of the microcapsules was observed in a model of rabbit venous thrombosis.

Concerning the mechanism of action, experiments with normal and thrombocytopenic human blood in an endothelial cell matrix-coated perfusion chamber demonstrated an interaction between the fibrinogen-coated albumin microcapsules and native platelets. It was shown that the fibrinogen-coated albumin microcapsules could facilitate platelet adhesion to endothelial cell matrix and correct the impaired formation of platelet aggregates in relatively platelet-poor blood. These data indicate that fibrinogen-coated albumin microcapsules (but also other platelet substitutes) can act to improve primary hemostasis under thrombocytopenic conditions and may eventually be a promising agent for prophylaxis and treatment of bleeding in patients with severe thrombocytopenia.

人工赤血球（酸素輸液）

土田 英俊

早稲田大学 理工学総合研究センター

体組織の各細胞にまで酸素を供給する赤血球は、35%濃度のHb溶液が内包された構造であり、この形態には重要な生理的意味がある。

例えば、①Hb分子溶液の酸素放出は迅速であるが、これを酸素過多と感知した血管は収縮して血流障害を起す場合がある。②Hb分子溶液は腎毒性のほか、NO(EDRF)を捕捉して血圧亢進の引金となる。赤血球にはこの障害は無い。③赤血球には解糖系と還元系が保持されている。④Hbの15%溶液は高い膠質浸透圧(60 Torr)を示すが、血液では25 Torrである。⑤血液は非ニュートン流体(3~4 cP)で、血管壁へ作用する溶液粘度の剪断応力が血流調節の生理情報となっている。このような赤血球構造の特徴はHb小胞体で代替できるように設計されている。体内投与されたHb小胞体は細網内皮系に捕捉代謝されるが、この時の免疫系への影響も検討されている。

他方、グロビンの役割代替ができるポルフィリン(リビドヘム)小胞体では、グロビン蛋白質を全く含まない酸素輸液となり得る。例えばリビドヘムとリン脂質類から成る小胞体のほか、リビドヘム8分子を安定に包接できるアルブミンの5%溶液は単純に10%Hbの酸素輸送に匹敵する能力がある。加えて二量体アルブミンを用いると、16分子の包接となるので、4%濃度でも16%Hbに匹敵するし、同濃度での膠質浸透圧は前者の半分になる。これらは動物を用いる前臨床評価試験で慎重な検討が進行中である。この他、Hbやリビドヘムの系で生成するメト体が、光電子照射により容易に還元され、酸素結合能力を復元することも知られて来ている。この方法は簡便な非酵素的還元の可能性を実証したもので、ここに述べる合成あるいは半合成の錯体系の酸素輸液の寿命延長に、決定的役割を果たすものである。現在詳しい反応機構の解明と最適照射条件の決定を急いでいる。

何時でも何処でも血液型に関係なく、必要量を簡単に投与できる酸素輸液の実現する見通しが、はっきりして来た。赤血球の型物質除去と病原性ウィルス除去は、Hb精製工程で完成している。小胞体表面へ(POE)鎖修飾して粒子の凝集や融合を抑制できる、それにこの種の酸素輸液をdeoxy体として室温で遮光下1年以上保存しても安定に機能維持ができる。必要時に滅菌濾過空気に被曝させて、直ちにオキシ体に変換させ直ぐ投与が可能となる。

規格を満足する量産試料により前臨床動物試験の成果再確認を完了し、臨床試験に踏込むための、製造設備の細部設計を検討している。極めて近い将来に実用できる酸素輸液の具体化を確実にする展開を推進している。

血小板代替物

西谷孝子、村田 満

慶應義塾大学医学部内科

血小板の機能は粘着、凝集、放出、血餅退縮、向凝固活性など非常に複雑である。なかでも出血部位で露呈している血管内皮下組織への血小板の粘着とそれに引き続いて起こる凝集が特に重要である。粘着には二つの機構が働いている。一つはフォン・ビルブランド因子(vWF)を標的とした反応であり、血小板膜糖蛋白(GP)Ib/IX/V複合体が関与している。今一つはコラーゲンを標的とした反応で、GPIIa複合体(インテグリン $\alpha 2 \beta 1$)が関与している。従ってGPIb/IX/V複合体、インテグリン $\alpha 2 \beta 1$ 、さらには凝集に必須な膜糖蛋白 $\alpha IIb \beta 3$ などが人工血小板作成におけるkey moleculesである。

我国では平成9年度より厚生省高度先端医療研究事業により人工血小板研究班が組織され、血栓止血学と流体力学を基礎に理論を構築し、これに実験による立証を行ないつつ人工血小板の創製に取り組んでいる。本講演では、GPIb/IX/V複合体の機能部位の遺伝子組み換え体を固相化したリポソーム(rGPIb α -liposome)や、組み換え $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンを導入したリポソーム(rGPIIa-liposome)の機能評価の結果を紹介する。

これ迄我々はrGPIb α -liposomeはvWFの存在下、リストセチン添加によりリポソーム自体が凝集すること、さらにヒト血小板とも凝集塊を形成すること、固相化vWFに静止状態下で粘着することなどを明かにした(BBRC, in press)。また最近、*in vitro*流動状態でvWF固相化表面にrGPIb α -liposomeを還流すると ΔF の増加を伴わない一過性の粘着が観察され、その粘着量は固相化vWF濃度に強く依存すること、rGPIb α -liposomeはコラーゲン上でrollingすること、*in vivo*ラット頸動脈シャントモデルにおいて放射ラベルしたrGPIb α -liposomeは血栓形成部位に特異的に集積すること、などを見出している。一方、コラーゲンに粘着すべきrGPIIa-liposomeは、蛍光顕微鏡と連動した連続画像解析装置を用いて観察すると流動状態でコラーゲン表面と接触すると直ちに粘着し、QCM法による振動数変化(ΔF)として捕らえることが可能であった。この反応は抗GPIa抗体(Gi9)で抑制される特異的な反応であった。さらにrGPIb α 、rGPIIaの両方を導入したリポソームの粘着の検討が進んでいる。

この他、担体としてアルブミン重合体やリポソームのPEG化も検討されている。これらの生体適合性や、血中半減期、生体内分布などについて、*in vivo*での検討が急務である。

人工血小板の開発は、海外においてはみべき研究成果はなく、米国に於て保存期限切れの血小板の凍結・融解を繰り返した後、高速遠心によって得られた膜小片を加熱・乾燥したものが、Infusible Platelet Membranes (IPM)として作られ、動物実験を経て臨床試験が行なわれたが、良好な成績が得られず中止された。生体内で良好な止血機能を有する人工血小板・血小板代替物の実用化に向けてさらなる前進が求められている。

遺伝子組換えヒト血清アルブミンの開発

小林 薫

吉富製薬株式会社 創薬研究所 生物医薬研究部

現在では、遺伝子操作技術の進歩により種々の医薬品の開発が可能となっており、第Ⅷ因子製剤や第Ⅸ因子製剤のような血漿たん白質もその例外ではない。しかしながら、医薬品としての遺伝子組換えヒト血清アルブミン(rHSA)の開発は、以下のような理由により組換え DNA 技術によるたん白質の生産における最も困難な目標の1つとされてきた。

1. 高い純度が要求される。

これは、ヒト血清アルブミン(=rHSA)の投与量が他の組換え DNA 技術により創られた医薬品と比べた場合、極端に高投与量であることに起因する。

2. 高い生産性が要求される。

製剤1グラムあたりの単価を考えた場合、他の血漿由来のたん白質製剤に比べると安価であり、しかも、大量に供給する必要がある。

このように、rHSA の開発には、純度と生産性という相反しやすい事象を特に大量生産の場合において両立させることが要求される。この目的を達成するため、我々はメタノール資化性酵母であるピキアパストリスを用いた rHSA の高生産系及び高度精製系を確立した。

血清アルブミン自身には、酵素活性のような活性が無いことから精製後の rHSA を用いた非臨床試験においては、血漿由来ヒト血清アルブミン(nHSA)との同等性をさまざまな観点より検証した。我々が実施した X 線結晶構造解析を含む物理化学的性質、免疫学的性質、動物を用いた効力薬理試験の結果について紹介するとともに、rHSA の繰返し投与試験や nHSA との比較試験など臨床試験の主要な項目についての成績も合わせて紹介する。

これら非臨床試験及び臨床試験の結果をもとに、1997年10月、rHSA の製造承認申請を実施した。また、審査と並行して実生産用の大規模プラントを北海道・千歳市において建設し、2000 年半ばの稼動を目指して試運転・調整中である。

遺伝子組換えヒト抗体

黒澤良和

藤田保健衛生大学総合医科学研究所

Bリンパ球に富む扁桃腺、臍帯血、骨髓、末梢血数10名相当分を出発材料にしてmRNAを単離し、ヒトの産生する巨大な抗体レパートリーを忠実に反映した抗体ライブラリーを作製した。ライブラリーは独立した1,000億種類のクローンからなりFabの形をした抗体がcp3タンパクと融合してファージ膜上に1価抗体として発現されている。このファージディスプレイ系を用いると抗体を発現すると同時にファージ粒子の中のDNAにその抗体遺伝子がコードされているために、抗原とファージ粒子を混合し、抗原に結合したファージを回収することにより、抗体遺伝子が容易に単離される。現在までに数10種類の抗原を用いてライブラリーをスクリーニングしたが、全例で複数種の抗体を単離できた。詳細に解析した例では約100アミノ酸からなるポリペプチド鎖に対して10数種を超える異なるモノクローン抗体が単離され、作製したライブラリーの性能の高さが証明されている。タンパクのリン酸化された特定部位に対する抗体単離も可能である。*in vivo*に於ては体細胞突然変異の導入と細胞の選別により抗原結合力が高まった抗体が作り出されるが、ファージ抗体の場合も *in vitro*でerror-prone PCRを行うことにより *in vivo*機構をmimicすることが可能である。

この抗体ライブラリーを利用すると、従来よりワクチン接種により予防可能な各種感染症、また中和抗体を含む血清を用いた治療が行われている各種毒素に対して完全なヒト抗体を単離生産できる。ファージ抗体として単離した後、そのV領域をコードする遺伝子を完全なヒト抗体をコードする形に変換できるベクターに組み込み、動物細胞で発現させる。我々のグループではジフテリア毒素、インフルエンザのヘマグルチニンを抗原としてその中和抗体を得る研究を開始している。このヒト型ファージ抗体ライブラリーの将来的可能性について論じる。

生体内における酸素輸送から見た血液代替物の評価—臨床応用に向けて—

堀之内宏久、小林紘一、渡辺真純、柿崎徹、
泉陽太郎、吉津晃、田島敦志、大塚崇、
慶應義塾大学医学部外科

酸素輸送を主目的とした血液代替物はパーフルオロ化合物、ヘムを用いて人工合成した物質、ヘモグロビンを用いた物質など多くの種類が開発されてきた。これらの物質の臨床応用において最も重要な酸素運搬能の評価を中心に全身の循環動態に与える影響、主要臓器の酸素分圧の変化を検討した。

【物質】対象はリポドヘム小胞体、ヘモグロビン小胞体(HbV)、POE修飾ヘモグロビン小胞体、Neo Red Cell(NRC、テルモ社製)、及びアルブミンヘムである。

【評価方法】実験動物として用いたのは、ウサギ、犬、ラットであり、試料の量によって動物種を選択した。評価法としては、主に脱血後血液代替物を輸注するモデルを用いて、循環動態と血液の酸素化、主要臓器での酸素分圧の変化等を含め、酸素運搬能について評価した。また、一部では人工心肺を使用して臓器血流を一定にした場合の酸素消費量の変化について検討した。毒性、代謝に関しては、生存実験と病理組織学的な変化、血中の血液代替物の変化について検討した。

【結果及び考察】リポドヘム小胞体においては40%脱血交換モデルにおいて循環動態を安定させ、全酸素運搬量のほぼ20%の酸素が投与されたリポドヘム小胞体によって運搬されていた。

ヒトヘモグロビンをリポゾームに包埋したタイプの酸素運搬体として、ヘモグロビン小胞体(HbV)及びテルモ社製のNRCを評価した。HbVについては90%の脱血交換実験を行った。NRCでは完全体外循環における酸素運搬実験を行った。HbV、NRCともにin vivoにおいて良好な酸素運搬能を有していた。Polyoxyethyleneでリポゾームの表面を修飾したヘモグロビン小胞体(POE-HbV)を用いると、末梢組織中の酸素分圧の上昇、血中滞留時間ともにHbVに比し良好となり、長期生存が可能であり、臨床応用のために表面修飾が有効であると考えられた。

アルブミンヘムでは、高度脱血交換輸注により、in vivoで酸素運搬能があり、血中滞留時間は比較的短いものの長期生存も可能である。

【まとめ】酸素輸送の評価ではそれぞれの物質は臨床応用に適する物質であると考えられた。血中滞留時間、末梢での酸素供給能力の点でそれぞれ特徴を有し、使用法を工夫することで臨床応用が可能と考えられた。

セル型、非セル型酸素輸液の物性比較、および血圧亢進と抵抗血管収縮の相関の検討

酒井 宏水、小沼 浩人、武岡 真司、
Marcos Intaglietta、土田 英俊

早稲田大学 理工学総合研究センター
Dept. Bioeng., Univ. California, San Diego

【緒言】ヘモグロビン(Hb)を用いる一連の非セル型、セル型酸素輸液を合成し、その物性を比較した。また、微小循環系を支配する抵抗血管を非侵襲で直接顕微鏡観測する方法を用い、各酸素輸液を投与したときの抵抗血管の動態と血圧変動を比較検討した。

【方法】非セル型として分子内架橋Hb(XLHb)、polyoxyethylene(POE)結合Hb(POE-PLP-Hb)、重合XLHb(Poly-XLHb)、hydroxyethylstarch(HES)結合XLHb(HES-XLHb)を合成し、セル型のPOE-HbVと物性を比較した。また、Hamster dorsal skinfold window法を用い、全血の10%容量の各酸素輸液([Hb] = 5 g/dL)を付加投与。抵抗血管(小動脈 A₀, 120~160 μ m径)の管径と血流速度を顕微鏡画像から解析。また体動脈圧も同時測定した。

【結果】POE-HbVでは、allosteric因子の添加量制御により酸素親和度を自在に調節できるが、他の非セル型Hbでは酸素親和度は分子構造に依存する。粘度と膠質浸透圧は高分子結合型で高く、POE-HbVはアルブミン分散時に血液と同等の値に調節できる。高分子結合型では血液と混合すると赤血球凝集が認められたが、XLHb、POE-HbVでは認められなかった。

Hamster皮下微小循環動態の非侵襲観測では、XLHbの投与直後から30%の血圧亢進と同時に抵抗血管の収縮と血流量の低下が認められた。酸素輸液の粒子径の増大に伴いこれらの反応は減少し、HES-XLHbとPOE-HbVでは殆ど変化を認めなかった。抵抗血管の収縮及び血圧上昇は、血管内皮弛緩因子NOをHbが捕捉する現象に起因する。即ち血管壁内皮層には数十nmの細孔があり、小粒径のHb分子は内皮層を透過して平滑筋近傍にまで到達してNOを捕捉するために血管収縮、及び血圧上昇に繋がったものと考察される。他方、大粒径のHbVでは、平滑筋近傍にまで到達できずNOの捕捉は起こらない。また、ストップドフロー法により測定したHbVのNO結合速度は、非セル型に比較して一桁遅いことも寄与しているものと思われる。

【結論】溶液物性と血管活性の両面から、セル型のPOE-HbVの方がより赤血球に近い性能を持った酸素輸液であると判断できる。

人工酸素運搬体、Neo Red Cell の開発現況

テルモ(株) 研究開発センター

緒 方 嘉 貴

献血由来の検査合格期限切れ濃厚赤血球製剤から精製したヘモグロビンを、リポソームによりカプセル化した人工酸素運搬体、Neo Red Cell : NRC の開発を行ってきた。

NRC は、Inositol hexaphosphate:IHP をヘモグロビンと共にカプセル化することで、その酸素親和性: $P_{50}O_2$ を天然赤血球より低親和性にシフトさせ、Hb 濃度が 6g/dl と低いにもかかわらず、生体中において血液と同等の酸素運搬能力を示す結果が得られて来ている。また、血液代替物学会評価委員会において、血液交換における酸素運搬能評価、人工心肺を用いた完全体外循環下における酸素運搬能評価、出血ショックに対する効果、臓器保存液としての効果等の検討を実施して頂き、輸血を一時的に代替する人工酸素運搬体として、必要な酸素運搬効果は十分認められるとの評価も頂いている。

一方で、人ヘモグロビンを原料としていることから、ウイルスによる感染リスクの低減という観点で、ウイルス不活化、除去技術向上も課題として取り組んできた。その結果、マイクロウェーブ超短時間高温加熱法によるウイルスの熱不活化及びウイルス除去フィルターの組み合わせにより 12logs 以上の不活化、除去を生産レベルで達成できる見込みが立って来ている。

この様な状況を踏まえ、現在、臨床応用を前提とした、処方確定、臨床試験用の GMP 製造方法、設備の確定、さらには有効性と安全性の検討を行っている段階にある。

これらの課題を解決した後、臨床に進むことになるが、原料の期限切れ赤血球の譲渡に関しては、現在研究用としての譲渡規定しかなく、問題点として、今後業務用となる臨床応用では、これらの規定の改定が必要であることと理解している。その点において臨床応用の実現を目指した、厚生省や日赤のご理解と、学会の更なるお力添えをお願いする次第である。

血液代替物臨床評価ガイドライン

中島一朗, 阿岸鉄三

東京女子医科大学腎臓病総合医療センター第三外科,
日本血液代替物学会臨床評価ガイドライン作成委員会
会ワーキンググループ

1997 年の日本血液代替物学会総会において、わが国における血液代替物の臨床応用に対応するための臨床評価ガイドライン作成委員会の設置が決定した。これを受けて 1998 年 1 月に第 1 回目の委員会が開催され、第 2 回目にはワーキンググループが発足し、数回におよぶ審議を経て血液代替物臨床評価ガイドラインの骨子が完成した。

その内容は、血液代替物のヒトへの投与に対する臨床評価（以下、治験）に際して、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則、および医薬品の臨床試験の実施の基準（以下、改訂 GCP）を遵守することを原則とした。具体的実施要項として、治験審査委員会、実施医療機関、治験責任医師、被験者の選定とインフォームドコンセント、治験依頼者、治験の契約、治験の実施計画書、治験薬概要書などについて言及した。なお説明不可能な反応事象が生じたときの原因追及や具体的評価判定基準の作成までは踏み込まないことを申し合わせた。

以上、血液代替物臨床評価ガイドラインについて、ヘルシンキ宣言および改訂 GCP を踏まえながらその概要を紹介する。

人工酸素運搬体ヘモグロビン溶液からの中空糸膜によるヒトパルボウイルスの除去

阿部英樹¹⁾, 菅原浩行^{1), 2)},
平山順一¹⁾, 池淵研二¹⁾, 関口定美¹⁾

北海道赤十字血液センター¹⁾
テルモ(株)研究開発センター²⁾

【目的】輸血により感染するウイルスの中でパルボウイルスB19は、輸血用血漿製剤や血漿分画製剤に用いられている各種ウイルス不活化法、すなわち液状加熱法、メチレンブルー光不活化法、有機溶媒/界面活性剤処理法に耐性であり、大きな問題となっている。そこで赤血球代替物の原料となるヒト赤血球由来ヘモグロビン溶液(SFH)の安全性を高めるため、濾過によるパルボウイルスB19除去法について検討した。

【方法】赤血球は献血で得た期限切れヒト赤血球製剤を用いた。赤血球を生理的食塩水で洗浄後4倍容のH₂Oで溶血し、膜成分を18,000×g, 30分遠心後、0.22μmフィルター次いでウイルス除去膜プラノバ35(BMM-35; 平均孔径35nm, 濾過面積0.01m², 旭化成)で濾過しSFHを調製した。ヘモグロビン濃度約4%のSFH 50mLにパルボウイルスB19陽性血漿0.5mLを添加し、プラノバ15(BMM-15; 平均孔径15nm, 濾過面積0.01m²)にて定圧(0.75kg/cm²)循環濾過し、10mLずつ分画した。ウイルスDNAはnested-double PCR法にて検出し、計算によりウイルス量を求めた。ヘモグロビン濃度及びメト化率はシアンメトヘモグロビン法により測定した。

【結果】濾過前10^{5.0-5.3}/10μL PCR titerのウイルス粒子数はBMM-15濾過により10^{1.3-2.2}/10μLとへと減少した。ウイルス粒子数を10^{5.0}/10μLにして濾過した場合、濾過後は10^{0.3-0.5}/10μLになり、これらはDNase処理により検出されなくなった。ヘモグロビン回収率は約70%であった。また濾過によるヘモグロビンのメト化亢進はみられなかった。

【まとめ】大きさが直径約20nmのパルボウイルスB19はBMM-15で効率よく除去することができ、6-7log₁₀の除去率が得られた。BMMによるウイルス除去の原理は粒子の大きさに基づいている。従ってパルボウイルスB19より大きいHIV, HBV, HCV等の除去も可能である。ヘモグロビン回収率も良好であり、酸化によるヘモグロビンのメト化も起こらないことから、赤血球代替物の原料となるSFHの安全性を高める方法として有効であると考えられた。

メチレンブルーおよびジメチルメチレンブルーを用いたヘモグロビン溶液に対するウイルス光不活化

平山順一^{1, 2)}, Stephan J Wagner²⁾,
Charlotte Gomez³⁾, Victor Macdonald³⁾,
阿部英樹¹⁾, 池淵研二¹⁾, 関口定美¹⁾

¹⁾北海道赤十字血液センター, ²⁾American Red Cross,
³⁾The Walter Reed Army Institute

【目的】

ウイルス検査技術の進歩により血液製剤によるウイルス感染は激減したものの、危険性を完全に克服した訳ではない。人工酸素運搬体の原料として期限切れ赤血球製剤由来のヘモグロビンを用いる場合、ウイルスの除去/不活化が必要とされる。除去/不活化法として既にフィルタ-処理などあり得るが、よりよい除去/不活化のためには機序の異なる不活化法を組み合わせることが重要である。本研究ではヘモグロビン溶液の新たな不活化法として、メチレンブルー(MB)および最近開発されたMB誘導体(ジメチルメチレンブルー、DMMB)を用い、ウイルス光不活化と共にヘモグロビン等への影響を検討した。

【方法】

1) ヘモグロビン溶液(SFH); 仲井らの方法により調製 2) 光処理; ウイルス液(SFH 900μL、水泡性口内炎ウイルス(VSV)、色素)1mLをウエルに添加し(液厚1mm)光照射(660nm) 3) ウイルス感染価; Vero細胞を用いたプラークアッセイ 4) メト化率; シアンメトヘモグロビン法 5) 酸素親和性(P50); Hemox-Analyzerによる

【結果】

MB 1μM存在下で11.4J/cm²の光照射を行うと、VSVは5.6log₁₀不活化された。この時メトヘモグロビン含量は3.2%増大し、P50は1.3mmHg減少した。一方、DMMB 1μM存在下で1.7J/cm²の光照射を行うと、VSVは6.4log₁₀不活化されたが、メトヘモグロビン含量もP50もほとんど変化がなかった。

【まとめ】

1) DMMBはMBよりもたやすくVSVを不活化した。2) DMMBはヘモグロビンに傷害を与えずにウイルスを光不活化できる色素であることが示唆された。

【謝辞】

本研究はヒューマンサイエンス財団の高度先端医療研究推進事業によるものである。

人工赤血球：ヘモグロビン小胞体の常温長期保存

宗 慶太郎, 富山賢一, 酒井宏水, 武岡真司,
土田英俊

早稲田大学 理工学総合研究センター

ストレス誘導型 heme oxygenase 発現臓器におけるヘモグロビン修飾型酸素運搬体の血管機能修飾作用の解析

水城 啓, 末松 誠, 武岡 真司, 石村 巽,
土田 英俊

慶應義塾大学医学部 医化学

済生会中央病院内科

早稲田大学理工学部 高分子化学

【緒言】酸素輸液の保存形態としては、溶液状態で長期間常温棚保存でき、開封後すぐに使用できることが理想である。そこで、ポリオキシエチレン (POE) 鎖にて表面修飾したヘモグロビン小胞体 (HbV) 分散液を窒素雰囲気下 4, 23, 40℃ で保存し、1 年間に亘った諸物性値の測定から HbV 分散液の保存安定度を検討した。

【方法】無菌的雰囲気中で調製した HbV 分散液 ([Hb]:10 g/dL, [POE-DSPE]:0.3 mol%, [ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP)]/[Hb]=3/1, [ホモシステイン (Hcy)]:5 mM, pH 7.4 in リン酸緩衝生理食塩水) に窒素を通気して酸素を除去した。4, 23, 40℃ で保存し、1) 紫外可視吸収スペクトル (300~900 nm, 生理食塩水 100 倍希釈)、2) 濁度 (900 nm 吸光度, 生理食塩水 10 倍希釈)、3) 粒径分布、4) 酸素結合解離曲線 (P_{50} , OTE, Hill 係数)、5) メト化率の推移 (P_{O_2} :23 Torr, 37℃) について保存 1 年後まで測定を行った。

【結果および考察】何れの試料も保存 1 年後の濁度は変化せず、粒径変化も殆ど認めず、沈殿及び溶血は確認されなかった。また、40℃・6 ヶ月後の時点で小胞体表面に担持されている POE 鎖は保存前の約 6% 程度の低下に留まった。酸素親和度 P_{50} は徐々に低下するが、これは小胞体内水相のイオン組成が膜透過により変化するためと推察される。しかしながら、この程度の減少では酸素運搬機能に問題は無い。保存後のメト化率は何れの試料においても低下する傾向が認められた。これは最初に存在していた metHb が窒素雰囲気下保存中、Hcy により還元されたためである。また、 P_{O_2} :23 Torr, 37℃ でのメト化率の推移は、23℃・1 年後でも保存前の試料と 3% 以内の相違しか認めず、Hcy の分解や Hb の変性は全く生起していないものと判断される。その他、脂質膜成分についても変化は認められなかった。

【結論】POE 修飾 Hb 小胞体は一年間常温で保存しても、分散安定度、酸素運搬機能ともにほぼ保たれており、保存可能であると思われる。本方法では開封後直ちに使用できる。

肝臓微小循環系は毛細血管に相当する類洞血管が収縮、弛緩を介して血流を調節する特異的な構築を有しており、その内壁を構成する血管内皮細胞には篩板状小孔 (fenestration: 径約 100 nm) が存在しているため、投与された無細胞型ヘモグロビン修飾体は容易に血管外に漏出し、代謝される可能性がある。またこのような酸素運搬体は出血性ショックなどの症例における適応が考慮されているが、このような個体ではヘモグロビン-ヘムの分解系である heme oxygenase-1 (HO-1) が高誘導されているため、肝臓内での代謝、分解の速度は正常時とは大きく異なる可能性がある。演者らはラット分離灌流肝を用い、遊離ヘモグロビン (Hb)、メトヘモグロビン (metHb)、リボソーム封入型ヘモグロビン (HbV) の三者を投与したさいの血管抵抗の変化を、あらかじめ HO-1 を誘導した肝臓において検討した。HO-1 は hemin 40 μ mol/kg を腹腔内投与して誘導した。HO-1 の発現は anti-rat HO-1 MoAb を用いて Western 解析と免疫組織化学により検討した。この肝臓では hemin 投与 12 時間後以降 HO-1 が肝細胞に発現し、18 時間では静脈灌流液での CO 量が最大に達した。Hb 投与 (1.5g/dl) により基礎血管抵抗の上昇、類洞血管の著明な収縮が惹起された。この血管抵抗の上昇に伴い、基礎胆汁流量は一過性に増加し、Hb の灌流回路からの除去により可逆的に回復した。一方 metHb ではそのような変化は起こらず、Hb により捕捉され、metHb では捕捉されない CO により血管抵抗が生理的に低いレベルに維持されているものと考えられた。また HbV 投与では血管反応、胆汁反応とも変動を認めなかった。これらより HbV は血管外空間における CO の生理的作用を阻害しないことが明らかになった。

Hemoglobin修飾体が自然発症糖尿病ラット (OLETF)の循環動態および血小板凝集能に及ぼす影響

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

¹北大医循環病態内科、²東北大院医環境保健医学、

³北大医機能薬理、⁴北大電子研

ヘモグロビン(Hb)系酸素運搬体により、血管内皮由来弛緩因子(EDRF)不活性化に伴う血管収縮、血小板活性化などの副作用が起こることが知られている。一方、救急領域では血小板活性化傾向を有する患者への酸素運搬体投与の可能性を考慮する必要がある。本研究では血小板活性化が危惧される糖尿病の動物モデルとしてOLETF (Ohtsuka Long Evans Tokushima Fatty)を用い、Hbが血小板活性化に及ぼす影響を検討した。

【方法】OLETFの遺伝的コントロールとしてLETO (Long Evans Tokushima)を用い、20、40、60週齢にて実験に用いた。大腿動静脈にカニューレを挿入、それぞれ血圧モニターならびに採血とHb投与に用いた。Hb投与量は125 mg/kgとし、未修飾Hbまたはs-nitroso-Hb (SNO-Hb)を用い、対照は生理食塩水とした。Hb投与10分後、全採血しPRPを調整、コラーゲン凝集(5 µg/ml)およびADP凝集(5 µM)を測定した。

【結果】Hbは血圧上昇および血小板活性化を示したが、SNO-Hbでは抑制された。OLETFとLETOの比較では、20週齢のOLETFにおいてHbによる血小板活性化が顕著となる傾向が観察された。ADP凝集は加齢ラットでも同様な傾向であったものの、コラーゲン凝集はLETOの対照群でも顕著な凝集活性が観察され、Hb条件との間に大きな差は見られなかった。血小板数はHb投与の影響は認められなかった。

【考察及び結論】未修飾Hbによる血小板活性化が示され、特に糖尿病ラットで顕著であった。一方、SNO-Hbにより血小板活性化が回避できることが示された。SNO誘導体は緊急性が要求される臨床実地上、血小板活性化傾向を有する患者に対しても安全に利用可能な酸素運搬体候補と期待された。

Increased capillary perfusion in extreme hemodilution after reinfusion with high-viscosity dextran in the microcirculation.

Silvia Bertuglia, CNR Institute of Clinical Physiology, Medical School, University of Pisa, Italy.

The aim of this study was to investigate the effects of reinfusion with dextran 500,000 (500kDa) during isooncotic isovolemic following extreme hemodilution in terms of laser Doppler fluxmetry (LDPM), functional capillary density (FCD), diameter and RBC velocity in arterioles and venules. The hamster cheek pouch microvasculature was visualized by a fluorescent microscopy technique and LDPM signals were derived from arterioles and venules under control conditions and after isovolemic hemodilution to systemic hematocrit of $16.1 \pm 2.1\%$ by removal of 1.8 ± 0.2 ml blood from the carotid artery and simultaneous infusion of dextran 70,000 MW mixed in 1.8 ± 0.2 ml saline to a 6% concentration. Capillary hematocrit was reduced from $16.9 \pm 1.2\%$ to $8.0 \pm 1.0\%$. During the exchange procedure MAP and heart rate (HR) were monitored. LDPM recordings presented a significant increase in perfusion units (PU) during hemodilution, 100 ± 20 vs. 37 ± 11 PU in arterioles and 34.2 ± 3.5 vs. 28.6 ± 4.0 PU in venules, that was correlated to a small increment in arteriolar and venular RBC velocity. Arteriolar RBC velocity was 0.68 ± 0.16 mm/s, while venular RBC velocity was 0.26 ± 0.02 mm/s. During the final step of hemodilution LDPM decreased significantly to 12 ± 4.5 PU in arterioles and 6.2 ± 1.5 PU in venules, that was correlated to a significant decrease in arteriolar (0.48 ± 0.16 mm/s) and venular (0.10 ± 0.02 mm/s) RBC velocity. FCD decreased significantly ($+3.5 \pm 5.3\%$). Infusion of D500 induced a significant rise in arteriolar LDPM average value (185 ± 15 PU) and venules (40.2 ± 3.5 PU), while capillary RBC velocity increased from 0.15 ± 0.04 to 0.29 ± 0.04 mm/s ($N=15$) during reinfusion of 500D. Arterioles present significant vasoconstriction whereas terminal arteriole had a trend to constrict completely. Vessels significantly dilated during reinfusion of D500 (arterioles: $+35.0 \pm 0.5$, 77.0 ± 1.5 , $p < 0.05$) and FCD increased significantly ($+40 \pm 5.3\%$, $p < 0.05$). Mean blood pressure increased significantly. Present data suggest that increasing microvascular blood viscosity by increasing plasma viscosity has a beneficial effect since functional capillary density was increased. We hypothesize that there is a re-distribution of vascular resistance because there is a significant recruitment of capillaries, and arterioles and terminal arterioles present the same high pressure.

ヘモグロビン小胞体の細網内皮系への影響

酒井 宏水、富山 賢一、武岡 真司、堀之内 宏久、
小林 紘一、土田 英俊

早稲田大学 理工学総合研究センター
慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科

【緒言】体内投与された粒子は、一般的に細網内皮系(RES)にて捕捉代謝されるため、RESが関与する生体防御機能の検討が必要となる。そこで今回は、Hb小胞体(HbV)投与後のRES食食能の把握を目的とし、カーボンクリアランス試験を実施した。

【方法】Wistar系ラット(♂、約200g)を用い、エーテル麻酔下、尾静脈よりPOE修飾HbV(10ml/kg)、Intralipid(20 ml/kg)および生理食塩水(40 ml/kg)を各群15匹に投与した。各群を4グループに分け、投与7時間後、1, 3, 7, 14日後にネプタール麻酔下右頸静脈挿管し、Carbon particle (16 mg/mL in 生理食塩水)を10 mL/kg投与、4, 10, 20分後に採血して可視吸光度からCarbon濃度を測定し、Phagocyte Index (K値)を算出した。測定後犠牲死させて臓器を摘出、脾臓重量を測定、各臓器をホルマリン固定して病理検査を行った。

【結果】Phagocyte Index (K)は、HbV投与1日後30%程度低下するが、3日後には約2倍に亢進、2週間後にはコントロール群と同等に戻った。また体重は、投与翌日に約10%減少するが、その後は順調に増え続けた。脾臓重量は1週間後に約30%増大するが2週間後には低下傾向にあった。

投与1日目の一過性の食食能低下は、生体防御の初期反応を抑制する可能性を示しており、3日後の亢進は投与に伴う網内系の機能亢進によると思われる。投与されたHbVが順次代謝されるために重要な過程を形成しているものと考えられた。2週間後には正常値にまで復したので一過性の亢進状態であったと考えられた。

【結論】HbVを10ml/kg投与した場合では、食食能の一過性低下が認められるが、3日後には回復、亢進し、2週間で正常値へ復する傾向が認められた。初期の食食能低下は今後更に検討する必要があるものの、HbVの投与が細網内皮系に不可逆な影響を与えるものではないと判断された。摘出臓器の病理検査について詳細を検討する予定である。

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¹、三橋将人²、小林紘一³、酒井宏水⁴、
武岡真司⁴、土田英俊⁴

¹川崎市立川崎病院呼吸器外科、²カリフォルニア大学アーバイン校病理学教室、³慶應義塾大学医学部外科学教室、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

【緒言】ストローマフリーヘモグロビン(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った。高濃度精製ヘモグロビンをリン脂質二重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、かつ十分な酸素運搬能を有する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。HbV を投与した際におけ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において検討したので報告する。

【実験方法】ヒト末梢血単核細胞を、濃度の異なる4種類のポリエチレングリコール(PEG-DSPE)修飾リポソーム、SF-Hb、HbV の存在下で培養を行い、0時間、4時間、8時間、16時間 37℃、5%CO₂ 下で培養した後遠心し、上清中の IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IFN- γ および TNF- α の産生を ELISA 法で測定した。また同様にヒト臍帯静脈内皮細胞を SF-Hb、HbV の存在下で培養を行い、各サイトカインを測定した。

【結果】ヒト末梢血単核細胞の PEG-DSPE 修飾リポソーム、SF-Hb、HbV 存在下での培養の結果、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10 および TNF- α の産生の増大を認めたが IL-2、IL-4 および IFN- γ は検出されなかった。またリポソームを修飾する PEG-DSPE の濃度による影響は認められなかった。SF-Hb と HbV の存在下でのサイトカイン産生の違いを比較すると IL-1 α 、IL-1 β 、IL-10 の 16 時間値が SF-Hb の場合に高値を示し、TNF- α の 4 時間値と 8 時間値が HbV の場合に高値を示した。またヒト臍帯静脈内皮細胞の SF-Hb、HbV 存在下での培養上清からは IL-6 と IL-8 の産生の増大を検出し、IL-6 の産生は SF-Hb の場合の方が高値を示した。

【結語】以上の結果は HbV を実際のヒトに投与した際におけ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のある情報であると考えられた。

人工酸素運搬体の血小板活性化に及ぼす影響

藤井 聡¹、佐久間 一郎¹、葛西 瑞穂¹、仲井 邦彦²、
佐藤 洋²、富樫 広子³、吉岡 充宏³、北畠 顕¹

¹北海道大学医学部循環病態内科学、²東北大学大学院環境保健医学、³北海道大学医学部機能薬理学

【緒言】血栓形成の初期過程に接着分子を介した血管内皮、血小板、白血球等の細胞間相互作用が重要な役割を果たしている。血小板β3インテグリンIIb/IIIaは活性化血小板において構造が変化し、フィブリノーゲン結合部位が発現し血小板同士が結合する。P-セレクチンは血小板α顆粒に存在する膜糖蛋白で血小板が活性化されると細胞表面に発現し、白血球膜上の糖鎖であるSialyl Lewisx糖鎖をリガンドとして認め接着能を発揮する。一酸化窒素(NO)は血小板のguanylate cyclaseを活性化させ細胞質内cGMP濃度を上昇させ血小板凝集、粘着を抑制する。そのためヘモグロビン(Hb)はNOを不活化する結果血小板凝集を増強する可能性がある。そこで血小板IIb/IIIaとP-セレクチンに注目しHbが血小板活性化をもたらすかを検討した。

【方法】ヒトまたはウシ赤血球よりstroma-free Hbを調整し透析後実験に使用した。健康ヒトPRPをHbとインキュベートした。活性化された血小板表面に発現されたP-セレクチンを、FITC蛍光標識した抗P-セレクチン抗体とフローサイトメトリー(FCM)を用いて直接的に活性化血小板を測定した。PAC-1はGPIIb/IIIaに対するモノクローナル抗体で静止状態のGPIIb/IIIaにはほとんど結合せず、活性化されたGPIIb/IIIaにのみ結合する。すなわち構造変化を受けたGPIIb/IIIa上のフィブリノーゲン結合部位を認識する。PAC-1もFCMを用いて直接的に活性化血小板を測定した。

【結果】FCM対照群に比べHb投与群で血小板CD62P発現とPAC-1結合が亢進し、SNO-HbおよびSNO-PEG-Hb投与群ではHb投与群に比べ軽度であった。

【考案】Hb投与により血小板機能が変化することが示唆された。Hbの影響を十分に把握するためにFCMを用いた評価系が有効であった。血栓周囲ではトロンビンが活性化されており、また糖尿病では酸化ストレスが増大し、活性酸素が豊富に存在する。トロンビンおよび活性酸素は血小板P-セレクチン発現を誘導する。従って、血栓形成素因、糖尿病、ないしは有意な冠動脈狭窄が存在する場合にはHbによる血小板活性化は、急性冠症候群を誘導する可能性がある。酸素運搬体の適応は健康人のみならず種々の病態生理下で使用されることを念頭に置いて各種病態モデル動物での検討が重要であろう。血小板P-セレクチン発現を抑制することはHbによる副作用を軽減する可能性がある。P-セレクチン分子活性化を抑制する細胞接着抑制戦略は急性冠症候群や脳梗塞の新しい治療法として有用であることも示唆された。

近赤外分光法を用いた脱血ショック下におけるpolyethyleneglycol-conjugated s-nitrosohemoglobinの酸素運搬能の評価

坂野上 淳¹、田村 守¹、仲井 邦彦²、佐藤 洋²、佐久間 一郎³、
北畠 顕³

¹北海道大学電子科学研究所 超分子分光分野、²東北大学医学系研究科 環境保健医学、³北海道大学医学系研究科 循環器内科学

【はじめに】ヘモグロビン系酸素運搬体の投与時における副作用としてこれまで血管収縮とそれに伴う全身血圧(BP)の上昇が指摘されている。これは血管内皮細胞から血中に放出される内皮由来弛緩因子(EDRF)、特に一酸化窒素(NO)をHb分子内のhemeがトラップし不活性化するためと考えられる。そこで、本実験はこのEDRF不活性化を代償するNO供与体および酸素運搬体としてpoly-ethyleneglycol (PEG)-conjugated s-(nitroso)-Hb (SNO-PEG-Hb)を作製した。ラット脱血モデルと近赤外分光法を組み合わせ、ラット頭部における細胞の酸素化度を測定しSNO-PEG-Hb投与効果を検討した。

【実験】PEG修飾型ヒトヘモグロビン(PEG-Hb)はstroma-free Hbを原材料として日本油脂製PEGにより修飾して作製した。PEG-HbをO₂雰囲気下でs-nitroso glutathione(SNO-GS)とインキュベーション(SNO-GS:Hb=5:1)することによりSNO-PEG-Hbを得た。動物実験は雄Wistarラットを用い、21%O₂人工呼吸下であらかじめ3%ウシ血清アルブミン(BSA)により全身血液を65%置換したのち約30%を脱血し、ショック状態を起こした。その後、脱血量に相当するSNO-PEG-Hb(5% w/w)を投与し観察した。対照実験には、3%BSAを投与した。近赤外分光測定はラットの頭皮を切開し、4波長近赤外分光測定器(USP430B, ユニソク社製)により脳内の酸素化ヘモグロビン(oxy-Hb)、脱酸素化ヘモグロビン(deoxy-Hb)、全ヘモグロビン(total-Hb)、およびチトクロームオキシダーゼ(Cyt. oxi.)の酸化率を同時に連続的に計測した。測定中は生理学的パラメータとして全身血圧、動脈血酸素分圧(PaO₂)、静脈血酸素分圧(PvO₂)等をモニターした。

【結果および考察】脱血ショックにより、oxy-Hbとtotal-Hbの減少、Cyt. oxi.の一部還元、およびBPの低下が観察された。また酸素供給量の不足によるPvO₂の低下も起こった。SNO-PEG-Hb投与によりHbとCyt. oxi.はすみやかに脱血前のレベルまで回復した。またBPはPEG-Hb投与に比べ急上昇を起こさず、1時間ほどかけて脱血前のレベルまで回復した。前者はSNO-PEG-Hbの酸素運搬能、後者は徐放的なNO供与体としての機能と考えられた。またBSAによる対照群のラットは投与後1時間以内にすべて死亡した。SNO-PEG-Hbは酸素運搬能に加えNO補償効果を持つ新しい酸素運搬体として期待された。

開心術における大動脈遮断中の新しい心筋保護液 —従来の心筋保護液に人工血液を混和させて—

小高桂子、長沢千奈美、加藤真弓、芦刈英理、
岩出宗代、野村 実、鈴木英弘
東京女子医科大学医学部麻酔科学教室

今回私どもは、従来のGIK心筋保護液に人工血液を混和させ、開心術における大動脈遮断中の心筋代謝に及ぼす効果を実験的に検討したので報告する。

＜対象・方法＞対象は雑種成犬18頭で、全身麻酔導入後、気管内挿管し調節呼吸を行った。左開胸後、左大腿動静脈より遠心ポンプを用いて体外循環を開始し、大動脈起始部で大動脈を遮断し、順行性、あるいは逆行性に心筋保護液の注入を行い、心停止を得た。30-32℃の中等度低体温で1時間の体外循環を行った。心筋保護液の注入は20分ごとに行った。その後大動脈を遮断解除し、除細動して血行動態が安定した時点で人工心肺から離脱し、さらに30分間観察を行った。

心筋保護液の違いで、従来のGIK液(GIK群)、GIKに人工赤血球浮遊液(Neo Red Cell^R：テルモ社製)を混和した群(NRC群)の2群に分けた。NRCは、GIK液に混和する直前に酸素加した。心筋代謝の指標として、体外循環開始直前(コントロール)、大動脈遮断解除直後、人工心肺離脱30分後、の3点で、冠静脈血の乳酸、ピルビン酸、CK-MBを測定し、同時に左室心筋を採取し高エネルギーリン酸を測定した。尚、高エネルギーリン酸は、大動脈遮断1時間後(遮断解除直前)にも測定を行った。

＜結果＞2群間において、L/P比、乳酸摂取率、酸素摂取率には有意な変化はなく、CK-MBは遮断解除後、2群共上昇した。高エネルギーリン酸は、GIK群では大動脈遮断によりATPが有意に低下したが、NRC群においてはATPの低下は軽度であった。

＜考察＞NRCは酸素解離曲線の特性により、低温下でも酸素運搬能に優れている。特に、低温による心筋保護を考慮した場合、従来の心筋保護液と比較し大動脈遮断中の心筋傷害が軽度になる可能性が高い。同時に、人工心肺中からのNRCの使用により、他家血輸血を回避できる可能性も高くなる。今回の実験結果から、NRC混和心筋保護液の大動脈遮断中のATPの減少は軽度であり、血液代替物としてのNRCの有用性が示唆された。

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

田島敦志、堀之内宏久、小林紘一
慶應義塾大学医学部外科

【目的】昨年、リポソーム包埋ヘモグロビン(liposome encapsulated hemoglobin, Neo Red Cell : NRC)を用いた部分液体換気(Partial Liquid Ventilation, PLV)が、実験的に作成した二種類の傷害肺のガス交換を改善することを証明した。今回は、ヘモグロビンの包埋されていないリポソーム(空NRC)を用い液体換気を行い、ガス交換の改善にヘモグロビンが関与しているか検討した。【方法】体重約2.5kgの日本家兎を用い、静脈麻酔を施し、気管切開後、人工呼吸器に接続し、FiO₂=1.0で換気を行った。肺傷害は生理食塩水で肺を4～6回洗浄し、surfactantを洗い出すことにより作成したものと、オレイン酸を0.1ml/kg/hrで30分間静注し作成したものを準備した。空NRCを用いてPLVを施行する洗浄肺空NRC-PLV群(n=4)と、オレイン酸空NRC-PLV群(n=4)に分け90分間、心拍数、大動脈圧、動脈血酸素飽和度を経時的に測定した。PEEPをかけて通常の換気を行う洗浄肺コントロール群(n=6)と、オレイン酸コントロール群(n=6)に分け検討した。4群とも90分間、心拍数、大動脈圧、動脈血酸素飽和度を経時的に測定した。【結果】肺傷害作成後のPaO₂は洗浄肺では53.5±9.7Torr、PaCO₂は43.3±14.9Torr、オレイン酸肺では43.8±5.7Torr、PaCO₂は54.8±6.2Torrであった。液体換気開始後30分で、PaO₂は洗浄肺では156.0±93.9Torrと有意差をもって改善した。一方オレイン酸肺では76.3±56.4Torrと若干の改善のみ認められた。90分後には両者ともPaO₂は低下していき、PaCO₂は増加していった。【考察】前回報告したNRCでの結果はPaO₂はPLV開始後30分で洗浄肺では252.9±61.4torr、オレイン酸では211.3±3.65torrと改善が認められ、90分間ほぼ安定していた。今回の空NRCでの液体換気の結果、洗浄肺に於いてはPaO₂が改善され、オレイン酸肺では若干の改善しか認められなかったのは、空NRCがsurfactantの役割を果たしたことによるものと考えられる。NRCを用いて液体換気を行う際、NRCの磷脂質膜はsurfactantの役割を果たし、無気肺を改善し、液体を肺の隅々まで運ぶ役割を担っていると考えられる。隅々まで液体が届いたところでヘモグロビンにより肺胞中の酸素分圧を高め、血液がガスが改善されると推測される。【結語】NRCによる液体換気ではNRC内のヘモグロビンがガス交換の改善に大いに関与していることが証明された。

エホバの証人が血液代替物を希望する理由

早崎 史朗¹, 中井 猛之², 棚橋 良雄³

¹ものの塔聖書冊子協会

ホスピタル・インフォメーション・サービス

²エホバの証人の品川医療機関連絡委員会

³エホバの証人の新宿医療機関連絡委員会

【はじめに】エホバの証人が信仰上の理由で輸血を拒否することはよく知られている。医学的に考慮しても輸血の弊害は少なくない。それで、この学会において、血液由来でない血液代替物の開発に期待していることを発表してきた。今回は、とりわけエホバの証人の患者の治療に際して用いられたことのあるフルオゾールDAに関連し、使用された経緯や使用状況、また結果等を論じたい。

【フルオゾールDAの使用状況】

日本の一企業が開発に携わった酸素運搬輸液(商品名 フルオゾールDA)は、医師たちやエホバの証人の患者の要望に基づき、輸血の代替品として提供されていた。フルオゾールDAはかつて、「緊急時の輸血の代用」の適応で1983年に厚生省に製造承認申請されており、エホバの証人の患者に対しては「治療薬の緊急避難の使用」との理由で使用されていた。1985年9月から1993年6月までの間に56人のエホバの証人の患者に投与された。しかし、この製剤は1993年に開発中止になった。

【フルオゾールDAの効果性】

効果性に関しては文献により様々な見解がある。大柳らは「臨床科学」誌(21巻6号)の中で「Fluosol DAは……適合血液が間に合わない時や宗教上の理由などで輸血を拒否する患者の急性出血時の救命には有効である」と述べた。植野は東医大誌[44(2):212-224,1986]の中で「たとえわずかのO₂含有量であっても全体像を改善するためには貴重な酸素供給であり、そのような極限状況においてFDAの有用性が認められた」と指摘した。他にも様々な意見があるが、おおむね有用性を認める意見が大半を占めた。

【結語】フルオゾールDAの使用状況と効果性について検討するとき、優れた血液代替物が開発されるなら、エホバの証人のみならず、大勢の患者から歓迎されることは容易に推測できる。それゆえ、わたしたちは、血液代替物の開発のため、日夜奮闘している関係者の働きに深く感謝している。そして、さらなる進展を期待している。

アルブミンマイクロスフェア利用の血小板代替物モデル

¹武岡真司, ¹大川春樹, ¹寺村裕治, ²池田康夫,

¹土田英俊

¹早稲田大学 理工学総合研究センター

²慶応義塾大学 医学部

【緒言】アルブミンマイクロスフェア(AMS)は、静注可能な微粒子として臨床認可されており多くの知見が集積されている。またpH、温度などの条件制御により粒径制御が可能である。今回は、これを血小板膜糖蛋白質の担持体として利用するために、まず0.3~3 μ mのAMSの調製条件、及び血小板膜蛋白質である GPIIb/IIIa を高収率にて結合させる条件を検討した。

【方法】ヒト血清アルブミン(HSA)をpH10.7にてB体とし、高温での分子間ジスルフィド結合、pH低下による疎水性相互作用を利用して粒径の異なるAMSを得る条件を検討した。AMSとGPIIb/IIIa間の架橋剤として、片末端にAMSのアミノ基と反応するスクシンイミド基、他方の末端には GPIIb/IIIa のチオール基と特異的に反応するピリリルメチル基を有するポリオキシエチレン(POE)誘導体を、両末端アミノ基のPOEから合成した。POE部のない低分子の架橋剤SPDPも比較として用いた。FITC標識AMSに架橋剤エタノール溶液を添加して反応、これを遠心洗浄・再分散後 GPIIb/IIIa と結合させ遠心洗浄により試料を得た。

【結果および考察】HAS溶液を加熱(pH10.7, 80°C)した後、室温にて徐々にpHを下げたところpH5.8付近で溶液が白濁し、粒径300nm程度のAMS(1)が得られた。更に40°Cで振とうすると粒径が徐々に増大、16時間後には3 μ m以上になった。最後にpHを7.4に調節して粒径2.5 μ mのAMS(2)を得た。原子間力顕微鏡観察では、(2)はAMS(1)の凝集塊であることが判明した。

スクシンイミド基とピリリルメチル基を持つPOE誘導体を合成、これをFT-IR、¹H-NMRにて同定した。本架橋剤を介したAMSとGPIIb/IIIaとの結合はGPIIb/IIIa抗体結合量およびvWFとの凝集反応から確認した。

【結論】粒子径300nm、2.5 μ m程度のGPIIb/IIIa結合AMSを合成した。最適粒径の選定、およびPOE架橋剤の効果を検討し、複数の蛋白質を複合させて多機能粒子を構築する。

抗HLA class I抗体に対する反応性のない凍結乾燥血小板の開発

酒居 一雄^{1,2}, 藤川 清三³, 田所 憲治⁴, 十字 猛夫⁴, 村田 満⁵, 池田 康夫⁵, 高橋 恒夫¹

1東京大学医科学研究所細胞プロセッシング研究部門, 2ヤトロニ中央研究所, 3北海道大学低温科学研究所, 4日本赤十字社中央血液センター, 5慶應義塾大学医学部

【緒言】血小板は止血作用に重要な役割を果たしている細胞であり、血小板数の大幅な減少は出血症状をもたらす。現在、血小板減少症の治療には血小板濃縮製剤(PC)が用いられているが問題点も多く、特にPCの保存に22℃振盪が必要なこと、保存期間が3日と短いこと、保存中のバクテリア増殖リスク、感染症リスク、同種免疫のリスクの存在が大きな問題である。同種免疫はランダムドナー由来PCの反復輸注により惹起され、患者血中に出現する抗血小板同種抗体のため血小板輸血の効果が著しく損なわれる血小板輸血不応状態(RPT)に陥る場合がある。RPT患者に対してはHLA適合ドナー由来血小板を輸注することで対応が行われている。今回我々は従来のヒト凍結乾燥血小板に着目し、細胞表面のHLA class I抗原を消去することにより、長期保存が可能でかつ抗HLA class I抗体を有する患者にも適用できる可能性のある凍結乾燥血小板を開発し、その基礎的な検討をおこなった。

【方法】バッフィコート由来ヒト洗浄血小板に対し、倉田らの酸処理法(pH3.0, 0℃)によりHLA class I抗原の消去を行った。続いて1.8% paraformaldehydeによる固定処理を行い、凍結乾燥保存した。復水処理した血小板について血小板凝集能測定およびフローサイトメトリーによる表面抗原の解析を行った。

【結果】洗浄血小板に対する酸処理では細胞表面のHLA class I抗原が消失し、リストセチン凝集能が維持されるが、小粒子の産生と、コラーゲン凝集能の低下が観察され、血小板の損傷が推測された。酸処理後、固定した凍結乾燥血小板ではリストセチン凝集能が維持されており、GP Ib、GP IIb/IIIaの発現も維持されていたが、従来の凍結乾燥血小板と異なりHLA-A/B/C抗原は全く検出されなかった。

【考察】酸処理によりHLA class I抗原を除去後、1.8% paraformaldehyde固定処理したヒト血小板は凍結乾燥保存が可能であることに加え、細胞表面にHLA class I抗原が検出されないことから、抗HLA class I抗体を有するRPT患者にも適用できることが期待される点において有望な血小板代替物の一つと考えられる。

遺伝子組み替え GPIb/IX/V のフラグメントを導入したリポソームと固定化 vWf との相互作用

西谷孝子¹、上出佳永子³、村田満¹、半田誠²、池田康夫¹。

¹慶應義塾大学医学部内科, ²同輸血センター
³吉富製薬研究所

【目的】遺伝子組み替え GPIb/IX/V のフラグメント(rGPIb α)を共有結合で導入したリポソーム(rGPIb α -liposomes)を作り、流動状態で rGPIb α -liposomes と固定化 vWf との相互作用を検討した。

【方法】ローダミンで蛍光標識した rGPIb α -liposomes の固定化 vWf 表面上での動的変化を蛍光顕微鏡で連続測定しイメージプロセッサー、ARGUS-20, ARGUS-50、を使って画像解析を行った。測定はすべて洗浄赤血球中、ヘマトクリット 37.5 %, 37℃で行った。

【結果】1. 血小板濃度が $1.25 \times 10^4/\mu\text{l}$ のとき、ずり速度が 600, 1200, 2400 s^{-1} と大きくなるのに伴って、vWf 表面と相互作用する rGPIb α -liposomes の数は増加した。2. Liposome 表面の rGPIb α 密度と vWf の濃度が低い場合、相互作用は可逆的で rGPIb α -liposomes は vWf 表面に短時間(msの範囲)接触するだけであった。

3. Liposome 表面の rGPIb α 密度と vWf の濃度が高くなると、rGPIb α -liposomes は vWf 表面に接触した状態で流動方向へ移動しその速度は rGPIb α 密度と vWf 濃度に依存して変化した。

4. 血小板濃度が 5.57×10^4 , $10.45 \times 10^4/\mu\text{l}$ と高くなると、vWf 表面と相互作用する rGPIb α -liposomes の数は著しく減少した。

5. 血小板濃度 $1.25 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、可溶性 vWf 濃度 $10\mu\text{g/ml}$ の場合、rGPIb α -liposomes は可溶性 vWf を介して固定化 vWf に粘着している血小板と相互作用することが認められた。可溶性 vWf を介した rGPIb α -liposomes と血小板との相互作用は、血小板濃度が 5.57×10^4 , $10.45 \times 10^4/\mu\text{l}$ と高くなると認められなかった。

【結論】rGPIb α -liposomes と固定化 vWf との相互作用は rGPIb α と vWf との可逆的な結合による"tethering"を特徴とする。血小板濃度が低いとき、rGPIb α -liposomes は可溶性 vWf を介して血小板と共に固定化 vWf に粘着しうることが認められた。

遺伝子組み替え GPIIb/IIIa 及び GPIIb/IX/V のフラグメントを導入したリポソームの固定化コラーゲンへの粘着

西谷孝子¹、戒能美枝³、上出佳永子⁴、村田満¹、半田誠²、池田康夫¹、

¹慶応義塾大学医学部内科、²同輸血センター

³東レ基礎研究所、⁴吉富製薬研究所

【目的】遺伝子組み替え GPIIb/IIIa (rGPIIb/IIIa) と GPIIb/IX/V のフラグメント (rGPIIb/IX/V) を共有結合で導入したリポソーム (rGPIIb/IX/V-liposomes) を作り、流動状態で、rGPIIb/IX/V-liposomes の固定化コラーゲンへの粘着における可溶性 vWf とずり速度の影響について検討した。

【方法】 rGPIIb/IX/V-liposomes をローダミンで蛍光標識し、固定化コラーゲンにリポソームが粘着する過程を蛍光顕微鏡で連続測定した。イメージプロセッサ、ARGUS-20, ARGUS-50, を用いて画像解析を行いリポソームの固定化コラーゲンへの粘着力をリポソームの粘着占有面積率 (% surface coverage) で評価した。測定はすべて洗浄赤血球中、ヘマトクリット 37.5%, 2 mM Mg²⁺, 37 °C で行った。 rGPIIb/IX/V-liposomes 表面の rGPIIb/IIIa と rGPIIb/IX/V の濃度はそれぞれ 1.37 nmol/ml と 17.3 nmol/ml であった。コントロールとして rGPIIb/IIIa のみを導入したリポソーム (rGPIIb/IIIa-liposomes, リポソーム表面の rGPIIb/IIIa の濃度は 2.06 nmol/ml) を用いた。

【結果】 1. rGPIIb/IIIa と rGPIIb/IX/V-liposomes はコラーゲン表面へ接触後直ちに静止し非可逆的に粘着した。

2. 血小板濃度が $1.0 \times 10^4/\mu\text{l}$ のとき、ずり速度が 600, 1200, 2400 s⁻¹ と大きくなるのに伴って rGPIIb/IIIa と rGPIIb/IX/V-liposomes の surface coverage は同様に著しく減少した。

3. 血小板濃度 $1.0 \times 10^4/\mu\text{l}$, ずり速度 2400 s⁻¹, 可溶性 vWf 濃度 10 μg/ml の場合、5 分間灌流後の rGPIIb/IX/V-liposomes の surface coverage は可溶性 vWf がいないときに比べ 10.3 倍増加した。 rGPIIb/IIIa-liposomes の surface coverage は vWf の濃度に関係なく 2400 s⁻¹ では常に非常に低かった。

【結論】ずり速度が大きい場合、rGPIIb/IX/V-liposomes の固定化コラーゲンへの効率良い粘着には、コラーゲン表面に吸着して rGPIIb/IX/V と相互作用する可溶性 vWf が必要である。

S-Nitroso-Polyethylene glycol-Hemoglobin 誘導体の開発

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

¹東北大院 医環境保健医学、²北大医 循環器内科、

³北大医第 1 薬理、⁴北大 電子研

【緒言】ヘモグロビン(Hb)系酸素運搬体による生体反応として、血管収縮、腸管収縮、血小板活性化などHbによる血管内皮由来弛緩因子不活性化に起因する副作用が報告されている。我々はその解決法としてNO代謝物放出性を有するs-ニトロソHbを提案し、その効果を昨年度の本学会で報告した。今回は、血管壁漏出回避と血中滞留時間延長を意図しpolyethylene glycol (PEG) 修飾を行い、酸素運搬体の具体的な製剤化を試みたので報告する。

【方法】Hb原料として、期限切れ赤血球製剤より高純度stroma-free Hbを作成した。酸素親和性調節のため嫌気的条件下にてpyridoxal 5'-phosphateを付加し、分子量の異なる種々の活性化PEG (日本油脂) により分子量制御を行った。ついでs-ニトロソグルタチオンを用い、好気的条件下、pH 8.5の0.1 Mリン酸緩衝液中にてHbのs-ニトロソ化を実施、生成物(SNO-PEG-Hb)を生理食塩水に対し透析および濃縮し、冷凍保存した。動物投与実験は、ラット大腿動静脈にカニューレを挿入、それぞれ血圧モニターならびに採血とHb投与に用いた。SNO-Hbおよび血中窒素酸化物の定量は、それぞれゲルろ過および逆相カラムを用いたHPLCにより行った。

【結果】用いたPEG鎖に関わらずPEG修飾Hbへのs-ニトロソ化は未修飾Hbとほぼ同様の効率で実施可能であり、最終生成物のメト化を10%以内とした場合、SNO化率は20%が適当であった。ラットに未修飾Hbを投与した場合、血圧上昇が観察されたが、SNO-PEG-Hbでは昇圧反応は認められなかった。SNO-PEG-Hbの血中半減期は、Hb自体の半減期15時間程度に対し、SNO部分の半減期は2-3時間程度と見積られた。

【考察】PEG修飾はHbのアミノ基を標的とし、チオールを標的としたs-ニトロソ化と両立することが確認され、SNO-PEG-Hbの創製に成功した。SNO-PEG-Hbはラット循環血液中でも比較的長い半減期を有しNO代謝物を徐放的に供給でき、Hbに起因する副作用を代償することが可能と推測された。

二量化アルブミン-ヘムの特徴と酸素結合能

小松晃之、土田英俊

早稲田大学理工学総合研究センター

【緒言】ヒト血清アルブミン(HSA)の疎水ポケットに鉄(II)テトラフェニルポルフィリン誘導体を包接させて得たアルブミン-ヘム複合体(HSA-FeP)は生理条件下(pH 7.4, 37°C)で酸素を可逆的に結合解離できる合成ヘムタンパク質である。本講演では、より高い酸素結合量の実現を目指して二量化アルブミン-ヘム複合体((HSA-FeP)₂)を合成、その構造と酸素結合能を明らかにしたので報告する。

【方法】Cys₃₄のSH残基をビスマレイミドヘキサンの架橋し、HSA二量体を合成した(収率28%)。ゲルろ過により二量体のみを単離精製し、MALDI-TOFMSにより分子量測定を行った。この(HSA)₂にFeP分子を包接させて得た(HSA-FeP)₂の酸素結合能を可視吸収スペクトル、レーザーフラッシュホトリシス分光法から解析した。

【結果及び考察】(HSA)₂のMALDI-TOFMSでは分子イオンピークが観測され、二量体の生成が明らかとなった。この(HSA)₂に1分子当り16個のFePを結合させることにより、(HSA-FeP)₂を調製した。遊離のFePが存在しないことから、ヘモグロビンの4倍量に相当するヘムが(HSA-FeP)₂に包接されていると考えられる。また、(HSA-FeP)₂の等電点は、FePの結合数によらず一定値(4.8)を示し、表面電荷に変化は見られなかった。

(HSA-FeP)₂への酸素の可逆的結合解離を可視吸収スペクトル変化から明らかにした。酸素親和性($P_{1/2}(O_2)$)は30Torrで、酸素結合速度定数(k_{on})は $2.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、解離速度定数(k_{off})は $3.2 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ であった。(HSA)₂のコロイド浸透圧は、同重量濃度HSAの50%を示すので、5wt%(0.75mM)の(HSA-FeP)₂は、ヒト血液の1.3倍量に相当するヘム濃度(12mM)の酸素輸液となる。

活性酸素から考察したヘモグロビン利用酸素輸液のセル構造の重要性

武岡真司¹, Takashi Yonetani², 土田英俊¹¹早稲田大学 理工学総合研究センター²ペンシルバニア大学 メディカルセンター

【緒言】ヘモグロビン(Hb)利用酸素輸液では活性酸素の発生および関連する副作用が検討課題となっている。今回は、オキシHbとスーパーオキシドアニオン($O_2^{\cdot-}$)や過酸化水素(H_2O_2)との反応を解析すると共に、Hbを飽和リン脂質膜で包込んだセル構造の重要性について考察する。

【方法】期限切れヒト赤血球からカラム精製したHbA₀に対して、更に $\alpha\beta$ サブユニットまで単離後、HbA₀を再構成した。ヒポキサンチン/キサンチンオキシダーゼ混合により意図的に発生させた $O_2^{\cdot-}$ が標識分子(シトクロムc、DMP0)と反応する系にて、これを半分阻害するHb濃度 C_{50} を可視吸収スペクトル及びEPRにより求め、反応性の指標とした。 H_2O_2 をヘモグロビン溶液に添加後、系中の酸素分圧と可視吸収スペクトルの推移を同時測定して分解速度 k_d を算出、試料の一部を瞬間凍結させてEPR測定を行い、メトHbおよびグロビンラジカルの濃度推移を観測した。

【結果および考察】再構成前後におけるHbA₀の C_{50} (シトクロムc法)は各々、 $15 \mu\text{M}$ 、 $440 \mu\text{M}$ であった。定法精製のHbA₀にはSODが混入、再構成体にて真値が得られた。カタラーゼの $k_d = 2.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ に対して再構成体では $1.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。また、 H_2O_2 との反応において、 $OH^{\cdot}$ は検出(DMP0)されなかった。 H_2O_2 との反応ではフェリルHb生成およびメトHbへの変換が観測され、メトHb系ではフェリルHbとグロビンラジカルが観測された。

セル型Hb小胞体では内部のHb濃度は24mMと高く、投与後も変化しない。従って、小胞体内で生じた $O_2^{\cdot-}$ は他の分子と反応する前に高濃度Hbの介在で不均化されるか、あるいは自動的に不均化され H_2O_2 となる。この H_2O_2 も高濃度Hbにより瞬時に水と酸素に分解され、 $OH^{\cdot}$ は発生しない。

【結論】

セル型HbではHbが関与する活性酸素種は全てセル内にて消去され、外部発生した H_2O_2 に対してもその消去作用が期待される。他方、非セル型Hb(投与前3mM)では投与後に更に希釈されるため消去効果は期待できず、フェリルHbの活性が直接細胞に作用する可能性がある。

O/W型パーフルオロカーボンエマルジョンの 新規調製法の開発と体内動態制御

福島昭二¹、西尾琢也¹、岸本修一¹、竹内由和¹、
仲井邦彦²、佐久間一郎²、坂野上淳³、佐藤洋²、
北畠顕²

神戸学院大・薬・薬剤学¹、東北大学・医・環境保
健医学²、北海道大学・医・循環器内科学³

【目的】酸素運搬剤の候補として、ヘモグロビン修飾体とパーフルオロカーボン(PFC)エマルジョンが有力である。PFCエマルジョンは、世界的な規模で臨床試験が行われ、経皮的冠動脈拡張術での酸素補給液として一旦は製造許可を受けたが需要がなく製造中止されている。しかし米国を中心とし、その第2世代ともいえるPFCが、赤血球輸血代替にとどまらず、癌放射線治療、画像診断、臓器保存などの分野で臨床試験に応用されている。これらの製剤製造には高圧乳化機が使用されているが、様々な問題点が指摘されており、我々は、新規な機構に基づく乳化機の開発と、これを利用した種々のエマルジョン製剤の調製を検討してきた。今回、この新規乳化機を用い、PFCエマルジョン製造の問題点の解決を行うとともに、体内動態の制御を目的とした製剤改良を試みたので報告する。

【実験】PFCとしてパーフルオロトリブチルアミンおよびパーフルオロデカリンを用いた。乳化剤として精製卵黄レシチンを用い、さらに体内動態制御を目的としてPEG修飾したリン脂質を用いた。まずレシチン分散液とPFCをデュアルフィード法(圧力20000psi)で粗乳化した。この粗乳化液をさらに種々な条件でリバース法にて本乳化した。粒子径を動的光散乱法で測定し、その他の物理化学的性質と合わせ製剤の特徴を解析した。体内動態はラットを用い、PFCエマルジョン投与後、経時的に採血し、血中PFC濃度をガスクロマトグラフィーで測定した。

【結果】デュアルフィード法と反転法の組み合わせにより、現時点でPFC90%(W/V)のエマルジョンの調製が可能であった。粒子径は、レシチン濃度・PFC濃度・圧力・パス回数を調節することで、約600 nmから100 nm以下の範囲で制御することができた(1.2%レシチン-60%PFC-40000psi-5パスで約180 nm)。本乳化後のPFCエマルジョンの粒子径は、4℃から37℃の保存条件で変化しなかった。PFC高濃度においても、レシチン濃度を低くすることで低粘度のエマルジョンが調製可能であった。ラットでのPFCエマルジョンの体内動態は、粒子径や使用したリン脂質により影響を受けた。今後ともPFC製剤の改良を行い次世代型PFCの開発を目指したい。

Acknowledgment

第6回日本血液代替物学会の開催に際し、協賛及び賛助して下さった企業のお名前は下記の通りです。

この場を借りて厚く御礼申し上げます。

大会長 池田 康夫

旭化成工業株式会社
エーザイ株式会社
小野薬品工業株式会社
大塚製薬株式会社
科研製薬株式会社
麒麟麦酒株式会社
協和発酵工業株式会社
クノールジャパン株式会社
興和株式会社
三共株式会社
塩野義製薬株式会社
住友製薬株式会社
大正製薬工業株式会社
田辺製薬工業株式会社
第一製薬株式会社
中外製薬工業株式会社
帝人株式会社
テルモ株式会社
東京田辺製薬株式会社
東レ株式会社
日本たばこ産業株式会社
日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社
ノバルティスファーマ株式会社
バイエル薬品株式会社
バクスター株式会社
萬有製薬株式会社
ファルマシア・アップジョン株式会社
藤沢薬品工業株式会社
持田製薬株式会社
山之内製薬株式会社
吉富製薬株式会社

(以上, 50音順)

非溶血性輸血副作用と血液製剤の保存による生理活性物質の産生

Nonhemolytic transfusion reactions and generation of bioactive substances in blood products during storage

藤原満博、若本志乃舞、池淵研二、池田久實

Mitsuhiro Fujihara, Shinobu Wakamoto, Kenji Ikebuchi, Hisami Ikeda

抄録

赤十字血液センターに報告された輸血副作用においては、非溶血性副作用が最も多い。その内訳として蕁麻疹等、発熱反応が約2/3、アナフィラキシー（様）反応、アナフィラキシー（様）ショック、血圧低下、呼吸困難などの重症例が1/3を占めている。その原因製剤としては、濃厚血小板製剤(PC)が約50%を占めている。近年、混入白血球や血小板由来の炎症性サイトカインやケモカイン、およびヒスタミン、セロトニンなどの生理活性アミンやリピッド、さらに血漿中の補体成分などの生理活性物質が、血液製剤の保存中に産生・増加することが明らかとなり、非溶血性副作用の原因の一つとしての可能性が示唆されている。本稿では、これらの最近の知見を中心に概説し、わが国の血液製剤での各種生理活性物質の測定の結果を紹介する。

Abstract

The nonhemolytic transfusion reaction was the most common in transfusion-related side effects reported to Red Cross Blood Centers in Japan in 1997. Of the all nonhemolytic transfusion reactions, the mild reactions such as urticaria and fever were two third and the rest were the severe ones such as anaphylaxis (like-) reaction, anaphylaxis (like-) shock, hypotension, and dyspnea. Recent studies have shown that several bioactive substances (inflammatory cytokines, chemokines, histamine, serotonin, bioactive lipids, and complement fragments) increased and accumulated in the blood products during the storage period. Some of them were considered to be derived from residual leukocytes and platelets. These substances were consequently suspected to be the causes of the nonhemolytic transfusion reaction. In this article, we give an overview of the current state of this topics, and show some results of our study regarding bioactive substances in the blood products.

Keywords

nonhemolytic transfusion reactions, blood product, storage, bioactive substances

1. はじめに

日本赤十字社中央血液センターに報告された輸血副作用情報の集計結果では、輸血副作用、合併症報告件数は年々増加し、1997年の1年間においては、870件の報告があり、その76%が非溶血性副作用である。非溶血性副作用のなかでは、蕁麻疹等が最も多く、さらに発熱反応が22%を占め、アナフィラキシー（様）反応、アナフィラキシー（様）ショック、血圧低下、及び呼吸困難の重症例が全体の約3分の1である。非溶血性副作用の報告件数を製剤別でみた場合、濃厚血小板製剤（PC）が

48.6%を占め、他の製剤に比べ多い。また赤血球製剤は、29%である（図1）。

近年、死にいたることは稀であるものの頻度の高いこうした非溶血性輸血副作用の原因として、血液製剤中の生理活性物質が注目されている。その生理活性物質としては、製剤中に混入する白血球が産生・放出する炎症性サイトカイン、同じく混入白血球から産生されるケモカイン、また血小板そのものに貯蔵されていて、保存による血小板の活性化に伴って血漿中レベル

総報告件数 870件

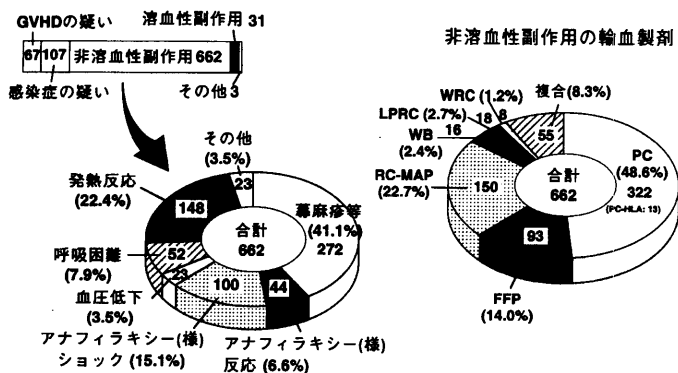


図1 血液センターに報告された輸血副作用 (PC: 濃厚血小板「日赤」、FFP: 新鮮凍結血漿「日赤」、RC-MAP: 赤血球MAP「日赤」、WB: 人全血CPD「日赤」、LPRC: 白血球除去赤血球「日赤」、WRC: 洗浄赤血球「日赤」) 日本赤十字社中央血液センター (1997年データ)

が増加するRANTES, platelet factor-4 (PF-4), β -thromboglobulin (β -TG) 及びTransforming growth factor- β (TGF- β), さらに補体成分であるC3aやC5aなどのアナフィラトキシン, ヒスタミンやセロトニンなどの生理活性アミン, 血小板活性化因子(PAF), リゾフォスファチジルコリン誘導体などのリピッドがあげられる。これらの多くは, 血液製剤の保存の間に一定レベル以上になり, それが患者の体内に輸血とともに入ることによって副作用を惹起するのではないかと考えられている。

我々は, これまでわが国のアフエーシス由来血小板濃厚液においてこれらサイトカインやケモカインの保存によるレベルの変化について検討してきた。本稿では得られた知見を中心として, 血液製剤中の生理活性物質と輸血副作用との関連及び予防について考察する。

2. 混入白血球由来の生理活性物質

2-1. 炎症性サイトカイン、ケモカイン

血小板濃厚液(PC)は室温 (20~24℃) で振盪保存されるが, その期間は保存された血小板の機能及び細菌汚染のリスクの観点から, わが国では3日間, 欧米では5日間とされている。PCの保存期間と輸血副作用の解析の結果, 保存期間と輸血副作用の発生頻度および重篤度には関連があり, 保存3日目以降の製剤において副作用の頻度が高いことが報告された。そのため保存によって産生増加する活性物質に輸血副作用が起因する可能性が考えられ, その一つとして炎症性サイトカインが着目された。インターロイキン(IL)-1, IL-6, 腫瘍壊死因子- α (TNF- α)はいずれも炎症反応のキーマediatorであり, また互いの相乗作用も知られている。IL-1とTNF- α は, 中枢でのプロスタグランジン合成を促し, そのプロスタグランジンは温度セットポイントを上昇させることで発熱を誘起する。Muyllera¹⁾は, 全血由来の血小板製剤において, IL-1, IL-6, TNF- α が保存日数と製剤中に混入する白血球数に依存して産生増加し, そのレベルは

臨床症状を呈するとされるレベルであることを見出した。またStackら²⁾は直接的な発熱作用はないものの, 好中球走化作用を持つIL-8が高値になることを報告した。

血小板製剤の保存によって産生するサイトカインが, 発熱などの非溶血性輸血副作用に関与することは, Muyllera^{1,3)}やHeddleら⁴⁾の臨床研究によって強く示唆されている。Muyllera¹⁾はベッドサイドで混入白血球数を減らしたPCを輸血された45人の患者を解析した結果, 6人の患者に発熱反応を伴った輸血副作用がみられ, それらの患者に輸血されたPC中のTNF- α , IL-1 β , IL-6の濃度は, 輸血副作用のみられなかった患者に輸血されたPCよりもいずれも有意に高値であったと報告している (表1)。

表1 発熱反応を伴った輸血副作用のみられたPCとみられなかったPCのサイトカイン濃度 (pg/mL) の比較

	輸血副作用	
	無 (39)	有 (6)
TNF- α	29 $\pm$ 22	122 $\pm$ 59**
IL- β	215 $\pm$ 265	437 $\pm$ 155*
IL-6	218 $\pm$ 263	1272 $\pm$ 723**

*p<0.01, **p<0.001

文献1より引用

さらにMuyllera³⁾は混入白血球数の多いPlatelet-rich Plasma PC (PRP-PC)と混入白血球数の少ないBuffy coat 法で調整したPC (BC-PC)の輸血による非溶血性副作用の頻度を解析した結果を報告している。PRP-PCでは398回の輸血で37回 (9.3%), BC-PCでは186回の輸血で5回 (2.7%)の副作用がみられた。白血球数はPRP-PCでは 1.43×10^6 個, BC-PCでは 0.15×10^6 個であり, IL-6レベルはPRP-PCが 79 ± 240 pg/mLに対し, BC-PCでは 1 ± 7 pg/mLであった。即ち輸血副作用の頻度の減少と混入白血球数の減少そしてIL-6レベルの減少との間に相関がみられている。さらにHeddleら⁴⁾は血小板濃厚液を遠心により血漿成分と細胞成分にわけ, それぞれを患者に2時間置きに輸血し, 副作用の発生との関連を調べた。その結果, 血漿成分と副作用の発生頻度に相関をみだし, さらに血漿成分中のIL-1 β 7.4 pg/mL, IL-6 60.0 pg/mL (中央値)では悪寒, 不快感などの副作用はみられないのに対し, IL-1 β 18.9 pg/mL, IL-6 214.0 pg/mLでは副作用を観察した (図2)。このような欧米でのサイトカイン産生の報告は, 混入白血球数の多いPRP-PCを用いたものである。わが国では血小板製剤の大半がアフエーシス製剤であるので, 我々はアフエーシス製剤保存でのサイトカイン産生の検討をおこなってきた⁵⁾。対象はMobile Collection System (MCS) およびオートフェーシスCIIで採取した15例のPCで, 混入白血球は $2.6 \pm 0.7 \times 10^6$ 個/mLであった。図3に示すように, 製剤毎におおきなバラツキがあるが, 保存とともにIL-8レベルの増加がみられた。またIL-8レベルと混入白血球数には有意な正の相関がみ

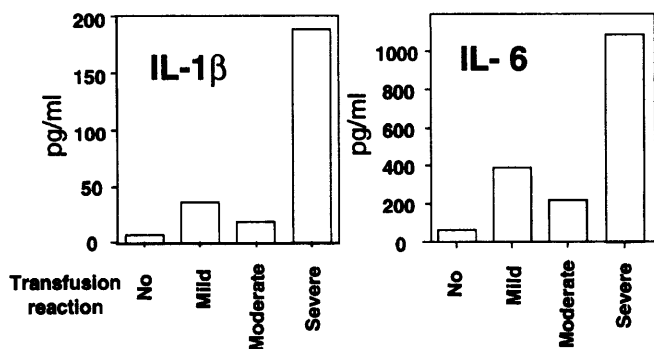


図2 非溶血性輸血副作用の重篤度とPC血漿中のIL-1 β とIL-6レベルの関連 文献4より引用

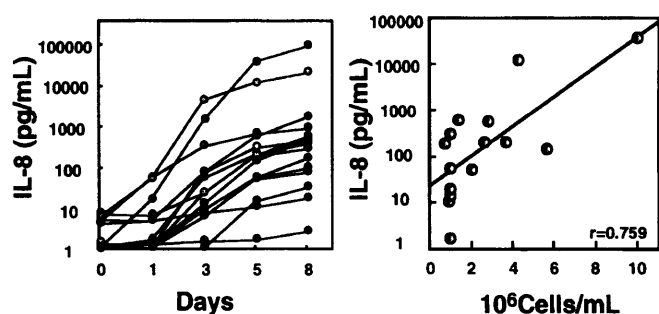


図3 保存アフエーシスPCのIL-8レベル

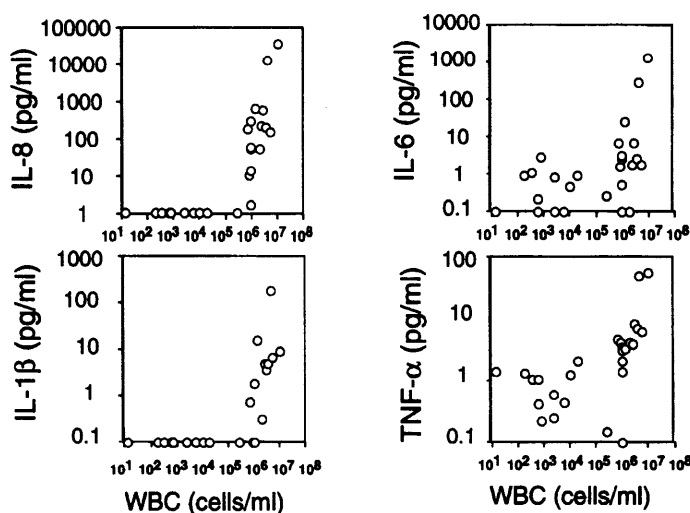


図4 保存3日目のサイトカインレベルと混入白血球数の関連

られることから、保存期間と混入白血球数がIL-8産生の大きな要因であると考えられる。IL-6, IL-1 β , TNF- α も、いずれも保存による産生増加がみられたが、そのレベルは欧米のPRP-PCで報告されている値に比べれば極く僅かであった。

サイトカイン産生が混入白血球に相関することは明らかであるが、サイトカイン産生がみられるのは製剤中にどれだけの混入白血球がある場合であろうか？ わが国のアフエーシスPC中のサイトカインレベルを混入白血球数に対しプロットしてみると、保存3日では約 1×10^6 個/mL、即ちバッグあたり約 2×10^8 個以上になると炎症性サイトカインの産生が検出できるようになる (図4)。アフエーシス機器の改良によってわが国のアフエーシス製剤中の混入白血球数は著しく減少しているの⁹⁾、上記のような副作用に関連するサイトカインレベルになることは現在のアフエーシス由来PCではほとんどありえないと考えられる。1997年以降、輸血副作用のみられた患者に輸血された製剤のIL-1 β , IL-6について10件の検討をおこなったが、いずれの検体においても、それぞれのサイトカインが発熱やアレルギー反応に関連するレベルではなく、輸血副作用への関与は少ないと考えられた。今後の課題としては、炎症性サイトカインの相乗効果による輸血副作用の可能性を検討する必要がある。

2-2. ヒスタミン

ヒスタミンは、即過敏反応の主な伝達物質の一つである。肥満細胞、好塩基球の顆粒に豊富に貯蔵され、アレルゲンまたは抗IgEの刺激を受けたとき、これらの細胞から活発に放出される。血中濃度が1 ng/mLを超えると紅潮などの症状が発現するとされている⁷⁾。また3年間にわたる359例の輸血副作用報告の解析では、発疹、紅潮、喘息などのアナフィラキシー様反応を呈した患者の血漿ヒスタミンレベルは、平均値1 ng/mLであったのに対し、発熱反応のみ、あるいは輸血副作用のみられなかった群では0.5 ng/mL以下と報告されている⁸⁾。こうした輸血後のアレルギー反応やアナフィラキシー反応との関連から、血液製剤中のヒスタミン量が測定されている。Muylléら⁹⁾は、全血由来血小板 (製剤あたり 10^8 レベルの混入白血球数) の保存により、上清遊離ヒスタミンレベルの増大が起こり、5日間の保存では最高22 ng/mLに達することを報告し、このレベルのヒスタミンを含む製剤が輸血された場合には、上記の値を超える場合もあることを示唆している。また、上清遊離ヒスタミンレベルの増加は、混入白血球数に相関すること、さらに炎症性サイトカインとは異なり保存中の合成はなく、あくまで顆粒球からの放出であることも明らかとしている¹⁰⁾。一方、柴ら¹¹⁾は、わが国のランダムPC2単位 (40 mL) 中の上清遊離ヒスタミンレベルを測定しているが、5日間の保存においても1.7 ng/mL以下であったと報告している。わが国では現在アフエーシスPCがほとんどであるが、ヒスタミンレベルが1.7 ng/mLのPC 200 mLが血漿量3Lの患者に輸血された場合、患者では0.11 ng/mLとなり、Indら⁸⁾が示したアナフィラキシー様反応を呈するレベル以下と考えられる。

2-3. 混入白血球由来の生理活性物質による輸血副作用の予防対策

混入白血球由来の生理活性物質による副作用を予防するためには、ベッドサイドで白血球除去するのではなく、採血直後、

すなわち保存前に生理活性物質の産生あるいは放出のもととなる白血球を除去することが必要である。PCからのフィルターによる白血球除去は高性能フィルター（第3世代）では、残存量を 10^3 個レベルにすることが可能である。こうした保存前フィルトレーションによりサイトカイン産生の予防が可能であることが、我々の結果（図5）を含め、多くの施設から報告されて

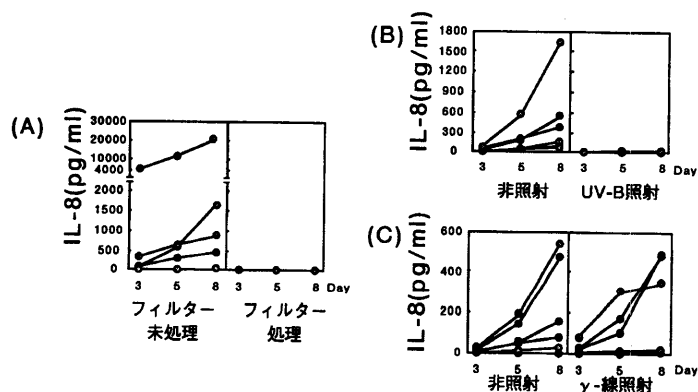


図5 保存前フィルトレーション、UV-Bおよび γ -線照射によるIL-8産生の影響

いる^{4,5,12)}。現在アフエーシス由来の血小板ではフィルターを用いなくても 10^3 個以下にすることが可能となっている⁹⁾。またこれ以上の混入白血球があっても血小板採取過程にフィルターを組み込むことによって採取すれば、 4×10^5 個レベルにすることができる¹³⁾。このように調整した製剤を5日間保存しても、IL-8を始めIL-1 β 、IL-6、TNF- α レベルの上昇は全く認められなかった¹³⁾。

同種抗原感作の予防に対し中波長紫外線（UV-B）照射の応用が検討され、またGVHD予防にはガンマ線照射が既におこなわれている。このような方法による白血球の不活化によって、混入白血球からのサイトカイン産生が予防できるかについて検討した⁹⁾。図5に示すように、保存前にUV-B照射（20,000 J/m²）した製剤では、IL-8レベルの上昇が抑制されるのに対し、30Gyのガンマ線照射では、ほとんど抑制効果がみられなかった。予備的検討では、UV-B照射を施したPCの血小板機能に関し、ADPとコラーゲンによる凝集反応さらに低浸透圧ストレス回復率は、照射3日保存のものでも、未照射のものに比べ90%は維持されていたことから、輸血副作用の予防に対し保存前UV-B照射の有効性が期待される。

3. 血小板由来サイトカインの生理活性物質

3-1. サイトカイン、ケモカイン

混入白血球由来の輸血副作用を予防するために、白血球除去の努力がなされているが、混入白血球の少ない製剤においても依然と輸血副作用がみられることから、白血球以外の要因も検討されてきた。最近、RANTES、 β -TG、PF-4などのケモカインや、TGF- β などのサイトカインが血小板から放出され保存と

もに増加することが報告された^{14,15)}。RANTESは好酸球や好塩基球の走化作用・活性化作用を有し、TGF- β は免疫担当細胞や造血系細胞に対しきわめて多機能作用を示すことから、これらのサイトカインの保存製剤中での蓄積は非溶血性輸血副作用の一つの要因となりうる可能性が考えられている。

アフエーシス製剤でのRANTES、TGF- β レベルの変動をみた我々の結果を図6に示す^{16,17)}。採血後には約27 ng/mLであった

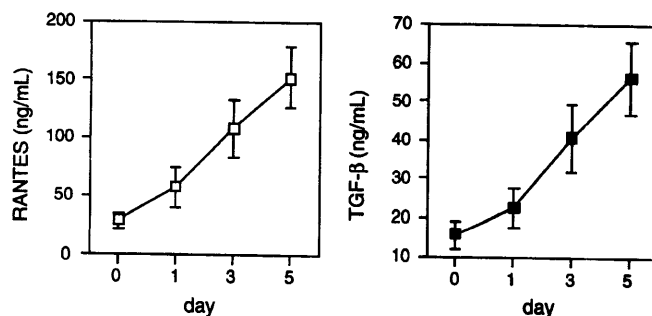


図6 保存によるアフエーシスPC中のRANTES及びTGF- β レベルの変化

RANTESレベルは保存とともに増加し、3日目では100 ng/mL、5日目では約150 ng/mLであった。TGF- β も17.5 ng/mLから保存5日目で56 ng/mLと増加した。保存5日目のRANTESおよびTGF- β レベルと、血小板数および混入白血球数との相関をみると、RANTESレベルおよびTGF- β レベルと血小板数には相関がみられるのに対し、これらのサイトカインレベルと混入白血球数には相関はみられなかった。従って、混入白血球から産生されるサイトカインがトリガーになって、血小板からRANTESあるいはTGF- β が放出される可能性は少ないと思われる。

3日あるいは5日保存のアフエーシスPCでは100-150 ng/mLのRANTESが検出されたが、これは臨床上有意味のあるレベルであろうか？ RANTESレベルが100-150 ng/mLのPC 200 mLが60~70 kgの患者に輸血されたと仮定すると、患者血中濃度は約1 nMと計算できる。RANTESによる好塩基球からのヒスタミンの放出をin vitroの系でみたKunaら¹⁸⁾の報告では、この濃度で約15%のヒスタミン放出がおこることから、アレルギー反応などの臨床症状を誘起する可能性が十分に考えられる。一方、Bischoffら¹⁹⁾、Hartmannら²⁰⁾の報告では100nMでかろうじて好塩基球からのヒスタミン放出能がみられている。保存中に蓄積したRANTESの生物活性があるかどうか、また他のサイトカインや活性物質などの相乗効果の有無について今後の検討が必要と思われる。従って我々がPC保存3~5日目に検出したRANTESレベルでアレルギー反応等の副作用が生ずるかどうかについては今のところ不明である。

3-2. セロトニン

セロトニンは、ADPやATPとともに血小板の濃染顆粒に濃縮貯蔵されており、血管収縮作用、血管透過性亢進、血管壁への

16. 若本志乃舞, 藤原満博, 池淵研二, 関口定美. アフェレーシスPC保存におけるRANTESおよびTGF- β レベル. 血液事業 1998;21:199-205.
17. Fujihara M, Ikebuchi K, Wakamoto S, Sekiguchi S. Effects of filtration and gamma radiation on the accumulation of RANTES and TGF- β 1 in apheresis platelet concentrates during storage. Transfusion 1999;39:498-505.
18. Kuna P, Reddigari SR, Schall TJ, Rucinski D, Viksman MY, Kaplan AP. RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophils. J Immunol 1992;149:636-42.
19. Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Rot A, von Tscharner V, Baggiolini M, Dahinden CA. RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. Eur J Immunol 1993;23:761-7.
20. Hartmann K, Beiglbock F, Czarenetzki BM, Zuberbier T. Effect of CC chemokines on mediator release from human skin mast cells and basophils. Int Arch Allergy Immunol 1995;108:224-30.
21. Palmer DS, Aye MT, Dumont L, Dumont D, McCombie N, Giulivi A, Rutherford B, Trudel E, Hashemi-Tavoularis S. Prevention of cytokine accumulation in platelets obtained with the COBE Spectra apheresis system. Vox Sang 1998;75:115-23.
22. De Clerk, F. Effects of serotonin on platelets and blood vessels. J Cardiovasc Pharmacol 1991;17(suppl 5):S1-S5.
23. Shimizu T, Kato K. Sequestration of serotonin in stored platelets. Transfusion 1986;26:274-7.
24. Cubeddu LX, Hoffman IS, Fuenmayor NT, Malove JJ. Changes in serotonin metabolism in cancer patients: its relationship to nausea and vomiting induced by chemotherapeutic drugs. Br J Cancer 1992;66:198-203.
25. Clarke G, Podlosky L, Petrie L, Boshkov L. Severe respiratory reactions to random donor platelets: an incidence and nested case-control study. Blood 1994;84:465a.
26. Silliman CC, Dickey WO, Paterson AJ, Thurman GW, Clay KL, Johnson CA, Ambruso DR. Analysis of the priming activity of lipids generated during routine storage of platelet concentrates. Transfusion 1996;36:133-9.
27. Silliman CC, Thurman GW, Ambruso DR. Stored blood components contain agents that prime the neutrophil NADPH oxidase through the platelet-activating-factor receptor. Vox Sang 1992;63:133-6.
28. Silliman CC, Voelkel NF, Allard JD, Elzi DJ, Tuder RM, Johnson JL, Ambruso DR. Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model. J Clin Invest 1998;101:1458-67.
29. Shimizu T, Uchigiri C, Mizuno S, Kamiya T, Kokubo Y. Adsorption of anaphylatoxins and platelet-specific proteins by filtration of platelet concentrates with a polyester leukocyte reduction filter. Vox Sang 1994;66:161-5.
30. Snyder EL, Mechqanic S, Baril L, Davenport R. Removal of soluble biologic response modifiers (complement and chemokines) by a bedside white cell-reduction filter. Transfusion 1996;36:707-13.
31. Geiger TL, Perrotta PL, Davenport R, Baril L, Snyder EL. Removal of anaphylatoxins C3a and C5a and chemokines interleukin 8 and RANTES by polyester white cell-reduction and plasma filters. Transfusion 1997;37:1156-62.
32. Stack G, Baril L, Napychank P, Snyder EL. Cytokine generation in stored, white cell-reduced, and bacterially contaminated units of red cells. Transfusion 1995;35:199-203.
33. Nielsen HJ, Reimert CM, Pedersen AN, Br  nner N, Edvardsen L, Dybkjoer E, Skov PS. Time-dependent, spontaneous release of leukocyte and platelet derived bioactive substances from stored human blood. Transfusion 1996;36:960-5.
34. Weller PF. The immunobiology of eosinophils. N Engl J Med 1991;324:1110-8.
35. Schleuning M, Bock M, Mempel W. Complement activation during storage of single-donor platelet concentrates. Vox Sang 1994; 67:144-8.
36. Schleuning M, Schmid-Hasbeck M, Utz H, Jochum M, Heim M, Mempel W, Wilmanns W. Complement activation during storage of blood under normal blood bank conditions. Effects of proteinase inhibitors and leukocyte depletion. Blood 1992;79:3071-5.
37. Charriant C, Senik A, Kalb JP, Frade R. Inhibition of in vitro natural killer activity by the third component of complement: role for the C3a fragment. Proc Natl Acad Sci USA 1982;79:6003-7.
38. Polley MJ, Nachman RL. Human platelet activation by C3a and C3a des-arg. J Exp Med 1983;158:603-15.
39. Haeffer-Cavaillon N, Cavaillon J-M, Laude M, Kazatchkine MD. C3a(C3adesArg) induces production and release of interleukin 1 by cultured human monocytes. J Immunol 1987;139:794-9.
40. 柴 雅之, 田所憲治, 徳永勝士, 十字猛夫. 濃厚赤血球製剤の保存におけるヒスタミン遊離および補体の活性化. 日本輸血学会雑誌 1994;40:711-5.

—ヒト エリスロポエチン製剤—

エスポー[®] 皮下用

6000・9000・12000・24000

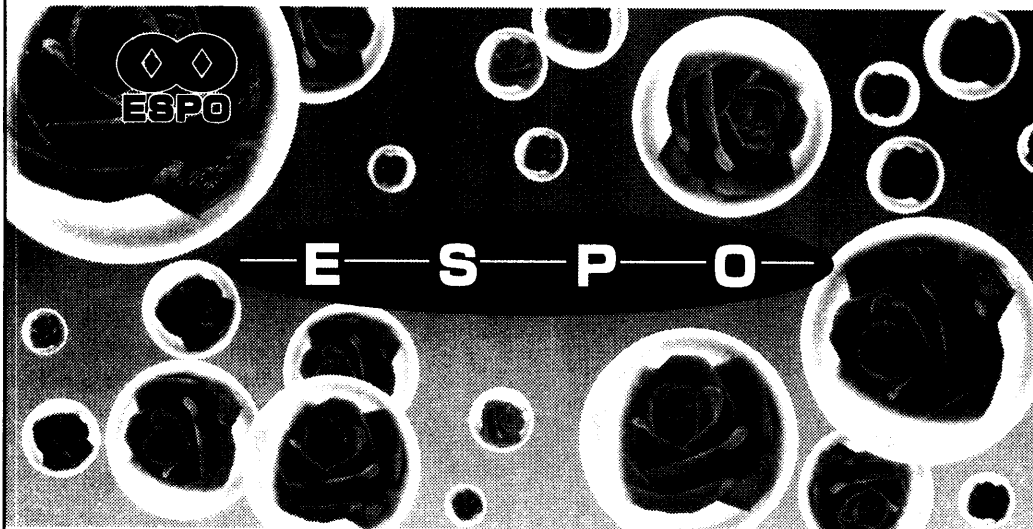
一般名: エポエチンアルファ (遺伝子組換え) ●薬価基準収載●創薬●指定医薬品●要指示医薬品 (注意—医師等の処方せん・指示により使用すること)

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
〒104-8288 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
〒100-8426 東京都中央区日本橋本町二丁目二五

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。

98 9 (総)

●編集後記●

1996年から編集委員に加えていただき、今回、編集委員長の大役を小林紘一会长より仰せつかりました。初代仲井邦彦先生、2代目池淵研二先生の後を継がせていただきますが、微力ながら、本誌の充実のために尽くしたいと思います。よろしくお願いいたします。事務局が早稲田大学理工学部から慶應義塾大学医学部呼吸器外科

に移動しました。編集委員にも若干の異動がある予定です。昨今のインターネット利用者の急増は目を見張るものがありますが、編集委員の先生方もメールアドレスをお持ちなので、メーリングリスト上での編集会議を試験的に運用開始しました。

(宮尾秀樹)

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。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。

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

はIndex Medicus に準拠する。単行本の場合は全著者名、題名、編集者名、書名、発行地: 発行書店、年号; 頁~頁。の順とする。

1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
2. 砂本順三, 岩本 清. リボソームの調製. 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、あらかじめ著作権所有者の許可を得ること。また、掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

掲載料は無料とし、論説、総説、原著、報告等については別刷り30部を贈呈する。それを超える分についての費用は著者の負担とする(およそ1部100円)。カラー写真掲載・アート紙希望などの場合は、著者の実費負担とする。

編集委員会

●宮尾秀樹(委員長), 池淵研二, 武岡真司, 友田燐夫, 西出宏之, 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 (3) 1999年8月20日発行

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL (03)5363-3806 FAX (03)5363-3493

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL (03)5363-3806 FAX (03)5363-3493

〒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