

人工血液

第7巻 第4号 1999年12月

目次

総説	ヘモグロビン溶液のウイルス除去/不活化	平山順一	95
	赤血球膜を三重層として捉える：膜骨格が維持する		
	赤血球の形態、変形能、膜安定性	高桑雄一	99
原著	ポリオキシエチレン修飾と脱酸素化による酸素輸液 (ヘモグロビン小胞体)の長期保存	酒井宏水	105
学会報告	第6回日本血液代替物学会年次大会 シンポジウム“人工酸素運搬体—臨床応用に向けて” における発表と討論内容	池淵研二	111
	「酸素治療および赤血球代替物の安全性ならびに 有効性評価基準に関するワークショップ」に参加して	仲井邦彦	112
海外文献紹介	Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits	村田 満	117
事務局たより			119

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 7 No. 4 December, 1999

Contents

Review:	Removal or inactivation of viruses in hemoglobin solution	Junichi Hirayama	95
	Erythrocyte membrane trilayer: Membrane skeleton and its maintaining erythrocyte shape, deformability and membrane stability	Yuichi Takakuwa	99
Original Article:	Long-Term Preservation of Oxygen Infusion (Hemoglobin- Vesicles) Achieved by Poly(oxyethylene)-Conjugation and Deoxygenation.	Hiromi Sakai	105
Report:	Summary of the Symposium—The Sixth Annual Meeting of the Society of Blood Substitutes, Japan	Kenji Ikebuchi	111
	Workshop on Criteria for Safety and Efficacy Evaluation of Oxygen Therapeutics as Red Cell Substitutes ...	Kunihiko Nakai	112
Topics:	Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits	Mitsuru Murata	117

会告

第7回日本血液代替物学会年次大会

会 期： 平成12年9月7日（木），8日（金）

会 場： かでる27

〒060-0002

北海道札幌市中央区北2条西7丁目

会 長： 北畠 顕 （北海道大学医学部循環病態内科学）

事務局： 北海道大学医学部循環病態内科学 佐久間一郎

〒060-8638

北海道札幌市北区北15条西7丁目

Tel: 011-716-1161（内）697

011-717-1132（直通）

Fax: 011-706-7874

E-mail: cvaspr@med.hokudai.ac.jp

ヘモグロビン溶液のウイルス除去/不活化

Removal or inactivation of viruses in hemoglobin solution

平山順一, 阿部英樹, 池淵研二, 池田久實

Junichi Hirayama, Hideki Abe, Kenji Ikebuchi, Hisami Ikeda

和文抄録

人工酸素運搬体の原料として、ヒト赤血球由来のヘモグロビンが重要である。生物由来の材料にはウイルスの除去/不活化工程が必要である。本総説では数々のヘモグロビン溶液の除去/不活化法について、除去/不活化率やヘモグロビンへのダメージなどを中心に述べた。

Abstract:

Since hemoglobin derived from termed transfusion red cells is an important material for an artificial oxygen carrier, it should be kept free from any kind of viruses in any process of manufacture. We overview, in this article, not only some methods of removing or inactivation viruses in the hemoglobin solution but their harmful effects to the hemoglobin molecule in themselves.

Key words

Virus inactivation, Virus removal, Hemoglobin, Artificial oxygen carrier

1) はじめに

血液事業の最大の使命は、安全な血液を安定に供給する事である。そのためには、血液型に関係なく輸血でき、ウイルス等の病原体や白血球の混在がなく、長期間の保存が可能であれば理想的である。この要望に答えられるのは人工血液であり、現在まで多くの開発研究がなされてきた¹⁾。中でも、赤血球の機能である酸素運搬能を代替する人工酸素運搬体ないしは人工赤血球の開発が最も盛んであり、既に家畜用の人工酸素運搬体が市販されている。ヒト用の人工酸素運搬体の実用化も遠くないと期待される。現在、世界では10社以上の企業がさまざまな形の人工酸素運搬体を開発中であるが²⁾、そのうち半数以上の企業は、人工酸素運搬体の原料として、期限切れ赤血球製剤から抽出したヒトのヘモグロビンを利用している。生物由来の材料を用いる場合、ウイルス等の感染に注意が必要である。

赤血球製剤をはじめ、輸血によるウイルス感染を防ぐため、血液センターでは問診やスクリーニング検査を行っている。近年、分子生物学等の発展により、スクリーニング検査法は急激に進歩しており、輸血後肝炎等は激減したものの、ウイルス感染が皆無になった訳ではない³⁾。スクリーニング検査のほとんどは抗体検査であるので、ウイルス感染後、抗体が作られるまでの期間中、体内にウイルスが存在するにもかかわらず、検査で見つ

けることが困難である（ウイルス感染後、検査で見つけられるまでの空白期間をウインドウピリオドという）。1997年、わが国において初めて献血血液によるヒト免疫不全ウイルス（HIV）の感染が確認されたが⁴⁾、これはまさしくウインドウピリオドの血液による感染と考えられている。輸血により感染し得ることが知られているにもかかわらず、検査法が確立していない、もしくは導入されていない場合もある。未知のウイルスの存在の可能性もある。最近、PCR法を用いたウイルス検査（NAT検査）法が本邦でも導入された。確かに、ウインドウピリオドを短縮することが可能で、ウイルス感染の確率を減少させているが、根本的な解決には至っていない（感染確率ゼロではない）。いずれにしても、検査によるウイルス除去という戦略は、検査の対象になっていないウイルスには無効である。分画製剤（凝固因子製剤やアルブミン製剤など）ではスクリーニング検査後の血液を原料にしているにもかかわらず、積極的にウイルスの除去/不活化が行われており、エンベロープウイルスに関しては高い安全性が確保されているが、血球製剤（赤血球製剤や血小板製剤）はスクリーニング検査のみである⁵⁾。従って、赤血球製剤由来のヘモグロビンを人工酸素運搬体の原料として利用する場合、ウイルスの不活化/除去の工程が必要とされる。より完成度の高い、ウイルスの不活化/除去のためには、機序の異なる複数の方法を

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

組み合わせる事が重要である。本総説では、ヘモグロビン溶液の不活化/除去法の開発の動向について紹介する。

2) 従来の方法

化学的処理法として、0.3% Tri (N-Butyl) Phosphate と0.2% Sodium Cholate を用いた例がある⁶⁾。これによると、1時間のインキュベーションで Pseudorabies Virus が $5\log_{10}$ 以上、3時間で水疱性口内炎ウイルス (VSV) が $5\log_{10}$ 以上、6時間で Sindbis virus が $6\log_{10}$ 以上不活化できた。これとは別に、20%エタノール処理により HIVを $5\log_{10}$ 以上不活化したという報告もある⁷⁾。

限外濾過法としては、孔径100kDのフィルターを用いて、Encephalomyocarditis virus, VSV, Sindbis virus を $3.3\log_{10}$ 以上不活化したという例がある⁶⁾。

熱処理法としては、60℃、30分のインキュベーションで Sindbis virus が $5\log_{10}$ 以上、Polio virus が $6\log_{10}$ 以上不活化できたという報告がある⁸⁾。この不活化処理によるヘモグロビンの酸素結合能には変化がなかったとしているが、熱処理に関してはメト化率が増大するという報告が多い。あらかじめヘムにCOを結合させておくと熱処理をしてもメト化されないという報告もある⁹⁾。化学修飾後のヘモグロビンを熱処理した例もある¹⁰⁾。それによると、ジアスピリンで架橋したヘモグロビン (DCLHbTM) の熱処理 (74℃で90分間) により、HIVを $7.9\log_{10}$ 以上、A型肝炎ウイルスを $7.2\log_{10}$ 以上、ブタパルボウイルスを $7.9\log_{10}$ 、不活化した。ノンエンベロープウイルスであるA型肝炎ウイルスやブタパルボウイルスを不活化できた点が注目値する。

3) 超短時間熱処理法

熱処理法に関しては、最近興味深い報告があった¹¹⁾。特殊な装置を用いたマイクロウェーブ照射により、ミリ秒オーダーの加熱を行い、ウイルスを不活化する方法である。熱に対する反応速度の違いを利用し、ヘモグロビンよりも熱耐性の低いウイルスを、ヘモグロビンが変性する前にすばやく不活化してしまう、という原理に基づいている。既にヒト血漿中HIVを血漿タンパクの変性なしに不活化できることが報告されているが¹²⁾、これをSFHに応用したものである。約90℃の加熱により、メト化率の増大は1.5%程度であった。分光学的分析、等電点電気泳動パターンに変化は見られなかった。

4) BMMによるウイルス除去

旭化成が開発したウイルス除去フィルターBMM (Bemberg Microporous Membrane, 商品名 プラノバ) を用いた報告がある。BMMは銅アンモニア法で再生したセルロースを素材とする中空糸膜からなる。平均孔径が数10ナノメートルのBMMを用いると、HIVが $6\log_{10}$ 以上¹³⁾、40ナノメートルのBMMの場合は、HBVを $8\log_{10}$ 以上¹⁴⁾除去できた。平均孔径15ナノメートルのBMMだと、最小のウイルスであるパルボウイルスB19 (粒子の大きさは約20nm) を $6\log_{10}$ 以上除去できた¹⁵⁾。この時、ヘモグロビンの回収率は約70%であり、ヘモグロビンのメト化の亢進は見られなかった。パルボウイルスなどエンベロープを

持たないウイルスは熱処理や化学処理に強力な耐性があるため、フィルターでの除去が最良の方法であろう。なお蛇足ではあるが、パルボウイルスを不活化できることが実験的に証明されている唯一の方法は、今のところ短波長の紫外線 (UVC, 240-280nm) のみである¹⁶⁻¹⁷⁾。

5) 光増感作用によるウイルス不活化

光増感作用によるウイルス不活化は、今まで、血液製剤を対象に数多くの研究がされてきた¹⁸⁻²¹⁾。ヨーロッパの一部の国では血漿製剤を対象にメチレンブルーによるウイルス不活化がすでに実用化されている⁵⁾。血球製剤 (赤血球製剤や血小板製剤) は従来の方法すなわち熱処理や化学処理では血球自体への傷害が大きくて使えないため、特に血球製剤への応用が期待されている。光エネルギーを吸収した光増感物質は活性酸素を放出し、活性酸素がウイルスの核酸等を傷害し、ウイルスを不活化する。核酸への指向性が高い程、ウイルスへの傷害が特異的になる。血小板製剤に対して、ソラレンの誘導体であるS59が実用化に有望であり²¹⁾、すでに臨床試験第3相が進行中である⁵⁾。赤血球に対しては、長年にわたり、メチレンブルーやフタロシアニン誘導体など数々の光増感物質を用いて多くの実験がされたが¹⁸⁻²²⁾、いずれも赤血球への傷害が無視できず、抗酸化物質の共存なしには実現が困難であった。最近になりようやく、いくつかの有望な光増感物質もしくは化合物が現れた²²⁾。その一つがメチレンブルーの誘導体であるジメチルメチレンブルー (DMMB) である。DMMBはメチレンブルーの1位と9位にそれぞれ1つずつメチル基を付加させたもので (図1)、これによりDNAとの結合がメチレンブルーにくらべ約10倍強くなった (核酸指向性が高まった)²³⁾。ヘマトクリット30%の赤血球にDMMB4 μ M存在

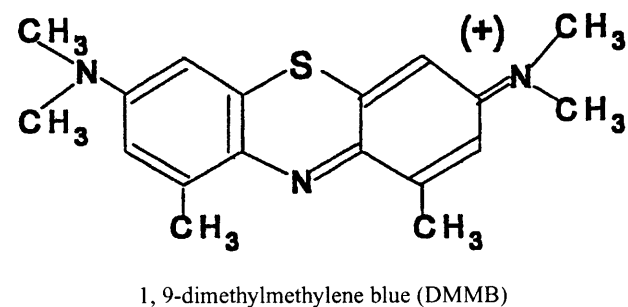
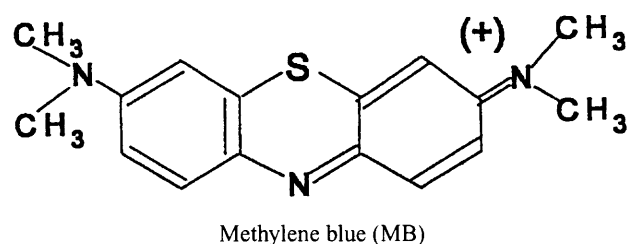


図1. MBおよびDMMBの化学構造

下で赤色光を照射すると、溶血やカリウム漏出など赤血球の機能にほとんど影響を与えることなく、VSVなど数種のウイルスを不活化することができた²⁴⁾。そこでわれわれはこのDMMBを用いてヘモグロビン溶液のウイルス光不活化を試みた²⁵⁾ (表1)。

2倍容の冷水で調製した溶血液を、従来の方法によってストローマフリーのヘモグロビン溶液にした。液圧1ミリで赤色光(660nm)照射を行ったところ、VSVを容易に不活化し、 $6.43\log_{10}$ 不活化する条件ではメト化率の亢進はわずか0.1%であり、 P_{50} に有意な差はなかった。これに対し、メチレンブルーで同様の実験を行うと、VSVを $5.61\log_{10}$ 不活化する条件では、メト化率は3.22%有意に亢進し、 P_{50} も有意に低下した。以上の結果は、DMMBによる光不活化処理はヘモグロビン溶液に傷害を与えずにウイルスを不活化できる方法であることを示唆している。DMMBの毒性については未だ不明であるが、毒性があろうがなかろうが、実用化に際しては除去という方向で考えるべきであり、既にその実現を予感させる予備的データを得ている。人工酸素運搬体の製造工程中にウイルスが混入する可能性がないわけではない。DMMBは核酸指向性が強いので、ヘモグロビンだけでなく人工酸素運搬体への傷害も少ないと期待される。従って、製造工程の最終段階に導入できる可能性がある。もしそうなら、その点がDMMBによるウイルス不活化法のメリットの一つであると言える。

6) おわりに

ヒトヘモグロビンのウイルス除去/不活化について述べてきた。ここで述べた方法は、ウシヘモグロビンのウイルス除去/不活化にも利用できるであろう。さまざまな形の人工酸素運搬体が存在するように、除去/不活化法もさまざまなものである。それぞれにメリットとデメリットがあり、どれが最高と断言するのは困難である。最初にも述べたように、ウイルス感染に関し、より高い安全性を確保するには、複数の機序の異なる方法を組み合わせることが重要である。そういった観点からすると選択肢は多いほうが良いので、それぞれの方法の完成度を高めていくと同時に、新たな除去/不活化法の開発を考慮に入れるのが望ましい。人工酸素運搬体の原料に、期限切れ赤血球製剤由来ヘモグロビンを利用するのは、開発の目的に矛盾しているのではないかという意見も(学会での質疑応答で)時々聞くが、ウイルス感染の確率がゼロなら矛盾はない。コストの面から、また、廃棄の運命にある献血血液の有効利用という観点からも、人工酸

表1 光不活性化処理によるVSV不活性化とヘモグロビンへの効果

Dye (μ M)	Irradiation (J/sq cm)	VSV inactivation (log 10)	Met-Hb (%)	P50 (mmHg)
MB				
1	0	0	1.27 $\pm$ 0.17	10.67 $\pm$ 0.31
1	1.71	1.84 $\pm$ 0.14	2.27 $\pm$ 0.31	N.T.
1	2.85	2.65 $\pm$ 0.33	3.06 $\pm$ 0.34	N.T.
1	5.70	3.72 $\pm$ 0.35	4.25 $\pm$ 0.86	N.T.
1	8.55	5.04 $\pm$ 0.37	4.53 $\pm$ 0.82	N.T.
1	11.40	5.61 $\pm$ 0.97	4.49 $\pm$ 0.56*	9.30 $\pm$ 0.47*
5	11.40	N.T.	13.24 $\pm$ 0.71	N.T.
DMMB				
1	0	0	1.30 $\pm$ 0.19	10.50 $\pm$ 0.35
1	0.57	2.23 $\pm$ 0.07	1.30 $\pm$ 0.21	N.T.
1	1.14	4.97 $\pm$ 1.04	1.11 $\pm$ 0.01	N.T.
1	1.71	6.43 $\pm$ 0.69	1.40 $\pm$ 0.16	9.83 $\pm$ 0.47
1	11.40	N.T.	1.74 $\pm$ 0.15	N.T.
5	11.40	N.T.	4.62 $\pm$ 0.23	N.T.

Values of VSV inactivation, Met-Hb, P_{50} are the mean $\pm$ S.D. of separate experiments (n=3). N.T., not tested

Determination of means and standard deviation of experimental values and the performance of two-tailed, paired t test were carried out by using standard software (InStat, GraphPad Software, San Diego, CA). A value of $p<0.05$ (*) was considered significant, against no irradiation

素運搬体の原料として期限切れ赤血球製剤由来ヘモグロビンを選択する事は有意義であるので、完璧なウイルス除去/不活化法の確立が強く望まれる。

参考文献

1. Tsuchida E. Perspective of blood substitutes. In Tsuchida E, eds. Blood substitutes. Netherlands: Elsevier Science S.A., 1998; 1-14.
2. 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, 2439-2446.
3. Scriber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. N.Engl.J.Med., 1996; 334, 1685-1689.
4. 毎日新聞(夕刊)5月23日付, 1997.
5. 金光公浩, 阿部英樹, 関口定美. 輸血用血液のウイルス不活化. 日本輸血学会誌 1999; 45, 339-348.
6. Bechtel MK, Bagdasarian A, Olson P, Estep TN. Virus removal or inactivation in hemoglobin solutions by ultrafiltration or detergent/solvent treatment. In: Chang TMS, Geyer RP, eds. Blood substitutes. Chichester, England: marcel dekker inc., 1989; 123-128.

7. 松村誠一郎, 岩崎敬治, 岩下雄二, 濱門敏齊, 水越幹雄. 安定化ヘモグロビン調製工程におけるHIV除去不活化. 日本輸血学会誌1989; 35, 263.
8. Estep TN, Bechtel MK, Miller TJ, Bagdasarian A. Virus inactivation in hemoglobin solutions by heat. In: Chang TMS, Geyer RP, eds. Blood substitutes. Chichester, England: marcel dekker inc., 1989; 129-134.
9. Sakai H, Takeoka S, Yokohama H, Seino Y, Nishide H, Tsuchida E. Purification of concentrated hemoglobin using organic solvent and heat treatment. Protein Expres.Purif. 1993; 4, 563-569.
10. Arazi M, Ebeling A, Baker R, Burhop K, Camacho T, Estep T, Guzder S, Marshall T, Rohn K, Sarajari R. Validation of the heat treatment step used in the production of diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHbTM) for viral inactivation. Artif.Cells Blood Substit. Immobil. Biotech. 1998; 26, 577-582.
11. 木村哲寛, 島村京子, 内山英樹, 金田伸一, 緒方嘉貴. マイクロウェーブによる超短時間高温加熱処理がヘモグロビンに与える影響. 人工血液1999; 7, 45-48.
12. Charm SE, Landau S, Williams B, Horowitz B, Prince AM, Pascual D. High-temperature short-time heat inactivation of HIV and other viruses in human blood plasma. Vox Sang. 1992; 62, 12-20.
13. Hamamoto Y, Harada S, Kobayashi S, Yamaguchi K, Iijima H, Manabe S, Tsurumi T, Aizawa H, Yamamoto N. A novel method for removal of human immunodeficiency virus: Filtratuin with porous polymeric membranes. Vox Sang 1989; 56, 230-236.
14. 関口定美, 阿部英樹. 輸血用血液製剤からの膜によるウイルス除去. 医学のあゆみ1995; 175, 416-417.
15. 阿部英樹, 菅原浩行, 平山順一, 池淵研二, 関口定美. 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. 人工血液1999; 7, 75.
16. Hirayama J, Abe H, Ikebuchi K, Horiuchi M, Shinagawa M, Kamo N, Sekiguchi S. Virus inactivation in superoxide dismutase preparations by ultraviolet light irradiation. Biol.Pharm.Bull. 1998; 21,621-623.
17. Chin S, Williams B, Gottlieb P, Margolis-Nunno H, Ben-Hur E, Hamman J, Jin R, Dubovi E, Horowitz B. Virucidal short wavelength ultraviolet light treatment of plasma and factor VIII concentrate: protection of proteins by antioxidants. Blood, 1995; 86, 4331-4336.
18. Ben-Hur E, Horowitz B. Advances in photochemical approaches for blood sterilization. Photochem.Photobiol. 1995; 62, 383-388.
19. Abe H, Wagner SJ. Analysis of viral DNA, protein and envelope damage after methylene blue, phthalocyanine derivative or mero-cyanine 540 photosensitization. Photochem.Photobiol 1995; 61, 402-409.
20. Hirayama J, Ikebuchi K, Abe H, Kwon KW, Ohnishi Y, Horiuchi M, Shinagawa M, Ikuta K, Kamo N, Sekiguchi S. Photoinactivation of virus infectivity of hypocrellin A. Photochem.Photobiol. 1997; 66, 697-700.
21. Lin L, Cook DN, Wieseahn GP, Alfonso R et.al. Photochemical inactivation of viruses and bacterial in platelet concentrates by use of a novel psoralen and long-wavelength ultraviolet light. Transfusion. 1997; 37, 423-435.
22. 平山順一, 阿部英樹, 池淵研二, 池田久實. 血球製剤に対するウイルス不活化研究の現状. 池田久實 編. 輸血医療におけるリスク管理. 札幌: エフ・コピエント富士書院, 2000.
23. Wagner SJ, Skripchenko A, Robinette D, Foley JW, Cincotta L. Factors affecting virus photoinactivation by a series of phenothiazine dyes. Photochem.Photobiol. 1998; 67, 343-349.
24. Wagner SJ, Skripchenko A, Robinette D, Mallory DA, Cincotta L. Preservation of red cell properties after virucidal phototreatment with dimethylmethylene blue. Transfusion 1998; 38, 729-737.
25. Hirayama J, Wagner SJ, Gomez C, Macdonald VW, Abe H, Ikeda H, Ikebuchi K, Sekiguchi S. Virus Photoinactivation in Stroma-free Hemoglobin with Methylene Blue or 1,9-dimethylmethylene Blue. accepted in Photochem.Photobiol. 2000; 71(1)

赤血球膜を三重層として捉える：膜骨格が維持する赤血球の形態，変形能，膜安定性

Erythrocyte membrane trilayer: Membrane skeleton and its maintaining erythrocyte shape, deformability and membrane stability

高桑 雄一

Yuichi Takakuwa

和文抄録

赤血球膜の内側には、スペクトリン、アクチン、4.1 蛋白質などからなる網目状の膜骨格（横のつながり）があり、アンキリンや 4.1 蛋白質を介して膜貫通蛋白質（バンド3やグリコフォリン C）に連結して（縦のつながり）細胞膜を裏打ちしている。この膜骨格は赤血球の中窪み円盤形の保持，変形能，膜安定性などの機能の維持に重要な役割を担っている。本総説では主に膜骨格に焦点を当て，その構造と機能およびその調節について最近までの知見を紹介した。

Abstract:

Underlying the human erythrocyte membrane is a self-assembled network of proteins termed the membrane skeleton. Spectrin, actin, protein 4.1 are its principal components. Lateral interactions among these proteins constitute the spectrin-based composite structure that is anchored to the bilayer through vertical interactions, one involving spectrin, ankyrin and band3, and the other through an interaction between protein 4.1 and gly-cophorinC. In this article reviewed are biochemical structure of the skeletal proteins, their interactions and functions and regulations by various constituents based on recent studies.

1. はじめに

一般に細胞膜は脂質二重層を基本構造に，それを貫く蛋白質や内側に寄り添う網目状の膜骨格から成り立っている。本総説では，細胞膜を表面糖鎖部分の第一層，脂質二重層と膜貫通蛋白質からなる第二層，細胞内側から細胞膜を裏打ちする膜骨格の第三層からなる三重層として捉え，赤血球膜を例に（Fig.1）それぞれの構造と機能およびその異常について概説する¹⁾。特に，筆者の研究領域の膜骨格については，最新の知見を紹介する（他の総説^{2) 3) 4)}も参照のこと）。

2. 第一層（細胞表面糖鎖）の構造と機能

2-1 認識，情報の受容

赤血球膜表面には糖鎖（糖蛋白質，糖脂質）からなる血液型物質が存在する。また，赤血球寿命（120 日）は血液中の自然抗体（抗バンド3 抗体）による老化赤血球の表面糖鎖の認識により規定される。この仕組みには膜を貫通するバンド3（Band3）の膜内動態が関わっている（後述）。赤血球膜表面には様々な

受容体があり，ホルモンやサイトカインの結合（刺激）を情報として伝達する。

2-2 融合・接着

循環中の赤血球は互いに融合しないが，センダイウイルスなどとは融合する。また，マラリア原虫が侵入することで，赤血球膜の性質が変化する⁵⁾。赤血球には細胞接着分子（CD44 など）が存在するが基本的には浮遊細胞であり，他の細胞とは接着しない。

3. 第二層（脂質二重層と膜貫通蛋白質）の構造と機能

3-1 膜の流動性と脂質の非対称分布（Fig.2）

膜脂質には流動性があり，脂質分子は自身の回転・振動のほか内外それぞれの層内で起こる側方拡散，フリップ（外層から内層へ）とフロップ（内層から外層へ）などにより常に動いている。構成リン脂質分子の脂肪酸の鎖長が短く，不飽和結合数が多いほど流動性は高くなる。脂質は内外層に非対称に分布し

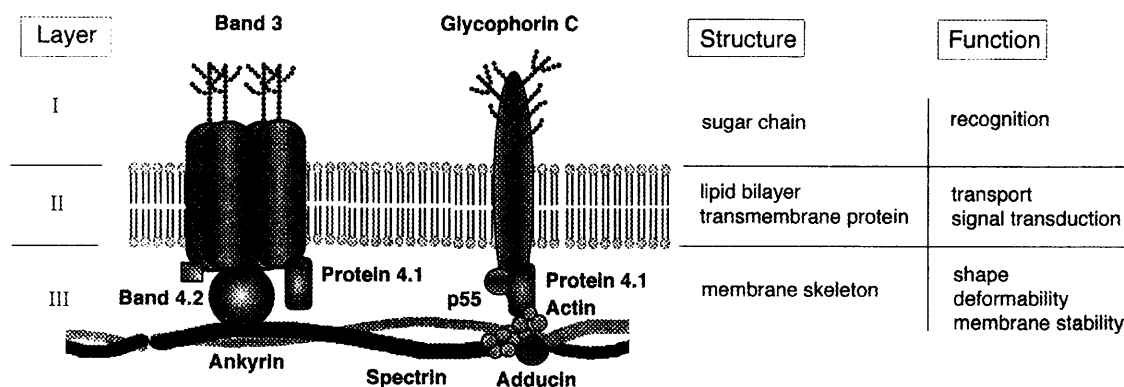


Fig. 1 Erythrocyte membrane trilayer.

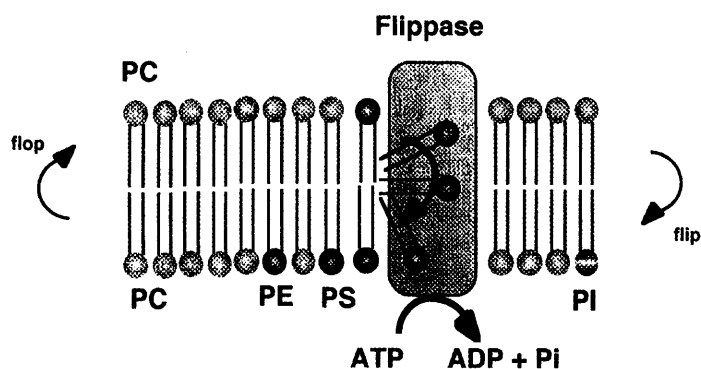


Fig. 2 Asymmetric distribution of phospholipids.

ており、内層には ホスファチジルセリン (phosphatidyl serine : PS), ホスファチジル エタノール アミン (phosphatidyl ethanolamine : PE), ホスファチジル イノシトール (phosphatidylinositol : PI) などが局在する。この局在は フリップアーゼ (flippase または aminophospholipid translocase) による PS, PE などの内層への能動輸送 (ATP の加水分解) によって維持されており、その活性は バナジン酸 (vanadate), Ca^{2+} , pyridyldithioethylamine (PDA) で抑制される。内層の PS は 陰性荷電を持ち スペクトリン (Spectrin), 4.1 蛋白質 (Protein 4.1) ⁶⁾ などと静電的に結合し、膜骨格を膜に寄り添わせることに一役かっている。また、C キナーゼ (PKC) などが細胞質から細胞膜へ移行する際にも内層の PS と Ca^{2+} が必要である。PI の代謝回転の過程で生ずる PIP₂ は PI 特異的ホスホリパーゼ C (PI - PLC) により加水分解され、産物のジアシルグリセロール (diacylglycerol : DAG) によって活性化された PKC は膜骨格蛋白質 (4.1 蛋白質, アデュシン aducin, デマチン dematin) をリン酸化する。

3-2 膜輸送

3-2-1 受動輸送

生体における赤血球の最も重要な生理的役割は、酸素 (O_2) を肺から末梢組織へ、二酸化炭素 (CO_2) を逆向きに運搬する

ことである。ガスは濃度勾配に従って赤血球膜を自由に透過でき、肺では O_2 を取り入れ CO_2 を排出し、組織ではその逆を行う。呼吸に連動するこの機能は バンド 3 (陰イオン交換体 Anion Exchanger 1: AE1) による Cl^- - HCO_3^- 交換輸送によって効率よく行われる。バンド 3 は赤血球膜を 14 回貫通し二量体を基本単位とするが、それぞれに陰イオン交換輸送活性が認められる。4, 4' - diisothiocyanostilbene 2, 2' -disulfonic acid (DIDS) は細胞外領域に結合し輸送を特異的に阻害する。ヒトではいくつかのバンド 3 異常症 (Southeast Asia Ovalocytosis : SAO など) が報告されているが、完全欠損の生存例が無いためバンド 3 は生体の生存に不可欠と信じられてきた。しかし、最近、牛の完全欠損生存例が発見され、 Cl^- - HCO_3^- 交換輸送が無いにもかかわらず生存していることで注目されている⁷⁾。なお、バンド 3 (AE1) は腎臓の尿細管細胞の血管腔側にも発現しており、組織によっては AE2, AE3 も見い出されている。

赤血球は ATP 産生を解糖系に依存しているため、糖輸送は赤血球にとって死活問題である。食後、血糖値が上昇すると糖輸送体 (GLUT 1) を介して赤血球内にグルコースが受動的に取り込まれる。水は浸透圧に従って赤血球膜を介して移動する。最近、水を透過させるチャンネルとしてアクアポリン (aquaporin) が発見され、X 線回折像も得られている。また、アクアポリン欠損赤血球も見い出されたが、赤血球の形態と機能には異常がみられない。

3-2-2 能動輸送

赤血球内外のイオンや物質の組成は異なっている。例えば細胞内では K^+ 濃度が高く、 Na^+ 濃度は低い。これは膜を貫通する Na^+ - K^+ ATPase による能動輸送によって保たれている。ウアバイン (Ouabine) は細胞外領域に結合し特異的に活性を抑制する。バナジン酸は ATP 結合に競合することですべての ATPase を阻害する。また、 Ca^{2+} ATPase による能動輸送によって細胞内 Ca^{2+} 濃度は 10^{-7}M 以下に保たれ、細胞外 (血中) に比べて 10,000 倍も低い。活性化因子であるカルモジュリン (Calmodulin: CaM) の結合により Ca^{2+} ATPase の Ca^{2+} 濃度感受性は 10 倍高くなる。3-3 情報伝達一般の細胞では、リガンドの受容体への結合 (刺激) は情報として伝達器 (G 蛋白質), 効果器

Table Protein composition of erythrocyte membrane

SDS-PAGE Gel Band	Protein	SDS-PAGE MW (kDa)	Copies/Cell ($\times 10^{-3}$)	Locus
1	α Spectrin	240	240	1q22 - q23
2	β Spectrin	220	240	14q23 - q24.2
2.1	Ankyrin	210	120	8p11.2
	α Adducin	103	30	4p16.3
	β Adducin	97	30	
3	Band3 (Anion exchanger 1 ; AE 1)	90 - 100	1,200	17q21 - qter
4.1	Protein 4.1	78 / 80	200	1p33 - p34.2
4.2	Band 4.2 (Pallidin)	72	200	15q15 - q21
4.9	Dernatin (Protein4.9)	48 & 52	140	
	p55	55	80	Xq285
5	β Actin	42	400 - 500	7pter - q22
6	G3PDH	35	500	12p13.31 - p13.1
7.1	Tropomyosin	27 & 29	80	1q31
7.2	Stornatin	31	200	
PAS 1	Glycophorin A	36	5001 - 1,000	4q28
PAS 2	Glycophorin B	32	50 - 100	2p14 - q21
PAS 3	Glycophorin C	20	100 - 300	4q28
	Glycophorin D	23	20	2q14 - q21

G3PDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

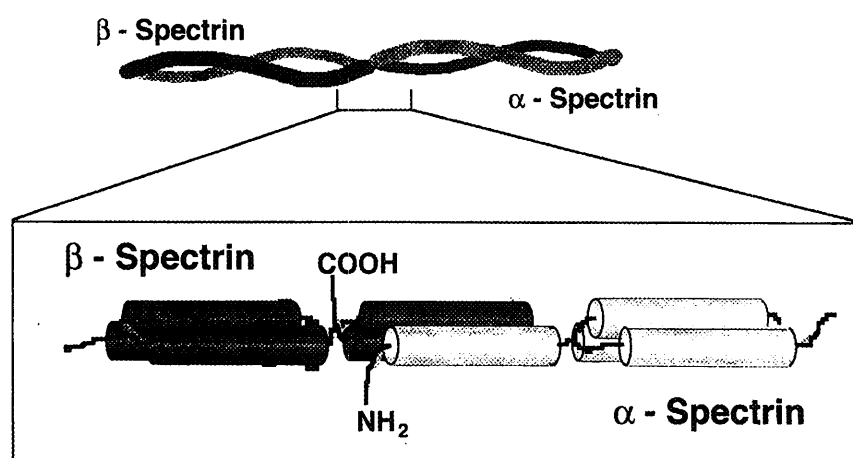


Fig. 3 Spectrin dimer-dimer interaction.

(adenylate cyclase, PLA2, PLC, PLD など)を経て, セカンドメッセンジャー (cAMP, Ca^{2+} など) を介して, 蛋白質の化学修飾 (リン酸化など) などの効果をもたらす. 赤血球膜にもこれらの情報伝達機構は基本的に保たれている.

4. 第三層 (膜骨格) の構造と機能

膜骨格はスペクトリン, アクチン (actin), 4.1 蛋白質などの

結合 (横のつながり) により網目状の平面的な広がりを保ち, アンカー蛋白質 (アンキリン: Ankyrin など) を介する膜貫通蛋白質 (バンド 3, グリコフォリン C: Glycophorin C) との連結 (縦のつながり) により脂質二重層を細胞質側から裏打ちしている (Fig.1). 膜骨格は赤血球の形態保持, 変形能, 膜安定性の維持に重要な役割を担っている. 膜骨格の構成蛋白質 (Table)

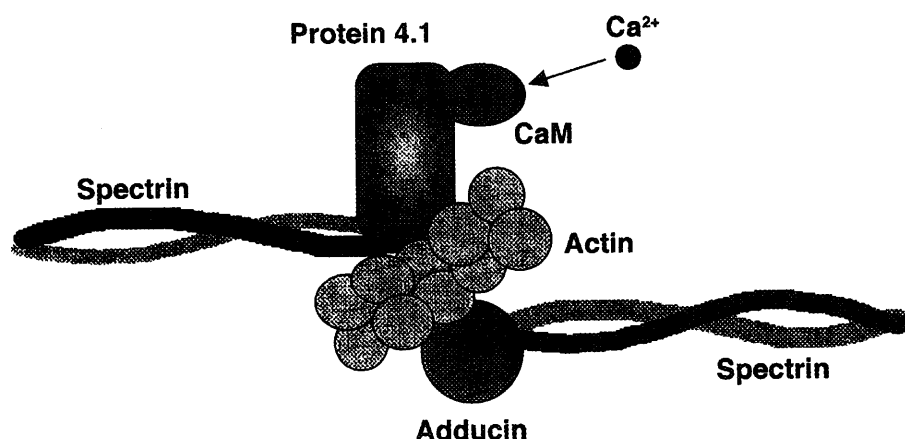


Fig. 4 Spectrin-actin interaction.

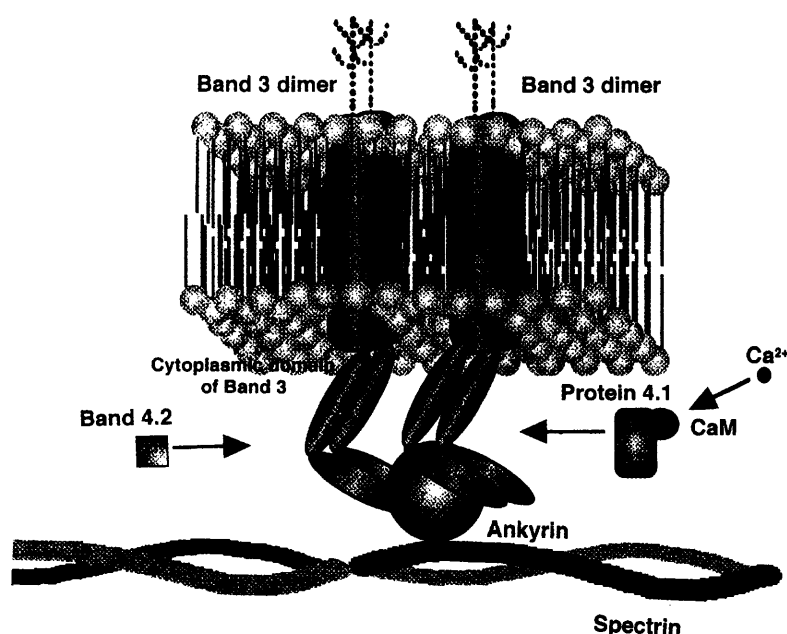


Fig. 5 Band 3-ankyrin-spectrin interaction.

については、遺伝子、蛋白質、分子間相互作用などの研究が進んでおり、赤血球以外の細胞におけるファミリー蛋白質の存在、細胞内分布なども明らかになりつつある。

4-1 横のつながり

4-1-1 スペクトリン二量体間の結合 (Fig.3)

繊維状のスペクトリンには α 鎖と β 鎖があり、いずれも配列の似た3つの α ヘリックス構造が束になった分節構造の繰り返しで形成され、赤血球膜に変形能を与える。両者が寄り添った二量体 ($\alpha\beta$; 長さ約 100 nm) が結合した四量体 ($\alpha_2\beta_2$; 長

さ約 200 nm) が膜骨格の網目構造の基本単位 (網の一边に相当) を形成し、膜安定性の維持に寄与している。スペクトリンの会合状態は、温度、pH、イオン強度 (塩濃度) などにより異なり、条件や病態により赤血球膜には種々の会合状態のスペクトリンが存在している (しうる)。スペクトリンは種々のキナーゼでリン酸化され、膜結合カゼインキナーゼ I (casein kinase I) による β 鎖の Ser/Thr 残基のリン酸化と脱リン酸化により膜安定性が調節される⁸⁾。赤血球以外の細胞ではスペクトリンのファミリー蛋白質としてフォドリン (fodrin) やジストロフィン (dystrophin) が知られている。

4-1-2 スペクトリン - アクチン 間の結合 (Fig.4)

4.1 蛋白質はスペクトリンとアクチンにそれぞれ結合し、スペクトリン - アクチン 間の連結を促進する。この横のつながりは膜安定性の維持に不可欠で、 Ca^{2+} と CaM による制御を受ける。即ち、生理的濃度の CaM (2-8 μM) は 4.1 蛋白質に結合しており、 Ca^{2+} 濃度が 1 μM 以上に上昇すると $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ は 4.1 蛋白質の構造変化を引き起こしてスペクトリン - アクチン間の結合を抑制し、膜安定性を低下させる⁹⁾。CaM と 4.1 蛋白質の結合には、4.1 蛋白質分子内に Ca^{2+} 非依存性および依存性の CaM 結合部位の存在が明らかになった¹⁰⁾。アデューシンも 4.1 蛋白質と同様にスペクトリン - アクチン結合を促進し、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ による制御を受ける。

4-2 縦のつながり

4-2-1 バンド 3 - アンキリン - スペクトリン間の結合 (Fig.5)

バンド 3 の約 20-50 % はアンキリンを介して膜骨格に連結し膜内での可動性が制限されている。残りの遊離型は膜内を動きまわることが膜骨格の網目 (スペクトリン からなるフェンス) の範囲に限定されている。これらのことから、バンド 3 は実質的に赤血球膜表面に均一に分布し、肺と末梢組織における陰イオン交換の効率を上げている。赤血球の老化に伴いバンド 3 は膜内集合し、自然抗体により認識され、マクロファージに補足され赤血球は 120 日の生涯を終える。その際、この過程には酸化ストレスが関与している。バンド 3 - アンキリン結合の親和

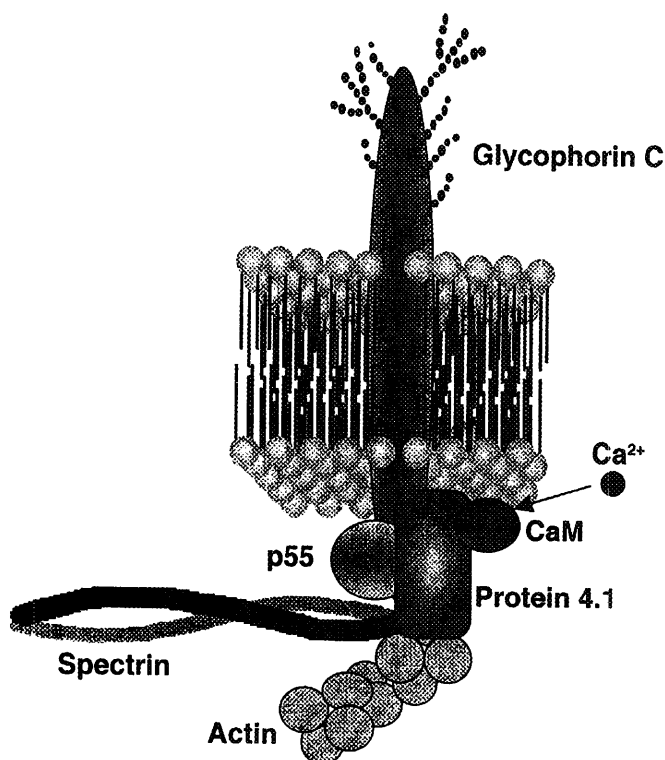


Fig. 6 Glycophorin C-protein 4.1 interaction.

性はアルカリ性条件下で低下し、膜安定性も低下する。また、バンド 3 には アンキリン に対する親和性の異なる二つの結合部位が存在し、4.1 蛋白質 の バンド3 への結合が バンド 3 の構造変化を引き起こし、アンキリン に対する高親和性部位を低親和性に変化させ、膜安定性も低下することが示された¹¹⁾。

4-2-2 グリコフォリン C - 4.1 蛋白質 - スペクトリン/アクチン間の結合 (Fig.6)

4.1 蛋白質はスペクトリン - アクチン間の結合を促進して横のつながりに寄与する一方で、グリコフォリン C にも結合し、膜骨格と脂質二重層を連結する役割を果たしている。最近、p55 蛋白質がグリコフォリン C と4.1 蛋白質にそれぞれ結合し、三者複合体を形成することが明らかになり、その機能の解明が待たれている。

4-3 形態保持

赤血球の中窪み円盤形は球に比べて表面積/体積比が大きく、肺や末梢組織でのガス交換に有利である。ATP は形態維持に不可欠であり、保存血には ATP 濃度を維持する工夫が施されている。膜骨格に異常を持つ赤血球に形態変化が多いことから、膜骨格構築は中窪み円盤形の保持に深く関わっていると考えられる。縦のつながりが保たれない赤血球 (バンド 3 欠損¹⁾、アンキリン異常など) は循環中に膜を喪失して球状を呈する。一方、横のつながりの異常 (4.1 蛋白質欠損¹²⁾ など) では、楕円状となる場合がある。

4-4 変形能と膜安定性の維持

赤血球は循環の過程で狭い毛細血管や脾臓の内皮細胞の間隙を通過する際にshear stress を受けるが、自らの形を変え (変形能)、ちぎれることもなく (膜安定性)、shear stress が去ると再びもとの中窪み円盤形に戻る。赤血球は寿命 (120日) がくるまでに約 50 万回これを繰り返す。

赤血球の変形能は表面積/体積比 (形態)、細胞内粘度 (ヘモグロビン濃度)、膜骨格 (主にスペクトリンの屈伸性) に依存する。従って、表面積/体積比の小さい球状赤血球、脱水によりヘモグロビン濃度が増加している老化赤血球、スペクトリン二量体間の結合の異常を持つ赤血球などでは変形能が低下する。変形能の測定方法には、マイクロピペット法、フィルター過法、レーザー回折法があり、最近、マイクロチャンネル通過法が開発された。膜安定性はレーザー回折法 (Ektacytometer) を用いて測定することができる。

膜安定性は主に膜骨格の横のつながりによって維持されており、スペクトリン二量体の結合や スペクトリン - アクチン間結合の異常により低下する。特に、膜安定性の極端に低下した 4.1 蛋白質欠損赤血球の膜安定性が精製した正常 4.1 蛋白質を再構成することにより回復する事実は、4.1 蛋白質が膜安定性の維持に不可欠であることを示している¹²⁾。また、 Ca^{2+}/CaM の 4.1 蛋白質への結合によってスペクトリン - アクチン間結合が抑制され、その結果、膜安定性は低下する⁹⁾。最近、バンド 3- アンキリン 結合が 4.1 蛋白質のバンド 3 への結合で減少し解離で増加すること、4.1 蛋白質 - バンド 3 間の結合自体は Ca^{2+}/CaM の 4.1 蛋白質への結合・解離によって調節されることが明らかになった¹¹⁾。興味深いことに、表皮角化細胞膜を貫通する細胞接着分子である CD44 への 4.1 蛋白質の結合も同様に Ca^{2+}/CaM によって調節され、その結果、CD44 - アンキリン結合が調節される¹³⁾。この事実は、膜貫通蛋白質とアンキリン間の結合には、細胞の種類によらない分子間相互作用による調節があることを示唆している。

5. おわりに

本総説では、人工血液の開発と利用を目指す研究者の皆様に、細胞膜のモデルとして赤血球膜について三重層それぞれの構造と代表的な機能について概説した。赤血球膜は最も単純で扱いやすいためこれまで細胞膜の研究素材として繁用されてきた。しかし、例えば膜骨格に類似した細胞膜の裏打ち構造はほぼ全ての細胞に存在し、構成蛋白質やファミリー蛋白質の存在、分布、性質、遺伝子などの解明が始められている。筆者も赤血球膜をモデルに、皮膚角化細胞¹⁴⁻¹⁶⁾ における接着、肥満細胞における分泌 (膜融合) などに対象を拡げつつあり、本年 (1999 年) 夏の Gordon Research Conference での招待講演でもその一部を紹介した。今後、赤血球膜で得られている多くの知見を参考に、種々の細胞における細胞膜の構造と機能の解明が進むものと思われる。

参考文献（著者の文献のみを挙げた）

1. 高桑雄一. 赤血球膜の構造と機能. 三輪史朗他編集, 血液病学. 東京: 文光堂, 1996;147-159.
2. 高桑雄一, 稲葉陸. 赤血球膜骨格. 三輪史朗監修, 藤井寿一・高桑雄一編集. 赤血球. 東京: 医学書院, 1998;81-92.
3. 高桑雄一, 萬野純恵. 赤血球膜骨格の構造 (総説) 日本臨床. 1996; 54:43-49.
4. 高桑雄一, 萬野純恵. 遺伝性楕円赤血球症, 垂井清一郎他編集, 遺伝子病マニュアル (上). 東京: 中山書店, 1996;360-361.
5. Magowan C, Liang J, Teung J, Takakuwa Y, Coppel RL and Mohandas N. Plasmodium falciparum: Influence of malarial and host erythrocyte skeletal protein interactions on phosphorylation in infected erythrocytes. *Exp.Parasitol.* 1998;89:40-49.
6. Takakuwa Y, Pack C-G, An X-L, Manno S, Ito E, and Kinjo M. Fluorescence correlation spectroscopy analysis of the hydrophobic interactions of protein 4.1 with phosphatidyl serine liposomes. *Biohypos. Chem.* 1999; in press.
7. Inaba M, Yawata A, Koshino I, Sato K, Takeuchi M, Takakuwa Y, MannoS, Yawata Y, Kanzaki A, Sakai J, Ban A, Ono K and Maede Y. Defective aniontransport and marked spherocytosis with membrane instability caused by hereditary total deficiency of red cell band 3 in cattle due to anonsense mutation. *J. Clin. Invest.* 1996;97:1804-1817.
8. Manno S, Takakuwa Y, Nagao K and Mohandas N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by β - spectrin phosphorylation and dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1995;270:5659-5665.
9. Takakuwa Y and Mohandas N. Modulation of erythrocyte membrane material properties by Ca^{2+} and calmodulin; Implications for their role in regulation of skeletal protein interactions. *J. Clin. Invest.* 1988;82: 394 - 400.
10. Nunomura W, Takakuwa Y, Parra M, Conboy J and Mohandas N. Identification of Ca^{2+} -dependent and -independent calmodulin binding site on protein4.1: Functional implications in regulation of 4.1 interactions with transmembrane proteins. *Mol. Biol. Cell.* 1997; Suppl. 8, 59-a.
11. An X-L, Takakuwa Y, Nunomura W, Manno S, Mohandas N. Modulation of band3- ankyrin interaction by protein 4.1: Functional implications in regulation of erythrocyte membrane mechanical properties. *J. Biol. Chem.*1996;271:33187-33191.
12. Takakuwa Y, Tchernia G, Rossi M, Menabadiji M and Mohandas N. Restoration of normal membrane stability to unstable protein 4.1-deficient erythrocyte membranes by incorporation of purified protein 4.1. *J. Clin. Invest.*1986;78: 80 - 85.
13. Nunomura W, Takakuwa Y, Tokimitsu R, Krauss SW, Kawashima M and Mohandas N. Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by Ca^{2+} and calmodulin: Implications for modulation of CD44-ankyrin interaction. *J. Biol.Chem.*1997; 272: 30322-30328.
14. Shimizu T, Takakuwa Y, Koizumi H, Ishibashi T and Ohkawara A. Calcium- dependent peripheral localization of 4.1-like proteins and fodrin incultured human keratinocytes. *Biol. Cell.* 1996;86:19-26.
15. Shimizu T, Takakuwa Y, Koizumi H and Ohkawara A. Nonerythroid membrane skeletal proteins in normal and diseased human skin. *Histol. Histopath.*1996;11:495-501.
16. Shimizu T, Takakuwa Y, Ohkawara A. Distribution of protein 4.1 inbasal and squamous cell carcinoma. *Arch. Dermatol. Res.* 1998;290:226-228.

ポリオキシエチレン修飾と脱酸素化による 酸素輸液(ヘモグロビン小胞体)の長期保存

酒井 宏水、富山 賢一、宗 慶太郎、武岡 真司、土田 英俊

Long-Term Preservation of Oxygen Infusion (Hemoglobin-Vesicles) Achieved by Poly(oxyethylene)-Conjugation and Deoxygenation.

Hiromi Sakai, Ken-ichi Tomiyama, Keitaro Sou, Shinji Takeoka, and Eishun Tsuchida.

要旨

細胞型酸素輸液であるヘモグロビン小胞体(HbV)の長期保存安定度を、1年間に亘って検討した。HbVの表面はポリオキシエチレン(POE)脂質を導入して修飾し、また系内の酸素を除去しdeoxyHbとして4℃、23℃および40℃にて保存した。いずれの温度でも保存6カ月後まではHbVの分散安定度(粒径、濁度)は保持された。40℃1年間保存後では沈澱形成、脂質の分解、pHの低下、そして内包Hb総量の4%が漏出していることが認められた。他方、4℃、23℃保存では1年後も分散度が保持され、Hbの漏出も検出限界以下であった。保存前に3%あったmetHbは、徐々に減少し1カ月後には1%以下になった。これは内包した還元剤のhomocysteineが残存酸素を消費し、更にmetHbを還元した為である。酸素親和度(P_{50})は保存前38 Torrであったが、40℃保存した場合は6カ月後に33 Torrにまで低下、1年後には43 Torrにまで上昇した。他方、4℃、23℃で保存した場合はそれぞれ36 Torr、32 Torrにまで徐々に低下するに留まった。以上より、HbVは少なくとも室温で1年間の棚置き保存が可能であることが明らかとなった。

Abstract:

The stability of hemoglobin vesicles (HbV) as an oxygen infusion was tested during the storage for one year at 4℃, 23℃, and 40℃. Prior to the storage, the surface of HbV was modified with poly(oxyethylene) (POE), and the suspension was deoxygenated with nitrogen bubbling. The samples stored at 4℃ and 23℃ showed a stable dispersion state for one year, though the sample stored at 40℃ showed precipitation and lipid decomposition, a decrease in pH, and leakage of 4% of total Hb. The original metHb content of 3% gradually decreased to less than 1% in all the samples after one month due to the presence of homocysteine inside the vesicles which consumed residual oxygen and reduced the trace amount of metHb. Oxygen affinity (P_{50}), which was originally regulated to 38 Torr, reduced to 33 Torr when stored at 40℃, though it significantly increased to 43 Torr after one year. On the other hand, preservation at 4℃ and 23℃ slightly reduced the P_{50} value to 36 and 32 Torr, respectively. These results indicate the possibility that HbV suspension can be stored at room temperature for at least one year.

Keywords:

blood substitutes / hemoglobin vesicles / polyoxyethylene / preservation / deoxygenation / methemoglobin / liposome

1. 緒言

ヘモグロビン(Hb)を用いた酸素輸液(人工酸素運搬体)の開発は、分子内架橋Hb、水溶性高分子結合Hb、分子間架橋Hb、重合Hbなどの臨床試験が欧米で進行しているものの、非細胞型構造に起因する各種の副作用が明らかにされている¹⁾。Hbが本来赤

血球膜に包まれている理由を考えると、Hbを内包させた細胞型のHb小胞体が適当と考えられている。

何時でも何処でも、血液型に関係なく投与することができる酸素輸液の実現には、長期間安定度高く保存できることが前提

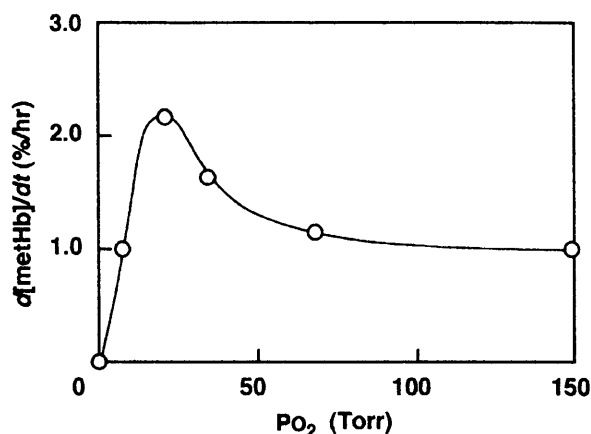


Figure 1 O₂ partial pressure dependence of the initial rate of methHb formation in HbV ([Hb] = 0.78 mM and pH 7.4). Cited from Takeoka et al., *Bioconjugate Chem.* 1997; 8: 539-544.

となるが、Hbを用いる細胞型、非細胞型酸素輸液共通の問題点として保存中のHbの自動酸化(メト化)がある。HbO₂はスーパーオキシドラジカル(O₂⁻)を遊離して自動酸化し、鉄三価のメト体(metHb)となり酸素結合能を失う。この自動酸化の抑制法として、還元剤やメトHb還元酵素系や活性酸素消去酵素を添加する方法が試みられているが^{2,5)}、溶液状態では長期安定度は十分ではない。架橋Hbやポリオキシエチレン(POE)修飾Hbの保存法として、糖類やポリオールを添加して凍結保存や凍結乾燥粉末として保存する方法が検討された^{6,7)}。また、HbO₂溶液の酸化速度は酸素分圧に依存し、デオキシ型は酸化反応が進行しないことが著者らも含め多くの研究者らによって報告されており^{2,4,8,9)}(Fig.1), この性質を利用して最近Biopure社が動物臨床用に二年間室温棚置き保存可能な重合ウシHbの酸素輸液を実現している。

しかしながら、Hb小胞体の場合はHb分子だけでなく小胞体構造も安定化する必要がある。リン脂質小胞体は両親媒性分子の集合体であり、その構造は一般的に不安定で、例えば冷蔵保存すると次第に凝集・融合が起こる。また脂質分解とそれが更にメトHb生成を促進するなどの劣化が起る。

HbVにトレハロースなどの糖類を保護剤として添加した凍結乾燥粉末は安定である¹⁰⁾。しかしHbVの最大用途である緊急時の使用を想定すると、粉末溶解には完全に溶解するまでに時間を必要とする上、気泡の除去も必要であり煩雑さを伴う。また凍結保存の場合^{11,12)}でもその融解および投与可能な温度までの昇温に時間を要する。従って、開封後そのまま使用できる溶液状態のほうが臨床的には好ましい。

POE鎖を結合した脂質をリン脂質小胞体の表面に導入すると血中滞留時間が延長する事実は良く知られている^{13,14)}。また、Hb小胞体と血漿蛋白質との相互作用の抑制を目的として、Hb小胞体の表面にPOE鎖で表面修飾する方法が用いられている¹⁵⁾。他方、血流動態が改善されることも確認されている^{16,17)}。しかし酸素輸液の室温棚置き保存に関して、POE修飾の効果は知ら

れていない。そこでHb小胞体の表面にPOEを結合させ、同時に溶液から酸素を除去することによりHb小胞体を溶液状態で保存できるのではと考え、1年間に亘った検討をしたので報告する。

2. 実験方法

2.1. ヘモグロビン小胞体(HbV)の調製

Hbは北海道赤十字血液センターから譲渡された期限切れヒト赤血球より精製して得た。Hb小胞体は既報に従い調製した^{17,18)}。一酸化炭素結合Hb(HbCO)溶液(40g/dL)に、pyridoxal 5'-phosphate (PLP, Merck Co., Germany)をHbに対して3倍モルとなるように、DL-homocysteine (Hcy, Aldrich, MO, USA)を濃度5mMとなるように添加した。混合脂質粉末Presome PPG-I (DPPC/cholesterol/DPPG = 5/5/1モル比、日本精化)を脂質濃度が4.5wt%となるようにHb溶液と混合し、4℃で終夜攪拌してHb内包多重層小胞体を得た。Remolino (Millipore, MA, USA)を用いたエクストルージョン法により粒径及び被覆層数の制御を行った。FMマイクロフィルター(富士フィルム、東京)を孔径3.0, 0.8, 0.65, 0.45, 0.3, 0.22μmの順に使用した。得られたHbV分散液を生理食塩水で希釈し、超遠心分離(50,000g, 60 min)後に上澄みHb溶液を吸引除去した。生理食塩水に分散させたPOE結合脂質:N-(monomethoxy polyoxyethylene-succinyl)-distearoyl phosphatidylethanolamine (POE鎖の分子量は5300, 日本油脂、東京)のミセルを、小胞体外表面の脂質の0.3mol%相当分を滴下し、37℃で2時間攪拌後、4℃で終夜攪拌してHb小胞体の外表面に導入した。円筒型フラスコにHb小胞体分散液(0.5g/dL, 200 mL)を入れ、これをロータリーエバポレータに装填し回転(56 rpm)させることによって形成させた液膜に、ハロゲンランプ(500W)を用いて酸素通気下(1L/min)で3分間可視光照射し、HbCOからオキシHb(HbO₂)への配位子交換を行った。この分散液を超遠心分離(50,000g, 60 min)してHbVを沈降させ、外水相生理食塩水を除去後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を加え、再分散させてHb濃度を10g/dLとした。最後にDismic-25: 0.45μm フィルター(ADVANTEC)で濾過し、POE修飾Hb小胞体(POE-HbV)を得た。

2.2. 脱酸素化と保存条件

POE-HbV分散液2 mLを10 mL容量のバイアル瓶に入れて密封した。滅菌ディスクフィルターを通し更に水蒸気飽和させた窒素の気泡を瓶内に発生させて通気し(13mL/min)、溶解している酸素を除去した。系内の酸素分圧をClark型酸素電極(酸素分圧測定装置, Po₂-100, Inter Medical社、名古屋)によってモニターしたところ、酸素分圧は1 Torrまで低下した。HbVの酸素親和度(P₅₀)は37℃で38 Torrであるので、この操作によりHbO₂は酸素を結合していないdeoxyHbに98%以上変換されたものと判断した。保存温度は冷蔵(4℃)、室温(23℃)、恒温槽(40℃)を設定し1年間保存した。

2.3. 保存後の測定項目

保存安定度評価として以下の項目の測定を行い保存前の試料と比較した¹⁹⁾。

① 試料30μLを生理食塩水で100倍に希釈し、室温において1mm

セルを用いて300~900nmまで紫外可視吸収スペクトル測定を行った。保存前の試料と比較して、新たな吸収極大の出現の有無やQ帯スペクトルの変形について検討した。また窒素バブルしてmetHbとdeoxyHbの二成分系にしてスペクトル測定し、Soret帯における405nmと430nmのピーク比からmetHb含量を測定した。

- ② 試料の沈澱形成の有無を目視により検査した。また試料30 μ Lを生理食塩水で10倍に希釈し、室温において1mmセルを用いて900 nmの吸光度を測定した。生理食塩水の900 nmの吸光度を対照として差し引き、試料の濁度とした。
- ③ 試料約0.2 mLをPBSで200倍に希釈し、超遠心分離(100,000g, 15 min)を行った後、上澄み液のHb定量を行い、HbV内相からの漏出率(%)を求めた。
- ④ 粒径分布は、Sub-micron Particle Analyzer Model N4-SD (Coulter Co., USA)を用いて動的光散乱法により測定した。
- ⑤ 酸素結合解離曲線はHemox-Analyzer(TCS Medical Products Co., USA)を用いて測定し、その解析から酸素親和度(P_{50})、酸素運搬効率(OTE)、Hill係数を算出した。
- ⑥ 開封後の溶液のpHを微小電極(Horiba 6378-10D, pH/10N meter F-23)にて測定した。
- ⑦ 脂質の分解を検討するため、試料約0.2 mLを凍結乾燥後、 CHCl_3 により脂質を抽出し、展開溶媒としてクロロホルム/メタノール/28%アンモニア水=13/7/1(容量比)およびクロロホルム/アセトン/メタノール/酢酸/水=10/4/2/2/1(容量比)を用いて二次元薄層クロマトグラム(シリカゲルプレート)を保存前と比較した。
- ⑧ 試料約0.2 mLを凍結乾燥後、約1 mLの CDCl_3 により膜成分を抽出しフィルター濾過後 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル(JNM-LA500, 日本電子, 東京)を測定した。また外水相に遊離したPOE鎖を除去するため、試料約0.2 mLをPBSで約200倍に希釈し、超遠心分離(100,000g, 15 min)を行って上澄み液を除去した。沈澱をPBSで再分散させた後凍結乾燥させ、約1 mLの CDCl_3 により膜成分を抽出し、フィルター濾過をして $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定した。POE脂質のPOE鎖メチレン基プロトンのピークは δ :3.63 ppmに、ホスファチジルコリンのコリンメチルプロトンのピークは δ :3.39 ppmに出現する。各々のプロトン積分比をB/Aとし、POE鎖の導入率は(外水相除去後の積分比B/A) $\div$ (仕込みの積分比B/A) $\times$ 100 から算出した。
- ⑨ 添加剤であるアロステリック因子PLPと還元剤Hcyの安定度を検討するため、6.2 mMのPLP溶液および10 mMのHcy溶液を脱気してから40 $^{\circ}\text{C}$ の恒温槽内に1カ月間保存した。PLP溶液は経時的に採取してHb溶液と混合し、酸素親和度を測定した。またHcyに関しては、SH基の定量法(N-エチルマレイミド法)によりSH基の活性を保存前と比較した。

3. 結果

3-1. POE-HbVの分散状態と脂質の性状

POE-HbV調製後の粒径は 222 ± 62 nmであった(Fig.2)。3カ月後に約10%収縮して粒径は201~204 nmになったが、6カ月後にはほぼ初期の粒径に戻った。濁度の変化は認められなかったが、40 $^{\circ}\text{C}$ 保存の系のみ1年後に容器の底に凝集体が沈澱し、4.3%のHb漏出が認められた。他方、4 $^{\circ}\text{C}$ および23 $^{\circ}\text{C}$ 保存の系では凝集体は認められず、Hbの漏出量も検出限界以下であった。

POE脂質の定量では、40 $^{\circ}\text{C}$ 保存6カ月後でもPOE鎖結含量は初期の6%程度の減少に留まった。二次元TLCの解析では、40 $^{\circ}\text{C}$ 保存1年後の試料のみ、リン酸が遊離したジアシルグリセロールと思われるのスポットが確認されたものの、他の保存試料では認められなかった。

比較のために、POE修飾を施さないリン脂質小胞体を各温度

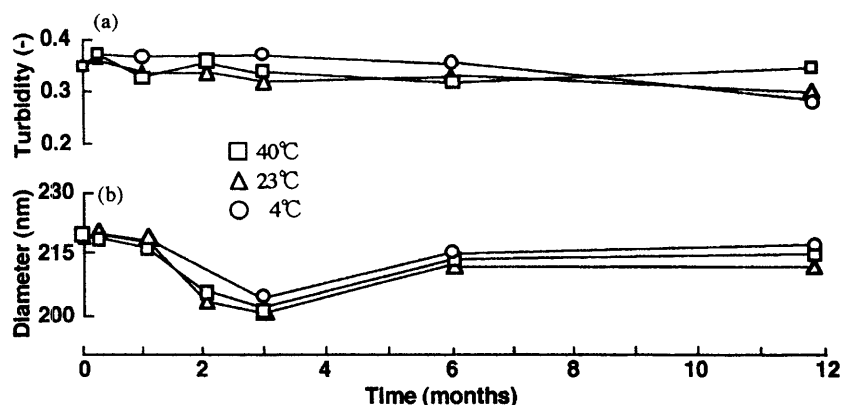


Figure 2 Changes in dispersion state of POE-modified HbV during preservation at 4, 23, and 40 $^{\circ}\text{C}$ for one year. (a) Turbidity of 10 times diluted samples at 900 nm, and (b) diameter changes measured with a Coulter particle analyzer.

において保存したところ、3日後に既に粒径の増大が認められ、1カ月後には265 nmにまで増大した(Fig. 3)。濁度は凝集体生成のため初期は増大するが、凝集体が沈澱するためその後は低下した。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存の試料が粒径増大と濁度上昇において他の保存温度の試料に比較して僅かに上回っていた。

3-2. 紫外可視吸収スペクトルと酸素結合解離曲線

保存したPOE-HbVを開封して空気と接触させ紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、 λ_{max} が415, 539, 575 nmに認められ、オキシ体であることを確認した(Table 1)。全ての保存温度、保存期間において特に保存前との差異は認められなかった。

POE-HbVの酸素親和度(P_{50})はPLPの内包によって38 Torrに調節してあったが、保存に伴い徐々に変動した(Fig. 4)。40 $^{\circ}\text{C}$ 保存の場合は、3カ月後に P_{50} は既に33 Torrにまで低下したが、1年後には逆に43 Torrにまで上昇した。他方、4 $^{\circ}\text{C}$ 、23 $^{\circ}\text{C}$ 保存した場合はそれぞれ36 Torr、32 Torrにまで徐々に低下するに留まった。

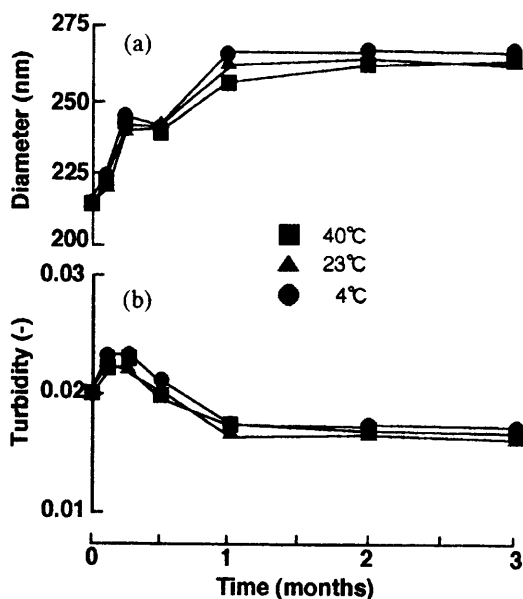


Figure 3 Changes in dispersion state of empty vesicles which were not modified with POE chains during preservation at 4, 23, and 40°C for three months. (a) Diameter changes measured with a Coulter particle analyzer, and (b) Turbidity of 10 times diluted samples at 900 nm.

Table 1 Spectrophotometric properties and P_{50} of Hb V after preservation

Conditions	Q band (nm)		Soret band (nm)	P_{50} (Torr)	pH
	α	β	γ		
before preservation	575	538	415	38	7.38
4 °C, 1 year	575	539	415	32	7.27
23 °C, 1 year	575	539	415	31	7.01
40 °C, 1 year	575	536	415	43	6.01

3-3. metHb含量

保存前のPOE-HbVのメト化率は2.8%であったが、どの保存温度においても1カ月後にはメト化率は1%以下にまで減少した。またその減少速度は保存温度が高いほど速くなった。

3-4. pHの変動

POE-HbVはリン酸緩衝生理食塩水に分散させてあり、初期のpHは7.38 (37°C)であった(Table 1)。1年保存後のpHは4°C, 23°C保存試料では各々7.27, 7.01まで低下した。他方40°C保存1年後にはpHは6.01まで低下していた。

3-5. PLP, Hcyの保存安定度

PLP溶液を脱酸素後、40°Cで加熱したところ、4週間後でも紫外可視吸光度スペクトルには顕著な変化は認められなかった。またこれをHb溶液に等モル添加して酸素親和度を測定したところ、保存前17 Torrが4週間後に15 Torrに低下するに留まり、殆ど分解していないことが明らかになった。

Hcy水溶液を脱酸素した後、40°Cにて加熱したところ、4週間後でもN-ethylmaleimideによるSH基定量ではほぼ同じ濃度を示し、酸素が無い状態ではSH基が安定に存在していることが明らかになった。

4. 考察

リン脂質小胞体は一般的に不安定な形態と考えられていたが、Hb小胞体の表面をPOE修飾することで分散安定度が保たれ、また脱酸素化することでHbや脂質、その他の添加物の酸化劣化を抑制し、結果としてHbV分散液を1年間溶液状態で保存することが可能となった。

表面をPOE修飾したリン脂質小胞体は、いわゆるstealth liposomeとして細網内皮系捕捉の抑制による血中滞留時間の延長と、抗癌剤などの薬物の効率高い腫瘍組織への運搬に利用されている。この薬物送達系(DDS)の場合は投与量が僅かであるが、酸素輸液のように大量投与を前提とした用途の場合は、より厳密な評価が必要となる。我々はPOE鎖の導入が小胞体の凝集を抑制して粘度を低下させ、迅速な血液循環と組織の酸素化に必要不可欠であることを報告した^{16,17)}。そして今回、POE修飾が長期保存においても極めて重要であることが明らかとなった。ごく最近、2つのグループがDDSにおいてPOE修飾が保存安定度に寄与すると報告したが^{20,21)}、4°Cでの数週間の保存安定度を観測したに過ぎない。今回の実験で我々は23°Cにおいて1年間の保存安定度を確認した。

今回用いたPOE脂質はDSPEにPOE鎖がコハク酸を介してエステル結合しており、加水分解を受けやすいと考えられる。実際に40°C保存6カ月後には6%のPOE鎖が遊離していた。しかしこの程度の分解では分散安定度に特に影響を与えないものと思われた。たとえ遊離したPOE鎖が共存したまま投与しても、POEは免疫系には影響を及ぼさず、また腎臓を經由して速やかに排泄されるので、問題は無いと考えられる²²⁾。また、POEとDSPEの結合様式としては、エステル結合以外に加水分解に対してより耐性を示すアミド結合型やウレタン結合型が合成されているので、これを用いた研究を進めている。

脱酸素化により脂質の過酸化は抑えられるものの、脂質のエステル結合などの加水分解が避けられない。TLCで分析した範囲では、4°C, 23°Cで1年間保存してもリン酸が遊離したジアシルグリセロールは検出されなかったが、40°Cで1年保存した試料はジアシルグリセロールと思われる分解物の存在が確認された。従ってこのときのpHの低下は脂質の分解に拠るもので、こ

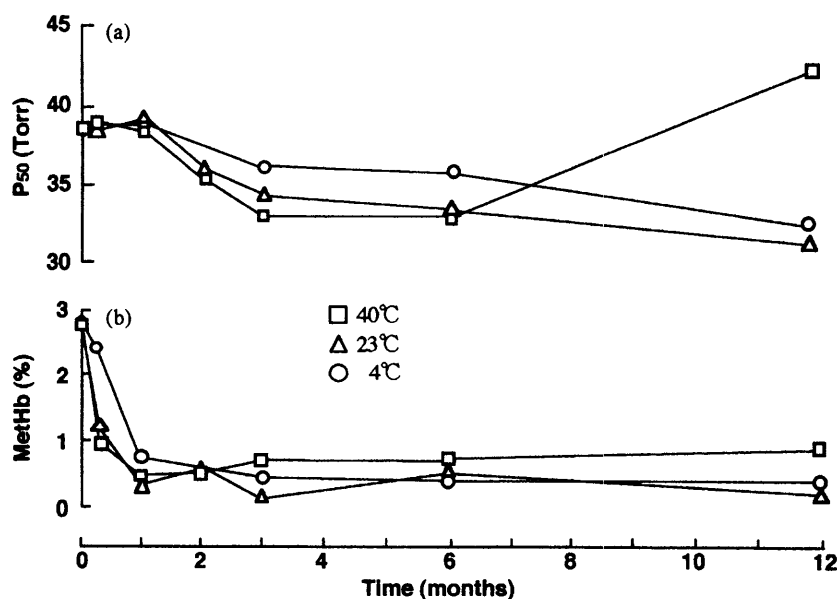


Figure 4 Changes in the oxygen binding properties of POE-modified HbV during preservation at 4, 23, and 40°C for one year. (a) oxygen affinity, P_{50} , and (b) metHb content.

れが P_{50} の上昇(43 Torr)を引き起こしたものと考察される。

HbVの初期の粒径の低下は、浸透圧の変化に拠る二分子膜中の脂質の再配列によるものと考えられる。HbVの調製工程において、Hbの内包効率を高めるために塩濃度を低く設定してあり(浸透圧は50 mOsm以下)、生理食塩水の300 mOsmに比較して低くなっている²³⁾。脂質二分子膜はイオン透過性が低いので、Donnan平衡に達するために内水相から外水相に水が移動し、これが初期においてHbVを収縮させたものと考えられる。その後次第にイオンの移動が起こり、最終的には安定な粒径に落ち着いたものと考えられる。周りの浸透圧に応じて小胞体の粒径が変化することは良く知られており、HbVについてもBeissingerらが報告している²⁴⁾。酸素親和度の変動も内水相のイオン濃度の変動と関連させた説明が考えられる。

HbO₂がmetHbに酸化される速度は酸素分圧に大きく依存し、deoxyHbは酸素が無い状態では酸化されない。この特徴を利用して無酸素下、HbVの長期保存が可能となった。保存前HbVに含まれるmetHb含量は2.8%であったが、1カ月後には1%以下にまで低下した。これは内水相に共存するHcyに拠るものである。我々はHbVのin vivoにおける自動酸化を遅延させるために、還元剤として一連のチオール類を検討し、その中から最も効果の高いHcyを選択した²⁾。酸素の存在下ではチオール類やアスコルビン酸などは酸素と反応して酸化され、同時にO₂などの活性酸素を生じ、これがHbの酸化を促進することがある。Kerwinらは、recombinant Hbの保存にアスコルビン酸を用いているが²⁵⁾、アスコルビン酸は酸素が存在するとメト化を促進することになるので、保存中は安定であるが開封後直ちに投与しないとメト化が

進行することが問題になり得る。またアスコルビン酸は強力な還元剤であるため、しばしば緑色をしたHb変異体を生成する²⁶⁾。他方Hcyは、Cysやグルタチオン、アスコルビン酸と比較して酸素とは比較的緩やかに反応し、効果的にmetHbを還元する²⁾。今回、Hcyを共存させることの新たな利点を見出すことができた。また実際にHcyが無酸素条件では、40°C、4週間以上安定であることを確認した。酸素除去操作後の溶液の酸素分圧は約1~2 Torrであり、このときの残存酸素溶解量は4μM以下となる。HbV分散液の総Hcy濃度は約1mMであり、残存酸素を消費して容器内を完全な無酸素状態とするのに十分な量と考えられる。保存後のHcy減少量は僅かであり、投与後もHcyがHbVの自動酸化抑制に充分寄与するものと考えられる。

POE-HbVの P_{50} はPLPを内水相にHbと共存させることにより調節している。保存前の P_{50} は38 Torrであり、この値は1週間保持されたが、その後低下する傾向が見られた。またこれが粒径の変動と対応していることから、Donnan平衡に達する際に、

酸素親和度に影響するPLP、Cl⁻、H⁺などアロステリック因子の濃度が変動したことも理由として考えられ、今後の検討が必要である。また40°Cにて1年保存後の P_{50} の増大は脂質の加水分解により内水相のpHが低下したことに拠る。

5. まとめ

本研究により得られた知見は以下のようにまとめられる。

1. HbV分散液から酸素を除去することでHbや構成成分の酸化を抑制できた。
2. 粒子表面にはPOE鎖を導入して保存中の粒子の凝集と融合による粒径変化、Hbの漏出を防ぐことができた。
3. 上記二つの技術を合わせることで、HbVは少なくとも室温で1年間の棚置き保存可能であることが明らかとなった。

今後は、保存試料に関して動物投与試験からその安全性を確認する必要があるが、将来医療機関の各部署、救急車、医療機関が無い遠隔地などに液体状態で酸素輸液を常備することができれば、必要時に直ちに体内に投与できることになる。更にこの技術はHbVに限定されず、細胞型/非細胞型、Hb利用/全合成系を問わず、広く酸素輸液全般に応用可能である。

謝辞

本研究の一部は、平成11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）の補助によって行われた。

参考文献

1. Tsuchida E (ed). Blood substitutes: present and future perspectives. Elsevier Science, Amsterdam, 1998.
2. Takeoka S, Sakai H, Kose T, Mano Y, Seino Y, Nishide H, Tsuchida E. Methemoglobin formation in hemoglobin vesicles and reduction by encapsulated thiols. *Bioconjugate Chem* 1997; 8: 539-44.
3. Takeoka S, Ohgushi T, Sakai H, Kose T, Nishide H, Tsuchida E. Construction of artificial methemoglobin reduction system in Hb vesicles. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 1997; 25: 31-41.
4. Sakai H, Takeoka S, Seino Y, Tsuchida E. Suppression of methemoglobin formation by glutathione in a concentrated hemoglobin solution and in a hemoglobin-vesicles. *Bull Chem Soc Jpn* 1994; 67: 1120-5.
5. D'Agnillo F, Chang TMS. Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase as a blood substitute with antioxidant properties. *Nature Biotechnol* 1998; 16:667-671.
6. Matsumura S, Yamaji K, Ohki H, Kosaka K, Iwashita Y. Large scale production and characterization of lyophilized pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene (PHP) Biomater *Artif Cells Immobilization Biotechnol* 1992; 20:435-8.
7. Kerwin BA, Heller MC, Levin SH, Randolph HW. Effects of Tween 80 and sucrose on acute short-term stability and long-term storage at -20°C of a recombinant hemoglobin. *J Pharm Sci* 1998; 87:1062-8.
8. Levy A, Zhang L, Rifkind JM. Hemoglobin: a source of superoxide radical under hypoxic conditions. *Oxy-radicals Mol. Pathol Proc Upjohn-UCLA Symp* 1988; 11-25.
9. Balagopalakrishna C, Manoharan PT, Abugo OO, Rifkind JM. Production of superoxide from hemoglobin-bound oxygen under hypoxic conditions. *Biochemistry* 1996; 35:6393-8.
10. Rudolph AS. Freeze-dried preservation of liposome encapsulated hemoglobin: A potential blood substitute. *Cryobiology* 1988; 25: 277-84.
11. Satoh T, Kobayashi K, Sekiguchi S, Tsuchida E. Characteristics of artificial red cells: hemoglobin encapsulated in poly-lipid vesicles. *ASAIO J* 1992; 38:M580-4.
12. Hosoi F, Omichi H, Akama K, Awai K, Endo S, Nakano Y. Radiation-induced polymerization of phospholipid mixtures for the synthesis of artificial red blood cells. *Nucl Instr Methods Phys Res B* 1997; 131: 329-34.
13. Woodle MC, Lasic DD. Sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1113:171-99.
14. Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycol effectively prolongs the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* 1990; 268: 235-7.
15. Yoshioka H. Surface modification of haemoglobin-containing liposomes with polyethylene glycol prevents liposome aggregation in blood plasma. *Biomaterials* 1991; 12: 861-4.
16. Sakai H, Tsai AG, Kerger H, Park SI, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E, Intaglietta M. Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with red cell substitutes consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J Biomed Materials Res* 1998; 40:66-78.
17. Sakai H, Takeoka S, Park SI, Kose T, Izumi Y, Yoshizu A, Nishide H, Kobayashi K, Tsuchida E. Surface-modification of hemoglobin vesicles with polyethyleneglycol and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90%-exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem* 1997; 8: 15-22.
18. Sakai H, Hamada K, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E. Physical Properties of Hemoglobin Vesicles as Red Cell Substitutes. *Biotechnol Progr* 1996; 12: 119-25.
19. Hamada K, Kose T, Ohgushi T, Sakai H, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E. Assay systems for the components of red cell substitutes (NRC). *Artif Blood* 1995; 3: 96-101.
20. Meyer O, Kirpotin D, Hong K, Sternberg B, Park JW, Woodle MC, Papahadjopoulos D. Cationic liposomes coated with polyethylene glycol as carriers for oligonucleotide. *J Biol Chem* 1998; 273: 15621-7.
21. Singh M, Ferdous AJ, Jackson TL. Stealth monensin liposomes as a potentiator of adriamycin in cancer treatment. *J Controlled Release* 1999; 59: 43-53.
22. Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *J Pharm Sci* 1994; 83: 601-6.
23. Takeoka S, Ohgushi T, Terasaki K, Ohmori T, Tsuchida E. Layer-controlled hemoglobin vesicles by interaction of hemoglobin with a phospholipid assembly. *Langmuir* 1996; 12:1755-9.
24. Beissinger RL, Farmer MC, Gossage JL. Liposome-encapsulated hemoglobin as a red cell surrogate; preparation scale up. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1988; 32: 58-63.
25. Kerwin BA, Akers MJ, Apostol I, Moore-Einsel C, Etter JE, Hess E, Lippincott J, Levine J, Mathews AJ, Revilla-Sharp P, Schubert R, Looker DL. Acute and long-term stability studies of deoxy hemoglobin and characterization of ascorbate-induced modifications. *J Pharm Sci* 1999; 88: 79-88.
26. Moxness MS, Brunauer LS, Huestis WH. Hemoglobin oxidation products extract phospholipids from the membrane of human erythrocytes. *Biochemistry* 1996; 35: 7181-7.

第6回日本血液代替物学会年次大会 シンポジウム“人工酸素運搬体—臨床応用に向けて”における発表と討論内容

北海道赤十字血液センター 池淵研二
慶應義塾大学医学部呼吸器外科 小林紘一

シンポジウムでは、近い将来人工酸素運搬体を臨床応用するために、いかに取り組むべきかを、4名の専門研究者に語っていただいた。

慶應大学医学部呼吸器外科堀之内宏久先生より「生体内における酸素輸送から見た血液代替物の評価」の演題で発表が行われた。各種実験動物での脱血後の投与効果をリポドヘム小胞体、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)、アルブミンヘムを用いて比較検討した成績では、血中滞留時間に3.3–28時間の差があるものの、いずれの製剤でも有効に酸素運搬が行われることが示された。

早稲田大学理工学総合研究センター酒井宏水先生より「セル型、非セル型酸素輸液の物性比較、および血圧充進と抵抗血管収縮の相関の検討」と題して発表が行われた。国内で入手できない分子内架橋型、分子間架橋型などの修飾ヘモグロビンを研究室で作製し、セル型POE-HbVとの機能の違いを比較検討した。Intaglietta研究室で開発されたハムスター皮下微小循環動態観測系を用いて抵抗血管の血流を計測すると、非セル型ヘモグロビンでは血管内皮弛緩因子NOの捕捉があるため血管収縮、血流低下が惹起される。セル型ヘモグロビンにはこの副反応が見られない。またin vitro系での赤血球との混合試験でも、非セル型ヘモグロビンは赤血球凝集を惹起し注意が必要であるとの結果であった。

テルモ研究開発センター緒方嘉貴先生より「人工酸素運搬体、Neo Red Cellの開発状況」と題する発表があった。NRCの製造工程図が紹介され、ウイルス不活化

および除去工程が工夫されており、種々のウイルスでも6–17ログの不活化、除去が達成されるとのことであった。製剤としてエンドトキシンを除く方法が難しいため、初めから汚染させない系を組む方針とのことである。これから臨床試験を進め、さらに臨床治療薬として登場させるために、原材料となる期限切れ赤血球をいかに確保するかに発言が及び、本学会の後押しと日赤、厚生省を含めたディスカッションが必要であると意見が出された。

本学会の臨床評価ガイドライン作成委員会委員で活躍されている東京女子医大腎臓病総合医療センターの中島一朗先生より、「血液代替物臨床評価ガイドライン」の演題で発表が行われた。医薬品の臨床試験の実施基準（改訂GCP）の遵守、外部の非専門家を加えた治験審査委員会の設置、治験責任医師の明確化、不利な情報の公開と再度インフォームドコンセントを取り直すこと、諸外国の情報を反映させること、など原則が紹介された。

この後総合討論に移った。それではどのような対象疾患に何を目標として臨床治験を実施したいか、意見が求められた。出血量がある程度予想できる、外科手術、整形外科手術での赤血球輸血との比較試験と、ex vivoでの臓器保存が候補に挙げられた。ショック患者を対象にすべきか否か議論が出たが、バクスター社の治験中断の反省を踏まえ、非可逆的な状態に入っているショックは対象とするのが難しいとの意見が出された。また一部ではこれらの症例ではインフォームドコンセントの取得が困難であるとの考えも出された。第一に人工酸素運搬体が有効な治療薬になり得ることを示し、次いで適応疾患

を拡大するという方針を考える参加者が多かった印象である。遠山先生、高折先生よりは輸血製剤の準備が難しい稀な血液型や高度不規則抗体保有者の輸血の代替えを候補と考える意見が提出された。

今回の学会でも人工酸素運搬体の保持するメリットとデメリットがいくつか紹介されたが、副作用として考えられるもののうち、治験の内容や獲得目標次第では許容できるものとできないものがあるように思うがどうか、と意見が求められた。例として炎症性サイトカインの産生は患者の生存を目標にした場合の治験では許容できるのではないかと。これに関して、今後は網内系の機能を重視し、例えば単純には脾臓重量でチェックする必要があることや、ビリルビンの上昇が製剤による毒性なのか、あるいは製剤が順調に肝臓で代謝されていることの反映なのか、明確にすることが今後大切になってくると意見が出された。またヘモグロビン修飾体の代謝には相当に血管内皮細胞が関与するとの報告がなされており、今後人工酸素運搬体の示す生物学的現象は血管内皮細胞の変化を伴う病態としてとらえていくことが大切であるとも意見が出された。

最後に現時点で国内で唯一企業努力しているテルモ社に対し、開発する上での問題点や学会への要望事項がないか、質問がなされた。やはり原料となる期限切れ赤血球の確保をスムーズに行うため、現状の研究用の譲渡血というシステム以上に、製造原料としての血液を準備できるようなシステムを学会、日赤、および厚生省と話し合っていきたい旨、希望が出された。

「酸素治療および赤血球代替物の安全性ならびに有効性評価基準に関するワークショップ」に参加して

Workshop on Criteria for Safety and Efficacy Evaluation of Oxygen Therapeutics as Red Cell Substitutes

September 27-28, 1999, NIH, Washington D.C.

Sponsored by FDA, CBER, NIH and United States Army

東北大学医学系研究科環境保健医学 仲井邦彦

昨年9月、Baxter Healthcare社（以下、Baxter社とする）は分子内架橋型 hemoglobin (Hb) 修飾体であるDCLHbを用いた米国および欧州でのフェーズ3研究を中止または中断することを発表した。理由はDCLHb投与群が対照群に比べ成績

が明らかに悪い（米国）、差が見られない（欧州）ためと報告された。本ワークショップはこのBaxter社の失敗からちょうど1年が経過したタイミングで開催された訳であり、米国における酸素運搬体開発の1つの転換点を意味するものかもしれない。臨床試験の方法論などかなり専門的な表現を含むものであり、その理解は筆者の能力をはるかに越え、包括的な紹介は困難である。あくまで部分的な範囲とお断りした上でここに紹介したい。なお、解説には筆者個人の主観を交えて記載させて頂いた。筆者の主観部分はそれと区別できるように記載したつもりであるが、客観性を欠くとしたらそれは筆者個人の責任であり、お許し願いたい。

本ワークショップ（Fig. 1）の構成は、まずFDAから臨床試験に関する問題提起が行われ、次にBaxter社を含む企業から簡単な

総括または中間報告が行われた。最後に、それを受けてtraumaおよびsurgical studiesに分れて臨床医からなる専門家によるラウンドテーブルディスカッションが進められる形で行われた（Fig. 2）。¹⁾

1. 臨床試験の経過

FDAの問題提起は主にBaxter社の総括に基づくものが多いと思われるため、Baxter社の報告を中心に臨床試験の結果または中間報告の概要を述べる。

Baxter社のフェーズ3はtraumaを対象と

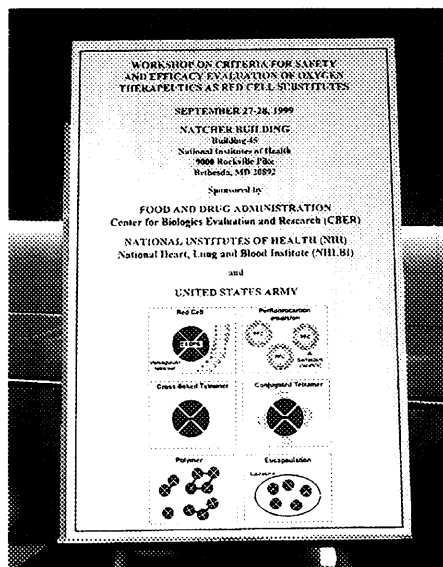


Fig. 1. ワークショップポスター



Fig. 2. ワークショップ会場案内

東北大学医学系研究科環境保健医学。
〒980-8575 仙台市青葉区星陵2-1
nakaik@mail.cc.tohoku.ac.jp
2-1 Seiryō, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan

¹⁾ FDAのCenter for biological Evaluation and Researchのホームページ (<http://www.fda.gov/cber/>) から本ワークショップ (<http://www.fda.gov/cber/cber/minutes/oxygen092899.pdf>) の公式記録にアクセスすることが可能である。

し、DCLHbの昇圧作用を逆に利用し出血性ショックの治療を目指すstudyであった(この昇圧反応については本雑誌の記事例えばvol.7 (2) p40-44などを参考にされたい)。Endpointとして、同種血使用の軽減、28日後のmortalityと設定し、従来のsalineによる治療法の治癒率を40%と予測し改善効果を検証しようとするものであった。最終的に500 - 1000 mLのDCLHbが投与された。米国の成績であるが、DCLHb群52例中死亡24例(46%)、対照群で46例中死亡8例(17%)であり、 $P=0.008$ でDCLHb群で有意に高い死亡率が認められ、試験中止を余儀なくされた。欧州での成績は、DCLHb群54例中死亡23例(42.6%)、対照群で62例中死亡22例(35.5%)、有意差はないもののDCLHbの優位性は認められず、こちらは試験は中断された。

結果の解釈について、まずsaline群の成績は40%と予測されたにもかかわらず米国研究では17%となり、DCLHb群の成績が悪いのではなく、saline群が良すぎた、というのが実状とされている。その理由として、盲検がかならずしも機能せずより重傷患者がDCLHb群に回された可能性が高いとされ、それはまたsaline群の良好な成績を示唆するものであった。今後のフェーズ3研究への教訓として、差をより正確に検出するために例数を増やすこと、プロトコル再検討と徹底、特に研究側またはランダムイズに関わるバイアスの抑制、さらにハイリスクな患者の取り扱いがとりあげられ、endpointとしてmortality以外にmorbidity surrogateなどの採用が問題提起された。

死亡例の詳細であるが、ARDS, SIRS, MOF, Pancreatitis, Myocardial ischemiaであり、特にPancreatitisはDCLHb群10%であり頻度はARDSなどに比べ低いもののsaline群のPancreatitisは0%でありその対比が注目された。ARDS, SIRSなど複雑な病態が多いのは、そのような患者がDCLHb群に回されたためか、DCLHbそのものに起因するかは明確ではない。Baxter社の結論は、「adverse effects are low frequency, and appear to attribute to mechanisms we know」というものであった。この結論はいささか単純すぎるように思われるが、Baxter社が残したデータ

は今後のHb修飾体研究に極めて貴重な資料となることは間違いなく、Baxter社の努力と学会への丁寧な報告は賞賛に値するものと深く感銘を受けた。

臨床試験としては次にAlliance社からperfluorochemical製剤であるPerflubronからなるOxygentの報告があった。興味ある点は、臨床の適応病態をhemodilutionに限定し、術前にOxygentを投与しながら血液希釈により自己血を貯血、術後に返血する自己血輸血に応用する戦略に絞っていることである。この術式をAugmented-ANHとして登録していることも興味をひかれた。endpointは同種血使用軽減であり、効果として血液よりも酸素加効率が良く、Oxygent 1 g/kgの投与がHb -1.5 g/kgと同等の効果であったとされていた。副作用は、flu-like syndromeと一過性のthrombocytopeniaが認められるものの、許容範囲と報告された。Oxygentの詳細については別の機会にまた紹介したい。

その他、Biopure社、Hemosol社、Northfield社から報告があったが、特記すべき内容はなく詳細は過去の総説を参考にされたい。この3社はBaxter社が遭遇した副作用はほとんどないものとして臨床試験の継続に自信をみせている。なお、後のラウンドテーブルディスカッションの中で、Northfield社担当の評価委員より、Polyhemeには好中球primingを抑制する作用が見られ、immunomodulationの可能性があると示唆されていた、興味あるコメントとしてここに記載しておく。

2. FDAによる問題提起

FDAからは、まずDr. Adbu I. Alayashiにより安全性について総説的な提言があり、ついでDr. Toby Silvermanより極めて単純で論理的な問題提起が行われた。その内容は資料として配付されているので、Table 1を参照されたい。

問題提起の特徴であるが、酸素運搬体製剤の有効性の根幹である酸素運搬能については議論は行われず、有効性の定義として赤血球製剤または既存の術式と比較しどのようにendpointを設定するか、という点に議論は集中した。FDAの報告に先立ち同種血輸血に伴う様々な副作用の概説がNIH自身によって行われた。同種

血の安全性は顕著に改善されているものの、血液事業としてゼロリスクを目指すものではないことも強調されていた。従って、同種血使用の回避そのものをendpointとして採用することにFDAも異論はないものの、より積極的なendpointを要求し、できるならばmortalityを重視したい意向のように思われた。

次に、FDAが新たに強調した点は、安全性重視、である。概説としては、血管収縮とそれに伴う昇圧反応、免疫担当細胞への影響、神経毒性、血液凝固、腸管作用、活性酸素関連の傷害、感染、などを指摘していたが、Dr. Arayashiとしては酸化ストレスを特に危惧しているものの印象を受けた。実際に臨床試験を計画中の各企業に対し、FDAよりHb代謝とその後の酸化ストレスの可能性についてこれまでより一歩踏み込んだ前臨床データの提出を求めているとも聞く。具体的には、極めて半減期が短いHb製剤が投与され、一斉に代謝を受け、大規模なヘム代謝が生起する状況を鑑み、Hbがferryl Hbまで酸化されhemeがHbより脱落しフリーとなって酸化ストレスを引き起こすのではないかという危惧が背景にあるものと予想された。これまでの臨床試験においてこの酸化ストレスに関する明確なmarkerなり指標が組み込まれていたかについては疑問の残るところであり、FDAの提案はこの点についても言及するものであった。Hb製剤はdrugかbiological drugか、という問いかけがあったが、方向としてはdrugとして厳密に評価がなされるべきとの感触を受けた。

最後にFDAはフェーズ3の規模を従来より多い600症例程度に増やすことを要求しつつある。これはBaxter社フェーズ3研究がプロトコル実施上の誤りによって混乱し、正しい評価ができなくなったことへの教訓として説明されているが、安全性を重視し、極めて稀な確率で発生するような未知副作用を検出する意図もあるのではないかとされた。いずれにしても、このフェーズ3規模の拡大というFDAの方針変更は、それはまた企業にGLP, GHPレベルの拡大に直結し、資金的、物理的さらには人的な負担増を意味する。それ故に戦略の再編成を迫られている企業も少なくないと思う。Baxter社

Table 1 FDA Questions/Considerations

FDA Questions/Considerations:	
I. SAFETY	where a large blood volume is temporarily replaced with an oxygen therapeutic and the patient survives, be extrapolated to the rural setting where there could be a substantial delay to definitive care?
Toxicities and laboratory findings known/thought to be associated with the use of one or more of the hemoglobin-based oxygen carriers include cardiovascular/hemodynamic changes, immune cell activation, neurotoxicity, coagulation changes, gastrointestinal changes, injuries associated with free-radical generation, and decreased host resistance to overwhelming infection.	- Are clinical trials in the rural setting necessary in order to demonstrate efficacy and safety in settings where there is delay to definitive care?
Toxicities known/thought to be associated with the use of one or more of the perfluorochemical emulsions include thrombocytopenia and complement activation.	- Are clinical trial using an oxygen therapeutic in the ambulance setting necessary?
- Are there any other potential toxicities you think should be added to this list? - Of the toxicities and laboratory findings outlined above, which do you feel are potentially clinically significant? - Does the use of oxygen therapeutics affect the incidence/susceptibility to, or the severity of systemic infection? - Based on the above, what evaluationis would you include in the safety component of a clinical trial?	- To what extent can efficacy demonstrated in clinical trials of product use in cases of civilian trauma be extrapolated to efficacy and safety in combat trauma?
II. TRAUMA	D. In situations where blood is available, can clinical equivalence in mortality between an oxygen therapeutic and blood be a basis for licensure?
A. Should mortality be the endpoint of choice for clinical trials in hemorrhagic shock or exsanguinating hemorrhage?	If yes, what lower 95% confidence interval for mortality rate would be acceptable?
- Are there any endpoints that could serve as surrogates for mortality? - What would constitute satisfactory validation for such endpoints?	III. ELECTIVE SURGERY
B. Are there any endpoints that are acceptable in the face of an adverse mortality outcome?	A. Should an oxygen therapeutic be evaluated in a controlled clinical trial in hemodynamically unstable patients requiring blood prior to licensure for elective surgery to ensure that its use in surgical patients at the highest risk would not lead to a worse outcome than if blood were used?
- For example, could the product have an effect on a serious morbidity that has substantial impact on day-to-day functioning? - Are changes in morbidity scores (e.g. Apache) an appropriate measure of morbidity outcomes?	- If no, should the product be evaluated in a surgical setting with a high degree of patient risk to assess whether those risks are increased by the use of the product?
C. In situations where blood is not available, should the product be tested in actual acute blood loss situations to demonstrate impact on survival?	B. FDA has proposed that studies should be powered for safety as well as efficacy and those safety endpoints should be defined prospectively.
- To what extent can data generated in an ER/OR setting,	- If a sponsor is conducting a single pivotal trial in a stable, elective surgery population, what safety endpoints are most likely to predict adverse events in patients at higher risk? - Based on the available safety data, what safety endpoints should be required? - In the above situation, what increase in adverse event rate should be ruled out before commercial availability? Should this increase vary depending on the underlying rate of adverse events in the control population? If so, how?

のフェーズ3失敗は様々な分野に波紋を投げかけている。

3. ラウンドテーブルディスカッション

パネリストのリストをTable 2に示す。いずれも酸素運搬体の評価に携わったメンバーと思われた。テーブルディスカッションは初日午後 traumaについて、翌日午前 elective surgeryについて行われた。なんらかのコンセンサスを得ることが目的の会議でもないため、気がついた点に

ついて羅列的に述べていく。

対象者：同種血使用の回避以外に mortalityをendpointとして採用できる臨床に出血性ショックがあり、Baxter社はそこで納得できる成績を残せなかった事実がある。「90%以上の患者を失うという臨床がそこにある以上、手をこまねいて見ているのではなく」果敢に挑戦すべきとの意見に加え、「efficacyを証明するためにも、high risk群から試みるべき」という賛成意見があり、臨床研究からハイ

リスク患者を除外すべきではないとの意見が多数のように思われた。elective surgeryでもstableな患者のみならず、unstableな状態でも対象にすべきとの意見が多かったように思われた。その際に「high risk」の中身を十分に検討すべきとのコメントが出されていた。

安全性：安全性に関するendpointを明確にする、点が強調されていた。副作用を検出するという点では、明確な新しいmarkerの提案は無かったように思われた。

Table 2 Panel members for the roundtable discussion

PANEL MEMBERS

Jeffrey L. Carson, M.D.
Professor and Chief of General Internal
Medicine, Robert Wood Johnson Medical
School, University of Medicine and Dentistry
of New Jersey

Stephen M. Cohn, M.D.
Professor of Surgery Chief, Trauma and
Surgical Critical Care, Department of Surgery,
University of Miami School of Medicine

James J. Holcroft, M.D.
Professor of Vascular Surgery, Department of
Surgery, University of California Davies
Medical Center

Michael J. Joyner, M.D.
Associate Professor of Anesthesiology
Department of Anesthesiology, Mayo Clinic

Margot S. Kruskall, M.D.
Associate Professor of Pathology, Beth Israel
Deaconess Medical Center Blood Bank

Paul M. Ness, M.D.
Professor, Pathology, Medicine & Oncology
Director, Transfusion Medicine
Department of Pathology, Johns Hopkins
Medical Institutions

Reuven Rabinovici, M.D.
Professor of Surgery and Trauma Chief,
Trauma Critical Care Department of Surgery
and Trauma, Yale University

Richard B. Weiskopf, M.D.
Professor of Anesthesiology, Department of
Anesthesia, University of California at San
Francisco

Gus J. Vlahakes, M.D.
Associate Professor of Surgery, Division of
Cardiac Surgery, Mass General Hospital,
Harvard University

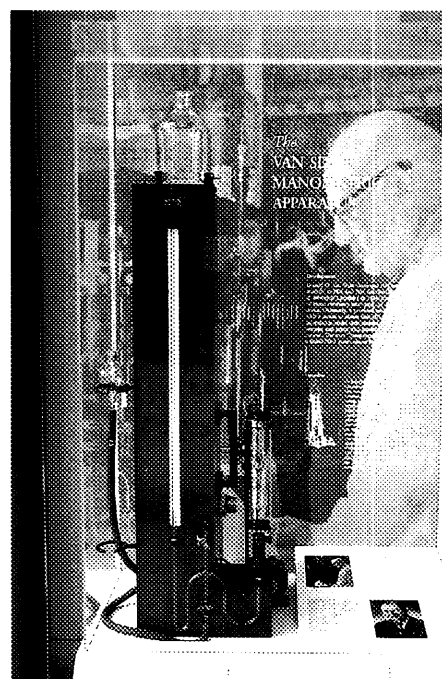


Fig. 3. The Van Slyke Manometric Apparatus

なお、neurotoxicityやcardiac ischemiaをどう検出するか、というコメントが目についた。筆者の勉強不足かもしれないが、今までに文献上でこのような副作用は明確には記載されていないと思われる。臨床医の直感としては問題になりつつあるということであろうか。Baxter社の臨床試験ではpancreatitisが問題となっていたが、この点についても逸脱酵素のフォロー程度が話題になったものと理解された。なお、riskとして若干の副作用があろうとも、患者を救命しうるならば少々副作用はまったく問題外とのコメントが出されていた。FDAは患者を救命しようとも永続的な副作用が残る場合は認可できない、とする立場のようであり、副作用の解析など詳細な議論が必至であろう。

Endpoint：Traumaでmortality以外に morbidity surrogateが用いられないかとの議論が行われたが、結論的なコンセンサスはなかったようである。elective surgeryでもendpointが同種血軽減効果だけで良いのかという問題提起はあり、他のefficacyを探ることが今後の宿題かもしれない。



Fig. 4. 会議場であるNIH Natcher Building #45外観

れない。過去に既存のdrugとの同等性のみが新薬承認の根拠になった例はないとされ、Hb製剤が例外になるのかという疑問も出されていた。endpointに関する議論は長い間の継続課題であり、今後のFDAの判断が待たれる。

Head injuryを対象者から除外するという議論にもかなりの部分が割かれていた。Head injuryの場合、出血ではなく脳そのものの傷害が致命的な場合が多く、除外すべきとの意見も少なくはなかった。コメントとして、head injuryの患者に臓器提供者が多いことを指摘した上で、適切な治療は試みるべきとの付帯意見が出されていた。

最後に

筆者は臨床試験に関するこのようなオープンな議論の場に参加することは初めての経験であり、新鮮な驚きであった。参加者の顔ぶれも極めて広く、その意味では米国における代替物研究が広範な研究者の参加によって進められていることをいまさらに思い知った。また、議論は必ずしも収束したものでなく、この中からFDAは一定の見解を打ち出すものと想定されるが、その手腕に大きな関心を持たれるとともに、その見解は今後の代替物研究に大きな転換を迫ることになるかもしれない。今後の展開に注目したい。

最後に、同会議に出席された本学会会長である慶應義塾大学の小林教授から、会場エレベーターホールの隅になにげなく置かれたVan Slyke Manometric Apparatusを紹介頂き、昔は苦勞して使われていた装置であることをお教え頂いた (Fig. 3)。解説書には1921年に初めて考案された血液ガス組成解析装置とあった。酸素運搬体研究と密接な装置の展示になにかしら因縁を感じた次第である。本ワークショップの会場であったNIHのNatcher Building #45 (Fig. 4) のエレベーターホールに展示されているので、機会があればお立ち寄り頂きたい。

謝辞：本ワークショップの開催をライフサイエンス振興財団派遣海外滞在研究期間中に受け取ったため、急遽情報収集の好機と考えて出席させて頂いたこと記し、振興財団への感謝の言葉としたい。

Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits

Marcel Levi, Philip Friderich, Sarah Middleton, Philip De Groot, Ya Ping Wu, Roy Harris Bart Biemond, Harry Heijnen, Jack Levin and Wouter Ten Cate
Nature Medicine 1999; 5: 107-111

慶応義塾大学医学部内科 村田 満

紹介記者のコメント

血小板の機能は複雑であり、血小板代替物作成のためには血小板機能の中で最も基本的かつ重要な機能を担う因子を効率良く担体に導入しなければならない。

Leviらの研究は十分な止血能を有する血小板代替物の開発を目的としている。彼らは生体適合性の良いアルブミンを担体とし、その表面に止血に重要なフィブリノゲンを固相化した微粒子(Synthocytes)を作成した。フィブリノゲンは血液凝固の最終産物であるフィブリンの前駆体であるばかりでなく、血小板凝集反応に中心的役割を果たす。すなわち刺激時に血小板の膜受容体糖蛋白(GP)IIb/IIIaがフィブリノゲンと結合することで血小板同士が架橋し、血小板-血小板の結合(凝集)が成立する。凝集は正常の止血血栓の形成に必須である。Synthocytesを血小板と混合し刺激すると、通常は可溶性フィブリノゲンに結合すべき血小板とSynthocytes間で結合が起り、血小板凝集塊にSynthocytesが取り込まれ、凝集塊が大きくなると予想される。従って血小板減少あるいは血小板機能低下患者にこれを投与すると、止血血栓の形成を補助し、牽いては止血能を増強させる可能性がある。

本論文ではSynthocytesの止血能への影響が動物実験で紹介されている。in vitroでの血小板との相互作用が形態学的検討にとどまっている点がやや残念であるが、in vivo止血効果が詳細に示されており、人工血小

板代替物開発に一つの重要な指針を示したものとして注目される論文である。

緒言

悪性腫瘍に対する化学療法、骨髄移植や外科手術の際に血小板輸血は欠くことの出来ない重要な補助治療法である。しかし、輸血後のウイルス感染症をはじめとする輸血副作用発現や供給不足・緊急時供給体制の不備などいくつかの問題点も指摘されている。輸血不応症もしばしば観察される。血小板輸血は頻回に行われることが多く、また、ドナー数が多いことから感染症のリスクも大きい。

ここではアルブミンmicrocapsuleの表面にフィブリノゲンを固相化した微粒子(Synthocytes)を作成し、その機能を、抗腫瘍剤投与で血小板減少状態に陥ったrabbitに輸注し、止血能の改善を検討した。

方法

ヒトアルブミンならびにヒトフィブリノゲンは、Cohn processにてプール血漿から回収精製した。アルブミンmicrocapsuleは、10%ヒトアルブミン溶液をspray-dryingすることにより作成した。粒子径の中央値は $3.5\sim 4.5\mu\text{m}$ で、 $6\mu\text{m}$ 以上のものは全体の2%未満である。次にフィブリノゲンを一定のイオン強度下pH6.0~6.5で4時間アルブミンmicrocapsuleとインキュベートすることによりSynthocytesを作成した。

血小板減少rabbitは、New Zealand White

rabbitsに抗血小板抗体またはbusulfanを 15mg/kg (day -12), 10mg/kg (day -9) 投与することによりday 0の血小板数が $10\sim 20\times 10^9/\text{L}$ となるようにした。

rabbits出血時間は耳切後止血までの時間を、5分間出血量の測定は前腹壁に5cm長、0.5cm深の創を作成し5分間にガーゼに吸着される血液重量を測定することにより定量化した。出血部位にSynthocytesが集積するかどうかの形態学的検討は、創部の生検標本で行った。

血栓成長モデル(thrombus growth model)は、露出した頸静脈に、in vitroでトロンビンと全血をインキュベートすることで作成した血栓含有血液を注入し、ここに集積する ^{125}I -フィブリノゲン量から算出した。

in vitro実験では、ヒト全血から任意の血小板数ならびにヘマトクリット値の再構成血を作成し、 $300/\text{sec}$ のずり速度下でcoverslips上の内皮細胞上を還流させたあと、coverslipsを形態学的に観察した。

結果

busulfan投与により、出血時間は $1.7\pm 0.4\text{ min}$ から $21.7\pm 4.4\text{ min}$ に延長した。ここにSynthocytesを 1.5×10^9 または 0.75×10^9 microcapsules/kgを15分前に投与しておくと出血時間はそれぞれ $5.2\pm 1.7\text{ min}$ と $6.5\pm 1.7\text{ min}$ に短縮した。前投与を60分前に行っても効果は認められたが15分前に比べ弱かった。

血小板減少状態での前腹壁からの5分間

出血量は、 2354 ± 351 mgであったが、Synthocytes 1.5×10^9 の前投与で 276 ± 102 mgに減少した。

頸静脈血栓成長モデルではSynthocytesは有意に血栓を増大させなかった。

in vitro実験では、PMAで刺激した内皮細胞上の血小板凝集塊占有面積は、Synthocytes添加により $12.0 \pm 0.8\%$ から $16.4 \pm 1.6\%$ に増加した。また走査電子顕微鏡を用いた形態学的検討により、Synthocytesと血小板の結合が観察された。

考察

血小板減少時、Synthocyteは残存する血小板との相互作用で内皮(下組織)への血小板粘着を増強することにより止血能を改善するものと思われる。本研究はYenらにより報告された同様の製剤に対する報告と合致する。Synthocyteは、動物実験で止血時間を短縮させたという点で画期的であるが実際の臨床現場での出血にどのような作用をもたらすかは今後の検討を持たねばならない。

静注用人免疫グロブリン製剤

薬価基準収載

指定医薬品

献血グロベニン[®]-I-ニチャリ

〈乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン〉



■ 効能・効果、用法・用量、使用上の注意(禁忌)等については、添付文書をご参照ください。

製造〔資料請求先〕



日本製薬株式会社

〒101-0031 東京都千代田区東神田一丁目9番8号



販売

武田薬品工業株式会社

〒540-8645 大阪市中央区道修町四丁目1番1号

1999年5月作成 (K)

日本血液代替物学会 総会

1. 日 時：

平成11年9月11日（土）13:00 -13:15

2. 場 所：

京王プラザホテル 「扇」の間

〒160-8330 東京都新宿区西新宿 2-2-4

Tel: 03-3344-0111

3. 議 題：

報告事項 ① 年次大会の開催状況

② 会員動向

③ 会誌編集委員会

④ その他

審議事項 ① 平成10年度事業報告

② 平成10年度収支決算

③ 平成11年度事業計画及び収支予算案

④ その他（次期大会長ほか）

以下議事内容を略記します。

報告事項

① 年次大会の開催状況として下記事項が報告された。

- 1) 第6回日本血液代替物学会年次大会
- 2) 平成11年9月10日（金）～11日（土）
- 3) 東京都新宿区西新宿 2-2-4 京王プラザホテル
- 4) 日本血液代替物学会会員、
臨床医学・理工学研究者、
国内の大学および医療機関臨床医、
血液センター関係者
約300名

② 会員状況は以下のとおり。

- 1) 維持会員：3社
- 2) 賛助会員：6社（退会2社）
- 3) 正 会 員：154名（入会18名／退会3名）
- 4) 購読会員：25（退会2箇所）

④ 事務局の移転（平成11年4月1日より）

住 所：〒180-8582 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/Fax：03-5363-3493

審議事項

① 平成10年度事業報告

（平成10年4月1日～平成11年3月31日）
が行われ各々承認された。

1) 定期総会の開催 平成10年9月4日（金）
かでの2・7にて開催された。

2) 第5回年次大会（大会長 関口 定美）
平成10年9月4日（金）～5日（土）
かでの2・7で行われた。

3) 会誌「人工血液」の発行
第6巻2号、3号、4号、
第7巻1号（平成11年3月）を発行。

4) 平成10年度収支決算報告は承認された。

③ 平成11年度事業計画（案）

1) 定期総会の開催
平成11年9月11日（土）13:00～13:15
京王プラザホテル 南館4F「扇」の間

2) 第6回年次大会の開催（大会長 池田 康夫）
平成11年9月10日（金）、11日（土）
於 京王プラザホテル

3) 「人工血液の発行」の発行
第7巻2号（平成11年6月）、3号（8月）、4号（12月）、
第8巻1号（平成12年3月）の発行予定。

4) 平成11年度収支予算案は承認された。

④ 平成12年度定期総会の予定が報告された。

- ・ 次期大会長は北畠 顕 教授
（北海道大学医学部循環病態内科）に決定された。
- ・ 第7回年次大会は、平成12年9月7・8日の予定です。

日本血液代替物学会 役員名簿 (平成11年度)

顧問	理事
尾形 利郎 東海大学医学部 教授	阿岸 鉄三 東京女子医科大学 教授
高久 文麿 自治医科大学 学長	池田 久實 北海道赤十字血液センター 所長
堀 原 一 筑波大学 名誉教授	北 畠 顕 北海道大学医学部 教授
遠 山 博 埼玉医科大学総合医療センター 所長	清 水 勝 東京女子医科大学 教授
前 会 長	友田 燐夫 東京医科大学 教授
土田 英俊 早稲田大学理工学部 教授	宮尾 秀樹 埼玉医科大学総合医療センター 助教授
会 長	湯浅 晋治 埼玉県赤十字血液センター 所長
小林 紘一 慶應義塾大学医学部 教授	監 事
副 会 長	桜井 靖久 東京女子医科大学 教授
池田 康夫 慶應義塾大学医学部 教授	藤 村 一 生産開発科学研究所 学術顧問
会計理事	(会誌担当) 宮尾秀樹
西出 宏之 早稲田大学理工学部 教授	埼玉医科大学総合医療センター 助教授
庶務理事	(事務局長) 堀之内宏久
池淵 研二 北海道赤十字血液センター 副所長	慶應義塾大学医学部 講師

日本血液代替物学会 評議員名簿 (平成11年度)

青 木 克 憲 慶應義塾大学医学部 助教授	高 久 文 麿 自治医科大学 学長
阿 岸 鉄 三 東京女子医科大学 教授	高 橋 晃 テルモ(株) 専務取締役
浅 野 茂 隆 東京大学医科学研究所 教授	高 橋 英 嗣 山形大学医学部 助教授
阿 部 喜 代 司 筑波大学医療技術短期大学部 教授	高 橋 恒 夫 東京大学医科学研究所 教授
飯 塚 哲 太 郎 法政大学工学部 教授	武 岡 真 司 早稲田大学理工学部 助教授
池 田 久 實 北海道赤十字血液センター 所長	土 田 英 俊 早稲田大学理工学部 教授
池 田 康 夫 慶應義塾大学医学部 教授	土 屋 喜 一 早稲田大学理工学部 教授
池 淵 研 二 北海道赤十字血液センター 副所長	遠 山 博 埼玉医科大学総合医療センター 所長
伊 藤 俊 之 京都府立医科大学 助教授	友 田 燐 夫 東京医科大学 教授
岩 田 博 夫 京都大学再生医科学研究所 教授	豊 田 忠 之 東部地域病院 元院長
大 島 宣 雄 筑波大学基礎医学系 教授	仲 井 邦 彦 東北大学医学部 助教授
大 塚 節 子 岐阜大学医学部 講師	中 井 一 士 麻薬覚醒剤乱用防止センター 専務理事
大 柳 治 正 近畿大学医学部 教授	長 澤 俊 郎 筑波大学臨床医学系 教授
尾 形 利 郎 東海大学医学部 教授	中 島 正 治 厚生省医薬安全局
岡 野 光 夫 東京女子医科大学医用工学研究施設長	西 勝 英 熊本大学医学部 教授
片 岡 一 則 東京大学工学部 教授	西 出 宏 之 早稲田大学理工学部 教授
鍵 谷 昌 男 吉富製薬(株) 生産本部長	西 谷 孝 子 慶應義塾大学医学部特別研究教員助教授
川 村 明 夫 札幌北楡病院 理事長	ジェイムス・R・ハーレイ バクスター(株) 代表取締役社長
北 畠 顕 北海道大学医学部 教授	馬 場 正 三 浜松医科大学 教授
黒 澤 良 和 藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授	平 澤 博 之 千葉大学医学部 教授
小 林 紘 一 慶應義塾大学医学部 教授	藤 島 清 太 郎 慶應義塾大学医学部 講師
小 室 勝 利 国立予防衛生研究所 教授	藤 巻 道 男 東洋公衆衛生学院 学院長
斎 藤 英 彦 名古屋大学医学部 教授	藤 村 一 生産開発科学研究所 学術顧問
酒 井 清 孝 早稲田大学理工学部 教授	堀 進 悟 慶應義塾大学医学部 助教授
桜 井 靖 久 東京女子医科大学 教授	堀 原 一 筑波大学 名誉教授
鮫 島 達 也 青山学院大学理工学部 教授	松 本 脩 三 日本赤十字社血漿分画センター 所長
四 釜 慶 治 弘前大学教育学部 教授	宮 尾 秀 樹 埼玉医科大学総合医療センター 助教授
清 水 勝 東京女子医科大学 教授	宮 崎 保 札幌通信病院 名誉院長
清 水 慶 彦 京都大学再生医科学研究所 教授	村 田 満 慶應義塾大学医学部 講師
十 字 猛 夫 日本赤十字社中央血液センター 所長	元 木 良 一 福島県立医科大学 学長
平 明 鹿児島大学医学部 名誉教授	湯 浅 晋 治 埼玉県赤十字血液センター 所長
高 折 益 彦 岡山県赤十字血液センター 所長	

公開シンポジウム 会告

厚生科学研究研究成果発表会（一般向け） 「人工血液をつくる」

日 時： 平成12年2月11日（祝日）13:00~17:00
場 所： 慶應義塾大学 医学部 北里講堂
〒160 - 8582 東京都新宿区信濃町35
JR総武線・中央線
信濃町駅下車徒歩3分 新宿－信濃町＝約6分

参加費： 無 料

発 表：

1. 人工血液は何故必要か？
東京女子医科大学 教授 清水 勝
2. 血小板の働き
慶應義塾大学医学部 講師 半田 誠
3. 人工血小板をどのようにして作るのか？－その戦略－
慶應義塾大学医学部 教授 池田 康夫
4. 赤血球の働きと人工赤血球を用いる利点
慶應義塾大学医学部 教授 小林 紘一
5. 人工赤血球の作り方：酸素輸液展開の現状と展望
早稲田大学理工学総合研究センター 教授 土田 英俊
6. 新しい酸素運搬体の開発とその臨床応用
北海道大学医学部 教授 北畠 顕

主 催： 厚生科学研究（人工血液開発研究推進事業）
ヒューマンサイエンス振興財団

後 援： 日本血液代替物学会

連絡先：

〒169－8555
東京都新宿区大久保3－4－1
早稲田大学理工総研 55S-701室
担当 武岡 真司
電話：03-5286-3120, 03-5286-3217
FAX：03-3205-4740
e-mail: w169988@mn.waseda.ac.jp
home page: <http://www.jhsf.or.jp>

人工血液開発研究成果発表会（研究者向け） （厚生科学研究費研究成果等普及啓発事業）

主催：ヒューマンサイエンス振興財団

日 時： 平成12年2月23日（水）13:00~17:00
場 所： 全社協・灘尾ホール
東京都千代田区霞ヶ関3-3-2 新霞ヶ関ビル
電話 03-3580-0988

定 員： 200名

参加費： 無 料

申込方法：

往復ハガキに住所、氏名、所属及び2月23日研究成果発表会と
記入の上、財団事務局まで申し込んでください。

プログラム：

13:05 ～ 13:50

「人工血小板の開発に関する研究」

（座長）国立病院東京災害医療センター 副院長 邊見 弘
（演者）慶應義塾大学医学部 教授 池田 康夫

13:50 ～ 14:35

「酸素運搬機能を有する人工赤血球の創製と
その評価に関する研究」

（座長）東京医科大学 教授 友田 燐夫
（演者）早稲田大学理工学部 教授 土田 英俊

14:35 ～ 15:20

「酸素運搬機能を有する人工赤血球の開発に関する研究」

（座長）東京医科大学 教授 友田 燐夫
（演者）北海道大学医学部 教授 北畠 顕

15:30 ～ 16:15

「人工免疫グロブリン等の開発に関する研究」

（座長）千葉大学医学部 教授 平澤 博之
（演者）国立感染症研究所ウイルス第二部 室長 松浦 善治

16:15 ～ 17:00

「人工抗体ライブラリーの作製とその利用法の開発」

（座長）千葉大学医学部 教授 平澤 博之
（演者）藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授 黒澤 良和

連絡先：

（財）ヒューマンサイエンス振興財団

〒103－0001

東京都中央区日本橋小伝馬町13－4 共同ビル（小伝馬町駅前）

担当 佐藤 哲治

電話：03-3663-8641

ホームページURL：<http://www.jhsf.or.jp>

関連学会の会告

日本医工学治療学会第14回学術大会

(The 14th Annual Meeting of Japanese Society for Therapeutics & Engineering)

●会 期：2000年(平成12年)2月25日(金)～26日(土)

●会 場：ホテルセンチュリーハイアット

〒160-0023東京都新宿区西新宿2-7-2 Tel: 03-3349-0111 Fax: 03-3344-5592

●大 会 長：阿岸鉄三

●事務局長：佐藤雄一

●事 務 局：東京女子医科大学腎臓病総合医療センター

〒162-8666東京都新宿区河田町8-1

Tel: 03-3358-9582 / 03-5361-8028 Fax: 03-3358-9582 / 03-5361-8028

E-mail: na6t-ags@asahi-net.or.jp

INTERNET Home page URL: <http://www.asahi-net.or.jp/~na6t-ags/ags-gakujutu.html>

●一般演題募集..... I. インターネット上のホームページに入力

II. フロッピーディスクによる申込み

●演題募集締め切り..... 1999年(平成11年)11月30日(火)

●そのほか特別セッション..... 特別/教育講演, カレントコンセプト, シンポジウム, セミナー&デモ(講義と実技研修)
など立案・交渉中

詳細は、事務局へ問い合わせるか、INTERNET Home Pageを開いて見て下さい。

●編集後記●

編集委員に慶応大学医学部呼吸器外科堀之内宏久先生，慶応大学医学部血液内科村田満先生，東北大学医学系研究科環境保健医学仲井邦彦先生をお迎えしました。新企画も少しずつ実現に向かっております。血液代替物はBaxter社の撤退により当初のエネルギーがそがれた感が有ります。また血液製剤の安全性が向上し，輸血代替としての道以外の分野の開拓に眼を向けるべき

時期なのかもしれません。PFCもAlliance社が希釈式自己血輸血との組み合わせの第II相臨床試験で新しい方向を模索しています。一方わが国の吉富製薬のリコンビナントアルブミンは発売直前まで来ています。基礎研究と臨床応用に関して幅広い視野に立って企画編集していきたいと考えております。

(編集委員長 宮尾秀樹)

本号から編集委員に加えて頂くことになりました。研究には必ずその動機というものがあるはずで、本号でNIHでのワークショップの取材を掲載させて頂きますが、人工赤血球の場合、その1つの原点は、適当な酸素輸液がないがために救命できない患者が存在する、という臨床医の思い、であることを改めて感じ

ました。その実現にはまだ道のりは遠いのですが、その目標があるかぎり研究は必ず意味を持つものだ確信しています。本分野の進展に何かのお役に立てればと考えており、よろしくお願いいたします。

(仲井邦彦)

このたび血液代替物学会の事務局の移転に伴い事務を引き受けさせていただくこととなりました。また、編集委員会の裏方としての仕事もさせていただけることになり、重責に心が引き締まる思いです。学会の運営が少しでもスムーズになり、影響力

のある学会および学会誌となりますように微力ながら努力いたす所存です。会員の皆様にはよろしくご指導下さい。

(堀之内宏久)

この度、新しく「人工血液」の編集委員を仰せつかりました。元々、血栓止血学を中心とした血液学、特に血小板の分子生物学と血栓症の臨床研究が専門でしたが、5～6年前から血小板代替物の基礎研究を始めたのが御縁で、今回仲間に入れていただくことになりました。現在、厚生省高度先端医療研究事業、人

工血液開発分野「人工血小板の開発に関する研究」の班員を務めさせていただいております。血小板関連の論文について多少なりともお役に立てれば、と存じます。何卒宜しくお願い申し上げます。

(村田 満)

外科的侵襲時に!!

アセートリンゲル液

ヴェーン® F注

Veen-F Inj.

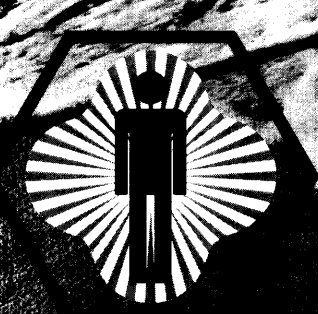
健保適用

特徴 ① 細胞外液又は組織間液の減少時に水・電解質の補給が可能です。

- 非機能的細胞外液の発生時に水・電解質の補給に適しています。
- Surgical diabetes状態でも血糖値の上昇を危惧することなく投与できます。

② ヴェーンF注は酢酸塩を配合しています。

- 酢酸は速やかに代謝されて、アシドーシスの補正に働きます。
- 酢酸は全身で代謝されるために、侵襲時や肝機能低下時にも有効に働きます。



(効能・効果)
循環血液量及び組織間液の減少時における細胞外液の補給・補正、代謝性アシドーシスの補正。

(用法・用量)
通常成人、1回500ml～1000mlを点滴静注する。投与速度は1時間あたり10ml/kg体重以下とする。なお、年齢、症状、体重に応じて適宜増減する。

(使用上の注意)

1. 慎重投与(次の患者には慎重に投与すること)
 - (1)腎疾患に基づく腎不全の患者〔酸塩基平衡の異常、電解質異常が起こることがある。〕
 - (2)心不全の患者〔体液量の過剰により心負荷を起こすことがある。〕
- (3)高張性脱水症の患者〔細胞内、組織間液が増加し浮腫を起こすことがある。〕
- (4)閉塞性尿路疾患により尿量が減少している患者〔体液量が過剰となることがある。〕

2. 副作用(まれに:0.1%未満、ときに:0.1～5%未満、副詞なし:5%以上又は頻度不明)

(1)大量・急速投与
脳浮腫、肺水腫、末梢の浮腫があらわれることがある。

3. 高齢者への投与
一般に高齢者では生理機能が低下しているため減量する等注意すること。

組成、適用上の注意、取扱上の注意等は製品添付文書をご参照下さい。

(資料請求先)

日研化学株式会社

本社 東京都中央区築地5-4-14
電話 ダイアルイン東京03(3544)8858

00457

投稿規定

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

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4部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。オリジナルのソフトおよびテキストファイル形式でも保存し提出すること。
- 2) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著者名、全著者所属、英文著者名、英文所属、ついで筆頭著者の住所、英文住所を記入する。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。
- 3) 総説、原著、および報告については、

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

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

1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
2. 砂本順三, 岩本 清. リポソームの調製. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編. リポソーム. 東京: 南江堂, 1988;21-40.
3. Fowler SA, Andracki M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Imobil 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、友田輝夫、仲井邦彦、西出宏之、堀之内宏久、村田満、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 (4) 1999年12月27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