

人工血液

第8巻 第1号 2000年4月

目次

総説	リコンビナントアルブミンの開発	小林 薫	1
	リポソームを用いた血小板代替物へのアプローチ	西谷孝子	6
原著	ホモゲンチジン酸によるヘモグロビンの酸化還元反応 と修飾反応	米田陽一	13
海外文献紹介	Perflubron乳剤投与で整形手術時の輸血を遅延させる ことができる	土田英俊・酒井宏水	21
	赤血球代替物としてのPerflubron治験論文への評価	高折益彦	26

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 8 No. 1 April, 2000

Contents

Review: Development of Recombinant Human Serum Albumin	Kaoru Kobayashi	1
Liposome-based Platelet Substitutes	Takako Nishiya	6
Original Article:		
Oxido-reductive Reactions and Modification of Human Hemoglobin Caused by Homogentisic Acid	Yoichi Yoneda	13
Topics: Summary and Comments on "Perflubron Emulsion Delays Blood Transfusions in Orthopedic Surgery"	Eishun Tsuchida, Hiromi Sakai	21
Comments on Clinical Study on Perflubron and for Clinical Trials on New Red Cell Substitute in the Future	Masuhiko Takaori	26

会 告

第7回日本血液代替物学会年次大会

テーマ： 「血液代替物臨床応用への戦略」

大会長： 北畠 顕 （北海道大学大学院医学研究科循環病態内科）

会 期： 2000年9月7日（木），8日（金）

会 場： かでる2・7

〒060-0002 北海道札幌市中央区北2条西7丁目

プログラム：

会長シンポジウム 血液代替物開発研究Update：2000 （指定）

特別講演1 わが国における血液代替物研究の歴史と将来 土田英俊（早稲田大学）

特別講演2 米国における人工血液研究の動向 Robert M. Winslow（Sangart Inc.）

教育講演 （指定）

シンポジウム 新たな人工酸素運搬体とその臨床応用 （指定）

ワークショップ1 海外における人工血液開発とわが国へのフィードバック

1. 臨床第三相試験の企画 Joseph DeAngelo（Apex Bioscience Inc.）

2. Hb修飾体の臨床応用 Christopher T. Privalle（Apex Bioscience Inc.）

3. PFCの臨床応用 Peter E. Keipert（Alliance Inc.）

ワークショップ2 わが国における人工血液臨床応用の問題点とその対策 （指定）

一般口演 （公募）

応募用紙： 人工血液2000年第8巻1号に綴じ込み
（または下記にご請求下さい）

演題募集： 一般演題（口演）

演題締切： 2000年5月27日（土）消印有効

演題送付先： 〒060-8638 北海道札幌市北区北15条西7丁目

北海道大学大学院医学研究科循環病態内科

第7回日本血液代替物学会年次大会

大会長 北畠 顕

事務局・連絡先：

北海道大学大学院医学研究科循環病態内科

事務局 佐久間 一郎

村井 雅奈子

TEL: 011-716-1161 内線6973, 6974

FAX: 011-706-7874

e-mail: cvsecret@med.hokudai.ac.jp

リコンビナントアルブミンの開発 Development of Recombinant Human Serum Albumin

小林薫

Kobayashi Kaoru

和文抄録

血漿由来の蛋白製剤を遺伝子組換えのそれらに置き換える必要性は、血漿原料由来ウイルスまたは細菌による感染の可能性があることから論を俟たない。リコンビナントアルブミン (rHSA) は、複数のクロマトグラフィーおよび膜処理工程を経て精製される。精製rHSA中の酵母由来不純物は、1ng/250mg rHSA以下であった。精製rHSAは、血漿由来アルブミン (nHSA) と同じ構造、物理化学的性状を示した。nHSAと比較して新たな抗原性が生じていないか精査したところ、その可能性は否定された。脱血・輸注モデル (ラット) を用い5%rHSAまたはnHSAの効力をみたところ、各製剤投与により膠質浸透圧がよく維持され、延命効果を示すことがわかった。nHSAを対照とする臨床比較試験では、同等性および安全性が証明された。rHSAは現在、培地成分、医薬品への添加剤、酸素輸液、超音波造影剤などへの利用が研究されている。

Abstract

The need to replace plasma proteins with those recombinantly produced is of great concern because of possible blood-transmitted viral and bacterial pathogens. Recombinant human serum albumin (rHSA) produced in *Pichia pastoris* has been thus developed as a potential substitute for plasma derived HSA (nHSA). Secreted rHSA in the culture broth is treated through several chromatographic and membrane filtration steps. Yeast components in purified rHSA are less than 1 ng/250mg rHSA. Purified rHSA has the correct stoichiometry identical to that of nHSA. Structural and physico-chemical analyses have proved essentially the same profiles between rHSA and nHSA. No neo-antigenicity different from nHSA was observed. Exchange-transfusion studies with rats using with either 5% rHSA or 5% nHSA have demonstrated that both the HSA maintain colloid osmotic pressure (COP) thus giving prolongation of survival periods. Comparison studies in clinical trials between rHSA and nHSA have shown the identical efficacy and safety data. Various uses such as additives, culture medium, oxygen carrier, ultrasound contrast medium are being investigated.

Key words

Recombinant human serum albumin, *Pichia pastoris*, Fermentation, Antigenicity, Exchange-transfusion, Clinical studies

はじめに

人血清アルブミン (HSA) は、主に肝臓において合成され、585個のアミノ酸からなる分子量約66.5 kDaの1本鎖で糖鎖を有しない単純たん白質である¹⁾。人血漿中のたん白質のおよそ60%がHSAであり、ビリルビンや脂肪酸などの低分子と結合してそれらの貯蔵や輸送たん白質として機能するとともに、その膠質浸透圧により血管内外の水分バランスを保ち、血液循環動態を維持する機能を有している²⁻³⁾。

医薬品としての血漿由来人血清アルブミン (nHSA) は、我が国においては1960年に実用化され (加熱人血漿たん白を含む)、現在最も汎用される血漿分画製剤である。また、nHSA製剤は発売当初より60℃、10時間の液状加熱処理が施されており、我が国における30年以上もの臨床使用においてもウイルス等の感染性

物質が伝播したとの報告が無く血漿分画製剤の中でも安全性の高い製剤であると認識されてきた。しかし、プリオン病であるクロイツフェルト・ヤコブ病 (CJD) 患者の血漿が混入した、または混入が疑われた原料プールから製造されたnHSA製剤 (加熱人血漿たん白質含む) が、米国だけでなく我が国においても回収されている。さらに、パルボウイルスB19のDNAがnHSA製剤中に検出される⁴⁾ などnHSA製剤といえども感染性物質伝播の可能性が否定できない事が改めて認識されるようになった。

また、血漿分画製剤の国内自給化は世界的な流れであり、1994年には国内自給の当面の目標であった血液凝固因子製剤 (インヒビター製剤を除く) の自給率が100%となり完全自給化が達成された⁵⁾。免疫グロブリン製剤やアンチトロンビンⅢ製剤についても献血量の増加や収率向上により順次国内自給化が推進

されるものと考えられる。しかしながら、nHSA製剤に関しては、1998年度においてもその自給率は26%にすぎず⁶⁾、収率向上の余地もほとんど無いことからnHSA製剤の自給化は厳しい状態にあると考えられる。

酵母を宿主として生産される組換え人血清アルブミン (rHSA) は、安全性の面からだけでなく、血漿分画製剤の国内自給の観点からも重要な役割を果たして行くものと思われる。このrHSAを医薬品として開発することを考えた場合、克服しなければならないポイントを列挙すると以下の3つに集約されるものと考えられる。

- (1) 非常に高い生産性 (経済性) が求められる。
nHSA製剤 (12.5 g/vial) が他の血漿分画製剤に比べて1gあたりの単価が安いことに起因する。
- (2) 大量に供給する必要がある。
nHSA製剤は、国内だけでも年間60トン以上使用されている。
- (3) 非常に高い純度が要求される。
臨床現場におけるnHSA製剤の投与量が多いことに起因している。出血性ショックに代表される急性の低蛋白血症では、100gを超えるHSAが投与される例も珍しくはない。

これら3点を同時にクリアしてはじめて医薬品としてのrHSAの開発に成功したといえるものであり、遺伝子組換え技術を応用したプロジェクトの中で最も困難なもの1つに数えられる⁷⁾ 所以である。

本稿では、rHSAの開発について全体をまとめてみた。

1. *Pichia pastoris*によるrHSA発現

我々がrHSA生産に用いている宿主株は、メタノール資化能を有する酵母として知られる*Pichia pastoris*である。*P. pastoris*は、米国、フィリップス社 (Phillips Petroleum Company) によって自然界から分離・同定された酵母であり、当初はSingle Cell Protein (我が国では、石油タンパクと称されていた) としての開発が試みられた。その後、フィリップス社は遺伝子操作技術の進展とともに、*P. pastoris*における宿主-ベクター系を確立し、効率よく機能することを示した⁸⁾。我々は、宿主-ベクター系に関する技術をフィリップス社より導入し、rHSAの開発に用いることとした。この系では、アルコールオキシダーゼのプロモーターが利用される。したがって、HSA構造遺伝子をアルコールオキシダーゼプロモーターの下流に配置した発現ベクターを酵母内に導入した遺伝子組換え酵母を構築すると (図1)、この酵母はメタノールを用いた増殖中にrHSAを培地中へ分泌発現する性質を持つよう

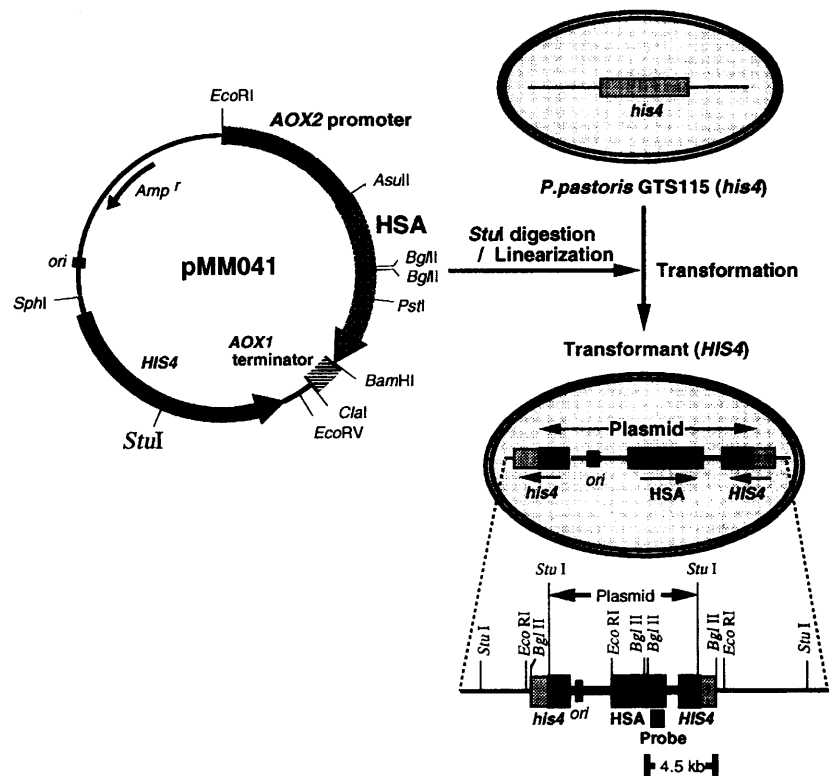


Fig 1 Structure of the HSA expression plasmid and *Pichia pastoris* transformant. *P. pastoris* GTS115 is a host strain which indicates histidine auxotrophy. The HSA expression plasmid containing the HIS4 gene as a selective marker was linearized and integrated into the chromosomal *his4* locus in the *P. pastoris* GTS115. Transformants were selected as to histidine prototrophy.

になる。実際にはプロモーターの改良⁹⁾ などさまざまな工夫をしているが、*P. pastoris*によるrHSA発現の基本は上述のとおりである。

2. rHSAの製造工程

nHSA製剤は、上述のとおり1バイアルあたり12.5gものHSAを含有しているにもかかわらず1バイアルあたりの単価は数千円である。さらに、国内だけでも年間60トン以上使用されている。このような製剤を組換え体を用いて供給するには、製造工程の第1段階である培養工程においては今までにない高い生産性が求められた。そのため、メタノールを発酵タンクに少しずつ加えながらrHSAの分泌を促す培養方法を実施している。これは、ピキア酵母がメタノール資化能を持つとはいえ、高濃度のメタノールは酵母菌体に対して阻害的に働くためである。ちなみに我々が使用している株はメタノール濃度が4% (v/v) 以上では増殖をほぼ停止してしまう。したがって、発酵タンクの1/4容量から培養を開始し、メタノールの蓄積をさたさないように注意しながらメタノールを添加している。約2週間で培養液は発酵タンク

の上限に達し、培養を終了する。

rHSAは培養液中に分泌されることから、培養工程の後、不要な酵母菌体を除いた培養上清を出発材料としてrHSAが精製される。rHSAは酵母を宿主として産生されていることから、rHSA以外の夾雑物である酵母成分については、これを徹底的に取り除く必要がある。また、同時に極端な回収率の低下も避ける必要がある。そのため、rHSAの精製には数段階のクロマトグラフィーと分画分子量の異なる数種類の膜処理が使用される。これらの組み合わせにおいてはさまざまな工夫がなされており、高純度と高回収率という相反しがちな事象を両立させている。

特に、酵母成分については1 ng/mlの検出感度を持つ酵素免疫測定法を構築しrHSAの純度を評価している¹⁰⁾。この測定系を用いても精製後のrHSA 1 ml (250mg) 中に1ngの酵母成分も検出されなかったことから、酵母成分から見たrHSAの純度は、99.999996%以上であると計算される。

3. rHSAとnHSAとの同一性

(1) たん白質レベルでの比較

アルブミンは、それ自身で例えば酵素のように活性を持っていない。したがって、rHSAとnHSAとの同一性に関しては、徹底的に両者のたん白質構造を比較する事で検証せざるを得なかった。表1に我々が測定した項目の一部を示した¹¹⁻¹⁵⁾が、いずれの分析においても両者の構造に差は認められなかった。

(2) 抗原性の比較¹⁶⁾

上述のように、rHSAは立体構造を含めた蛋白質レベルでnHSAと差が認められなかったことから、構造に起因する新たな抗原決定部位は存在しないものと考えられる。また、精製後のrHSA中に酵母成分は検出されなかったことから、非常に高純度な製剤が得られているものと考えられた。しかしながら、免疫原性の異同については十分に注意する必要がある。このため、nHSAあるいはrHSAをFreund's complete adjuvantとともにウサギに感作して得た抗血清を用いてrHSAの抗原性を評価した。モルモットを用

Table 1. Test items to prove the coincidence between rHSA and nHSA.¹¹⁻¹⁵⁾

Item	Contents
Primary structure	N-terminal amino acid sequence C-terminal amino acid Entire amino acid sequence Peptide map (reduced)
Secondary structure	CD spectra Peptide map (non-reduced) Number and positions of disulfide bridges Number and positions of sulfhydryl groups
Higher structure	NMR analysis X-ray crystallographic structural analysis
Physicochemical properties	Molecular weight Isoelectric point Capillary electrophoresis Ion exchange and reversed-phase chromatography Colloid osmotic pressure Viscosity Ligand binding properties

いたPassive Cutaneous Anaphylaxis (PCA) 反応の結果を写真1に示したが、抗rHSA血清はnHSA製剤で吸収処理することによりPCA反応が陰性化することが確認され、製剤として比べた場合においてもrHSAとnHSAで異なる抗原性はないことが示唆された。

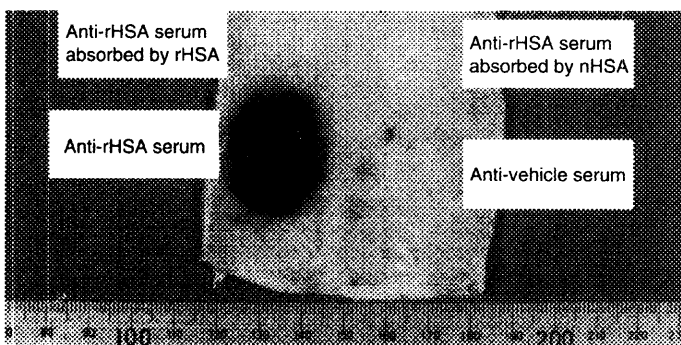


Photo 1 Passive cutaneous anaphylaxis reaction in guinea pig with anti-rHSA.

Anaphylaxis reactions were induced by intravenous administration of rHSA after 4h anti-rHSA sera injection into the back skin of guinea pig.

4. rHSAの効果 (ラット脱血交換モデル)

ラットを用いた交換輸注によりヘマトクリット値を10程度にまで希釈することにより、薬剤の血漿量維持効果を動物の生死により判定した。生理食塩液及び電解質輸液を用いて交換輸注を行なった場合、10例中9例の動物は10時間以内に死亡した。一方、5% rHSA及びnHSAにより交換輸注を行なった動物群においては、それぞれ10例中1~3例に死亡が見られたにすぎなかった。HSA製剤投与により膠質浸透圧は高く維持されており、延命効果をもたらしているものと考えられる (図2)。

5. 臨床試験

rHSAを用いた第1相臨床試験は、健康成人男子を対象に1993年に開始された。単回投与試験では、1.25 g/bodyより段階的に6.25, 12.5及び25.0 g/bodyまで投与量が増加された。反復投与試験においては、12.5 g/body/dayで3日間投与が行われた。その結果、rHSA

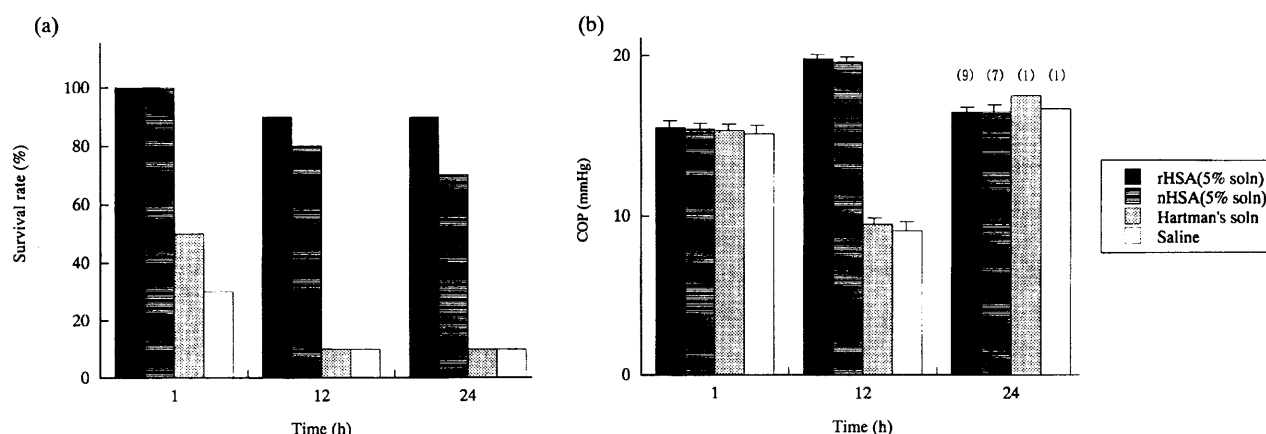


Fig 2 Changes of (a) survival rate, and (b) colloid osmotic pressure (COP) in the exchange-transfusion experiments with rats. The experiments were performed using 10 rats per each group. Figures in parenthesis in the graph indicate number of the surviving rats which could be determined COP.

投与による異常は認められず、安全性が確認された。また、rHSA 投与による抗酵母成分抗体の特記すべき上昇も認められなかった (表2)¹⁷⁾。この後、第2相及び第3相臨床試験へと移行し、rHSAの高い安全性と有効性が確認されている。特に、肝硬変による腹水を対象とした試験において、rHSAとnHSAの比較試験を行ない同等性が検証されている¹⁸⁾。また、ネフローゼ症候群による浮腫及び肝硬変による腹水においては、rHSAの繰り返し投与試験 (rHSAを一度投与された患者さんで、これらが再発しアルブミン製剤の投与が必要とされた患者さんに再投与) が実施された。これらの試験においても抗酵母成分抗体の特記すべき変動は認められず、IgE RIST, IgE RASTの推移にも異常は認められなかった。さらに、アナフィラトキシン及び免疫複合体についても検討し、rHSA繰り返し投与における安全性が確認された¹⁹⁻²⁰⁾。

最後に

将来的なrHSAの用途として、培地成分としての利用、現状ではnHSAやゼラチンが使用されているワクチンや生理活性物質製剤への添加剤としての利用、さらには血漿交換での使用や造影剤としての利用などが期待される²¹⁾。また、最近ではHSAとヘムとを結合させて酸素運搬体とする研究もなされており²²⁾、HSAが汎用的な物質であるがゆえrHSAについても発展性の広さが窺える。

また、本稿では紹介しきれなかったが、動物を使用した種々の毒性試験、効力薬理試験によってもrHSAの安全性と有効性が確認されている。我々が世界に先駆けて開発したrHSAは、現在、製造承認申請中であり、実用化に向けた最終段階にあるといえる。これにより、原料の大部分を輸入に頼っているアルブミン製剤の現状から脱却する糸口となることが期待される。なお、rHSAの商業生産用プラントは、1999年10月、北海道千歳市に竣工しており、槽容量80m³、最大稼動液量50 m³の培養槽4基で年間100万バイアルのrHSA生産を予定している。

Table 2 Changes of anti-pichia yeast component antibody in healthy volunteers (Phase I).

Dosage and administration	Number of patients	Anti-Pichia Yeast Component Antibody (A.u.)			
		Before administration	1 week after completion of administration	1 month after completion of administration	3 months after completion of administration
1.25 g/body	5	10.94±9.13	10.40±8.30	11.72±9.51	11.86±9.23
6.25 g/body	5	14.62±8.41	17.21±10.69	17.41±10.65	18.92±13.20
12.5 g/body	5	2.46±2.83	2.64±3.08	2.86±3.37	2.14±2.40
25.0 g/body	5	9.36±10.99	9.71±10.35	9.80±10.23	9.59±12.05
12.5g, Repeated administration for 3 days	5	25.90±27.61	29.59±33.95	28.25±32.77	27.03±27.67

参考文献

- Minghetti PP, Ruffner DE, Kuang W-J, Dennison OE, Hawkins JW, Beattie WG, Dugaiczky A. Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4. *J Biol Chem* 1986; 261: 6747-6757.
- Peters T. Serum albumin. In: Putnam FW Ed. The plasma proteins. 2nd ed. Vol. 1. New York: Academic, 1975; 133-181.
- Foster JF. Some aspects of the structure and conformational properties of serum albumin. In: Rosenoer VM, Oratz M, Rothshild MA eds. The albumin structure, function and uses. Oxford: Pergamon, 1977; 53-84.
- Saldanha J, Minor P. Detection of human parvovirus B19 DNA in plasma pools and blood products derived from these pools: implications for efficiency and consistency of removal of B19 DNA during manufacture. *Br J Haematol* 1996; 93: 714-719.
- 市未修. 血液凝固因子製剤の必要量調査結果の概要. 血液製剤調査機構だより1996; 31: 2-10.
- 臼井了志. 血漿分画製剤の需給状況と自給率. 血液製剤調査機構だより1999; 52: 5-6.
- Fleer R, Yeh P, Amellal N, Maury I, Fournier A, Bacchetta F, Baduel P, Jung G, L'Hote H, Becquart J, Fukuhara H, Mayaux JF. Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces* yeasts. *Bio/Technology* 1991; 9: 968-975.
- Cregg JM, Tschoep JF, Stillman C, Siegel R, Akong M, Craig WS, Buckholz RG, Madden R, Kellaris PA, Davis GR, Smiley BL, Cruze J, Torregrossa R, Velicelebi G, Thill GP. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 1987; 5: 479-485.
- Ohi H, Miura M, Hiramatsu R, Ohmura T. The positive and negative cis-acting elements for methanol regulation in the *Pichia pastoris* AOX2 gene. *Mol Gen Genet* 1994; 243: 489-499.
- Ohtani W, Ohda T, Sumi A, Kobayashi K, Ohmura T. Analysis of *Pichia pastoris* components in recombinant human serum albumin by immunological assays and by HPLC with pulsed amperometric detection. *Anal Chem* 1998; 70: 425-429.
- 大谷渡, 真崎厚司, 池田義孝, 広瀬正明, 中元寺雅子, 竹島一哉, 近藤雅英, 鷺見昭典, 大村孝男. 組換えヒト血清アルブミンの構造・組成分析. *薬学雑誌* 1997; 117: 220-232.
- Ikegaya K, Hirose M, Ohmura T, Nokihara K. Complete determination of disulfide forms of purified recombinant human serum albumin, secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Anal Chem* 1997; 69: 1986-1991.
- Ohtani W, Nawa Y, Takeshima K, Kamuro H, Kobayashi K, Ohmura T. Physicochemical and immunochemical properties of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris*. *Anal Biochem* 1998; 256: 56-62.
- 竹島一哉, 大谷渡, 鷺見昭典, 大村孝男. 組換え型ヒト血清アルブミンの多分子結合能及びエステラーゼ類似作用. *薬学雑誌* 1996; 116: 622-629.
- Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Engineering* 1999; 12: 439-446.
- 入江弘之, 方山和幸, 今井直人, 内藤寿英, 小柴博, 川畑好之康, 花田秀一, 岩井正和, 阿部俊一. 遺伝子組換えヒト血清アルブミン (rHSA) の抗原性試験—血漿由来ヒト血清アルブミンとの比較—. *薬理と治療* 1997; 25: S1925-S1931.
- 東純一, 山本勇, 青木敏郎, 橋田進, 徳田浩三, 瀬戸米蔵. GB-1057 [人血清アルブミン (組換え型)] の第I相臨床試験. *臨床と研究* 1997; 74: 2841-2855.
- 鎌田武信, 戸田剛太郎, 笠原彰紀, 植松幹雄, 花岡一雄, 湯浅晋治. 肝硬変による腹水に対するGB-1057 [人血清アルブミン (組換え型)] と血漿由来人血清アルブミンの多施設群間比較試験. *臨床と研究* 1997; 74: 2884-2899.
- 鎌田武信, 戸田剛太郎, 笠原彰紀, 植松幹雄, 湯浅晋治. 肝硬変による腹水に対するGB-1057 [人血清アルブミン (組換え型)] の繰り返し投与試験. *臨床と研究* 1997; 74: 3128-3137.
- 越川昭三, 太田善介, 出浦照國, 横野博史, 吉村吾志夫, 湯浅晋治. ネフローゼ症候群における浮腫に対するGB-1057 [人血清アルブミン (組換え型)] の繰り返し投与时における有効性, 安全性および抗体産生の有無の検討. *臨床と研究* 1997; 74: 3138-3148.
- Jones EC. Prospect for a recombinant albumin. *J Am Blood Resources Assoc* 1996; 4: 108-110.
- Komatsu T, Hamamatsu K, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E. Human serum albumin-bound synthetic hemes as an oxygen carrier: determination of equilibrium constants for heme binding to host albumin. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 1998; 26: 519-527.

リポソームを用いた血小板代替物へのアプローチ Liposome-based platelet substitutes

西谷孝子

Takako Nishiya

和文抄録

血小板輸血には、供給の不足、感染症の伝播、発熱、同種免疫の成立など数々の問題が指摘されている。これら諸問題への対応として、献血血液由来の血小板製剤に代わる血小板代替物の創製が報告されている。ここでは、これまでに試みられてきた血小板由来のプロダクト、および血小板を用いずに創製された新しいプロダクト、特に血小板膜蛋白の遺伝子組み換え体を固定化したリポソームについて紹介する。

Abstract

Despite advances in human platelet concentrate preparation and storage, the available platelet products continue to be associated with significant risks to recipients. These risks include: transmission of infectious diseases, febrile reaction, and development of alloimmunization. Furthermore, the liquid-stored platelet preparations currently available have a limited shelf life, and they are often in short supply. In addition to products derived from human platelets, there are platelet substitutes that are not platelet-derived, and have shown to be capable of hemostasis. In this article reviewed are some of the novel approaches that have been taken to develop novel human platelet products and substitutes, focussed on the preparation of liposomes with covalently bound recombinant platelet membrane glycoproteins.

Key words

Platelet substitutes, liposomes, recombinant GPIIb/IIIa, recombinant GPIb α , collagen, von Willebrand factor.

1. 序

生命活動由来の物質を取り扱う科学として生まれた有機化学は、原子間の共有結合を巧妙にコントロールして複雑な分子を構築するために、広範囲にわたる極めて高度で有効な方法論と化学論理を確立した。Friedrich Wohler が1828年に尿素を合成して以来150年の道のりを経て、有機化学は、高い効率と選択性を備えたエレガントな有機合成法を確立し、Robert B. Woodward, Albert Echenmoser と多くの協力者によるVitamin B₁₂の全合成に至った。この時点で、化学者たちは、生体系に見いだされるいかなる分子も原理的には合成可能であり、生命現象に見られる脱離、置換、転移、付加、などの反応も、本質的には“化学反応”という共通の言葉で語ることができ、生体系とは独立した純粋な実験室で取り扱うことができるという確信を持った。彼らの次なる目標は共有結合を介しない分子間相互作用であった。分子間相互作用は、基質のレセプター蛋白への結合、酵素反応、複数の蛋白から成る集合体形成、抗原抗体反応、遺伝子コードの

転写、翻訳、DNA結合蛋白による遺伝子発現の制御、細胞へのウイルスの進入、神経伝達物質によるシグナルの誘導、細胞間の認識など、生体系に見られる高度に特異的な認識、反応、輸送、制御の基礎となるものである。このような分子間相互作用を人工系で再現しようという試みのなかで、化学者たちは、生体系の精巧さにヒントを得て、生体系と同様の高い効率、選択性、反応速度を達成することに成功した。

生命現象特有の能動輸送や共役反応は、機能を持った分子が生体膜へ組み込まれ、さらに膜の中で他の機能性分子と相互作用して、ある構造、機能をもつ分子システムを作ったとき初めて発現されるプロセスで、まさに分子間相互作用が基礎になっている。従って、生体膜の構造や性質を理解することは、非生命現象から生命現象へ前進するために重要なことである。生体膜の構造は、1972年Singer-Nicolsonが提唱したfluid-mosaicモデルで説明されている。生体膜の基本的な構造は脂質二重膜で、膜内では脂質や蛋白質は分子間相互作用により、側方拡散運動(lateral diffusion)、フリップフロップ(transverse diffusion)、異方性

軸回転運動(anisotropic axial rotation), トランスゴーシュ変換などの分子運動をしている。1964年, Banghamらは、卵黄ホスファチジルコリンの水溶液中懸濁物が、イオンなどに対してバリエーションを有する閉鎖小胞であることを見出し、1965年には、生体膜の構成成分であるリン脂質を水溶液中に懸濁すると、閉鎖小胞を形成し、小胞内部の水層にイオンやグルコースなどの親水性物質を内包しうることを確認した。このような閉鎖小胞をリポソームと呼ぶ。リポソームの基本的な構造は脂質二重膜で、生体膜の構造と類似していることから、膜機能を再構成する際に広く用いられている。また、pHの変化に応じてその構造や性質が変化するリポソーム、血管内で長い寿命を持つリポソーム、核酸を内包できるカチオン性リポソームなどが開発され、それらの臨床研究における有用性が認められている^{1,2)}。リポソームは内部の水層に親水性物質を内包し、脂質部分には親油性物質を埋め込むことができるので、特定の部位に薬物などを運搬するドラッグデリバリーシステムとしても用いられている。リポソームを特定の部位と相互作用させる方法は“targeting”と呼ばれており、リポソームにその標的に対する高い特異性と親和性を持たせなければならない。そのためには、標的となる細胞や組織の性質に応じていろいろな方法が考えられているが、標的となる部位に特異的に存在する物質に対して高い親和性を持つ物質をリポソームの表面に固定化する方法が一般的に用いられている。

現在私はリポソームを用いた血小板代替物の開発研究という壮大なテーマに取り組んでいる。どんなに新しい科学の領域でも常に過去と何らかの関連を持っているものである。150年以上にわたる有機化学の輝かしい進歩を顧みると、一見、難解、到達不可能に思える人工血小板の創製も、21世紀の科学として幾分かの足跡を残すことができるかもしれないと思うのは、私の楽天的な性格によるものであろうか。

2. 血小板代替物の必要性

悪性腫瘍や造血器疾患に対する根治療法として強力な化学療法や骨髄移植が普及した結果、それらの支持療法として、輸血療法の重要性が一層認識されるようになってきている。しかし、輸血後感染症や免疫異常などの副作用の回避もまた重要な課題となって来ている。最近のFDAの調査によると、血液製剤の投与を受けた患者1000人のうち2.7人がウイルス感染の危険性に晒されていることが明らかになった³⁾。過去10年の間に、輸血後感染の危険性は著しく減少したが⁴⁾、なお解決すべき問題として残されており、多くの研究者が献血血液由来の血液製剤に代わるもの、即ち血液代替物の創製を試みている。赤血球についてはヘモグロビン修飾体やリポソーム包埋型ヘモグロビンなどの人工赤血球について研究開発が以前から進められている^{5,6)}。血小板輸血は、補助治療法としてその重要性が増しており、血小板製剤の使用量は最近では毎年約10%も増加している。血小板輸血での問題点としては、供給不足と緊急時供給体制の不備があり、他の血液製剤と同様、輸血副作用発現の危険性がある。血小板製剤は22℃で振とうして保存され、その有効期限は日本

では3日間、欧米では5日間に限られている。献血体制が整った先進国では通常の場合、血小板製剤の供給体制は比較的整備されているが、僻地や災害発生時にはその供給が不足することが予想される。また、医療施設が整っていない低開発国などでは、血小板製剤の不足は深刻な問題であろう。このような問題を解決する為に、血小板製剤の保存法の改善、感染症の伝播を防ぐためのウイルスの不活性化や除去についての研究が行われている。一方、長期間保存可能、常時使用可能、感染症伝播の可能性がなく、繰り返し使用することが出来る血小板代替物の開発研究は21世紀の医療の目指す一つの方向として注目を集め始めている。表1に、これまでに試みられてきた血小板由来のプロダクト、および血小板を用いずに創製された新しいプロダクトを示した。ここでは、これらのプロダクトについて概略するとともに、わが国で1997年に厚生省高度先端医療研究事業「人工血液開発研究」により組織された人工血小板研究班によって開発が進められている血小板代替物を紹介する。

3. 血小板由来のプロダクト

血小板を22℃で保存する従来の方法では避けることのできない問題点を解決する為に、血小板の長期保存に関しては、凍結保存、低温での液状保存などが試みられている(表1, A)。凍結保存では、血小板はDMSOを凍結保護剤として用いて、マイナス80℃で数年間保存することができ、解凍後の血小板の回収率はin vitro で約75%, in vivo で約33%と報告されている⁷⁾。しかし、DMSOを用いると血小板を解凍後、輸血する前に入念な洗浄操作が必要であるため、DMSOに代わる凍結保護剤として、glycerol, mannitol, polyvinyl-pyrrolidoneを含む溶液が検討されている⁸⁾。凍結保存血小板は解凍後、血小板減少症患者にされ、一定の臨床効果をもたらすことが示されている^{8,9)}。

一般に血小板は冷却により活性化し、低温保存後は、その生体寿命は短くなることもあって、血小板の低温保存は行われていない。これらの低温保存の問題を解決するために、いくつかの薬物が試みられている。最近の例では、polar fishesの血液から単離された antifreeze glycoproteins (AFGP) の存在下で洗浄血小板を4℃で保存すると、低温保存による血小板の機能や形態学的変化を防ぐことが可能で、これは、AFGPが温度変化による膜の相転移と細胞内容物の流出を押さえるためであると報告されている^{10,11)}。

血小板のmicroparticlesは保存中に自然に形成される物であるが、凍結保護剤無しで反復凍結融解させることによって形成される。血小板膜のフラグメントやmicroparticlesの止血効果は以前から認められていたが、最近、米国のPRP社が、期限切れ血小板輸血製剤を反復凍結融解させることにより血小板を破壊し、加熱処理後乾燥させた粉末製剤を開発した。この物質はInfusible Platelet Membrane™ (IPM)、またはCyplex™と呼ばれ、加熱処理をしてあるため感染症のリスクが少ないこと、抗原が認められないため免疫原性が少ないこと、白血球の混入がないので発熱などの反応がないこと、保存可能期間が長い(4℃で36ヶ月)ことなどの利点があり¹²⁾、臨床第II相試験まで行われ

表1. これまでに試みられた血小板代替物

A. 血小板由来のプロダクト	
1.	凍結保存血小板
2.	低温液状保存血小板
3.	血小板膜のフラグメント又はmicroparticles
4.	光化学処理した血小板
B. 人工血小板（血小板非由来）	
1.	フィブリノーゲン又はRGD peptides を共有結合で表面に固定化した赤血球
2.	表面に血小板膜蛋白を持つリポソーム
3.	表面をフィブリノーゲンでコーティングしたアルブミン粒子

たが、その有用性に疑問が持たれその臨床開発は中止された。

血小板製剤に混入しているウイルスの除去や不活性化に関しては、最近、psoralen や ultraviolet A (UVA) light を用いた光化学的処理が有効であることが報告されている。Psoralen-UVA で処理した血小板製剤は現在 臨床第III相試験 の段階で21世紀には臨床応用できる可能性がある¹³⁾。

4. 人工血小板（血小板非由来）

血小板の機能は、一次止血（粘着、放出、凝集）、二次止血（向凝固活性）、血餅退縮など非常に複雑で、血小板のすべての機能を人工的に再現することは不可能とってさしつかえない。血小板機能のなかで止血に最低限必要な最も基本的かつ重要なものは、粘着と凝集である。このことは血小板膜糖蛋白、たとえばGPIb/IX/V 複合体やGPIIb/IIIa の欠如、分子異常によって粘着や凝集が障害される出血性疾患、Bernard-Soulier 症候群や血小板無力症において、出血傾向が強く認められることから明らかである。従って、最も単純な人工血小板として、粘着と凝集の機能をつかさどっているこれらの膜受容体蛋白を適当な担体に固定化したものを考えることができる。また、残存している正常な血小板の機能を補助、増幅できるように、例えば、活性化血小板と結合しうるフィブリノーゲンやRGD ペプチドを適当な担体に固定化したものも人工血小板の一つと考えることができる。

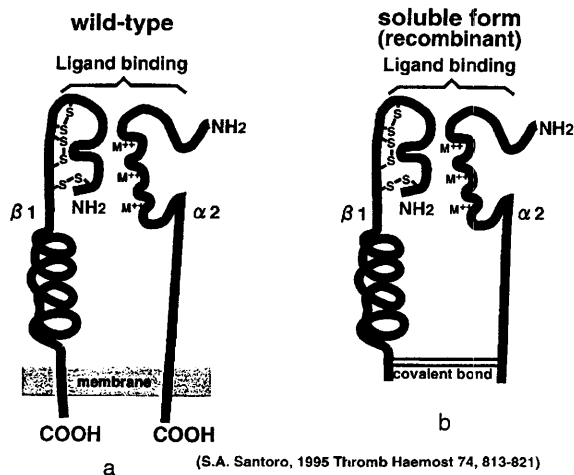
固定化する機能蛋白として粘着に重要なvon Willebrand factor (vWf) の受容体であるGPIb/IX/V 複合体、コラーゲンの受容体であるGPIIa や凝集に必要なGPIIb/IIIa などを用いると、正常な血管内皮とは相互作用せず、血管が障害をうけたときに露出する血管内皮下組織のコラーゲンやvWf を標的として、血管損傷部位に特異的に集積する粒子を創ることができる。また、フィブリノーゲンやRGD ペプチドを機能発現物質として用いると、活性化血小板と特異的に相互作用し血小板の凝集塊の中に巻き込まれる物質を創ることができる。機能発現物質を固定化

する担体としては、生体適合性に優れ、機能蛋白を十分に固定化できる適当な大きさを持つものがよい。このようなアイデアに基づいて、これまでに開発されたいくつかの物質を表1. B に示した。

フィブリノーゲンを正常ヒト赤血球に共有結合で固定化した物質は、正常血小板の凝集塊の中に巻き込まれ、血小板減少ラットに投与するとラットの出血時間が短縮することが報告されている¹⁴⁾。Thromboerythrocytes と呼ばれる物質は、フィブリノーゲンのアミノ酸配列の中でGPIIb/IIIaによって認識されると考えられているRGD 配列を持った合成ペプチド、Ac-CGGRGDF-NH₂、を赤血球膜に共有結合で固定化したもので、この物質は活性化血小板と特異的に相互作用し凝集塊に巻き込まれ、血小板減少症において出血傾向を緩和することが報告されている¹⁵⁾。Deoxycholate で可溶化した血小板膜蛋白をリポソームに固定化したPlateletsome は、GPIb, GPIIb/IIIa, GPIV など15種類の膜蛋白を含んでおり、血小板減少ラットや血小板機能異常ラットに投与すると尾切後の出血量が減少することが報告されている¹⁶⁾。Thrombosphere とSyntocytes は、アルブミン粒子の表面をフィブリノーゲンで共有結合、又は物理的吸着によりコーティングしたもので、血小板凝集塊へ巻き込まれ、血小板の放出反応を促進し、血小板減少ラットに投与すると、延長していた耳切後の出血時間が用量依存的に短縮することが報告されている^{17, 18)}。

日本では、1997 年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、このプロジェクトの一環として、私は、血管障害部位へ特異的に集積し、血小板減少時の血管壁の脆弱性を補強しうる物質として、血管内皮下組織の構成成分であるコラーゲンやvWfのレセプターであるGPIIa 複合体やGPIb α の遺伝子組み換え体を固定化したリポソーム、rGPIIa-liposomes¹⁹⁾、rGPIb α -liposomes^{19, 20)}、および、2つのレセプターを固定化したリポソーム、rGPIIa-Ib α -liposomes²¹⁾、を創り、それらの流動状態下でのコラーゲンまたはvWf 表面との相互作用を検討している。コラーゲンの受容体であるGPIIa は図1-a に示したようなインテグリン α_2 と β_1 の複合体であるが、図1-b のような細胞内ドメインを持たない遺伝子組み換え体を用いた。vWf受容体としては、図1-c に示したGPIb/IX/V 複合体のvWf 結合部位、即ち、GPIb α のN末端細胞外ドメインに存在する45 kDa 領域（アミノ酸残基1-302）の遺伝子組み換え体を用いた。rGPIIa-liposomes とrGPIIa-Ib α -liposomes は、コラーゲン表面に接触後直ちに静止して非可逆的に粘着し、流動状態下における血小板のコラーゲンへの粘着と同様、リポソーム上のGPIIa がコラーゲンと相互作用をおこすことが確認され、rGPIIa-liposomes とrGPIIa-Ib α -liposomes は有望な血小板代替物と考えられるが、残念なことにその詳細についての記述は、遺伝子組み換えGPIIa 複合体の特許性の確立を待たなければならない。ここでは、rGPIb α -liposomes と血小板型von Willebrand病(vWD)患者に発見された遺伝子変異GPIb α の遺伝子組み換え体、rM239V、を固定化したリポソーム、rM239V-liposomes、の流動状態下におけるvWf 表面、および可溶性vWf との相互作用について比較検討し、これらのリポソームの有用性について述べる。

インテグリン $\alpha_2\beta_1$



GPIb-IX-V 複合体

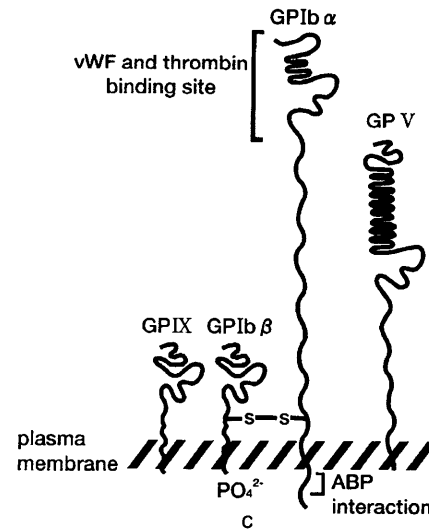


図1

5. 流動状態でvWf 表面と相互作用するリボソーム

5-1. rGPIb α -liposomes^{19, 20}

rGPIb α -liposomes とvWf 表面との相互作用は、蛍光顕微鏡を用いて測定した。この方法では、rhodamine でラベルしたリボソームがvWf 表面と相互作用する様子を蛍光顕微鏡で連続撮影し、イメージプロセッサで画像解析を行った²²⁾。rGPIb α -liposomes とvWf 表面との相互作用に対するリボソーム表面のrGPIb α 密度とvWf 濃度の影響を調べるため、リボソーム表面のrGPIb α 密度が4000, 2800, 700 molecules/ μ m² である3種類のリ

ポソームと、3種類の異なったvWf 濃度を持つ表面を作った。固定化vWf は、polycarbonate でコーティングしたガラス板をvWf 溶液に4℃で12時間浸し、余分のvWf をPBS で洗浄して作製し、表面のvWf 濃度はperoxidase が結合したウサギ抗ヒトvWf 抗体を用いて、ELISA で測定した。コーティングに用いたvWf 溶液の濃度と表面のvWf 濃度の関係を図2に示す。実験には、0.1, 1.0, と100 μ g/ml のvWf 溶液をコーティングに使い、測定はすべて洗浄赤血球中、ヘマトクリット37.5%, 血小板濃度1.25 x 10⁴/ μ l, 37℃で行った。rGPIb α -liposomes とvWf 表面との相互作用は可逆的、即ち、リボソームはvWf 表面と接触後直ちに静止して粘着するのではなく、表面を流動方向へ移動し、その移動速度、表面に滞在する時間、および表面と相互作用するリボソームの数は、リボソーム表面のrGPIb α 密度とvWf 濃度に依存しており、vWf 表面と相互作用するrGPIb α -liposomes の数は、リボソーム表面のrGPIb α 密度とvWf 濃度が高いときは大きく、これらの値が小さくなるに従って減少した(図3)。1.0 と100 μ g/ml のvWf 溶液を用いて作ったvWf 表面では、リボソームは表面との接触を保ちながら流動方向へ移動し、その移動速度は、リボソーム表面のrGPIb α 密度とvWf 濃度が高いときには小さく、これらの値が小さくなるに従って大きくなった(図4)。0.1 μ g/ml のvWf 溶液を用いて作ったvWf 表面では、リボソームは短時間表面と接触するのみで、表面に滞在する時間は、rGPIb α 濃度が4000 molecules/ μ m² であるリボソームでは約250 ms, rGPIb α 濃度が2800 molecules/ μ m² であるリボソームでは33 ms 以下で、rGPIb α 濃度が700 molecules/ μ m² であるリボソームでは表面との相互作用は見られなかった。また、コラーゲン表面との相互作用は起こらず、ずり速度が大きくなるのに伴って、vWf 表面と相互作用するrGPIb α -liposomes の数は増加するという結果(図5)は、rGPIb α -liposomes は正常血小板と同様にvWf

コーティングに用いたvWf 溶液の濃度と表面のvWf 濃度との関係

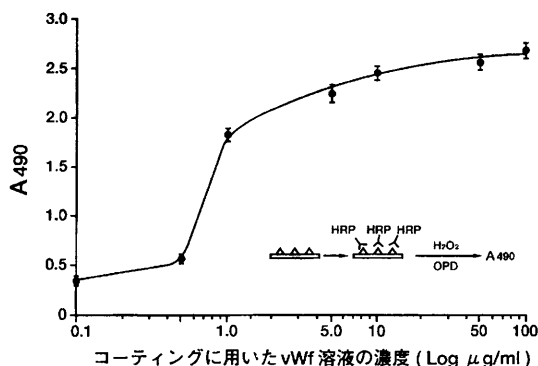
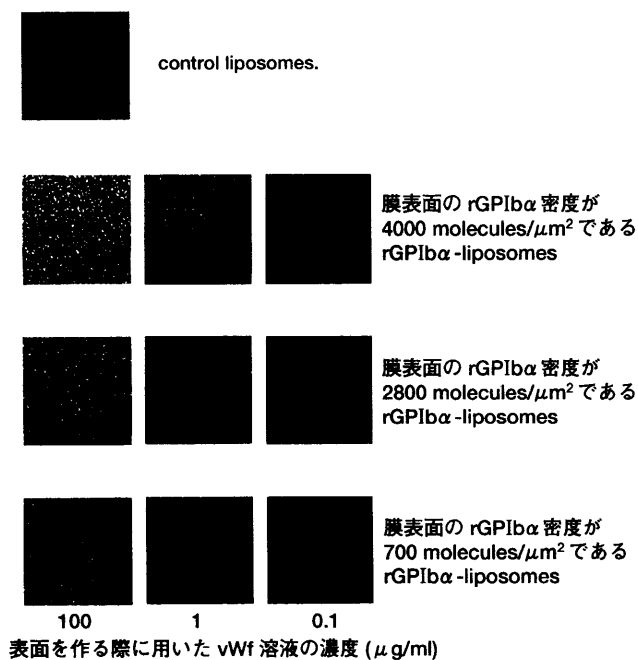


図2

流動状態下での rGPIb α -liposomes と vWf 表面との相互作用に対する rGPIb α 密度と vWf 濃度の影響



画像は、かん流開始5分後にとったもので、測定条件はずり速度 2400 s^{-1} , ヘマトクリット 37.5%, 37°C.

図3

表面と特異的に相互作用し、この相互作用は単なる吸着反応ではなく、恐らく蛋白のコンフォメーションに依存した蛋白間相互作用によって厳密に制御されていることを示唆している。まだ preliminary ではあるが、rGPIb α -liposomes を血小板減少ラットに投与すると中等度の血小板減少時において出血時間の短縮が認められた。

5-2. rM239V-liposomes

vWf は血液中にも存在するが、循環血液中においては通常 GPIb/IX/V 複合体と結合しないことから、この相互作用は生理的止血ならびに病的止血防止のために、特別な条件下でのみ引き起こされるよう制御されているものと考えられる。実験的にこの相互作用を引き起こすためには誘導物質や特別な条件が必要である。例えば、蛇毒ボトロセチン、または、抗生物質のリストセチンを加えた場合、vWf を脱アシル化した場合、vWf を固相化した場合、高ずり応力下においた場合などで、特に生体内における高ずり応力による血小板凝集は、血小板代替物を考える上で重要である。正常では、vWf 依存性の血小板凝集は 80 dyne/cm 2 (2100 s^{-1} のずり速度に相当する) 以上の高ずり応力の

rGPIb α -liposomes の移動速度に対する rGPIb α 密度と vWf 濃度の影響

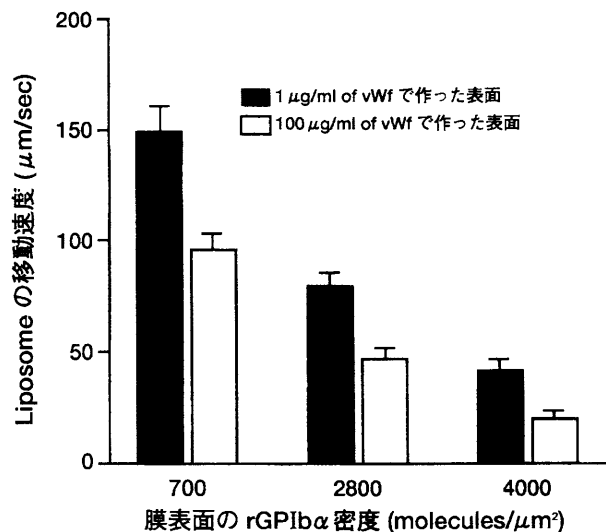
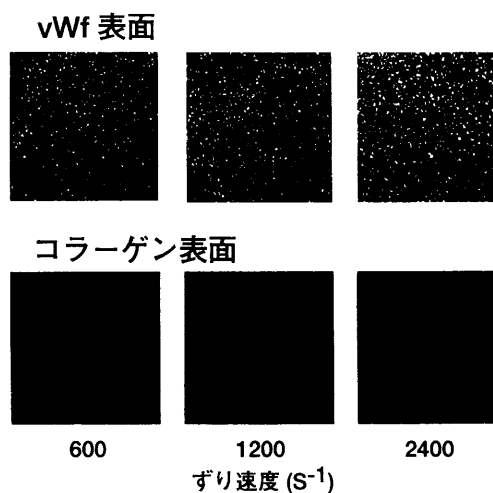


図4

rGPIb α -liposomes と vWf 表面との相互作用に対するずり速度の影響



画像は、かん流開始5分後にとったもので、vWf 表面は 100 $\mu\text{g/ml}$ vWf 溶液で、コラーゲン表面は 30 $\mu\text{g/ml}$ のコラーゲン溶液で作った。rGPIb α -liposomes の膜表面上の rGPIb α 密度は 4000 molecules/ μm^2 。

図5

vWf 表面上における リポソームの移動速度

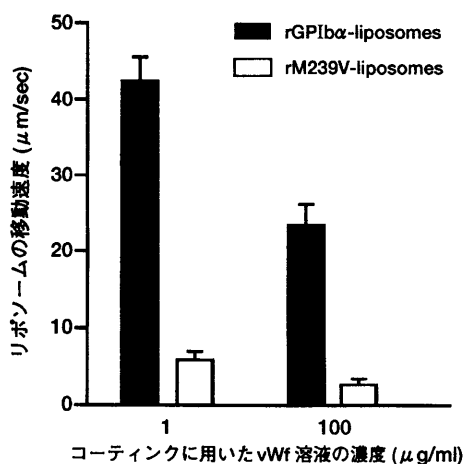


図6

可溶性vWfによるリポソームの凝集

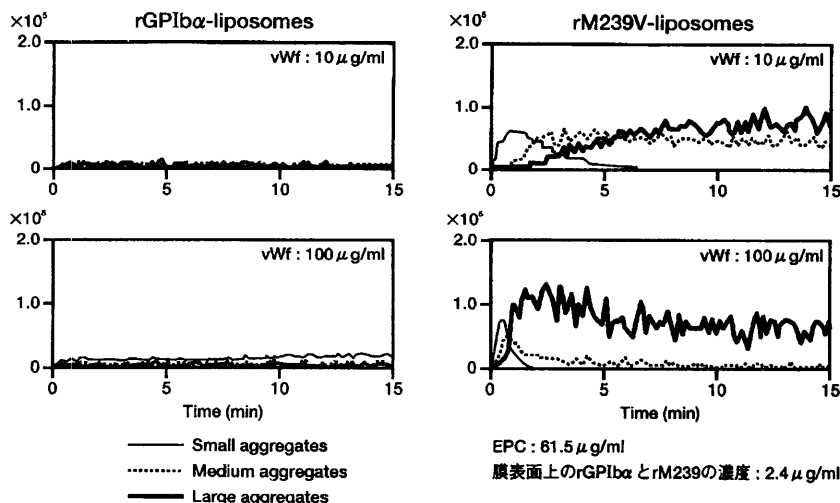


図7

付加により認められるが²³⁾、血小板型 von Willebrand 病(vWD)患者では、その凝集が15 dyne/cm² (400 s⁻¹ のずり速度に相当する)程度の低ずり応力の付加でも容易に惹起されることが報告されている²⁴⁾。GPIbα のN末端細胞外ドメインに存在する45 kDa 領域のvWf 結合部位のなかで、239 番アミノ酸残基Met がVal に置換した遺伝子変異が血小板型vWD 患者に発見され、アミノ酸残基1-302 の中で239 番アミノ酸残基Met がVal に置換された遺伝子組み換えGPIbα, rM239V, はリストセチンを誘導物質として使用した場合では、正常型 rGPIbα と比較し、低濃度(0.2 mg/ml) のリストセチン存在下でvWf と結合することが明らかになった。また、健康人血小板のリストセチン凝集を、rM239V は正常型rGPIbα に比べて極めて低濃度で抑制することから、rM239V は vWf に対し強い結合能を持っているものと思われる²⁵⁾。著者らは、正常型rGPIbα-liposomes と同じ方法でrM239V を固定化したリポソーム, rM239V-liposomes, を創り、vWf 表面、及び可溶性vWf との相互作用について、正常型rGPIbα-liposomes と比較検討した。rM239V-liposomes がvWf 表面を移動する速度は、正常型rGPIbα-liposomes の移動速度の11-14% と非常に遅く (図6)、vWf 濃度の低い場合にも、正常型rGPIbα-liposomes の表面滞在時間は約250 ms であるのに対し、rM239V-liposomes では約830 ms であった。可溶性vWf 存在下では、正常型rGPIbα-liposomes はvWf と相互作用しないが、rM239V-liposomes は速やかにvWf と結合し、溶液中のリポソームは一つの大きな凝集塊となった (図7)。これらの結果は、rM239V は固定化vWf に対してだけでなく、可溶性vWf に対しても大きな親和性を持つことを示しており、vWD 患者では、正常では決して起こり得ないvWf とGPIbα との結合が生じ、血小板凝集が惹起され、vWf と血小板の消費性減少が起こり出血傾向を呈す

という病態上の性質と一致している。血小板代替物は、循環血液中では不活性で固定化vWf やコラーゲンに対してのみ高い親和性をもつべきであるので、rM239V-liposomes は人工血小板としては不適格であるが、生理的止血血栓や病的血栓形成のかぎ鍵を握るGPIb-vWf 相互作用の解明や、GPIb 分子構造と機能関連の解析などに役立つ可能性がある。

6. 結び

これまで述べてきたように、蛋白をリポソームに固定化することにより蛋白本来の機能を膜表面に再現することが出来、さらに、脂質部分や内水層に工夫を凝らすことによって、複数の機能を持ったリポソームを創り出すことができる。例えば、膜の構成成分を変化させることにより、コラーゲンやvWf 表面への粘着に伴うリポソーム内容物の放出を誘導できるので、もし、リポソームにフィブリン形成を促進する物質を内包することができれば、粘着と凝集の2つの機能を持ったリポソームを創ることができる。設計された分子や分子集合体は、一見、空想的な物であっても、化学論理の矛盾さえなければ合成可能であるというのは、分子を自由に操ることのできる化学者に与えられた特権であり、また化学のみが持つ尽きせぬ魅力であろう。

rGPIaIIa やrGPIbα を固定化したリポソームは、血小板由来の物質を用いずに、血小板粘着の分子機構に基づいて、血小板膜上でのGPIaIIa とGPIbα の機能を再現すべく緻密にデザインされたものであり、人工血小板への独創的なアプローチである。今後の課題としては、血小板減少モデル動物を用いたリポソームの止血能、臓器分布、代謝分解、リポソームと血液成分との相互作用などについての検討や、長期保存可能な安定性の高い

リポソームの開発など、多くの解決すべき問題がある。また、フィブリノーゲンやRGD ペプチドを固定化したリポソームの検討も計画中である。人工血小板の開発は、人類のすべての英知をもってしても容易に達成できるものではない。しかし、真摯に、神の創造物である血小板機能の真理に迫りたい。

文献

- Philippot JR, Schuber F. *Liposomes as Tools in Basic and Industry*. Boca Raton, FL, CRC Press, 1995.
- Gregoriadis G, *Liposome Technology*, 2nd edition, Vol. III, Boca Raton, FL, CRC Press, 1992.
- Chan K. Blood supply. FDA Oversight and Remaining Issues of Safety. Washington, DC: U.S. General Accounting Office, 1997.
- Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ, The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334: 1685-1689.
- 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.
- 岩下雄二・酸素運搬体臨床研究の現況. *人工臓器* 1997; 26: 920-926.
- Melaragno AJ, Carciro R, Feingold H, Talorico L, Weintraub L, Valeri CR. Cryopreservation of human platelets using 6% dimethyl sulfoxide and storage at -80°C. *Vox Sang.* 1985; 49: 245-258.
- Alving BM, Reid TJ, Fratantoni JC, Finlayson JS. Frozen platelets and platelet substitutes in transfusion medicine. *Transfusion*. 1997; 37: 866-876.
- Currie LM, Vadhan-Raj Livesey SA, Connor J. Cryopreservation of platelets from Recombinant human thrombopoietin (rhTPO)-treated donors using Thrombosol using 2% DMSO. *Transfusion*. 1997; 37: 3S (abstr; suppl).
- Hays LM, Feeney RE, Crowe LM, Crowe JH, Oliver AE. Antifreeze glycoproteins inhibit leakage from liposomes during thermotropic phase transitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 6835-6840.
- Tablin F, Oliver AE, Walker NJ, Crowe LM, Crowe JH. Membrane phase transition of human platelets. Correlation with cold-induced activation. *J. Cell Physiol.* 1996; 168: 305-313.
- Chao FC, Kim BK, Houranieh AM, Liang FH, Konrad MW, Swisher SN, Tullis JL. Infusible platelet membrane microvesicles: A potential transfusion substitutes for platelets. *Transfusion*. 1996; 36: 536-542.
- Corash L. Inactivation of viruses, bacteria, protozoa, and leukocytes in platelet concentrates: Current research perspectives. *Transfus. Med. Rev.* 1999; 13: 18-30.
- Agam G, Livne AA. Erythrocytes with covalently bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia. *Eur. J. Clin. Invest.* 1992; 22: 105-112.
- Collar BS, Springer KT, Beer JH, Mohandas N, Scudder LE, Norton KJ, West SM. Thromboerythrocytes. In vitro studies of a potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusions. *J. Clin. Invest.* 1992; 89: 546-555.
- Rybak MEM, Renzulli LA. A liposome based platelet substitute, the plateletsome, with hemostatic efficacy. *Biomater. Art. Cells & Immob. Biotech.* 1993; 21: 101-118.
- Yen RCK Ho TWC, Blajchman MA. A novel approach to correcting the bleeding time in thrombocytopenic rabbits. *Transfusion*. 1995; 35: 41S, (abstr; suppl).
- Levi M, Friederich PW, Middleton S, De Groot PG, Wu YP, Harris R, Biemond B, Heijnen HFG, Levin J, Ten Cate JW. Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nature Medicine*: 1999; 5: 107-111.
- Nishiya T, Murata M, Handa M, Ikeda Y. Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Ib α to immobilized von Willebrand factor under flow conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, in press.
- Kitaguchi T, Murata M, Iijima K, Kamide K, Imagawa T, Ikeda Y. Characterization of liposomes carrying von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib: A potential substitute for platelet transfusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 261: 784-789.
- Nishiya T, Kainou M, Kamide K, Murata M, Handa M, Ikeda Y. Adhesion of liposomes carrying both recombinant GPIIb/IIIa and GPIb α to collagen surface under flow conditions. *Blood*, 1999; 94: 443a, (abstr. Suppl).
- Kawakami K, Harada Y, Sakashita M, Nagai H, Handa M, Ikeda Y. A new method for continuous measurement of platelet adhesion under flow conditions. *ASAIO Journal*, 1993; 39: M558-M560.
- Ikeda Y, Handa M, Kawano K, Kamata T, Murata M, Araki Y, Anbo H, Kawai Y, Watanabe K, Itagaki I, Sakai K, Ruggeri ZM. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J. Clin. Invest.* 1991; 87: 1234-1240.
- Murata M, Fukuyama M, Satoh K, Fujimura Y, Yoshioka A, Takahashi H, Handa M, kawai Y, Watanabe K, Ikeda Y. Low shear stress can initiate von Willebrand factor-dependent platelet aggregation in patients with Type IIB and platelet-type von Willebrand Disease. *J. Clin. Invest.* 1993; 92: 1555-1558.
- Moriki T, Murata M, Kitaguchi T, Anbo H, Handa M, Watanabe K, Takahashi H, Ikeda Y. Expression and functional characterization of an abnormal platelet membrane glycoprotein Ib α (Met239 to Val) reported in patients with platelet-type von Willebrand disease. *Blood* 1997; 90: 698-705.

ホモゲンチジン酸によるヘモグロビンの酸化還元反応と修飾反応

米田陽一¹⁾, 小泉純子¹⁾, 赤沢麻美¹⁾, 高崎優¹⁾, 山口順道²⁾, 友田燐夫³⁾

Oxido-reductive Reactions and Modification of Human Hemoglobin Caused by Homogentisic Acid

Yoichi Yoneda¹⁾, Junko Koizumi¹⁾, Mami Akazawa¹⁾, Masaru Takasaki¹⁾, Jundo Yamaguchi²⁾, Akio Tomoda^{3)*}

和文抄録

ホモゲンチジン酸をヒトヘモグロビンと反応させると、オキシヘモグロビン (Fe^{2+}) はメトヘモグロビン (Fe^{3+}) に酸化された。また、メトヘモグロビンはオキシヘモグロビンに還元された。このようなホモゲンチジン酸によるヘモグロビンの酸化還元反応は強力なアロステリック作用をもつイノシトールヘキサリン酸により促進された。ホモゲンチジン酸によるオキシヘモグロビンの酸化反応はスーパーオキシドジスムターゼ存在下で著しく促進されたが、カタラーゼにより阻害された。また、ホモゲンチジン酸によるメトヘモグロビンの還元反応はスーパーオキシドジスムターゼ存在下では阻害されたが、カタラーゼ存在下では影響を受けなかった。これらの結果からホモゲンチジン酸によるヘモグロビンの酸化還元反応のメカニズムが推定された。また、芳香族化合物のオルトアミノフェノールおよびその誘導体についてもヘモグロビンの酸化還元反応が起こることが明らかとなったが、この場合はホモゲンチジン酸による反応様式とは異なっていた。さらに、ホモゲンチジン酸とヒトヘモグロビンとを反応させると平板等電点電気泳動ゲル上に特異なバンドが出現し、これが新規の修飾型ヘモグロビンであることが明らかとなった。この修飾型ヘモグロビンは正常のオキシヘモグロビンの吸収スペクトルとほぼ同一であったが、SH反応性が消失し、また酸素親和性は増加していた。修飾型ヘモグロビンの本態については明らかに出来なかった。このように、ホモゲンチジン酸はヒトヘモグロビンに対して酸化還元作用を有するとともに、修飾作用を示すことが明らかとなった。

Abstracts

When human oxyhemoglobin was reacted with homogentisic acid, it was oxidized to methemoglobin. The reaction was accelerated in the presence of inositol hexaphosphate, superoxide dismutase, but was prevented in the presence of catalase. But the oxidation of ferrous hemoglobin by homogentisic acid did not occur under the anaerobic conditions. When human methemoglobin was reacted with homogentisic acid, it was reduced to ferrous hemoglobin. The reaction was accelerated in the presence of inositol hexaphosphate, inhibited by superoxide dismutase, and was not affected by catalase. The reaction of human hemoglobin with homogentisic acid was compared with that with aromatic reductants such as o-aminophenol and its derivatives. From these results, the reaction mechanism of human hemoglobin with homogentisic acid was deduced. Furthermore, a novel cathodic hemoglobin band (designated as the homogentisic-acid-modified hemoglobin) was found, when human hemoglobin was reacted with homogentisic acid. This homogentisic acid-monodified hemoglobin had absorption spectra similar to those of normal oxyhemoglobin and methemoglobin, but had increased oxygen affinity and deleted SH reactivity. The identity of this modified hemoglobin is still unclear.

Key words

human hemoglobin, homogentisic acid, oxidation and reduction, modification

¹⁾ 東京医科大学, 老年病学教室, 〒160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1, Department of Geriatric Medicine, Tokyo Medical University, Nishishinjuku 6-7-1, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023 ²⁾ 池田病院内科, 金沢市, Department of Internal Medicine, Ikeda Hospital, Kanazawa ³⁾ 東京医科大学生化学, 〒160-0022 東京都新宿区新宿6-1-1, *To whom correspondence should be addressed. Department of Biochemistry, Tokyo Medical University Shinjuku 6-1-1, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0022

論文受付 2000年1月18日, 再受付 2000年3月7日, 受理 2000年3月9日

1. はじめに

ホモゲンチジン酸はフェニルアラニン、チロシンなどの芳香族アミノ酸の代謝物であるが、生体では通常は微量にしか存在しない¹⁾。この化合物はチロシンオキシダーゼの活性が異常に高い場合やホモゲンチジン酸オキシダーゼの活性が低下した場合に生体内、とくに血液中に蓄積することが知られている²⁾。先天性アルカプトン尿症の患者ではホモゲンチジン酸オキシダーゼ活性の低下のために、血液中にホモゲンチジン酸が蓄積するし、さらに大量に尿中へ排泄される³⁾。このような病的状態において、血液中のタンパク質がホモゲンチジン酸の作用を受けることは充分考えられる。とくに赤血球の主要なタンパク質であるヘモグロビンに対するホモゲンチジン酸の作用についてはこれまで十分に検討されていない。糖尿病の患者におけるグルコースによるヘモグロビンの修飾とヘモグロビンA1cの増加を考慮すれば、ホモゲンチジン酸が赤血球中のヘモグロビンに何らかの影響を及ぼしていることが予測出来る。また、ホモゲンチジン酸はDNAに作用して発癌作用があることが示されているが⁴⁾、これはホモゲンチジン酸から生成される活性酸素の作用によること⁵⁾が明らかとなっている。活性酸素もヘモグロビンに対して種々の作用を及ぼすことが知られている^{6,7)}。

このような観点から、私達はホモゲンチジン酸によるヘモグロビンの酸化反応および還元反応を詳しく検討を行った。さらに、これらの反応で得られたヘモグロビン溶液を平板ゲル等電点電気泳動法で解析を行ったところ、通常では存在しないヘモグロビンのバンドが見いだされた。そこで、この等電点電気泳動上で確認された新しい分子種のヘモグロビンの精製を行い、その物理化学的性質を詳しく検討を行った。このヘモグロビン分子種にホモゲンチジン酸が結合しているかどうかは現在のところ定かではないが、ホモゲンチジン酸により修飾されたヘモグロビンであることが示された。これらの結果から、本論文ではホモゲンチジン酸によるヘモグロビンに対する多様な作用を詳しく検討を行い、ホモゲンチジン酸の病態生化学的意義を考察した。

2. 実験方法

2.1. 実験材料

ホモゲンチジン酸およびフェリシアン化カリウムは各々、半井化学（東京）および和光純薬（東京）より購入した。ホモゲンチジン酸は蒸留水に溶解し、0.1 MのNaOH溶液で中和したのち、ただちに使用した。スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）およびカタラーゼは各々マイルスラボラトリー社（米国）とベーリンガー・マンハイム社（ドイツ）より購入した。イノシトールヘキサリン酸はシグマ社（米国）より購入した。等電点電気泳動用の平板ゲルプレート（pH 3.5-9.5）はアマーシャム・ファルマシア社（スウェーデン）から購入した。高速液体クロマトグラフィ用カラム（陽イオン交換カラムSP-5PW）は東ソー（東京）より購入した。

2.2. 赤血球とヘモグロビンの調製

ヘパリン採血したヒト新鮮血を遠心分離（3,000 x g, 10分）し、

血漿および顆粒球層を除いたのち、赤血球を得た。この赤血球を0.9%塩化ナトリウム水溶液に懸濁させ、遠心にて洗浄を行った。この操作を3回繰り返したのちに得られた赤血球を2つに分け、半分はヘモグロビンの精製に、残りの半分はホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンの調製に使用した。

洗浄赤血球に10倍容量の氷冷蒸留水を加え10分間室温にて放置したのち、遠心分離（10,000 g x 20分）を行った。ヘモグロビンを含む上澄を採取したのち、友田らの方法によりヘモグロビンの精製を行った⁸⁾。精製されたオキシヘモグロビンは最終的にセファデックスG-25（fine, 予め0.1 M塩化ナトリウムを含む0.05 Mのビス・トリス塩酸、pH7.0で平衡化したもの）を充填したカラム（直径3cm, 長さ25cm）に通過させ、実験に使用した。

メトヘモグロビンは精製したオキシヘモグロビンをフェリシアン化カリウムで酸化したのち、上記のセファデックスG-25を充填したカラムに通過させることによりフェリシアン化カリウムを除去して得た。以下、ヘモグロビンとは精製ヘモグロビンをさす。

2.3. ヘモグロビンとホモゲンチジン酸との反応

2.3.a. ホモゲンチジン酸によるヘモグロビンの酸化還元反応

上記方法で得たオキシヘモグロビン（最終濃度：45 μ M）あるいはメトヘモグロビン（最終濃度：45 μ M）とホモゲンチジン酸（最終濃度：1mM）とを、イノシトールヘキサリン酸（最終濃度：1 mM）、カタラーゼ（最終濃度：29単位）、スーパーオキシドジスムターゼ（最終濃度：1,300単位）などを添加した上で、反応させた（反応条件：pH7.0、25 $^{\circ}$ C）。これらの反応は450 nmから650nmまでの波長の変化、あるいは578 nmにおける吸光度の変化で測定した。ホモゲンチジン酸とデオキシヘモグロビン、あるいはメトヘモグロビンとの反応を含む嫌気的条件下での反応はツンベルク管内で行った⁹⁾。これらの反応は630 nmの吸光度の変化で測定を行った。

2.3.b. ホモゲンチジン酸によるヘモグロビンの修飾反応と修飾型ヘモグロビンの同定

オキシヘモグロビン（0.5 mM heme）にホモゲンチジン酸（最終濃度：1.5 mM）を添加し、pH 7.0、25 $^{\circ}$ Cにて25分インキュベートした。このヘモグロビン溶液を10 mMリン酸カリウム溶液（pH 7.0）で平衡化したセファデックスG-25を充填したカラムに通過させた。また、精製したオキシヘモグロビンにフェリシアンカリ溶液を添加し、部分酸化したヘモグロビン試料を得た¹⁰⁾。これらのヘモグロビン溶液について平板ゲル等電点電気泳動（ファルマシア・アマルシャム社、pH 3.5-9.5）にてヘモグロビンの分析を行った¹⁰⁾。

2.4. 修飾型ヘモグロビンの調製

赤血球をクレブス・リンガー液にヘマトクリット値が約20%となるように浮遊させ、さらに最終濃度10 mMのホモゲンチジン酸を加え、pH 7.4、37 $^{\circ}$ Cにて、13時間インキュベートを行なった。そこで赤血球を凍結融解法により溶血させ、さらに遠心

分離 (10,000x20分) を行いヘモグロビンを含む上澄みを得た。このヘモグロビン溶液に一酸化炭素を注入し、さらにジチオナイトを添加した。この溶液には一酸化炭素ヘモグロビンと一酸化炭素結合ホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンとが含まれているが、この溶液をさらにセファデックスG-25を充填したカラムに通し、ジチオナイトとホモゲンチジン酸とを除去した。得られたヘモグロビン溶液を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) にかけて、一酸化炭素結合ヘモグロビンと一酸化炭素結合ホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンとを分離精製した。HPLCに用いた溶液はA液 (50 mMリン酸ナトリウム, pH 6.3) とB液 (0.2 M 塩化ナトリウム) である。またHPLCに用いたカラムはSP-5PW (東ソー) である。精製された一酸化炭素結合ホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンをさらにflash photolysis法¹¹⁾により一酸化炭素を解離、除去させて、最終的にホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンを得た。

2.5. ヘモグロビンの酸素平衡の測定

ヘモグロビンとホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンの酸素平衡の測定はイノシトールヘキサリン酸存在下および非存在下で、分光測定法¹²⁾により行なった。50%酸素飽和度におけるHillプロットの傾斜から、Hill係数を決定した。

2.6. ヘモグロビンのSH基の定量

ヘモグロビンおよびホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンのSH基の測定はパラクロロマーキュリベンゾエートを用いて行なった¹³⁾。

3. 結果

オキシヘモグロビンにホモゲンチジン酸を添加すると、オキシヘモグロビンの吸収スペクトルは急速に変化し、とくに578 nmの吸光度の減少、630 nmの吸光度の増加が著明にみられた (図示せず)。このことはホモゲンチジン酸により、オキシヘモグロビン (Fe^{2+}) が酸化され、メトヘモグロビン (Fe^{3+}) へ変化していることを示している。図1はホモゲンチジン酸添加後のオキシヘモグロビンの酸化反応を578nmにおける吸光度の減少で調べた結果を示したものである。その結果、ホモゲンチジン酸添加により、オキシヘモグロビンは $1.96\mu\text{M heme/min}$ の速度で酸化され (対照)、イノシトールヘキサリン酸存在下で反応は促進され、またスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 存在下ではさらに促進された。また、カタラーゼ存在下では反応は非常に阻害され、SODおよびカタラーゼ存在下でもほぼ同様の結果が得られた。なお、嫌氣的条件下では反応は全く進行しなかった。

そこでホモゲンチジン酸と類似の構造をもつ芳香族化合物 (いずれもホモゲンチジン酸と同様に水酸基をベンゼン環に配位する) であるオルトアミノフェノール、2-アミノ-4-メチルフェノールについてヘモグロビン酸化作用があるかどうかを上記と同様な条件下で検討し、ホモゲンチジン酸による反応とを比較した (表1)。ホモゲンチジン酸以外の芳香族化合物では、イノシトールヘキサリン酸存在下ではヘモグロビンの酸化反応

は促進したが、カタラーゼ、およびSODの影響は全く受けなかった。しかしながら、これらの化合物によるヘモグロビン酸化はホモゲンチジン酸の場合と同様に嫌氣的条件下では全く進行しなかった。

ついで、私達はホモゲンチジン酸によるメトヘモグロビンの還元反応についても種々の条件下で検討を行なった。メトヘモグロビンにホモゲンチジン酸を添加すると578 nmにおける吸光度の増加、630 nmにおける吸光度の減少がみられ、ホモゲンチジン酸によりメトヘモグロビンが還元されることが明らかとなった (図示せず)。表2はホモゲンチジン酸やオルトアミノフェノール、2-アミノ-4-メチルフェノールなどの芳香族化合物によるメトヘモグロビンの還元反応速度 ($\mu\text{M heme/min}$) を種々の条件下で測定した結果を要約したものである。すなわち、イノシトールヘキサリン酸存在下ではホモゲンチジン酸によるメトヘモグロビンの還元反応は促進されたが、SODにより非常に阻害を受け、カタラーゼでは影響されなかった。

ホモゲンチジン酸によるメトヘモグロビンの還元反応は嫌氣的条件下でも進行し、しかも酸素存在下の対照試料と比べて速かった。

また、オルトアミノフェノールとその誘導体化合物 (2-アミノ-4-メチルフェノールによっても、メトヘモグロビンは還元を受け、イノシトールヘキサリン酸存在下で促進された。しかしながら、ホモゲンチジン酸によるメトヘモグロビン還元反応の場合とは異なり、カタラーゼおよびSODの作用を全く受けなかった。また、嫌氣的条件下では酸素存在下の対照よりは反応速度は遅いものの、反応は進行した。

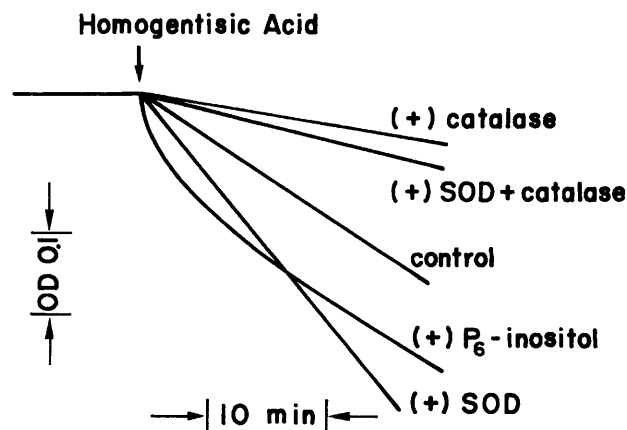


Fig.1 Oxidation of human oxyhemoglobin by homogentisic acid in the presence or absence of inositol hexaphosphate, superoxide dismutase and catalase. The oxidation of human oxyhemoglobin by homogentisic acid in the presence or absence of inositol hexaphosphate (P6-inositol), superoxide dismutase and catalase was pursued by the decrease of optical density at 578 nm. The control in the figure shows the experiment with homogentisic acid and without inositol hexaphosphate or enzymes.

Table 1 Initial rates of oxidation of ferrous hemoglobin by o-aminophenol, its derivatives and homogentisic acid ($\mu\text{M heme/min}$)

Aromatic Reductants	Anaerobic	Aerobic			
		Control	P ₆ -inositol (+)	SOD (+)	Catalase (+)
homogentisic acid	0	1.96	15.3	8.2	0.7
o-aminophenol	0	1.2	2.0	1.2	1.2
2-amino-4-methylphenol	0	8.2	11.6	8.2	8.2

Table 2 Initial rates of reduction of ferric hemoglobin by o-aminophenol, its derivative and homogentisic acid ($\mu\text{M heme/min}$)

Aromatic Reductants	Anaerobic	Aerobic			
		Control	P ₆ -inositol (+)	SOD (+)	Catalase(+)
homogentisic acid	10	2.5	5.4	0.7	2.5
o-aminophenol	0.13	1.6	7	1.6	1.6
2-amino-4-methylphenol	very slow	1.6	3.5	1.6	1.6

以上のように、ホモゲンチジン酸にはヘモグロビンの酸化作用およびメトヘモグロビンの還元作用があることが明らかとなった。また、ホモゲンチジン酸と同様に水酸基をもつ芳香族化合物であるオルトアミノフェノールとその誘導体化合物にもヘモグロビンの酸化作用およびメトヘモグロビンの還元作用があることが示されが、作用機構はホモゲンチジン酸の場合とは異なっていた。

私達はオキシヘモグロビンをホモゲンチジン酸と25分反応せしめ、反応液を回収したのち、平板ゲル等電点電気泳動法により分析を行なった。その結果、ゲル上に通常には見られない新規のヘモグロビンのバンドが発見された。図2にその結果を示す。(a)はオキシヘモグロビンをフェリシアンカリで部分酸化したのち等電点電気泳動を行なって得られる結果であるが、ゲル上の陽極側にオキシヘモグロビンのバンドが見られる。半分酸化型ヘモグロビンである $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$ と $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ が陰極側に見られ、さらに陰極側に完全酸化型であるメトヘモグロビンが存在している。一方(b)はオキシヘモグロビンとホモゲンチ

ン酸とを25分反応させて得られたヘモグロビン溶液を等電点電気泳動で分析したものであるが、オキシヘモグロビン以外に陽極側に新たなバンドが存在している。このバンドについてはこれまで全く報告がなかったものであり、オキシヘモグロビンがホモゲンチジン酸により修飾を受けて生成したものであると考えられる。

そこでヒト赤血球にホモゲンチジン酸を添加し、最終濃度10mMのホモゲンチジン酸を加えpH7.4, 37℃にて13時間インキュベートを行った後、HPLCでこの新規の修飾型ヘモグロビンを大量に分離し、その精製を行なった(実験方法参照)。この修飾型ヘモグロビンについて吸収スペクトルを測定し、また酸素平衡およびSH反応性も検討した。その結果、ホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンのオキシ型およびメト型の吸収スペクトルは正常のオキシヘモグロビンおよびメトヘモグロビンとほとんど差異はなかった (Fig. 3)。

しかしながら、酸素平衡パラメーターについて検討すると (Table 3)、イノシトールヘキサリン酸が存在しない場合では、ホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンのP₅₀は4mmHgであり明らかに正常のヘモグロビン (7mmHg) と比べて小さくなっており、酸素親和性が高いことを示している。この場合、ホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンのHill係数も低下しており (1.9) ヘム間の相互作用が低下していると考えられる。このような傾向は強力なヘモグロビンのアロステリック作用を示すイノシトールヘキサリン酸存在下でも同様であった。但し、イノシトールヘキサリン酸存在下では、正常ヘモグロビンおよびホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンのいずれも酸素親和性は極端に小さくなっている。

表4は正常オキシヘモグロビンとホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンのSH反応性を調べた結果を示す。その結果、正常オキシヘモグロビンでは1.8個のSH基が滴定されたのに対してホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンではSH基はほとんど滴定されなかった (Table 4)。このことはホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンではSH基は酸化されているか、何らかの形で遮蔽されていることを示している。

4. 考察

ホモゲンチジン酸はチロシンオキシダーゼの作用により芳香族アミノ酸であるチロシンが代謝された化合物であり、ベンゼン環に水酸基を配位している。酸素が存在する場合、ホモゲンチジン酸 (ハイドロキノン型) は酸素と反応してセミキノン型、キノン型に酸化され、一方では酸素はホモゲンチジン酸により還元されてスーパーオキシドや過酸化水素などの活性酸素に代謝されることが知られている^{4,5)}。このようにホモゲンチジン酸は還元作用をもつことが知られているが、これはベンゼン環

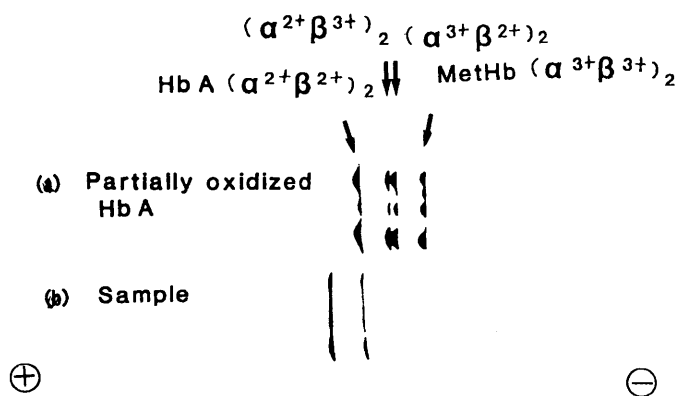
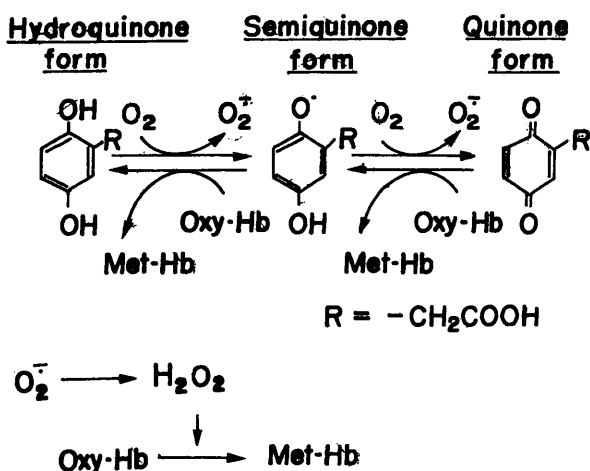


Fig.2 Isoelectric focusing patterns of the partially oxidized hemoglobin with ferricyanide, and hemoglobin solution reacted with homogentisic acid. A solution of purified oxyhemoglobin (500 μM in heme) was mixed with homogentisic acid (1.5 mM) and incubated, at 25°C for 25 min.

- hemoglobin solution which was partially oxidized by ferricyanide.
- sample obtained by the reaction of oxyhemoglobin with homogentisic acid.

に配位している水酸基によるものと考えられる。また、スーパーオキシドはオキシヘモグロビンを酸化するとともに、メトヘモグロビンを還元する作用があることが報告されている⁷⁾。これらのことを考慮すると、ホモゲンチジン酸によるヘモグロビンの酸化還元反応は以下のような反応で説明できる。

Scheme 1

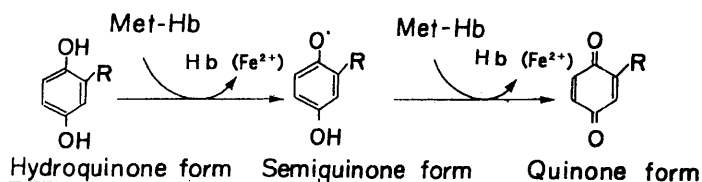


Schema 1ではまず、ホモゲンチジン酸によるヘモグロビンの酸化反応について推定する。すなわち、ハイドロキノン型のホモゲンチジン酸は酸素と反応し、酸素を還元してスーパーオキシド生成させるとともに、自身はセミキノン型に代謝される。セミキノン型はさらに酸素と反応しキノン型に代謝され、この場合もスーパーオキシドが生成される。スーパーオキシドの不均化反応で生成される過酸化水素はオキシヘモグロビンを直接酸化してメトヘモグロビンへ変えることが知られている¹⁴⁾。それ故、ホモゲンチジン酸によるヘモグロビン酸化反応にスーパーオキシド由来の過酸化水素が大きく関わっていると考えられる。

すなわち、Fig. 1に示したようにホモゲンチジン酸によるヘモグロビンの酸化反応はSODにより非常に促進されるが、これはスーパーオキシドより生成された過酸化水素がオキシヘモグロビンを酸化していることによると考えられる。過酸化水素のスカベンジャーであるカタラーゼ存在下あるいはSOD+カタラーゼ存在下でホモゲンチジン酸によるヘモグロビン酸化反応が非常に抑制されたことも (Fig. 1)、このことを裏付けている。なお、嫌気的条件下で反応が進行しなかったが、このこともホモゲンチジン酸によるヘモグロビンの酸化反応にスーパーオキシドや過酸化水素などの活性酸素が反応に関わっていることを支持する。なお、カタラーゼ存在下でも反応は部分的に進行したが (Fig. 1)、これはホモゲンチジン酸のセミキノン型およびキノン型とオキシヘモグロビンとの直接反応を示していると考えられる (Schema 1)。

一方、ホモゲンチジン酸によるメトヘモグロビン (Fe^{3+}) の還元反応はScheme 2のように進行すると考えられる。

Scheme 2



ホモゲンチジン酸のハイドロキノン型はメトヘモグロビンと直接反応し、セミキノン型になり、さらにセミキノン型はメトヘモグロビンと直接反応しキノン型に代謝されることが考えられる。

Table 2で示すように酸素存在下でホモゲンチジン酸によるメトヘモグロビンの還元反応がSODによって非常に抑制された。この結果はホモゲンチジン酸と酸素との反応で生成されるスーパーオキシドがメトヘモグロビンを還元するのをSODが阻害していることで説明出来る。また、嫌気的条件下でもホモゲンチジン酸によるメトヘモグロビン還元反応が進行し、しかも好気的条件下よりも反応速度が速かった。この結果は活性酸素の

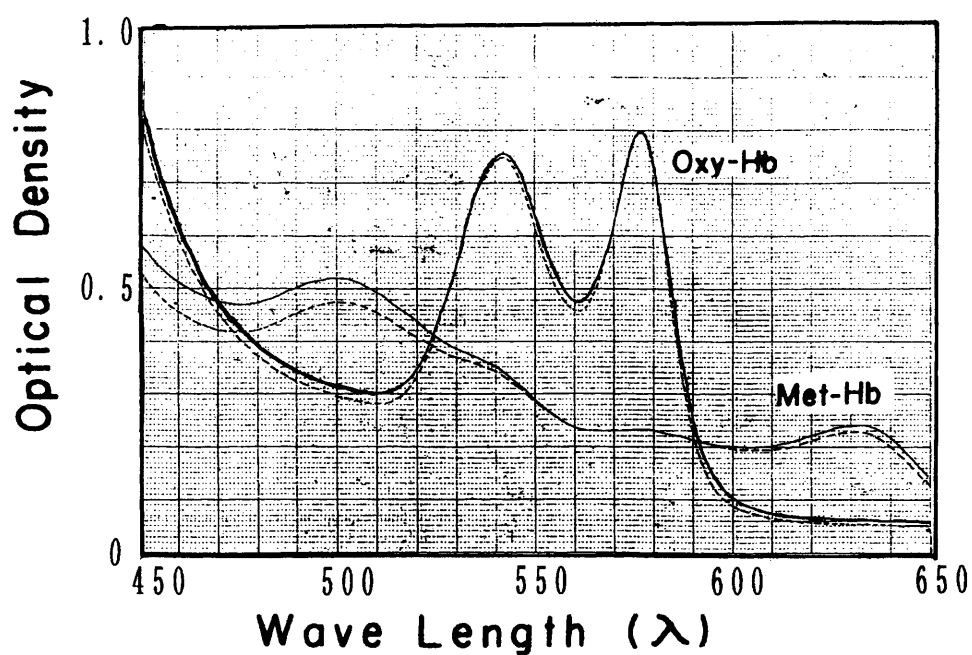


Fig.3 Absorption spectra of oxyhemoglobin, methemoglobin, homogentisic acid-modified oxyhemoglobin and homogentisic acid-modified methemoglobin.

straight lines: homogentisic acid-modified oxy- and methemoglobin

broken lines: normal oxy- and methemoglobin

Scheme 3

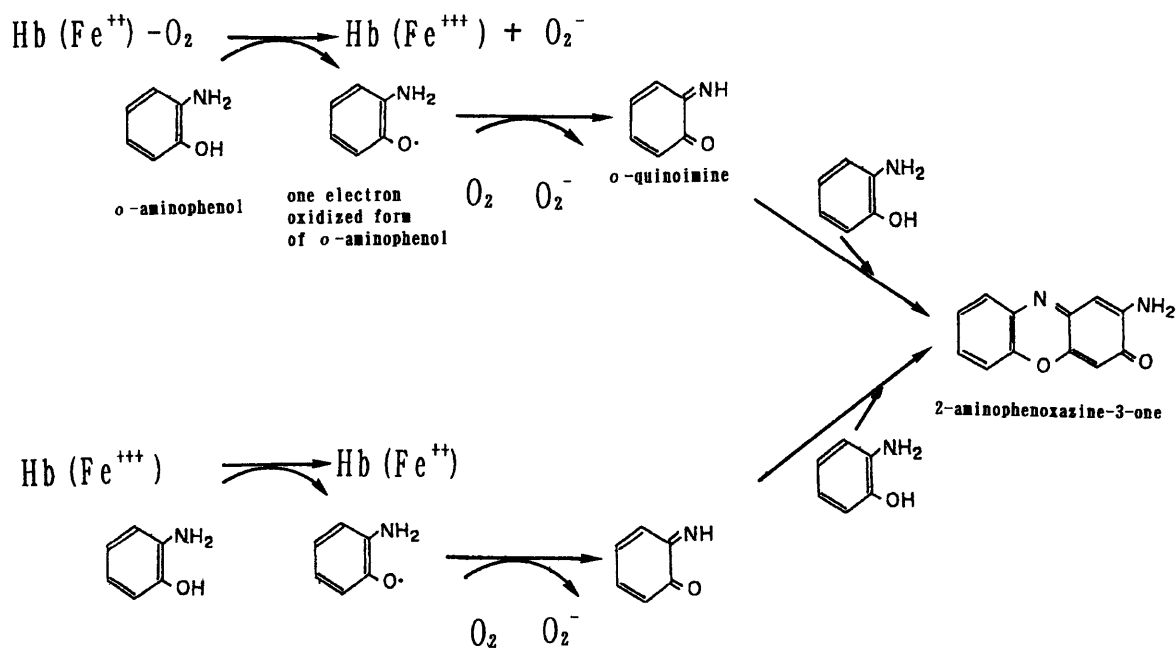


Table 3 Oxygen equilibrium parameters of normal hemoglobin and the homogentisic acid modified hemoglobin in the presence or absence of P6-inositol

	P ₅₀ (mmHg)	Hill'sn
Hemoglobin A	7	3.1
Homogentisic acid modified hemoglobin A	4	1.9
Hemoglobin A + P ₆ -inositol	80	2.2
Homogentisic acid modified hemoglobin A + P ₆ -inositol	42	1.2

Concentrations of hemoglobin A and homogentisic acid modified hemoglobin A: 100 μ M (in heme) Concentrations of P₆-inositol: 1 mM Buffer: 50 mM bis-Tris/acetate (pH 7.0) containing 0.1 M NaCl (25C)

Table 4 Titration of SH groups of the homogentisic acid modified hemoglobin A and normal hemoglobin A

	normal hemoglobin A	homogentisic acid modified hemoglobin A
SH number titrated (SH/hemoglobin tetramer)	1.8	0

影響がない条件下で、ホモゲンチジン酸と三価のヘム鉄とが直接的に反応していることを表していると考えられる。

以上の結果から、ホモゲンチジン酸はヘモグロビンの酸化作用および還元作用の両方の作用があることが示された。同様にヘモグロビンの酸化還元作用を示す化合物としてオルトアミノフェノールとその誘導体がある (Table 1, 2)。その反応はイノシトールヘキサリン酸により促進されるが、SODおよびカタラーゼの作用がみられなかった。また嫌氣的条件下ではヘモグロビンの酸化反応は反応が進行せず、メトヘモグロビンの還元反応は好氣的条件下と比べて反応が遅かった。これらの結果から、オルトアミノフェノールおよびその誘導体はヘモグロビンの酸化還元作用を示すが、ホモゲンチジン酸によるヘモグロビンの酸化還元反応とは異なる機構で反応が進行すると考えられる (Schema 3)。そのメカニズムについては、酸素存在下で反応が進行するにもかかわらずSODおよびカタラーゼの作用がほとんどないことから、現在のところ十分な説明ができない。なお、本研究で示されたイノシトールヘキサリン酸存在下でのヘモグロビンの酸化還元反応の促進は、ヘモグロビンと種々の酸化還元剤との反応で示唆されているように^{15,16)}、イノシトールヘキサリン酸の結合によるヘモグロビンの高次構造の変化によるものと考えられる^{16,17)}。

私達が検討した結果では、水酸基を配位した芳香族化合物では3-ヒドロキシアントラニル酸、3-ヒドロキシキヌレンンな

どもヘモグロビンの酸化還元作用を持っていた¹⁸⁾。また、Winterbournらは¹⁹⁾メナジオンにヘモグロビンの酸化還元作用があることを示している。ヘモグロビンを酸化する化合物としてはフェリシアン化カリウム、亜硝酸、銅イオン、過酸化水素²⁰⁾など多くの化合物が知られているが、これらの化合物はメトヘモグロビンを還元しない。またメトヘモグロビンを還元する化合物としては、アスコルビン酸などが知られている。しかしながら、ヘモグロビンの酸化作用と還元作用を合わせ持つ化合物についてはこれまで体系的に検討されていなかった。

さらにホモゲンチジン酸とオキシヘモグロビンとを一定時間反応させるとFig. 2に示すように、電気泳動上の陽極側に新規のヘモグロビンのバンドが出現した。平板ゲル等電点電気泳動ではヘモグロビンAICもオキシヘモグロビンの陽極側に移動するが、ホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンほどは大きく移動していない。私達はこのヘモグロビンがホモゲンチジン酸より修飾された新規のヘモグロビンと考え、このヘモグロビンを大量に精製し、その物理化学的性質を検討した (Fig. 3, Table 3, 4)。その結果、このホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンは吸収スペクトルについては正常のオキシヘモグロビン、メトヘモグロビンとほとんど差がないが (Fig. 3)、酸素親和性は異常に高く (Table 3)、SH反応性はなくなっていること

が示された。私達はホモゲンチジン酸がヘモグロビンに結合している (Table 4) ことを想定し、色々分析を試みたが現在のところ明らかとなっていない。ヘモグロビンのSH基が何らかの形でブロックされているか、酸化されていると考えられる。Garelら²¹⁾は還元型グルタチオンとオキシヘモグロビンとを反応させると、還元型グルタチオンはヘモグロビンの β 93システインに共有結合し、SH基がブロックされ、酸素親和性が高くなっていることを示した。彼らの論文にはこのヘモグロビンの平板ゲル等電点電気泳動上での位置については具体的に示されていないが、陽極側に大きく移動していると述べられており、本論文で示したホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンの泳動位置と一致している可能性が高い。

ホモゲンチジン酸を赤血球と数時間インキュベートすると、赤血球内のヘモグロビンは大量にホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンに変化することが明らかとなった (友田ら、未発表データ)。このことは、ホモゲンチジン酸が長期にわたり高濃度に血液中に存在する先天性アルカプトン尿症の患者では、赤血球内のヘモグロビンがホモゲンチジン酸修飾型ヘモグロビンに変化していることを示唆している。その結果、その患者ではヘモグロビンの酸素親和性が高くなり、慢性的な貧血状態になっていることも推測される。また、先天性アルカプトン尿症のヘテロの患者についても同様なことがいえるかもしれない。これらのことについては今後の研究の進展に待たれる。

参考文献

1. Deutsch JC, Cheruppolil R, Kumar S. Quantitation of homogentisic acid in normal human plasma. *J.Chromatogr.* 1966B; 677:147-151
2. La Du BN, Zonnoni VG., Laster L, Seegmiller J.E. The nature of the defect in tyrosine metabolism in alkaptonuria. *J.Bio.Chem.* 1958; 230: 251-260
3. Fernandez-Canon J, Granadino B, Beltran-Valero de Bernabe D, Renedo M, Fernandez-Ruiz E, Penalva MA, Rodriguez de Cordoba R. The molecular basis of alkaptonuria. *Nature* 1996; 14:19-24.
4. Hiraku Y, Yamasaki M, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by homogentisic acid, a tyrosine metabolite. *FEBS letters.* 1998; 432: 13-16.
5. Martin JP, Batkoff B. Homogentisic acid autoxidation and oxygen radical generation: Implications for the etiology of alkaptonuric arthritis. *Free Rad.Biol.Med.* 1987; 3:241-250.
6. Tomoda A, Sugimoto K, Suhara M, Takeshita M, Yoneyama Y. Haemichrome formation from haemoglobin subunits by hydrogen peroxide. *Biochem.J.* 1978; 171: 329-335.
7. Winterbourn CC, McGrath BM, Carrell RW. Reactions involving superoxide and normal and unstable haemoglobins. *Biochem.J.* 1976; 155:493-502.
8. Tomoda A, Yoneyama Y, Tsuji A. Changes in intermediate haemoglobins during autoxidation of haemoglobin. *Biochem.J.* 11981; 95: 485-492.
9. Tomoda A, Shirasawa E, Yoneyama Y. Reactions of oxy- and methemoglobin with tryptophan metabolites, 3-hydroxyanthranilic acid and 3-hydroxykynurenine. *Hemoglobin* 1986; 10: 33-48.
10. Tomoda A, Yoneyama Y. Analysis of intermediate hemoglobins in solutions of hemoglobin partially oxidized with ferricyanide *Biochim.Biophys.Acta* 1979; 581:128-135.
11. Gibson QH. An apparatus for flash photolysis and its application to the reactions of myoglobin with gases. *J.Physiol.* 1956; 134: 112-112.
12. Matsukawa S, Nishimbu M, Nagai M, Mawatari K, Yoneyama Y. Analysis of optical properties of hemoglobins in terms of the two-state model, especially from studies on abnormal hemoglobins with amino acid substitution in the α 1 β 2 contact region. *J.Biol.Chem.* 1979; 254:2358-2363.
13. Boyer PD. Spectrophotometric study of the reaction of protein sulfhydryl groups with organic mercurials. *J.Am.Chem.Soc.*, 1964; 76:4331-4337.
14. Eyer P, Hertle H, Kiese M, Klein G. Kinetics of ferrihemoglobin formation by some reagents and the role of hydrogen peroxide. *J.Mol.Pharmacol.* 1975; 11:326-334.
15. Tomoda A, Matsukawa S, Takeshita M, Yoneyama Y. Effects of organic phosphates on methemoglobin reduction by ascorbic acid. *J.Biol.Chem.* 1976; 251:7494-7498.
16. Tomoda A, Yoneyama Y. On the relationship of hemoglobin oxidation with the conformation of hemoglobin. *Experientia* 1979; 35: 2-3.
17. Perutz MF, Fersht AR, Simon SR, Roberts GCK. Influence of globin structure on the state of the heme. II. Allosteric transition in methemoglobin. *Biochemistry* 1974; 13:22174-2186.
18. Tomoda A, Shirasawa E, Yoneyama Y. Reactions of oxy- and methemoglobin with tryptophan metabolites, 3-hydroxyanthranilic acid and 3-hydroxykynurenine. *Hemoglobin* 1986; 10: 33-48.
19. Winterbourn CC, French JK, Claridge, RFC. The reaction of menadione with haemoglobin: Mechanism and effect of superoxide dismutase. *Biochem.J.* 1979; 179:665-673.
20. Kiese, M. in *Methemoglobinemia: A comprehensive treatise* CRC Press Inc., Cleveland, Ohio 1974; p 1-92.
21. Garel MC, Domenget C, Caburi-Martin J, Prehu C, Galacteros F, Beuzar Y Covalent binding of glutathione to hemoglobin 1. Inhibition of hemoglobin S polymerization. *J.Biol.Chem.* 1986; 261: 14704-14709.

海外文献紹介

Anesthesiology (麻酔学) 1999; 91:1195-1208

American Society of Anesthesiologists Inc. (アメリカ麻酔科医師学会)

(出版社: Lippincott Williams & Wilkins, Inc.)

Perflubron乳剤投与で整形手術時の輸血を遅延させることができる (Perflubron Emulsion Delays Blood Transfusions in Orthopedic Surgery)

Donat R. Spahn, Ronald van Bremp, Gregor Theilmeier, Jan-Peter Reibold, Martin Welte, Hartmut Heinzerling, Katrin M. Brick, Peter E. Keipert, Konrad Messmer
ヨーロッパPerflubron乳剤研究グループ (the European Perflubron Emulsion Study Group).

早稲田大学 理工学総合研究センター 土田 英俊・酒井 宏水

訳者からのコメント

第2世代PFC乳剤 (Perflubron 乳剤, Alliance Pharm. Co.) の臨床第2相試験実施 (1996 Jan. - 1997 Feb., 欧州 Perflubron 評価委員会) 結果の公表が本論文である。人工血液の開発推進に参考になると考えられるので邦訳 (要旨) とコメントを作成した。我国でも酸素輸液製造や臨床試験開始が待たれているので、試験法や適応の議論のために、本誌に収録して頂いた。

いわゆるPFC乳剤はミドリ十字が開発 (1970), Fluosol-DA としてFDA認可 (1990) を受けたものの、有効性と安全性の確認が充分でなく1993年には製造中止に至っている。その後分子構造の一部を臭素に置換してPFC成分の濃度を従来の二倍以上に向上させ、酸素溶解量の増大をはかったのが Perflubron である。

この報告はPerflubron を手術中の補助輸液として用い、術前に血液希釈に際して貯血した自己血を手術後に戻して同種血輸血の回避を目指した例の解説である。造血因子 (EPO) 投与による術前貯血が一般的になっている最近の傾向から見ると、術前貯血の煩雑さと経費高を併せ考え Perflubron 利用が有効と主張する用法は、その意義が更に議論されるべきであろう。少なくともヒト血液に匹敵する酸素量が輸送できるとすれば、酸素輸

液の最大用途としては、出血ショックや気管閉塞、呼吸不全、心不全などに起因する脳死の回避に対応できる緊急蘇生液として、或いは簡単な体外循環装置を併用することで有効に作動するのではない。従来自然災害時の緊急用途は無視されてきたが、実は血液型に関係なく利用できる利点から、これこそが最優先されるべき対象であろう。

また、この報告の中では副作用の点で、発熱や血小板数の低下が確認されている。安定乳液を構成するためにPerflubron 粒子表面は界面活性剤 (リン脂質膜) で覆われており、循環中に凝集、融合も起るとも想定され、表面状態改質の必要があると思われる。PFCは化学的に極めて安定で、体内投与されると速やかに細網内皮系に捕捉されるものの代謝されず、最終的には呼気に乗って大気に排泄される。最近環境重視の考え (sustainable system) が主張されるように成っており、オゾン層破壊や地球温暖化の原因となるフロンは国際条約 (1995) によって全廃された。投与された患者当り数kgものPFCが大気に放出される事態は到底許されないことでもある。

いずれにせよ、本研究は欧州でPerflubron評価委員会を組織し、多くの麻酔外科医の参加、また6ヶ国、11機関でな

れた大規模試験の遂行結果であり、日本血液代替物学会には臨床評価のガイドライン作成委員会 [委員長: 阿岸 鉄三 教授 (東女医大)] も設置されているので、我国でもこの分野のプロトコルの決定から遂行までの役割を担っていくことになるであろう。

(以上)

緒言

同種血輸血回避を目的として、Hb濃度を基準とした輸血誘因 (*) や、Hb濃度を考慮しない生理的輸血誘因が提案されている。また回避法として術前自己血貯血や、循環血液量を維持した急速血液希釈 (Acute Normovolemic Hemodilution, ANH: 術中希釈式自己血採血) もある。術前自己血貯血の経費高は問題であるし、同種血輸血回避の効果も疑問である。ANH処置後の低Hb濃度は症例に依っては危険な状態になるので、ANHに人工酸素運搬体を組合わせた方法は有効と考えられる。ANHによってHb濃度を低下させて貯血効果を向上、また酸素運搬能が加わることで貧血状態での安全性が向上する。

パーフルオロ化合物 (PFC) は人工酸素運搬体の一つで、Perflubron乳剤は第2世代の高濃度乳剤である。perfluorooctyl bromide ($C_8F_{17}Br$) と、perfluorodecyl-

* Transfusion trigger: triggerは誘因の意。輸血開始の目安、輸血要求点。

bromide ($C_{10}F_{21}Br$) をレシチンで乳化している。酸素や二酸化炭素の高い溶解度を有し、酸素分圧と酸素溶解度の比例関係は、Hbのsigmoidal曲線とは対照的である。半減期は 9.4 ± 2.2 時間（投与量 $1.8g/kg$ ）。本研究の目的は、ANHに於けるPerflubronの効果と安全性を明らかにするとともに、著明な失血を伴う整形手術患者において生理的輸血誘因を回避することである。

方法

研究対象：

本臨床試験は欧州6か国11機関にて、1996年1月から1997年2月の間に無作為抽出を受けた患者290名のうち、147名を対象に実施された。性別に無関係に、股関節置換手術または脊椎手術の患者で、2-6ユニット（1ユニットは500mL採血由来）の赤血球パックが必要と判断された患者を本研究の対象とした。

採用基準は、術前Hb濃度 $11 \sim 16g/dL$ 、全身麻酔(isoflurane, fentanyl, vecuronium)、肺動脈カテーテル挿入の承諾、Hb濃度 $9g/dL$ 迄のANH、吸気酸素濃度(F_{iO_2})を1.0として5分間肺換気後に動脈血酸素分圧が $360mmHg$ 以上を示すこと、また $F_{iO_2}=0.4$ にてANHした後、混合静脈血酸素分圧(PvO_2)が $40mmHg$ 以上であること。除外基準は、妊娠や授乳期、同種血輸血の拒否、手術前EPO投与、Perflubron乳剤成分に対するアレルギー、手術所要時間が8時間以上、必要血液量が6ユニット以上と予測される場合、脊椎麻酔や硬膜外麻酔を伴う場合、術前輸血を受けた場合、心臓障害、呼吸障害、肝機能障害、腎機能障害、肥満体質、経口抗凝固剤服用、アスピリン、線溶系薬剤、抗維溶系薬剤の投与、出血素因の既往、免疫不全、感染症、悪性腫瘍の既往、アルコールや麻薬乱用の既往。術前自己血輸血および深部静脈血栓症予防に低分子量分画ヘパリンの投与は承認した。Perflubron乳剤以外の乳剤製剤は術中前後に用いない（除外基準は本文ではもっと詳しく記載があり）。

試験プロトコール：

本研究では、前向き（prospective）、複数国、複数機関、無作為選択、集中管理下、単純盲検法の同時進行試験である。Per-

flubron乳剤（Oxygent）はAlliance Pharm.（San Diego, CA）が提供、また臨床試験はR.W. Johnson Pharmaceutical Research Institute（Zurich, Switzerland & Rartin, NJ）の支援により実施。Perflubronの $37^\circ C$ 、1気圧における酸素溶解度は $7.6mM$ （ $19.3vol\%$ ）、二酸化炭素溶解度は $61.6mM$ （ $157vol\%$ ）である。

末梢静脈を確保し麻酔を開始。isofluraneとfentanylで麻酔を維持し、vecuroniumで患者を不動化した。亜酸化窒素を用いずに高酸素濃度にて換気。橈骨動脈と肺動脈カテーテルを挿入した。Hb濃度 $9g/dL$ 迄のANHは、脱血とコロイド投与を同時に行って達成（ゼラチン、ヒドロキシエチルスターチ $200kDa/0.5M$ 、またはヒト血漿アルブミン）。ANH後、最初の血流動態測定は $F_{iO_2}=0.4$ にて実施。心拍数、体動脈圧、肺動脈圧、肺動脈楔入圧(PCWP)、心拍出量、動脈血および混合静脈血のガス分析、Hb濃度を測定。無作為配分までは F_{iO_2} を0.4に維持した（図1）。

輸血誘因は血流動態に基き、生理的輸血誘因として定義した。頻脈（心拍数がANH後の値の125%以上、または110beats/min以上のどちらかが先に診られたとき）、低血圧（平均動脈圧がANH後の値の75%以下、または $60mmHg$ 以下）、高心拍出量（ANH後心拍出量の150%以上）、または低 PvO_2 （ $38mmHg$ 以下）の時を生

理的輸血誘因とした。生理的輸血誘因に達する前にHb濃度 $6g/dL$ 以下を示した場合や心電図が心虚血を示した場合は無作為配分を行わずに、ANH中に得た自己血を返血。無作為に分配されて処置を受けた場合、Hb濃度 $6g/dL$ 以下または心電図が心虚血を示した時に、第二、第三の輸血誘因とした。頻脈と低血圧はハイポレミアと浅麻酔を否定できた場合に生理的輸血誘因とした。

生理的輸血誘因に達した後、患者を4群に無作為に分配した。①標準処置群として、 $450mL$ の自己血（ANH中に得た全血）を $F_{iO_2}=0.4$ の状態で投与（AB群）；②Perflubron乳剤低投与群、 $0.9g/kg$ （ $1.5mL/kg$ ）の投与量で、コロイドを添加して総量を $450mL$ とし、 F_{iO_2} を1.0として投与（ $P_{0.9}$ 群）；③Perflubron乳剤高投与群、 $1.8g/kg$ （ $3.0mL/kg$ ）の投与量で、コロイドを添加して総量を $450mL$ とし、 F_{iO_2} を1.0として投与（ $P_{1.8}$ 群）；そして、④コロイド群、コロイド溶液 $450mL$ を F_{iO_2} を1.0として投与（COL群）。

第二輸血誘因が現れた場合は、ANHで得た1ユニット（ $450mL$ ）の自己血、或いは1ユニットの赤血球パック（自己血または同種血）を、各群規定の F_{iO_2} を維持しながら投与した。手術中のセルセーバー（術中の出血を回収し再輸血する）を可能とした。再輸血液は先ず自己血（優先

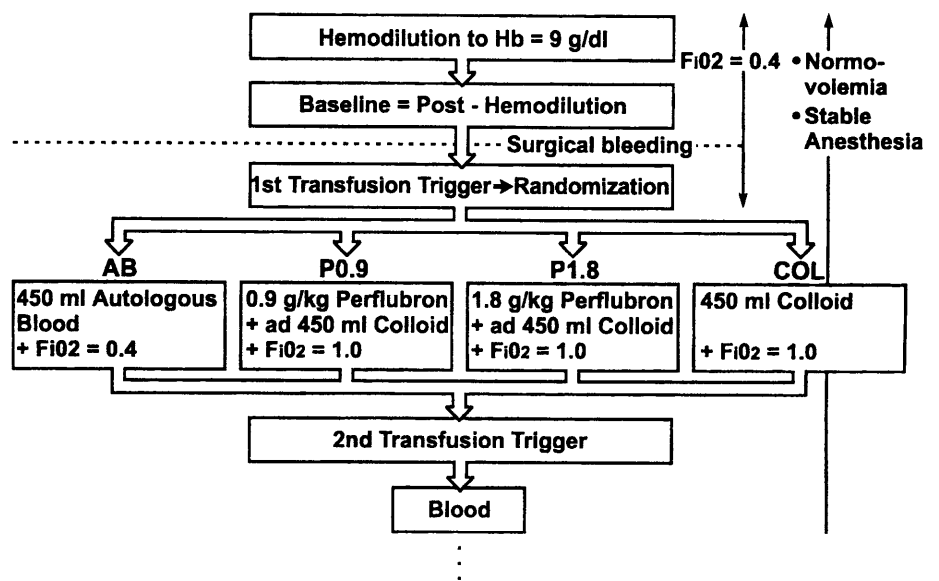


Fig. 1. Study protocol.

順位はANH中に得られたもの、セルセーバー血液、そして術前自己血貯血液)、次に同種血輸血とした。第二処置終了後、第三輸血誘因が診られたら、ANHで得た1ユニットの自己血、或いは1ユニットの赤血球パック(自己血または同種血)を投与する。術部縫合開始後、同種血輸血の前に、残余自己血を徐々に投与しHb濃度を8g/dL以上に調節する。患者は手術後28日まで追跡調査を受ける。

第一のendpointは輸血誘因回避の持続時間で、最初の処置を受けた時から第2回目の処置を始めた時、或いは手術を終えるまで(手術部縫合開始まで)のどちらか早く生じた時までの時間である。第二のendpointは生理的輸血誘因を回避した患者の比率; 同種血輸血の必要性; 酸素ダイナミクス; 28日間の追跡評価である。

結果

(表1) : 147名の患者を無作為選択し、38名をCOL群に、38名をP_{0.9}群に、36名をP_{1.8}群に、そして35名をAB群に分配。最

初の処置において、平均動脈血圧は全群安定であったが、P_{1.8}群では上昇した。肺動脈圧はCOL群とP_{1.8}群では変化せず、P_{0.9}群とAB群では僅かに増大。心拍数は全群で安定。心係数はP_{0.9}、P_{1.8}、AB群で増大したが、COL群では安定。動脈血酸素分圧は(プロトコール通りに)COL、P_{0.9}、P_{1.8}群で増大したがAB群では変化しなかった。P_vO₂および静脈血酸素飽和度は全群で増大した。しかし処置後の群間比較では、AB群のみ有意に低くなった。動脈血酸素含有量はP_{0.9}群およびP_{1.8}群のみ増大したが、COL群およびAB群では変化しなかった。酸素輸送係数はP_{0.9}群、P_{1.8}群、およびAB群で増大したが、COL群では変化なし。酸素消費係数は全群で変化せず、酸素抽出率は全群で低下した。

輸血誘因を回避した割合が一番高かったのは、P_{1.8}群であり、次いでP_{0.9}群、COL群、そしてAB群となった。低P_vO₂の反転は、AB群に比較してCOL、P_{0.9}およびP_{1.8}群で多く見られた(表2)。低血圧、頻脈、高心拍出力からの反転は群間で特に

差異は無かった。輸血誘因回避の持続時間(第一endpoint)は、P_{1.8}群が一番長く、次いでP_{0.9}、AB、COL群の順となった。頻脈、高心拍出力、およびHb濃度6g/dL以下の状態は、第二輸血誘因として全群において同様の確率で生起。低血圧はP_{1.8}群(11%)よりもCOL群(45%)でより頻発し、P_vO₂ ≤ 38mmHgもAB群が他の群に比較して多く見られた。手術後28日までの死亡例は無し。同種血輸血要求の頻度は全群で同程度であり、退院までのHb値も同様であった。

副作用による調査中断は無かった。計12名の患者が重篤な副作用を示したが、全て本研究処置には無関係であった。副作用を示した患者の割合は53%~69%でその殆どは軽度から中程度の強さであり、群間に有意差は無かった。血小板、出血、および凝固に関する異常がP_{0.9}群およびP_{1.8}群において、COL群およびAB群よりも頻度高く報告された。Perflubron投与群中の計14症例の副作用は血小板数減少症、出血、術後13日目の血小板数の

Table 1. Data prior to and after First Treatment

	Colloid (FiO ₂ = 1.0)		Perflubron 0.9 g/kg (FiO ₂ = 1.0)		Perflubron 1.8 g/kg (FiO ₂ = 1.0)		Autologous Blood (FiO ₂ = 0.4)	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Time from incision to first transfusion trigger [min]	50 ± 36		45 ± 32		51 ± 37		57 ± 35	
Time of first transfusion trigger to end of surgery [min]	91 ± 63		75 ± 55		80 ± 48		82 ± 58	
Hemoglobin [g/dl]	7.8 ± 1.1	7.1 ± 1.1*	8.1 ± 0.9	7.6 ± 1.2*	7.9 ± 1.4	7.6 ± 1.4*	7.8 ± 1.0	7.9 ± 1.0
PCWP [mmHg]	13 ± 3	14 ± 4	14 ± 5	15 ± 6*	14 ± 4	14 ± 4	14 ± 4	15 ± 4
MAP [mmHg]	72 ± 16	76 ± 12	74 ± 16	78 ± 18	75 ± 16	82 ± 13*	70 ± 14	76 ± 15
MPAP [mmHg]	20 ± 4	21 ± 5	21 ± 6	22 ± 8*	21 ± 5	21 ± 6	20 ± 5	22 ± 5*
HR [bpm]	70 ± 14	69 ± 15	70 ± 12	73 ± 14	67 ± 13	69 ± 12	68 ± 15	74 ± 15*
CI [l · min ⁻¹ · m ⁻²]	3.2 ± 1.1	3.2 ± 1.0	3.0 ± 0.8	3.3 ± 0.7*	2.8 ± 1.0	3.0 ± 1.0*	2.9 ± 0.8	3.1 ± 0.8*
PaO ₂ [mmHg]	147 ± 58	421 ± 89*	157 ± 66	407 ± 124*	176 ± 81	441 ± 78*	160 ± 41	164 ± 43†
pH	7.40 ± 0.05	7.39 ± 0.03	7.41 ± 0.04	7.41 ± 0.09	7.41 ± 0.05	7.40 ± 0.04*	7.39 ± 0.05	7.38 ± 0.05*
PaCO ₂ [mmHg]	37 ± 5	37 ± 4	37 ± 4	37 ± 4	36 ± 4	37 ± 4	37 ± 5	38 ± 5*
PvO ₂ [mmHg]	39 ± 6	48 ± 6*	39 ± 5	50 ± 10*	38 ± 4	51 ± 8*	38 ± 4	40 ± 4†
SvO ₂ [%]	71 ± 7	81 ± 7*	71 ± 7	82 ± 8*	72 ± 6	83 ± 7*	70 ± 6	73 ± 7†
CaO ₂ [ml/dl]	10.7 ± 1.4	10.8 ± 1.4	11.1 ± 1.2	11.4 ± 1.4*	11.0 ± 1.9	11.7 ± 1.9*	10.8 ± 1.3	10.9 ± 1.4
CvO ₂ [ml/dl]	7.6 ± 1.3	7.9 ± 1.2*	7.8 ± 1.1	8.3 ± 1.3*	7.7 ± 1.4	8.6 ± 1.9*	7.4 ± 1.0	7.8 ± 1.2*
DO ₂ I [ml · min ⁻¹ · m ⁻²]	349 ± 129	362 ± 125	333 ± 79	370 ± 77*	306 ± 98	351 ± 112*	310 ± 74	334 ± 72*
VO ₂ I [ml · min ⁻¹ · m ⁻²]	100 ± 33	96 ± 33	96 ± 20	97 ± 23	88 ± 22	89 ± 22	97 ± 24	92 ± 22
O ₂ Ex overall [%]	29 ± 6	27 ± 5*	30 ± 6	27 ± 6*	30 ± 6	27 ± 6*	32 ± 5	28 ± 6*
O ₂ Ex hemoglobin [%]	28 ± 7	19 ± 7*	27 ± 6	18 ± 8*	27 ± 6	17 ± 7*	29 ± 6	26 ± 6†
Temp [°C]	35.4 ± 0.8	35.3 ± 0.9	35.4 ± 0.7	35.4 ± 0.8	35.2 ± 0.8	35.2 ± 0.8	35.4 ± 0.8	35.3 ± 0.8

Values are mean ± SD and [N (%)]. There are no significant differences between groups before treatment (PRE).

FiO₂ = inspiratory O₂ fraction; PCWP = pulmonary artery wedge pressure; MAP = mean arterial pressure; MPAP = mean pulmonary artery pressure; HR = heart rate; CI = cardiac index; PaO₂ = arterial O₂ partial pressure; PaCO₂ = arterial CO₂ partial pressure; PvO₂ = mixed venous O₂ partial pressure; SvO₂ = mixed venous O₂ saturation; CaO₂ = arterial O₂ content; CvO₂ = mixed venous O₂ content; DO₂I = O₂ delivery index; VO₂I = O₂ consumption index; O₂Ex overall = overall O₂ extraction ratio; O₂Ex hemoglobin = hemoglobin O₂ extraction ratio; Temp = temperature.

* Significantly different (P < 0.05) versus pretreatment value.

† Significantly (P < 0.05) different from any other group.

Table 2. Transfusion Trigger Reversal

	Colloid	Perflubron 0.9 g/kg	Perflubron 1.8 g/kg	Autologous Blood
FI_{O_2}	1.0	1.0	1.0	0.4
Overall reversal of first transfusion trigger [%]	76	82	97*†	60
Duration of first transfusion trigger reversal [min]	30 (27–60)	59 (40–90)†	80 (60–100)*†	55 (30–70)
Censored observations [%]	13‡	45	53	26‡
Reversal of tachycardia [N (%)]	3/6 (50)	2/4 (50)	4/5 (80)	1/4 (25)
Reversal of hypotension [N (%)]	10/15 (67)	10/12 (83)	10/10 (100)	17/19 (89)
Reversal CO > 150% [N (%)]	2/3 (67)	0/2 (0)	1/2 (50)	1/2 (50)
Reversal PvO_2 < 38 mm Hg [N (%)]	22/23 (96)*	22/24 (92)*	26/26 (100)*	12/22 (55)

Values are median (95% confidence intervals) and [N (%)].

FI_{O_2} = inspiratory O_2 fraction; CO = cardiac output; PvO_2 = mixed venous P_{O_2} .

* Significantly different ($P < 0.05$) versus autologous blood.

† Significantly different ($P < 0.05$) versus colloid.

‡ Significantly different ($P < 0.05$) versus perflubron emulsion 1.8 g/kg.

増大，凝固パラメータ低下である。

手術後に血小板数が全群で低下した。加えて，手術後2日目から4日目の間に一過性の血小板数低下が $P_{1.8}$ 群において，他の群よりも多く認められた。手術後2日目から3日目において $P_{0.9}$ 群がCOL群に比較して低い血小板数を示したが，AB群との差異は無かった。術後7日目以降は全群間で差が無かった。その他の一般測定項目は28日間全群において同様の値になった。平均入院期間は全群で同様であった（15-17日間）。

論 考

本臨床試験ではPerflubron 1.8g/kgの投与を100%酸素吸入条件で実施，この処置に対して全患者が十分な耐性を示した。血流動態や酸素輸送パラメータの変動も輸血をした場合と同等であり，“輸血誘因の回避”が高頻度で，また長時間みられた。

同種血輸血の回避は外科手術における重要課題である。輸血反応，異常免疫化，感染物質の伝染，免疫不全など，様々な危険性と副作用を伴う同種血輸血の無い手術を望む患者数が増大している。また近年は同種血輸血を最小限に留めるために様々な方法や処置法が開発されている。修飾ヘモグロビン溶液やパーフルオロカーボン乳剤などの人工酸素運搬体は，補助的な酸素運搬と酸素放出能力を提供しうるので，術中の貧血状態において患者の安全性を高めることになる。

Perflubron乳剤の補助的な酸素運搬量および酸素放出量の増大の効果については，血液希釈や外科的出血，体外循環モデルで検討され，高い酸素運搬効率が示されている。Hb濃度3～5g/dLの低濃度でも高い動脈血酸素運搬量と心拍出量を維持できる。このため，組織酸素化を増大，混合静脈血酸素含量を増大，また体外循環や出血ショック時の低血圧蘇生後の生存率を高める。本研究でも，Perflubron乳剤を投与して FI_{O_2} = 1.0を吸入させることで低 PvO_2 が上昇した。Perflubron粒子（直径：0.2 μ m以下）が赤血球（直径：7～8 μ m）に比較して狭小な微小血管系をより迅速に循環し酸素輸送量を増大させ，組織酸素化が局部的に，特に心臓系で増大し，著しい血液希釈による貧血状態にも拘わらず血圧維持に寄与したのである。末梢組織への酸素運搬量の増大は輸血誘因の回避に対応し（図2，表2），Perflubron乳剤が効率よく酸素を放出していることを意味する。Perflubron乳剤の高投与群において輸血誘因回避の持続時間が一番長かった。

Perflubron乳剤の高投与量群ではcensored observationが最も多かったにも拘わらず，輸血誘因の回避が長時間続いた（表2）。手術終了前に第二輸血誘因を示さなかった患者がcensored observationである。第一輸血誘因において1.8g/kgのPerflubron乳剤を投与した患者の53%は，第一回処置と外科的処置の終了迄の時間を輸血誘因回避の時間として使わざるを得ず，いつも長

時間を示した。またHb濃度6g/dL以下を第二輸血誘因と定めているので，生理的輸血誘因を示さない患者でHb濃度が6g/dL以下に達した患者には，自己血を1ユニット輸血した。従って生理的輸血誘因回避の持続時間を更に短くした可能性がある。このためPerflubron乳剤高投与量群の生理的輸血誘因回避の持続時間は過小評価されている。第二輸血誘因として低血圧が $P_{1.8}$ 群よりもCOL群に多く認められた。また $P_{1.8}$ 群でのみ，第一回目の処置に拠る血圧上昇が認められた（表1）。低 PvO_2 はAB群で最も多く見受けられ，AB群では第一回目処置後最も低値を示した。従って，最初の処置の効果が第二の輸血誘因の分布に影響を与える。

同種血輸血の要求度は全処置群において同等であった。強調すべきことは，本研究計画では本質的に輸血結果に有意差を見出すことを不可能にしている。なぜならば全群の患者は手術前後において同程度のHb濃度に設定してある。Hb濃度は，全患者が縫合開始後にHb濃度が8g/dL以上になるように輸血を受け，最終的には同様のHb濃度にしてから退院させる。仮に同じHb濃度の時に出血があれば，同程度の赤血球が失われ，同程度の同種血輸血が必要となる。同種血輸血必要量の低下を示すためには，Perflubronを投与して患者のHb濃度を更に下げること外科手術中の失血に際し赤血球喪失量を低下させる実験が将来必要になろう。

副作用として発熱反応が74名中5名で観測され，Perflubron非投与群では73名中

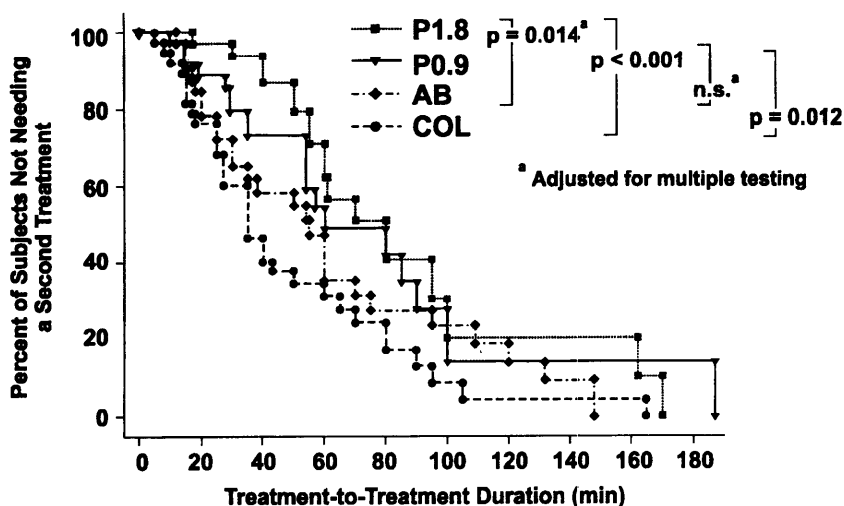


Fig. 2. Duration of reversal due to treatment at first transfusion trigger. Treatments were infusion of 450 ml colloid and ventilation with an inspiratory oxygen fraction ($F_{I}O_2$) of 1.0 (COL), perflubron emulsion 0.9 g/kg and colloid (total of 450 ml) with $F_{I}O_2$ of 1.0 ($P_{0.9}$), perflubron emulsion 1.8 g/kg and colloid (total of 450 ml) with $F_{I}O_2$ of 1.0 ($P_{1.8}$), and 450 ml autologous blood with $F_{I}O_2$ of 0.4 (AB).

1名であった。その他の副作用は全群で同様の頻度で見られた。血小板数はPerflubron投与群で最も低い値を示したが、手術後7日目には完全に回復し、その他の副作用は無かった。血小板数に対する影響は、特にPerflubron乳剤を再投与する場合や、投与量が多い場合について今後検討されるべきである。

結論として、Perflubron乳剤の投与を100%酸素吸入と同時に行うと、同種血輸血必要性を無くす点において少なくとも自己血輸血と同程度の効果を有するので、従来の輸血療法の安全な代替法に成り得ることを本研究は示している。

静注用人免疫グロブリン製剤

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〉

薬価基準収載

■ 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)

ARTIFICIAL BLOOD Vol. 8, No. 1, 2000

25

赤血球代替物としてのPerflubron治験論文への論評

Comments on clinical study on Perflubron and for clinical trials on new red cell substitute in the future

岡山赤十字血液センター 高折 益彦

要約

Spahn, D.R. を代表としたヨーロッパPerflubron (PFB) 研究グループのAnesthesiology (1999) への発表と、これに対するEditorial Views として Tremper 教授のコメントに論説を加えた。治験計画では今回治験遂行中、生体にもし好ましくからざる兆候が生じた際には輸血をおこなうためのtrigger point (測定因子の値) をいくつか設けている。血圧、脈拍数、心電図変化、hemoglobin値などは一般的ではあるが、これらは生体のhomeostasisのために重要な因子で、代償機能破綻の重要な感知因子である。今後、我が国で同様な治験を行なう際に採用すべき因子、ならびにtrigger pointである。しかし心拍出量、混合静脈血酸素分圧の測定などは、少数の特定症例に限ってのみ行ない、全例には必要でないと思われる。また今回の治験でのPFB液、膠質液の使用方法に関しては今後多少考慮が必要である。手術直前に希釈式自己血輸血用に自己血を採取、保存するならば、そのための血液量補充には開発しようとする赤血球代替物を使用するのが有効、かつ適切でないかと思われる。

abstract

European Perflubron Emulsion (PFB) Study Group, Spahn, D.R. and his colleagues, reported a clinical trial on red blood cell substitute, such as perflubron, in Anesthesiology 1999; 91: 1195-1208, and Dr. Tremper criticised it in the same issue. Reviewing the both, we made comment on clinical trial concerned with red blood cell substitute. Dr. Spahn et al. scheduled that the investigators should start curative blood transfusion, when certain unfavourable signs in patient's physical condition and non-physiological values in parameters monitored would be noted. Decrease in blood pressure, increase in heart rate, changes in ST-segment on ECG and low hemoglobin value (less than 6.0 g/dl) are reasonably accepted for the above transfusion trigger as routine and valuable parameters. These factors are noteworthy and useful to detect failure in vital homeostasis and falling into irreversible state. Therefore we have better to apply them when a new trial will be designed for development of red blood cell substitute in the future. On the other hand, monitoring of cardiac output and mixed venous oxygen partial pressure will be performed in restricted patients alone and should be avoided for all subjects since these parameters remained in their normal range throughout the PFB study and probably would do in the new trials. When we will try clinical study for new developing red cell substitute, it will likely efficient to compare the red cell substitute which can carry oxygen and plasma substitute which can not for the replacement of diminished blood volume for autologous blood collection immediately before surgery and further replacement for additional bleeding, if possible.

key words

acute normovolemic hemodilution, autologous blood transfusion, red blood cell substitute, clinical trial, protocol design, review

昨年、1999年“ヨーロッパPerflubron乳剤研究グループ”から整形外科手術時の出血に対して、赤血球製剤使用の代替としてPerflubron (以下PFB) を用いた治験報告がなされた。すなわちAnesthesiology 1999; 91:1195-1208に掲載されている (その要約は本誌、本号に掲載されている)。また同Anesthesiology誌にはEditorial ViewsとしてアメリカMichigan大学の麻酔科のTremper, K. K. 教授のコメント (ibid 1185-1187) が掲載されている。Tremper教授はこの治験が非常に複雑な計画で、しかも多施設で行なわれたことに称賛の辞を送りながらも、現行のアメリカでの輸血施行基準¹⁾と必ずしも一致しないこと、また結果的に

ネガティブデータではないかとの厳しい論評を加えている。この治験のprotocolでは、かつてわれわれがcell型赤血球代替物としてNRC (liposome encapsulated hemoglobin テルモ社) を用いて行なった動物実験^{2, 3)}のprotocolに非常に近い方法を採用している。われわれの動物実験では実地臨床での赤血球代替物使用を想定して研究のprotocolを作成していたので、両者のprotocolが類似したものになったと思われる。われわれの研究では外科的出血に対してまず晶質液、膠質液を使用してすでに血液希釈状態になっていて、そしてさらに相当量の出血があった場合の処置を想定した。すなわちこの際の出血に対して酸素運

搬能のあるNRC, または酸素運搬能がない代用血漿剤を使用し, 本来血液中に存在していたヘモグロビンが4 g/dlとなる血液希釈条件での両群の比較が計画されていた. その結果, さらなる出血に対してもNRCの使用は心拍出量の維持, 酸素消費量の維持などの治療効果が認められた. しかし組織の酸素不足を回避という点に関しては対照群との間に十分な差を検証できなかった. すなわち酸素運搬能がない代用血漿剤投与群でも生体の代償機能が限界まで作動し, ある時点を過ぎると, データーをとる間もなく死亡することを回避したためであった. 同様のことは治験でも十分可能性があり, とてもそのような危険に近づくprotocolの立案は許されない. したがって今回のPFB研究グループの治験でも靴下搔痒の感を持たざるえなかったものと思われる.

Editorial ViewsでTremper教授は, 現在のように輸血用血液にエイズウイルスやC型肝炎ウイルスの汚染が少なくなったにもかかわらず, 同種血輸血の回避のためにPFC (perfluorocarbon emulsion: PFB) を使用するのには意味がないと述べている. しかし同種血輸血を回避するのは輸血感染症の防止だけが目的ではない. この点に関してはTremper教授の見解に賛同できない. また自己血輸血施行群に対しても100%酸素吸入を行なったことの指摘では, PFB群で100%酸素吸入は必要であり, 実験デザインとして投与した薬剤, 血液製剤の差を除いて, 他の条件を統一することの必要性は認容されよう. また混合静脈血酸素分圧に差を認めたとは言うものの, それらはすべて正常値内にあったのではないかとTremper教授は指摘している. たしかにその差は有意ではあったものの, 極めて僅少であって, われわれも意義があるとは思えない. この点に関しては, われわれの動物実験^{4, 5)}でも混合静脈血酸素分圧は不可逆の状態に至るまで維持されていた. おそらく生体が極度の酸素不足状態におかれると重要臓器の保護のため自らを一時的に虚血状態に導入する組織, 臓器, たとえば皮膚, 骨格筋など, が出現するためと思われる. すなわちそれらの臓器を灌流すべき動脈血液がシャント血流として静脈血液に混合して心臓に還り, 混合静脈血の酸素分圧の低下を生じせしめないと想像される. しかし心筋の酸素分圧は著しく低下し, 酸素不足の状態に到っているものと思われる. これが不可逆的变化を生体にもたらす要因と推測される. ヘマトクリット値を21.7%に低下させたCrystal⁶⁾の血液希釈条件では心筋からの灌流血液である静脈洞血液の酸素分圧は32.6mmHgから33.1mmHgへの変化に止まっているが, 動脈酸素含有量との差は13.9vol.%から6.9vol.%と半減している. すなわち極度の血液希釈, たとえばヘマトクリット値が12%となった場合には0 vol.%近くまで低下して, 心筋組織の酸素不足を生じせしめると推測される. われわれの研究⁵⁾でも心不全兆候の指標としての心室拡張終末期圧の上昇は4.3g/dlのhemoglobin値 (ヘマトクリット値で約13%) で生じている. すなわち今回のPFB研究で混合静脈血の酸素分圧が正常値内にあったのはこの臨床研究が生体の代償機能が作動しうる安全限界内で行なわれていた結果として当然のことと解釈される.

今回のPFB研究ではいくつかのtransfusion trigger pointを設けている. そしてそのtrigger pointに達した時には輸血を行なう計

画になっていた. このような計画は多施設での治験計画として適合したものと思われる. 血圧, 脈拍数, 心電図上でのST変化などを観察してこれをtrigger factorとして取り上げたのは一般的, 臨床的であり評価される. またこれらの因子は生体のhomeostasisの維持が行なわれているか, 否かを知る面で極めて重要である. すなわち生体内になんらかの異常, すなわち生体機能のhomeostasisを攪乱する変化が生じて, それが生体の代償能力を越える場合にはこれらの因子が必ず変動するからである. またhemoglobin値の6.0g/dlも認容されよう. すなわち一般に認められている急性貧血, 血液希釈の下限値¹⁾を監視するため適切であろう. しかし心拍出量に関する基準には必ずしも賛同できない. すなわち一般に心拍出量の測定はSwan-Ganzカテーテルの挿入が必要である. これを限定した症例のみに挿入するならば認容されよう. しかし今回の治験対象症例の全てでどれだけその必要性があったであろうか. Swan-Ganzカテーテルの挿入にはある程度リスクがともなう. 必ず心機能が手術操作等により障害される可能性がある場合にはその必要性は認められる. しかしその可能性がない場合には挿入を回避すべきであろう. まして治験症例であるとすれば, なおさらその挿入は批判されよう. また過去の成績を振り返ってみても心拍出量が血液希釈によって150%以上となった成績は少ない. ちなみにわれわれの動物実験^{5, 6)}ではヘマトクリット値が10%近くになった場合でも, また12ml/kgの血液交換を行なった臨床研究⁷⁾の場合でも心拍出量の増加は希釈前値の約1.3倍程度にとどまっている. これは一回拍出量の増加は安静状態の1.3以上にはなりがたい生理的条件にもとづくものと解釈される. ちなみに一般の血液希釈の際には心拍数は1.1倍程度しか増加しない.

今回のPFB研究の計画ではまず一般に使用される各種膠質液 (これらの膠質液同士はかなり性格が異なるもので, 研究の統一性に問題がある) を使用して血液希釈と同時に自己血を採取している. これはわれわれが以前おこなった動物実験での想定, すなわち一般臨床では出血が生じればまず晶質液, さらに出血が増加すれば膠質液の投与という基準⁸⁾に沿った計画であった. あるいは先行する血液希釈で患者自身のhemoglobinによる酸素運搬能を減じておいて, 次にPFBを投与してその有効性を検出しようとしたとも考えられる. しかしもし今回の研究でPFBの有効性を検討することに重きを置くならば, なぜ最初の自己血採取の際にPFBを使用しなかったか, そしてこの場合を対照となる膠質液使用の場合と比較しなかったのか. そして手術が開始され, 出血が生じた場合には手術前に採取した自己血とともにPFBを使用しなかったのか. このようにすればさらにPFBを使用して (1.8g/kg以上の使用は回避しなければならない条件があれば不可能であろうが), これと膠質液使用と比較すれば, よりその効果と安全性とを検討することが出来たのではないか. ただしそのような計画を行なった場合, 使用するPFB量が130g以上になり, その副作用を危惧しなければならなかったためかも知れない.

今回の論文には総出血量の記載が見当たらない. ただ同種血を輸血された症例数は少なく, 自己血投与総量が3.3単位 (約1500ml) であったことから, 総出血量はこの量と推定できるか

もしれない。対象症例の体格を日本人（平均体重60kg）のそれと比較すると、体重では約1.2倍であり、身長を考慮外としても、この出血量は日本人に換算すると1250mlにとどまる。なお今回のPFB研究でも一部では貯血式自己血輸血が行なわれていた。もし手術前7-10日前に400mlの術前自己血貯血、さらに可能ならば2週間前からの800mlの貯血、を行なっておけば赤血球代替物による希釈式自己血輸血とあわせて十分対応できる出血量である。我が国で開発を進めているliposome包埋型、すなわちcell型赤血球代替物での治験が将来開始される場合には上記のような計画も参考になろうかと思われる。

治験は有効性の検討とともに安全性の検討も行なわなければならない。そのためには治験計画を一次治験、二次治験と分け、まず少量の赤血球代替物投与で安全性を、次により大量の投与を行ない、その有効性を検証するのも一法かと思える。

引用文献

- 1) Practice guidelines for blood component therapy, a report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on blood component therapy *Anesthesiology* 1996; 21: 732-47
- 2) 日本血液代替物学会血液代替物前臨床評価試験専門委員会の評価報告資料集 1996; (平成8年2月) 77~79 頁
- 3) Takaori, M., Fukui, A. Treatment of massive hemorrhage with liposome encapsulated human hemoglobin (NRC) and hydroxyethyl starch (HES) in beagles *Artif. Cells Blood Subst. Immobil. Biotechnol.* 1996; 24: 643-53
- 4) Takaori, M., Safar, P. Adaptation to acute, severe hemodilution with dextran 75 in dogs *Arch. Surg.* 1966; 92: 743-8
- 5) Takaori, M., Safar, P. Critical point in progressive hemodilution with hydroxyethyl starch *Kawasaki med. J.* 1976; 2: 211-22
- 6) Crystal, G.J., Rooney, M.W., Salem, M.R. Myocardial blood flow and oxygen consumption during isovolemic hemodilution alone and in combination with adenosine-induced controlled hypotension *Anesth. Analg.* 1988; 67: 539-47
- 7) Takaori, M., Kuroki, T. Preoperative hmodilution for autotransfusion *Biblthca Haemat.* 1981; No.47, 270-8 (Karger, Basel)
- 8) 血液製剤調査機構血液製剤の使用にあたって薬業時報社 東京 1999

●編集後記●

この時季、花粉症に悩まされ雨降りを心待ちにしている会員の方も少なからずいらっしゃると思います。今年のスギ花粉量は例年の数倍から十数倍とのこと、どうか今しばらくご自愛ください。厚生科学研究成果発表会一般向けが2月11日に、研究者向けが23日に行われました。両日とも会場は大盛況で研究者はも

ちろん一般の方々の人工血液に対する関心の高さを改めて目の当たりにしました。

早いもので「人工血液」の編集を担当するようになって本号が3冊目となります。何分不慣れなもので関係の皆様にはご迷惑をおかけしておりますが、今後ともよろしくお願い申し上げます。

(渡辺真純)



遺伝子組換えヒトG-CSF製剤

指定医薬品・要指示医薬品

薬価基準収載

イトロジン®

注 50 μ g
100 μ g
250 μ g



[資料請求先]

中外製薬株式会社
〒104-8301 東京都中央区京橋2-1-9

CNU8218

NEUTROGIN[®] Injection 一般名 レノグラスチム(遺伝子組換え)

※ 効能・効果、用法・用量、使用上の注意、取扱い上の注意等は製品添付文書をご参照ください。

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. 8 (1) 2000年3月31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