

## 目 次

# 人工血液

第8巻 第4号 2000年12月

論説 赤血球代替物の臨床応用をめざして ..... 高折益彦 85

### 二次掲載論文

粒子径を制御したアルブミン重合体の合成とGP1b $\alpha$   
結合体の機能評価 ..... 寺村裕治 90

### トピックス

南極越冬隊の医療の現状と人工血液への期待 ..... 大野義一郎 96

### 海外文献紹介

重症自己免疫性溶血性貧血症例に対するウシ重合  
ヘモグロビン輸血 ..... 岩丸有史 100

### 学会報告

第7回日本血液代替物学会ワークショップ  
“人工血液臨床応用をとりまく問題点と対策”を司会して  
..... 高折益彦・仲井邦彦 103

# ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 8 No. 4 December, 2000

## Contents

### Comment:

*Development of Erythrocyte Substitute and Its  
Practical Use* ..... Masuhiko Takaori 85

### Secondary Publication:

*Preparation of Size-Controlled Albumin Polymers  
and Evaluation of the GP1b $\alpha$  Conjugates*  
..... Yuji Teramura 90

### Topics: Circumstances and Problems on Antarctic Medicine:

*Prospect for the Artificial Blood* ..... Giichirou Ohno 96  
*Transfusions of Polymerized Bovine Hemoglobin  
in a Patient with Severe Autoimmune Hemolytic  
Anemia* ..... Arifumi Iwamaru 100

### Report: 7th Annual Meeting of the Society of Blood Substitutes, Japan Workshop on “Issues and Measures to Clinical Application of Artiticial Blood”

..... Masuhiko Takaori, Kunihiko Nakai 103

# 会 告

## 第8回日本血液代替物学会年次大会

会 期：平成 13 年 9 月 4 日（火），5 日（水）

会 場：シェーンバッハ・サボー  
〒102-0093  
東京都千代田区平河町 2-7-5

大會長：清水 勝 （東京女子医科大学中央検査部輸血科）

事務局：東京女子医科大学中央検査部輸血科 藤井 寿一  
〒162-8666  
東京都新宿区河田町8-1  
TEL: 03-3353-8111 (内 37231, 37232)  
FAX: 03-5269-7360 (直通)

# 赤血球代替物の臨床応用をめざして Development of Erythrocyte Substitute and its Practical Use

高折益彦

Masuhiko Takaori, M.D.

## Abstract

Development of erythrocyte substitute ( RCS ) and its clinical use is strongly desired from social and medical needs. The RCS is promised to give us many benefits in clinical practice. The RCS may avoid several immunological adverse effects associated with homologous blood transfusion, such as alloimmunization and GVHD, and also transfusion related infection, such as AIDS and viral C hepatitis. Furthermore the RCS can be used as an universal blood without any blood type screening and be storaged for long period on shelf. For its clinical use, it is required obviously strict examination and solid guarantee upon safety and efficacy. Up to date two type products have been candidated for its trial. One of them is colloid fromed RCS, such as DCLHb ( Baxter Co. ) and Perfubron ( Alliance Co. ), and another is cellular formed, such as NRC ( Terumo Co. ). The cellular formed RCS, in my opinion, seems more superior to the other from several reasons as followed ; 1 ) Capability for inclusion of some substances for sufficient oxygen transport, 2 ) More physiological flow pattern in the microcirculation as similar as the natural erythrocytes, 3 ) More long persistence in the circulation, 4 ) I cap. indirect contact of oxygen carrying substance with surrounding tissues and cells. Selection of oxygen carrying substance is also important. Full synthetized compound should be ideal while the present situation it has to be obtained from natural sources, as human or bovine hemoglobin. Recently, however, lipid heme or albumin heme has been synthetized in Waseda University. These are now being tested in preclinical studies and are expected for practical use in the future .

## Key Words

erythrocyte substitute, artificial blood, clinical trial design, cell form, non-cell form, microcirculation, circulatory persistent time, half life, social benefit, medical benefit, product check point

## はじめに

海外においてはすでに赤血球代替物に関しての臨床治験がおこなわれている。一方、わが国においても基礎的研究はかなり進んでいる。しかし臨床治験をおこなうまでに至っていない。とはいへ試作された製品は治験をおこなっても許されるほどの域に達している。ただ多少はその安全性と有効性について追試すべき点が残っているとは思われる。しかし赤血球代替物に対する医学的、社会的要望は強く、現在でも直ちに臨床応用に進むべきではないかとも思われる。そして実際に赤血球代替物が臨床に使用されるとなれば、種々の恩恵を我々に与えることが約束されている。

## 1. 赤血球代替物の医学的、社会的恩恵 (Tab-1)

その一つは

- 1) 血液型判定を必要としない赤血球の出現、すなわち universal blood の出現である。輸血医療における事故でもっとも多いものは血液型判定の誤りである<sup>1), 2)</sup>。またもし血液型判定を必要とせず、安全に輸血が施行できるならば、輸血にともなう検査時間は短縮され、医療全体の流れを速やかならしめる。そしてそれはとりもなおさず治療効果を向上させることとなる。さらにまた適合血液が得難い稀な血液型の患者には大きな福音である。
- 2) 次に製品使用期間の延長が得られることである。現在の赤血球製剤の使用期間は採血から 21 日間となっている。このような短い使用期間のために現在では多大の労力と経費とを費やしている。そのためにもさらに長期間の保存が可能

な代替物の開発が望まれる。少なくとも我々が前臨床研究で使用、経験した赤血球代替物製品では、上記21日よりもはるかに長期間、すなわち数ヶ月、乃至年余の貯蔵に耐えうることが認められている。

- 3) そして人工生産物である代替物では種々の輸血感染症の予防が可能で、安全である。たとえヒトヘモグロビン（Hb）を酸素運搬体として活用したとしても、その製造過程において、細菌、ならびにウイルスをほぼ完全に死滅、不活性化することが可能である。もちろん採取された血液中の白血球は製造過程で排除されるので、GVHD（Graft vs. Host Disease）の発生は認められない。
- 4) Redmanら<sup>3)</sup>が無作為的に輸血を受けた患者で検索したところ、同種免疫抗体の発生率は全体の8.4%であったという。現在の輸血ではたとえ初回の輸血は安全に行なわれていたとしても、不規則抗体産生により、患者の将来に不安を残す過誤を犯している。これに反し人工的な赤血球代替物ではいかなる赤血球膜抗原も含まないため同種免疫抗体の産生の危険性を生じない。このことは将来での洗練された医療には必須の条件であるといえよう。
- 5) 現在の少子・高齢化傾向では、きわめて近い将来に献血による輸血用血液での供給に不足をもたらすことが明白である。このことを解決するには人工的に赤血球の工業生産をすることが差し迫った問題となっている。
- 6) 宗教上の信条として、生体から得られた血液を輸注する現在の輸血療法を拒否する人たちのための医療では、現在、多くの問題をかかえている。そのためにも人工血液、すなわち赤血球代替物の出現が望まれる。
- 7) また血液型の多型性から適合血液が得難い畜産医療のために 1) にて述べた血液型をもたない人工血液の社会的意義は大きい。

Table-1

Medical & Social Benefits	
Universal Blood	
Long Term Storage	
No Disease Transmission & No Incidence of GVHD	
No Allogeneic Immunization	
Independency upon Social Donation	
Solution of Transfusion Refusal & Incompatibility	

## 2. 前臨床試験で検討しておかなければならぬ事項

すでに本誌<sup>4)</sup>において、赤血球代替物となり得るべき条件については述べている。その有効性を検討することもさることながら、まずはその安全性についての検討が必要である。Tab-2は焦点を赤血球代替物にしほって有効性、安全性について検討すべき最小限の項目を提示した。欧米では重合Hb<sup>5)</sup>、過ヨウ素化合物<sup>6)</sup>での臨床治験がすでにおこなわれている。その治験前にはこの表に示した項目以上の検討がおこなわれていたと思われ

る。わが国ではliposome encapsulated hemoglobin vesicle (LEHV) が赤血球代替物開発の中心となっている。しかしこのタイプの赤血球代替物について諸外国での包括的、詳細な検討は少ない。LEHVを臨床応用にまで発展させるためには、少なくともTab-2に提示した項目の一部を研究室段階で、その他は包括的に製薬会社において検討されなければならない。過去にテルモ株式会社が作成したLEHV、すなわちNRCについてはすでにかなり多方面からの検討が加えられ、少なくとも致命的な副作用は認められなかった。ただこのLEHVの循環血液中での半減期は約24時間で、われわれ臨床医が理想するものよりもやや短い感をいたいた。

Table-2

### Check Points for Organ Dysfunction and Injury

Behavior	
Central & Peripheral Nervous System	
Tendon & Skeletal Muscle System	
Defensive & Immunological Function	
Antibody Formation	
Complement Activation	
Chemical Mediator Release	
Phagocytotic Function	
Cardiovascular System	
General Hemodynamics	
Blood Volume	
Vascular Permeability	
Endothelial Function	
Respiratory System	
Pulmonary Gas Exchange & Acid Base Balance	
Lung Respiratory Mechanics	
Liver Function	
Detoxication	
Albumin & Coagulation Factors Synthesis	
Hepatocyte Viability	
Pancreas Function	
Kidney Function	
Digestive Gastrointestinal System	
Reproductive System	
Endocrine System	
Hematological System	
Hematopoietic Function	
Hemostatic & Fibrinolytic Function	
Tissue Metabolism & Energy Production	
Interaction with Other Drugs Routinely Used	

## 3. 赤血球代替物として備えるべき諸点 (Tab-3)

赤血球代替物たるものは

- 1) 充分に酸素を含有する能力を有し、それを末梢組織に運搬する能力を有することが必要条件である。つぎに
- 2) 動脈内で軸流として流れることである。すなわちもし壁流であった場合にはその動脈の栄養血管 (vasovasorum) に大量

- に流入し、シャント血流として無駄に静脈側に移行し、その分、実際に酸素供給を必要とする組織への酸素供給が減少する。さらに血小板は逆に壁流から排除され、より軸流に近くになり、血管損傷の際に充分にその機能を果さなくなる。
- 3) むろん使用する代替物が毛細血管を通過し難いような状態、たとえば大きな凝集塊として毛細血管を閉塞するようなこと、あるいは流速を低下させることがあつてはならない。
  - 4) 赤血球代替物が臨床で用いられる第一の目的は輸血治療の代替である。したがって循環系から赤血球が失われた場合には生体自身の赤血球新生により充分な赤血球量が得られるまで、代替物が流血内にあり、赤血球本来の機能を補うことが要求される。そのためには適当な流血内滞留時間が要求される。すなわち急性貧血での生体の赤血球新生は erythrocyte mass として 3 - 4 ml/kg·week<sup>7), 8)</sup> であることから、少なくとも 48 - 72 時間の半減期での流血内滞留が望まれる。また逆にあまり長時間の流血内滞留は生体自身の赤血球新生を抑制するため好ましくない。むろん
  - 5) として前項 2. で検討した項目の中で生体機能に悪影響を及ぼすものがあつてはならない。そして
  - 6) 工業生産である程度の大量生産が可能であり、
  - 7) その純度が高く、均一性が保たれていることが要求される。そしてさらに
  - 8) 生産コストがかからないことも要求される。すなわち現在の赤血球製剤の価格よりも低価格であることが望ましいが、それが不可能の場合にもその価格と同等、もしくはその価格の 1.5 倍以下であることが要求されよう。

Table-3

## Target of Red Cell Substitute

Oxygen Carrying Capacity	
Circulatory Pattern	
Axillary Flow in the Arteriole	
Smooth Passage through the Capillary	
Retention Time in the Circulation	48 - 72 hours
Mass Production	Homogeneity, Purity, Reasonable Cost

## 4. 細胞型赤血球代替物の利点 (Tab-4)

現在考えられている赤血球代替物としては、酸素運搬物質をコロイド型として含有させた非細胞型のもの、たとえば先般 Baxter 社が開発し、治験にまですすんだ DCLHb、あるいは同様にすでに治験をすませた Alliance 社の Perfubron がある。一方、細胞型としては liposome 内に酸素運搬物質を封入させてテルモ社が試作した NRC がある。しかし前項 3. において述べた赤血球代替物としての生理的条件を勘案すれば細胞型の物性をとらざるをえないと思われる。さらにその上、次のごとき利点が細胞型には付加される。すなわち

- 1) 人工赤血球膜の内部に酸素運搬物質の機能を保持させる、あるいは倍加させる必要物質を添加することができる。またその粒径が 100 - 200 micron となるために
- 2) 流血内での滞留時間を延長させることができる。そしてさらに
- 3) たとえ使用する酸素運搬物質が組織との接触により組織の機能障害をきたすような可能性、あるいは有害物質の遊離の可能性があつても細胞型では人工細胞膜で酸素運搬物質を包埋するため直接外部との接触が防がれ、上記の副作用を防止、あるいは軽減できる<sup>9)</sup>。そして
- 4) 一定のサイズの粒径を保つことにより、その代替物を生体内に注入した際にも正常とほぼ同等の血液粘度を保つことが可能である。これに反しコロイド型（非細胞型）の代替物では循環血液の血液粘度が低下し、shunt 血管への血流量を増加させ、毛細管、細小動脈への流入量を低下させる。そのため末梢組織への酸素運搬が障害される<sup>10)</sup>。さらに大動脈拡張期圧の低下もきたし<sup>11)</sup>、冠状動脈血流量の減少から、心筋代謝障害をきたす可能性も生じる。したがって循環血液中に投与した際に、その血液の粘度が正常に近い状態に保持されることが大切であり、これが細胞型の代替物では可能となる。

Table-4

## Cellular Typed Red Cell Substitute

Capability for Inclusion of Physiological Substances
Expective Long Time Retention in the Circulation
Indirect Contact of O <sub>2</sub> Carrying Substance to Surrounding Tissues
Near Normal Blood Viscosity and Flow Character in Minute Vessels

## 5. 選択すべき酸素運搬体 (Tab-5)

すでにヒト Hb、ならびに牛 Hb が酸素運搬体として用いられている。しかしこのような自然界に存在する物質を選ぶ場合には混入してくる夾雑物の除去が充分でなければならない。とりわけ疾病を発生させる夾雑物の除去、たとえば病原体ビールスなどは確実に除去しなければならない。牛 Hb に関してはその資源が豊富であり、かつ牛 Hb の酸素解離曲線の性質上、酸素運搬量も増加させることができ期待できる。一方、ヒト Hb に関してはすでにテルモ社の NRC で経験したごとく、allosteric 効果を発揮する物質の添加により充分の酸素運搬能力が示されている。しかしその供給源に関しては 1. 項でのべたように問題がある。さらに現在献血で得られた赤血球は、たとえそれが廃棄される場合でも、特定の使用目的（主として医学研究用）以外への転用はできない規制がある。したがって企業が赤血球代替物の工業生産に着手することができないのが現実である。たしかに国民の善意で献血された赤血球そのものを製品販売を目的とした企業に譲渡することは倫理的な問題と思われる。しかし赤血球としての形態をとどめない Hb そのもの、あるいは溶血状態となった血液は単なる一物質として考えられ、他目的への転用が許されても不思議でないと思われる。現実に血漿につ

いてはすでに特例処置の許可が下りている。そして企業がアルブミン製剤を作成、販売している。医療への貢献を考慮して上記問題は今後の検討課題であろう。

しかし一方、これら自然界から得られる酸素運搬物質に対して完全化学合成による酸素運搬体が最近になり出現してきた。すなわち lipid heme, albumin heme がそれである。これらについてもその合成過程、ならびに精製過程において夾雑物の混入は存在する。したがってその純化は必須であるが、合成方法の改良によりすでにほぼその目的は達している。非細胞型である albumin heme ではその血液内滞留時間が数時間と短い。しかし酸素含有量は Hb の2倍と多くなり、将来は liposome 内包酸素運搬体としての活用が望める。これに対して lipid heme はすでに細胞型を呈し、今後、*in vivo* での積極的な研究が待たれる。

Table-5

#### Oxygen Carrying Substance

Natural Source ( Human, Bovine Hemoglobin )

Synthetic Substance ( Heme Compounds, Others )

#### 6. 段階臨床応用と治験計画 ( Tab-6 )

赤血球代替物の第一の目的は 1. の項にて述べたごとく赤血球代替物が現在輸血に用いられているヒト血液、なかんずく赤血球の代用をして酸素を末梢組織に運搬する代替物となることがある。したがってまずその目的での臨床応用を満足させなければならない。すなわち出血の治療である。出血の治療にも手術時のように出血量に応じて循環血液を補う場合もあり、外傷時のようにすでに一定量の循環血液の減少があり、これを補う場合もある。さらに出血量が多くて出血性ショックに陥っている場合の治療もある。しかし後者の出血性ショックの場合は単なる循環血液量の減少のみに止まらず、ショックという複合した病態をともなっている。このような複合病態の治療で開発中の赤血球代替物の効果、安全性を検討することは適当とはいえない。複合病態の治療は本質的に複数の治療法、治療薬でおこなわれるべきである。したがって赤血球代替物の使用は赤血球の減少と、同時に循環血液量の減少をともなう病態、すなわち手術的出血での乏血、あるいは生体の代償機能により生体機能がほぼ正常に保たれている外傷時の乏血状態の治療においてまず試みるべきであろう。そしてそのような症例での治療で赤血球代替物の効果が認められ、同時に安全性も確認されれば、軽症の出血性ショックの治療、そしてその結果をふまえてさらに重症の出血性ショックの治療に応用する道を開くことが可能であろう。また体外循環を使用する際の回路充填にも利用される可能性がある（現在でも乳幼児での体外循環では同種血による回路充填がおこなわれる可能性が高い）。その他、悪性腫瘍の化学療法の際の補助剤として、あるいは液体肺換気に、移植臓器の保存に、あるいは臓器梗塞の治療などへの応用と、その臨床応用対象はは多数想定される。しかし治験ではまず手術時の出血治療を対象とするのが適切である。

Table-6

#### Stepwise Clinical Trials

1. Treatment of Hemorrhage ( Surgery, Trauma etc )
2. Treatment of Hemorrhagic Shock  
Priming in Extracorporeal Circulation Circuit
3. Adjuvant for Chemotherapy  
Liquid Ventilation  
Organ Preservation

#### おわりに

赤血球代替物の基礎的研究はかなり進んでいる。そして今後も益々進歩し続けるであろう。その結果をふまえてどの程度の安全性、有効性ならば、臨床治験に踏み込むか、判断することもかなり困難な問題であろう。このような新しい物質を医療に応用することは革命にも相当する。そのような革命では必ずある程度の risk をともなう。その risk と新しい代替物のもたらす benefit とのバランス上で新しい道が開ける。しかしながらその際の risk に対しては開発者が責任を負う覚悟も必要であろう。

#### 参考文献

1. Williamson, L.M. Systems contributing to the assurance of transfusion safety in the United Kingdom  
*Vox Sang.* 1999; 77: 82-87.
2. Myhre, B.A., McRuer, D. Human error - a significant cause of transfusion mortality *Transfusion* 2000; 40: 879-885.
3. Redman, M., Regan, F., Contreras, M. A prospective study of the incidence of red cell allo-immunization following transfusion  
*Vox Sang.* 1996; 71: 216-220.
4. 高折益彦 前臨床試験でクリアすべき課題 人工血液 1998; 6: 94-100.
5. Sloan, E., Koenigsberg, M., Gens, D., Cipolle, M., Runge, J., Mallory, M.N., Rodman, G. Diaspirin cross-linked hemoglobin ( DCLHb ) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock : A randomized controlled efficacy trial *JAMA* 1999; 282: 1857-1864
6. Spahn, D.R., van Brempt, R., Theilmeier, G., Reibold, J-P., Welte, M., Heinzerling, H., Birck, K.M., Keipert, P.E., Messmer, K. Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery *Anesthesiology* 1999; 91: 1195-1208.
7. Takaori, M., Safar, P. Galla, S.J. Changes in body fluid compartments during hemodilution with hydroxyethyl starch and dextran 40 *Arch. Surg.* 1970; 100: 263-268.
8. 中山雅人、小川重男、高折益彦 拡大血液希釈性自己輸血に関する研究 日本輸血学会雑誌 1984; 30: 168-174.
9. Rudolph, A.S., Sulpizio, A., Hieble, P., MacDonald, V., Chavez, M., Feuerstein, G. Liposome encapsulation attenuates hemoglobin-induced vasoconstriction in rabbit arterial segment *J. appl. Physiol.* 1997; 82: 1826-1837.

10. Intaglietta, M. Molecular design of oxygen carrying plasma expanders 人工血液 1999; 7: 68.
11. 高折益彦 希釈式自己血輸血 高折益彦 編著 自己血輸血マニュアル 改訂第2版 克誠堂, 東京 1996 p:83-84

# 粒子径を制御したアルブミン重合体の合成と GPIba結合体の機能評価<sup>†</sup>

## Preparation of Size-Controlled Albumin Polymers and Evaluation of the GPIba conjugates

寺村 裕治<sup>1)</sup>, 武岡 真司<sup>1)</sup>, 土田 英俊<sup>1)</sup>, 池田 康夫<sup>2)</sup>  
Yuji Teramura<sup>1)</sup>, Shinji Takeoka<sup>1)</sup>, Eishun Tsuchida<sup>1)</sup>, Yasuo Ikeda<sup>2)</sup>

### 和文抄録

リコンビナントヒト血清アルブミンからpHと温度変化により、数十nmから数十μmの粒子径のアルブミン重合体を調製した。また、その表面に血小板膜蛋白質(GP)Ibaのリコンビナント体を結合させたアルブミン重合体(240±10nm)では、リストセチン添加によりフォンビルブランド因子(vWF)と特異的な凝集塊を形成し、血小板減少症において残存血小板を巻込んだ凝集塊を形成した。さらに、このrGPIba-アルブミン重合体は流動下においてvWF固定化表面に粘着することが確認され、血小板止血機能の補助剤としての可能性が示唆された。

### Abstract

Albumin polymers from several tens nanometers to several tens micrometers were prepared by pH and temperature change of a recombinant human serum albumin (rHSA) solution. rGPIba, which is the recombinant fragment of platelet glycoprotein Iba, was conjugated to the surface of the albumin polymers of which average diameter was 240±10nm. rGPIba-albumin polymers specifically aggregated with von Willebrand factor (vWF) after the addition of ristocetin, and the platelet aggregation was enhanced in a 10-fold diluted platelet concentration. Under the flow conditions, rGPIba-albumin polymers were also specifically attached to the vWF-immobilized surface. Therefore, it is considered that rGPIba-albumin polymers satisfy the one of the requirements for platelet substitutes, i.e., recognition ability to vWF under the flow conditions.

### Key words

Platelet substitutes, Albumin polymers, recombinant GPIba, recombinant Human serum albumin, von Willebrand factor

### 1. はじめに

血小板輸血は、悪性腫瘍に対する化学療法、骨髄移植や外科手術には欠くことが出来ない重要な補助療法であり、使用量も年々増大している。しかし、血小板はその短い保存期間(3日間)のために慢性的な供給不足の状態にあり、緊急時の対応が困難、ウイルスなどの感染症の危険性も残しているため、ヒト由来に依存しない血小板代替物の開発が急がれている。

このような血小板代替物は世界に先駆けて池田らのグループにより開発され、血小板膜蛋白質GPIbaのリコンビナント体(rGPIba)を担持させたリポソームは血小板と凝集塊を形成し<sup>1)</sup>、rGPIba複合体の担持したリポソームでは流動下においてコラーゲン表面への粘着が確認されている<sup>2,3)</sup>。

我々は、リポソーム以外の静注可能な認識蛋白質の担体としてアルブミン重合体の検討を行なっている。アルブミン重合体は、生体適合性、生分解性に優れているため<sup>4)</sup>、1960年頃からアルブミン凝集体、マイクロスフェアなど静注可能な微粒子として利用され続けており<sup>5-7)</sup>、1999年にLeviらがフィブリノーゲン結合アルブミンマイクロカプセルを用いてin vivoでの出血時間の短縮に成功した報告は記憶に新しい<sup>8)</sup>。

殆どのアルブミンマイクロカプセルあるいはマイクロスフェアは、噴霧乾燥法、コアセルベーション法や乳化法にて調製されており、いずれも有機溶媒や界面活性剤、あるいは安定化のために架橋剤を用いており、これらの除去操作が煩雑であり粒子径制御も困難であった。我々は、水溶液中にてpHと温度変化

1) 早稲田大学 理工学総合研究センター 高分子化学研究室 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1 Department of Polymer Chemistry, Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University, 3-4-1 Ohkubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan. 2) 慶應義塾大学 医学部内科 〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-8582, Japan.

論文受付2000年11月9日、採択2000年11月21日

† 本論文は、2000年に掲載された「Takeoka S, Teramura Y, Ohkawa H, Ikeda Y, and Tsuchida E. Conjugation of Von Willebrand Factor-Binding Domain of Platelet Glycoprotein Iba to Size-Controlled Albumin Microspheres. *Biomacromolecules* 2000;1: 290-295. (<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm0055293>)」に基づき和文として作製したものである。

Copyright © 2000 American Chemical Society

のみでリコンビナントアルブミン (rHSA) からアルブミンの重合体を調製した<sup>9)</sup>。粒子径も溶液条件と反応時間によって数十nmから数十μmまで簡単に制御できる。

このアルブミン重合体にrGPIbα<sup>10)</sup>を最少限の修飾により結合させて、リストセチン凝集評価、流動下における評価を行なった。血管が損傷すると内皮下組織のコラーゲンが露出し、そこにフォンビルブランド因子 (vWF) が結合する。結合vWFは流動下ずり応力によって立体構造が変化し、血小板表面のGPIb/IX複合体と結合する<sup>11)</sup>。本報では、このrGPIbαを結合させたアルブミン重合体を調製し、一次止血の補助剤としての機能を評価したので報告する。

## 2. 方法

### 2.1. アルブミン重合体の合成

250mg/mLリコンビナントヒト血清アルブミン (rHSA、ウェルファイド社提供) を純水に対して12時間透析して安定化剤を除去した後、生理食塩水にて希釈し10mg/mLのrHSA溶液を得た。このrHSA溶液25mLに0.1N NaOH水溶液を800μL加えて20分間攪拌し、pH10.65とした。80°Cで20分間加熱後、氷浴中で10分間攪拌し冷却した。次に室温で5分間攪拌を続け、pH10.51 (21°C) の溶液を得た。次に、攪拌しながら0.1N HCl水溶液を200μLずつ800μLまで加え、更にpH 6.04 (21°C) になるまで加え (100μL程度) て白色透明のrHSA溶液を得た。この溶液を37°Cで90分間攪拌すると徐々に溶液全体が白濁した。これをpH7.4 (37°C) リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に対して15時間透析 (5°C) 後、ヨードアセトアミドを過剰量 (15mg) 加え室温 (22°C) で30分間攪拌した。最後にPBS (pH 7.4) に対して24時間透析後 (5°C)、限外ろ過器にて10mLまで濃縮してアルブミン重合体分散液を得た ([アルブミン重合体]=16mg/mL, pH 7.4)。収率は90%であった。

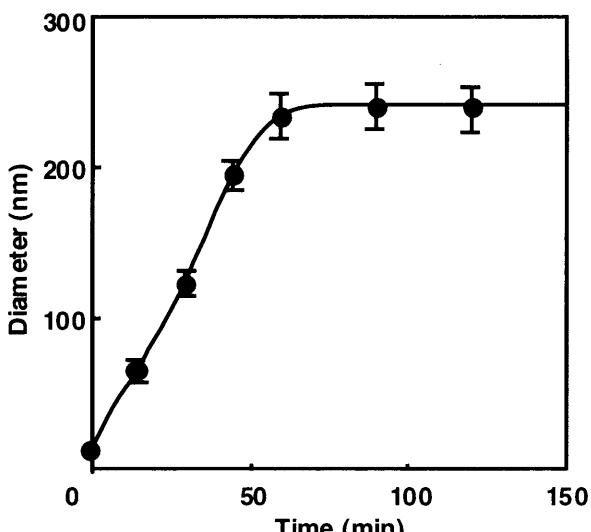


Fig. 1. Change in albumin polymer diameter during stirring at 37°C, pH6.0.

### 2.2. ピリジルジチオ (PD)-アルブミン重合体の合成

rGPIbαをアルブミン重合体に結合させるためにN-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) を使用した。SPDPはヘテロの二官能性架橋剤であり、スクシンイミジル基はアミノ基と反応し、ピリジルジチオ基はチオール基と反応する。アルブミン重合体分散液 ([HSA]=16mg/mL, pH 7.4) 5.0mLに対して10.9mM SPDPエタノール溶液を50μLを加え22°Cで30分間攪拌した。ゲルろ過 (Sephadex G-25, 10mm×d. × 70mm h) にて未反応のSPDPと副生成物を除去して、11mL のPD-アルブミン重合体 ([HSA] = 9.0mg/mL)を得た。

PD-アルブミン重合体溶液 ([HSA]=4.9mg/mL) 500μLに対して1Mジチオスレイトール (DTT) 溶液10μLを加えて22°Cで15分間攪拌してPD基を還元した。遊離の2チオピリドン ( $\epsilon: 8.08 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  at 343nm, 2TP) の定量をHPLC法により行ない、結合PD基を算出した。アルブミン重合体の定量は、BCA法 (BCA protein assay kit, Pierce Chemical, IL) によって行った。

### 2.3. HPLC法

PD基導入蛋白質をDTT処理後、溶液20μLをサイズ排除HPLC (TSK-GEL G3000SW<sub>XL</sub> column, 7.8mm×d. × 300mm, 流速1mL/min, 使用溶媒PBS (pH7.4)) を透過させて遊離する2TPを343nmの吸光度から定量した。DTTと2TPの溶出時間は異なるがDTTのピークの裾が若干2TPと重なった。しかし誤差範囲と考えてDTTのピークの影響は考慮せずに2TPを定量した。

### 2.4. SH-rGPIbαの合成

rGPIbα (74mg/mL) 100μLを400μLのPBSに溶解させ、10.0mMSPDPエタノール溶液を20μL加え、22°Cで30分間振とうしPD- rGPIbαを得た。続けて1M DTT溶液10μLを加えて22°Cで10分間振とう後、ゲルろ過にてSH-rGPIbα (2.2mg/mL) 2.3mLを得た。

### 2.5. rGPIbα-アルブミン重合体の合成

PD-アルブミン重合体溶液 ([HSA] = 9.0mg/mL) 11mLにSH-rGPIbα溶液 (2.2mg/mL) 2.3mLを加え、25°Cにて振とうを行なってrGPIbα-アルブミン重合体を合成した。アルブミン重合体に結合したrGPIbαは、ELISA法により定量した。

### 2.6. アグリゴメーターによる凝集測定

rGPIbα-アルブミン重合体の凝集測定には、アグリゴメーター(興和、PA-100)を使用した<sup>12)</sup>。rGPIbα-アルブミン重合体 ([rGPIbα]=4.0μg/mL, [HSA]=1.0mg/mL) にvWFを混合 (50μg/mL) 後、リストセチンを添加 (1.0mg/mL) し、アグリゴメーターにて観察した。rGPIbα-vWF間の特異的凝集を確認するために、rGPIbαのvWF結合部位を認識するモノクローナル抗体 GUR20-5 (50μg/mL) を使用し、抑制実験を行なった。小 (>9μm), 中 (>30~40μm), 大程度 (>45~60μm) の凝集塊からの散乱光を検出し、記録した。

血小板数の少ない血漿 ( $4.0 \times 10^4/\mu\text{L}$ ) にrGPIbα-アルブミン重

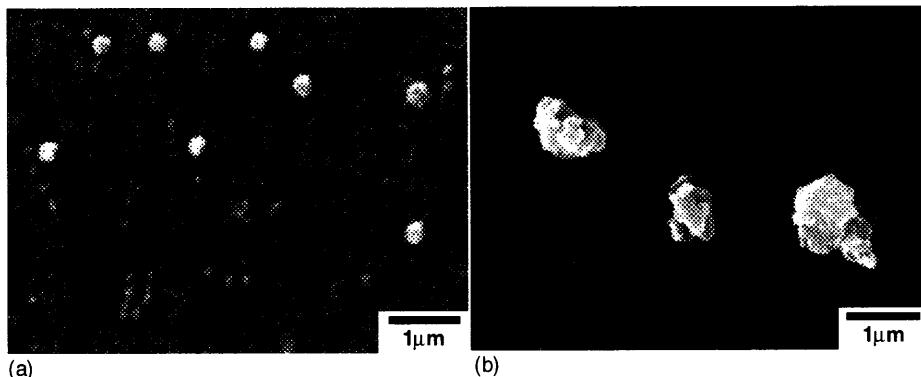


Fig. 2. SEM images of albumin polymers.

合体 ( $[r\text{GPI}\beta\alpha]=0.27\mu\text{g/mL}$ ,  $[\text{HSA}]=150\mu\text{g/mL}$ )、またはアルブミン重合体を混合し、リストセチンを添加 (1.5mg/mL) して同様にアグリゴメーターにて測定した。

### 2.7. 流動下におけるrGPI $\beta\alpha$ -アルブミン重合体の機能評価

ヒト採血液にACD溶液を添加し、洗浄後ACD混合生理食塩水に分散させてHct70.7%、血小板数 $1.7\times10^4/\mu\text{L}$ の再構成血液を調整した。循環用再構成血液はHct40%に調整して使用した。

vWF溶液 (10 $\mu\text{g/mL}$ , PBS (pH7.3)) に、ガラス板 (直径25mm) を5°Cにて10時間浸漬後、2g/dLのBSA溶液中2時間室温にて静置し、PBSで洗浄してvWF固定化基板を調製した。

再構成血液5mLと蛍光標識 (FITC) rGPI $\beta\alpha$ -アルブミン重合体 (終濃度0.02g/dL) を混合後、37°Cにて10分間静置し、蛍光顕微鏡を用いてCCDカメラを通して観察した。再構成血液の流動中、チャンバー内の温度は37°Cに保持した。循環血液のすり速度は $2400\text{s}^{-1}$ とした。

## 3. 結果及び考察

### 3.1. アルブミン重合体の調製

ヒト血清アルブミンは、17対のジスルフィド結合と1個のチオール基を持つ分子量66.5kDaの蛋白質である<sup>13)</sup>。アルカリ性のpHではN-B転移に伴ないジスルフィド結合がアルブミン分子表面へ露出する。この状態で、チオール基とジスルフィド結合との間で交換反応が起きるので、分子間はジスルフィド結合で架橋される<sup>14,15)</sup>。pHを6.0まで下げる過程で電荷反発により分散していたアルブミンの凝集が生起し、さらにpH6.0, 37°Cでの攪拌により分子間ジスルフィド結合の形成による重合体が成長する。

この時の攪拌時間と平均粒子径との関係を図1に示す。37°Cにて攪拌して15, 30, 45, 60分後には、アルブミン重合体はそれぞれ $65\pm1.3$ ,  $126\pm3$ ,  $194\pm7$ ,  $240\pm8\text{nm}$ と徐々に成長し90分後には $239\pm10\text{nm}$ のアルブミン重合体が得られた(図2a)。そこで、アルブミン重合体表面の反応性チオール基をヨードアセトアミドにより失活させて、設定粒子径にて重合反応を停止させた。さらに37°Cでの攪拌を続けると、アルブミン重合体の沈殿が急速に生じた。また、同様の条件にてアルブミン溶液を加

熱後、0.1N塩酸を1mL加えてpH5.8まで下げるから、37°Cにて90分間攪拌すると粒径数μmのアルブミン重合体が調製できた(図2b)。従って、アルブミン溶液状態と粒径分布の観察から攪拌時間を設定すれば粒子径の制御が可能となる。

### 3.2. rGPI $\beta\alpha$ -アルブミン重合体の合成

SPDPによってアルブミン重合体表面に導入されたPD基の導入率を正確に決定する方法として、従来法のspectrophotometric (SP) 法<sup>16)</sup>は採用せずにHPLC法を用いた。SP法は、還元剤であるDTTによって遊離する2TPを分離せずに343nmの吸光度から定量してPD基の導入率を決定する方法であるが、正確ではない<sup>17)</sup>。これは343nmにおける2TPの吸光度はpH、試薬、濃度などの反応条件で変化し、さらにDTT由来の280nm吸光ピークの裾が343nmまでかかっており、正確な2TPの定量ができないためである<sup>18,19)</sup>。そのため、NaらはPD-BSAをDTT処理し、逆相HPLCにより2TPとDTTのピークを検出している<sup>20)</sup>。またEllman試薬によるチオール基の定量法でも、DTT処理に伴う分子内、分子間ジスルフィド結合の還元により実際のPD基導入率よりも大きな値が得られる可能性が高い<sup>16,17)</sup>。そこで我々はDTT処理後、サイズ排除HPLCにて、DTTと2TPを分離し、遊離2TPの定量を343nmの吸光度から行う方法を採用した。

仕込SPDPと結合PD基との間に明確な比例関係があり、使用した濃度に関係なく反応時間30分以内に反応が完了していることを確認した。SPDPのアルブミン重合体の結合率は60%であったが、使用したSPDPのスクシンイミジル基は15%が既に使用前に失活していたので、補正後の結合率は71%であった。アルブ

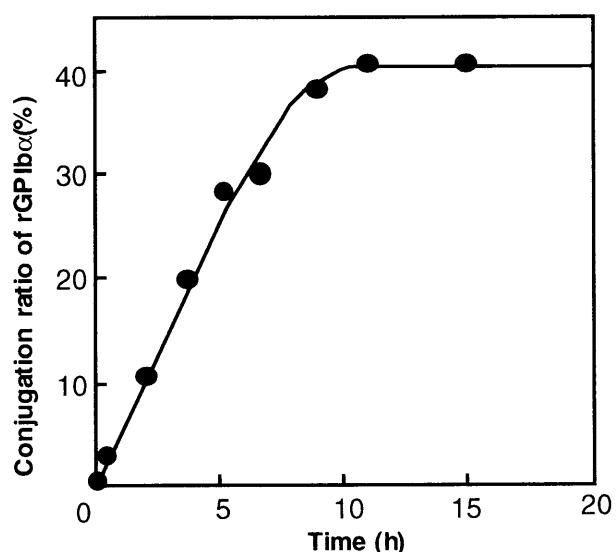


Fig. 3. Conjugation of rGPI $\beta\alpha$  to albumin polymers.

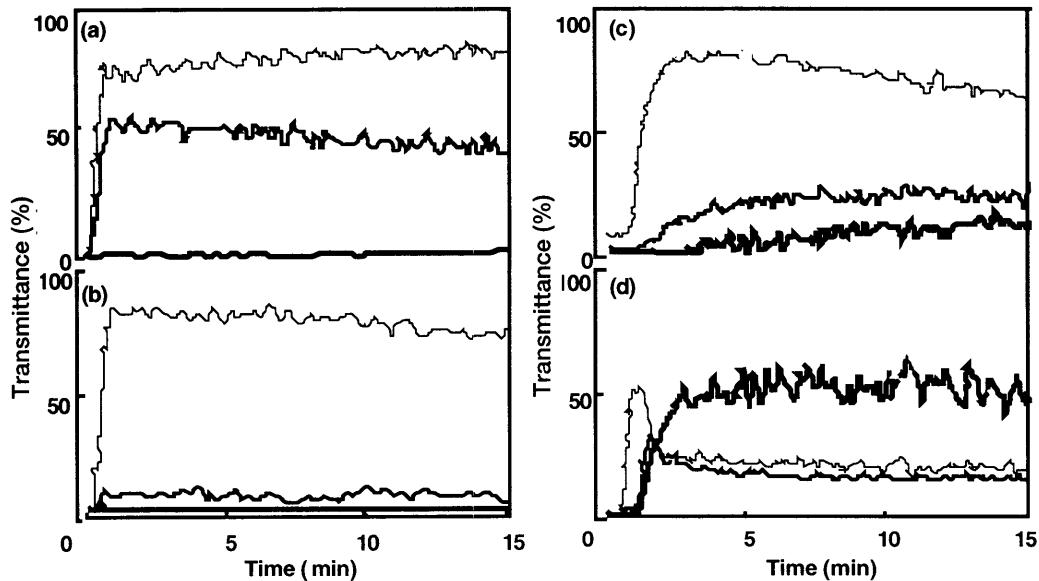


Fig. 4. Aggregation of rGPIb $\alpha$ -albumin polymers in the presence of vWF by the addition of ristocetin detected by PA-100. (a) rGPIb $\alpha$ -albumin polymers([rGPIb $\alpha$ ]=4.0 $\mu$ g/mL, [HSA]=1.0mg/mL) was mixed with vWF(50 $\mu$ g/mL), and ristocetin(1.0mg/mL) was added thereafter. (b) Aggregation under the above conditions was inhibited by GUR20-5(10 $\mu$ g/mL). (c) Platelet aggregation by control albumin polymers(150 $\mu$ g/mL) with ristocetin was monitored at low platelet counts(4.0 $\times$ 10 $^4$ / $\mu$ L). (d) Platelet aggregation by rGPIb $\alpha$ -albumin polymers([rGPIb $\alpha$ ]=0.27 $\mu$ g/mL, [HSA]=150 $\mu$ g/mL) was strongly induced by ristocetin(1.0mg/mL) at low platelet counts(4.0 $\times$ 10 $^4$ / $\mu$ L). ■ 36-60 $\mu$ m ■ 30-40 $\mu$ m — > 9 $\mu$ m

ミン分子のサイズが8×8×3nmなので直径240nmの球形粒子にはアルブミンが約90000個充填されていると推定される。アルブミン重合体表面に存在するHSA数はアルブミン重合体を構成しているHSA数の15分の1であった。従ってアルブミン重合体の表面構成HSA 1分子に対して4.8個のPD基が導入されたことになる。ちなみにHSA 1分子にSPDPが結合できるリジン残基のアミノ基は59個ある。同様にしてPD基導入rGPIb $\alpha$ をDTT還元後、サイズ排除HPLCにより定量すると、rGPIb $\alpha$ 1分子当たり1.3個のPD基が導入された計算となった。

得られたPD-rGPIb $\alpha$ をDTT処理後、SH-rGPIb $\alpha$ 溶液をPD-アルブミン重合体溶液に加えて終濃度を [-PD (アルブミン重合体)] = 40 $\mu$ M, [-SH (rGPIb $\alpha$ )] = 8.6 $\mu$ Mとした後、37°Cで振とうした。0.5, 2, 6, 15時間後の反応液についてHPLC流出曲線から求めたrGPIb $\alpha$ 結合率は、各々9, 26, 36, 39%であった(図3)。反応時間が15時間以上では、遊離の2TP濃度がほとんど変化しなかつたので、この時点でrGPIb $\alpha$ の結合が飽和に達したものと考えられる。遊離2TPの定量により、アルブミン重合体1粒子当たりにrGPIb $\alpha$ が約2500個結合した計算となった。アルブミン重合体の表面に存在しているHSA 1分子当たり5.5個導入されているPD基のうち0.4個がrGPIb $\alpha$ と結合した計算となった。GPIb $\alpha$ のリコンビナントフラグメントの分子量は45kDa<sup>[10]</sup>であるが、リコンビナントフラグメントにはシステインが2個以上存在するため、自動酸化により2, 3量体の形成が電気泳動により確認された。HSAの分子量は66.5kDaであり、rGPIb $\alpha$ の分子量は45kDaから135kDa

とすると、アルブミン重合体表面への結合は、ほぼ飽和状態であると考えられた。

### 3.3. rGPIb $\alpha$ -アルブミン重合体の機能評価

我々はrGPIb $\alpha$ -アルブミン重合体の機能を評価するために、血小板凝集の評価に用いられているアグリゴメーターを使用した。小、中、大程度の凝集塊は、各々粒径 >9, >30~40, >45~60 $\mu$ mを示している。rGPIb $\alpha$ -アルブミン重合体にvWFを混合した系にリストセチン添加すると、中程度の凝集塊形成が確認できた(図4 (a))。またこの凝集は、rGPIb $\alpha$ のI-302番目のアミノ酸残基内のエピトープを認識する抗GPIb $\alpha$ モノクローナル抗体であるGUR20-5の添加により抑制されたことから(図4 (b))、凝集塊形成がrGPIb $\alpha$ -vWF間の特異的結合に起因するものであることが示された。

通常の1/10くらいに血小板数を減少させた状態では血小板凝集は起こり難いので、血小板数減少下における血小板凝集に対するrGPIb $\alpha$ -アルブミン重合体の影響をアグリゴメーターを用いて調べた。正常血小板数の1/10に減少させた血小板が存在する血清中でrGPIb $\alpha$ -アルブミン重合体を混合した系にリストセチンを添加し、アグリゴメーターにて凝集塊形成を観察したところ、rGPIb $\alpha$ -アルブミン重合体では、小、中程度の凝集塊を形成後に大凝集塊が形成されており、多数の血小板がrGPIb $\alpha$ -アルブミン重合体との凝集塊に巻込まれているものと考えられた(図4 (d))。図4 (c)にrGPIb $\alpha$ が結合していないアルブミン

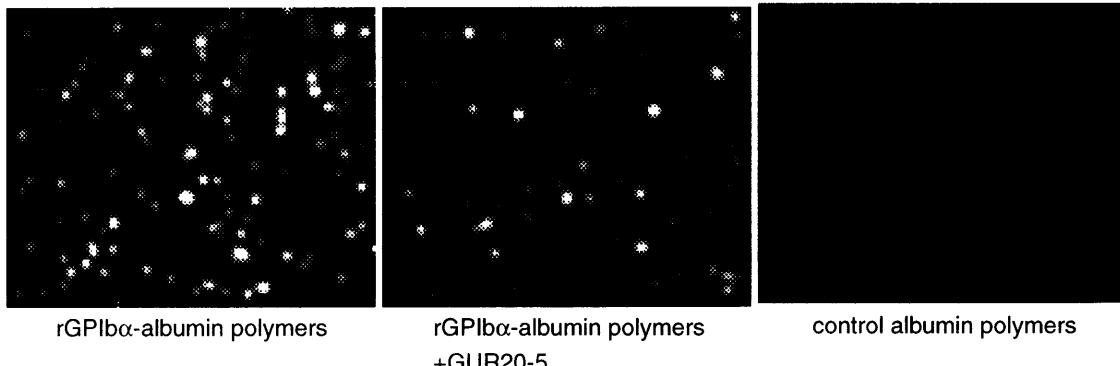


Fig. 5. Attachment of rGPIba-albumin polymers to the immobilized vWF under flow conditions (shear rate 2400s<sup>-1</sup>).

重合体のみを用いたコントロール実験の結果を示す。リストセンで誘発された非特異的なアルブミン重合体の凝集による小程度の凝集塊の形成が確認できたのみで、中、大程度以上の大きさの凝集塊の形成は認められなかった。また、血小板減少血漿中でのrGPIba-アルブミン重合体の凝集は、GUR20-5の添加により抑制された。以上よりアルブミン重合体はrGPIbaの結合によりvWFを介して血小板と凝集していることが明らかとなった。

さらに流動下にてvWF固定化基板へのrGPIba-アルブミン重合体の粘着挙動を蛍光顕微鏡を用いて観測したところ、FITC標識rGPIba-アルブミン重合体 ([rGPIba]=1.2μg/mL, [HSA]=450μg/mL) は、ずり速度2400s<sup>-1</sup>流動下においてvWF表面に対して接触すると直ちに粘着して静止した。またGUR20-5の添加により粘着が抑制されたことから、rGPIba-アルブミン重合体はvWF表面と特異的に相互作用していることが確認できた(図5)。rGPIba結合数の異なるrGPIba-アルブミン重合体では、rGPIba結合数の増加と共にvWF表面に粘着したアルブミン重合体の数が増大した。これは、vWF表面へのアルブミン重合体の粘着が、結合rGPIbaによるものであることを支持している(図6)。

他方、rGPIba-リポソームでは、vWF基板上ではずり速度に依存したローリング現象が観察され、rGPIba-Iallαリポソームでは高ずり速度下での粘着が報告されている<sup>2,31</sup>。しかし、rGPIba-アルブミン重合体では高ずり速度下においてもローリングせず粘着しており、この興味深い相違に関しては現在解析中である。

#### 4. 結論

我々は、温度とpHの変化のみでrHSAから粒径数十nmから數十μmまでアルブミン重合体を合成することに成功した。この方法は、高収率で大量調製が可能であり、特別な添加剤も必要とせずクリーンな方法である。得られたアルブミン重合体は、表面に官能基を有しており、様々な機能性分子を結合させることができる。我々は、SPDPを用いてチオール・ジスルフィド交換反応によりrGPIbaをアルブミン重合体へ定量的に結合させた。この方法では、サイズ排除HPLCにより遊離2TPの検出によ

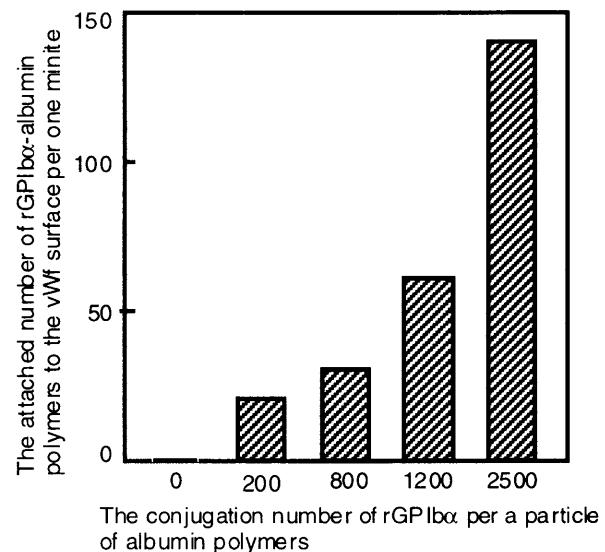


Fig. 6. The attached number of rGPIba-albumin polymers with various conjugation ratios of rGPIba to the vWF surface.

り結合PD基が定量できるので、アルブミン重合体に結合する分子の数の制御が可能である。このrGPIba-アルブミン重合体はrGPIbaの機能を保持しているので、血小板代替物のプロトタイプとして利用可能であると考えられる。

#### 5. 謝辞

rGPIba結合アルブミン重合体の評価に際し、有益な御助言と御指導を頂いた慶應義塾大学医学部半田 誠博士、村田 満博士、西谷孝子博士に感謝いたします。rHSAとrGPIbaを提供していただきいたウェルファイド社に感謝します。アルブミン重合体の調製に御協力頂いた早稲田大学理工総研の大川春樹氏に感謝いたします。本研究の一部は厚生省科学研究費高度先端医療研究事業(人工血小板)および文部省科学研究費(No. 11877172)の補助によるものであることを付記します。

## 参考文献

1. 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 $\alpha$ : A potential substitute for platelet transfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:784-89.
2. Nishiya T, Murata M, Handa M, Ikeda, Y. Targetting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Ib $\alpha$  to immobilized von Willebrand factor under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:755-60.
3. 西谷孝子. リポソームを用いた血小板代替物へのアプローチ. *人工血液* 2000;8:6-12.
4. Bogdansky S. Natural polymers as drug delivery systems. Biodegradable polymers as drug delivery systems 1990;240-246.
5. Gupta PK, Hung CT. Albumin microsphere I: physico-chemical characteristics. *J Microencapsulation* 1989;6:427-62.
6. Burger JJ, Tomlinson E, Deroo JE, Palmer J. Technetium-99m labeling of albumin microspheres intended for drug targetting. *Methods in Enzymology* 1985;112:43-56.
7. Sheffel U, Rhodes BA, Natarajan TK, Wagner MN. Albumin microspheres for study of the reticuloendothelial system. *J Nucl Med* 1972;13:498-503.
8. Levi M, Friederich PW, Middleton S, De Groot PG, Wu YP, Harris R, Biemond BJ, Heijnen FG, Levin J, Ten Cate JW. Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat Med* 1999;5:107-11.
9. Takeoka S, Teramura Y, Ohkawa H, Ikeda Y, Tsuchida E. Conjugation of von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib $\alpha$  to size-controlled albumin microspheres. *Biomacromolecules* 2000;1:290-95.
10. Murata M, Ware J, Ruggeri ZM. Site-directed mutagenesis of a soluble recombinant fragment of platelet glycoprotein Ib $\alpha$  demonstrating negatively charged residues involved in von Willebrand factor binding. *J Biol Chem* 1991;266:15474-15480.
11. Ikeda Y, Handa M, Kawano K, Kamata T, Murata M, et al. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest* 1991;87:1234-40.
12. Ozaki Y, Satoh K, Yatomi Y, Yamamoto T, Shirasawa Y, Kume S. Detection of platelet aggregates with a particle counting method using light scattering. *Anal Biochem* 1994;218:284-94.
13. Peters T Jr, All about Albumin, Academic press 1996
14. Huggins C, Tapley DP, Jensen EJ. Sulphydryl-disulphide relationships in the induction of gels in proteins by urea. *Nature* 1951;167:592-93.
15. Warner CR, Levy M. Denaturation of bovine Plasma albumin. II. Isolation of intermediates and mechanism of the reaction at pH 7. *J Am Chem Soc* 1958;80: 5735-44.
16. Carlsson J, Drevin H, Alex R. Protein Thiolation and Reversible Protein-Protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heteronfunctional reagent. *Biochem J* 1978;173:723-37.
17. Ansell SM, Tardi PG, Buchowsky SS. 3-(2-Pyridyldithio)propionic acid hydrazide as a cross-linker in the formation of liposome-antibody conjugates. *Bioconjugate Chem* 1996;7:490-96.
18. Grassetto DR, Murray JF Jr. Determination of sulphydryl groups with 2, 2'- or 4, 4'-dithiodipyridine. *Arch Biochem Biophys* 1967;119:41-9.
19. Singh V, Curtiss R 3rd. Effect of amino group modification of ovine luteinizing hormone (oLH) by N-Succinimidyl 6-[3-(2-pyridyldithio)propionate] hexanate, a long chain N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) on immunological and biological properties: a comparative study with SPDP modified oLH. *Mol Cell Biochem* 1994;130:83-90.
20. Na DH, Woo BH, Lee KC. Quantitative analysis of derivatized proteins prepared with pyridyl disulfide-containing cross-linkers by high-performance liquid chromatography. *Bioconjugate Chem* 2000;10:306-10.

## トピックス

# 南極越冬隊の医療の現状と人工血液への期待

## Circumstances and problems on Antarctic medicine: Prospect for the artificial blood.

大野義一朗<sup>1)4)</sup>, 宮田敬博<sup>2)4)</sup>, 三上 春夫<sup>3)5)</sup>  
*Giichirou Ohno<sup>1)</sup>, Takahiro Miyata<sup>2)</sup>, Haruo Mikami<sup>3)</sup>*

### 和文抄録

日本の南極越冬観測は昭和基地で37回（1956年～1999年）行われ、のべ1200人（平均33才）が越冬した。歴代傷病総数は4233例で外科整形外科疾患45.3%，内科22.7%，歯科12.7%が3大領域であった。10カ国14基地の歴代死亡集計76件の内訳は病死9%（最多は急性心疾患），事故死72%（73%が航空機事故），不明19%であった。昭和基地の医療の特徴は完全な孤立隔絶で、越冬医師はすべての疾患に支援なしで制約のある設備で診療する。

輸血治療は出血性ショックの治療に欠かせないが南極越冬中の血液製剤使用は困難で人工血液が待望される。その要件は長期保存が可能、運搬・保存が容易、使用前処置が平易、大量投与が可能、辺境環境で使用可能などである。これは将来宇宙での輸血療法につながる。

### ABSTRACT

Since 1956, Japanese Antarctic research expedition (JARE) has administered wintering 37 times with a total 1200 personnel at Syowa station. The total medical consultation was 4233 cases, indicating that 45.3% of the cases were surgical and orthopedic cases, 22.7% were internal medical cases and 12.7% were dental problems. There have been 76 deaths at 14 wintering stations of 10 nations: 9% from disease, 72% from accidents and 19% from unknown causes. The major fatal disease was the heart attack, 73% of fatal accident involved airplanes and helicopters. The doctor must manage all diseases without support. Several problems make difficult to use natural blood in Antarctica and the blood substitute is being expected.

### Key words

Antarctic expedition, polar medicine, morbidity, blood transfusion, artificial blood

### 1. はじめに

2000年、南極の昭和基地（南緯69度、東経39.6度）(Fig.1)では39回目の越冬が運営されている。南極は探検や南極調査の時代は過ぎ、現在は地球環境のモニタリングや地球・太陽系の研究が中心となり女性を含む多くの研究者が越冬し貴重な研究が続けられている。医療はその観測の安全に貢献している。第39次日本南極地域観測隊（1997～1999年）（以下39次隊、他隊も同様）に参加した経験をもとに南極の医療の現状と問題点について輸血療法をふくめ報告する。

### 2. 39次隊が関与した救急患者

39次隊を乗せた砕氷艦「しらせ」(Fig.2)が往路の西オーストラリアに寄港していた1997年11月末、昭和基地で急性腎不全が発生した。前立腺腫大による腎後性腎不全で12月3日、血中尿素窒素92mg/dl、クレアチニン12.4mg/dlに達した。昭和基地に人工透析装置はなく、腹膜灌流装置を持っていた「39次隊」は海洋観測を中止して直行した。昭和基地では経皮的膀胱瘻造設術に成功し腎不全は改善し「しらせ」が到着した12月16日には危機を脱していた。悪性疾患の可能性もあり患者は「しらせ」で1月8日昭和基地を出発、ケープタウンから飛行機で帰国し2月4日に手術が施行された。「しらせ」が救援を決めて昭和基地に到着するまで2週間、帰国はその1ヶ月後であった。

1) 東葛病院 外科 〒270-0174 流山市下花輪409 Department of Surgery, Tokatsu Hospital, 409 Shimohana, Nagareyama City, Chiba 270-0174, Japan 2) 大阪大学医学部附属病院救命救急センター Trauma and Acute Critical Care Center, Osaka University Hospital, 3) 千葉県がんセンター疫学研究部 Division of Epidemiology, Chiba cancer center research institute, 4) 第39次日本南極地域観測隊 39th Japanese Antarctic Research Expedition, 5) 第29次日本南極地域観測隊 29th Japanese Antarctic Research Expedition

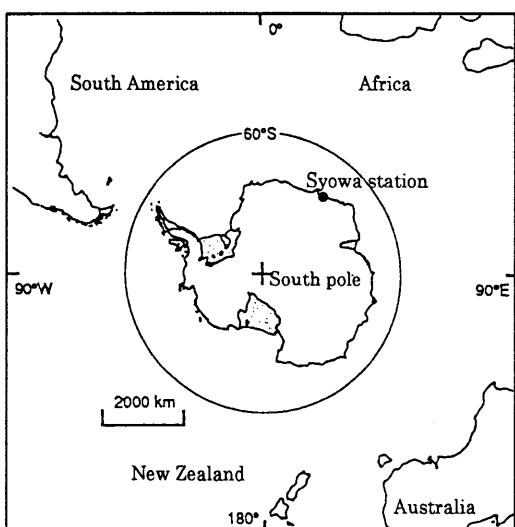


Fig. 1. A map of Antarctica.

Syowa station (Longitude 69°S., Latitude 39.6°E.) locates on the eastern Antarctica.



Fig. 2. Ice breaker SHIRASE. Although she is one of the biggest ice breaker in the world, she needs two weeks' voyage from Australia to Syowa station.

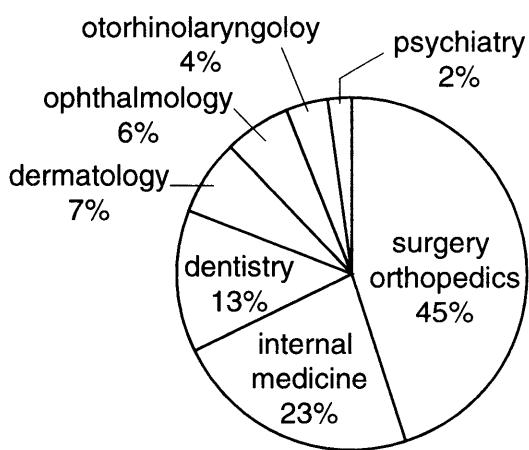


Fig. 3. Distribution of consultation by medical field.  
(4233 cases, 1956-1999)

### 3. 越冬中の傷病発生状況

日本隊は1956年より継続的な南極観測を開始した。当初11名だった越冬隊は現在40名となり、のべ1200人が越冬した。隊員の年齢は22-56（平均33）才、39次隊で初めて女性2名が越冬した。歴代傷病総数は4233例（1人1越冬平均3.8件）であった。内訳は外科整形外科疾患が最多の45.3%，内科22.7%，歯科12.7%でこれらが毎年3大領域で以下皮膚科、眼科、耳鼻科、精神科、

泌尿器科であった（Fig.3）。外科整形外科領域では切挫創、凍傷、打撲捻挫、運動器障害、痔核など、内科領域では消化器、呼吸器、心循環器などの疾患があった。死亡例は遭難死1例で病死はなかった<sup>1)</sup>。

39次隊の傷病の27.6%は仕事に、31.7%は環境、17.1%は生活に関連していた。過酷な自然環境に加え国内では無縁の土建作業に従事する不慣れから事故が発生した。凍傷は気温が急速に下がる4月に初発し以後注意しておきなくなったが8・9月の厳寒期は防ぎきれず多発した。極夜・白夜など昼夜の変化が激しく生活リズムを崩しやすいうえ1週間連続夜勤など特殊な勤務形態があり、国内と比べて強度で持続する睡眠障害がみられた。歯の治療物は外気を吸ったときに歯との収縮率の違いからよく脱落した。沿岸部にある昭和基地の年平均気温はマイナス10℃、基地内は20℃前後に暖房している。南極大陸は平均2000m厚の氷が覆い内陸部は寝泊する雪上車内でもマイナス20℃まで下がる。気圧も600mmHgPa台となり容易に高山病が発生した。変化する日照時間とオゾンホールの影響もあり紫外線関連疾患の発生も季節で変動する。10ヶ月間は外界から完全隔離された小集団となり物資食糧の補給はなく、精神的なストレスも大きい。このように南極に特徴的な疾患や、季節変化のある疾患がみられた。

### 4. 昭和基地の医療体制

医師は当初1名だったが規模拡大に伴い2名になった。41次隊までに越冬した医師は74名、年齢25~56才、30才台が最多で平均33.6才であった。専門科は外科53%，内科、麻酔科が各12%，整形外科8%などである。

昭和基地は腹部・胸部の全身麻酔手術に対応できるように手

術室、レントゲン室、血液・生理検査設備がある。しかし他職種は存在せず、機器保全や滅菌作業も医師が行う。そのため手術の実施は困難でこれまでおこなわれたのは腰椎麻酔の虫垂切除術1件で、全身麻酔手術はない。

医薬品は定数を決め、消費分や起期限切れ分を毎年補充する。

国内とは通信衛星を介して画像を含むコンサルトが可能である。

これまで海路による患者搬出が3件あった。日本隊は大陸間航空路がないがニュージーランドから日本隊への酸素ボンベ輸送がアメリカの輸送機とソ連のヘリコプターの国際協力によって一度おこなわれた。

## 5. 1998年各国基地医療の比較

現在約20ヶ国が南極越冬基地を運営している。1998年9月各国の越冬医師にアンケート調査をおこない10ヶ国14基地の医療情報をまとめ昭和基地と比較した<sup>2)</sup>。

医師数は0~1名で、医療スタッフがいるのは1基地（看護婦、放射線技師）だけであった。

手術室はほとんどの基地にあり虫垂炎、硬膜外血腫除去、骨折整復などの手術が散発的に施行されている。

各基地の歴代死亡集計76件の内訳は病死9%，事故死72%，不明19%であった。病死は急性心疾患が最多で、事故死は73%が航空機事故だった。日本隊は病死がないが心筋梗塞などは昭和基地でも救命は難しくこれら致命的な疾患が発生しなかったことが幸いしている。

各国は重症患者の緊急搬出を検討している。船は片道2週間を要し、海水の発達する冬季は不可能となる。飛行機は大陸間を8時間で飛ぶが大型航空機用滑走路があるのは特定の基地に限られておりそこまでの搬送が難しい。また極夜期と悪天時の飛行は不可能となる。国際協力による航空機乗り継ぎ搬出が行われている<sup>3)</sup>。

## 6. 輸血をめぐる問題

オーストラリア隊では出血性穿孔性胃潰瘍による死亡が報告されている。日本隊でも雪上車にひかれて骨盤骨折（25次隊）、医師をふくむ3人がクレバスに転落し大腿骨骨折と頸動脈至近傷を負う（29次隊）など出血性ショックが懸念された重症事故が起きており輸血療法は基本的な治療法として必要である。

しかし越冬中の輸血療法には多くの問題がある。第1に保存期間の問題：越冬隊は11月中旬に日本を出発し碎氷艦「しらせ」で赤道を越えて南下し、12月初め西オーストラリアに寄港し生鮮野菜など最後の積み荷を行う。12月中旬に昭和基地に到達し新旧越冬隊が交代し、2月「しらせ」が昭和基地を離れる。次の12月に再び「しらせ」がくるまでは物資の補給ができない。血液製剤の13ヶ月の保存が必要である。関連して自動血球算定

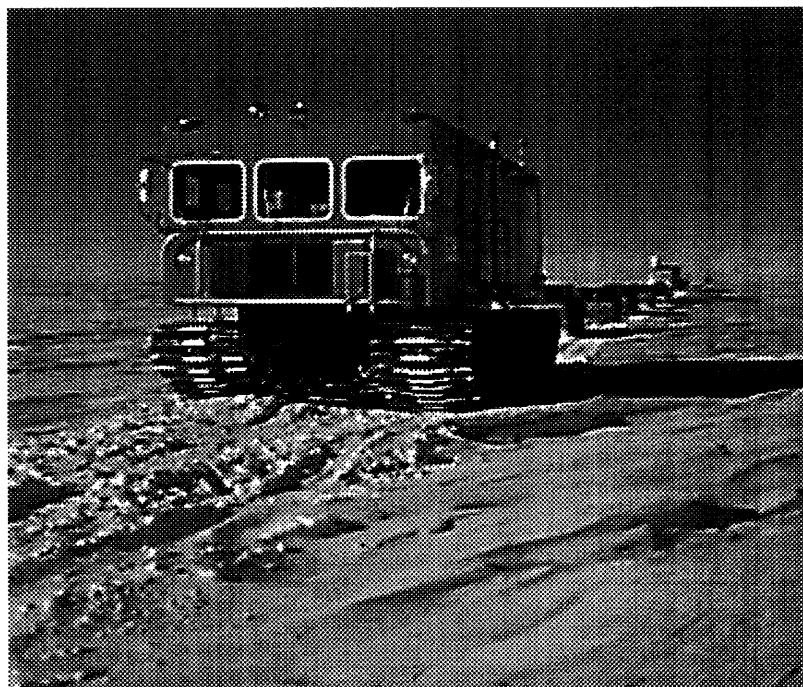


Fig. 4. SM100 or largest snow tractor designed for inland travel is forging ahead on ice sheet with 7 coasters.

Almost all cargo in the coaster was frozen and destroyed by wavering.

機器の校正用基準血液が期限切れとなるため、キャリブレーションができない問題も起きている。血液製剤の凍結保存が検討されているがそのための専用冷凍庫の準備や解凍技術、安全性など問題は多く実現していない。

第2に輸送手段の問題：「しらせ」は暴風圏や碎氷作業で激しく揺れ、船から基地まではヘリコプターとトラックを使う。この道程を破損することなく保存温度を一定にしながら輸送することは難しい。アメリカ極点基地では航空機から薬剤投下を行ったことがある。昭和基地前の海で氷に穴を開け釣りをした際、魚は海水からあげたとたんに凍結した。このような環境での血液製剤の投下回収は品質管理が難しい。

第3に当日新鮮血の問題：保存血がないため隊員相互の当日新鮮血輸血を想定して採血キットが準備されている。隊員は採用健診で感染症の有無、血液型の確認をおこない、41次で初めて相互のクロスマッチを事前におこなった。これまでRh（-）の隊員はいない。しかしショック状態の患者対応をしながら輸血のための採血やクロスマッチを行うことは人的体制上困難であり、加えてGVHDや感染症のリスクを考えると輸血は回避したいものとなる。

第4に野外での診療条件の悪さ：前述の日本隊の事故2件は昭和基地から数百km離れた地点で発生した。基地にある小型航空機の航続距離圏外は雪上車での救援となるがその走行距離は1日100kmが限度である。また雪原の起伏のため雪上車は激しく揺れる。車内では荷物が飛散し、牽引する貨物ソリでは全て凍結するうえ揺れのためビールのアルミ缶はもちろんエンジンオ

イルのペール缶も摩耗し穴があく。夜間は雪上車のエンジンを止めるので電気と暖房も止まり、車内温度はマイナス20℃まで低下する (Fig.4)。医薬品はクーラーボックスで管理するが温度を一定に保つことはできない。また氷を溶かして作る水は貴重で100日を越える調査旅行中でも洗顔、入浴、食器の水洗いは行わなかった。この状況は輸血や採血などの医療行為に不適である。

これまで昭和基地で輸血を施行したことはないが、実際に輸血を要する疾患が発生した場合にも有効な輸血療法は事実上不可能に近い。

## 7. 考察

日本の南極での医療の特徴は完全に孤立していることである。越冬する医師は専門以外の多彩な疾患に支援なしで制約のある設備での診療を強いられる。さらに安全管理、健康管理や今後は高齢化に伴う成人病対策なども必要である。このように専門分化が進んだ国内にはない医療の総合性を求められる。また隊員選抜健診の基準、予防衛生活動、遠隔地医療支援などが検討されてきたが、その成果は南極にとどまらずさまざまな分野に応用されている。

南極の医療設備充実には限界があり日本を含め各國は航空機を用いた緊急時の搬出方法を模索している。しかし搬出も即座の対応は難しい。急性期を現地で対応して搬出を待つ方式が現実的である。輸血療法は出血性ショックの急性期治療に欠かせない。

しかし血液製剤については上述した問題があることから、南極では人工血液が待望される。その要件は長期保存が可能であること、運搬が容易で破損せず特別な搬送装置を必要としないこと、保存状態から使用可能にするための処置が簡単で特別な装置を必要としないこと、大量投与が可能であること、救援が困難な辺境環境でも使えることなどである。

近年、南極の隔離小集団における諸問題は将来の宇宙旅行、特に火星基地の擬似として注目されている<sup>4, 5)</sup>。南極の輸血問題を解決する人工血液は、将来宇宙の輸血療法の鍵となるであろう。

## 参考文献

1. 大野義一朗, 宮田敬博.日本南極地域観測隊における越冬期間中の歴代傷病統計:4233例の検討. 南極資料 2000;44:1-13
2. 大野義一朗, 宮田敬博.昭和基地と各国基地の医療の比較:体制, 死亡例, 緊急搬出の検討. 南極資料 2000;44:42-50
3. Podkolinski MT, Semmens K: Intestinal Haemorrhage in Antarctica: A Multinational rescue operation. Med. J. Aust. 1979;2:275-277
4. Harrison AA, Clearwater YA, McKay CP. Human experience in Antarctica: applications to life in space. Behav. Sci. 1989; 34:253-271
5. Palinkas LA. Psychosocial effects of adjustment in Antarctica: lessons for long-duration spaceflight. Journal of spacecraft and rockets 1990;27:471-477

## 海外文献紹介

The New England Journal of Medicine 342(22): 1638-1643, 2000

### 重症自己免疫性溶血性貧血症例に対するウシ重合ヘモグロビンの輸血 (Transfusions of polymerized bovine hemoglobin in a patient with severe autoimmune hemolytic anemia)

John Mullon, M.D., George Giacoppe, M.D., Cynthia Clagett, M.D., David McCune, M.D., and Thomas Dillard, M.D.

The Department of Medicine, Madigan Army Medical Center, Tacoma, Wash.(J.M., G.G., C.C., D.M., T.D.); and the Department of Medicine, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, Md. (T.D.)

慶應義塾大学医学部 外科 岩丸有史, 小林絃一

#### 訳者からのコメント

非セル型ヘモグロビンである分子内架橋ヘモグロビン、ポリマー化ヘモグロビンなどの分子修飾ヘモグロビンは、臨床試験に入っている製品も存在し、開発研究が加速度的に進行中である。非セル型ヘモグロビンは、一酸化窒素(NO)を捕捉し血管収縮作用を有するとのことから、投与により体血圧・肺動脈圧の上昇や心拍出量の減少などがおこることが各種文献で報告されている。しかしながら、膜抗原をもたないため、血液型に関係なく投与できることはセル型と同様である。従って、出血性ショックなど救急患者にはもちろんであるが、自己免疫性血球減少症や自己免疫性溶血性貧血の急性増悪期に対しても、有効な治療になりうるものと考えられる。「自己免疫性」とは自分自身の組織が自己の免疫機構によって破壊的な影響を受ける状態のことをいい、自己免疫性溶血性貧血の場合、自分自身の赤血球に対する自己抗体によって赤血球が破壊され（これを溶血という）、結果として貧血となる。赤血球には各種膜抗原が発現しているため、これを自己抗体が標的として溶血反応が進行する。通常治療はステロイドや免疫抑制剤を用いるが、治療に抵抗する症例も存在する。今回は、膜抗原をもたない非セル型ヘモグロビン（ウシ重合ヘモグロビン：HBOC-201）を、自己免疫性溶血性貧血

の患者に投与し救命し得たた症例報告を紹介する。この症例報告では非セル型ヘモグロビン投与による体血圧の上昇は軽度であったが、肺動脈圧の上昇が見られた旨述べられている。NOとの関連などを含めて今後の詳細な解析が期待される。

#### 症例

症例は21歳。女性。既往歴、家族歴などは詳細不明だが、経口避妊薬の使用歴がある。肝臓、脾臓の腫大はなかった。著明な血小板減少症 $7000/mm^3$ を認めた。骨髄穿刺では十分な細胞があり、赤芽球優位で左方偏位を認めた。当初、特発性血球減少性 血栓性紫斑症と診断され、プレドニン $1mg/kg/day$ が開始され、血小板は $83,000/mm^3$ まで回復した。

初診から12日後に脱力感、呼吸困難、発熱で再入院となり、ヘモグロビンは $4.8g/dl$ 、ヘマトクリットは $13.8\%$ 、血小板は $12,000/mm^3$ にまで低下していた。入院後12時間でヘマトクリットは $7.5\%$ にまで低下し、頻脈、胸部圧迫感、呼吸困難、心電図上の虚血性変化が出現した。濃厚赤血球2単位の輸血後、症状と心電図はヘマトクリットの上昇( $12.4\%$ )とともに改善した。貧血の一時的な改善を得るために、メチルプレドニゾロン $1g/day$ と10日間にわたる免疫グロブリン $5g/day$ の投与が行われた。

続く45日間、溶血は進行し、貧血は大量グルココルチコイドや血漿交換、脾摘、免疫グロブリン療法などに対して難治性であった。

末梢血スメアでは、白血球100に対し有核赤血球が128で、著明な球状赤血球症を呈していた。網状赤血球はピーク時で $37\%$ を示した（訳者注：もともと球状赤血球は脆弱で溶血しやすく、これがまた網状赤血球を増加させることとなる）。患者血漿中の抗体は利用可能な全てのドナーに対して陽性反応を示した。心電図上の虚血性変化との兼ね合いから、ヘマトクリットを $12\%$ 以上、ヘモグロビンを $4g$ 以上に維持するため1日8単位の輸血が必要であった。輸血の際患者は発熱、嘔気、背部痛を訴え、これは急性溶血によるものと思われた。この時点でサイクロフォスファマイド $1000mg/m^2$ が開始された。

従来の輸血が効果なかったため、患者のインフォームドコンセントを得たのち、自己免疫溶血性貧血が落ち着くまで HBOC-201を使用することとした。

#### 投与方法

HBOC-201は乳酸リンゲルで緩衝され、グルタールアルデヒド架橋重合をうけたヘモグロビン溶液である。1単位中に $30g$ の架橋ヘモグロビンがあり、濃厚赤血球2分の1単位に相当する。HBOC-201投与

により得られるヘモグロビン上昇は（全ヘモグロビン量-ヘマトクリット3分の1）で求められる。

臓器虚血（アシドーシスやベースエクセス）や循環動態の異常、ヘモグロビン4g/dl未満の所見があればHBOC-201を投与した。最初の1単位は0.25g/minで、ついで0.5g/minの速度で投与され、これは以前に鎌状赤血球症の患者で許容されている速度である。HBOC-201の毒性はバイタル、血液検査、症状などで検討されたが、頻回の血液検査は行いえなかった。撓骨動脈ラインから動脈圧が、また肺動脈圧、心拍出量、中心静脈圧、時間尿量などもモニターされた。

## 結果

全部で11単位のHBOC-201が7日間にわたり、90gが1日間、60gが2日間、30gが4日間と投与された。血清中ピークHBOC-201レベルは3.36g/dlで9単位目の投与後であった。特に目立った副作用はなかった。臓器虚血に対し5単位を、敗血症に3単位を、ヘモグロビン4g/dl以上の維持のため3単位をそれぞれ使用した。HBOC-201治療中ヘモグロビンは平均5.5g/dlを維持し同様にヘマトクリットも9.5%を維持した。察するに血中酸素運搬量の大部分は可溶性ヘモグロビンに由来していた。

### 臓器虚血

初診から75日後、はじめの2単位60gは急速に進行する溶血に対して使用された。36時間でヘマトクリットは22%から13.8%に下降し、130以上の頻脈となり乳酸値も2.2mmol/lと上昇した。この4時間のHBOC-201投与中にヘマトクリットはさらに6.4%まで減少し、ヘモグロビンも3.7g/dlまで（うちHBOC-201が1.6g/dl）減少した。これにもかかわらず患者の心拍数は70にまで減少し、70-90のレンジで循環動態も安定し心電図上も虚血の徵候はなかった。

4-6単位目は最初の循環動態維持用の3単位終了48時間後に、敗血症に対して投与された。ノルエピネフリンも同時に開始された。7単位目はその16時間後にpHが7.45から7.22に、ベースエクセスが-5.1から-17.8になったのを受けて投与された。HBOC-201投与後10分間でBEは-13.2になり、最初の1時間でpHは7.37へBEは-

11.8へと変化した。この期間ノルエピネフリンの投与量に変化はなかった。

10単位目は治療6日目、6時間のあいだにpHが7.35から7.20へ、BEが-8.2から-10.8へ変化した時に使用され、投与1時間でpHは7.34、BEは-9.2まで改善した。

最後の11単位目はその翌日、BEが-3.7の時に投与され、1時間で1mmol/lの改善を認めた。HBOC-201治療中、最小のヘマトクリットは4.4%で（全ヘモグロビン量は3.5g/dl、うちHBOC-201は2.03g/dl）、治療開始後2日目に測定した値である。この時、心電図上では特に異常を認めなかった。

### 循環動態に対する影響

非セル型ヘモグロビン溶液は全身の血圧、肺動脈圧の両者を上昇させるとの報告があるが、この患者においては高血圧の傾向は認めなかった。治療開始前の5日間の血圧は平均93.6mmHgで治療終了後の5日間の血圧は平均119.7mmHgであった。治療中は104.7mmHgでありこれは敗血症に対してノルエピネフリン投与中のことであった。平均動脈圧は投与後すぐに変化せず、心係数も敗血症の時点でははじめは減少したが、血圧の改善と平行して改善した。治療期間中肺動脈圧は収縮期、拡張期ともに上昇していた。

### 臨床経過

サイクロフォスファマイド投与による好中球減少の間HBOC-201投与をうける一方、患者はグラム陰性菌による敗血症に、のちに骨盤骨髄炎になった。2回にわたるデブリードメントが必要となり、抗生素質を長期間使用した。サイクロフォスファマイド投与により溶血は軽度改善したが、合併症のためこれ以上の投与はおこなわれなかった。2回目の血漿交換と免疫グロブリン投与も満足な結果が得られなかつたため、サイクロフスボリンが投与された。これにより寛解となり、これ以上の輸血をする必要がなくなった。患者はHBOC-201治療後100日目で退院し、8ヶ月後も体調は良好であり、ヘマトクリットも35%以上を保っている。

### 考察

過去10年間に、輸液可能な酸素運搬体として、安全で効率のよい血液代替物の

開発に興味がもたれている。多くの代替物が試験中である。HBOC-201のようなヘモグロビンの架橋重合体はparticular promiseを示している。それらはヒトヘモグロビンと同じ分子構造を有するが生体内に比べてエステル濃度が低いため、結果として虚血組織ではより酸素を放出しやすく（acid-Bohr効果）、deoxygenated状態では二酸化炭素と結合するヘモグロビンが多くなる（Haldane効果）。重合ヘモグロビンの酸素結合能は血清中のクロライドイオンにより部分的に調節されておりヒトヘモグロビンが2,3-diphosphoglycerateに影響されるのと同様であり、こういった物性により優れた酸素運搬体となっている。

重合ヘモグロビンは組織の酸素化を維持し、ヒツジモデルではヘマトクリット2.4%という低値で1ヶ月以上の生存が得られている。HBOC-201は健常成人に対して安全かつ許容されるものであるとされている。鎌状赤血球症の患者に対しても同様で、腹部大動脈瘤の一部の患者に対しても治療中である。われわれの知る限りでは重症自己免疫性溶血性貧血の患者に対して、酸素輸液を目的としてHBOC-201を使用した報告はこれが初めてである。患者はその前に投与した濃厚赤血球よりも大量のHBOC-201(330g)を投与され、過去のどの報告よりも高い血清中HBOC-201レベルを示した。

血圧および肺動脈圧の上昇による血管収縮反応はヘモグロビンをベースとした溶液の投与により惹起されるが、これはヘモグロビンの一部がNOと結合する事によるとされている。この反応は心拍出量の減少と関連しており、いくつかの報告では、不十分な酸素運搬と関連があるとされている。治療開始時点では侵襲的循環動態検査は施行していなかったが、HBOC-201に対する血管収縮反応はみられなかった。この高血圧反応の欠如は鎌状赤血球症の患者に投与した時にも報告されている。加えて同時に発生していた敗血症も高血圧反応の欠如に関連していた可能性もあり、これは羊モデルでも示されている。また、HBOC-201の大投与は、腹部大動脈瘤患者に対する投与試験から、血管収縮反応を弱める可能性がある。さらに心係数は平均動脈圧と

比例し、虚血を反映する代謝性アシドーシスはHBOC-201投与により徐々に改善した。

患者はHBOC-201投与治療中に深刻なグラム陰性菌による敗血症をおこし、グラム陰性菌による骨髄炎となった。非セル型ヘモグロビンは鉄の供給を容易に

し、細菌の毒性を助長させてしまう可能性があり、これが細菌の複製を助け好中球機能を抑制してしまったかもしれない。溶血の進行それ自体もまた感染のリスクを上昇させるとされており、結局のところ、HBOC-201が感染、好中球減少、そして溶血性貧血の進行の合併を助長さ

せたかははつきりしない。

最後にまとめると、酸素運搬体としてのHBOC-201投与は自己免疫性溶血性貧血の患者に対して、救命手段となった。HBOC-201は急性期あるいは長期的な虚血傷害なしに、患者のヘマトクリットを4.4%以上に維持した。

## 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<sup>®</sup>-I-ニチヤク

〈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)

## 学会報告

第7回日本血液代替物学会年次大会 ワークショップ

# “人工血液臨床応用をとりまく問題点と対策”を司会して

岡山県赤十字血液センター 高折益彦  
東北大学医学系研究科環境保健医学 仲井邦彦

我が国の血液代替物、なかんずく赤血球代替物に関する研究も過去数年間の成果を踏まえて、次の臨床応用に歩を進める時期に来ているように思われる。このような状況から北畠会長が今回大会のまとめとして二日目最終のプログラムとして上記題名のワークショップを組まれたものと推察される。

最初に札幌市エホバの証人医療機関連絡委員会委員である金森寿憲氏から血液代替物の開発がエホバの証人の信者にとつていかに期待されているか述べられた。とくに全合成系にもとづく赤血球代替物の登場を切に希望された。しかし現在酸素運搬物として赤血球代替物に使用されている hemoglobin について最近の教会としての見解に変化があったと報告され我々の注意を呼んだ。すなわち hemoglobin は erythropoietin, immunoglobulin のごとく、従来通り血液そのものと考えても、あるいはこれはもはや血液の一部ではなく、単なる heme 化合物、すなわち錯体化合物と考えても、それは信者各人の信条に従って許されることを述べられた。このことは後述するごとく、おそらく第一段階の赤血球代替物として登場するであろう hemoglobin を酸素運搬体として採用した製品が一部のこの宗教信者の方に使用可能であることを意味している。

次に慶應大学医学部外科の堀之内先生が hemoglobin 内包型 liposome, lipid heme 小胞体, albumin-heme を用いてラットで血液交換を行なった成績について報告された。両者とも 90 %、あるいはそれに近い量の血液交換でも生体機能に認めるべき循環動態、肺ガス交換、組織酸素代謝

に著しい変化を生じなかった。そしてこれらは投与後に網内系に捕捉されて、代謝されるが、長期間の観察で各臓器に不可逆的な変化を生じることは認められなかつた。ただ albumin-heme の投与後の血液中半減期が短い（7時間）のは改良すべき点と指摘された。

血液事業の立場から北海道血液センターの池淵先生は、まず現行の輸血、すなわち献血血液で行なわれる同種血輸血をやめるべき問題点はあるのか？ またなにが血液代替物の使用に移行させる要因か？ という論点から検討を進められた。その結果、確かに同種血輸血の問題点は存在する。しかしこれを血液代替物に置換えたとしても現在の同種血輸血と同等、あるいはそれ以上の副作用を随伴することも考慮すべきである。さらに有効性、とくにその短い血液中滞留時間に問題が残ると指摘された。そしてこれらの条件を考慮して、もし現在使用可能な血液代替物を臨床に応用するとすれば、緊急時に同種血輸血を行なうまでのつなぎとすべきであると述べられた。しかしながら副作用発生に関して確認すべき諸点が存在することも追加された。

工業生産を担当する企業の立場からテルモ株式会社開発センターの緒方嘉貴氏は hemoglobin 内包 liposome 赤血球代替物（NRC）の開発を長年にわたり努力されてこられたが、それらの研究の中からとくに最近の成果について報告された。すなわち hemoglobin の持つ allosteric 効果を inositol phosphate により維持し、hemoglobin の酸素解離曲線を右方移動させ、酸素輸送効果を増大させた。また liposome 表面を polyethylene glycol の修飾

にてその血液中滞留時間を 24 時間と延長した成果を報告された。しかもし このような製品で臨床治験を行なうとすれば、その目標を出血治療などでの輸血の代替とするのではなく、臓器梗塞部位への酸素供給に求むべきではないかと提案された。それはその血液内半減時間が 24 時間程度では短く、またその予測使用が 1,000 ml 程度と制限されるのでは、輸血の代替治療としては不十分と考えるためである。しかし反面その粒径は赤血球の 1/30 - 1/40 と小さく、赤血球では到達できない血管床にこれが到達することから上記の治療目的ならばその効果が期待されようとして述べられた。いずれにしても工業生産面からは製造コストの軽減、製品の画一化が必要で、現在その確立に取り組んでいると述べられた。

最後に司会者である高折がまとめとして、血液代替物の必要性、利点、予想される副作用を述べ、今後開発すべき赤血球代替物としてはどのようなものが理想的であるか検討した。その中で、まず赤血球代替物としては細胞型であることが理想的であろうと提言した。その理由として、1) 人工細胞膜（たとえば liposome）内に酸素運搬物質を内蔵させるとともにその機能保持物質も内蔵させうる可能性、2) 長時間血液内滞留の可能性、3) 酸素運搬物質と外界細胞、組織との直接接觸の防止、4) 正常血液粘度正常保持の可能性などをあげた。最後に臨床応用への第一選択としてはまず単純出血の治療、そして第二に緊急時を含む予想せざる出血の治療を選択すべきであろうと述べた。また Sangart 社の Winslow 博士が特別講演でも述べられたごとく、

人工血液の開発は革命であり、それを実行するにはある程度の risk (むろん可及的これを回避する努力は必要ではあるが) をともなうことは避けられないのではないかと結んだ。

これらの発表があった後、総合討論となり、司会者からの質問に答えて堀之内先生が現在までの赤血球代替物を動物に使用した範囲ではとくに目立つ副作用はなかったが、 albumin-heme ではまれに shock 様症状が見られたこともあったと答えられた。そして今後、大動物での研究が必要であると追加された。また池淵先生から liposome をカプセルとして使用した場合、anti-cholesterol antibody の発現、それによる代替物の捕捉・効果低下、副作用発現などの問題点を検討すべきであると追加された。また北畠会長から、"このような血液代替物の臨床応用は緊急治療のみとすべきではないか"との提言があった。さらに北海道大学の佐久間先生から Sangart Inc. の Winslow

博士に対して"なぜアメリカでは細胞型の赤血球代替物の臨床応用を目指し、企業が乗出さないのか"との質問があった。これに対して1) 医療上の cost effectiveness, 2) 生産企業側での economical effectiveness, 3) 製造過程が複雑で検討項目が非常に多くなる点、で開発を試みる企業がないのであろうとの解答があった。これに対して早稲田大学土田先生から我が国ではその生産技術面での改良は着々と進みつつあるとの追加発言があった。

司会者の印象として、赤血球代替物での酸素運搬物質として全合成物質を使用する時期はまだ遠いように思われる。したがってそれまではヒト hemoglobin, あるいは牛 hemoglobin (すでに Hemopure として開発された製品がある) を使用すべきかと考える。また現在献血された血液の一部 (6 - 13 %) の赤血球は未使用のまま廃棄されていると聞く。しかしそれらを販売を目的としている工業生産企

業へ売却することは許されていない。エホバの証人の教会は今回示したごと各人の信条により hemoglobin を単なる物質として考えることも認容した。献血された赤血球、そのうち、医学的理由から選択された特定の赤血球のみを 日本赤十字血液センターが責任をもってなんらかの処理をほどこし、企業に供給するならば、倫理的拘束から開放されるように思われる。今後この方面的検討がぜひあってほしいと強く望まれた。来年度の日本血液代替物学会はやはり秋に東京女子医大の清水勝教授の下で開催される。そして臨床応用をとりまく諸問題は今後も重要な問題であり、来年もその検討が続けられると思われる。本ワークショップがその一つの契機となれば幸いである。基礎研究での進歩もさることながら、臨床応用面での研究でもさらなる進展があることを心から望むものである。

## ●事務局たより

### 日本血液代替物学会 総会

#### 1. 日 時 :

平成12年9月7日（木） 13:00 — 13:15

#### 2. 場 所 :

かでる2・7 かでるホール  
〒060-0002 札幌市中央区北2条西7丁目<sup>テレ</sup>  
Tel: 011-231-4111

#### 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11年度事業報告

② 平成11年度収支決算

③ 平成12年度事業計画及び収支予算案

④ その他（次期大会長ほか）

以下審議内容を略記します。

#### 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7回日本血液代替物学会年次大会
- 2) 平成12年9月7日（木）～8日（金）
- 3) 札幌市中央区北2条西7丁目 かでる2・7
- 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：7社
- 3) 正会員：156名（入会4名／退会9名）
- 4) 購読会員：26箇所

④ 事務局FAX番号変更（平成12年9月1日より）

新FAX番号：03-5363-3499

#### 審議事項

① 平成11年度事業報告（平成11年4月1日～平成12年3月31日）  
が行われ各自承認された。

- 1) 定期総会の開催 平成11年9月10日（金）  
京王プラザホテルにて開催された。
- 2) 第6回年次大会（大会長 池田 康夫）  
平成12年9月10日（金）～11日（土）  
京王プラザホテルで行われた。
- 3) 会誌「人工血液」の発行  
第7巻2号、3号、4号、第8巻1号を発行。
- 4) 平成11年度収支決算報告は承認された。

#### ③ 平成12年度事業計画（案）

- 1) 定期総会の開催  
平成12年9月7日（木）13:00～13:15  
かでる2・7 かでるホール
- 2) 第7回年次大会の開催（大会長 北畠 顯）  
平成12年9月7日（木）、8日（金）  
於 かでる2・7
- 3) 会誌「人工血液」の発行  
第8巻2号（平成11年7月）、3号（9月）、4号（12月）、  
第9巻1号（平成12年3月）の発行予定。
- 4) 平成12年度収支予算案は承認された。

#### ④ 平成13年度定期総会の予定が報告された。

- ・ 次期大会長は清水 勝教授（東京女子医科大学中央検査部  
輸血科）に決定された。
- ・ 第8回年次大会は、平成13年9月4・5日の予定です。

## ●事務局たより

### 日本血液代替物学会 役員名簿（平成12年度）

顧 問	尾形利郎	防衛医科大学校名誉教授	庶務理事	池淵研二	北海道赤十字血液センター副所長
	高久文麿	自治医科大学 学長	理 事	阿岸鉄三	板橋中央総合病院血液浄化療法センター プラッドアクセス治療センター 所長
	堀 原一	筑波大学 名誉教授		池田久實	北海道赤十字血液センター 所長
	遠山 博	埼玉医科大学総合医療センター名誉所長		清水 勝	東京女子医科大学 教授
前 会 長	土田英俊	早稲田大学理工学部 教授		友田燁夫	東京医科大学 教授
会 長	小林紘一	慶應義塾大学医学部 教授		宮尾秀樹	埼玉医科大学総合医療センター助教授
副 会 長	池田康夫	慶應義塾大学医学部 教授	監 事	桜井靖久	東京女子医科大学 名誉教授
大 会 長	北畠 訓	北海道大学医学部 教授		藤村 一	生産開発科学研究所 学術顧問
会計理事	西出宏之	早稲田大学理工学部 教授	(事務局長)	堀之内宏久	慶應義塾大学医学部 講師
			(会誌担当)	宮尾秀樹	埼玉医科大学総合医療センター助教授

### 日本血液代替物学会 評議員名簿（平成12年度）

青木 克憲	慶應義塾大学医学部救急部 助教授	高折 益彦	岡山県赤十字血液センター 顧問
阿岸 鉄三	板橋中央総合病院 血液浄化療法センター プラッドアクセス治療センター 所長	高久 文麿	自治医科大学 学長
浅野 茂隆	東京大学医科学研究所 教授	高橋 晃	テルモ(株) 専務取締役
阿部喜代司	筑波大学医療技術短期大学部 教授	高橋 英嗣	山形大学医学部 助教授
飯塚哲太郎	法政大学工学部 教授	高橋 恒夫	東京大学医科学研究所 教授
池田 久實	北海道赤十字血液センター 所長	武岡 真司	早稲田大学理工学部 助教授
池田 康夫	慶應義塾大学医学部 教授	土田 英俊	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	土屋 喜一	早稲田大学理工学部 教授
伊藤 俊之	京都府立医科大学 助教授	遠山 博	埼玉医科大学総合医療センター 所長
岩田 博夫	京都大学再生医科学研究所 教授	友田 燁夫	東京医科大学 教授
大島 宣雄	筑波大学基礎医学系 教授	豊田 忠之	東部地域病院 元院長
大塚 節子	岐阜大学医学部 講師	仲井 邦彦	東北大学医学部 助教授
大柳 治正	近畿大学医学部 教授	中井 一士	麻薬覚醒剤乱用防止センター 専務理事
尾形 利郎	防衛医科大学校名誉教授	長澤 俊郎	筑波大学臨床医学系 教授
岡野 光夫	東京女子医科大学医用工学研究施設長	中島 正治	厚生省医薬安全局血液対策課 課長
片岡 一則	東京大学工学部 教授	西 勝英	熊本大学医学部 教授
鍵谷 昌男	ウェルファイド(株) 生産本部長	西出 宏之	早稲田大学理工学部 教授
川村 明夫	札幌北楡病院 理事長	西谷 孝子	慶應義塾大学医学部特別研究教員助教授
北畠 訓	北海道大学大学院医学研究科 教授	ジムス・R・ハーレイ	バクスター(株) 代表取締役社長
黒澤 良和	藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授	馬場 正三	浜松医科大学 教授
小林 紘一	慶應義塾大学医学部 教授	平澤 博之	千葉大学医学部 教授
小室 勝利	国立予防衛生研究所 教授	藤島清太郎	慶應義塾大学医学部 講師
斎藤 英彦	名古屋大学医学部 教授	藤巻 道男	東洋公衆衛生学院 学院長
酒井 清孝	早稲田大学理工学部 教授	藤村 一	生産開発科学研究所 学術顧問
佐久間 一郎	北海道大学大学院医学研究科 講師	船津 昭信	(財) 化学及血清療法研究所 常務理事
桜井 靖久	東京女子医科大学 名誉教授	堀 進悟	慶應義塾大学医学部 助教授
鯨島 達也	青山学院大学理工学部 教授	堀 原一	筑波大学 名誉教授
清水 勝	東京女子医科大学 教授	松本 倭三	日本赤十字社血漿分画センター 所長
清水 慶彦	京都大学再生医科学研究所 教授	宮尾 秀樹	埼玉医科大学総合医療センター 助教授
十字 猛夫	日本赤十字社中央血液センター 所長	宮崎 保	札幌通信病院 名譽院長
平 明	鹿児島大学医学部 名誉教授	村田 満	慶應義塾大学医学部 講師
		湯浅 晋治	埼玉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(人工血液開発推進事業)平成12年度 研究成果発表会「人工血液をつくる」

日 時： 平成13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 新宿一信濃町＝約6分

参加費： 無 料

- 発 表：
- 1. 人工血液に期待するもの .....(東京女子医大 輸血科) 清水 勝
  - 2. 血小板の働き .....(慶應義塾大学 医学部) 半田 誠
  - 3. 人工血小板をどうようにして作るのか？ またどのような時に利用できるのか？  
.....(慶應義塾大学 医学部) 池田 康夫
  - 4. 赤血球の働きと人工系を用いる利点 .....(慶應義塾大学 医学部) 小林 紘一
  - 5. 必要とする酸素量を運べる人工赤血球の現状と展望 ... (早稲田大学 理工総研) 土田 英俊
  - 6. 臨床応用を目指した酸素運搬体の開発とその展望 .....(北海道大学 医学部) 北畠 顕
  - 7. 人工赤血球の需要と医療経済 .....(北海道大学 医学部) 佐久間 一郎

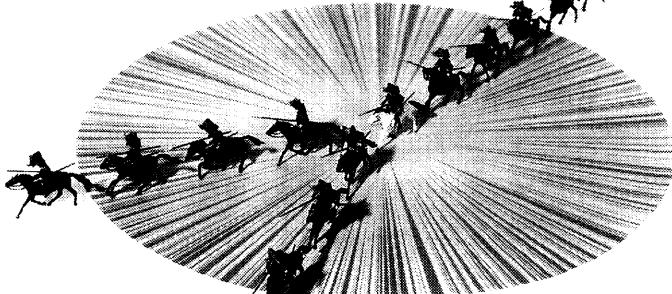
主 催： 厚生科学研究(人工血液開発研究推進事業) ヒューマンサイエンス振興財団

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>

# にっぽんの血液製剤です。

献血であることの誇りと重責……



## 禁忌 (次の患者には投与しないこと)

本剤の成分に対しショックの既往歴のある患者

## 原則禁忌 (次の患者には投与しないことを原則とするが、特に必要とする場合には慎重に投与すること)

本剤の成分に対し過敏症の既往歴のある患者

冷蔵保存から室温保存になりました。

血漿分画製剤

指定医薬品

献血由来 静注用人免疫グロブリン製剤

**献血ベニロン-I**

〈乾燥スルホ化人免疫グロブリン〉

生物学的製剤基準

Kenketsu Venilon®-I

薬価基準収載

総発売元・販売

製造元・販売

資料請求先：帝人(株)医薬医療事業本部学術情報部

TEIJIN 帝人株式会社

医療医薬事業本部学術情報部  
〒100-8585 東京都千代田区内幸町2-1-1  
電話番号：03-5566-3441～1211/Fax03-345-1345

化血研

化学及血清療法研究所  
〒860-0566 熊本市大通り1-6-1 〒860-8568  
Phone096-344-1211/Fax096-345-1345

資料請求先：(財)化学及血清療法研究所営業管理部

VE16-9908 作成年月1999年11月

# Bolster & Heal

献血由来 生体組織接觸剤  
**ボルヒール**  
BOLHEAL® 指 健保適用

●ご使用に際しましては製品添付文書をご参考下さい。

販売

TEIJIN 帝人株式会社

医療事業本部 〒100-8585 東京都千代田区内幸町2-1-1

製造元・販売

化血研

熊本市大通り1-6-1 〒860-8568

資料請求先：帝人株医薬事業本部第2学術部  
化学及血清療法研究所営業部

BT011T9810 作成年月1998年10月

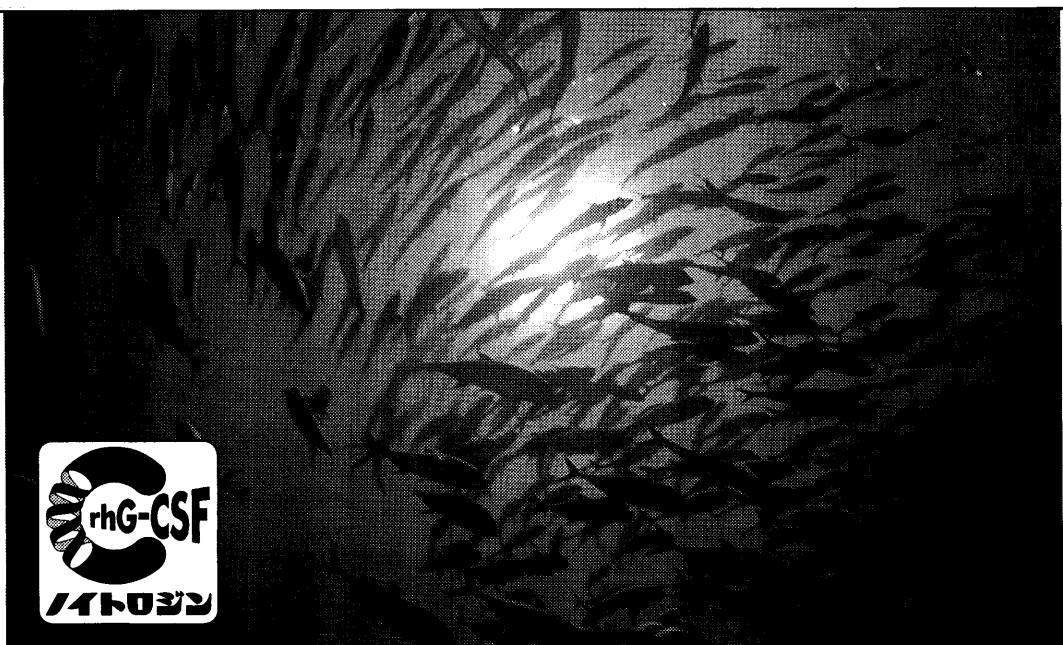
B52

## ●編集後記●

世紀末からいよいよ21世紀を迎えようとしています。20世紀は Landsteiner の血液型発見を契機として輸血学、外科学などの発展が人類の健康に大きく貢献してきました。21世紀にはこの学会が発信している人工酸素運搬体や人工血小板をはじめとする人工血液を用いた医療が人類に貢献できる様になることを願つ

てやみません。会員の皆さんに少しでも有益な情報を提供できるように編集部一同努力していきたいと思います。21世紀も本学会誌への尚一層のご協力（ご投稿）をよろしくお願ひいたします。

(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

**ナイトロジン**®

NEUTROGIN<sup>Injection</sup>

一般名 レノグラスチム(遺伝子組換え)

薬価基準収載

50<sup>μg</sup>  
100<sup>μg</sup>  
250<sup>μg</sup>  
注



[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

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

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

1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
2. 砂本順三、岩本 清. リポソームの調製. 野島庄七、砂本順三、井上圭三編. リポソーム. 東京: 南江堂, 1988;21-40.
3. Fowler SA, Andracki M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22:27-42.
4. Reichert CM, Kelly VL, Macher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985;111-60.

- 9) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
- 10) 既発表の図表、その他を引用、転載する場合には、あらかじめ版権所有者の許可を得ること。また、掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

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

### 編集委員会

●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、津田良夫、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 (4) 2000年12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)5363-3499

〒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)5363-3499

〒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