

人工血液

第10巻 第1号 2002年3月

目次

巻頭言	遠山 博	4
総説	流動状態下におけるrGPIa/IIa-Ib α -liposomesのコラーゲン表面での粘着と凝集	西谷孝子 6
	献血血液の核酸増幅検査(NAT)によるウイルススクリーニング	佐藤進一郎 11
原著	ヘモグロビン系人工酸素運搬体の血小板に及ぼす影響と人工材料としての臨床応用の可能性	藤井 聡 17

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 10 No. 1 March, 2002

Contents

Opening Message	Hiroshi Tohyama	4
Review: Adhesion of rGPIa/IIa-Ib α -liposomes on the collagen surface under flow conditions	Takako Nishiya	6
Virus screening by nucleic acid amplification testing (NAT) for donated blood	Shinichiro Sato	11
Original Article:		
Effects of hemoglobin based oxygen carrier on platelets: Implications for coating artificial surfaces	Satoshi Fujii	17

会 告

第9回日本血液代替物学会年次大会

テーマ

「血液成分の新展開」

会 期：平成14年9月4日(水)，5日(木)
大 会 長：西 勝英(熊本大学医学部薬理学第二講座)
会 場：熊本市国際交流会館
〒860-0806
熊本市花畑町4番8号
TEL: 096-359-2020

応募用紙：人工血液第10巻1号に綴じ込み
(又は下記にご請求ください)

演題募集：一般演題(口演)

演題締切：2002年6月7日(金)

演題送付先・連絡先

：〒860-0811 熊本県熊本市本荘2-2-1
熊本大学医学部薬理学第二講座
第9回日本血液代替物学会年次大会
事務局 徳富 直史
森山 智子
TEL/FAX: 096-373-5082

会 告

第9回 血液代替物国際シンポジウム

IX-International Symposium on Blood Substitutes

会 期：2003年3月2日(日)～5日(水)

場 所：京王プラザホテル

〒160-8330 東京都新宿区西新宿2-2-1

TEL: 03-3344-0111

会 長：小林 紘一（慶應義塾大学医学部外科学教室）

事務局：慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

TEL: 03-3353-1211(内線 62333)

03-5363-3806(直通)

FAX: 03-5363-3499

U R L： <http://www2.convention.co.jp/athisbs>

巻頭言

日本輸血学会名誉会長
埼玉医科大学総合医療センター名誉所長
遠山 博



今回宮尾秀樹先生の御依頼で巻頭言を書かせていただくことになりました。慌てて「人工血液」の前の方をひっくり返してみますと、昨年の巻頭言は小林紘一本学会会長先生が書いていらっしゃるのに、今年のそれはactive memberとはとてもいえそうもない私で大変に恐縮致します。

先ず日本血液代替物学会会誌「人工血液」が第10巻をお迎えになられることに対し、心よりお慶び申し上げます。私の記憶によりますれば、平成5年であったかと存じますが、土田英俊先生、小林紘一先生、池田康夫先生、西出宏之先生等早慶連合軍（スポーツではこんなことはなかったのでしょうか）を柱として、多くの同好の士が結集されたのですが、当時私が度肝を抜かれたのは、理工学の先生方が医学の先生方にハッパを掛けて下さったように見えたことです。人工血液の研究は20世紀の初期から細々とやられて来たようですが、血液を入手し易い医師が主体で施行されて来た研究が大部分のように思われました。私ばかりかも知れませんが、医師はどうも化学、工学に弱く、よいものが出来なかったきらいもあったようです。医・理・工の三学の一体化こそよき人工血液を作る鍵でありましょう。

私事で恐縮ですが、私は昭和24年に大学医学部を卒業して、外科に入局しましたが、当時ほとんどやる人がなかった輸血の勉強を命じられ、昭和35年まで東大病院輸血部の主任をしておりましたが、同48年迄群馬大学外科の助教授を勤め、又東大輸血部の部長に帰って参りました。昭和60年に60歳定年となり、同年埼玉医科大学が川越市に新設した総合医療センターによんでもらいました。昭和62年より平成5年まで日本輸血学会の会長に推され、それを勇退してから平成6年から同11年まで総合医療センターの所長を命ぜられ、病院経営の方に忙殺されました。従って平成6年からほとんど勉強しなくなり、本学会に出席しては世界の「人工血液」方面の新しい研究の成果などのお話をうかがっては、びっくりして帰るといったことの繰返しでありました。

私は昭和40年代、50年代には東大輸血部で「人工血液」方面にも興味を持っておりましたので、古いお話を少々させていただきたいと思います。

人工血液と申しまして遺伝子組換えアルブミンや同血液凝固因子製剤は全く完成されており、血小板は大変に難しく、何と申しまして赤血球代替物こそ、当面人工血液の本流でありましょう。これには赤血球と全く関係のない人工酸素運搬体とヘモグロビン(Hb)又はその修飾体、さらにHbのマイクロカプセル化がございましょう。本邦では本学会が設立される迄は、人工臓器学会(1960年頃設立)が、人工血液方面の研究の主たる発表の受皿になっておりましたことを思い出します。

第二次世界大戦終戦後間もない1950年頃、北大生理学の箕島高教授がコバルト・ヒスチジン複合体が酸素の結合・放出することを利用して一連の人工血液と命名した溶液を作られたが、勿論実用にはならなかった。1958年頃Corwinら、Wangらはイミダゾール誘導体を用いて人工Hbモデルを作り、本邦の豊田忠之(1966)、簗野昌弘(1972)等はこのモデルを改良した。

米国のClark(1966)は電気の絶縁体PFCの中にマウスを沈めて生きていることをNature誌に発表、Geyer(1968)はPFCでラットの全血交換をしてbloodless ratを作製した。これ等によりミドリ十字社が1968～1970年にかけてFluosol-DAを開発し、FDAの許可もあって世界的に実用化されたのは御存知の如くであって、エホバの証人患者にも使用された。

人工Hbの結晶輸注は最も古くから施行された。古くは血清化学の巨人といわれたHeidelberger(1922)はcrystalline oxyhemoglobinと称するものを実験室で製造した。今日から見れば幼稚な技術かも知れないが、筆者は歴史的な論文であると思う。当時彼はニューヨークのロックフェラー研究所で、K. Landsteiner、野口英世と並ぶ三大研究エースであった。又偉大な生化学者Van Slyke(1922)もHb製造の研究をしていた。彼の発明した血液のO₂、CO₂濃度、pHを測定する器械はあまりにも有名で、筆者も昭和20年代の末、これを使って実験を行っていた。

それより大分時がたった。met Hb化しないstroma-freeのoxy Hb結晶液を作るべく多くの人々の研究があったが、米国のRabiner(1970)は純粋な上記Hb液は腎に障害を全く与えないことを立証し、250mL壇内で真空凍結した。これはソ連邦のレニングラードの救命救急センターで汎用された。血液型検査が全く不要で、Minikovan[医長]によれば30人の患者にHb液を400mL位ずつ使用したが、血圧はかなりの時間保たれ、副作用は皆無であったという。又Malahovはレニングラードの第一Pavlov Medical Instituteで16例の胸部外科患者にこのHb液を用い、速効性があり、副作用はなかったが、8時間位でHbは腎からすべて排出されてしまうとした。

1970年代後半、1980年代に入って多くの人々が修飾Hb液を研究したが、米国のDe Venutoら(1984)が結晶化Hbにpyridoxal-5-phosphateを添加したPLP-Hbは、血漿内半減期を7倍に延長した。

赤血球代替物の将来の本命としては、Hbを人工膜などで小胞化した文字通り人工赤血球と呼べるものであろう。例えば小胞体はリン脂質からなるリポソーム等で作られるものが多い。紙面の都合もあり、筆者は新しいことを勉強していないので、これ位で失礼させていただく。

「代替赤血球は本当に必要か？」の議論において、エホバの証人患者は別として、私は純医学的立場からその絶対的適応として稀な赤血球型患者、非常に多種の抗赤血球型抗体を持っている患者等があげられます。特に前者で高頻度抗原といって人間誰もが持っている赤血球膜表面抗原を不幸にして持っていない人が稀にいて、そのような人はその抗原に対する抗体を持っているものであり、それらの人には輸血できる血液がないのです。

本学会は間もなく設立10年を迎えられることになるかと存じますが、汎く世界に認められたユニークな学会として大きく発展されることを期待してやみません。

流動状態下におけるrGPIa/IIa-Ib α -liposomesの コラーゲン表面での粘着と凝集

Adhesion of rGPIa/IIa-Ib α -liposomes on the collagen surface under flow conditions

西谷孝子
Takako Nishiya

和文抄録

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血小板膜糖蛋白I, GPIa/IIa複合体とGPIb α フラグメントの遺伝子組み換え体を固定化したリポソーム, rGPIa/IIa-Ib α -liposomes, が可溶性vWf存在下, 流動状態下において, コラーゲン表面に効率よく粘着することを確認した。さらに, rGPIa/IIa-Ib α -liposomesは, 可溶性vWf存在下, コラーゲン表面, または, 均一系で活性化された血小板と相互作用して血小板凝集塊に巻き込まれることも確認した。

Abstract

Liposomes carrying both recombinant GPIa/IIa (rGPIa/IIa) and GPIb α fragment (rGPIb α) (rGPIa/IIa-Ib α -liposomes) instantaneously and irreversibly adhered to the collagen surface in the presence of soluble von Willebrand factor (vWf) at high shear rates, in marked contrast with translocation of liposomes carrying rGPIb α alone on the vWf surface. rGPIa/IIa-Ib α -liposomes interacted with platelets on the collagen surface to form aggregates. In a homogeneous solution, rGPIa/IIa-Ib α -liposomes enhanced platelet aggregation in a dose-dependent manner, as evaluated using an aggregometer.

Keywords

platelet substitute, liposome, rGPIa/IIa, rGPIb α fragment, adhesion, aggregation

はじめに

厚生労働省高度先端医療研究事業によって組織された人工血小板研究班に私が参加し, リポソームを用いた血小板代替物の開発に着手して以来, 約4年にわたる研究で, 止血機能を持しうる人工粒子の創製に成功した。具体的な研究成果としては, 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, 血管内下組織の構成成分であるコラーゲンやvon Willebrand factor (vWf) のレセプターであるGPIa/IIa複合体とGPIb α フラグメントの遺伝子組み換え体を固定化したリポソーム, rGPIa/IIa-Ib α -liposomes, を創り, このリポソームが流動状態でコラーゲン表面に効率よく粘着することを確認した。前回, rGPIb α フラグメントのみを固定化したリポソーム, rGPIb α -liposomes, とvWf表面との相互作用は可逆的, 一過性で, その粘着量はずり速度が高いほど増加すること述べた¹⁻³⁾。今回は, 流動状態下におけるrGPIa/IIa-Ib α -

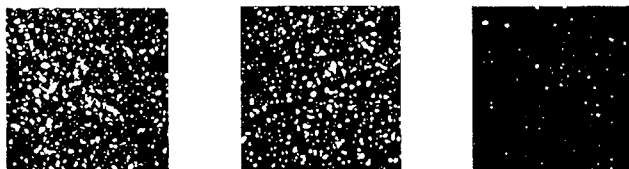
liposomesのコラーゲン表面での凝集と粘着について述べる。

2. 流動状態下におけるrGPIa/IIa-liposomesのコラーゲン表面への粘着⁴⁻⁸⁾

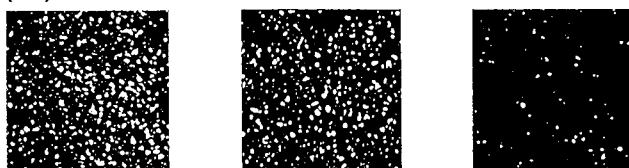
rGPIb α -liposomesがvWf表面上を流動方向へ移動するのに対し, rGPIa/IIa-liposomesは, コラーゲン表面と接触すると直ちに静止して粘着した。図1に, rGPIa/IIaの表面密度が 2.22×10^3 molecules/particleであるリポソームのコラーゲン表面への粘着の様子を示した。ずり速度が 600 s^{-1} の場合, rGPIa/IIa-liposomesのコラーゲン表面への粘着における表面占有率(surface coverage)は, 可溶性vWf存在下では $23.0 \pm 2.2\%$, 存在しないときは $23.8 \pm 2.0\%$ であった。ずり速度が 2400 s^{-1} になると, surface coverageは, 可溶性vWfの有無に関わらず, 約3%に著しく減少した。図2に示したようにrGPIa/IIa-liposomesのコラーゲン表面への粘着は, 抗GPIa抗体であるGi9によるリポソームの前処

理や, free rGPIa/IIaの共存下で抑制された。これらの結果は, rGPIa/IIa-liposomesが固定化コラーゲンのレセプターとしての機能を保持しており, rGPIa/IIa-liposomesのコラーゲン表面への粘着はずり速度の低いときに有効であることを示している。

vWf (+)



vWf (-)



600

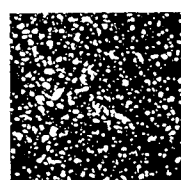
1200

2400

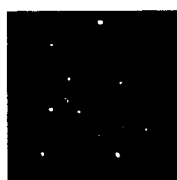
Shear rate (s⁻¹)

Figure 1. Dependence of the interaction of rGPIa/IIa-liposomes with the collagen surface on shear rate.

Images were obtained after 3 min of perfusion on the collagen surface at different shear rates, as indicated, in the presence or absence of 10 μg/ml soluble vWf. Liposomes have an exofacial rGPIa/IIa density at 2.22×10^3 molecules/particle.



control



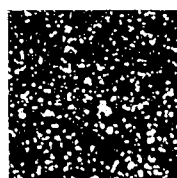
anti GPIa



free rGPIaIIa
(0.1 μg/ml)



free rGPIaIIa
(1 μg/ml)



control mouse IgG

Figure 2. Inhibitory effect of the anti-GPIa monoclonal antibody, Gi9, and free rGPIa/IIa on the interaction of rGPIa/IIa-liposomes with the collagen surface under flow conditions.

Control; images were obtained after 3 min of perfusion at a shear rate of 600 s⁻¹. Liposomes have an exofacial rGPIa/IIa density of 2.22×10^3 molecules/particle.

Anti-GPIa; experimental conditions were the same as control except that rGPIa/IIa-liposomes were incubated with 10 μg/ml Gi9 for 5 min at 37°C before perfusion.

Free rGPIa/IIa; experimental conditions were the same as for the control except that 0.1 or 1.0 μg/ml of free rGPIa/IIa was present in perfusion solutions.

Control mouse IgG; experimental conditions were the same as control except that rGPIa/IIa-liposomes were incubated with 10 μg/ml control mouse IgG for 5 min at 37°C before perfusion.

3. 流動状態下におけるrGPIa/IIa-Ibα-liposomesのコラーゲン表面への粘着⁴⁻⁸⁾

rGPIa/IIa-liposomesにrGPIbαフラグメントを導入したりリポソーム, rGPIa/IIa-Ibα-liposomes, は, rGPIa/IIa-liposomesと同様に, コラーゲン表面と接触すると直ちに静止して粘着した。図3に, 流動状態下(2400s⁻¹), コラーゲン表面におけるrGPIa/IIa-liposomes, rGPIa/IIa-Ibα-liposomes, rGPIbα-liposomes, control liposomeを, それぞれ2秒間に2/30sec毎に撮った30枚の写真を重ね合わせたものを示した。rGPIa/IIa-liposomesと rGPIa/IIa-Ibα-liposomesは, コラーゲン表面に強固に粘着するため, リポソームは一定の場所に留まっているが, 高ずり条件下では, rGPIa/IIa-Ibα-liposomesが rGPIa/IIa-liposomesより効率よくコラーゲンに粘着する(図3 A, 3 B)。これに対し, rGPIbα-liposomesは, コラーゲン表面に吸着したvWfとrGPIbαとの一過性の相互作用をしながら流動方向へ移動しているので, その軌跡を見ることができる(図3 c), rGPIa/IIaの表面密度を一定(約 2.00×10^3 molecules/particle)とし, 異なるrGPIbα表面密度(1.00×10^4 , 5.27×10^3 , 0 molecules/particle)を持つリポソームを創り, それらのコラーゲン表面への粘着における surface coverageを図4 Aに示した。rGPIbαとrGPIa/IIaの表面密度がそれぞれ 1.00×10^4 と 2.00×10^3 molecules/particleであるリポソームは, 可溶性vWf存在下では, ずり速度が高くなるのにもなってコラーゲン表面へ効率よく粘着するが, 可溶性vWfが無いと, ずり速度が高くなるのに伴って粘着が著しく減少した。rGPIbαの表面密度が50%減少すると, 可溶性vWf存在下での粘着は可溶性vWfの無いときより強いが, ずり速度の上昇に伴って減少した。rGPIbαを持たないリポソームのコラーゲン表面への粘着は, 可溶性vWfの有無に関わらず, ずり速度が高くなるのに伴って著しく減少した。rGPIbαの表面密度を一定(約 1.00×10^4 molecules/particle)とし, 異なるrGPIa/IIa表面密度(2.17×10^3 , 0.96×10^3 , 0 molecules/particle)を持つリポソームのsurface coverageを図4 Bに示した。rGPIa/IIaの表面密度が50%減少すると, リポソームの粘着はずり速度が高くなるのに伴って著しく減少し, rGPIbαのみを固定化したリポソームは, コラーゲン表面に粘着することなく, 一過性の相互作用をするのみで, リポソームの表面での滞在時間は33msec以下であった。これらのことから, rGPIa/IIa-Ibα-liposomesのコラーゲン表面への粘着では, rGPIa/IIa-collagen相互作用は, 高ずりにおいても, 低ずりにおいても重要であり, 特に高ずり条件下では, rGPIa/IIa-collagen相互作用とrGPIbα-

vWf相互作用が相乗的に働いていることが明らかである。

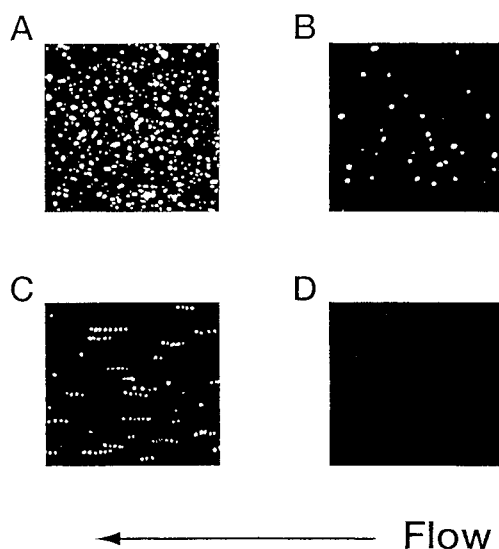


Figure 3. Time-lapse analysis of liposome movement on the collagen surface.

Each image is a composite created by the superimposition of 30 successive frames, taken at 2/30 s intervals, Het of 37.5%, shear rate of 2400 s^{-1} , platelet count of $1.25 \times 10^4/\mu\text{l}$, $10 \mu\text{g/ml}$ soluble vWf, and 37°C .

- rGPIa/IIa-Ib α -liposomes with exofacial densities of rGPIa/IIa and rGPIb α at 2.17×10^3 and 1.00×10^4 molecules/particle, respectively.
- rGPIa/IIa-liposomes with exofacial density of rGPIa/IIa at 2.21×10^3 molecules/particle.
- rGPIb α -liposomes with exofacial density of rGPIb α at 1.16×10^4 molecules/particle.
- Control liposomes.

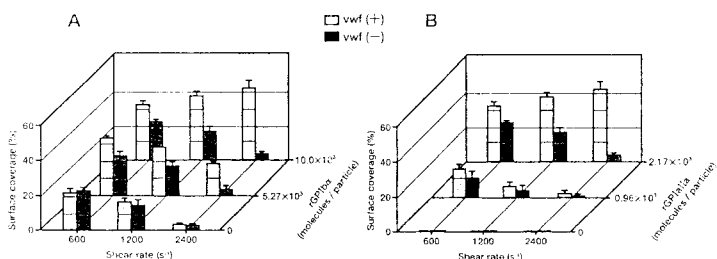


Figure 4. Percentages of surface coverage of rGPIa/IIa-Ib α -liposomes on the collagen surface. Dependence on shear rate, densities of rGPIa/IIa and rGPIb α , and vWf. Values are the mean $\pm$ standard deviation, $n=6$.

- Percentages of surface coverage of rGPIa/IIa-Ib α -liposomes with different exofacial densities of rGPIb α , as indicated. The exofacial density of rGPIa/IIa was kept constant at $2.19 \pm 0.02 \times 10^3$ molecules/particle.
- Percentages of surface coverage of rGPIa/IIa-Ib α -liposomes with different exofacial density of rGPIa/IIa, as indicated. The exofacial density of rGPIb α was kept constant at $1.08 \pm 0.08 \times 10^4$ molecules/particle. The percentages of surface coverage of rGPIb α -liposomes on the collagen surface in the presence and absence of soluble vWf (front row) were $0.07 \pm 0.02\%$ at all shear rates tested.

4. rGPIa/IIa-Ib α -liposomesのコラーゲン表面への粘着に対する抗GPIb α 抗体及び、抗GPIa抗体の粘着阻害効果⁸⁾

抗体の阻害効果は、抗体が存在しないときのrGPIa/IIa-Ib α -liposomesのコラーゲン表面への粘着におけるsurface coverageに対する、抗体が存在するときのsurface coverageの割合 (rela-

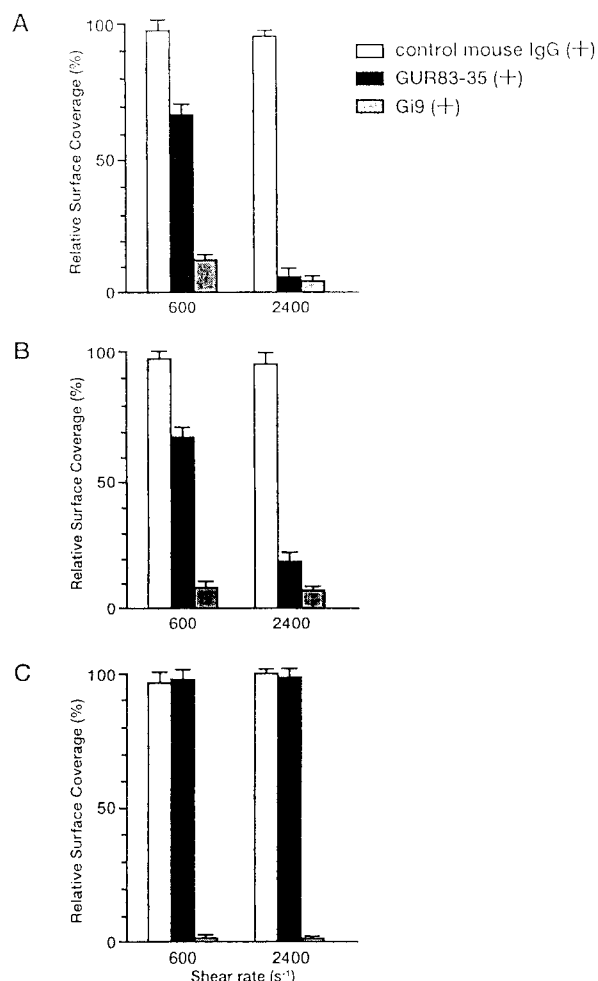


Figure 5. Inhibitory effect of GUR83-35 or Gi9 on the adhesion of rGPIa/IIa-Ib α -liposomes to the collagen surface under flow conditions.

Relative surface coverage of rGPIa/IIa-Ib α -liposomes with different densities of rGPIa/IIa and rGPIb α , in the presence of specific antibody and $10 \mu\text{g/ml}$ soluble vWf, were shown. Values are the mean $\pm$ standard deviation, $n=6$.

- rGPIa/IIa-Ib α -liposomes with exofacial densities of rGPIa/IIa and rGPIb α at 2.17×10^3 and 1.00×10^4 molecules/particle, respectively.
- rGPIa/IIa-Ib α -liposomes with exofacial densities of rGPIa/IIa and rGPIb α at 2.19×10^3 and 5.27×10^3 molecules/particle, respectively.
- rGPIa/IIa-liposomes with an exofacial density of rGPIa/IIa at 2.22×10^3 molecules/particle.

tive surface coverage) として示した (図5)。

rGPIb α -vWf相互作用を抗GPIb α 抗体 (GUR83-35) で阻害すると、リポソームは非可逆的にコラーゲン表面に粘着するが、relative surface coverageは、ずり速度が高いほど小さく、rGPIa/IIa-liposomesに対しては、阻害効果を示さなかった。抗GPIa抗

体 (Gi9) で rGPIa/IIa-collagen 相互作用を阻害すると、コラーゲン表面でのリポソームの流動方向への移動が観察され、Gi9 による rGPIa/IIa-collagen 相互作用の阻害効果は、常に GUR83-35 の阻害効果より大きく、特に、低ずり条件下でその違いが大きかった。以上の結果からも、rGPIa/IIa-Ib α -liposomes コラーゲン表面への粘着では、rGPIa/IIa-collagen 相互作用と rGPIb α -vWf 相互作用の両方が必要であり、特に高ずり条件下では、この両方が相乗的に働いていることが明らかである。

5. コラーゲン表面における rGPIa/IIa-Ib α -liposomes と血小板との相互作用⁹⁾

流動状態で、ローダミンで蛍光ラベルした rGPIa/IIa-Ib α -liposomes ($4.0 \times 10^5 / \mu\text{l}$) と、メパクリンで蛍光ラベルした血小板 ($1.0 \times 10^5 / \mu\text{l}$) の混合液をコラーゲン表面に灌流し、それぞれのコラーゲン表面への粘着を測定した。図 6 に示したように、ずり速度が高くなるにしたがってリポソームも血小板も効率よく粘着した。rGPIa/IIa-Ib α -liposomes のコラーゲン表面への粘着は、GPIIb/IIIa と vWf の arginine-glycine-aspartic acid-serine (RGDS) アミノ酸配列との相互作用を阻害する RGD-peptide または、adenylate cyclase を活性化し、細胞内の cyclic AMP レ

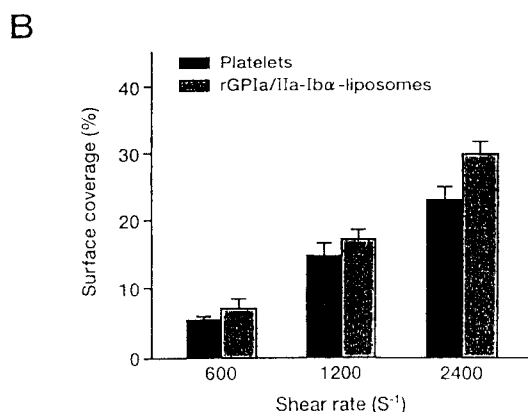
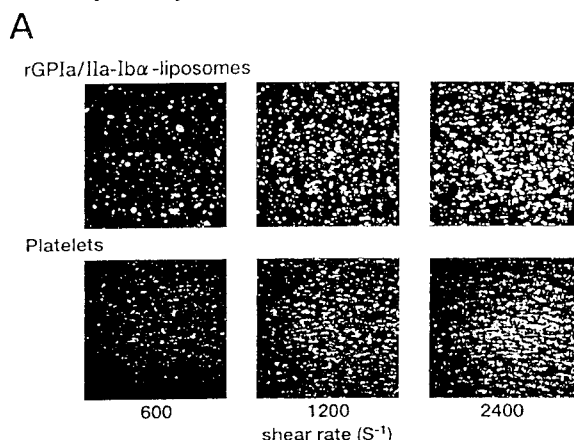


Figure 6. Interaction of rGPIa/IIa-Ib α -liposomes with platelets on the collagen surface.

Images were obtained after 3 min perfusion of a mixture of liposomes ($4.0 \times 10^5 / \mu\text{l}$) and platelet ($1.0 \times 10^5 / \mu\text{l}$) on the collagen surface at a hematocrit of 37.5%, soluble vWf concentration of $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, 2 mM Mg^{2+} , 37°C , and various shear rates as indicated. Exofacial concentration of rGPIa/IIa and rGPIb α was 1.0 and $0.7 \mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. Values are the mean $\pm$ standard deviation, $n=6$.

ベルを高め、細胞内 Ca^{2+} 濃度を下げることにより、GPIIb/IIIa の活性化を抑制する prostaglandin E1 (PGE) によって阻害されたが、arginine-glycine-glutamic acid を持つペプチド (RGE-peptide) では阻害されなかった (図 7)。これらの結果から、vWf を介した活性化 GPIIb/IIIa と rGPIb α との相互作用により、コラーゲン表面上で rGPIa/IIa-Ib α -liposomes は血小板と凝集しているものと考えられる。また、活性化血小板表面の vWf と rGPIb α が相互作用している可能性もある。

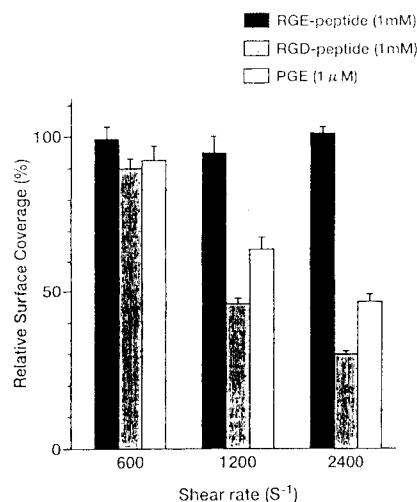


Figure 7. Inhibition of the interaction of rGPIa/IIa-Ib α -liposomes with platelets on the collagen surface.

Experimental conditions were the same as described for Figure 6. Inhibition studies were performed in the presence of the RGD-peptide (1 mM), RGE-peptide (1 mM), or PGE ($1 \mu\text{M}$).

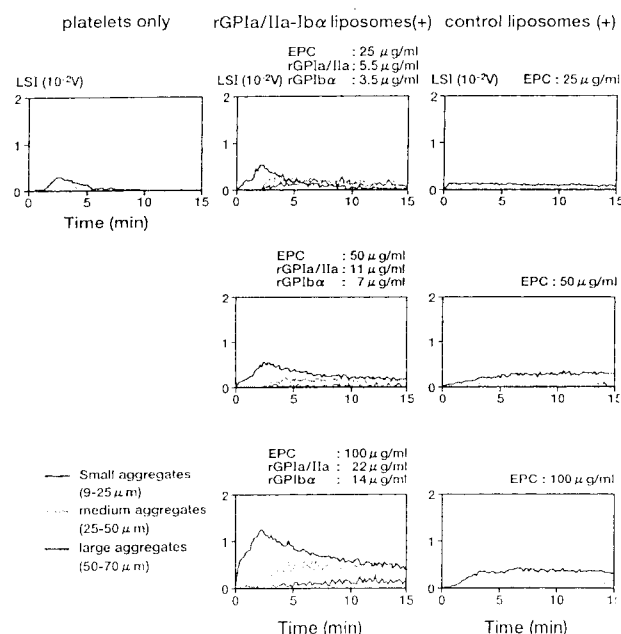


Figure 8. Enhancement of platelet aggregation by rGPIa/IIa-Ib α -liposomes assessed by changes in light scattering intensity.

PRP at $1 \times 10^4 / \mu\text{l}$ platelets was mixed with various concentrations of rGPIa/IIa-Ib α -liposomes, and $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ of collagen was then added to the mixture.

EPC: egg phosphatidyl choline

6. rGPIa/IIa-Ib α -liposomesによる血小板凝集生成の増強⁹⁾

Platelet rich plasma (PRP, $1 \times 10^4/\mu\text{l}$)に種々の濃度の rGPIa/IIa-Ib α -liposomesを加え、10 $\mu\text{g/ml}$ のコラーゲンで血小板を活性化すると、rGPIa/IIa-Ib α -liposomesは用量依存的に血小板凝集の生成を増強した(図8)。同量のリン脂質を持つ control liposomesは、血小板凝集の生成を増強しなかった。これらの結果は、均一系においても、血小板と rGPIa/IIa-Ib α -liposomes が相互作用し、リポソームが血小板凝集塊に巻き込まれていることを示している。

7. 結び

これまで述べてきたように、血小板の多岐にわたる機能のなかで、止血に最低限必要な、最も基本的かつ重要な機能である粘着と凝集をin vitroで人工的に再構築することができた。今後、ここに示したリポソームの止血効果を in vivoで評価するためには、まず、リポソームのサイズ、膜を構成している脂質成分などを十分に検討し、血中滞在時間の長いリポソームを創ることが必要であろう。さらに、rGPIa/IIaやrGPIb α と同等の機能を持つ、より小さなペプチドの開発も重要であろう。

参考文献

1. Nishiya T, Murata M, Handa M, Ikeda Y. Adhesion of liposomes carrying recombinant fragment of platelet glycoprotein Ib α or anti-collagen antibody to collagen surface under flow conditions. *Blood* 1998;92:346a, (abstr. Suppl).
2. 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;270:755-760.
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;1:6-12.
4. Nishiya T, Kainou M, 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).
5. Nishiya T, Kainou M, Murata M, Handa M, Ikeda Y. Adhesive properties of liposomes carrying both recombinant GPIIb/IIIa and GPIb α under flow conditions. Specific synergy of receptor-ligand interactions. *Blood* 2000;96:622a (abstr. Suppl).
6. 西谷孝子, 池田康夫. 血小板代替物. *血液, 腫瘍科* 2000; 1: 47-54.
7. 西谷孝子. 人工血小板 (血小板代替物). *血液, 免疫, 腫瘍* 2001;1:41-45.
8. Nishiya T, Kainou M, Murata M, Handa M, Ikeda Y. Reconstitution of adhesive properties of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ib α under flow conditions. Specific synergy of receptor-ligand interactions. *Blood* 2002 in press.
9. Nishiya T, Kainou M, Murata M, Handa M, Ikeda Y. Platelet interactions with liposomes carrying recombinant platelet membrane glycoproteins or fibrinogen. Approach to platelet substitutes. *Art Cells Blood Subs Immob Biotech* 2001;29:453-464.

献血血液の核酸増幅検査 (NAT) によるウイルススクリーニング

Virus screening by nucleic acid amplification testing (NAT) for donated blood

佐藤 進一郎¹⁾, 池田 久實²⁾
Shinichiro Sato, Hisami Ikeda

和文抄録

ウイルスに感染した献血者のウインドウ期 (検査により検出できない病原体感染初期) による輸血感染リスクを減少させる有効な方法として核酸増幅検査 (NAT) がある。1999年10月以降、日本赤十字社では献血血液の全国的なNATスクリーニングを、B型肝炎ウイルス (HBV)、C型肝炎ウイルス (HCV)、ヒト免疫不全ウイルス-1 (HIV-1) の同時検出が可能なマルチプレックスアッセイシステムを用いて実施している。NATの実施により血清学検査のウインドウ期と考えられるNAT陽性血液が排除できるようになり、輸血用血液製剤の安全性は明らかに向上した。本稿では、感染初期におけるウイルス血症及びセロコンバージョン、ウインドウ期血液の感染性、HBV、HCV、HIV-1に対するNATスクリーニングの現状について述べる。

Abstract

Nucleic acid amplification testing (NAT) is an effective method for reducing the risk of transfusion-transmitted viral infection from donors in window period. Since October 1999, nationwide NAT for donor screening has been performed by an automated multiplex assay system for simultaneous detection of hepatitis B virus (HBV), hepatitis C virus (HCV), and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in Japanese Red Cross. Implementation of NAT eliminated NAT-positive blood in pre-seroconversion window period. Accordingly, the safety of blood supply has been obviously increased. In this review, we described the viremia and seroconversion during early infection. The infectivity of donated blood in window period, and present status of NAT screening for HBV, HCV and HIV-1.

Keywords

NAT, blood transfusion, HBV, HCV, HIV-1, window period

はじめに

わが国における輸血用血液の安全性は血液スクリーニング検査技術の進歩によって著しく向上した^{1,2)}。特に輸血感染症の防止に関しては、日本赤十字社が従来の血清学検査に加えて、1999年10月から全献血者を対象に核酸増幅検査 (nucleic acid amplification test, NAT) 技術を用いたB型肝炎ウイルス (HBV)、C型肝炎ウイルス (HCV)、ヒト免疫不全ウイルス-1 (HIV-1) のウイルススクリーニング検査を導入したことにより、これまで検出できなかった血清学検査のウインドウ期 (検査により検出できない病原体感染初期) のウイルス陽性血を排除できるようになった³⁾。本稿では輸血によって伝播するウイルス感染症のウイルス血症と感染マーカーの推移、ウインドウ期の考え方、NAT陽性血液の感染リスクを概説し、NATスクリーニングに

よる感染防止効果とその限界について述べる。

1. ウイルス感染症におけるウイルス血症

ウイルス感染経過中の潜伏期や血中ウイルス量 (viral load) はウイルスの種類や宿主の免疫状態によって異なるが、一般的に感染後のウイルス血症 (viremia) は、1) Pre-ramp-up viremia, 2) Ramp-up viremia, 3) Plateau phase/peak viremia, 4) Peri-seroconversion (SC) viremia, 5) Post-SC viremiaの経過をたどる⁴⁾ (Fig. 1)。

1) Pre-ramp-up viremia

ウイルスが生体の標的臓器または細胞に感染後、潜伏期を経てウイルス遺伝子の転写、複製、増殖が起こり、血液中に低レ

1) 北海道赤十字血液センター検査三課長, 〒063-0002 札幌市西区山手2-2, Japanese Red Cross Hokkaido Blood Center, Yamanote 2-2, Nishi-ku, Sapporo, 063-0002, Japan 2) 北海道赤十字血液センター所長
論文受付 2002年2月12日

ベルのウイルス血症が断続的に出現する時期がある。これをPre-ramp-up viremiaといい、後述するRamp-up viremiaの前段階である (Fig. 1)。Pre-ramp-up viremiaはHCV、HBV、HIV-1感染で観察されている⁴⁾。この時期は血中ウイルスRNA/DNAレベルが極めて低いため、個別検体を用いたNATにより、断続的な陽性反応が認められる。このような低ウイルス濃度の検体を、他の検体と一緒に数本から数百本単位でプールした検体 (ミニプール検体) では、ウイルスが希釈されてしまうために、NATでは検出が困難であると考えられる。なぜこのような血中ウイルスRNA/DNAレベルの断続的な変化が生じるのかは明らかでないが、免疫反応を含めた生体防御機構によるウイルスクリアランスが作用している可能性も考えられている⁴⁾。

2) Ramp-up viremia

Pre-ramp-up viremiaの後に、血中ウイルスRNA/DNAレベルが急速に増加する時期があり、これをRamp-up viremiaと呼んでいる (Fig. 1)。この時期のウイルス量はPlateau phase/peak viremiaまで、logスケールでほぼ直線的に増殖することから、その血中ウイルス量と増殖時間よりウイルスの倍加時間が求められる。したがって、倍加時間はウイルスの増殖速度の指標であり、NATスクリーニングにおけるウインドウ期の短縮効果を推定するために重要である⁴⁾。

3) Plateau phase/peak viremia

HCV感染ではRamp-up viremia後、血中HCV RNA量がプラトーに達し、seroconversion (HCV抗体の陽転化) が起こるまでの間、長期間に亘り高力価の血中HCV RNA量 (10^5 – 10^7 genome equivalent (geq)/mL) が持続する^{4,5)}。この時期をPlateau phaseと呼んでいる (Fig. 1)。HCVの倍加時間は平均14.9時間と短いため、Ramp-up viremia後、急速に血中HCV RNA量がPlateau phaseに達する (Fig. 2)⁶⁾。したがって、この時期はミニプール検体を用いたNATスクリーニングによる検出効果が十分期待できる。

一方、HIV-1とHBV感染ではRamp-up viremia後、HCV感染のようなPlateau phase viremiaは認められず、一過性のpeak viremiaを示す (Fig. 3, 4)。この時の血中HIV-1 RNA量は 10^2 – 10^7 geq/mL及びHBV DNA量は 10^2 – 10^4 geq/mL程度に至ると報告されている^{4,5)}。その後、ウイルス量は免疫反応やウイルスクリアランス作用によって速やかに減少する。したがって、peak viremiaでは血中HIV-1 RNA量及びHBV DNA量が最も高くなることから、ミニプール検体を用いたNATスクリーニングによる検出効果が期待できる。また、HIV-1の倍加時間は平均21.5時間と短いため、Ramp-up viremia後、急速に血中HIV-1 RNA量が上昇してpeak viremiaに達するが (Fig. 4)、HBVの倍加時間は平均2.6日と長いため、Ramp-up viremia後、比較的ゆっくりと血中HBV DNA量がpeak viremiaに達する (Fig. 3)⁵⁾。これらの成績はNATスクリーニングの検出効果について、倍加時間が短く (増殖速度が速く) 血中ウイルス量が高くなるウイルスは、プールサイズによる希釈の影響を受けにくい、倍加時間が長く (増殖速度が遅く) 血中ウイルス量の低いウイルス

ほどプールサイズによる希釈の影響を受けやすいことを示唆している。

4) Peri-seroconversion (SC) viremia

Plateau phase/peak viremiaの後、seroconversion (SC) が起こり、細胞性免疫や体液性免疫反応によってウイルス産生が減少し、感染が一過性に終息して血中ウイルスがクリアランスされる例やウイルスが完全にクリアされずキャリア化する例がある。このSCが起こっている間に血中ウイルスRNA/DNAが陽性を示す時期をPeri-SC viremiaと呼んでいる⁴⁾。幾つかの症例では、この期間にPre-ramp-up viremiaと同様の断続的な陽性反応を示す場合がある⁴⁾。

5) Post-SC viremia

Peri-SC viremiaの後、ウイルス持続感染者となる場合があり、この時期をPost-SC viremiaと呼んでいる⁴⁾。成人のHBV感染者の約5%⁷⁾、HCV感染者の約85%⁷⁾、HIV-1感染者の大部分 (89.5%)⁸⁾はキャリア化し、ウイルス持続陽性者となることが知られている。一方、HBV感染者の大部分及びHCV感染の20–30%は、自然に治癒して血中からウイルスが排除される。

2. ウインドウ期の考え方

ウインドウ期はウイルス感染から個別検体を用いたNATで検出されるようになるまでの期間 (Phase-1) と個別検体を用いたNAT陽性から血清学検査が陽性になるまでの期間 (Phase-2) に大別して考えることができる⁹⁾ (Fig. 1)。Phase-1はNATのウインドウ期であり、Phase-1+2は血清学検査のウインドウ期ということになる。

前述したウイルス感染による各ウイルス血症の時期をこのウインドウ期の分類に当てはめると、Pre-ramp-up viremiaはPhase-1とPhase-2の境界部分、Ramp-up viremia及びPlateau phase/peak viremiaがPhase-2に相当する。これらのウイルス陽性血液を検出するために、NATスクリーニングが極めて有用ということになる。一方、Peri-SC viremia及びPost-SC viremiaについては、血清学検査で検出が可能な時期である。

現状では、NATスクリーニングを個別検体について実施することは、コストや技術的問題から困難であり、ミニプール検体を用いて実施せざるを得ない。しかし、ミニプール検体を用いるということは、NATスクリーニングの検出感度を低下させてしまうことになる。したがって、NATスクリーニングによるウインドウ期の短縮効果は、NATの検出感度と検体のプールサイズの組合せによって決まることになる。

3. NAT陽性血液の感染リスク

Pre-ramp-up viremiaの血液による感染性について詳細な報告はないが、NATのウインドウ期感染例がHBV¹⁰⁾、HCV¹¹⁾で報告されており、これらの感染例がNATの検出感度未満のPre-ramp-up viremiaであった可能性が考えられる。しかし、ウインドウ期のPhase-1による感染の可能性も考えられることから、今後このような血液の感染性については、動物モデルなどを用

いた感染実験が必要である。また、Table 1 に日本赤十字社中央血液センターの医薬情報部が報告した、1999年のわが国における輸血感染症例をまとめて示した¹²⁾。これらは輸血用血液の保管検体にウイルス核酸が検出され、患者もそのウイルス感染マ

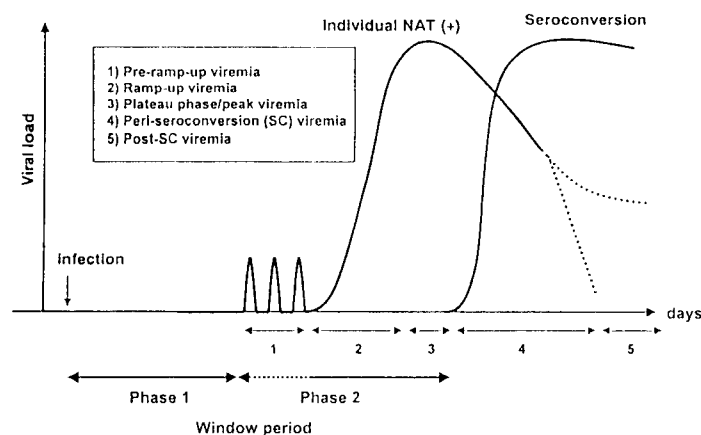


Fig. 1 Viremia and seroconversion during early infection

カーが輸血後に陽性を示した症例である。その内訳はHBV感染が20例、HCV感染が5例、HIV-1感染が2例であった。これらの原因血液はNATスクリーニングがまだ実施されていなかった時期の血清学検査陰性のNAT陽性血液であり、その大部分はRamp-up viremiaまたはPlateau phase/peak viremiaに相当すると思われる。

一方、著者らは過去に血清学検査陰性のHBV DNA陽性血液が輸血された患者9例の週及調査を行い、HBV感染例を2例経

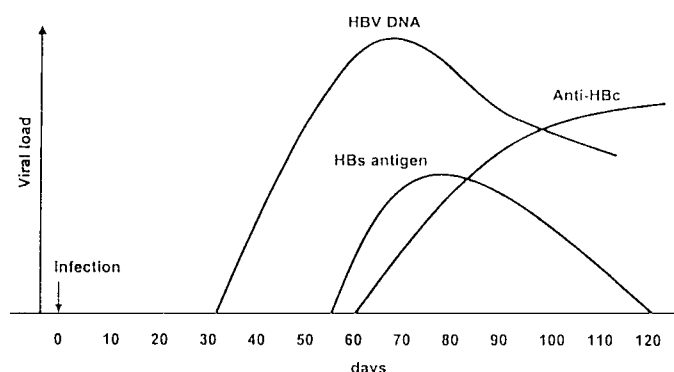


Fig. 3 Hepatitis B virus (HBV) markers during early infection

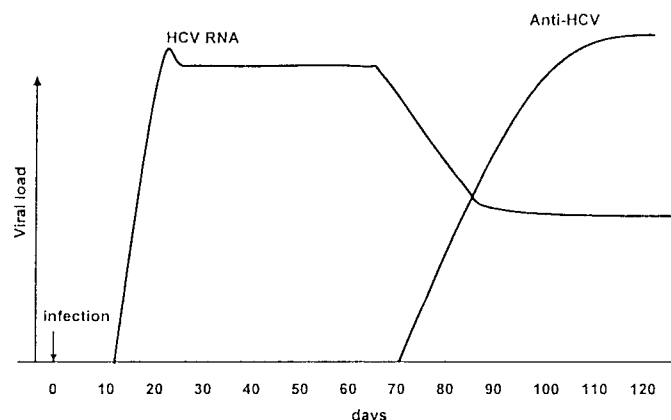


Fig. 2 Hepatitis C virus (HCV) markers during early infection

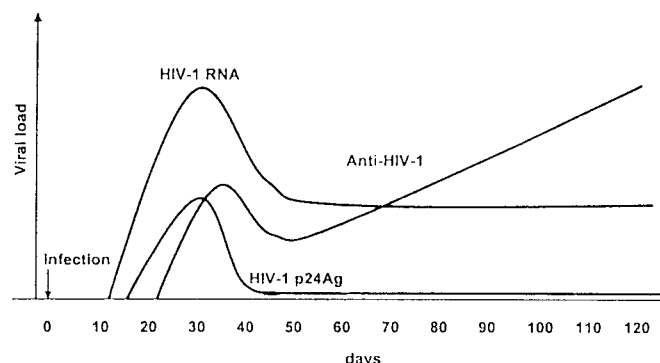


Fig. 4 Human Immunodeficiency virus-1 (HIV-1) markers during early infection

Table 1 Case reports of HBV, HCV, and HIV-1 transmission by donated blood negative in serological tests but positive in NAT during 1999

Virus transmission	No.	Age generation	Sex	Disease	Pre-transfusion	Post-transfusion (weeks)	Progress (weeks after transfusion)
HBV	1	60	M	Hepatoma	HBsAg(-)	HBsAg(+) (16.1)	HBsAg(+), anti-HBs(-) (17.1)
	2	10	F	Acute lymphoblastic leukemia	HBsAg(-), anti-HBs(-)	HBsAg(+) (39.4)	HBV DNA(+), HBsAg(+), anti-HBs(-) (69.0)
	3	70	M	Gastric carcinoma, etc	HBsAg(-)	HBsAg(+) (23.9)	HBV DNA(-), HBsAg(-), anti-HBs(+) (75.0)
	4	50	M	Intrahepatic stone	HBsAg(-)	HBsAg(+) (26.3)	HBsAg(+), anti-HBs(-) (37.6)
	5	40	M	Facial rhabdomyosarcoma	HBsAg(-)	HBsAg(+) (15.9)	HBV DNA(+), HBsAg(+), anti-HBs(-) (21.9)
	6	70	M	Acute abdomen, sepsis	HBsAg(-), anti-HBs(-)	HBsAg(+) (23.9)	HBV DNA(-), HBsAg(-), anti-HBs(-) (83.3)
	7	40	F	Hepatoma, HCV carrier	HBsAg(-)	HBsAg(+) (9.1)	HBV DNA(+) (30.4)
	8	60	F	Rheumatoid arthritis	HBsAg(-), HBV DNA(-)	HBsAg(+) (9.0)	HBsAg(-), anti-HBs(+) (19.7)
	9	40	M	Acute myeloid leukemia	HBsAg(-)	HBV DNA(+) (21.7)	HBV DNA(+), HBsAg(+), anti-HBs(-) (37.9)
	10	80	M	Hemorrhagic gastric ulcer	HBsAg(-)	HBV DNA(+) (12.0)	HBV DNA(+), HBsAg(+), anti-HBs(-) (17.3)
	11	80	M	Bile duct stone	unknown	HBV DNA(+) (11.3)	HBV DNA(+), HBsAg(-), anti-HBs(-) (11.3)
	12	70	F	Bladder tumor	HBsAg(-)	HBV DNA(+) (6.7)	HBsAg(-), anti-HBs(+) (23.9)
	13	60	M	Dissecting aneurysm of aorta	unknown	HBsAg(+) (6.0)	HBV DNA(+), HBsAg(+), anti-HBs(-) (9.1)
	14	70	F	Hemorrhagic gastric ulcer	HBsAg(-)	HBV DNA(+) (5.9)	HBV DNA(+), HBsAg(+), anti-HBs(-) (51.7)
	15	40	F	Acute myeloid leukemia	HBsAg(-)	HBsAg(+) (10.0)	HBV DNA(+), HBsAg(+), anti-HBs(-) (13.0)
	16	70	M	Hemorrhagic duodenal ulcer	HBsAg(-), HBV DNA(-)	HBV DNA(+) (6.0)	HBsAg(-), anti-HBs(+) (34.3)
	17	60	F	Myelodysplastic syndrome	HBV DNA(-)	HBV DNA(+) (17.3)	HBsAg(+), anti-HBs(-) (36.6)
	18	40	M	Myelodysplastic syndrome	HBsAg(-)	HBsAg(+) (9.1)	HBV DNA(+), HBsAg(+), anti-HBs(-) (27.4)
	19	60	F	Hepatic chirrhosis	HBsAg(-)	HBsAg(+) (11.0)	HBsAg(+) (12.3)
	20	10	M	Brain tumor	HBsAg(-), HBV DNA(-)	HBV DNA(+) (32.7)	HBV DNA(-), HBsAg(-), anti-HBs(-) (70.7)
HCV	1	40	M	Multiple myeloma	unknown	HCV RNA(+) (12.6)	HCV RNA(+), anti-HCV(+) (16.7)
	2	70	M	Lung carcinoma	HCV RNA(-)	HCV RNA(+) (10.6)	HCV RNA(+), anti-HCV(+) (43.1)
	3	30	F	Aplastic anemia	HCV RNA(-)	HCV RNA(+) (5.7)	HCV RNA(+), anti-HCV(-) (8.0)
	4	40	M	Gastric ulcer	unknown	Anti-HCV(+) (8.1)	HCV RNA(-), anti-HCV(+) [IFN treatment] (20.4)
	5	60	M	Multiple myeloma	unknown	HCV RNA(+) (11.4)	HCV RNA(+), anti-HCV(-) (11.4)
HIV-1	1	50	M	Thoracic aortic aneurysm	anti-HIV-1(-)	HIV-1 RNA(+) (2.6)	HIV-1 RNA(+), anti-HIV-1(+) (2.6)
	2	70	M	Gastric carcinoma	anti-HIV-1(-)	HIV-1 RNA(+) (8.7)	HIV-1 RNA(+), anti-HIV-1(+) (8.7)

験している。その原因血液のHBV DNA濃度は230,000 copies/mLと2,500 copies/mLであり、それらの塩基配列が患者由来のウイルスのそれと同一であることが確認された症例であった¹³⁾。これらの原因血液もRamp-up viremiaまたはPlateau phase/peak viremiaに相当すると考えられる。

したがって、これらのウインドウ期血液による輸血感染リスクは高いといえる。ただし、NAT陽性血が輸血された場合、患者に感染が成立するか否かは、ウイルス側と患者側の種々の要因が複雑に関与しているものと考えている¹³⁾。

4. ウイルス感染初期における感染マーカーの推移と検査法による推定ウインドウ期間

HBV, HCV, HIV-1の典型的な感染マーカーの推移をFig. 2～4に、検査法による推定ウインドウ期をTable 2に示した^{4,5)}。HBVは感染後56日目にEIA法によるHBs抗原検査が陽性を示すようになるが、個別検体を用いたNATではそのウインドウ期を23日間短縮できる (Fig. 3, Table 2)。HCVは感染後70日目にEIA法によるHCV抗体検査が陽性を示すようになるが、個別検体を用いたNATではそのウインドウ期を58日間短縮できる (Fig. 2, Table 2)。HIV-1は感染後22日目にEIA法によるHIV-1抗体検査が陽性を示すようになるが、個別検体を用いたNATではそのウインドウ期を11日間短縮できる (Fig. 4, Table 2)。HIV p24抗原検査では抗体検査のウインドウ期を6日間短縮できるが、NATに比べ短縮効果は少ない。ここに示した数字はあくまでも平均的な推定値であり、宿主の免疫状態や抵抗力等によって個人差がある。

Table 2 Window period of HBV, HCV and HIV-1 seroscreening during early infection

Virus	Viral marker	Method	Window period (days)	Window period reduction (days) NAT vs serological markers
HBV	HBsAg	EIA	56	23
	HBsAg	RPHA	76	43
	HBsAg	CLIA	49	16
	HBV DNA	NAT	33	---
HCV	anti-HCV	EIA3.0, 2.0	70	58
	anti-HCV	PHA, PA	70	58
	HCV RNA	NAT	12	---
HIV-1	anti-HIV-1	EIA	22	11
	anti-HIV-1	PA	22	11
	HIV-1 p24Ag	EIA	16	5
	HIV-1 RNA	NAT	11	---

5. 輸血用血液のNATスクリーニング

1) NATスクリーニング導入の変遷

現在、日本赤十字社は全国3ヶ所（千歳市、東京都、福岡市）にNAT検査センターを設置して検査担当エリアを分担し、全国の血液センターから航空便や陸路輸送等で搬送された検査用検体を24時間無休体制で輸血用血液のNATスクリーニングを実施している^{14,15)}。NAT検査センターに検査用検体が到着するのは夜間であるため、夜を徹して検体のプーリング作業、NATスクリーニング、検査結果の処理等が行われ、翌日の朝にはコンピュータシステムによって検査結果が全国の血液センターに報告されるという体制が取られている¹⁵⁾。

日本赤十字社におけるNATスクリーニングは、ロッシュ社のHBV, HCV, HIV-1の3ウイルスを同時に検査できる試薬を用いて、1999年7月1日より500プール検体で東京地区から開始さ

れ、同年10月10日から全献血者を対象に実施された¹⁶⁾。翌年の2000年2月1日からはプールサイズが500検体から50検体に変更され、同年7月からは血小板製剤を含むすべての輸血用血液がNATスクリーニング陰性として供給されている¹⁶⁾。また、同様に分画用原料血漿にもNATスクリーニング陰性のものが使用されている。

2) NATスクリーニング検査法

NATスクリーニング用検体は、血清学検査陰性検体を対象に、アロカの自動化システムを用いて50検体のプーリングが行われる³⁾。NATスクリーニングはそのプール検体を用いて、ロッシュ社が開発した自動化AMPLINAT MPX HBV/HCV/HIV-1システム (AMPLINAT MPX)で行われている¹⁷⁾。ウイルスRNA/DNAの抽出は自動核酸抽出装置GT-Xを使用し、ウイルス核酸の増幅・検出にはreal-time PCR技術であるTaqMan PCR assayが用いられている¹⁷⁾。

3) NATスクリーニングの検出感度

NATスクリーニングの検出感度はサンプル中に存在するウイルス量によって影響を受ける。もう少し具体的に述べると、検査をn回実施した時に全て陽性になるウイルス量、全て陰性になるウイルス量、あるいは陽性が陰性が定まらないウイルス量の領域が存在する。検出感度はn回実施した時の陽性回数であらわす。通常、検出率95% (95% hit rate) が用いられる。したがって、実際は検出感度 (95% hit rate) 未満のコピー数の検体でも、数～数十%の確率で陽性反応を示す場合がある (NATの検出限界)。これはNATスクリーニングを実施する場合、プラスの効果として作用するが、検出感度未満のウイルス量の検体は常に検出できるわけではないので、スクリーニング検査や血漿分画製剤のプロセスバリデーションでは、95% hit rateを検出感度としてその有効性を評価すべきである。現在、日本赤十字社が用いているAMPLINAT MPXの個別検体における検出感度は、HBVが30 (95% confidence interval, CI: 22-60) copies/mL, HCVは77 (95% CI: 61-112) IU/mL, HIV-1は42 (95% CI: 33-66) copies/mLと報告されている¹⁷⁾。したがって、50プール検体を用いたNATスクリーニングの検出感度 (95% hit rate) はその50分の1ということになる。

3) NATスクリーニングによるウイルス感染防止効果

NATスクリーニングで検出されたウイルス核酸陽性数はTable 3の通りである。1999年7月1日～2001年10月15日までの期間に、合計11,488,868の献血検体におけるNATスクリーニングを実施したところ、HBV DNA陽性が200例、HCV RNA陽性は41例、HIV-1 RNA陽性は4例検出された¹⁶⁾。NAT陽性例の大部分はウインドウ期の感染例であったが、HBVについては一部HBV precore mutantsも検出されている^{3,18)}。いままでのところ、プールサイズを500本から50本に縮小したことにより、HBV NATの陽性率は約2倍上昇し、HCV NATのそれに明らかな変化がないという結果 (Table 3) である¹⁶⁾。この結果は、HCVでは増殖速度が速く (倍加時間が短く) 高力価のウイルス血症が持続するのでプールサイズの違いによる希釈の影響を受けにくく

NAT検出数に差が生じないが、HBVは増殖速度が遅く（倍加時間が長く）血中ウイルス量も低いのでプールサイズの違いによる希釈の影響を受けやすく検出数に差が生じるという前述の成績を支持するものである。いずれにしても、この結果よりNATスクリーニング導入によるウイルス核酸陽性例の検出効果は明らかであり、輸血用血液からこれら多くのウィンドウ期感染リスクを排除することができたことは感染防止対策として極めて意義があったといえる。

Table 3 NAT-positive donors in Japan

Virus	NAT-positive n	Frequency per 100,000 donation	
		500-pool	50-pool
HBV	200	0.89	1.94
HCV	41	0.37	0.35
HIV-1	4	0	0.04

During 1999.7.1 and 2000.1.31, 2,140,207 samples were tested by 500-pool NAT. During 2000.2.1 and 2001.10.15, 9,348,661 samples were tested by 50-pool NAT. The results showed that total of 11,488,868 samples were tested by NAT screening.

4) NATスクリーニングの限界と将来的展望

現在の50プール検体を用いたNATスクリーニングにもウィンドウ期が存在していることや、NATスクリーニングが実施されていない輸血伝播感染症に対しては、未だ輸血による病原体感染リスク（細菌汚染、寄生虫等）が存在している¹⁹⁾。したがって、将来的には個別検体を用いたNATスクリーニングの導入について検討されることが考えられるが、当面はNATスクリーニングと血清学検査の併用による感染防止対策が継続されるであろう。近年の遺伝子領域研究の進歩により、次世代の輸血用血液の感染症スクリーニングは、DNAチップ等のマイクロアレイ技術を用いたものが取って代わる可能性が考えられる²⁰⁾。また、個別検体を用いたNATスクリーニングが導入されたとした場合、血清学検査の位置付けについては、今後議論されなければならない問題である。Post-SC viremiaでは血中ウイルス量が減少し、個別NATでも検出できない場合は、抗体検査によるスクリーニングの意義は相対的に高まる。もし、血清学検査を継続して行う必要があるということであれば、プロテインチップを用いた血清学検査の導入等も次世代の感染症スクリーニングとして考えられる²⁰⁾。

おわりに

輸血用血液のNATスクリーニングの導入により、多くのウイルス陽性血液が検出され、これらは輸血や分画原料血漿として使用される前に排除することができるようになった。これによって、従来の血清学検査だけでスクリーニングをしてきた当時と比べるとウイルス感染リスクは極めて低くなったといえる。しかしながら、それでも輸血感染症に対して100%安全性が確保できたというわけではない。同種血輸血が行われる限り、この問題を解決するための防止対策は永遠のテーマになるであろう。NATスクリーニングは現時点では最先端の安全対策と考えられるが、このような安全対策を講じても輸血後感染症が発生してしまった場合は、行政上の対応として被害者救済制度の設置が必要であり、早期の国家的政策の決定が待たれるところである。また、更なる感染防止対策として、血液製剤の病原体の不活化

や人工血液の使用が考えられることから、その研究開発の進展や早期の臨床応用が望まれる。

Reference

1. 関口定美. 輸血用血液製剤の感染予防限界. 血液事業 1998; 21:173-184.
2. 関口定美, 佐藤進一郎. 輸血後肝炎の現状とその予防. 臨床検査 1999;43:255-264.
3. Japanese red cross NAT screening research group. Nationwide nucleic acid amplification testing of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 for blood transfusion and follow-up study of nucleic acid amplification positive donors. Jpn. J. Infect. Dis 2000;53: 116-123.
4. Busch MP. Nucleic acid testing vs infectivity. EPFA, Lisbon Portugal, May, 2001.http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3760b1_06_busch/sld001.htm.
5. Committee report. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases. Transfusion 2000;40:143-159.
6. Busch MP. Insights into epidemiology, natural history and pathogenesis of hepatitis C virus infection from studies of infected donors and blood product recipients. Transfus Clin Biol 2001;8:200-206.
7. Technical manual committee. Infectious complication of blood transfusion. In: Vengelen-Tyler V, eds. Technical manual 13th ed. Bethesda. American association of blood banks. 1999;601-634.
8. Busch M. Transfusion-associated AIDS. In: Rossi EC, Simon TL, Moss GL, Gould SA, eds. Principles of transfusion medicine. 2nd ed. Baltimore. MD: Williams and Wilkins 1996;699-708.
9. 佐藤進一郎, 池田久實. 核酸増幅検査(NAT)とWindow period対策. 橋本保彦 編. ニューミレニアムの輸血療法. 考えよう, 輸血療法の必要性和安全性. 東京: 真興交易(株)医学出版部. 2001;60-71.
10. Magnius LO, Lunel F, Lapierre. Transmission of hepatitis B virus by HBV-negative blood transfusion. Lancet 1995;346: 964.
11. Schuttler CG, Caspari G, Jursch CA, Willems WR, Gerlich WH, Schaefer S. Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA. Lancet 2000;355:41-42.
12. 日本赤十字社中央血液センター医薬情報部. 輸血用血液の保管検体にウイルス核酸が検出された症例 -1999年-. 輸血情報 2001;107-165.
13. 佐藤進一郎, 伊原弘美, 酒谷真一, 長谷川秀弥, 山本定光, 加藤俊明, 池田久實. 血清学検査陰性のHBV DNA陽性血液を輸血された患者の遡及調査結果. 日輸血会誌 2001;47:395-402.

14. 伴野承計, ウイルスの核酸増幅検査と安全な血液, 第9回赤十字血液シンポジウム, 輸血医療の新たな展開[2000年からの転回], 日本赤十字社, 2001;101-110.
15. 室塚剛志, ウイルスの核酸増幅検査と安全な血液, 第9回赤十字血液シンポジウム, 輸血医療の新たな展開[2000年からの転回], 日本赤十字社, 2001;111-115.
16. 鴨慎一, 安全な血液のために -過去から現在-, 血液製剤調査機構だより, 2001;65:2-3.
17. Meng Q, Wong C, Rangachari A, Tamatsukuri S, Sasaki M, Fiss E, Cheng L, Ramankutty T, Clarke D, Yawata H, Sakakura Y, Hirose T, Imprim C. Automated multiplex assay system for simultaneous detection of hepatitis B virus DNA, hepatitis C virus RNA, and human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39:2937-2945.
18. Japanese red cross NAT screening research group: Ohnuma H, Tanaka T, Yoshikawa A, Murokawa H, Minegishi K, Yamanaka R, Yugi-Iizuka H, Miyamoto M, Satoh S, Nakahira S, Tomono T, Murozuka T, Takeda Y, Doi Y, Mine H, Yokoyama S, Hirose T, Nishioka K. The first large-scale nucleic acid amplification testing (NAT) of donated blood using multiplex reagent for simultaneous detection of HBV, HCV, and HIV-1 and Significance of NAT for HBV. *Microbiol. Immunol.* 2001;45:667-672.
19. 阿部英樹, 池田久實, 安全な血液供給の現状と将来, -血液製剤の安全対策の現状と将来展望-, 清水勝編, 臨床病理, (特集号), 2002;118:1-8.
20. Petrik J. Microarray technology: the future of blood testing? *Vox Sang.* 2001;80:1-11.

ヘモグロビン系人工酸素運搬体の血小板に及ぼす影響と 人工材料としての臨床応用の可能性

Effects of Hemoglobin Based Oxygen Carrier on Platelets: Implications for Coating Artificial Surfaces

藤井 聡¹⁾, 藤井ひとみ²⁾, 富樫廣子³⁾, 吉岡充弘³⁾, 仲井邦彦⁴⁾, 佐藤 洋⁴⁾, 佐久間一郎¹⁾, 劔物 修²⁾, 北畠 顕¹⁾
Satoshi Fujii¹⁾, Hitomi Fujii²⁾, Hiroko Togashi³⁾, Mitsuhiro Yoshioka³⁾, Kunihiko Nakai⁴⁾, Hiroshi Satoh⁴⁾,
Ichiro Sakuma¹⁾, Osamu Kenmotsu²⁾, Akira Kitabatake¹⁾

和文抄録

人工材料に抗血栓性を付加するためには、物理化学的処理を施す、生理活性物質を材料表面に結合させる、生体組織自身を利用するなどの方法がある。一酸化窒素 (NO) は血管拡張作用がある。我々はヘモグロビン (hemoglobin, Hb) のβ鎖のSH基をニトロソ化したSNO-Hbを作成し、血管収縮を抑制しながら酸素を運搬する物質を開発してきた。一方、NOは血小板凝集、粘着を抑制する。HbはNOを不活化する結果血小板凝集を増強する可能性がある。NO放出能を付加したHb修飾体(SNO-Hb)、分子バリアーとしての作用を持つポリエチレングリコール(PEG)を付加したHb修飾体(PEG-Hb)、その両方を付加したHb修飾体(SNO-PEG-Hb)について血小板活性化作用がより少ないかを検討した。また人工材料への応用の可能性を考慮して、ガラス板、コラーゲンをコーティングしたガラス板への血小板の粘着に対するHbとその修飾体の影響も検討した。Hb添加群で血小板活性化のマーカーであるP-セレクトリン発現が亢進した。SNO-Hb添加群でP-セレクトリン発現の上昇はHb添加群に比べ軽度であった。コラーゲンでコーティングしたガラス板に対する血小板の接着及び凝集を顕微鏡で観察するとHbは有意に血小板の接着及び凝集を抑制した。また、SNO-Hb、PEG-Hb、SNO-PEG-HbではHbよりもその効果が大きかった。修飾Hbの人工酸素運搬体としての特質は、血管内ステント、心臓外科手術における体外循環、人工血管のコーティング等に臨床応用出来る可能性も大きく将来性が期待できる。

Abstract

The effects of the modified human hemoglobins (Hb) on platelet activation were studied. The Hb derivatives were SNO-Hb, covalently modified by S-nitro oxide (NO), PEG-Hb, modified by polyethylene glycol (PEG), and SNO-PEG-Hb, modified by both NO and PEG. Platelet activation was assessed by cytometric analysis of GPIIb/IIIa activation and P-selectin expression after stimulation with Hb derivatives. Platelet adhesion and aggregation were measured in a parallel glass plate chamber or the chamber pre-coated with collagen and each chamber bound unmodified Hb, SNO-Hb, PEG-Hb or SNO-PEG-Hb on the surface. There was significantly less platelet binding of antibodies for GPIIb/IIIa and P-selectin with SNO-Hb, PEG-Hb and SNO-PEG-Hb compared with unmodified Hb. There was significantly less platelet attachment, adhesion, and aggregation on the SNO-Hb, PEG-Hb and SNO-PEG-Hb coated surfaces compared with unmodified Hb coated and uncoated surfaces. SNO-Hb, PEG-Hb and SNO-PEG-Hb induced less platelet adhesion and aggregation on thrombogenic surfaces compared with unmodified Hb. The inhibitory effect may be derived from antiadhesive properties of Hb, antiplatelet actions of NO, and molecular barrier action of PEG.

Keywords

platelet, thrombosis, nitric oxide, hemoglobin, artificial surface

1) 北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学, 札幌市北区北15条西7丁目, The Departments of Cardiovascular Medicine, Hokkaido University Graduate School of Medicine, N15 W7, Kitaku, Sapporo, Japan 2) 北海道大学大学院医学研究科侵襲制御医学, Anesthesiology 3) 北海道大学大学院医学研究科機能薬理学, Pharmacology 4) 東北大学大学院医学系研究科環境保健医学, The Department of Environmental Health Sciences, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

論文受付 2001年12月12日 受理 2002年3月12日

1. はじめに

血小板は代用臓器や人工臓器の人工材料表面と接触して刺激され粘着・凝集反応を起こす。血小板 β_3 インテグリンであるIIb/IIIaは活性化血小板において構造が変化し¹⁾、フィブリノゲン結合部位が発現し、その結果血小板同士が結合する。IIb/IIIaに対するモノクローナル抗体は急性冠症候群の血小板血栓の予防に有効である。これは血栓形成過程に細胞接着機構が極めて重要であることを示唆する。一方、細胞接着分子の一つであるP-セレクトインは血小板の α 顆粒や血管内皮細胞のWeibel-Palade小体の顆粒膜に存在する膜糖蛋白で、血小板がトロンビンや活性酸素の刺激により活性化されると速やかに細胞表面に発現し²⁾、白血球膜上のSialyl Lewis^x糖鎖をリガンドとして接着能を発揮する。従って、IIb/IIIaやP-セレクトインは血小板活性化のマーカーとしても使用されている³⁾。

一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は内皮で産生され、抗血栓作用を有し、血小板のguanylate cyclaseを活性化させ、細胞質内cGMP濃度を上昇させて血小板凝集、粘着を抑制する⁴⁾。血漿蛋白質は血管グラフトのコーティングに用いられる⁵⁾。しかしヘモグロビン (hemoglobin, Hb) はNOをその分子内に容易にトラップし不活化する結果、血小板の活性化を増強する可能性がある⁶⁾。HbにはNO放出能を付加でき⁷⁾、またポリエチレングリコール (polyethylene glycol, PEG) は分子バリアーを形成して人工材料に抗血栓性を付加できることが知られている⁸⁾。そこでNO放出能を付加したHb修飾体、PEGを付加したHb修飾体、その両方を付加したHb修飾体を作成した。本研究では血小板 β_3 インテグリンと細胞接着分子であるP-セレクトインに注目し、Hbが血小板活性化をもたらすか、また修飾されたHbは血小板活性化作用がより少ないかについて検討した。

2. 方法

2.1 S-ニトロソ化しポリエチレングリコール鎖を結合させたHbの作成

Hbとしてヒトまたはウシ赤血球よりHbを抽出して膜成分を除いたstroma free Hbを調製し、透析後実験に使用した⁹⁾。S-ニトロソ化しポリエチレングリコール鎖を結合させたHbの作成はNakaiらの方法^{7,9)}にて作成した。

2.2 採血

倫理面へ配慮のため研究の重要性を説明し、また静脈採血に伴う危険性も説明し理解を得て、インフォームドコンセントを得た後、健康人から静脈採血を行った。

2.3 フローサイトメトリーによる活性化血小板の検出

健康ヒト多血小板血漿 (platelet rich plasma, PRP, 100 μ l) をHb及びその修飾体 (0-0.5%) と20分間、22°Cでインキュベートした。活性化された血小板表面に発現されたP-セレクトインを、FITC蛍光標識した抗P-セレクトイン抗体 (CD62P) とフローサイトメトリーを用いて、直接的に活性化血小板として測定した³⁾。PAC-1はGPIIb/IIIaに対するモノクローナル抗体で、静止

状態のGPIIb/IIIaにはほとんど結合せず、活性化されたGPIIb/IIIaにのみ結合する。すなわち、構造変化を受けたGPIIb/IIIa上のフィブリノゲン結合部位を認識する。PAC-1もフローサイトメトリーを用いて活性化血小板として直接的に測定した¹⁰⁾。

2.4 人工材料への血小板の粘着・凝集

ガラス板、コラーゲンをコーティングしたガラス板への血小板の粘着・凝集に対するHbとその修飾体の影響も検討した¹¹⁾。ガラス板に対する血小板の粘着・凝集の測定には、ガラス板、及びコラーゲンでコーティングしたガラス板にHbまたはその修飾体を塗布、乾燥させた後、健康ヒトPRPを加えガラス板、及びコラーゲンでコーティングしたガラス板に対する血小板の粘着及び凝集を400倍で顕微鏡観察した。イメージはコンピュータに保存し、画像解析装置により定量評価した。

3. 結果

対照群に比較して、Hb添加群で血小板へのCD62PとPAC-1の結合が亢進した (図1, 図2)。SNO-Hb添加群、PEG-Hb添加群、SNO-PEG-Hb添加群ではCD62PとPAC-1の結合の上昇はHb添加群に比べ軽度であった。

ガラス板及びコラーゲンでコーティングしたガラス板に対する血小板の粘着についてみると、Hbは有意に血小板の粘着及び凝集を抑制した (図3, 図4)。また、SNO-Hb, PEG-Hb, SNO-PEG-HbではHbよりもその効果が大きかった。

4. 考察

Hb修飾体を人工赤血球として用いた場合、血栓形成素因、糖尿病、または有意な動脈狭窄が存在する可能性の高い高齢者の場合にはHbがもたらす血小板活性化は、脳梗塞や心筋梗塞を誘導する可能性が考えられる。酸素運搬体の適応は健康人のみならず種々の病態生理下で使用されることを念頭に置いて、副作用の少ない材料を開発する必要がある。SNO-Hbは血小板を活性化させずに、血管内腔側からNOで血管拡張させながら酸素を供給するので脳梗塞や心筋梗塞で局所的に治療に使える。

今回の検討では無修飾Hbは血小板の活性化を亢進させた (図1, 図2)。一方、血小板の粘着・凝集を抑制した (図3, 図4)。血小板の粘着・凝集の観察の比較対照がガラス板表面またはコラーゲンであり、ガラス板表面やコラーゲンが血小板にとっては非常に粘着性が高く、かつ活性化も引き起こしやすい物質であることを考慮すると、血小板の粘着・凝集における無修飾Hbの影響は、これら血栓原性の強い物質から、血小板を隔離したことの効果とも考えられる。対照として、血小板への影響がより少ない蛋白、たとえばアルブミンなどを用いていたら無修飾Hbは粘着・凝集を亢進させた可能性も考えられる。また、コラーゲンコートしたガラス板にHb修飾体を塗布した場合より、ガラス板に直接Hb修飾体を塗布したほうが血小板の粘着・凝集抑制がみられた原因については今後さらに検討する必要がある。

人工材料の血栓形成のメカニズムとして、血液との接触反応により瞬間的に材料表面への血漿蛋白の吸着が起こり、吸着蛋白の種類で、その後起こる血小板の粘着凝集の程度がきまる。材料の化学組成、表面組成、表面構造により血漿蛋白との吸着様式がきまる。Hb由来の陰性荷電はガラス板に陰性荷電を与えて血小板の吸着作用を弱めたと考えられる。PEG-Hbは長鎖PEGを有するという構造的特徴による物理的な血液成分の付着抑制作用がある。PEGは親水性でガラス板には吸着しにくく、PEG-Hbの疎水性のHb部分でガラス板に着いていたと思われ、HbとPEG-Hbではガラス板についたHbの量が異なった可能性がある。Hb自身にも血球成分の粘着を抑制する作用が報告されている¹²⁾。さらにNO放出能を付加したHb修飾体はNOの血小板に対する好

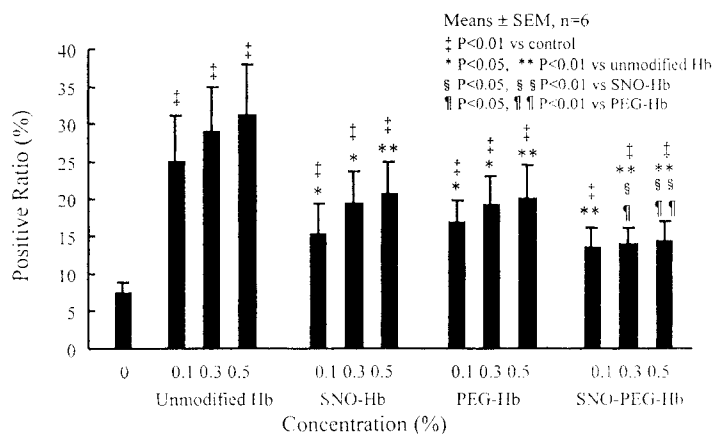


Figure 1
Effect of unmodified Hb, SNO-Hb, PEG-Hb and SNO-PEG-Hb solution on P-selectin expression. Results are means $\pm$ SEM. $\dagger$ p<0.01 compared to control, $*$ p<0.05, $**$ p<0.01 compared to unmodified Hb, $\S$ p<0.05, $\S\S$ p<0.01 compared to SNO-Hb, $\P$ p<0.05, $\P\P$ p<0.01 compared to PEG-Hb. The results are derived from 6 independently performed experiments.

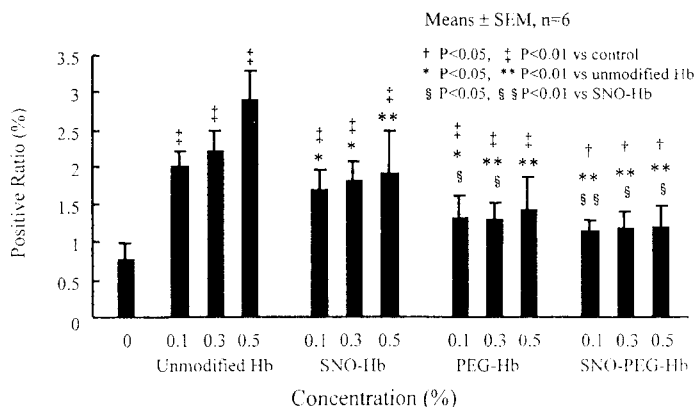


Figure 2
Effect of unmodified Hb, SNO-Hb, PEG-Hb and SNO-PEG-Hb on platelet GPIIb/IIIa activation. Y-axis means the binding of PAC-1, a monoclonal antibody, which recognizes an activation-dependent epitope of GPIIb/IIIa. Results are means $\pm$ SEM. $\dagger$ p<0.05, $\dagger\dagger$ p<0.01 compared to control, $*$ p<0.05, $**$ p<0.01 compared to unmodified Hb, $\S$ p<0.05, $\S\S$ p<0.01 compared to SNO-Hb. The results are derived from 6 independently performed experiments.

ましい抑制作用^{13,14)}により、分子バリアーとしての作用を持つPEGを付加したHb修飾体ではPEGの分子バリアー効果により無修飾Hbに比較して血小板に対する好ましくない作用が少ないと考えられる。更に、その両方を付加したHb修飾体は血小板活性化作用がより少ないと考えられた。また、ガラス板、コラーゲンをコーティングしたガラス板への血小板の接着に対する修飾Hbの影響も顕著であったことから、修飾Hbは血管拡張作用を持った人工酸素運搬体としての作用のみならず血管内ステント、心臓外科手術における体外循環サーキット、あるいは人工血管のコーティング等に臨床応用出来る可能性が大きいことが示された。

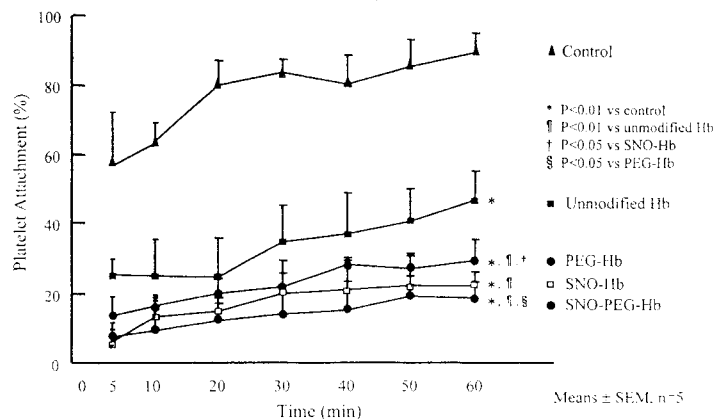


Figure 3
Percent platelet attachment on glass (control, ▲), unmodified Hb coated glass (■), SNO-Hb coated glass (□), PEG-Hb coated glass (●) and SNO-PEG-Hb coated glass (○) as a function of time of platelet exposure to the surface. Results are means $\pm$ SEM. $*$ p<0.01 compared to control, $\P$ p<0.01 compared to unmodified Hb, $\dagger$ p<0.05 compared to control, $\S$ p<0.05 compared to PEG-Hb. The results are derived from 5 independently performed experiments.

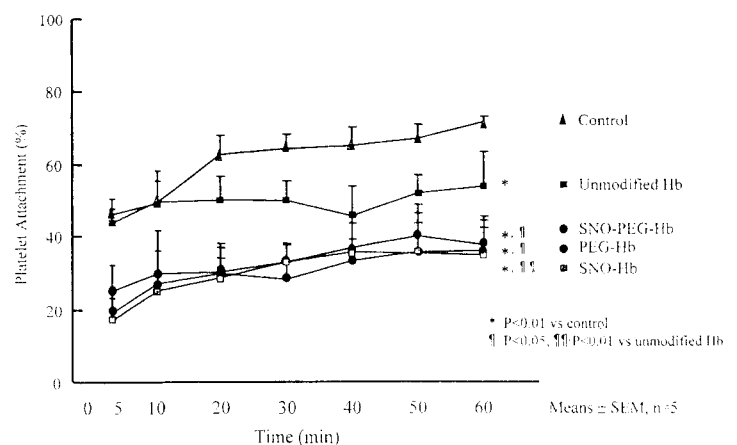


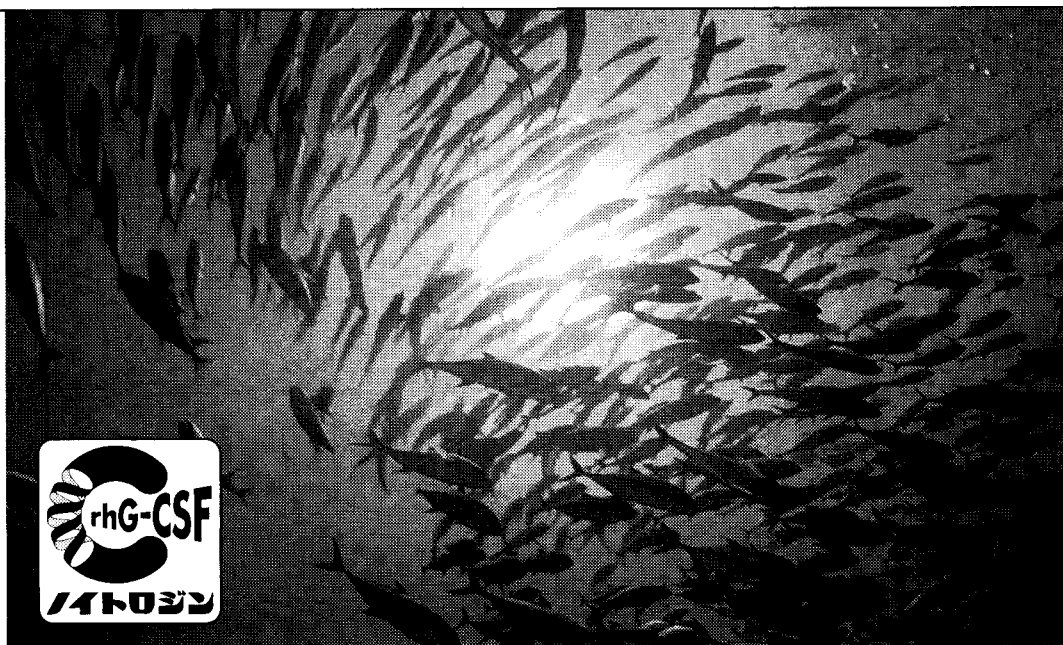
Figure 4
Percent platelet attachment to type I collagen (control, ▲), unmodified Hb coated collagen (■), SNO-Hb coated collagen (□), PEG-Hb coated collagen (●) and SNO-PEG-Hb coated collagen (○) as a function of time of platelet exposure to the surface. Results are means $\pm$ SEM. $*$ p<0.01 compared to control, $\P$ p<0.05 compared to unmodified Hb, $\dagger$ p<0.01 compared to control, $\S$ p<0.05 compared to unmodified Hb. The results are derived from 5 independently performed experiments.

5. まとめ

NOを付加したHb修飾体はNOの血小板凝集抑制作用により、PEGを付加したHb修飾体ではPEGの分子バリアー効果により、無修飾Hbに比べ血小板に対する好ましくない作用が少ないと考えられる。両方を付加したHb修飾体は血小板活性化作用がより少ない可能性があると考えられた。修飾Hbの人工酸素運搬体としての特質は、血管内ステント、心臓外科手術における体外循環、人工血管のコーティング等に臨床応用出来る可能性も大きく将来性が期待できる。

参考文献

1. Janes SL, Wilson DJ, Chronos N, Goodall AH. Evaluation of whole blood flow cytometric detection of platelet bound fibrinogen in normal subjects and patients with activated platelets. *Thromb Haemost* 1993;70:659-666.
2. McEver RP. GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *J Cell Biochem* 1991;45:156-161.
3. Knight CJ, Panesar M, Wright C, Clarke D, Butowski PS, Patel D, Patrinely A, Fox K, Goodall AH. Altered platelet function detected by flow cytometry. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2044-2053.
4. Myers PR, Minor RL, Guerra R Jr, Bates N, Harrison DG. Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resembles S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 1990;345:161-163.
5. Amiji M, Park H, Park K. Study on the prevention of surface induced platelet activation by albumin coating. *J Biomater Sci Polymer* 1992;3:375-388.
6. Nakai K, Ohta T, Sakuma I, Akama K, Kobayashi Y, Tokuyama S, Kitabatake A, Nakazato Y, Takahashi TA, Sekiguchi S. Inhibition of endothelium-dependent relaxation by hemoglobin in rabbit aortic strips: Comparison between acellular hemoglobin derivatives and cellular hemoglobins. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;28:115-123.
7. Nakai K, Togashi H, Yasukohchi T, Sakuma I, Fujii S, Yoshioka M, Satoh H, Kitabatake A. Preparation and characterization of SNO-PEG-hemoglobin as a candidate for oxygen transporting material. *Int J Artif Organs* 2001;24:322-328.
8. Deible CR, Petrosko P, Johnson PC, Beckman EJ, Russell AJ, Wagner WR. Molecular barriers to biomaterial thrombosis by modification of surface proteins with polyethylene glycol. *Biomaterials* 1999;20:101-109.
9. Yabuki A, Yamaji H, Ohki H, Iwashita Y. Characterization of a pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene conjugate as a physiologic oxygen carrier. *Transfusion* 1990;30:516-520.
10. Faraday N, Rosenfeld BA. In vitro hypothermia enhances platelet GPIIb/IIIa activation and P-selectin expression. *Anesthesiology* 1998;88:1579-1585.
11. Olorundare OE, Simmons SR, Albrecht RM. Cytochalasin D and E: effects on fibrinogen receptor movement and cytoskeletal reorganization in fully spread, surface-activated platelets: a correlative light and electron microscopic investigation. *Blood* 1992;79:99-109.
12. Freischlag J, Backstrom B, Kelly D, Busuttill RW. Blood and peritoneal neutrophil (PMN) adherence in rabbits: the effects of hemoglobin, peritoneal fluid, and infection. *J Surg Res* 1985;38:635-640.
13. Inbal A, Gurevitz O, Tamarin I, Eskaraev R, Chetrit A, Novicov I, Feldman M, Varon D, Eldar M, Loscalzo J. Unique antiplatelet effects of a novel s-nitrosoderivative of a recombinant fragment of von Willebrand factor, AR545C: in vitro and ex vivo inhibition of platelet function. *Blood* 1999;94:1693-1700.
14. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:444-448.



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

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

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。

●編集後記●

この度、宮尾委員長、渡辺副委員長から編集委員長を私が、副委員長を福島先生が引継ぎました。工学系の若輩が宮尾先生の役を果たせるのか大変不安ですが、福島副委員長と共に編集委員の先生方と協力して努力して行く所存です。また、宮尾先生、渡辺先生には2年間本当にご苦勞様でした。

さて、日本血液代替物学会は200名弱の小さな学会ですが、医学・薬学・工学の学界、産業界において、その分野を代表する先生方が血液代替物の創製と評価、そして今後の輸血医療を模索するために1993年7月21日に設立されました。その間今日に至るまで、年次大会での活発なる討論や会誌「人工血液」での質の高い論文発表に見られる様に、人工血液の開発において、基礎的、学術的な進歩は確実にありました。しかし、世の中の日に見える形で大きな進展をしたとは言えないと思います。開発に携っている者として力不足を再認識する次第ですが、欧米で先行しているベンチャー企業においても中断になったり臨床最終段階での足踏みなど、人工血液の研究が如何に奥深く困難であるのかを物語っていると思います。他方、ゲノム、ポスト

ゲノム、再生医療など新しいテクノロジーの急展開は、人工血液の開発に間違いなく大きな影響を及ぼすことでしょう。そして、遺伝子組換え体を用いる人工血小板や人工抗体などの新しい分野が形成され、本邦独自の先端研究も進んでおります。

会誌「人工血液」では、国内外の最先端の研究を原著、総説、海外文献紹介、国際会議見聞録として、速報性を持って会員の皆様に情報発信しています。3月、6月、9月、12月の年4回の発刊ですが、発刊の1カ月前までに送付された原稿は専門員の審査を経て掲載される方針で進めます。また、バックナンバーは順次電子化を行ない、ホームページにて閲覧できるシステムを作る予定です。人工血液の領域は正に境界領域ですので、様々な領域からの原著論文を中心とした投稿により学術交流を深め、本領域を代表するジャーナルとして認知度を高めて行きたいと思います。会員の皆様の積極的な投稿、そして活発なるご利用をお願いします。

(武岡真司)

静注用人免疫グロブリン製剤

薬価基準収載

指定医薬品

献血グロベニン[®]-I-ニチャリ

〈乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン〉



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

製造（資料請求先）



日本製薬株式会社

〒101-0031 東京都千代田区東神田一丁目9番8号

販売



武田薬品工業株式会社

〒540-8645 大阪市中央区道修町四丁目1番1号

2001年11月作成（※）

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、図表中文字はすべて英文とすること。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) 論文中的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

●武岡真司(委員長)、池淵研二、津田良夫、仲井邦彦、福島昭二、堀之内宏久、宮尾秀樹、村田満、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 研恒社

人工血液 vol.10 (1) 2002年3月25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) 5363-3493 FAX (03) 5363-3499

〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1

早稲田大学理工学部65-208室

TEL (03) 5286-3217 FAX (03) 3205-4740

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

TEL (03) 3265-8961 FAX (03) 3264-1995

再生紙を使用