

人工血液

第10卷 第2号 2002年7月

目 次

総説	人工血液としての条件liposome-encapsulated hemoglobinの有効性、安全性への検討	高折益彦	28
原著	ラットhemodilutionモデルにおけるNRC (Neo Red Cell) の効力持続性評価	筒井洋治	36
	人工血液を用いた灌流液による肝常温灌流装置の開発…桂巻 正		42
	酸素輸液(ヘモグロビン小胞体)を含有する血清の生化学的検査		
酒井宏水		47
	サイトカインによる造血幹細胞の増殖制御	日野原 敦	54

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 10 No. 2 July, 2002

Contents

Review: Assessemnt of Artificial Blood for Clinical Use: Efficacy and Safety of Liposome-Encapsulated Hemoglobin	Masuhiko Takaori	28
<i>Original Article:</i>		
Duration of efficacy of NRC (Neo Red Cell) in a rat hemodilution model	Youji Tsutsui	36
Developement of ex vivo normothermic liver perfusion system using artificial blood.	Tadashi Katsuramaki	42
Clinical Chemistry of Blood Serum Containing Hemoglobin-vesicles as O ₂ Carriers	Hiromi Sakai	47
Cytokines that directly affect hematopoietic stem cells	Atsushi Hinohara	54

第9回日本血液代替物学会年次大会会告

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)

会場：熊本市国際交流会館

〒860-0806 熊本市花畠町4番8号

TEL: 096-359-2020

プログラム

会長シンポジウム「血清蛋白質の新展開」

1. はじめに：血清アルブミンと α_1 -酸性糖蛋白質の新たなる機能を求めて
小田切優樹／熊本大学薬学部薬剤学
2. α_1 -酸性糖蛋白質の体内挙動と生物活性
丸山 徹／熊本大学薬学部薬剤学
3. 血小板代替物としての認識蛋白質結合アルブミン重合体
武岡真司／早稲田大学理工学総合研究センター
4. The use of modified albumins as versatile carriers for cell-specific drug delivery.
D.K.F. Meijer／Groningen Univ. (The Netherlands)

特別講演 1

模型人工肺による生命維持法の開発と応用

寺崎秀則／熊本大学医学部麻酔学

特別講演 2

高分子治療剤開発の現状

前田 浩／熊本大学医学部微生物学

シンポジウム 1 「治療薬としてのヒト抗体開発の現状」

1. ヒト免疫系の再構築と抗体産生
垣生園子／東海大学医学部免疫学
2. C型肝炎ウイルスエンベロープ蛋白に対するヒト型抗体の開発
松浦善治／大阪大学微生物病研究所付属エマージング感染症研究センター
3. 抗ガングリオシド抗体および抗VEGF受容体抗体の抗腫瘍効果とそのメカニズム
太田聰／協和発酵工業株式会社東京研究所

4. 各種ウイルスに対するヒト中和抗体の開発状況
黒澤良和／藤田保健衛生大学総合医科学研究所免疫学
5. 血管炎治療用の人工グロブリン開発をめざして
鈴木和男／国立感染症研究所生物活性物質部
6. HBV, HCMV人工ヒト中和抗体の作製
井原征治／東海大学医学部分子生命科学

シンポジウム 2 人工赤血球開発の展望

1. 臨床応用可能な人工赤血球の創製
土田英俊／早稲田大学理工学総合研究センター
2. ヘモグロビン小胞体と血液成分の相互作用
池田久實／北海道赤十字血液センター
3. ショック病態における細胞型・非細胞型Hb投与による網内系機能変動の解析
末松 誠／慶應義塾大学医学部医化学
4. ヘモグロビン小胞体の投与試験による酸素運搬機能と安全度の評価
小林紘一／慶應義塾大学医学部外科
5. 臨床応用を目的とした生体機能代替可能な人工赤血球の開発
佐久間一郎／北海道大学医学部循環器内科

特別講演 3

微小循環の生理機能の効果的発現と赤血球のレオロジー特性
前田信治／愛媛大学医学部生理学第二

特別講演 4

人工血小板の開発の現状と将来展望
池田康夫／慶應義塾大学医学部血液内科

ワークショップ

企業における血液成分代替物質開発の現状と今後の展望

1. ナノバイオマシンとしての血液代替物
西谷孝子／富士レビオ株式会社先端研究部
2. 組換え酵母由来ヒト血清アルブミンの性状解析
中島和幸／財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所試作研究部
3. 急性大量出血モデルラットにおける人工酸素運搬体 (Neo Red Cell; NRC) の酸素代謝への影響
石塚隆伸／テルモ株式会社 研究開発センター
4. 人工酸素運搬体-アルブミン・ヘムの開発-
甲斐俊哉／ニプロ株式会社医薬品開発部
5. 人工赤血球液—その有効性と安全性
高折益彦／東宝塚さとう病院

〈大会事務局〉 〒860-0811 熊本市本荘2-2-1
熊本大学医学部薬理学第講座
第9回日本血液代替物学会年次大会
TEL/FAX: 096-373-5082

人工血液としての条件 liposome-encapsulated hemoglobinの有効性, 安全性への検討

Assessemnt of Artificial Blood for Clinical Use: Efficacy and Safety of Liposome-Encapsulated Hemoglobin

高折益彦
Masuhiko Takaori

和文抄録

21世紀の洗練された医療を推進するためには人工血液の開発は欠かすことが出来ない。血液成分中、とりわけ酸素運搬体である赤血球の開発が臨床上、現在特に望まれている。そのような人工赤血球液はまず急性出血の治療に、また一般輸血用血液使用の補助としての用途が早急の課題であろう。そして現在廃棄されている献血血液の中のヘモグロビンを再利用することも一課題であろう。しかしそのような人工赤血球液には薬剤製品として一定の必要条件が付帯される。すなわちその必要条件とは酸素運搬体としての有効性と製剤としての安全性とである。本稿においてはこれらの必要条件を指摘し、さらにそれらが満足されているか実証するにはいかなる方法を用いるか、具体的な検討を試みた。

Abstract

Development and practical use of artificial blood is essential for sophisticated medicine in the new century. Specially, as an oxygen transporter, new artificial red cell is desired to be developed sooner rather than substitutes of other blood components. It is an urgent object that the articial red cell should be used to treat acute, unexpected hemorrhage and to shear in transfusion of donated blood supplementary. Furthermore there will be another object that hemoglobin contained in red cells which were donated and expired for some reasons should be reused in medical field. However the new developed artificial red cell must be adjusted to pharmaceutical criteria as a new drug and blood substitute, particularly its safety, and must be satisfied for efficacy as an oxygen transporter. In this paper, we attempted to propose our designs and actual methods for assessment and validation for them.

Keywords

artificial blood, artificial red cell, drug safety, drug efficacy, drug evaluation & validation, liposome-encapsulated hemoglobin

はじめに

現在人工血液の開発は現代医療を支えるために不可欠な問題である。それには種々の要因があげられる。すなわち現在行なわれている輸血医療が本質的に組織移植であり、そのため各種免疫的障害がその使用を妨害し、そして輸血後に現れてくるためである。また輸血用血液、なかんずく赤血球、血小板は單なる物質ではなく、それぞれその細胞内にて酵素活動を営む生物体である。そのため我々の生体外では限られた時間、限られた環境下でしか生存できない。そのため生体からそれらを採取、特定環境下に保存し、常に輸血のために準備していなければな

らない。そしてさらに最近のわが国をはじめ諸外国でも問題となってきたが、血液の提供者の減少が生じている。そのため輸血用血液の供給制限が生じてきている。渡辺の試算¹⁾によれば、この数年以内に輸血用血液供給量は血液使用量を下回るようになるという。これらの問題を解決するためにも人工血液の開発は不可欠な問題となってきている。

輸血は各種血液成分をその目的に応じて生体に補給するのが原則である。その内で実地臨床の場にあって最も重要な位置を占めるのは赤血球の補給である。すなわち生体の各臓器、組織に酸素を運搬する赤血球を補給することである。事実、血液製

東宝塚さとう病院 〒665-0873 兵庫県宝塚市長尾町2番地1号1-2 Higashi Takarazuka Sato Hospital, Nagao-chou, Takarazuka City, Hyougo, Japan
論文受付 2002年5月25日 受理 2002年5月31日

剤の使用量の70%以上は赤血球製剤として用いられている。それゆえ当面の目標としてこの赤血球の代替物を開発することに焦点がおかれる。人工赤血球の開発はすでに50年以上前から始まり、30年前にはFluosol DA[®]としてperfluorocarbonが用いられた。しかしその酸素運搬能の特性から、人工赤血球としての評価を充分に得るには至らなかった。最近になり酸素抱合能を高めたPerflubron[®]が臨床治験にまで進んだが²⁾、使用にともなう血小板の異常な凝集効果から一時的に開発は中断されている。またヒト・ヘモグロビンを酸素運搬体として用いたDCLHbも臨床治験にまで進んだが、最終目的である治療面において酸素運搬効果がないアルブミンよりも救命率が悪くなる結果から³⁾、製剤化されるに至らなかった。これらの開発製品はいずれもコロイド型製品、すなわち非細胞型製品であり、その性状自身に問題点を残していると思われる⁴⁾。すなわち人工赤血球として開発されたものもそれを人工血液として使用する場合、単に酸素運搬能があるだけでは目的を達成しえない。実際に臨床の場では出血に対して使用されるため、循環血液量を維持することも要求される。またその血液中滞留時間についても考慮が必要である。さらに末梢微小循環での流態、酸素放出動態についても検討が必要である。反面細胞型の人工赤血球ならば生理的に充分代替物としての機能を果しうるか否かについても今後の充分な検討が必要である。すなわち以下本稿において述べる種々の条件を満足してはじめて臨床使用に耐えるものとなりうる。

すでに現在までいくつかの人工血液としての確認事項、必要条件などが発表されている⁵⁻⁸⁾。しかし本稿においてはそれらの条件付け、あるいは検討方法をより具体的に示すように留意した。とりわけ臨床の場で遭遇する予期せざる出血にこのような赤血球代替物で対処する場合を想定し、その際の循環血液補充、酸素運搬体の補充を目的としてその有効性と安全性に関する基準 (criteria) を規定することとした。

2. 開発されるべき人工血液として備えるべき条件

すべて開発される薬剤についてはその有効性(effectiveness)と安全性(safety)を兼備することが必須条件である。そして有効性には 1) そのものが物理的、化学的見地から間違ひなく目的とする作用を有すること、すなわち確実にそれに適合した物性を有すること(activity) と、2) そのものを臨床に使用して明らかな治療効果を得ること(efficacy) とに区別して評価される。すなわち基礎的なactivityの上に成り立って臨床的なefficacyが得られる。たとえば初期段階で作成されたFluosol DA[®]のように100%酸素吸入にともない、肺胞内酸素分圧を500-600mmHgに上昇させて辛うじて 6 vol%量の酸素を保有させ得る状態では、臨床的応用の域に達しているとは言えなかった。そして近年開発されたPerflubron[®]においてもなおこの点に関して充分とはいえない状態にある。すなわち40%酸素吸入($\text{PaO}_2 = 250\text{mmHg}$)で7.5vol%程度に止まる⁹⁾。したがって現況では酸素運搬体としては動物体が保有するヘモグロビン(Hb)に頼らざるをえない状態にある。しかしHbを単体として溶媒内に溶解させた場合、その血管内停留時間が限られ、さらに血液内皮細胞の産生する一酸化窒素(NO)を吸収する作用から血流障害さえ引き起こす

結果となる¹⁰⁾。この作用はHbを重合させた場合でも少なからず残存し、臨床使用にともない種々の副作用が認められている¹¹⁾。この作用をほとんど完全に防止するため、さらにHbの血管内腔からの漏出を低下させることを含めてHbをリポソームにて包埋した製品が開発され、これに今後の人工赤血球としての期待がかけられている。すなわちその酸素運搬能の特性から、また安全性の点からももっとも臨床応用が可能であると考えられている。本稿においては特に我が国で開発が進められてきている人工血液、すなわちリポソーム包埋ヘモグロビン小胞体生理食塩水浮遊液(HbV)を中心検討することとした。

3. Activityの検討

1) 酸素運搬能

(a) 酸素解離能(P_{50})

赤血球代替物は生体の肺での酸素分圧下(90-100mmHg)において100%に近く飽和され、末梢組織での低酸素分圧下において結合酸素を放出しうる能力を有することが必要である。Hbを酸素運搬体とした場合、生理的赤血球内のHbと同様に充分に肺で酸素と結合し、さらにその酸素解離曲線の特性、すなわちS字曲線から低酸素環境下、組織レベルの酸素分圧40mmHg近傍において、その約35%の酸素を放出しうる。それにより組織、細胞に対して生理的赤血球同様の酸素供給効果が得られる。そのため製剤の酸素解離能、すなわち P_{50} は著しく生理的赤血球のそれと異なるものでないことが望まれる。 P_{50} を高くすることにより酸素放出量は増加する。しかし最近の研究によれば酸素放出を多少抑制した場合の方が、実質的に組織酸素供給バランスを向上するとの研究もある¹²⁾。また逆にかかる赤血球代替物を含有する人工血液を使用する場合、生体は空気呼吸におけることは少ない。多くは30-40%以上の酸素吸入におかれている。したがって P_{50} を30-35mmHgと高くして酸素放出量をさらに多くすべきであるとした見解も存在する。しかし本質的に P_{50} は26-32mmHgであることが一応の基準と考えられる。

(b) 酸素運搬体含有量 酸素運搬量を増加させるためにはHbVのリポソーム包埋粒子内のHb含有量を増加させることが望ましい。理想的には20vol/dlの酸素含有量、すなわち15g/dl程度のHb含有量が望ましい。しかし生体には種々の機能にて血液中の酸素運搬能低下を代償するので、このような充分な条件でなくとも構わないとする見解も生じる。ただし作成した人工血液としての中のHb濃度は生理的赤血球での血液希釈での限界値¹³⁾といわれる6 g/dl以上は保持すべきものであろう。すなわち正常人循環血中Hb量の40-50%以上は含有することが望まれる。

2) メトヘモグロビン(metHb)の共存率

Hbはin vitroで放置された場合、次第にmetHbに変化する。生理的な赤血球にはmetHb還元酵素がありNADHを使用してmetHbの蓄積を防いでいる。しかし単純に循環中の赤血球から抽出したHbにはこのmetHb還元酵素が失われている、あるいはその活性が低下しているため、次第にmetHbが增量してHbとし

ての酸素運搬能の機能が失われる。したがってHbを酸素運搬体として利用した人工赤血球であるかぎり、このmetHbが保存中に一定量以上に増加しない状態を得なければならない。少なくとも製品化された状態でのmetHbはHbV粒子内Hbの5%以下に保持されるべきであろう。

3) リポソーム粒子の粒絆

赤血球の粒絆の直絆は7μm、厚さは1-2μmである。しかし血管内を循環している際は円盤中央部を先頭に長径が3-4μm、厚さが2-3μm(著しい場合には長径が5-6μm、厚さが1.5-2.0μm)の長鳥帽子形となって流れている。これは赤血球の細胞膜、および内部構造が非常に大きな可塑性を有するためで、これによりかなり細い血管でも通過することを可能ならしめている。しかし現在使用しうる脂質二分子膜でHbを包埋した微小球体では赤血球同様の可塑性を得ることは困難で、全く可塑性がないと考えるのが正しい。したがって毛細血管をスムースに通過するためには0.5μm以下の直絆に規定するべきであると予想される。

4) HbV粒子の液体内の分散性

上記の粒絆の製品が得られたとしても、そのそれぞれの粒子が凝集して巨大凝集塊を生じた場合には微小循環系の血管内をスムースに流れることができなくなる。そこでこのような凝集塊の発生を防ぐためHbV表面をpolyethylene glycol(PEG)にて修飾することが行なわれている。すなわちリポソーム膜表面の99%以上をPEG分子にて被覆してリポソーム粒子間での凝集を防止する。ただその量が多すぎる場合には粒子サイズの増大をもたらすので、その量のPEG・リン脂質対比を最小限低く抑える必要性があり、現在では0.3mol%程度に保たれている¹⁴⁾。

5) 製剤のpH

生体の循環系への投与を目的とした製品であるからには、その溶液のpHは7.40近傍にあるべきである。特に出血治療を目的とした場合にはこの点が重視される。そして酸塩基緩衝能が大きいものでは特にその必要性が問われる¹⁵⁾。HbVは生理食塩水にHb包埋リポソーム粒子を浮遊させたものであるので、酸塩基緩衝能は大きくはない。しかしpHをアルカリ性に傾ければリン脂質とHb分子とが反発し合うことになり、包埋に必要なリン脂質量を増加させる結果となる。またpHを酸性に傾ければHbのmetHbへの移行を容易ならしめる。この見地からもpHをほぼ中性の7.40近傍に設定することが望ましい。

6) 製剤溶液粘度

製剤の溶液粘度も本質的に血液そのものの粘度と同等であることがのぞましい。しかし球形で、その粒絆が250nmで、かつほとんどの変形性がないHbVの場合に通常の血液と同等の粘度を有することで血液循環、とりわけ微小循環血流に好ましい結果をもたらすか、またそのような酸素運搬体が効果的に酸素を運搬するのに適しているか、今後に研究課題を残している。さらにこのような人工血液が使用される状況、すなわち多くは血液希

釀状態での冠循環維持に正常血液粘度と同等のもので良いのか¹⁶⁾疑問が残るところである。

7) 製剤の均一性、恒常性

すべて製品は常に一定の品質を維持することが必要で、医薬品製造指針2001¹⁷⁾に記載された有効成分ならびに補助成分の含有量規定によれば各ロット間でのバラツキは一般的に1%以下に定められている。また不純物の検出規定によれば、これらはすべて0.1%以下に抑えなければならないと規定されている。

また臨床使用上、製品を液状保存(低温下)した場合では少なくとも半年、凍結保存した場合には少なくとも2年以上の恒常性があることが望まれる。最近のHbVの製品プロフィールは表(1)に示すごとく、上記人工血液としてのactivityも、また後述する安全性もほぼ満足していると思われる。

Table (1)
Characteristics of HbV and PEG-HbV compared with XLHb and RBC

Parameters	XLHb*	HbV	PEG-HbV	RBC
Diameter (nm)	5	244 ± 70	251 ± 76	8000
Hb (g/dl)	10.0	10.2	10.0	ca. 15
Lipid (g/dl)	-	5.9	5.1	0.2
[Hb]/[Lipid]	-	1.73	1.75	75 (13*)
PEG-lipid (mol%)	-	-	0.3	-
p _w (mmHg)	32	35	35	28
OTE (%) ^b	32	37	38	28
metHb (%)	< 2	< 3	< 3	< 0.5
HbCO (%)	< 2	< 2	< 2	< 5
pH at 37°C	7.4	7.4	7.4	7.4
Osmolarity (mOsm)	300	300	300	300
Oncotic pressure (mmHg)	30	20	20	25
Viscosity (cP) at 37°C	1.6	9.4	3.7	4.0

*Intramolecular crosslinked hemoglobin with bis(3,5-dibromosalicyl)fumarate (DBBF).

^bOxygen transporting efficiency: the difference in oxygen saturation (%) between pO₂ of 40 and 100 mmHg.

^aIncluding membrane proteins (ca. 1 g/dl) as lipid.

^cOncotic pressure was adjusted by addition of γ-human serum albumin.

cited from "Evaluation of the oxygen transporting capability of hemoglobin vesicles : Takeoka, S., Sakai, H., Kobayashi, K., Tsuchida, E. ; In: Blood Substitutes - Present and future perspectives Tsuchida, E. ed. Amsterdam Elsevier Sci. 1998; 171-184."

4. 有効性 (efficacy) の検討と評価

生体に投与される人工血液が実際に実地治療上有効に作用するためには以下の諸条件を満足しなければならない。

1) 生理的循環において組織代謝に必要な酸素の運搬

(a) 肺における酸化効率

吸入気酸素濃度21-40%下にある生体に投与して肺におけるHbV中のHb酸素飽和度が97%以上に得られることが必要であろう。実地臨床の場にあって人工血液の投与を受ける患者は一般に酸素吸入を受けている可能性がきわめて高い。しかし長時間にわたり吸入して肺に障害を与えない酸素濃度は40%であるから、一応、40%の酸素吸入下にて97%以上のHb酸素飽和度が得られれば充分と認められる。すなわち40%濃度の酸素吸入をしている生体にHbVを投与して、その動脈血酸素飽和度を測定することから検証できる。

(b) 実質的な酸素運搬能

HbVの酸素含有量から組織における酸素必要量を満足させるためにはHbVからの酸素解離率が少なくとも30%以上であることが要求される。この点もHbVが投与された生体の混合静脈血(可能ならば主要臓器からの流出静脈血についても)の酸素飽和度を測定することからほぼ検証しうる。

(c) メト化速度

前述のごとくHbV粒子内には還元作用を有する物質を含んでいない。したがって生体内に投与し、血液中を循環している間に次第に含有されるHbがmetHbへと変化する。それにともない酸素運搬能は消失する。ただしHbV粒子の循環血液からの喪失速度に応じて、このメト化速度の認容範囲も決定される。すなわちHbV粒子の循環血液中の半減期時に全Hbの10%以下でmetHbに変化する程度ならば臨床的に酸素運搬能の面からは有効と判断される。

2) 投与後の血液量の維持

たとえ充分な酸素運搬能、すなわち所定量のHb量を有し、かつそれへの所定の酸素抱合能を有していても、HbV投与後にHbVを含み、生体循環血液量が速やかに減少するような場合、実地臨床の場での使用は困難である。すなわち循環血液量の10-40%が喪失するような出血下においてHbVを投与し、少なくともその後6-12時間は投与前の循環血液量が維持されることが要求される。現在のHbVは溶媒に生理食塩水を使用していて膠質が含まれていない。したがって上記の条件を満足するためには将来的にHb包埋リポソーム粒子をなんらかの膠質液に浮遊させることが要求される。あるいは現在のHbVと同時に膠質液を投与することが必要となる。上記各種処置をおこなった循環血液量の50%出血動物実験例で、また50%希釈式自己血輸血施行の症例で、HbV投与前後に循環血液量を測定して、この問題点を検証することが必要である。小動物(ラット)に血液量の40%出血を負荷し、これをHbV単独投与にて処置した際、循環血液量の減少のためと思われる循環不全から生存することが出来ないとする報告もある¹⁸⁾。ただしこれに膠質液を追加投与すれば救命しうるという¹⁸⁾。これに反してビーグル犬でその循環血液量の40%の急性出血をHbV類似人工血液(生理食塩水浮遊Hb内包リポソーム粒子、テルモ社製NRC)にて治療した際には、循環血液量をほぼ出血前値に維持することができ、動物を生存させうとする報告もある¹⁹⁾。すなわち血管透過性がないリポソーム粒子が投与容量の一部を占めるため、コロイド性赤血球代替物使用の人工血液に比較してvolume expanding効果がえられるとする見解もある。

3) 投与後のHb包埋リポソーム粒子の循環血液内の半減期は少なくとも24時間以上であることが望ましい。特に循環血液量の50%に相当したHbVによる血液交換例でのHbVの血液内半減期の検定が必要である。すなわち上記循環血液量の測定と同時にHbV濃度を出血前後で測定して検討しうる。ただし小動物での検定では24時間程度の半減期が認められている¹⁸⁾。ただ一般に動物のサイズが大きくなればこのような小粒子の循環血液中で

Table (2) Items Confirmed for Effective Artificial Blood (HbV)

Chemical Activity	Clinical Efficacy
Oxygen Transporting Ability	Capability for Oxygen Supply to Tissues
Oxygen Dissociation (P50)	Pulmonary Oxygenation
Oxygen Transporting Substance (Hb) Content	Oxygen Extraction in Tissue
	Conversion Rate to Met-Hb
Co-existent Rate of Met-Hb in Pure Hb	Maintenance of the Circulating Blood Volume
Size of Liposome Capsule Contained Hb	Retention Rate of Artificial Red Cell in the Circulation
Dispersibility of the Liposome Capsule in HbV	
pH of HbV	
Viscosity of HbV	
Homogeneity of HbV and Stability	

Table (3) Safety of HbV

Chemical & Biological Validations	Clinical Assessments
Residual Carbon Monoxide	Psychological Function and Behavior
Residual Excess Phospholipid	Mental Activity
Residual Excess PEG	Tendon & Skeletal Muscle Function
Free Hb	Serum Electrolytes Composition
Residual Endotoxin	Heart & Circulatory Function
Sterility	Respiratory & Gas Exchange Function of the Lungs
	Hepatic Function
	Body Fluid Buffering Capability
	Renal Function
	Digestive Canal Motility
	Digestive Exocrine Function
	Hemostasis & Fibrinolytic Function
	Hemopoietic Function
	Endocrine Function
	Body Defensive & Immune Function (including Abnormal Release of Chemical Mediator)
	Reproductive Function
	Teratogenicity
	Tumorigenicity
	Drug Interaction

の滞留時間が延長するといわれる。そのため中動物、および大動物での検討が必要である。

以上、製品の有効性(化学的効力と臨床・生理学的有効性)での確認事項を表(2)に示した。

4. 安全性の検討—表(3)

1) HbV製剤の化学的安全性

(a) 一酸化炭素Hbの除去

Hbの精製・純化には一度一酸化炭素と結合させる工程が含まれる。すなわち一酸化炭素Hb(HbCO)として、その構造を安定化させる必要性がある。しかし純粋なHbCOをリン脂質である

リポソーム内に包埋させてからHbCOからCOを除去しなければならない。最終的なHbV製剤にはHbCOが存在していないことが必須である。さらにHbVの溶液内にも不純物としてのHbCOが存在しないことが必須である。したがってHbV製剤として、その中にHbCOが遊離体としても、またHbV粒子内にもHbCOが存在していないことを確認する。

(b) 残存リン脂質量

Hbをリポソームにて包埋する過程を経るため遊離リン脂質がHbV製剤中に残留する可能性がある。このようなリン脂質の生体内注入にともない、血液中の補体を活性化し、血液中の血小板が各種臓器血管床に蓄積することもある²⁰⁾。したがってHbV製剤中の余剰の遊離リン脂質の存在は極力回避しなければならない。この点についての検定も必要である。

(c) 残存PEG量

Hbをリポソームにて包埋後、それらのリポソーム粒子の凝集を抑制するために粒子表面にPEG修飾をおこなう。PEGそのものの毒性は比較的小ない²¹⁾。しかし余剰のPEGが製剤(溶液)内に残存していた場合、製品封入用のプラスチック製品と反応することもあり、その残存がないように努めるべきである。

(d) 遊離Hb

前述にしたごとく遊離Hbは血管内皮細胞の産生するNOを吸収するため生体には有害である。それゆえHbV製剤内に残存することは許されず、その検定は不可欠である。

(e) 内毒素

発熱物質としての内毒素は製造過程の各部において混入しうる。したがって最終製品として完成した時点での存在の有無を検定する。すなわちin vitro検査とともに生物学的手法にて確認しておくべきである。

(f) 無菌性

病原性の有無にかかわらず製剤中に微生物体を検出しない状態が当然要求される。HbVを加熱滅菌することは不可能であるので、最終製造工程に至るまで、完全な無菌加工操作が必要である。そして最終段階での微生物体の混入の有無に関して適確な検定が必要である。

以上これらの製剤安全性検査は各ロット毎に確認する。

2) 製剤の生体内投与での安全性確認

製剤投与後の生体に対する安全性、すなわち生体機能に即時的に、また遅発的に障害を与えないことが要求される。一方、検討すべき生体機能は多岐にわたる。しかしその個々について可能なかぎり検討していかねばならない。もちろん最終検査はヒトを対象とした、いわゆる治験結果を必要とするが、それ以前に動物を対象とした前臨床試験にて検討しておかねばならない。以下、それら検討すべき項目と、いかなる手法、検査法によつて確かめていくか述べたい。なおそれらの検査値の異常判定、ならびにその重症度の判定に関しては平成4年6月29日厚生省薬務局安全課長通知「薬安第80号による“医薬品等の副作用の重症度分類基準について”を適応する。

(a) 精神活動、習性反応

臨床治験においては問診による精神活動の検査、記憶テスト、ならびに知能テストによる検定が可能である。これに対して前臨床試験では動物の行動知能習性変化を迷路試験、食事摂取試験などから推定する。急性期反応(即時型反応)を投与後24-48時間に、また慢性期反応(遅発性反応)を投与後2、6月にわたり観察して判定すべきである。

(b) 中枢神経、および末梢神経機能

前臨床試験、臨床治験とも、脳波検査、聴覚皮質反応検査、あるいは末梢神経刺激反応試験から検査しうる。精神活動検査同様、投与後24-48時間の急性期、投与後数ヶ月から6月にわたり慢性期に観察する。

(c) 鞘帯、骨格筋機能

臨床治験の場合には自由運動への障害の有無、前臨床試験の場合には神経電気刺激にともなう四肢骨格筋運動反応、筋電図所見、血清CPK (creatine phosphokinase) 値変動から判定可能である。そして急性期反応として投与後24時間まで、慢性期反応として投与後48時間から1ヶ月の観察から判定する。

(d) 血清電解質組成の保持

血清電解質(Na, K, P, Ca, Mg, Cl, HCO₃) 値が投与直後から投与後少なくとも12時間以内は生理的範囲に維持されていることを観察する。

(e) 循環機能

i. 心筋収縮力

HbV投与後において心筋収縮力が生理的範囲内に保たれていることが必要条件である。また循環系への負荷(前負荷、後負荷)に対して、少なくとも生理的な反応範囲で対応しうることが必要である。これらの検定は前臨床試験、臨床治験とともに心拍出量測定、心室収縮容量/圧曲線(心エコー的観察、必要に応じて血管内カテーテルを用いた観血的観察)、心作動曲線、血管内脈波速度測定、心電図観察等の総合評価から判定する。

ii. 心拍出量の各臓器・組織分布

前臨床試験では心拍出量測定ならびに所定臓器の組織酸素分压測定、その還流静脈酸素分压測定、フレチスマグラフから判定可能である。心腔内に注入したmicrosphereの各臓器、組織への分布から確認しうる。

iii. 循環血液量の血管内分布

前臨床試験では放射性同位元素標識赤血球を用いた臓器、組織血液量測定から判定可能である。またF cell ratioを測定することにより大血管、末梢微小循環系における赤血球分布状況をも検定できる。またこれらは臨床治験においても一部臓器では

観察が可能である。

iv. 血管抵抗

臨床治験では心拍出量、血圧測定からその変化を推定しうる。一方前臨床試験においては摘出脈管での還流実験からも判定できるし、さらに血管収縮薬、血管拡張薬に対する反応も検査できる。

v. 血管の高分子透過性

前臨床試験、臨床治験とともに人工的に作成した水泡内への標識アルブミン漏出試験から、また血液濃縮状態をヘマトクリット値の変化等、臨床的な観察から判定する。さらに前臨床試験では血管透過性物質投与後に指示物質摘出臓器、組織から検出して判定しうる。

vi. 組織液・リンパ液循環

臨床治験ではリンパ管造影、前臨床試験では観血的にリンパ流量を測定、あるいは組織液クリアランスを測定して判定する。これらの機能への影響は急性期として投与直から8時間、慢性期反応として実質的に投与後24時間までの観察で充分判定できよう。

(f) 呼吸機能

臨床治験においても、また前臨床試験においても、呼吸機能に関してはi. 肺換気メカニクス、ii. 肺胞膜ガス透過性を検査し、これらが生理的に保たれることを確認する。すなわちi. に関しては肺呼吸分画量、肺コンプライアンス、気道抵抗測定から判定可能である。またii. に関しては肺胞膜拡散機能検査、そして動脈血酸素、炭酸ガス分圧測定から判定できる。呼吸機能に関しても急性期として投与直から8時間後、慢性期反応として24時間までの観察、ならびに投与後3ヶ月時の検査も追加して確定する。前臨床試験では麻酔下にて検査が行なわれるが、HbV投与にともなう前後のこれら諸検査値の変化から判定する。

(g) 肝機能

臨床試験においても、また前臨床試験においても、HbV投与にともなう肝機能への影響判定には以下の6項目から検討する。

i. 解毒機能が生理的に保持されていることをBSP(bromsulphophalein)、ICG(indocyanine green)排泄試験、血清ビリルビン値から判定可能である。

ii. 解糖系諸因子、脂肪代謝諸因子が影響を受けないことを血液中のブドウ糖値、およびその代謝産物(たとえば乳酸値)、中性脂肪値、コレステロール値測定から判定する。さらに呼吸商値から判定する。

iii. 蛋白、脂肪合成機能が生理的にたもたれているか、血漿蛋白量、血清コリンエステラーゼ、血漿コレステロール等、一般血液生化学検査値から判定できる。さらにプロトロンビン時間の測定は、肝でのプロトロンビン、第V因子、第VII因子、第VIII因子、第X因子、フィブリノーゲン生産機能の総合判定の指標なりうるので上記測定因子と同様に判定に利用する。また尿中窒素排泄率も参考とする。

iv. 胆汁合成、分泌機能への影響は主として血清ビリルビン値、血清アルカリホスファターゼ値への影響の有無から判定できる。

v. 肝実質細胞の障害が生じないこの判定には肝細胞からのGOT、GPTなどのトランスマイラーーゼの血液中への遊離、すなわちこれらの血液中濃度から判定できる。さらに血漿中グルタミニル・トランスペプチダーゼ値(γ GPT)、LDH(lactate dehydrogenase)もその指標となる。

vi. 動脈血中ケトン体比は元来肝ミトコンドリアの酸化還元状態を反映する指標であるが、臨床的には肝の酸素需給消費バランスを示す指標として利用できる。すなわち肝血流量の増減にもなる酸素供給状態の指標として活用できる。これら諸検査は前臨床試験、臨床治験においてともに利用できる。とくに肝臓はHbV中のリポソーム粒子が蓄積する臓器であり、これらの諸機能は投与直後から、少なくとも数週間にわたり観察が必要である。

(h) 体液緩衝機能

出血に対する処置としては比較的大量の人工血液を注入する可能性があるため、その注入にともない体液の血液緩衝系が影響される可能性がある。人工血液製剤としての製品そのもののpH、それ自身も重要ではあるが、その溶液の緩衝能が関係する。しかしながら、HbVにおいては溶媒が生理食塩水であり緩衝能は少ない。しかし将来的には人工赤血球を浮遊させる溶媒を膠質液に変更する可能性がある。その際には再度検討することが必要であることを注意したい。投与直後の観察で判定できるが、溶媒の代謝性を考慮しても24時間までの観察で可能であろう。

(i) 腎機能

腎機能は本質的に糸球体機能と尿細管機能とに分割して検討すべきである。しかし実際問題として総合結果として認識される場合が多い。一般検査としての尿量、尿組成、血液尿素、クレチニン、尿酸濃度を、さらに糸球体濾過率、PSP排泄能、尿細管濃縮・希釈能を検査する。さらに尿中 β 2-microglobulin、N-acetylglucosaminidase量の変化から尿細管の障害の有無を検索する。これら腎機能の観察も投与直後から、少なくとも2-3週間後までの観察が必要である。

(j) 消化管機能

臨床治験では被験者の自覚症状から判定する。しかし前臨床試験では腸管内圧曲線、平滑筋筋電図の観察から検討しうる。投与直後から24時間までの観察で可能である。

(k) 消化液分泌機能

臨床治験では被験者の自覚症状、ならびに便性状から判定する。前臨床試験での評価では臨床での判定に準じるとともに、積極的には胆汁、胰液分泌量をそれぞれの分泌管に挿入したカテーテルからのそれぞれ測定して判定する。この場合にはそれぞれの消化液性状についても検査しうる。

(l) 止血、纖維素溶解機能

i. 前臨床試験、臨床治験とともに外因性、内因性血液凝固機能、血小板数、に影響を及ぼさないことをaPTT、PTT、TT、throm-

boelastogramの測定を行ない判定する。

ii. 同様に血小板機能に影響を与えないことを血小板凝集能、血小板粘着能から判定する。

iii. 同様に纖維素溶解機能への影響をthromboelastogram、ならびに血漿FDP, D-dimer, TAT, FPA値から判定する。

iv. 臨床治験においては血管損傷とともに微小血管の収縮機能を出血時間、Rumpel-Leede法から判定する。

(m) 造血機能

前臨床試験、臨床治験ともに、末梢血液細胞解析(赤血球数、網赤球数、白血球数、白血球分画、血小板数、Hb値、Hct値)、骨髄細胞解析を投与後4週間まで行ない、その結果から判定する。

(n) 各種内分泌機能

各種ホルモン、ACTH, TSH, ADH, prolactin, thyroxin, triiodothyronine, insulin, cortisol, aldosterone、血漿renin活性、estrogen, progesteron, testosteroneの血液中濃度変化を投与直後、1週間、4週間と観察して判定する。

(o) 生体防御機能、免疫機能

i. HbV投与後に血漿中の免疫グロブリン、補体濃度に影響がないこと、すなわちHbV投与後、1-24時間の血液中免疫グロブリン、補体濃度に変化が生じないことを確認する。

ii. HbV投与後にHbVに対して抗体を産生しないこと、すなわち前臨床試験、臨床治験ともに1-10週時の血清とHbVとの反応をin vitroにて観察する。また臨床治験ではハッチ試験、皮刺試験にて反応を検査する。前臨床試験では上記期間中にその動物に少量のHbVを皮内、または静脈内に投与して反応を観察する。

iii. 貪食能を含む細胞免疫機能に影響を及ぼさないこと、すなわち前臨床試験ではHbV投与後の生体網内系での貪食能を炭素微粒子法にて観察、臨床治験では末梢血液内マクロファージの貪食能(in vitro)を炭素微粒子、イースト粒子貪食能検査法から判定する。

(p) 化学的メディエータの遊離

前臨床試験、臨床治験ともに、HbV投与後、1-4時間での血液中histamine, serotonin, leukotriene等の化学的メディエータ値を測定、それらに異常な変化がないことを確認する。

(q) 生殖機能

前臨床試験ではHbV投与後1-12月間、周期的に動物の性周期、卵子、精子生産状況を観察、同時に生殖能力を観察する。また臨床治験では同期間中の性周期観察(女性)、精子性状の観察(男性)から判定する(ただし臨床治験では妊娠の希望のある、あるいは可能性のあるものを対象としない)。

(r) 催奇形性

前臨床試験でHbV投与個体から3代目までの継代個体まで観

察して確認する。

(s) 悪性腫瘍誘発性

前臨床試験でHbV投与個体から3代目までの継代個体まで観察する、そして非投与個体との比較において腫瘍の発生率を増加させないことを確認する。

(t) 薬剤相互作用

臨床にて頻繁に使用される薬剤とin vivo, in vitroにおいて、ともに反応しない、あるいはそれらの薬剤の薬効に影響を与えないことを検討する。

また原則としてHbVとの相互作用を防ぐため、HbVの血液中半減期の4倍の期間、すなわち1~2週間内での脂肪乳剤の投与は回避することが望ましいと思われる。またHbVと他の輸液剤との混合(in vitro)注入は行なわないことは原則となる。しかしその他の薬剤については適宜選択して臨床治験にて検討せざるをえない。

おわりに

以上開発する人工血液、とりわけHbVを中心にそれに付帯されるべき有効性、安全性について述べた。有効性に関しては少なくとも24時間内は酸素運搬能力と循環血液量維持能力があることが必要条件である。しかし安全性に関しては初期段階から全てを網羅することは困難である。事実、医薬品製造指針¹⁷⁾においてもその限界を指摘している。そのため一般的に検討すべき諸点について前臨床試験、臨床治験にて一律に確認し、次に遭遇する特殊な点について順次検討していくべきであろう。一方、緒言にて述べたごとく人工血液の開発は急務である。そのため最小限の、そして有効性に関して最も重要な点、安全性でもっとも憂慮される諸点を優先的に検索すべきである。事実、現在われわれが手にしている人工血液、すなわちHbVについてもなお問題点を残している。それらの点は速やかに改善し、一刻も早く臨床使用に供しなければならないと痛感する。

Reference

- 渡辺 嘉久、高橋幸喜、掛川裕通、黒木奈津子、赤座達也、岡 功夫、田所憲次、十字猛夫 日本の将来推計人口をもとにした今後30年間の輸血用血液の需給予測 日輸会誌 1998;44:328-335.
- Spahn DR, van Brempt R, Theilmeier G, Reibold J-P, Welte M, Heinzerling H, Birck KM, Keipert PE, Messmer K. Perflubron, emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery Anesthesiology 1999;91:1195-1208.
- Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J, Mallory MN, 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.
- 高折益彦. 赤血球代替物の臨床応用をめぐして. 人工血液 2000;8:85-89.

5. Center for Biologics Evaluation and Research Points to consider in the safety evaluation of hemoglobin-based oxygen carriers *Transfusion* 1991;31:369-371.
6. Center for Biologics Evaluation and Research Points to consider on efficacy evaluation of hemoglobin-and perfluorocarbon-based oxygen carriers *Transfusion* 1994;34:712-713.
7. Przybelski RL, Daily EK, Stern KN, Mattia Goldberg C. A graded scale for assessment of safety of blood substitutes *Transfusion* 1997;37:749-751.
8. Fratantoni JC. Red cell substitutes: Evolution of approaches for demonstrating efficacy In: *Blood Substitutes-Present and future perspectives* Tsuchida, E. ed. Amsterdam Elsevier Sci 1998;33-39.
9. Lowe K. Synthetic oxygen transport fluids based on perfluorochemicals: Applications in medicine and biology *Vox Sang* 1991;60:129-140.
10. Moisan S, Drapeau G, Burhop KE, Rioux F. Mechanism of the acute pressor effect and bradycardia elicited by diaspirin crosslinked hemoglobin in anesthetized rats *Can J Physiol Pharmacol* 1998;76:434-442.
11. Takaori M. The target and assessment of clinical tests In: *Blood Substitutes-Present and future perspectives* Tsuchida, E. ed. Amsterdam Elsevier Sci. 1998;111-123.
12. Sakai H, Tsai AG, Rohlfs RJ, Hara H, Takeoka S. Tsuchida E, Intaglietta, M. Microvascular responses to hemodilution with Hb vesicles as red blood cell substitute: Influence of O₂ affinity. *Am J Physiol* 1999;45:H553-H562.
13. America Society of Anesthesiologists Task Force on Blood Component Therapy Practice guidelines for blood component therapy. A report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on blood component therapy. *Anesthesiology* 1996;84:732-747.
14. Evaluation of the oxygen transporting capability of hemoglobin vesicles. Takeoka S, Sakai H, Kobayashi K, Tsuchida E. In: *Blood Substitutes-Present and future perspectives* Tsuchida E. ed. Amsterdam Elsevier Sci. 1998;171-184.
15. Takaori M. Changes of pH of blood diluted with plasma substitutes in vitro. *Kawasaki Med J* 1976;2:1-6.
16. Intaglietta M. Microcirculatory basis for the design of artificial blood *Microcirculation* 6:247-258, 1999.
17. 薬事審査研究会 一般用医薬品の承認申請の留意事項 薬品製造指針2002 東京 じほう社 2001.
18. 小林絹一, 堀之内宏久, 渡辺真純, 岩丸有史, 山内徳子, 山本 学 ヘモグロビン小胞体の投与試験による酸素運搬能と安全度の評価 平成13年度 厚生科学研費補助金(高度先端医療開発事業)分担研究報告書 上田英俊 編集 東京 早稲田大学理工学総合研究センター 2002;37-42.
19. 高折益彦, 福井 明. 赤血球代替物NRC投与と血液量変化. 血液代替物前臨床評価試験専門委員会 評価報告資料集 東京 日本血液代替物学会 1995;72-76.
20. Goins Phillips WT, Klipper R, Rudolph AS. Role of complement in rats injected with liposome-encapsulated hemoglobin. *J. Surg Res* 1997;68:99-105.
21. Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE. *Merck Index An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals* XI Ed. Rahway, New Jersey 1989;7542.

ラットhemodilutionモデルにおける NRC (Neo Red Cell) の効力持続性評価

Duration of efficacy of NRC (Neo Red Cell) in a rat hemodilution model

筒井洋治, 木村哲寛, 石塚隆伸, 大森伸二, 志澤 隆, 後藤 博, 緒方嘉貴, 金田伸一

Youji Tsutsui, Tetsuhiro Kimura, Takanobu Ishizuka, Shinji Oomori, Takashi Shizawa, Hiroshi Goto,
Yoshitaka Ogata, Shinichi Kaneda

和文抄録

カプセル型人工酸素運搬体であるNRC (Neo Red Cell) は、リポソーム表面を親水性高分子で修飾することにより血中滞留性を向上させている。しかし、生体内ではNRC中のヘモグロビンのメト化に伴い、NRCの酸素運搬能が低下することから、その実質的な機能の半減期（有効半減期）は、リポソームとしての半減期にメトヘモグロビンの生成速度を加味したものであると考えられた。そこで、ラットhemodilutionモデルにおいて、NRCの有効半減期と酸素代謝改善効果との関係について検討し、その効力の持続性を明確にすることを試みた。

麻酔下でWistar系雄性ラットを用い、同種血漿による75%血液交換を行った後、NRCあるいは対照とするヒトまたはラットの洗浄赤血球もしくは生理食塩水を投与し、酸素代謝の指標として血中乳酸値・血液ガスを測定した。NRC群に関しては、さらにその動態変化の指標としてクリット値・メト化率を測定した。

生理食塩水群および未投与群では観察時間中に死亡する個体が認められ（4/5例、3/5例）、生存例においても血中乳酸値・血液ガスの基準値への回復は観察されなかった。一方、NRC群でのこれら酸素代謝の指標は、洗浄赤血球群と同様に投与終了6時間後まで概ね正常値の範囲内で推移した。この時、NRCクリット値・メト化率の測定結果から有効半減期は6時間程度と推定された。これらの結果、NRCの酸素代謝改善効果は、その有効半減期に相当する時間まで持続することが示された。

Abstract

NRC (Neo Red Cell), liposome encapsulated hemoglobin, as a blood substitute has a long circulation time achieved by modification of the liposomal surface with hydrophilic polymer. However, due to methemoglobin generation, it is thought that "half-life of efficacy" as the period to reduction by half of actual oxygen transport efficiency should be estimated by circulation time of liposome and rate of methemoglobin generation. In this study, to clarify the duration of efficacy of NRC, we examined the relationship between half-life of efficacy and efficiency in improving oxygen metabolism in a rat hemodilution model. Male wistar rats were anaesthetized, and 75% blood exchange was carried out with a homologous plasma. Either of NRC, RBC of human or rat or saline was administered at a dose of 20ml/kg. Indexes of hemodynamics and blood lactate, blood gases as indexes of oxygen metabolism were measured. In addition, NRC-crit and methemoglobin generation were measured in the NRC group. The results of NRC-crit (NRC volume as a percentage of blood) and methemoglobin generation suggested the half-life of efficacy of NRC was about 6 hours. All of the rats of NRC and RBC groups survived, while some of the rats of saline and no-infusion groups were dead within 6 hours after administration. The indexes of hemodynamics and oxygen metabolism in the NRC group were maintained the same as them in RBC group for 6 hours after administration. These results confirmed that oxygen metabolism in rats administered NRC can be maintained during the half-life of efficacy.

Keywords

NRC (Neo Red Cell), half-life of efficacy, oxygen metabolism, blood exchange, blood lactate

テルモ株式会社 研究開発センター 〒259-0151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500 Terumo Corporation R&D Center, 1500 Inokuchi,
Nakai machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa 259-0151, Japan
論文受付 2002年5月1日 受理 2002年5月29日

1. 緒言

NRC (Neo Red Cell) は、ヒトヘモグロビンをナノサイズのリポソームにカプセル化したナノカプセル型人工酸素運搬体であり、輸血治療代替を目指して開発が進んでいる¹⁻²⁾。将来NRCを臨床使用する際、どの程度酸素代謝改善効果が持続出来るかを予測することは、その使用法を規定する上で重要である。一方、従来のヘモグロビンを原料とした人工酸素運搬体の有効性評価においては、生体内における人工酸素運搬体の物質的な半減期のみが主に議論されてきたが、生体内での機能的な半減期としての議論は十分になされていなかった。NRCではリポソーム表面を親水性高分子にて修飾することによりリポソーム表面へのタンパク等の吸着を制御することで免疫系の認識を抑制し(ステルス化)，血中滞留性を向上させている³⁾。しかし、血中動態と生体の酸素代謝を改善する効力の持続時間についてはこれまで明確に出来ていなかった。生体内ではNRC中のヘモグロビンがメトヘモグロビンに酸化(メト化)されることに伴いNRCの酸素運搬能が低下することから、その実質的な機能の半減期(有効半減期)は、リポソームとしての半減期にメトヘモグロビンの生成速度を加味したものであると考えられた。

本実験では、ラットhemodilution modelにおいて、有効半減期と酸素代謝改善効果との関係について検討し、その効力の持続性を明確にするため、血中乳酸値および血液ガス値を主な指標として洗浄赤血球との比較検討を行った。

2. 方法

2.1. 被検物質(NRC)の製造方法⁴⁾

日本赤十字社より研究用として譲渡された期限切れ濃厚赤血球製剤を生理食塩水にて遠心洗浄、溶血後、フィルターによりstroma除去を行った。分画分子量100kDaの限外濾過膜(孔径15 nm)によるヘモグロビン精製後、ヘモグロビン濃度を45g/dlまで限外濾過により濃縮し、Stroma-free-hemoglobin (SFH)とした。Hydrogenated Soybean phosphatidylcholine: Cholesterol: stearic acid=1:1:1 (モル比) からなる混合脂質を60°Cの水で膨潤させ、これにSFH (β -NAD 0.1mM, inosine 6mM, inositol hexaphosphate 7mM添加)を加えて乳化処理し、SFHをカプセル化した。カプセル化されなかったSFHを分画分子量300kDaの限外濾過膜にて除去後、0.45μmおよび0.20μmフィルター処理し、ヘモグロビン濃度が6 g/dlになるように調整した。これにPolyethyleneglycol-conjugated phosphatidylethanolamine (PEG-PE) をリポソーム表面に導入し、NRCとした(Table 1.)。

2.2. 対照物質

溶媒対照として生理食塩水を、薬剤対照としてヒト洗浄赤血球(HRBC、ヘモグロビン濃度6 g/dlあるいは12g/dl)およびラット洗浄赤血球(RRBC、ヘモグロビン濃度12g/dl)を用いた。ヒトまたはラットよりcitrate phosphate dextrose solution (CPD液) 加採血を行い、採血1~3日後の使用時まで4°C保存した。使用当日に遠心処理により血漿除去後、生理食塩水にてヘモグロビン濃度を調整し、洗浄赤血球とした。なお、ヒト血

Table 1. Physicochemical properties and O₂ carrying capacity of NRC

Property	Value
Hemoglobin (g/dl)	6
Total lipid (g/dl)	4
Vesicle diameter (μm)	0.20-0.24
Initial Methemoglobin (%)	<5
Increase in Methemoglobin (%/month) ^a	<1
P ₅₀ O ₂ (mmHg)	40-45
Hill coefficient	2.0-2.2
A-V O ₂ content (ml/dl) ^b	4.5

a: Stored at 4°C. b: The volume of O₂ that could be delivered to tissues by the suspensions was calculated assuming the patient inhalation of oxygen, then lung and tissues PO₂ values to be 300 and 40 mmHg respectively.

液はテルモ研究用採血基準に従い、社内ボランティアの同意を得た上で採取を行った。

洗浄赤血球の酸素飽和度を以下の通り測定した⁵⁾。赤血球をリン酸緩衝液に懸濁し、37°Cにて1時間インキュベートさせた後、酸素分圧を150-0mmHg(pCO₂: 40mmHg)まで変化させ、その時の吸収スペクトルを測定した。

2.3. topload投与実験

Wistar系雄性ラット(体重323.4~350.9g)の体重を測定後、ラットホルダーに固定し、NRC 20ml/kgを2.0ml/kg/minの速さで尾静脈投与した。採血ポイントはサンプル投与終了後5 min, 4 hr, 24hr, 48hrの4点とし、それぞれNRCクリット測定用に2匹、NRCメト化率測定用に2匹ずつの計16匹使用した。各採血ポイントにてラットをエーテル麻酔後、開腹し、腹大動脈より採血を実施した。

2.4. hemodilution (HD) 実験

Wistar系雄性ラット(体重281.7~332.4g)の体重を測定後、2.0%イソフルランを含む45%O₂ガス(N₂ベース)にて吸入麻酔を行い、保温マットに固定、直腸温を37±1°Cに維持した。総頸動脈および大腿動脈にポリエチレンカテーテル(内径0.5 mm、外径0.8mm)を、気管内に留置針用カテーテル(14G: 内径1.73mm、外径2.17mm)をそれぞれ留置後、大腿静脈より臭化バニクロニウム(ミオブロック、三共株)の0.2mg/hr持続投与を開始した。同時に人工呼吸器(SN-480-7、シナノ製作所株)、設定条件: 3.3ml/回、40回/分)による吸入麻酔(1.4%イソフルランを含む45%O₂ガス(N₂ベース))を開始した。大腿動脈留置カテーテルを圧力トランスデューサー(TP-400T、日本光電株製)に接続し、血压用ひずみ圧力アンプ(AP-601G、日本光電株製)を介して動脈圧を測定した。このとき同時にアンプ出力をトリガーとして、心拍数測定ユニット(AT-601G、日本光電株製)を介して心拍数を測定した。動脈圧、心拍数のデータをレコーダー(RECTI-HORIZ-8K、日本電気工業株製)にて記録した。

投与群は未投与・生理食塩水・ラット洗浄赤血球(12g/dl)・ヒト洗浄赤血球(12あるいは6 g/dl)・NRCの計6群とし、各群n=5とした。採血ポイントは血液交換開始前(Pre)、血液

交換終了後(HD), サンプル投与終了後5 min, 3 hr, 6 hrの5点とし、総頸動静脈よりそれぞれ採血を行い、測定に用いた。Pre採血・測定を行い、動脈血pHが7.35-7.45の範囲内にあることを確認後、総頸静脈よりラット血漿(ヘパリン採血、遠心処理後に血漿採取を行い、-80°Cにて保存し、使用時には流水にて解凍した)を1.0ml/kg/minの速さで投与しながら総頸動脈より脱血を同速度で行い、血液交換を60分間実施した。血液交換終了後、直ちにHD採血・測定を実施した。統いて、総頸静脈より被検物質もしくは対照物質20ml/kgを2.0ml/kg/minの速さで投与した。投与終了後の観察時間中も保温マット使用および採血を行うため、水分補給として総頸静脈より生理食塩水の投与を1.0ml/hrの速度で実験終了時まで持続した。なお、投与終了後の観察時間は、後述のtopload投与実験の結果を踏まえて6時間と設定した。

2.5. 測定項目

topload投与実験ではNRCクリットおよびメト化率について、HD実験では下記に示した項目全てについて測定した。

循環指標として血圧および心拍数の測定を実施した。平均血圧(MBP)については次式より算出した。

$$\text{平均血圧(mmHg)} = \frac{\text{拡張期血圧} + (\text{収縮期血圧} - \text{拡張期血圧})/3}{2}$$

血液ガスおよび血中乳酸値は血液ガスシステム(ABL-555、ラジオメータートレーディング株)を用いて測定した。但し、過剰塩基(B.E.)値は次式にて算出した(式中のヘモグロビン濃度は赤血球およびNRC由来の合計である)⁶⁾。

$$\text{B.E. (mmol/L)} = (1 - 0.023 \times \text{Hb (mmol/L)}) \times ((\text{HCO}_3^- - 24.1) + (7.7 + 2.3 \times \text{Hb (mmol/L)}) \times (\text{pH} - 7.4))$$

ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値は多項目自動血球分析装置(SE-9000、東亜医用電子株)を用いて測定した。NRCクリットは以下の方法にて測定した。採取した血液をテキストラン(平均分子量188000、SIGMA製)8%を含む生理食塩水と1:1の割合で混和後、ヘマトクリット毛細管にて吸引した。吸引した溶液の長さ(A1)をノギスにて測定した。遠心処理(15000g、45分間)後、NRCの長さ(A2)をデジタルノギスにて測定し、次式よりNRCクリットを算出した。

$$\text{NRCクリット (\%)} = A2/A1 \times 2 \times 100$$

NRCメト化率は以下の方法にて測定した。実験終了後に採血を行い、遠心分離(1300g、4°C、10分間)により上清を回収した。上清を超遠心分離(50000g、10°C、120分間)によりNRCを回収し、生理食塩水に浮遊させた後、テキストラン(平均分子量188000、SIGMA製)12%を含む生理食塩水と2:1の割合で混和した。液体窒素による凍結融解処理後、遠心分離(1300g、4°C、10分間)を行い、上清にNRC由来ヘモグロビンを回収し、シアンメト法によってメト化率を測定した。

NRCクリットおよびメト化率の結果より、酸素運搬能を保持するNRCのクリットを次式にて算出した。

$$\text{酸素運搬能を保持するNRCクリット (\%)} = \text{NRCクリット (\%)} \times (100 - \text{NRCメト化率 (\%)}) / 100$$

2.6. 統計解析

HD実験の結果に関して統計処理を実施した。値を平均値±標準偏差で表した。各採血ポイントでの群間比較としてTurkey's検定を実施し、有意水準5%とした。但し死亡例が認められた場合、その採血ポイントでの群について統計解析を行わなかった。

3. 結果

3.1. topload 投与実験

NRC投与終了5分後のNRCクリットは平均9.7%であり、24時間後には平均3.4%と半分以下に減少した。さらにメト化率の結果から、NRCの有効半減期はおよそ6時間程度と推定された。なお、投与終了48時間後ではNRCクリット値が4分の1以下に減少し、充分量のNRCを確保できず、メト化測定するに至らなかつた(Fig. 1)。

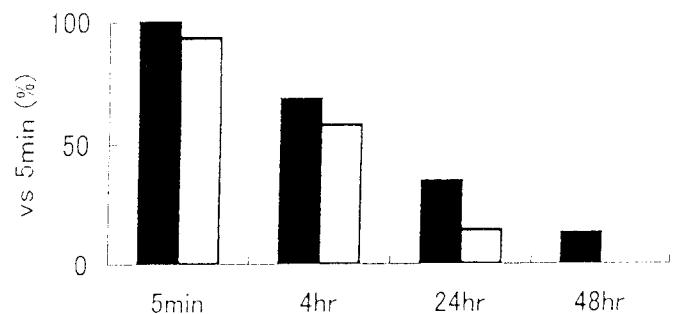


Fig. 1. Blood concentration of NRC on topload model. ■: total NRC-crit (% vs 5min), □: NRC-crit with function estimated by NRC-crit and methemoglobin ratio (% vs 5min of total NRC-crit).

3.2. HD実験

3.2.1. 赤血球の酸素飽和度

ヒトおよびラット洗浄赤血球のP₅₀はそれぞれ26.5, 31.8mmHgであり、ラット洗浄赤血球の酸素解離曲線の方が低親和性方向(右側)にシフトしていた(Fig. 2)。

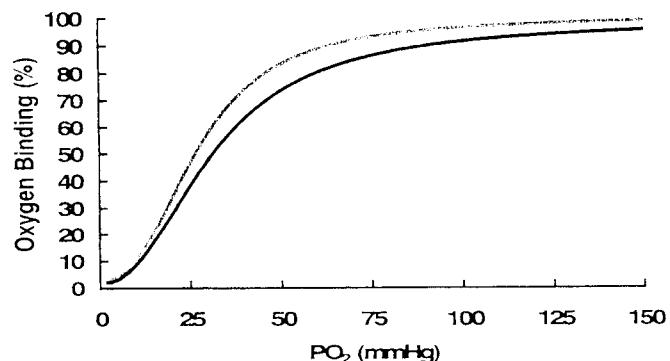


Fig. 2. Dissociation curve of HRBC (gray line) and RRBC (black line).

3.2.2. 生存数

未投与群および生理食塩水群では投与終了5分後から3時間

後の間に各1例ずつ死亡した。さらに投与終了3時間後から6時間後の間に、前者は2例、後者は3例死亡した。RRBC(12g/dl)群、HRBC(6,12g/dl)群およびNRC群では実験終了時まで5例全て生存した。

3.2.3. 循環動態

PreのMBP平均値は各群とも100-120mmHg程度であり、有意な差は認められなかった。血液交換により血圧の低下が認められ、RRBC(12g/dl)群、HRBC(6,12g/dl)群およびNRC群ではサンプル投与により血圧の回復が認められた。生理食塩水群では回復の認められた個体(2例)と認められなかつた個体(3例)に分かれた(Table 2)。心拍数に関しては、死亡個体を除いて300-500beats/minの範囲内であり、有意な差は認められなかった。

Table 2. Changes in mean arterial blood pressure (mmHg).

	Pre	HD	5min	3hr	6hr
No-infusion	121±15	...	84±12	70±9*	75†
Saline	121±17	74±17	74±18*	61±5*	78‡
RRBC(12g/dl)	121±16	94±11	125±11*	104±24	88±23
HRBC(12g/dl)	101±6	73±7	102±17	90±23	98±17
HRBC(6g/dl)	114±14	68±4	95±22	91±16	88±20
NRC	113±10	73±16	110±17	91±15	78±11

Data means average(n=5)±S.D. a:p<0.05 saline vs RRBC(12g/dl). *n=4, †n=2, ‡n=1.

3.2.4. 血中乳酸値

血液交換により、各投与群の血中乳酸平均値は2.2-2.5倍の増加が認められた。NRC群とRRBC(12g/dl)群では投与終了3hr後に有意差がついたが、いずれも概ね基準値(4-18mg/dl)^{7,8)}の範囲内であった。生理食塩水群ではサンプル投与による血中乳酸値の低下はほとんど認められず、時間と共に増加傾向にあった。未投与群では、投与終了3時間後に数値上昇が認められた個体と6時間後に認められた個体とに分かれた。HRBC(6g/dl)群では、一時的に数値低下が認められたものの、投与終了6時間後において2例で血中乳酸値の明らかな上昇が認められた結果、高値傾向を示した(Fig. 3)。

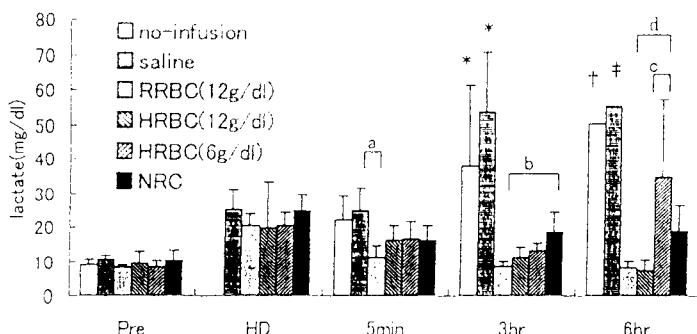


Fig. 3. Concentration of lactate in mixed venous blood. Data means average(n=5)±S.D.
a:p<0.05 saline vs RRBC(12g/dl), b:p<0.05 RRBC(12g/dl) vs NRC, c:p<0.05 HRBC(6g/dl) vs RRBC(12g/dl), d:p<0.05 HRBC(6g/dl) vs RRBC(12g/dl). *n=4, †n=2, ‡n=1.

3.2.5. 血液ガス

血液交換により各投与群のpH平均値はわずかに低下したもの、各群間での有意差は認められなかった。投与終了6時間後において、未投与群および生理食塩水群の生存例ではいずれも基準値(7.35-7.45)⁹⁾を下回っていた。HRBC(12g/dl)・RRBC(12g/dl)・NRC群では投与終了後の状態観察時間において一時的に基準値を外れた個体もあったが、いずれも時間と共に回復傾向を示した。HRBC(6g/dl)群では投与終了6時間後において、1例が7.2を下回っていた結果、低値傾向を示した(Table 3)。

Table 3. Changes in arterial blood pH.

	Pre	HD	5min	3hr	6hr
No-infusion	7.427±0.013	...	7.386±0.017	7.428±0.059*	7.339†
Saline	7.404±0.029	7.389±0.028	7.380±0.027	7.369±0.035*	7.280‡
RRBC(12g/dl)	7.397±0.026	7.371±0.020	7.345±0.041	7.401±0.033	7.389±0.015
HRBC(12g/dl)	7.403±0.027	7.388±0.024	7.378±0.024	7.412±0.036	7.412±0.033
HRBC(6g/dl)	7.409±0.022	7.375±0.039	7.362±0.028	7.424±0.037	7.332±0.086
NRC	7.413±0.013	7.393±0.023	7.388±0.030	7.455±0.032	7.399±0.047

Data means average(n=5)±S.D. *n=4, †n=2, ‡n=1.

血液交換により全ての個体でv-pO₂(混合静脈血酸素分圧)値の低下が認められた。投与終了6時間後において、未投与群および生理食塩水群の生存例ではいずれも30mmHgを下回っていた。HRBC(6g/dl)およびNRC群では30mmHg付近を示し、HRBC(12g/dl)およびRRBC(12g/dl)群では概ね35-40mmHgを示した(Table 4)。

Table 4. Changes in mixed venous blood pO₂(mmHg).

	Pre	HD	5min	3hr	6hr
No-infusion	47.7±1.8	...	34.6±2.5	30.8±2.7*	28.0†
Saline	47.6±5.7	33.7±3.2	33.1±2.6*	28.9±3.0*	27.6‡
RRBC(12g/dl)	48.8±3.6	36.1±4.2	44.8±4.3*	37.8±5.3	38.6±3.2‡
HRBC(12g/dl)	48.4±5.5	32.9±1.4	39.5±4.6	32.6±4.1	35.1±2.3
HRBC(6g/dl)	47.3±7.3	33.7±1.9	36.3±3.3	28.2±2.5	30.9±3.6
NRC	44.4±4.9	31.5±1.8	36.3±4.3	27.9±4.4	29.7±2.3‡

Data means average(n=5)±S.D. a:p<0.05 saline vs RRBC(12g/dl), b:p<0.05 RRBC(12g/dl) vs NRC.

*n=4, †n=2, ‡n=1.

B.E.値は血液交換後においても大きく変動することはなかった。しかし、未投与群および生理食塩水群では数値が基準値(-2-2mM)⁶⁾に回復しなかった。HRBC(6g/dl)群のうち、血中乳酸値の高い個体では基準値を大きく下回ったものの、それ以外は基準値の範囲内であった。HRBC(12g/dl)・RRBC(12g/dl)・NRC群では概ね基準値の範囲内を示した(Fig. 4)。

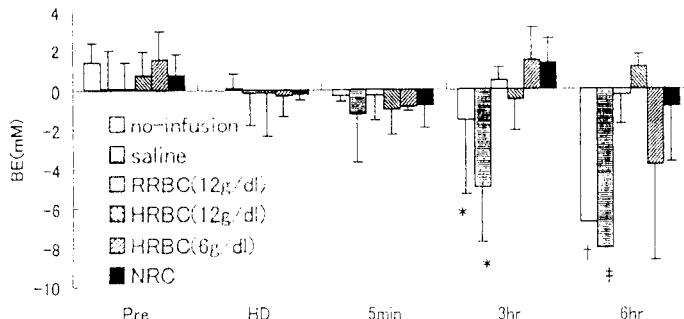


Fig. 4. Base excess of arterial blood. Data means average ($n=5$) ± S.D. *: $n=4$, +: $n=2$, #: $n=1$.

3.2.6. ヘマトクリット値, NRCクリット値, NRCメト化率

HD時でのヘマトクリット値はいずれも9-12%の範囲内であった。このときの各個体の血液交換率は71.7-78.8%の範囲内であり、各群の平均値は約76%であった。

試料投与終了5分後のNRCクリット値は $10.4 \pm 0.4\%$ であった。投与終了6時間後には約 $7.4 \pm 0.5\%$ に減少した。さらにNRCメト化率の結果から、酸素運搬能を保持するNRCとしてのクリット値は約5.7%と算出され、投与終了5分後に比べて半減したことから、その有効半減期は6時間程度と推定された(Fig. 5)。

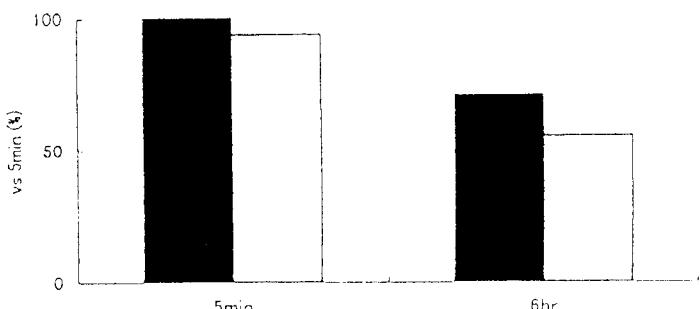


Fig. 5. Blood concentration of NRC on hemodilution model. ■: total NRC-crit (% vs 5min), □: NRC-crit with function estimated by NRC-crit and methemoglobin ratio (% vs 5min of total NRC-crit).

4. 考察

日本厚生省の血液製剤の使用指針によると¹⁰⁾、外科的適応(術中投与)の場合、循環血液量の20-50%出血時には、細胞外液系輸液薬(乳酸リンケル液、酢酸リンケル液など)および赤血球濃厚液を投与し、必要に応じて人工膠質液(HES、デキストランなど)を投与すると記されている。NRCは主にこの赤血球濃厚液に置き換わる人工酸素運搬体としての適応を想定しているため、まず循環血液量を確保した上でその使用が望ましいと考えられる。また、American Association of Blood BanksのTechnical manualによると¹¹⁾、循環血液量が充分にコントロールされているような状態では、輸血開始の判断基準の一つにヘモグロビン濃度7g/dL以下(ヘマトクリット値約20%以下)と記されている。

一方、いわゆる術前の10/30ルール(ヘモグロビン濃度10g/dL、ヘマトクリット値30%以上)に関しては慣習的なものであり根

拠がない。循環血液量が確保されていれば、ヘモグロビン濃度が10g/dL以下に低下しても酸素分圧のA-V較差が大きくなる結果、酸素運搬効率が高まり、組織への酸素供給を充分に行うことが可能になる。実際に酸素供給量が生体の VO_2 を満たすことができなくなるのは、理論上、クリティカルDO₂と呼ばれるヘマトクリット値10%を下回ったときといわれている¹²⁾。そこで、NRCの投与によって VO_2 を満たし、酸素代謝改善効果がどの程度持続するのか検証するため、血液交換によりヘマトクリット値を10%程度にまで低下させた後、各サンプルを投与する評価モデルにて実験を実施した。

未投与群・生理食塩水群では一部死亡例が認められ、生存例においてもpH・重炭酸イオン濃度・B.E.値の低下、血中乳酸値の上昇が認められたことから、組織での乳酸蓄積による代謝性アシドーシスの状態であったと判断した。生理食塩水群では投与終了3時間後の乳酸値は全例で明らかな上昇が認められたが、未投与群では投与終了6時間後に初めて乳酸値が上昇した個体が一部存在した。死亡数も前者の方が多かったことから、サンプル投与による容量負荷・血液交換による影響は否定できないと考えられた。一方、NRCの血中動態については、hemodilution modelにおいても、topload modelでの投与実験の結果と概ね同様の傾向を示していたことから、血液交換による影響は小さいと考えられた。

RRBCの酸素解離曲線はHRBCのそれと比べて低親和性方向(右側)にシフトしており、酸素運搬能が異なるため、RRBCのみをNRCの薬剤対照として用いることには疑問が残る。このことから、HRBCも加えた上で比較検討することとした。但し、異種血液であるHRBCを投与することに関しては細網内皮系による貪飢能・補体系への影響が否定できない。そこで、RRBC(12g/dL)群との比較を行ったところ、概ねHRBC(12g/dL)投与群と同様の結果が得られたこと、HRBC投与後に異種血液投与によるショック症状などは特に認められなかったことから、少なくとも単回投与で観察期間の短い本実験においては薬剤対照として妥当であると判断した。

HRBC(12g/dL)・RRBC(12g/dL)・NRC群ではサンプル投与による平均血圧の回復が認められ、実験終了時まで血液ガス値や血中乳酸値も基準値を大きく外れることはなかった。現在米国で開発中の非カプセル型人工酸素運搬体では、血中動態に関しては血中ヘモグロビンの濃度変化を指標として示されている¹³⁻¹⁴⁾。しかし、生体内ではヘモグロビンのメト化進行もあり、その実質的な機能の半減期である有効半減期は、ヘモグロビン濃度としてのそれよりも短くなると考えられる。同様のことはNRCについても言え、投与終了6時間後のNRCの動態データから、ラットでの有効半減期は6時間程度と推定された。

HRBC(6g/dL)群では実験終了時まで酸素代謝改善効果が持続した個体と乳酸アシドーシスの状態になった個体とに分かれた。クリティカルDO₂のポイントまで血液交換を行う厳しい条件のため、効果が持続した個体においても辛うじて VO_2 を満たすことができた状態で、このことがばらつきの原因と考えられた。一方、NRC投与群では概ねその効果が持続していた。両投与群のv-pO₂の変動パターンは同様の傾向を示していたことから、酸

素飽和度のA-V較差はNRC投与群の方が大きく、酸素運搬効率も高いと考えられた。出血あるいは血液交換に伴う血液物性の変化に伴い、末梢組織における循環動態に変化を生じる状況においても、NRCはその物性(RBCに比べてその大きさが約1/40(直徑約200nm)でかつ低粘性)を生かして、微小循環を改善し、組織への酸素供給を効果的に行っていったのかもしれない。同じヘモグロビン濃度であれば、より酸素運搬効率の高いNRCの方が効果を發揮し、赤血球とほぼ同等の酸素代謝改善効果を示すことが動物実験においても確認できた。さらに、NRCはこの有効半減期に達する時間まで、生体内での酸素代謝改善効果をほぼ維持していたと判断した。

今後、イヌやブタのような大動物で同様の試験を行い、ヒトでのNRC血中動態と効力の持続時間を予測する必要があると考えられる。イヌでの予備的検討実験の結果、ラットに比べてNRC血中滞留時間が長い結果が得られたことから、より長い時間NRCの効力が持続する可能性があると考えられた。その理由として、一般的に体重の小さい動物ほど体重に対する体表面積比が大きく、基礎代謝が盛んであることが考えられる。実際、赤血球寿命もヒトでは約120日であるのに対し、イヌでは約100日、マウスでは約40日である^{[5][6]}。従って、ヒトではさらに長い時間効力が持続することが期待される。

5. 結論

NRCは有効半減期に達するまで、生体内での酸素代謝改善効果をほぼ維持していたことが明らかとなり、酸素解離曲線から得られるNRCの高い酸素運搬効率が動物実験においても確認できた。大動物でのNRC効力持続性評価試験を行い、ヒトでのNRC血中動態を予測することが今後の課題である。

本論文の要旨を第8回日本血液代替物学会年会にて発表した。

参考文献

1. Tsutsui Y, Asakawa Y, Goto H, Kimura T, Ogata Y. Assessment of the oxygen transport capacity of NRCs with a 70% blood exchange in rats. *Artif Cells Blood Subst Immobil Biotechnol* 1998;26:465-75.
2. Ohki N, Kimura T, Ogata Y. The reduction of methemoglobin in Neo Red Cell. *Artif Cells Blood Subst Immobil Biotechnol* 1998;26:477-85.
3. 鈴木一比好、後藤博、緒方嘉貴、坂口圭介、岡本武、上谷利治、高橋晃、リボソーム型人工赤血球(ネオレッドセル:NRC)、人工血液 1994;2:39-40.
4. Ogata Y. Evaluation of human hemoglobin vesicle as an oxygen carrier: Recovery from hemorrhagic shock in rabbits. *Polym Adv Technol*. 2000;11:1-6.
5. 緒方嘉貴、岡本武、鈴木一比好、上谷利治、Methemoglobin還元機構を有した人工赤血球(NRC)の開発. 人工血液 1994; 2:62-6.
6. 松崎健三. Base Excessとbuffer base. 講説新刊号第5版(2). 大阪: 日本臨床社, 1999;268-72.
7. 上谷誠之. 乳酸. 講説新刊号第5版(1). 大阪: 日本臨床社, 1999;642-5.
8. Mizock BA. Lactic acidosis. *Dis Mon* 1989;35:233-300.
9. 上藤翔二. 第4章pHと酸・塩基平衡. 浅井宏裕. 血液ガステキスト. 東京: 分光堂, 1990;85-120.
10. 厚生省医薬安全局長. 血液製剤の使用指針. 厚生省医薬安全局長通知. 医薬発第715号. 平成11年6月10日.
11. American Association of Blood Banks. 19 Blood Transfusion Practice. Vengelen-Tyler V, Benson K, Branch DR, Calhoun L, Dzik WH, Leparc GF, et al. Technical Manual 12th edition. Bethesda, MA: American Association of Blood Banks, 1996;413-45.
12. Winslow RM. A Physiologic Basis for the Transfusion Trigger. Winslow RM, Vandegriff KD, Intaglietta M. *Blood Substitutes Physiological Basis of Efficacy*. Boston, MA: Birkhauser 1995;25-41.
13. Hughes GS, Francom SF, Antal EJ, Adams WJ, Locker PK, Yancey EP, Jacobs EE. Hematologic effects of novel hemoglobin-based oxygen carrier in normal male and female subjects. *J Lab Clin Med* 1995;126:444-51.
14. Palaparthi R, Kastrissios H, Gulati A. Pharmacokinetics of diaspiron cross-linked haemoglobin in a rat model of hepatic cirrhosis. *J Pharm Pharmacol* 2001;53:179-85.
15. 清崎直孝. 赤血球の機能と人工赤血球. 人工血液 1999;7:35-9.
16. Landaw SA. Factors that accelerate or retard red blood cell senescence. *Blood Cells* 1988;14:47-59.

人工血液を用いた灌流液による肝常温灌流装置の開発

Development of ex vivo normothermic liver perfusion system using artificial blood.

桂巻 正, 縫 明大, 菊地 仁, 久木田和磨, 永山 稔,
日黒 誠, 木村 仁, 平田公一

Tadashi Katsuramaki, Akihiro Nui, Hitoshi Kikuchi, Kazuma Kukita, Minoru Nagayama,
Makoto Meguro, Hitoshi Kimura, Koichi Hirata.

和文抄録

生体血液を用いた肝常温灌流法は報告されているが、生体物質を用いない人工的産物による常温肝灌流法の開発は報告されていない。われわれは人工血液を用いた人工産物組成による灌流液を作成し、豚肝を体外で常温灌流させて機能を維持させることができあるか検討した。体重20kgの豚の肝臓を摘出し、門脈に流入用チューブ、肝下部下大静脈に流出用チューブを挿入し、灌流液を37°Cに保温しながら人工肺にて酸素化しつつ、300ml/minの流速で9時間灌流した。灌流液は人工産物による組成で、テルモ社より供給された人工血液 (Neo Red Cell) 600ml、肝細胞用培養液L15 40ml、蒸留水240ml、アルブミン27g、NaHCO₃ 2.2g、50%ブドウ糖2ml、NaOH 90mg、KCl 3.6ml、インスリン0.6ml、デキサメザン0.9mlを混和させて作成した。灌流中は門脈へ流入する灌流液の酸素分圧は400Torr以上を維持でき、酸素消費量は灌流4時間までは10ml-O₂/min以上を維持できたが、それ以降は漸減した。ATP産生とアミノ酸代謝も確認された。組織学的検討では灌流中の肝組織の構築は保たれており、PAS染色にてグリコーゲン顆粒が肝細胞に蓄積されていた。以上の結果から人工血液を用いた灌流液によって体外で肝臓の機能を維持させることが可能であった。

Abstract

Although there were normothermic extracorporeal liver perfusion circuits using physiological blood, true artificial perfusion systems have not been developed. We tried to make an ex vivo functioning liver with an artificial perfusate that consisted of artificial blood in the pig liver. A liver graft from a female pig weighing 20 kg was harvested in the usual manner. The perfusion solution used consisted of artificial blood, (Neo Red Cell, Terumo Co.) L-15 medium, distilled water, bovine serum albumin, NaHCO₃, NaOH, KCl, human regular insulin, 50% glucose solution, and dexamethasone. The isolated liver was perfused with this oxygenated perfusate through the portal vein at a rate of 300 ml/min for 9 hr. During perfusion, oxygen consumption of the liver was maintained at over 10 ml-O₂/min until 4 hr after perfusion, however gradually decreased after then. Production of ATP and amino acid metabolism was recognized. Histological examination showed almost normal hepatic architecture. Although liver cells at just after laparotomy showed the absence of glycogen deposits by PAS staining, numerous liver cells exhibited PAS-positive cytoplasmic glycogen deposits after 4 hr perfusion. These observations indicated that we succeeded in developing an ex vivo functioning liver with an artificial perfusate employing use of artificial blood.

Keywords

liver, normothermic perfusion, artificial blood, extracorporeal perfusion

はじめに

近年のバイオテクノロジーの発達により肝細胞培養が可能となり¹⁾、さらに再生医学の発達によって小型肝細胞などから成熟

した肝細胞を作り出すことも可能となっている²⁾。しかしながら、肝細胞から臓器を作り出すには、細胞が増殖してある程度の細胞塊を形成した時点で充分な酸素と栄養が細胞塊全体に行き渡

札幌医科大学医学部 外科学第一講座 〒060-8543 札幌市中央区南1条西16丁目 First Department of Surgery, Sapporo Medical University, School of Medicine, South-1, West 16, Chuo-ku, Sapporo, 060-8543, Japan.

論文受付 6月17日 受理 6月28日

らせなくてはならないが、現時点では単純な細胞培養ではこれは不可能である。われわれは再生医学の発達のためには臓器そのものを培養する臓器培養法の開発も極めて重要であると考えている。細胞培養と同じコンセプトに立てば、細胞培養液の中で充分な酸素を細胞へ供給できるシステムが可能であれば、細胞培養と同様に臓器培養も可能になるのではないかと思われる。

一方、肝においては今までに生体の血液を希釈させた灌流液で常温灌流させた報告があり^{3,4)}、肝不全患者における人工肝臓としての使用^{5,7)}、肝臓移植におけるグラフト肝保存としての使用^{8,9)}が報告されている。しかしながら、これらの報告はいずれも酸素運搬体として生体の血液を用いている。

本研究では臓器培養法開発の基礎的研究として従来より報告されている肝常温灌流において、酸素運搬物質として生体の血液を使わずに人工血液を使用した灌流液を作成し、肝を体外において機能を維持しながら灌流させることができるとか検討した。

方法

実験には20kgの雌豚を使用した。まず豚の肝臓を通常の肝移植実験と同様にグラフトとして冷却したラクテック液を門脈より灌流して摘出した。摘出した肝臓の重量は420gで、門脈・肝下部下大静脈に流入用チューブ・流出用チューブ(12Fトロッカーカーテール)を挿入し、肝動脈、肝下部下大静脈は結紮した。胆囊は摘出し総胆管にチューブを挿入して排出される胆汁量を測定した。灌流液は酸素運搬物質としてテルモ社より供給された人工血液(Neo Red Cell)を使用し、人工血液600ml、肝細胞用培養液L15 40ml、蒸留水240ml、アルブミン27g、NaHCO₃ 2.2g、50%ブドウ糖2ml、NaOH 90mg、KCl 3.6ml、インスリン0.6ml、デキサメザゾン0.9mlを混和させて作成した(表1)。最終調整段階での灌流液のヘモグロビン濃度は4.9g/dlであった。灌流装置は人工肺(CAPIOX[®]、テルモ社、東京、日本)、バイオポンプ(Bio Medics, Minneapolis, MN, USA)、リザーバーを設置したone way回路を作成した(図1)。灌流液を人工肺で酸素化し300ml/minの流速で門脈に挿入したチューブより流入させた。灌流中は灌流液を37°Cに保温し9時間灌流した(図2)。

Table. 1

Component of perfusion solution

NRC	600ml
distilled water	240ml
L-15	40ml
albumin	27g
NaHCO ₃	2.2g
NaOH	90mg
KCl	3.6ml
insulin	24 IU
50% glucose solution	2ml
dexamethazone	0.9ml

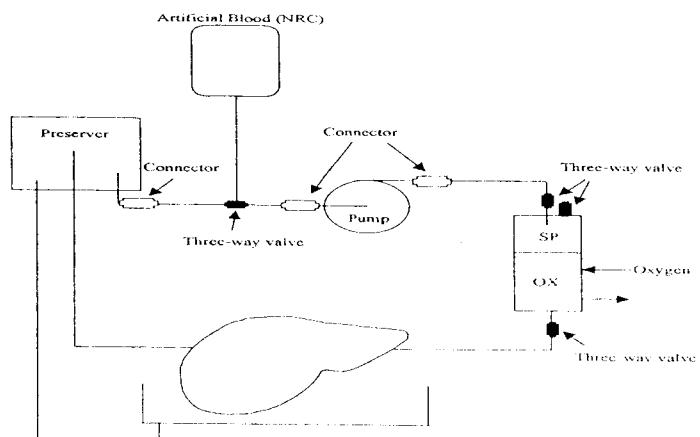


Fig. 1 Diagram of the ex vivo liver perfusion circuit. The perfusion system consists of an oxygenator including a heat exchanger, a Bio pump, and a preserver. The isolated liver was perfused with oxygenated perfusate at a rate of 300 ml/min through the portal vein. Outflow of the perfusate was collected from the infrahepatic vena cava.

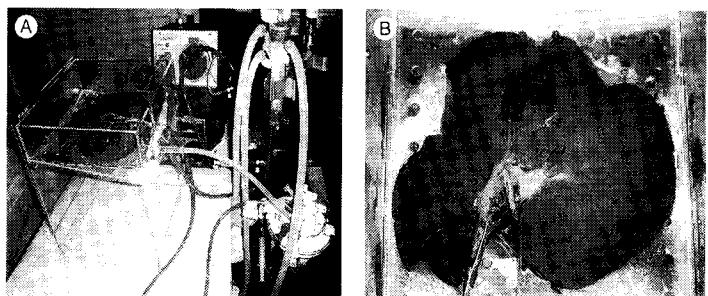


Fig. 2 The isolated liver was perfused with an oxygenated perfusate at a rate of 300 ml/min through the portal vein for 9 hr. (A) perfusion system. (B) liver during perfusion.

灌流中に経時的に灌流液をサンプリングし、一部を直ちにガス分析機ABL 520 (Radiometer Co., USA)にて酸素飽和度、酸素分圧を測定し、一部は-80°Cに冷凍保存しaspartate aminotransferase (AST)を自動生化学分析機(AV5200, オリンパス、東京、日本)で測定した。また、灌流液のアミノ酸分析を自動アミノ酸分析機(Aminotac JLC-500/V, 日本電子、東京、日本)にて測定した。

肝組織を開腹時、灌流開始後5時間、9時間目に採取し、一部は採取後直ちに液体窒素に保存してATPを測定し、一部はホルマリン固定して保存し、後に組織学的検討に供した。ATP測定は従来より報告されている方法に準じて行った¹⁰⁾。

酸素消費量は以下の式によって計算した。
 細胞の酸素消費量(ml/min)=灌流液から供給された(消費されたものとみなす)
 酸素量+NRCから供給された(消費されたものとみなす)酸素量
 灌流液から供給された酸素量=人工肺で酸素化された灌流液中の酸素量(pre)-組織によって酸素が消費された後の灌流液中の酸素量(post)。灌流液中の酸素量:mO₂(mmol/L)=(pO₂)/(760-飽和水蒸気压)/Henry定数×1000。灌流液から供給された酸素量(ml/dL)=pre-post. NRCから供給された酸素量

nO_2 (mmol/L) = [{酸素飽和度(pre-post) × (ヘモグロビン濃度(g/dL) - メトヘモグロビン濃度(g/dL)) × 10} / 64450] × 4 × 1000.
NRCから供給された酸素量(ml/dL) = (nO_2 × RT/P) × (1/10).

結果

1. 灌流液中酸素分圧、飽和度

流入灌流液の酸素分圧は灌流中は400Torr以上を保っていた。流出灌流液の酸素分圧は灌流4時間までは60Torr以下であったが5時間をおこると70Torr以上となりその後徐々に上昇した。同様に酸素飽和度も流入灌流液は灌流中は100%近くであったが、流出灌流液の酸素飽和度は灌流4時間までは70%以下であったが5時間を超えると徐々に上昇し70%以上となった(図3)。

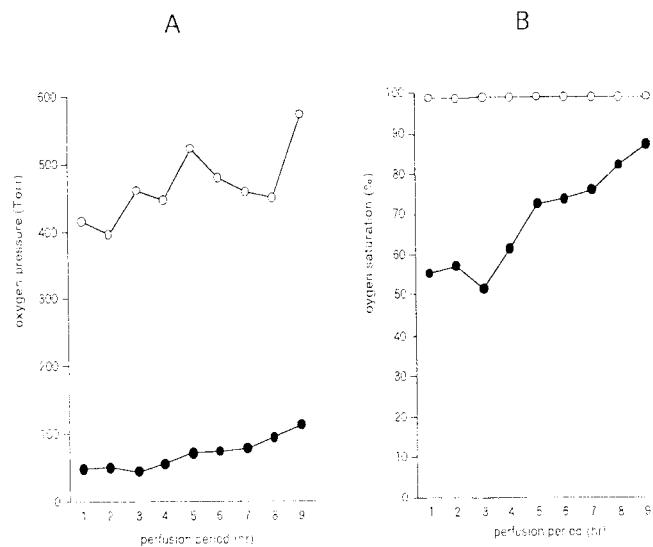


Fig. 3 Changes of oxygen pressure (A) and oxygen saturation of NRC (B). Open circles indicate perfusate of inflow, and closed circles indicate that of outflow.

2. 肝酸素消費量

肝酸素消費量は灌流4時間までは10ml-O₂/min以上を維持していたが、5時間目以降は漸減した(図4)。

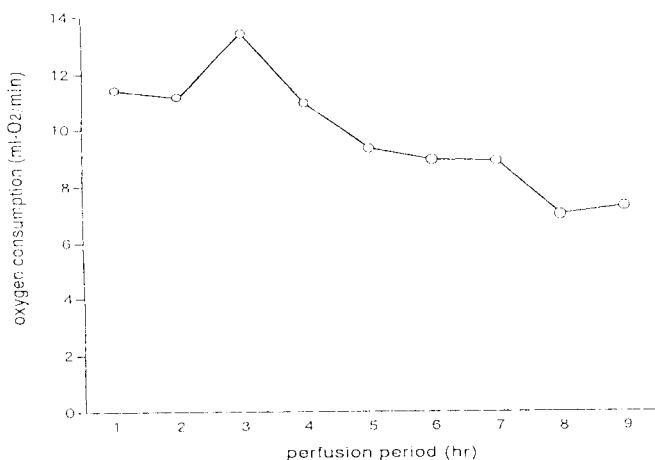


Fig. 4 Changes of oxygen consumption in perfusate. Oxygen consumption was mostly over 10 ml-O₂/min until 4hr after perfusion, and then gradually decreased.

3. 胆汁排出量

胆汁排出量は灌流開始後3時間までは2.5ml/h以上排出を認めたが4時間以後徐々に減少し、5時間以後は0.5ml/hであった(図5)。

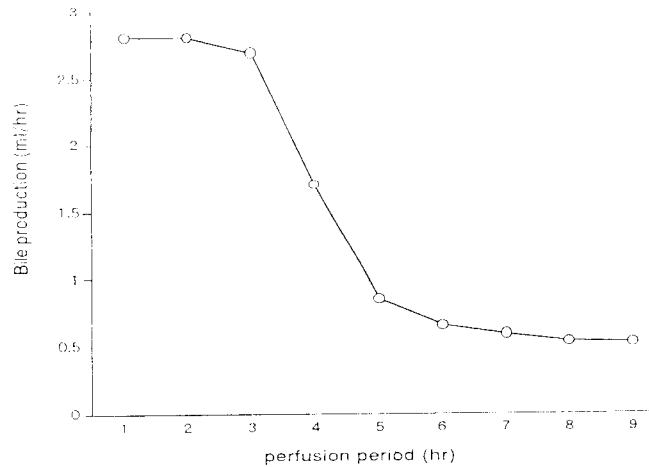


Fig. 5 Bile production. Bile was produced over 2 ml/hr until 3 hr after reperfusion. However, bile production were gradually decreased after 5 hr.

4. 灌流液中AST

灌流開始後5時間までは400IU/Lでほとんど変化がなかったが、灌流7時間目以降上昇し9時間目で1610IU/Lに達した(図6)。

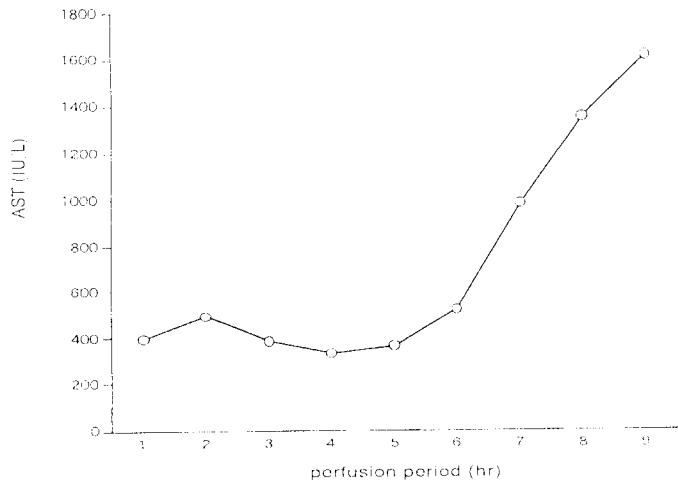


Fig. 6 Changes of AST in perfusate. AST was almost the same level until 6 hr after perfusion. However, AST was increased after 7 hr.

5. ATP測定

開腹時の肝組織のATPは1.60μmol/g-wet, energy chargeは2.23であったが、灌流5時間目ではATPは0.66μmol/g-wet, energy chargeは1.81, 灌流10時間目ではATPは0.71μmol/g-wet, energy chargeは1.03で灌流10時間目でも比較的エネルギー産生は保たれていた(表2)。

Table. 2

Energy charge of hepatic tissue

	AMP (μmol/g-wet)	ADP (μmol/g-wet)	ATP (μmol/g-wet)	Energy charge
Pre	0.15	0.47	1.60	2.23
5 hr	0.62	0.53	0.66	1.81
10 hr	0.12	0.20	0.71	1.03

6. アミノ酸代謝

灌流液中のアミノ酸分析において新たなアミノ酸の産生(Tau, Trp, Asp, Glu, AAA, Cit, Cys, Pro)と消失(Arg, Asn, Met, Tyr, Phe)を認めた(図7)。

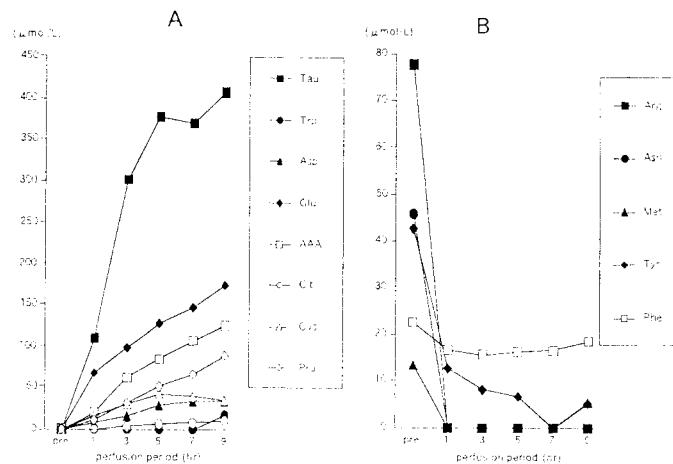


Fig. 7 Changes of amino acid in perfusate. There were increased amino acids; Tau, Trp, Asp, Glu, AAA, Cit, Cys, Pro (A) and decreased amino acids; Arg, Asn, Met, Tyr, Phe (B).

7. 組織学的検討

HE染色では灌流5時間において肝組織の組織構築は保たれていた(図8)。PAS染色において開腹時の肝組織は絶食のためグリコーゲンの蓄積は認めていなかったが、再灌流後5時間では肝組織中にグリコーゲンの蓄積を認めた(図9)。

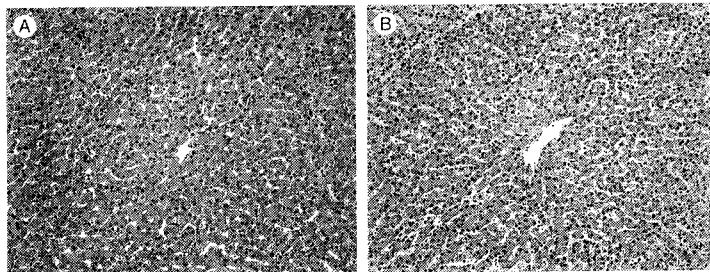


Fig. 8 Hepatic architecture was well preserved at 5 hr after perfusion, and there was no difference between before (A) and after (B) perfusion.

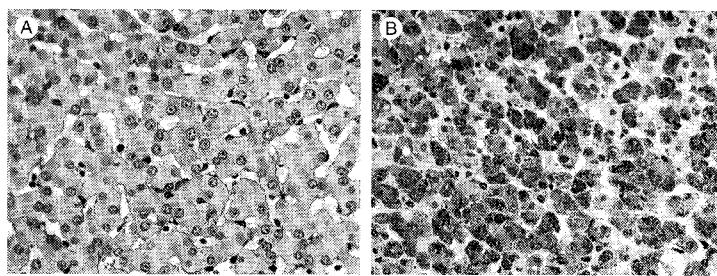


Fig. 9 Liver cells just after laparotomy show absence of glycogen deposits by PAS staining (A). After 5 hr of perfusion, numerous liver cells exhibit PAS-positive cytoplasmic glycogen deposits (B).

考 察

人工血液は代替赤血球として臨床応用を目指して開発されているが本邦では未だに臨床の場で使用されてはいない。しかし、酸素運搬体として本研究のように臓器灌流において応用できるのではないかと考えられる。細胞培養が可能である現在、酸素を運搬さえできれば細胞培養のように臓器培養も可能かもしれない。また、肝においては従来より常温肝灌流についての報告があるが^{3,4)}、これらはいずれも酸素供給として生体の血液を使用しており、言い方を変えると体外で酸素化した血液を供給しているだけにすぎない。酸素運搬体を人工血液に置き換え、さらに灌流液の組成を細胞培養液に準じれば、臓器培養法が可能でないかと考え、本研究では人工血液を用いた灌流液を作成して豚の肝臓を体外で灌流することを試みた。

まず、灌流液を作成したが酸素運搬体としてテルモ社より提供された人工血液、Neo Red Cellを用いた。これを基本として肝細胞培養液L-15、アルブミン、ブドウ糖、インスリン、デキサメサン、電解質を混和させ、蒸留水を加えて浸透圧を280 mOsm/Lになるように調節した。基本的には肝細胞培養液に酸素運搬体を加えた構成を考えた。灌流回路はよりシンプルにするために門脈より流入用カテーテルを肝下部下大静脈に流出用カテーテルを挿入し、人工肺は流入回路側に設置してバイオポンプにて灌流液を灌流させた。肝動脈からは灌流しなかった。

その結果、酸素消費量が9時間まで維持できたこと、PAS染色にて肝細胞にグリコーゲンの蓄積を認めたこと、ATP産生を認めたこと、アミノ酸代謝を認めたことなどから、本装置によって肝は機能していたと考えられた。灌流時間は9時間で決して長くはないが、人工血液、培養液などほとんど人工産物による肝常温灌流装置は報告がなく、本検討が初めてと思われた。

しかしながら、酸素飽和度は灌流4時間までは10ml O₂/minであったが、5時間を過ぎると徐々に低下し、それに呼応して胆汁排出量も灌流5時間より低下し、灌流液中のASTも灌流7時間目で上昇した。酸素飽和度の低下、胆汁排出量の低下、ASTの上昇から考えると、灌流5時間以後は肝のviabilityが徐々に低下したと考えられた。灌流5時間以後のviabilityの低下の原因としては、まず人工血液の濃度が充分でないことが考えられた。本灌流液のヘモグロビン濃度は最終調整段階では4.9g/dLであるが、灌流中は3.5g/dLに低下しておりヘマトクリット換算では12%であった(データ未提示)。これは生体の血液の3分の1以下

であり、充分に酸素が肝臓全体に行き渡っていない可能性がある。また、本実験では肝動脈から灌流液を流していないが、肝全体に酸素を供給するためには肝動脈からの灌流も必要であるかもしれない。さらに、灌流液自体の組成もまだ検討する余地がかなりあると考えられる。たとえばアルギニンが灌流後1時間で消失しているが、アルギニンは血管拡張作用を有する一酸化窒素(NO)の供給源となるアミノ酸なので、NO低下による微少循環不全の出現も考えられる。灌流途中でアルギニンのような物質を補充する必要があるかもしれない。その他に老廃物の蓄積による肝障害も考えられ、透析回路の設置も考慮する必要があるだろう。しかしながら、5時間までは本灌流装置で充分に機能させることができたと考えられるので、今後さらに上記のような問題点を改良できれば長時間の灌流維持が可能になると思われる。

人工血液を用いたほぼ完全な人工産物による灌流液によって、豚肝を機能させながら体外で常温灌流することが可能であった。再生能力旺盛な肝臓のような臓器では体外で肝臓を再生させることは可能と思われ、再生医学分野における応用が期待できる。われわれは臓器培養法の開発を最終目標としているが、これが可能になれば正常に機能する臓器を常に維持できることで緊急的な臓器移植にグラフト臓器を常に供給できること、心停止ドナーからのグラフト臓器など障害のあるグラフト臓器を移植前に回復させること、灌流された臓器のみに特定の遺伝子を導入させること、などが可能になると想定している。今後、このような研究を続けることで人工血液の新たな利用分野が期待できると思われる。

参考文献

- Mitaka T, Sattler CA, Sattler GL, Sargent LM, Pitot HC. Multiple cell cycles occur in rat hepatocytes cultured in the presence of nicotinamide and epidermal growth factor. *Hepatology* 1991;13:21-30.
- Mitaka T, Sato F, Mizuguchi T, Yokono T, Mochizuki Y. Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology* 1999; 29:111-125.
- Rodriguez-Reynoso S, Portilla E, Garcia D, Larios F, Romero M, Muniz J, Vazquez G, Leal C. Blood flow rate and energy charge in the isolated perfused canine liver. *J Surg Res* 2001;99:40-46.
- Foley DP, Vittimberga FJ, Quarfordt SH, Donohue SE, Traylor AN, MacPhee J, McLaughlin T, Ricciardi R, Callery MP, Meyers WC. Biliary secretion of extracorporeal porcine livers with single and dual vessel perfusion. *Transplantation* 1999;68:362-368.
- Nakamura N, Kamiyama Y, Takai S, Kamiya T, Imamura A, Matsui Y, Wei T, Kaibori M, Satoi S, Saitoh T, Yoshida H, Yoshida K, Kwon AH. Ex vivo liver perfusion with arterial blood from a pig with ischemic liver failure. *Artificial Organs* 1999;23:153-160.
- Horslen SP, Hammel JM, Fristoe LW, Kangas JA, Collier DS, Sudan DL, Langnas AN, Dixon RS, Prentice ED, Shaw BW Jr, Fox IJ. Extracorporeal liver perfusion using human and pig livers for acute liver failure. *Transplantation* 2000;70: 1472-1478.
- Borie DC, Eyraud D, Boleslawski E, Lemoine A, Sebagh M, Cramer DV, Roussi J, Imbert-Bismut F, Germain G, Hannoun L. Functional metabolic characteristics of intact pig livers during prolonged extracorporeal perfusion: potential for a unique biological liver-assist device. *Transplantation* 2001;72:393-405.
- Dutkowski P, Odermatt B, Heinrich T, Schonfeld S, Watzka M, Winkelbach V, Krysiak M, Junginger T. Hypothermic oscillating liver perfusion stimulates ATP synthesis prior to transplantation. *Surg Res* 1998;80:365-372. 1998
- Schön MR, Kollmar O, Wolf S, Cshrem H, Matthes M, Akkoc N, Cshnoy NC, Neuhaus P. Liver transplantation after organ preservation with normothermic extracorporeal perfusion. *Ann Surg* 2001;233: 114-123.
- Mei DA, Gross GJ, Nithipatikom K. Simultaneous determination of adenosine, inosine, hypoxanthine, xanthine and uric acid in microdialysis samples using microbore column high-performance liquid chromatography with a diode array detector. *Anal Biochem* 1996;238:34-39.

酸素輸液(ヘモグロビン小胞体)を含有する血清の生化学的検査*

Clinical Chemistry of Blood Serum Containing Hemoglobin-vesicles as O₂ Carriers

酒井 宏水¹⁾, 富山 賢一¹⁾, 政田 陽平¹⁾, 武岡 真司¹⁾, 堀之内 宏久²⁾, 小林 純一²⁾, 土田 英俊¹⁾
Hiromi Sakai¹⁾, Kenichi Tomiyama¹⁾, Yohei Masada¹⁾, Shinji Takeoka¹⁾, Hirohisa Horinouchi²⁾,
Koichi Kobayashi²⁾, Eishun Tsuchida¹⁾

和文抄録

ヘモグロビン小胞体 (HbV) の赤血球代替物としての優れた酸素運搬機能が投与試験から明らかにされてきた。今後更に安全性を評価するにあたって血液の生化学的検査が必須項目になるが、HbVの微粒子分散系による阻害作用が懸念されていた。そこで本研究ではHbVの阻害作用の確認と、その回避法を検討することを目的とした。ヒトプール血清にHbV ([Hb]=10 g/dL), 精製Hb溶液, 生理食塩水を50 vol%まで混合し、血液生化学的検査30項目の測定を自動分析装置により実施し、阻害の程度を比較した。またHbVを混合した血清に関しては、HbVを超速心分離(50,000g, 20 min)した上清、また高分子量デキストラン(分子量200 kDa)を添加した後、通常の遠心分離(2,700g, 30 min)にてHbVを除去した上清の血液生化学的検査を同様に行った。HbVが血清中に存在すると殆どの項目で阻害作用が確認され、その程度はHb溶液の混在の場合と同等、或いはそれ以上であった。これは検査項目の殆どが比色法や比濁法による測定であり、Hbに特有の紫外可視光領域の吸収や、微粒子分散系による光散乱の影響と考えられる。またHbVの成分も脂質や蛋白質の項目に加算された。一方、上記2方法でHbVを分離した血清では、殆どの項目で阻害作用を除去することができた。これは細胞型HbVでのみ可能な方法であり、利点の一つとして主張できる。

Abstract

A suspension of hemoglobin-vesicles (HbV) is an artificial O₂ carrying fluid for the substitution of the red blood cell function, and its O₂ transporting ability *in vivo* has been extensively studied. It is important to clarify the interference of the HbV suspension on serum clinical chemistry, and to establish a pretreatment method to avoid such an interference. The HbV suspension, acellular Hb solution ([Hb]=10 g/dL), or saline was mixed with a pooled human serum at various mixing ratios up to 50 vol%, and the magnitude of the interference effect of HbV and Hb on 30 clinical laboratory tests was studied. The mixture of the HbV suspension and serum was ultracentrifuged (50,000g, 20 min) to remove the HbV particles as a precipitate and the supernatant was analyzed and compared with the saline control group. The HbV was also removed by centrifugation (2,700g, 30 min) in the presence of dextran (Mw. 200 kDa). The HbV suspension showed a considerable interference in most laboratory tests, and most of which were more serious than those of the acellular Hb solution. These findings are thought to be due to the light absorption of Hb in HbV and the light scattering derived from the suspension that interfere with the colorimetric and turbidimetric measurements. The components of HbV may also interfere with or participate in the chemical reaction of the assays. Removal of the HbV from the supernatant diminished the interference with the laboratory tests. This will be an advantage of HbV in comparison with acellular Hb solutions.

Keywords

clinical chemistry, interference effect, hemolysis, lipemia, blood substitutes

* 本研究の一部は、第8回日本血液代替物学会年次大会にて報告した。

1) 早稲田大学理工学総合研究センター, 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1 Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University, Tokyo 169-8555, Japan 2) 慶應義塾大学医学部外科, 東京都新宿区信濃町35 Department of Surgery, Keio University School of Medicine, Tokyo 169-8682, Japan

論文受付 2002年5月9日 受理 2002年5月31日

1. 緒言

血液生化学的検査の項目数は年々増大する傾向にあり、自動分析装置によって日常的に測定され、その簡便さから病態を知るための一次検査として欠かすことのできない診断法の一つであることは言うまでもない。ところが、欧米で進展している非細胞型の修飾ヘモグロビン (Hb) 溶液の臨床試験において、採血液を遠心分離しても血清中に修飾Hbが混在するため(図1)、比色法や比濁法で得られた検査値が実際の値から著しく解離することが問題になっている^{1,2}。修飾Hbは血漿蛋白質と分子量が同等であるため除去が困難で^{3,4}、影響を受ける測定項目については自動分析装置の利用が不可能となり、測定法や機種の厳密な検討を行って独自の方法を臨床試験に備えて確立しておく必要がある。

我々はこれまでに細胞型のHb小胞体 (HbV) の投与試験からその十分な酸素運搬機能を実証してきた^{5,6}。HbVの粒子表面はポリエチレンギリコール (PEG) 鎖で修飾してあるため血中における分散安定度が高く⁷、投与後の採血液を通常の遠心分離をした後でもHbVは血清中に存在するため、自動分析装置を用いた血液生化学的検査において不可能となる項目があった。特にHbV粒子の場合は、内水相のHbに起因する特有の紫外・可視光領域の吸収に由来する影響に、更に粒子分散液に起因する光散乱の影響が加算され(図2)、比色法や比濁法による定量において著しい障害作用を示すので、対応策の確立が急務となる。そこで本研究では、ヒト血清に各種混合比でHbまたはHbVを添加して血液生化学的検査を行い、HbVの障害作用を明確すると共に、遠心分離操作によりHbVを除去する方法を検討した。

2. 方法

HbVの調製は従来法^{7,8}に従って行った。脂質成分としては、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine、コレステロール、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerolが5/5/1のモル比で含まれる。更に外表面にはPEG脂質 (PEG-DSPE) が0.3mol%導入されている。HbVは生理食塩水に分散

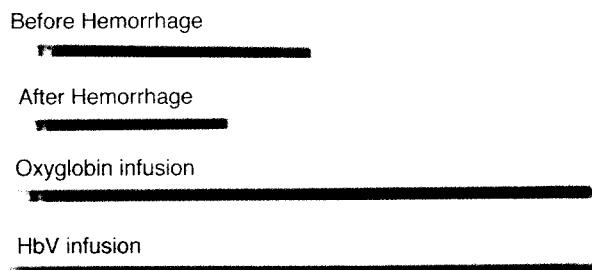


Figure 1 Pictures of glass capillaries for the hematocrit measurements during the resuscitation of hemorrhagic shocked hamsters. The centrifuged glass capillary containing blood after the infusion of Oxyglobin (glutaraldehyde-polymerized bovine Hb, Biopure Co.) showed a red colored supernatant due to the presence of Hb components. In the case of HbV infusion, HbV does not precipitate at the normal centrifugation condition (10,000g, 5 min), therefore, the supernatant is red and turbid.

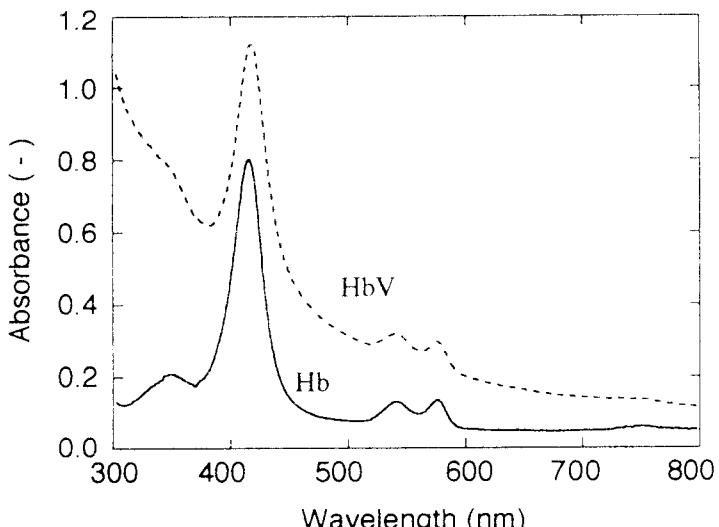


Figure 2 Absorption spectrum of Hb and HbV at [Hb] = 0.01 g/dL in a 10 mm cuvette measured using a UV/vis spectrophotometer. The significant turbidity is confirmed especially at shorter wavelength for an HbV suspension.

させ、Hb濃度を10 g/dLに調節した。その他の物性値：粒径 251 ± 80 nm, [metHb] < 5%, [HbCO] < 3%, [リン脂質] = 6.3 g/dL, [コレステロール] = 2.7 g/dL, P_{50} = 31 Torr。また、比較試料として精製Hb溶液 (10 g/dL、生理食塩水に溶解) を用いた。

ヒトフル血清に0, 10, 20, 30, 40, 50%の混合比で精製HbまたはHbV、生理食塩水を混合し検体とした(図3)。また、HbV混合試料については、超遠心分離 (50,000g, 20 min)、または高分子量デキストラン (分子量20万、自血球分離用、和光純薬製) の20 wt%水溶液を10 vol%添加してから通常の遠心分離 (2,700g, 30 min) を行い、得られた上清液を回収して検体とした。血液生化学的検査30項目の測定を行った(BML社依頼、Hitachi 7450, JEOL JCA-BM12 analyzer)。カリウムイオン濃度に関しては電極法によって測定されるが、その他の測定項目には紫外可視光領域の吸光度を測定する操作が含まれる¹⁹。

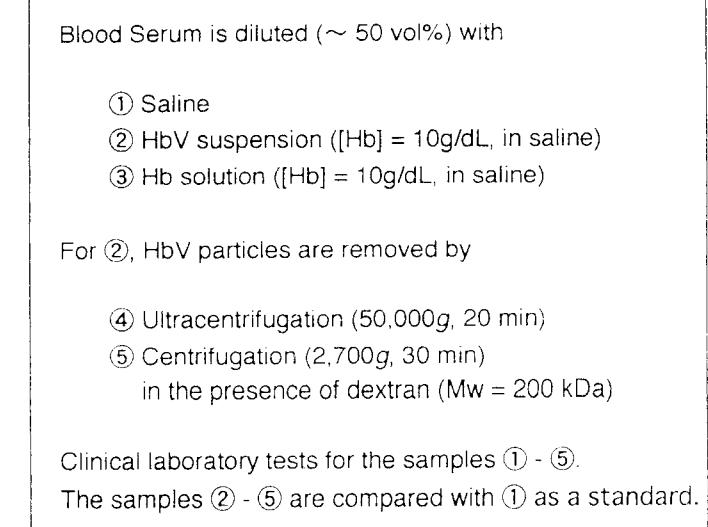


Figure 3 Experimental procedures for the study of clinical chemistry of blood serum containing HbV.

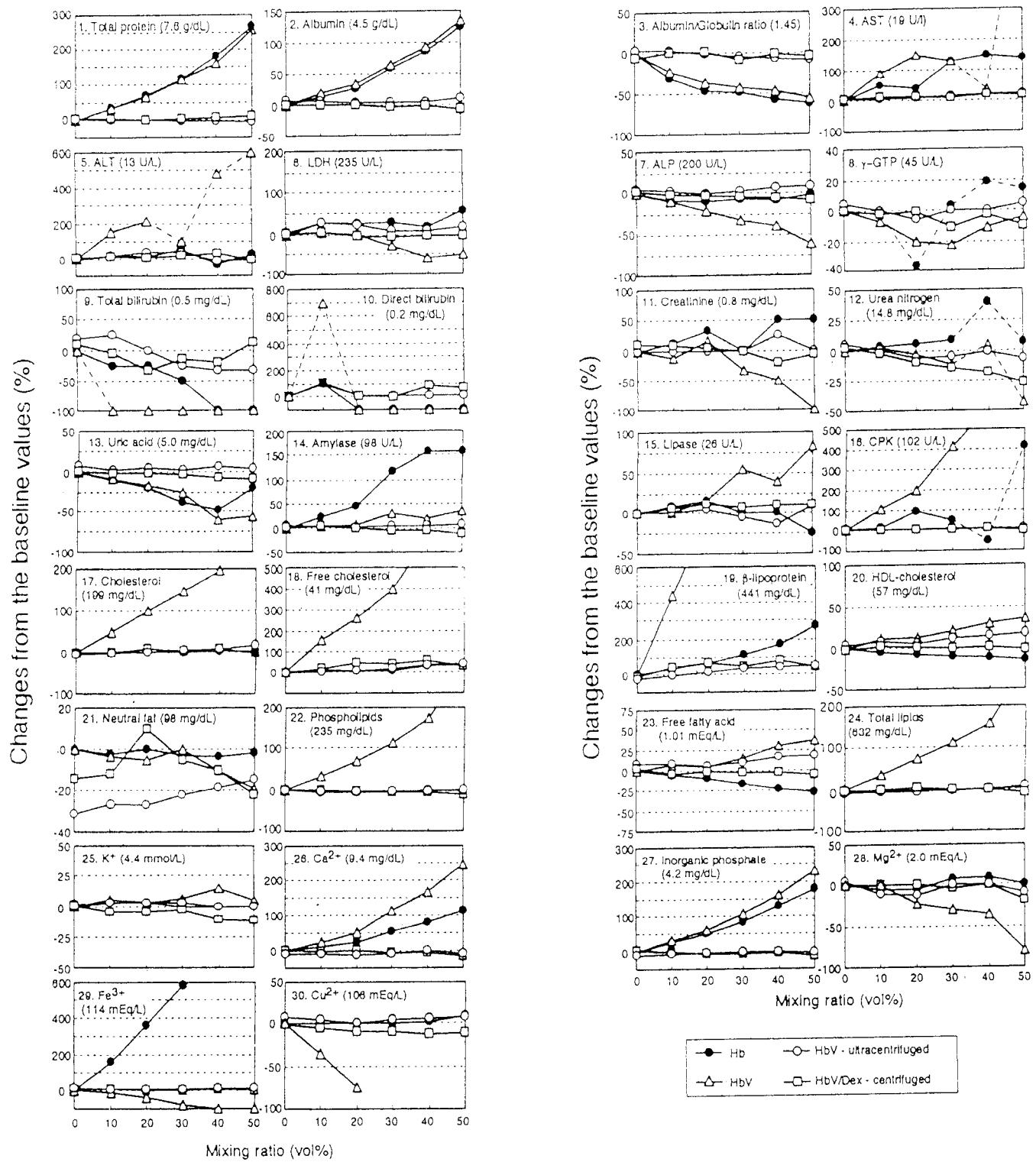


Figure 4 Clinical chemistry of human serum after mixing with HbV (\triangle) and Hb (\bullet), after removal of HbV by ultracentrifugation (\circ), and after removal of HbV by centrifugation in the presence of dextran (Dex) (\square). The interference effect was expressed as the changes (%) from the value of serum mixed with saline at the same mixing ratio. Unstable values were observed for AST, ALT, total and direct bilirubins, and urea nitrogen with HbV, and for γ -GTP, urea nitrogen and CPK with Hb, so that the plots were connected by broken lines. The values in the parentheses are the analyte concentrations of the pooled serum. (AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; LDH, lactate dehydrogenase; ALP, alkaline phosphatase; γ -GTP, γ -glutamyltransferase; CPK, creatine phosphokinase).

HbV分散液中のHbV粒子の占有体積は39.5%であるので、血清とHbV分散液を混合した系列は、生理食塩水やHb溶液を混合した場合に比較して実際の希釈度は小さい。そこでHbVを分離した血清中の各測定項目の濃度に関しては、HbVの占有体積を考慮して濃度補正を行った。例えば、血清3 mLとHbV分散液2 mLを混合した場合（混合比40%）、実際には $1.21\text{ mL} = 2 \times (1 - 0.395)$ の生理食塩水を使って血清を希釈したことになる。デキストラン溶液を10 vol%添加した系についても、同様の補正を行った。精製Hb溶液を混合した系列ではこのような補正是行わなかった。

かった。

血清と生理食塩水の混合系列で得られた各混合比での測定値を基準値とし、Hb、HbV混合系列およびHbV分離系列で得られた値と基準値との較差（誤差）をパーセント表記した。米国FDAのClinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA)の規定する測定誤差の許容範囲(CLIA limit)²⁰⁾を測定可否の判断基準とした⁷⁾。CLIA limitが規定されていない測定項目に関しては、測定値誤差の許容範囲を仮に20%とした。測定誤差がCLIA limitまたは20%を越えない上限のHb、HbV混合比を求めた。

Table 1 Summary of the influence of the presence of Hb or HbV on blood serum clinical chemistry and the effect of removal of HbV by ultracentrifugation or centrifugation in the presence of Dex to avoid the interference effect of HbV (Fig. 4). (+) and (-) indicate the direction of interference effect with a deviation exceeding the CLIA limits (ref. 20). We set the deviation limit of 20% for the analytes which do not have CLIA limits (indicated as ND). The degree of interference effect was expressed as the volume ratios (vol%) of the Hb solution or the HbV suspension mixed with the pooled serum at which the deviations do not exceed the CLIA limits or 20%. "50 vol%" indicates that the deviation does not exceed the limit up to the maximum mixing ratio of 50 vol% (Hb concentration = 5 g/dL), and "< 10 vol%" indicates that the deviation exceeds the limit at the mixing ratio of 10 vol% (Hb concentration = 1 g/dL). The concentrations of the analytes of the pooled serum are expressed in Fig. 4.

Analyte	CLIA limit	Volume ratio of Hb or HbV of which the deviation does not exceed the CLIA limit or 20%			
		Hb-mixed	HbV-mixed	HbV-ultracentrifuged	HbV/Dex-centrifuged
1) Total protein	± 10%	(+), < 10 vol%	(+), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
2) Albumin	± 10%	(+), < 10 vol%	(+), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
3) Albumin/globulin ratio	ND, used ± 20%	(-), < 10 vol%	(-), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
4) AST ^a	± 20%	(+), < 10 vol%	(+), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
5) ALT ^b	± 20%	(+), < 30 vol%	(+), < 10 vol%	(+), < 20 vol% ^c	(+), < 40 vol% ^c
6) LDH ^d	± 20%	(+), < 10 vol%	(-), < 30 vol%	50 vol%	50 vol%
7) ALP ^e	± 30%	50 vol%	(-), < 30 vol%	50 vol%	50 vol%
8) γ-GTP ^f	ND, used ± 20%	(-), < 20 vol%	(-), < 30 vol%	50 vol%	50 vol%
9) Total bilirubin	± 0.4 mg/dL or ± 20% ^g	(-), < 40 vol% ^h	(-), < 10 vol% ^h	50 vol% ^h	50 vol% ^h
10) Direct bilirubin	ND ^h	(-), < 10 vol% ^h	(-), < 10 vol% ^h	50 vol% ^h	50 vol% ^h
11) Creatinine	± 0.3 mg/dL or ± 15%	(+), < 20 vol%	(-), < 20 vol%	(+), < 40 vol%	(-), < 40 vol%
12) Urea nitrogen	± 2 mg/dL or ± 9%	(+), < 40 vol%	(-), < 30 vol%	50 vol%	(-), < 30 vol% ⁱ
13) Uric acid	± 17%	(-), < 20 vol%	(-), < 20 vol%	50 vol%	50 vol%
14) Amylase	± 30%	(+), < 20 vol%	(+), < 50 vol%	50 vol%	50 vol%
15) Lipase	ND, used 20%	(-), < 50 vol%	(+), < 30 vol%	50 vol%	50 vol%
16) CPK ^j	± 30%	(+), < 20 vol%	(+), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
17) Total cholesterol	± 10%	50 vol%	(+), < 10 vol%	(+), < 50 vol%	50 vol%
18) Free cholesterol	ND, used ± 20%	(+), < 40 vol%	(+), < 10 vol%	(+), < 40 vol% ^k	(+), < 20 vol% ^k
19) β-Lipoprotein	ND, used ± 20%	(+), < 10 vol%	(+), < 10 vol%	(+), < 30 vol% ^k	(+), < 10 vol% ^k
20) HDL-cholesterol	± 30%	50 vol%	(+), < 50 vol%	50 vol%	50 vol%
21) Neutral fat (Triglyceride) ± 25%	50 vol%	50 vol%	(-) ^l	50 vol% ^l	50 vol% ^l
22) Phospholipid	ND, used ± 20%	50 vol%	(+), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
23) Free fatty acid	ND, used ± 20%	(-), < 40 vol%	(-), < 40 vol%	50 vol%	50 vol%
24) Total lipid	ND, used ± 20%	50 vol%	(+), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
25) K ⁺	± 0.5 mmol/L (used ± 11%)	50 vol%	50 vol%	50 vol%	50 vol%
26) Ca ²⁺	± 1 mg/dL (used ± 10%)	(+), < 20 vol%	(+), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
27) Inorganic phosphate	ND, used ± 20%	(+), < 10 vol%	(+), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
28) Mg ²⁺	± 25%	50 vol%	(-), < 30 vol%	50 vol%	50 vol%
29) Fe ³⁺	± 20%	(+), < 10 vol%	(-), < 20 vol%	50 vol%	50 vol%
30) Cu ²⁺	ND, used ± 20%	50 vol%	(-), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%

a) aspartate aminotransferase.

b) alanine aminotransferase.

c) L-lactate dehydrogenase.

d) alkaline phosphatase.

e) γ-glutamyltransferase.

f) creatine phosphokinase.

g) Interferences are seen even after the removal of HbV, however, the deviations are significantly decreased in comparison with the samples before the HbV removal (see Fig. 4, No. 5, 18, and 19).

h) Due to the low concentrations of bilirubin in the pooled serum used (Total bilirubin 0.5 mg/dL, Direct bilirubin 0.2 mg/dL) which are close to the CLIA limit (0.4 mg/dL), the interference effect was judged if the analyte concentration is completely inhibited and the deviation shows -100%.

We determined that the ultracentrifugation and centrifugation allowed measurement.

i) A part of urea should bind to HbV/Dex precipitate.

j) Neutral fat should be phase separated on the top of the supernatant.

3. 結果

HbVを混合した血清を超遠心分離(50,000g, 20 min)すると血清には、HbVは含まれず、透明溶液であった。また高分子量デキストラン添加後に遠心分離(2,700g, 30 min)した場合も透明な上清が得られた。

血液生化学的検査30項目の測定結果を図4および表1にまとめた。Hb混合系では21項目について基準値からの較差(誤差)が許容範囲を超え、著しい阻害作用が認められた。HbV混合系では28項目について阻害作用が認められた。例えば総蛋白質濃度はBiuret法によって検出され、Hbも蛋白質として加算される。HbVを分離した系では23項目で阻害作用は認められず、また6項目(アラニンアミノトランスフェラーゼ、クレアチニン、尿素窒素、総コレステロール、遊離コレステロール、 β -リボ蛋白)ではHbVの混合比が高いときにまだ阻害作用が認められるものの改善が見られた。超遠心分離操作により負誤差が中性脂質に、またデキストラン添加後の遠心分離の影響が尿素窒素に負誤差として認められた。HbVを除去しても遊離コレステロールと β -リボ蛋白に正誤差が認められた。直接および間接ビリルビンは、フル血清に含まれる量がともと著しく低く、また測定感度も0.1mg/dLであるため正確な測定ではないが、HbV混合系では測定不可、HbVを除去すると測定可能となった。

4. 考察

酸素輸液の投与は一般薬剤とは比較にならないくらい大量投与を伴うので、血液生化学的検査に及ぼす影響も多大であり、測定法に対する影響を明確にし、阻害作用がある場合にその回避策を用意しておくことは重要な課題である。本研究によりHbVがHb溶液と同等或いはそれ以上に著しい阻害作用を示すことが明らかとなったので、HbVの分離法を検討したところ、超遠心分離法で簡単に除去できた。しかし臨床現場に超遠心分離機が必ずしも設置されていないので、簡便法として高分子量デキストランを添加して遠心分離する方法を検討したところこれも有効であり、何れの分離法によても殆どの項目でHbVによる阻害を回避できた。

他方、架橋Hbや重合Hbなどいわゆる修飾Hb溶液系に関する報告によると、複数の自動分析装置を試して阻害作用の少ない機種を選定して対処したり⁶、また溶血や乳糜血に対応できる特殊機種の開発なども行われている²¹。しかし通常の方法からできるだけ逸脱せず、汎用自動分析装置で機種に依らず一定の値が得られることが望まれている。Balionらは不溶性のアニオン性高分子電解質(HemogloBind™, Ligochem社製, Fairfield, NJ)で架橋Hbを血清から除去する前処理法を検討したが¹⁰、完全除去はできず加えてこのアニオン性高分子電解質が他の蛋白質を吸着する可能性も否定できない。またHb濃度と阻害効果の相関を予め調べておけば補正できるが、使用機種や分析法にも依存し、極めて複雑な処理となろう。更にHbの吸収スペクトルか配位子の有無や酸化状態の相違(HbO₂, deoxyHb, metHb)によって微妙に変化することも計算を複雑にする可能性がある。

HbV粒子表面のPEG修飾により、血液成分との相互作用が抑制され、HbV粒子間の凝集が生じせず粘度も血液と同等で、投

与後の微小循環動態も維持される^{14,20}。投与後の採血をヘマトクリット測定用のキャビラリー管に入れて遠心分離(10,000g, 5 min)すると、血球成分は沈降するが上清にHbVが浮遊する(図1)。しかし更に超遠心分離(50,000g, 20 min)すると容易に除去できた。これはHbVの粒径(250 nm)がHb分子のそれ(7 nm)よりも大きく赤血球(8000 nm)よりも小さい、更に濃厚Hb(35wt%)が内包されているため血清よりも高密度である特性に起因する。除去の確認は上清の透明性から簡単に判断できる。また、より低い遠心力でHbVを沈降させるために高分子量デキストランの添加を検討した。リン脂質小胞体の凝集惹起剤としてPEGとデキストランが知られているが、高分子量PEGは蛋白質を凝集する可能性があるので、我々は白血球分離にも多用される高分子量デキストランを選択した。デキストランの水酸基と小胞体表面との水素結合によって凝集が生起し、分子量が15kDa以上で小胞体の凝集が観測されるが、完全に凝集させるには分子量100 kDa以上が必要である^{23,25}。そこで白血球分離用デキストラン(200 kDa)を添加したところ、通常の遠心分離機でも容易にHbVを沈降分離させることができた。検査項目のうち尿素窒素で顕著な負誤差が認められたが、これは尿素が水素結合によってHbVとデキストランの凝集体中に取り込まれたためと考えられる²⁶。

HbVを遠心除去すると脂質類の測定項目の阻害作用は著しく低下するが、遊離コレステロールに最大40%、 β -リボ蛋白に最大50%の正誤差が認められた。これはHbVの二分子膜構成成分であるコレステロールやリン脂質が血清中に移動した可能性を示唆している^{27,28}。しかし総脂質含量では殆ど同じであり、移動量は僅かと考えられる。トリグリセリドの負誤差は、遠心分離によってトリグリセリドが遠心管上部に相分離したことに起因すると考えられる。トリグリセリドに関してはHbVを分離しなくても正確に測定ができ、HbVの阻害作用は無いといって良い。

本実験では生理食塩水に分散させたHbVを血清と混合したので、血清の希釈度とHbVの占有体積を考慮した補正処理を行った。しかし実際に投与実験を行った場合は、生理食塩水は生体内では血管から間質に速やかに分布するため、希釈効果は同様にはならないと考えられる。従ってin vivoでの検査値に本研究の結果は直接的には反映しない。HbVの投与実験を想定した場合、採血の遠心分離処理で血球とHbVを排除した上清を血清とみなして、補正せずに検査することになる。

結論として、HbVが血清中に混在すると、Hbの光吸収とHbV粒子による光散乱のために血液生化学的検査28項目において正確な測定が困難になった。これはHb溶液を混合した場合の阻害作用(21項目)よりも著しかった。しかし、HbVは遠心分離により完全に除去でき、殆どの項目でより正確な分析が可能となった。本研究では血液生化学的検査のうち、一般的な項目についてのみ検討を行ったに過ぎず、他の測定項目、更に免疫学的、血清学的、血液学的検査項目についても阻害作用の有無を確認する必要があろう。

本方法を導入して、HbV投与後の安全性に関する研究も既に開始しており、ラットに20 ml/kg投与した場合の血液生化学的検査では、特に異常は認められていない。詳細については別の

機会に報告したい。

謝辞

本研究の一部は、厚生科学研究（高度先端医療研究事業；人工血液開発分野）および日本学術振興会科学研究費補助金（B12558112, B12480268）によって行われた。記して謝意を表す。

参考文献

1. Glick MR, Ryder KW. Double trouble: hemolysis and stabilized hemoglobins (so you think you're seeing red now?). *Clin Chem* 1993;39:1761-1763.
2. Ma Z, Monk TG, Goodnough LT, McClellan A, Keipert PE, Scott MG, et al. Effect of hemoglobin- and perflubron-based oxygen carriers on common clinical laboratory tests. *Clin Chem* 1997;43:1732-1737.
3. Sarkozi L, Jacobs E, Clark T, Gawryl MS, Simson E. Effect of hemoglobin-based oxygen carrier-201 on common chemistry laboratory procedure. *Clin Chem* 1997;43:1792-1793.
4. Chance JJ, Norris EJ, Kroll MH. Mechanism of interference of a polymerized hemoglobin blood substitutes in an alkaline phosphatase method. *Clin Chem* 2000;46:1331-1337.
5. Alonsozana GLG, Elfath MD, Mackenzie C, Gregory LC, Duh SH, Trump B, Christenson RH. In vitro interference of the red cell substitute pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene with blood compatibility, coagulation, and clinical chemistry testing. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997; 11:845-850.
6. Wolthuis A, Peek D, Scholten R, Moreira P, Gawryl M, Clark T, Westerhuis L. Effect of the hemoglobin-based oxygen carrier HBOC-201 on laboratory instrumentation: cobas integra, chiron blood gas analyzer 840, sysmex SE-9000 and BCT. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:71-76.
7. Kazmierczak SC, Catrou PG, Best AE, Sullivan SW, Briley KP. Multiple regression analysis of interference effects from a hemoglobin-based oxygen carrier solution. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:453-464.
8. Ali ACY, Mihas CC, Campbell JA. Interferences of o-raffinose cross-linked hemoglobin in three methods for serum creatinine. *Clin Chem* 1997;43:1738-1743.
9. Ali ACY, Campbell JA. Interference of o-raffinose cross-linked hemoglobin with routine Hitachi 717 assay. *Clin Chem* 1997;43:1794-1796.
10. Balion MC, Champagne PA, Ali ACY. Evaluation of HemoglobindTM for removal of o-raffinose cross-linked hemoglobin (HemolinkTM) from serum. *Clin Chem* 1997;43: 1796-1797.
11. Callas DD, Clark TL, Moreira PL, Lansden C, Gawryl MS, Kahn S, Bermes Jr EW. In vivo effects of a novel hemoglobin-based oxygen carrier on routine chemistry, therapeutic drug, coagulation, hemorheology, and blood bank assays. *Clin Chem* 1997;43:1744-1748.
12. Kazmierczak SC, Catrou PG, Boudreau D. Simplified interpretative format for assessing test interference: studies with hemoglobin-based oxygen carrier solutions. *Clin Chem* 1998; 44:2347-2352.
13. Moreira PL, Lansden CC, Clark TL, Gawryl MS. Effect of HemopureTM on the performance of Ektachem and Hitachi Clinical Analyzer. *Clin Chem* 1997;43:1790-1791.
14. Izumi Y, Sakai H, Hamada K, Takeoka S, Tsuchida E, Kobayashi K, et al. Physiologic responses to exchange transfusion with hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier in anesthetized rats: changes in mean arterial pressure and renal cortical tissue oxygen tension. *Crit Care Med* 1996; 24:1869-1873.
15. Sakai H, Tsai AG, Rohlfis RJ, Hara H, Tsuchida E, Intaglietta M. Microvascular responses to hemodilution with Hb vesicles as red blood cell substitutes: influence of O₂ affinity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999;276:553-562.
16. Sakai H, Tsai AG, Kerger H, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M, et al. Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with red cell substitutes consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J Biomed Materials Res* 1998;40:66-78.
17. Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Molecular Dimensions of Hb-based O₂ Carriers Determine Constriction of Resistance Arteries and Hypertension in Conscious Hamster Model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:908-915.
18. Sakai H, Yuasa M, Onuma H, Takeoka S, Tsuchida E. Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: objective comparison between cellular and acellular types. *Bioconjugate Chem* 2000;11:56-64.
19. 金井泉, 金井正光 編. 臨床検査法提要(改訂第31版). 東京: 金原出版, 1998;459-682.
20. U.S. Department of Health and Human Services, Division of Laboratory Systems. Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA), Current CLIA Regulations (through 12/29/2000), Section 493.931, <http://www.phppo.cdc.gov/clia/regis/toc.asp>
21. Glick MR, Pieper J, Ryder KW. Interference-reduced methodologies for Boehringer-Mannheim/Hitachi analyzers: validation using a recombinant hemoglobin "blood substitute" product. *Clin Chem* 1998;44(Suppl):A140-1.
22. Sakai H, Takeoka S, Park SI, Kose T, Nishide H, Izumi Y, Yoshizu A, Kobayashi K, Tsuchida E. Surface modification of hemoglobin vesicles with poly (ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem*

- 1997;8, 23-30.
23. Takeoka S, Sou K, Arase S, Ohgushi T, Tsuchida E. Critical molecular weight effects in the aggregation of phospholipid vesicles triggered by water soluble polymers and integrated glycolipid. *Macromolecules* 1996;29:8132-8136.
24. Takeoka S, Mori K, Ohkawa H, Sou K, Tsuchida E: Synthesis and assembly of poly (ethylene glycol)-lipids with mono-, di-, and tetraacyl chains and a poly(ethylene glycol) chain of various molecular weights. *J Am Chem Soc* 2000;122, 7927-7935.
25. Sou K, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. Polyoxyethylene-modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of polyoxyethylene-lipid into the vesicles. *Bioconjugate Chem* 2000;11:372-379.
26. Jan KM. Role of hydrogen bonding in red cell aggregation. *J Cell Physiol* 1979;101:49-55.
27. Kirby C, Clarke J, Gregoriadis G. Cholesterol content of small unilamellar liposomes controls phospholipid loss to high density lipoproteins in the presence of serum. *FEBS Lett* 1980;11:324-328.
28. Wharton SA, Green C. Effect of sterol structure on the transfer of sterols and phospholipids from liposomes to erythrocytes in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1982;711:398-401.

サイトカインによる造血幹細胞の増殖制御

Cytokines that directly affect hematopoietic stem cells

日野原 敦, 西川 光郎
Atsushi Hinohara, Mitsuo Nishikawa

和文抄録

造血幹細胞は、個体から直接幹細胞を分離できる数少ない組織特異的な幹細胞である。造血幹細胞に直接作用する因子を同定することで、幹細胞としての性質をより詳しく理解することができる。正常マウス骨髄中に存在する造血幹細胞はCD34^{-low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ (CD34⁻KSL) の表現型を示す。われわれは、高度に純化されたCD34⁻KSL細胞に対する種々のサイトカインの直接的な作用を無血清条件のクローナル培養系において検討した。その結果、従来造血前駆細胞、幹細胞の培養に使用してきたサイトカインのほとんどが単独でCD34⁻KSL細胞の増殖を刺激しなかった。検討したサイトカインの中で、SCF、あるいはTPOが、それぞれ単独でCD34⁻KSL細胞に増殖刺激を入れた。8日間の培養でSCFでは79.3±8.1% (n=50) の細胞が増殖し、TPO添加群では50.0±15.6% (n=50) の細胞が増殖した。SCF単独添加で2日間培養後にTPOを添加、あるいはTPO単独で培養後にSCFを添加した場合には、培養開始後6日目の細胞数の増加は、後者においてより増殖能の高い造血細胞が誘導されることから、培養系にTPOをあらかじめ添加した方が造血幹細胞の増幅に有効であることが示された。また、SCF、TPO単独で5日間培養した際には、増殖したCFCのうち49%がHPP-CFCであり、TPOで培養した際には増殖したCFCのうち65%がHPP-CFCであった。以上の結果から、TPO、SCFはともにCD34⁻KSL表現型を示す造血幹細胞に直接作用し、増殖を誘導するが、それらの因子の造血幹細胞に対する作用メカニズムは異なることが示唆された。

Abstract

Organ specific stem cells are defined as the cells that have the capability to self-renew and differentiate into functional cells. Among these stem cells, hematopoietic stem cells (HSCs) are unique population since they can be enriched according to their cell surface markers. Mouse bone marrow HSCs can be highly enriched in CD34^{-low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ (CD34⁻KSL) cell fraction and we evaluated direct effects of various cytokines on CD34⁻KSL cells clonally in serum depleted culture conditions in order to define which environmental factors affect HSCs. Most of cytokines, act on hematopoietic cells, did not sustain CD34⁻KSL cell survival and proliferation. Only stem cell factor (SCF) or thrombopoietin (TPO) alone stimulated proliferation of CD34⁻KSL cell. CD34⁻KSL cell proliferation were observed in 79.3 ± 8.1 % of wells (n=50) in the presence of SCF, and 50.0 ± 15.6% (n=50) in the presence of TPO after 8 days of culture. When CD34⁻KSL cells were cultured in the presence of SCF or TPO alone 2 days and subsequently cultured in the presence of both SCF and TPO for 4 days, better proliferation of CD34⁻KSL cells was observed in the culture that was initiated with TPO at the end of culture period. More HPP-CFCs were observed in colony-forming cells (CFCs) arose from 5 days culture in the presence of TPO (65%) than in SCF (49%). These data strongly support the notion that TPO and SCF directly affect the HSCs and stimulated proliferation, and that SCF and TPO has discriminating effects on HSCs.

Keywords

hematopoiesis, hematopoietic stem cells, cytokine, cell division, stem cell factor, thrombopoietin

1. はじめに

幹細胞システムは、組織特異的な機能細胞を供給するとともに幹細胞の自己複製を行い生体の恒常性を保っている。分化し

た細胞と異なり、幹細胞は増殖能が低く、特定の部位(niche)に存在することが確認されている¹⁾。通常、ヒトでは臓器障害などにおいても、幹細胞が動員され臓器が修復されることはない。

キリンビール株式会社医薬カンパニー医薬探索研究所 群馬県高崎市宮原町3番地 Pharmaceutical Research Laboratories, Pharmaceutical Division, Kirin Brewery Co., Ltd. 3 Miyahara, Takasaki, Gunma, Japan

論文受付 2002年5月18日 論文受理 2002年6月17日

しかし幹細胞システムの自己複製能の特徴を利用して、幹細胞を生体外で人為的に培養、増殖させ、目的とする臓器細胞を取得して患者に戻す再生医療が確立されれば、これまで治癒が見込まれなかつた疾患を完治することが可能となり、革新的な医療を実現することができる。

造血幹細胞移植は再生医療の中でもっとも早くからヒトで臨床的に実施されてきた治療法である。造血幹細胞を移植することで、患者の体内において生涯にわたりドナー由来の造血システムを構築する治療法が実践してきた。造血幹細胞移植術の正否はいくつかの要因に左右されるが、移植造血幹細胞数を増加させることでその成績を改善できることが統計的に示されている²⁾。すなわち、造血幹細胞を体外で増幅し十分量の造血幹細胞の移植が可能となれば、移植治療の成績向上が期待できる。しかし、試験管内で臨床に利用できるほど効率的に造血幹細胞を増幅させる技術は確立されていない^{3,4)}。

造血幹細胞は骨髄中のnicheに存在する。nicheを構成するストローマ細胞は、各種サイトカインを産生し、また、細胞同士が接着し合うことで造血幹細胞の自己複製を調節していると想定されている。一方、造血前駆細胞、機能造血細胞は、種々のサイトカインによりそれぞれの分化系列特異的に増殖、分化、機能発現が調節されている。造血細胞に作用する多くのサイトカインのうちどのような分子が造血幹細胞に直接作用するか興味が持たれている。このような造血幹細胞に刺激を与える分子を解明することは造血幹細胞の試験管内自己複製系確立に重要な知見をもたらすものと考えられる。

マウス骨髄由来のCD34 KSLの表現型を示す細胞は、従来同定されてきた造血幹細胞の中でもっとも高度に純化された造血幹細胞集団の一つである⁵⁾。CD34 KSL細胞は、一個の細胞を放射線照射したマウスに移植することでレシピエントマウスの造血系を再構築することが可能であるが、CD34⁺ c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻の造血前駆細胞は、短期の再構築しか有しておらず、c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻細胞群の中で、CD34抗原の発現から前駆細胞と幹細胞を確実に分離することが可能である。このCD34 KSL細胞を用いることで、従来造血前駆細胞が混入した状態でしか検討できなかつた種々のサイトカインの造血幹細胞への直接的な作用を解析することが可能となった。本研究では、無血清条件下においてCD34⁺ KSL細胞に種々のサイトカインを作用させ、各種サイトカインの造血幹細胞に対する直接的作用を解析した。

2. 実験方法

2. 1. 増殖因子

本研究で使用したマウスおよびヒト組換え型増殖因子は、マウスマルチペプチド成長因子 (SCF)、マウスマクロファージ集積因子 (TPO)、マウスIL-3、ヒトIL-6、ヒトgranulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)、ヒトgranulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、ヒトerythropoietin (EPO) (キリンビール)、マウスIL-6、マウスIL-11、ヒトFlt-3 ligand、ヒトLIF (Genzyme, Cambridge, MA, USA)、マウスOncostatin M、マウスVEGF (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)

2. 2. マウス骨髄からのCD34^{low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻細胞の調製

C57BL/6 (8~10週齢、雄) の大腿骨および脛骨内の骨髄を採取し、PBSに懸濁した。骨髄細胞浮遊液を、比重1.086g/mlのsodium metrizoate液 (Nicomex, Oslo, Norway) に重層し、400gで室温15分間遠心した。中間層の単核球細胞画分を回収、染色バッファー (5% FCS, 1mM EDTA, 0.05% Na₃を含むPBS) に懸濁し、FITC結合CD34抗体、フィコエリスリン結合Sca-1抗体、アロフィコシアニン結合c-Kit (Pharmingen, San Diego, CA, USA)、および、分化マーカー (Lin) として以下の6種類のビオチン化した分化抗原特異的な抗体、CD45R, CD4, CD8, Gr-1, Ter119, CD11b (Pharmingen) を添加し、水中で30分間放置し反応させた。染色バッファーで2回洗浄した後に、TEXAS RED結合ストレプトアビジン (GIBCO/BRL, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を添加し、水中で30分間放置し反応させた。染色バッファーで2回洗浄後、セルソーター (FACS Vantage, Becton Dickinson, San Jose, CA) により、CD34陰性、Sca-1陽性、c-Kit陽性、Lin陰性細胞 (CD34^{low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻) を分取した⁵⁾。CD34^{low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻細胞の一部は、セルソーターにより染色バッファーに分取した後、再度セルソーターに供して細胞の純度を検定した。本研究に用いたCD34^{low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻細胞は、98%以上の純度であることを確認している。

2. 3. 無血清培養によるクローナルアッセイ

マウス骨髄由来CD34^{low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻細胞を96ウェルU底プレート (Nunc, Kamstrup, Denmark) に1cell/wellとなるようにセルソーターにより播種し、種々の増殖因子の組合せ条件下、無血清培地 (200μl/well) により培養した。無血清培地にはS-clone SF O2 (三光純薬) を用い、1% deionized crystallized BSA (Calbiochem, La Jolla, CA, USA)、2 mM L-glutamine (Life Technologies, Rockville, MD, USA) および1 mM sodium pyruvate (Life Technologies) を添加した。37°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂、水蒸気飽和の条件下で8日間の培養を行い、適宜細胞数を顕微鏡下で算定して、各々のウェルにおける細胞の維持・増殖を調べた。

2. 4. コロニー-アッセイによる造血前駆細胞の増殖状況の評価

精製直後のCD34^{low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻細胞または上記無血清培養系にて増殖した細胞をPBSで洗浄した後、1 mlメチルセルロース培地に播種して、コロニー形成細胞 (colony forming cell, CFC) の増殖を調べた。メチルセルロース培地には、Metho-Cult H4230 (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC) を用い、10ng/ml マウスマルチペプチド成長因子 (SCF)、マウスマクロファージ集積因子 (TPO)、ヒトIL-6、ヒトG-CSFおよび2IU/ml ヒトEPOを添加した。37°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂、水蒸気飽和の条件下で12日間の培養を行い、出現してきたコロニーを倒立顕微鏡下で算定した。コロニーの種類は、顕微鏡観察およびコロニー-アッセイによるサイトスピニ標準で決定した。コロニーの分類は以下のとおり、GM (granulocyte/macrophage), Meg (megakaryocyte), E (eryth-

rocyte), E-mix (erythrocyte mixed colony), また直径 2 mm 以上のコロニーをHPP-CFC (high proliferative potential-colony forming cell) とした。

3. 結果

3. 1. CD34⁻KSL細胞に直接作用するサイトカイン

セルソーターを用いてCD34^{-low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻細胞を一個づつウェルにソートした。ウェルには造血前駆・幹細胞集団に対して作用すると考えられる因子を予め添加しておき、培養とともに造血細胞数の変化を測定した。(Fig. 1)

まず50個あるいは16個のCD34⁻KSL細胞について各サイトカインを単独で作用させ、CD34⁻KSL細胞に対する直接的な効果

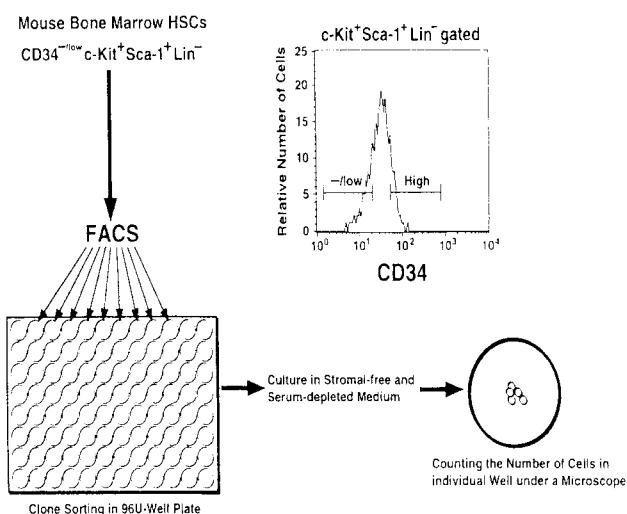


Fig. 1 Schema of single cell culture. CD34^{-low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ cells were deposited at one cell per well with cell sorter. The cells were cultured in serum-depleted medium supplemented with various cytokines. The number of cells per well was monitored under a microscope until day 8 of culture.

Table 1. Effects of Cytokines on Clonal Proliferation of CD34⁻KSL cells in Serum-Free Culture

Cytokine	No. of wells analyzed	Cells / Well			
		0	1	2-7	8≤
SCF	50	6	4	40	0
TPO	50	16	8	22	4
Flt-3 ligand	50	49	1	0	0
IL-3	32	12	4	1	0
VEGF	32	30	2	0	0
Epo	16	14	2	0	0
G-CSF	16	13	3	0	0
GM-CSF	16	14	2	0	0
IL-6	16	14	2	0	0
IL-11	16	15	1	0	0
LIF	16	13	3	0	0
Oncostatin M	16	15	1	0	0

Single CD34^{-low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ cell were seeded in each well containing serum-depleted medium supplemented with the indicated cytokines. After 5 to 6 days of culture, the number of cells in each well were scored.

を検討した結果、確実に分裂を誘導する活性が検出されたのはSCFとTPOを添加したウェルのみであった(Table 1)。SCFの単独添加では、79.3±8.1%のCD34⁻KSL細胞がSCFに反応し増殖した。また、TPOの刺激では50.0±15.6%のCD34⁻KSL細胞が増殖した(Fig. 2, Table 2)。

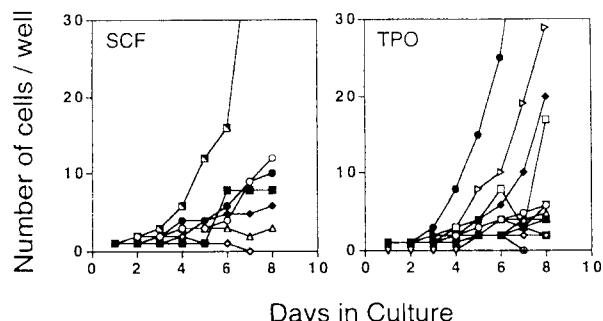


Fig. 2 Effects of SCF and TPO on clonal proliferation of CD34⁻KSL cell. Single CD34^{-low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ cells were individually cultured in 200 μ l serum-depleted medium supplemented with 100 ng/ml mSCF or 20 ng/ml mTPO. Data from one representative experiment are shown.

Table 2. Effects of SCF and TPO on proliferative response of single CD34⁻KSL cell

Cytokine	% proliferative clones
SCF	79.3 ± 8.1
TPO	50.0 ± 15.6
SCF+TPO	90.0 ± 5.7

CD34^{-low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ cells were sorted at one cell per well in serum-depleted medium supplemented with indicated cytokines. (n=50 cells) Clonal growth in each well was evaluated after 5 days culture. The data represent the mean percentages ± SD of clones that underwent cell division at least ones in three individual experiments.

続いて、SCFとTPOの協調的な作用について検討した。SCFとTPOを培養開始時に同時に添加、あるいは培養開始時にSCFあるいはTPOを添加し、2日後にTPO、SCFを添加しウェル中の細胞数を計数した(Fig. 3)。SCFとTPOを同時に添加したウェルでは、90.0±5.7%の細胞が増殖し、SCF添加後TPOを添加した(TPO遅延添加)場合、TPO添加後にSCFを添加した(SCF遅延添加)場合では、それぞれ68.7%, 75%のCD34⁻KSL細胞が刺激に対して反応した。SCF遅延添加とTPO遅延添加では異なる細胞増殖のカイネティクスを示した。すなわち、培養6日での増殖細胞数の平均(細胞増殖が見られたウェルの細胞数を平均した)は前者では35個、後者では84個であり、TPOで培養を開始した場合の方が、より細胞が増殖している。培養8日目では100細胞以上に増殖しているウェルは前者では25% (4/16)であるのに対し、後者では62.5% (10/16)であり、最初の2日

間で維持される細胞の性質が、TPO刺激下で培養した方がより増殖能の高い細胞であることを示している。

SCFで培養後TPOを添加した細胞を8日以降さらに継続して培養しても8日目に100細胞にまで分裂していないウェルではそれ以上の細胞数の上昇は観察されなかった。一方、TPOで最初に培養を開始した場合には培養8日以降においても100細胞以上に細胞分裂を示すウェルが観察された。これらの結果は、骨髓より分取したCD34⁻KSL細胞に対してSCF、TPOは異なる増殖シグナルを伝達していることを示唆している。

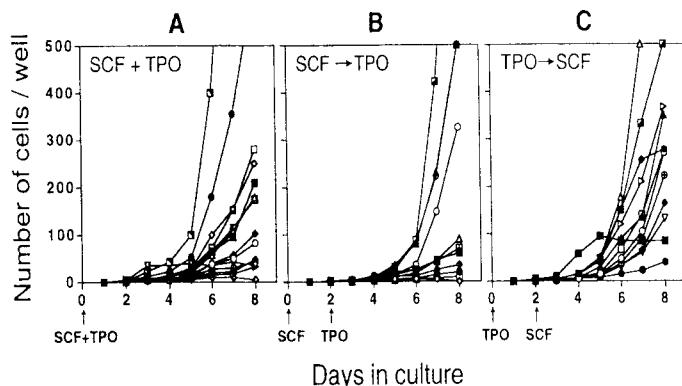


Fig. 3 Effects of combination of SCF and TPO on clonal proliferation of CD34⁺KSL cell. (A) Single CD34^{low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ cells were individually cultured in 200 μ l serum-depleted medium supplemented with 100 ng/ml mSCF plus 20 ng/ml mTPO. (B) After 2 days of preincubation in 100 ng/ml mSCF, mTPO was added to each well at 20 ng/ml. (C) After 2 days of preincubation in 20 ng/ml mTPO, mSCF was added to each well at 100 ng/ml.

3. 2. SCF, TPO, Flt-3 ligand (FL)で培養したCD34⁻KSL細胞のコロニー形成能

SCF, TPOで培養した細胞の分化レベルを検討するため、SCF, TPO, SCFとTPO, SCFとFLおよびTPOとFL存在下でクローナルに5日間培養したCD34⁻KSL細胞のコロニー形成能について検討した(Table 3)。

SCF単独でCD34⁻KSL細胞に作用させた場合、トータル細胞数は3倍に、トータルCFC数は2倍になるが、HPP-CFCはほぼ変化しない。一方、TPOを単独で作用させた場合、細胞数は2倍にCFC数も2倍程度に増幅するがHPP-CFC数はほぼそのまま維持されている。トータルCFC数のうちHPP-CFC数の割合は、SCFで49%、TPOで65%である。他の因子単独では細胞の維持さえできないのに対し、SCF、TPOは単独で、未分化な状態を維持させたまま造血幹細胞を増殖させ得ることが示された。

SCFとTPOを同時に作用させた場合には、相乗的に造血幹細胞を約30倍にまで顕著に増殖させ、トータルCFC数、HPP-CFC数については、それぞれ22.7倍、8.2倍にまで増幅させた。

また、SCFとTPOは同時添加により非常に強い相乗効果を發揮するのに対し、FLは、SCFあるいはTPOと同時に添加してもCD34⁻KSL細胞の増殖に対する相乗効果は認められず、SCFあるいはTPOを単独で添加した場合とほとんど変わらない結果から、造血幹細胞に対してFLは直接作用しない可能性が示唆された。

Table 3. Effects of Cytokine combinations on colony formation of single CD34 KSL cell

Cytokines	Total No. of cells	Total CFC	HPP-CFC	No. of colonies			
				GM	Meg	E	E-Mix
Fresh Cells	50	45	43	23	2	0	20
SCF	145 (2.9)*	100 (2.2)	49 (1.1)	62	12	0	26
TPO	104 (2.1)	71 (1.6)	46 (1.1)	31	12	0	28
SCF+TPO	1422 (28.4)	1023 (22.7)	353 (8.2)	855	70	3	95
SCF+Flt-3 ligand	134 (2.7)	133 (3.0)	54 (1.3)	99	14	0	21
TPO+Flt-3 ligand	96 (1.9)	87 (1.9)	30 (0.7)	60	9	0	18

Single CD34^{low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ cells were individually cultured in serum-depleted medium supplemented with designated cytokines. (n=50 cells) On day 5 of culture, number of cells in each well were scored. Then, the cells in each well were washed and replated into the methylcellulose culture in the presence of SCF, IL-3, IL-6, Epo, and TPO. Incubation was carried out for 12 days. * (), fold increase.

4. 考察

本研究では、種々のサイトカインのCD34⁻KSL細胞に対する直接作用を観察した。血清には幹細胞増幅に関わる因子が存在することが知られており、無血清培地を使用して血清因子の影響を受けないようにした。その結果、SCFとTPOがCD34⁻KSL細胞に直接作用することが確認され、これまで造血幹前駆細胞の増幅に有効とされてきたサイトカインを含む多くの造血系のサイトカインはCD34⁻KSL細胞に対し直接的増殖刺激を与えていた。この結果は、造血幹細胞は造血前駆細胞と全く異なった環境刺激に応答する特異な細胞分画であり、分化血球が各分化系列に特異的な増殖因子に依存するように造血幹細胞も特定の刺激因子に依存して増殖することを示している。

SCFがCD34⁻KSL細胞に直接作用することは、CD34⁻KSL細胞がc-Kit陽性であることから、SCFのシグナルを受け取るのは妥当と考えられる。一方、巨核球の成熟を促進する因子として単離同定されたTPO^{6,9)}も造血前駆・幹細胞に作用することが示されてきた^{10,11)}。c-mpl, TPOのノックアウトマウス¹²⁻¹⁶⁾においても造血前駆細胞の数が低下していることが報告されており、造血幹細胞から非常に未分化な造血前駆細胞においてc-mpl/TPOシグナル伝達系が機能していることは明らかにされてきたが、本研究においてもTPOがCD34⁻KSL表現型を示す造血幹細胞に直接作用し、増殖を誘導することが確認された。また、今回のCD34⁻KSL細胞に対するSCF、TPO、IL-3の作用は、Emaからの報告とほぼ同様の結果となっている¹⁷⁾。このような造血幹細胞の増殖に対するTPOの刺激は、造血幹細胞のex vivo増幅系でTPOが非常に有用なものであることを示唆する。実際に、ヒトにおいても抗TPO抗体により再生不良性貧血が惹起されることが報告されており、非常に未分化な造血前駆細胞あるいは造血幹細胞の恒常的な維持においてc-mpl/TPOシグナル伝達系が重要な機能を果たしていることが示唆される¹⁸⁾。

TPOとSCFでは、CD34⁻KSL細胞集団の中で反応する細胞数が異なる。特にc-Kit陽性である細胞集団であるのに、SCFがすべてのCD34⁻KSL細胞の生存を支持しないのは、c-Kitを発現していてもシグナルが伝達されていないことを示唆しており興味深い。SCFとTPOを協調的に作用させると、その刺激に反応するCD34⁻KSL細胞の割合は90%程度に相乗的に増加する。この

結果は、単一のシグナルでなく、複数のシグナルの協調的作用によってCD34⁻KSL細胞の生存、増殖が調節されていることを示している。従い、前述のc-Kitの発現にもかかわらず、反応しないCD34⁻KSL細胞が存在するという結果は、未知の因子がCD34⁻KSL細胞の維持、増殖に関与することを強く示唆する。

TPO、SCFそれぞれ単独で培養後にSCF、TPOを添加した場合、最初にTPOで培養した方が、その後の培養で多くの造血細胞を産生する。この結果は、2日間の培養期間においてTPOはCD34⁻KSL細胞に対し、SCFよりもより増殖に対してcompetentな状態にしていると考えられる。この結果は、c-Kit⁺Sca-1⁺Lin造血幹前駆細胞集団に対する、TPOのearly acting cytokineとして作用するという性質¹⁹⁾が、同様にCD34⁻KSL表現型を示す造血幹細胞集団に対してもいえることを示唆している。SCFは多くのサイトカインと協調的に作用し、その増殖刺激を増強するが、単独で添加した場合にはcompetentな状態に細胞を持っていく活性は認められない。CD34⁻KSL細胞に対しても、同様にearly acting cytokineとしての機能は有していないように示唆される。

Shimomuraらは、5-FU処理マウスの骨髄c-Kit⁺Sca-1⁺Lin⁻細胞に対する作用を検討しているが²⁰⁾、この細胞はSCF以外にもG-CSF、IL-3、にも顕著に反応し増殖する。また、IL-6、LIF、IL-11といったサイトカインに対しても弱いながら反応性を示す。これらの結果から、5-FU処理c-Kit⁺Sca-1⁺Lin⁻細胞は、前駆細胞を含む集団であり、造血幹細胞に対する真の作用を検出しているのではない。また、Shimomuraらの報告では正常骨髄CD34陰性細胞に対する作用を検証しているが、血清の入った系であり血清中の因子が造血幹細胞に作用することを否定できない。また、5-FU投与マウス骨髄の造血幹細胞はc-Kitの発現が低下しているとの報告もあり²¹⁾、5-FU投与マウス骨髄c-Kit⁺Sca-1⁺Lin⁻細胞が前駆細胞集団を含むとすると造血幹細胞では造血前駆細胞と全く異なるサイトカインへの反応性を有していると想定される。

最近Flt-3の発現は、造血幹細胞の自己複製能の消失と一致することが報告された²²⁾。本研究においてもFLは単独で増殖刺激を与えず、CD34⁻KSL細胞に対して直接的な作用を有さないことを示した。さらに、TPOはSCFと協調的にCD34⁻KSL細胞の増殖を刺激するが、FLはSCFやTPOとの協調的な作用を示さず、CD34⁻KSL細胞培養系へのFL添加の効果を確認することはできなかった。Kobayashiらはヒト造血幹前駆細胞集団に対するTPO、SCF、FLの作用を検証している²³⁾。その結果、ヒトCD34⁺c-Kit^{low}CD38^{-/low}細胞は、IL-3に対する反応性が低く、マウスCD34⁻KSL細胞とほぼ似たようなサイトカインへの反応性を示している。しかし、マウスCD34⁻KSL細胞はFLに対しても反応性が低いが、ヒトCD34⁺c-Kit^{low}CD38^{-/low}細胞は、FLとTPOを同時に作用させることで強い相乗効果が認められている。この結果は、今回示したマウスCD34⁻KSL細胞のFLに対する反応性と全く異なる。最近ヒトでもCD34陰性の造血幹細胞集団が認められており、CD34⁺c-Kit^{low}CD38^{-/low}細胞がマウスCD34⁻KSL細胞集団に相当する細胞群といえず、このようなサイトカインへの反応性の相違は細胞集団の違いによるかもしれない。あるいは、造血幹、前駆細胞の性質のヒトとマウスの種差に由来するものかもしれない。

ない。いずれにせよ、今後のヒトCD34陰性分画に含まれる造血幹細胞の性状の詳細な解析が必要である。

結論として、CD34⁻KSL細胞がほとんどのサイトカインに反応せず、SCF、TPOの二つの限られたサイトカインに反応性を示すことを明らかにすることができた。この結果は、前駆細胞と幹細胞の間で、造血環境からの刺激受容に全く異なった反応性を有していることを示す。造血幹細胞を試験管内で増幅することが可能となれば、造血幹細胞移植療法の改善、造血細胞に対する効率的な遺伝子治療への応用が期待されている。今回明らかにしたTPOの造血幹細胞に直接作用するという性状から、造血幹細胞増幅系においてTPOを利用することが有効であることを示すことができた。

参考文献

- Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M, Jackson IJ, Barrandon Y, Miyachi Y, Nishikawa S. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 2002;416:854-60.
- Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, Berkowitz RL, Cabbad M, Dobrila NL, Taylor PE, Rosenfield RE, Stevens CE. Outcomes among 562 Recipients of Placental-Blood Transplants from Unrelated Donors. *N Engl J Med* 1998;339:1565-77.
- Miller CL, Eaves CJ. Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho-myeloid reconstituting ability. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13648-53.
- Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling LE, Karanu FN, Bhatia M. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* 2001;2:172-80.
- Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996;273:242-5.
- Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 1994;369:565-8.
- de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994;369:533-8.
- Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL, Swift S. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 1994;77:1117-24.
- Kato T, Ogami K, Shimada Y, Iwamatsu A, Sohma Y,

- Akahori H, Horie K, Kokubo A, Kudo Y, Maeda E. Purification and characterization of thrombopoietin. *J Biochem* 1995;118:229-36.
10. Kaushansky K. Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Blood* 1998;92:1-3.
 11. Farese AM, Hunt P, Grab LB, MacVittie TJ. Combined administration of recombinant human megakaryocyte growth and development factor and granulocyte colony-stimulating factor enhances multilineage hematopoietic reconstitution in nonhuman primates after radiation-induced marrow aplasia. *J Clin Invest* 1996;97:2145-51.
 12. Alexander WS, Roberts AW, Nicola NA, Li R, Metcalf D. Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood* 1996;87:2162-70.
 13. Kimura S, Roberts AW, Metcalf D, Alexander WS. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1195-200.
 14. Carver-Moore K, Broxmeyer HE, Luoh SM, Cooper S, Peng J, Burstein SA, Moore MW, de Sauvage FJ. Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin-and c-mpl-deficient mice. *Blood* 1996;88:803-8.
 15. Kaushansky K, Lin N, Grossmann A, Humes J, Sprugel KH, Broudy VC. Thrombopoietin expands erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocytic progenitor cells in normal and myelosuppressed mice. *Exp Hematol* 1996;24:265-9.
 16. Sitnicka E, Lin N, Priestley GV, Fox N, Broudy VC, Wolf NS, Kaushansky K. The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 1996;87:4998-5005.
 17. Ema H, Takano H, Sudo K, Nakauchi H. In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2000;192:1281-8.
 18. Basser RL, O'Flaherty E, Green M, Edmonds M, Nichol J, Menchaca DM, Cohen B, Begley CG. Development of pancytopenia with neutralizing antibodies to thrombopoietin after multicycle chemotherapy supported by megakaryocyte growth and development factor. *Blood* 2002;99:2599-602.
 19. Ku H, Yonemura Y, Kaushansky K, Ogawa M. Thrombopoietin, the ligand for the Mpl receptor, synergizes with steel factor and other early acting cytokines in supporting proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice. *Blood* 1996;87:4544-51.
 20. Shimomura T, Yonemura Y, Miyazoe T, Miyake H, Kato T, Miyazaki H, Mitsuya H, Kawakita M. Thrombopoietin stimulates murine lineage negative, Sca-1+, C-Kit+, CD34+ cells: comparative study with stem cell factor or interleukin-3. *Int J Hematol* 2000;71:33-9.
 21. Lian Z, Feng B, Sugiura K, Inaba M, Yu C, Jin T, Fan T, Cui Y, Yasumizu Y, Toki J, Adachi Y, Hisha H, Ikebara S. c-kit<low Pluripotent Hemopoietic Stem Cells Form CFU-S on Day 16. *Stem Cells* 1999;17:39-44.
 22. Adolfsson J, Borge OJ, Bryder D, Theilgaard-Monch K, Astrand-Grundstrom I, Sitnicka E, Sasaki Y, Jacobsen SE. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin (-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. *Immunity* 2001;15:659-69.
 23. Kobayashi M, Laver JH, Lyman SD, Kato T, Miyazaki H, Ogawa M. Thrombopoietin, steel factor and the ligand for flt3/flk2 interact to stimulate the proliferation of human hematopoietic progenitors in culture. *Int J Hematol* 1997;66: 423-34.

●編集後記●

「本号では高折益彦先生(東宝塚さとう病院名誉院長、川崎医科大学名誉教授)から主に我が国で開発されているリポソーム型人工赤血球に対して、機能面、安全面、有効性面で満足すべき要件が提示され、開発側にとって大いに参考になる総説と思われる。また、リポソーム型Hb製剤に関する原著論文が3報投稿されました。この様な臨床適応に関する研究論文の積極的な投稿を期待する次第である。更に、再生医療からのアプローチ

に対して人工血液に対する新しい動きが広がりつつあるのを感じた。次号Vol. 10(3)は9月4、5日に熊本にて開催されます第9回日本血液代替物学会(大会長 熊本大学医学部 教授 西 勝英先生)のプログラム・予稿集となります。その関係で、本号ではごく最近投稿されました原著論文も掲載したく発刊が少し遅れました。」

(武岡真司)

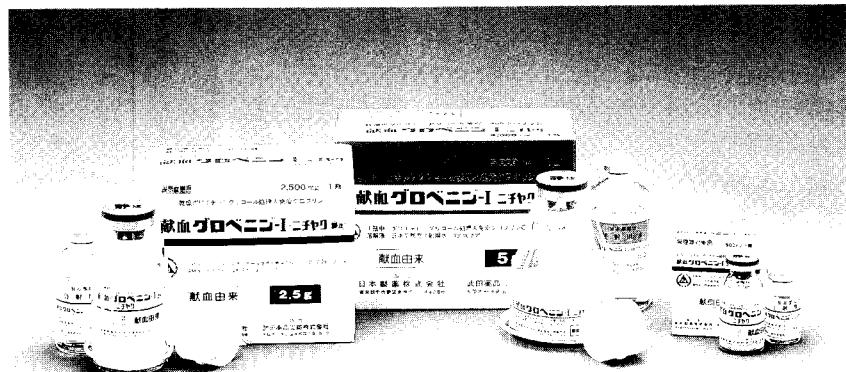
静注用人免疫グロブリン製剤

薬価基準収載

指定医薬品

献血グロベニン®-I-ニチヤリ

〈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

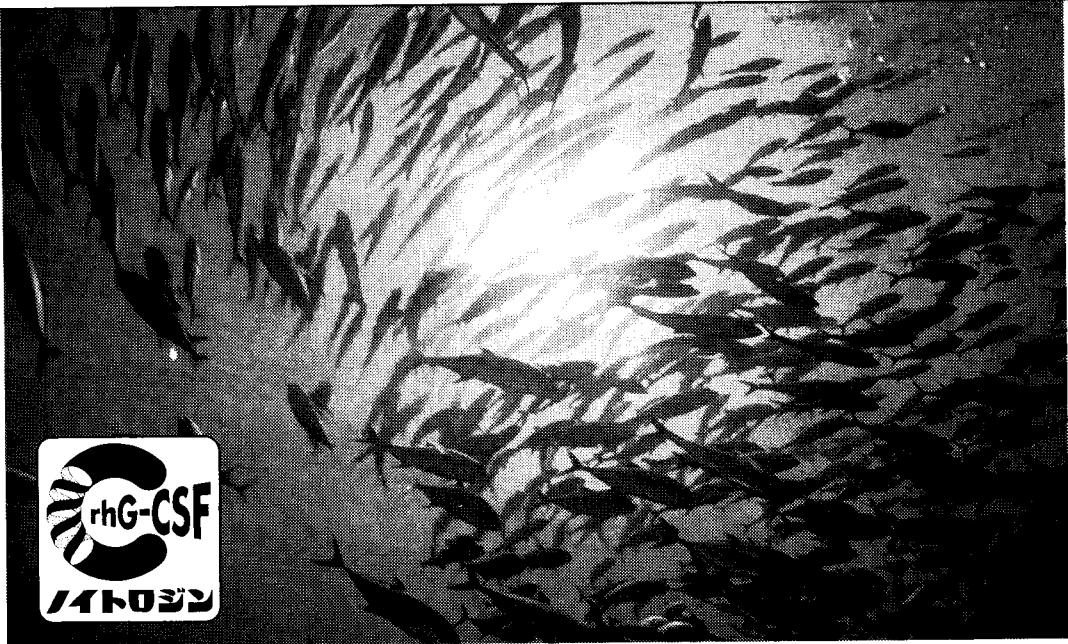
販売



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1月作成(改)



遺伝子組換えヒトG-CSF製剤

指定医薬品・要指定医薬品

薬価基準収載

ノイトロジン®

NEUTROGIN®_{Injection}

一般名 レノグラスチム(遺伝子組換え)

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

(CNJ)8258

※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。

Bolster 3 Hell

献血であることの誇りと重責…

献血由来 生体組織接着剤
ボルヒール[®]
BOLHEAL[®] 指定
■健保適用

●ご使用に際しましては製品添付文書をご参照下さい。

販売 TEIJIN 帝人株式会社 医薬事業本部 〒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1-6-1 〒860-0568	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 ☎011-9810 作成年月：1998年10月
---	---------------------------------------	--

にっぽんの血液製剤です。

献血であることの誇りと重責…

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
生物学的製剤基準

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[®]

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

販売元・販売 TEIJIN 帝人株式会社 医薬事業本部 〒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1-6-1 〒860-0568	資料請求先：帝人(株)医薬医療事業本部学術情報部 ・財)化学及血清療法研究所営業管理部 ☎011-9810 作成年月：1998年10月
---	---------------------------------------	---

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(,) ヒリオド(.) 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

はIndex Medicusに準拠する。單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、井上圭二編、リボソーム、東京：南江堂、1988;21-40.
3. Fowler SA, Andracci 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

●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(2) 2002年7月19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

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

はIndex Medicusに準拠する。單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. リホソームの調製. 野島庄七、砂本順三、井上圭三編. リホソーム. 東京：南江堂、1988;21-40.
3. Fowler SA, Andracci 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

●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(2) 2002年7月19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

第9回日本血液代替物学会年次大会会告

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)

会場：熊本市国際交流会館

〒860-0806 熊本市花畠町4番8号

TEL: 096-359-2020

プログラム

会長シンポジウム 「血清蛋白質の新展開」

1. はじめに：血清アルブミンと α_1 -酸性糖蛋白質の新たなる機能を求めて
小田切優樹／熊本大学薬学部薬剤学
2. α_1 -酸性糖蛋白質の体内挙動と生物活性
丸山 徹／熊本大学薬学部薬剤学
3. 血小板代替物としての認識蛋白質結合アルブミン重合体
武岡真司／早稲田大学理工学総合研究センター
4. The use of modified albumins as versatile carriers for cell-specific drug delivery.
D.K.F. Meijer／Groningen Univ. (The Netherlands)

特別講演 1

模型人工肺による生命維持法の開発と応用

寺崎秀則／熊本大学医学部麻酔学

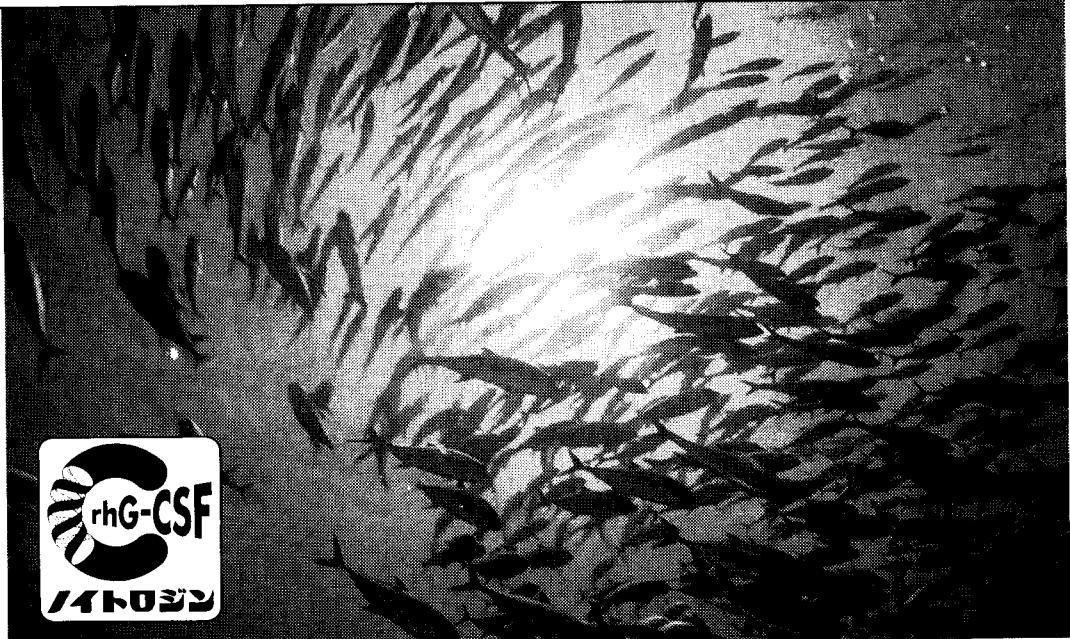
特別講演 2

高分子治療剤開発の現状

前田 浩／熊本大学医学部微生物学

シンポジウム 1 「治療薬としてのヒト抗体開発の現状」

1. ヒト免疫系の再構築と抗体産生
垣生園子／東海大学医学部免疫学
2. C型肝炎ウイルスエンベロープ蛋白に対するヒト型抗体の開発
松浦善治／大阪大学微生物病研究所付属エマージング感染症研究センター
3. 抗ガングリオシド抗体および抗VEGF受容体抗体の抗腫瘍効果とそのメカニズム
太田聰／協和発酵工業株式会社東京研究所



遺伝子組換えヒトG-CSF製剤

指定医薬品・要指導医薬品

薬価基準収載

ノイトロジン®

NEUTROGIN[®] injection

一般名 レノグラスチム(遺伝子組換え)

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2-19
(03)38218

※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。

人工血液としての条件 liposome-encapsulated hemoglobinの有効性, 安全性への検討

Assessemnt of Artificial Blood for Clinical Use: Efficacy and Safety of Liposome-Encapsulated Hemoglobin

高折益彦
Masuhiko Takaori

和文抄録

21世紀の洗練された医療を推進するためには人工血液の開発は欠かすことが出来ない。血液成分中、とりわけ酸素運搬体である赤血球の開発が臨床上、現在特に望まれている。そのような人工赤血球液はまず急性出血の治療に、また一般輸血用血液使用の補助としての用途が早急の課題であろう。そして現在廃棄されている献血血液の中のヘモグロビンを再利用することも一課題であろう。しかしそのような人工赤血球液には薬剤製品として一定の必要条件が付帯される。すなわちその必要条件とは酸素運搬体としての有効性と製剤としての安全性とである。本稿においてはこれらの必要条件を指摘し、さらにそれらが満足されているか実証するにはいかなる方法を用いるか、具体的な検討を試みた。

Abstract

Development and practical use of artificial blood is essential for sophisticated medicine in the new century. Specially, as an oxygen transporter, new artificial red cell is desired to be developed sooner rather than substitutes of other blood components. It is an urgent object that the articial red cell should be used to treat acute, unexpected hemorrhage and to shear in transfusion of donated blood supplementary. Furthermore there will be another object that hemoglobin contained in red cells which were donated and expired for some reasons should be reused in medical field. However the new developed artificial red cell must be adjusted to pharmaceutical criteria as a new drug and blood substitute, particularly its safety, and must be satisfied for efficacy as an oxygen transporter. In this paper, we attempted to propose our designs and actual methods for assessment and validation for them.

Keywords

artificial blood, artificial red cell, drug safety, drug efficacy, drug evaluation & validation, liposome-encapsulated hemoglobin

はじめに

現在人工血液の開発は現代医療を支えるために不可欠な問題である。それには種々の要因があげられる。すなわち現在行なわれている輸血医療が本質的に組織移植であり、そのため各種免疫的障害がその使用を妨害し、そして輸血後に現れてくるためである。また輸血用血液、なかんずく赤血球、血小板は単なる物質ではなく、それぞれその細胞内にて酵素活動を営む生物体である。そのため我々の生体外では限られた時間、限られた環境下でしか生存できない。そのため生体からそれらを採取、特定環境下に保存し、常に輸血のために準備していなければな

らない。そしてさらに最近のわが国をはじめ諸外国でも問題となってきたが、血液の提供者の減少が生じている。そのため輸血用血液の供給制限が生じてきている。渡辺の試算¹⁾によれば、この数年以内に輸血用血液供給量は血液使用量を下回るようになるという。これらの問題を解決するためにも人工血液の開発は不可欠な問題となってきている。

輸血は各種血液成分をその目的に応じて生体に補給するのが原則である。その中で実地臨床の場にあって最も重要な位置を占めるのは赤血球の補給である。すなわち生体の各臓器、組織に酸素を運搬する赤血球を補給することである。事実、血液製

東宝塚さとう病院 〒665-0873 兵庫県宝塚市長尾町2番地1号1-2 Higashi Takarazuka Sato Hospital, Nagao-chou, Takarazuka City, Hyogo, Japan
論文受付 2002年5月25日 受理 2002年5月31日

●編集後記●

「本号では高折益彦先生(東宝塚さとう病院名誉院長、川崎医科大学名誉教授)から主に我国で開発されているリポソーム型人工赤血球に対して、機能面、安全面、有効性面で満足すべき要件が提示され、開発側にとって大いに参考になる総説と思われる。また、リポソーム型Hb製剤に関する原著論文が3報投稿されました。この様な臨床適応に関する研究論文の積極的な投稿を期待する次第である。更に、再生医療からのアプローチ

に対して人工血液に対する新しい動きが広がりつつあるのを感じた。次号Vol. 10(3)は9月4, 5日に熊本にて開催されます第9回日本血液代替物学会(大会長 熊本大学医学部教授 西勝英先生)のプログラム・予稿集となります。その関係で、本号ではごく最近投稿されました原著論文も掲載したく発刊が少し遅れました。」

(武岡真司)

ての酸素運搬能の機能が失われる。したがってHbを酸素運搬体として利用した人工赤血球であるかぎり、このmetHbが保存中に一定量以上に増加しない状態を得なければならない。少なくとも製品化された状態でのmetHbはHbV粒子内Hbの5%以下に保持されるべきであろう。

3) リポソーム粒子の粒絆

赤血球の粒絆の直絆は7μm、厚さは1-2μmである。しかし血管内を循環している際は円盤中央部を先頭に長径が3-4μm、厚さが2-3μm(著しい場合には長径が5-6μm、厚さが1.5-2.0μm)の長鳥帽子形となって流れている。これは赤血球の細胞膜、および内部構造が非常に大きな可塑性を有するためで、これによりかなり細い血管でも通過することを可能ならしめている。しかし現在使用しうる脂質二分子膜でHbを包埋した微小球体では赤血球同様の可塑性を得ることは困難で、全く可塑性がないと考えるのが正しい。したがって毛細血管をスムースに通過するためには0.5μm以下の直絆に規定するべきであると予想される。

4) HbV粒子の液体内での分散性

上記の粒絆の製品が得られたとしても、そのそれぞれの粒子が凝集して巨大凝集塊を生じた場合には微小循環系の血管内をスムースに流れることができなくなる。そこでこのような凝集塊の発生を防ぐためHbV表面をpolyethylene glycol(PEG)にて修飾することが行なわれている。すなわちリポソーム膜表面の99%以上をPEG分子にて被覆してリポソーム粒子間での凝集を防止する。ただその量が多すぎる場合には粒子サイズの増大をもたらすので、その量のPEG・リン脂質対比を最小限低く抑える必要性があり、現在では0.3mol%程度に保たれている¹⁴⁾。

5) 製剤のpH

生体の循環系への投与を目的とした製品であるからには、その溶液のpHは7.40近傍にあるべきである。特に出血治療を目的とした場合にはこの点が重視される。そして酸塩基緩衝能が大きいものでは特にその必要性が問われる¹⁵⁾。HbVは生理食塩水にHb包埋リポソーム粒子を浮遊させたものであるので、酸塩基緩衝能は大きくはない。しかしpHをアルカリ性に傾ければリン脂質とHb分子とが反発し合うことになり、包埋に必要なリン脂質量を増加させる結果となる。またpHを酸性に傾ければHbのmetHbへの移行を容易ならしめる。この見地からもpHをほぼ中性の7.40近傍に設定することが望ましい。

6) 製剤溶液粘度

製剤の溶液粘度も本質的に血液そのものの粘度と同等であることがのぞましい。しかし球形で、その粒絆が250nmで、かつほとんど変形性がないHbVの場合に通常の血液と同等の粘度を有することで血液循環、とりわけ微小循環血流に好ましい結果をもたらすか、またそのような酸素運搬体が効果的に酸素を運搬するのに適しているか、今後に研究課題を残している。さらにこのような人工血液が使用される状況、すなわち多くは血液希

釀状態での冠循環維持に正常血液粘度と同等のもので良いのか¹⁶⁾疑問が残るところである。

7) 製剤の均一性、恒常性

すべて製品は常に一定の品質を維持することが必要で、医薬品製造指針2001¹⁷⁾に記載された有効成分ならびに補助成分の含有量規定によれば各ロット間でのバラツキは一般的に1%以下に定められている。また不純物の検出規定によれば、これらはすべて0.1%以下に抑えなければならないと規定されている。

また臨床使用上、製品を液状保存(低温下)した場合では少なくとも半年、凍結保存した場合には少なくとも2年以上の恒常性があることが望まれる。最近のHbVの製品プロフィールは表(1)に示すごとく、上記人工血液としてのactivityも、また後述する安全性もほぼ満足していると思われる。

Table (1)
Characteristics of HbV and PEG-HbV compared with XLHb and RBC

Parameters	XLHb*	HbV	PEG-HbV	RBC
Diameter (nm)	5	244 ± 70	251 ± 76	8000
Hb (g/dl)	10.0	10.2	10.0	ca. 15
Lipid (g/dl)	-	5.9	5.7	0.2
[Hb]/[Lipid]	-	1.73	1.75	75 (13*)
PEG-lipid (mol%)	-	-	0.3	-
p ₅₀ (mmHg)	32	35	35	28
OTE (%) ^b	32	37	38	28
metHb (%)	< 2	< 3	< 3	< 0.5
HbCO (%)	< 2	< 2	< 2	< 5
pH at 37°C	7.4	7.4	7.4	7.4
Osmolality (mOsm)	300	300	300	300
Oncotic pressure (mmHg)	30	20	20	25
Viscosity (cP) at 37°C	1.6	9.4	3.7	4.0

*Intramolecular crosslinked hemoglobin with bis(3,5-dibromosalicyl)fumarate (DBBF).

^aOxygen transporting efficiency: the difference in oxygen saturation (%) between pO₂ of 40 and 100 mmHg.

^bIncluding membrane proteins (ca. 1 g/dl) as lipid.

^cOncotic pressure was adjusted by addition of γ-human serum albumin.

cited from "Evaluation of the oxygen transporting capability of hemoglobin vesicles": Takeoka, S., Sakai, H., Kobayashi, K., Tsuchida, E., In: Blood Substitutes - Present and future perspectives Tsuchida, E., ed. Amsterdam Elsevier Sci. 1998, 171-184."

4. 有効性 (efficacy) の検討と評価

生体に投与される人工血液が実際に実地治療上有効に作用するためには以下の諸条件を満足しなければならない。

1) 生理的循環において組織代謝に必要な酸素の運搬

(a) 肺における酸化効率

吸入酸素濃度21-40%下にある生体に投与して肺におけるHbV中のHb酸素飽和度が97%以上に得られることが必要であろう。実地臨床の場にあって人工血液の投与を受ける患者は一般に酸素吸入を受けている可能性がきわめて高い。しかし長時間にわたり吸入して肺に障害を与えない酸素濃度は40%であるから、一応、40%の酸素吸入下にて97%以上のHb酸素飽和度が得られれば充分と認められる。すなわち40%濃度の酸素吸入をしている生体にHbVを投与して、その動脈血酸素飽和度を測定することから検証できる。

結果は、単一のシグナルでなく、複数のシグナルの協調的作用によってCD34⁻KSL細胞の生存、増殖が調節されていることを示している。従い、前述のc-Kitの発現にもかかわらず、反応しないCD34⁻KSL細胞が存在するという結果は、未知の因子がCD34⁻KSL細胞の維持、増殖に関与することを強く示唆する。

TPO、SCFそれぞれ単独で培養後にSCF、TPOを添加した場合、最初にTPOで培養した方が、その後の培養で多くの造血細胞を産生する。この結果は、2日間の培養期間においてTPOはCD34⁻KSL細胞に対し、SCFよりもより増殖に対してcompetentな状態にしていると考えられる。この結果は、c-KitSca-1Lin造血幹前駆細胞集団に対する、TPOのearly acting cytokineとして作用するという性質¹⁹⁾が、同様にCD34⁻KSL表現型を示す造血幹細胞集団に対してもいえることを示唆している。SCFは多くのサイトカインと協調的に作用し、その増殖刺激を増強するが、単独で添加した場合にはcompetentな状態に細胞を持っていく活性は認められない。CD34⁻KSL細胞に対しても、同様にearly acting cytokineとしての機能は有していないように示唆される。

Shimomuraらは、5-FU処理マウスの骨髄c-Kit^{+ Sca-1⁺Lin}細胞に対する作用を検討しているが²⁰⁾、この細胞はSCF以外にもG-CSF、IL-3、にも顯著に反応し増殖する。また、IL-6、LIF、IL-11といったサイトカインに対しても弱いながら反応性を示す。これらの結果から、5-FU処理c-Kit^{+ Sca-1⁺Lin}細胞は、前駆細胞を含む集団であり、造血幹細胞に対する真の作用を検出しているのではない。また、Shimomuraらの報告では正常骨髄CD34陰性細胞に対する作用を検証しているが、血清の入った系であり血清中の因子が造血幹細胞に作用することを否定できない。また、5-FU投与マウス骨髄の造血幹細胞はc-Kitの発現が低下しているとの報告もあり²¹⁾、5-FU投与マウス骨髄c-Kit^{+ Sca-1⁺Lin}細胞が前駆細胞集団を含むとすると造血幹細胞では造血前駆細胞と全く異なるサイトカインへの反応性を有していると想定される。

最近Flt-3の発現は、造血幹細胞の自己複製能の消失と一致することが報告された²²⁾。本研究においてもFLは単独で増殖刺激を与えず、CD34⁻KSL細胞に対して直接的な作用を有さないことを示した。さらに、TPOはSCFと協調的にCD34⁻KSL細胞の増殖を刺激するが、FLはSCFやTPOとの協調的な作用を示さず、CD34⁻KSL細胞培養系へのFL添加の効果を確認することはできなかった。Kobayashiらはヒト造血幹前駆細胞集団に対するTPO、SCF、FLの作用を検証している²³⁾。その結果、ヒトCD34^{+ c-Kit^{low} CD38^{-/low}}細胞は、IL-3に対する反応性が低く、マウスCD34⁻KSL細胞とほぼ似たようなサイトカインへの反応性を示している。しかし、マウスCD34⁻KSL細胞はFLに対しても反応性が低いが、ヒトCD34^{+ c-Kit^{low} CD38^{-/low}}細胞は、FLとTPOを同時に作用させることで強い相乗効果が認められている。この結果は、今回示したマウスCD34⁻KSL細胞のFLに対する反応性と全く異なる。最近ヒトでもCD34陰性の造血幹細胞集団が認められており、CD34^{+ c-Kit^{low} CD38^{-/low}}細胞がマウスCD34⁻KSL細胞集団に相当する細胞群といえず、このようなサイトカインへの反応性の相違は細胞集団の違いによるかもしれない。あるいは、造血幹、前駆細胞の性質のヒトとマウスの種差に由来するものかもしれない。

ない。いずれにせよ、今後のヒトCD34陰性分画に含まれる造血幹細胞の性状の詳細な解析が必要である。

結論として、CD34⁻KSL細胞がほとんどのサイトカインに反応せず、SCF、TPOの二つの限られたサイトカインに反応性を示すことを明らかにできた。この結果は、前駆細胞と幹細胞の間で、造血環境からの刺激受容に全く異なった反応性を有していることを示す。造血幹細胞を試験管内で増幅することが可能となれば、造血幹細胞移植療法の改善、造血細胞に対する効率的な遺伝子治療への応用が期待されている。今回明らかにしたTPOの造血幹細胞に直接作用するという性状から、造血幹細胞増幅系においてTPOを利用することが有効であることを示すことができた。

参考文献

- Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M, Jackson IJ, Barrandon Y, Miyachi Y, Nishikawa S. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 2002;416:854-60.
- Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, Berkowitz RL, Cabbad M, Dobrila NL, Taylor PE, Rosenfield RE, Stevens CE. Outcomes among 562 Recipients of Placental-Blood Transplants from Unrelated Donors. *N Engl J Med* 1998;339:1565-77.
- Miller CL, Eaves CJ. Expansion in vitro of adult murine hematopoietic stem cells with transplantable lympho-myeloid reconstituting ability. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94: 13648-53.
- Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, Ling LE, Karanu FN, Bhatia M. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* 2001; 2:172-80.
- Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996;273:242-5.
- Lok S, Kaushansky K, Holly RD, Kuijper JL, Lofton-Day CE, Oort PJ, Grant FJ, Heipel MD, Burkhead SK, Kramer JM. Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 1994;369:565-8.
- de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA, Darbonne WC, Henzel WJ, Wong SC, Kuang WJ. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994;369:533-8.
- Bartley TD, Bogenberger J, Hunt P, Li YS, Lu HS, Martin F, Chang MS, Samal B, Nichol JL, Swift S. Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* 1994;77: 1117-24.
- Kato T, Ogami K, Shimada Y, Iwamatsu A, Sohma Y,

リポソーム内に包埋させてからHbCOからCOを除去しなければならない。最終的なHbV製剤にはHbCOが存在していないことが必須である。さらにHbVの溶液内にも不純物としてのHbCOが存在しないことが必須である。したがってHbV製剤として、その中にHbCOが遊離体としても、またHbV粒子内にもHbCOが存在していないことを確認する。

(b) 残存リン脂質量

Hbをリポソームにて包埋する過程を経るため遊離リン脂質がHbV製剤中に残留する可能性がある。このようなリン脂質の生体内注入にともない、血液中の補体を活性化し、血液中の血小板が各種臓器血管床に蓄積することもある²⁰⁾。したがってHbV製剤中の余剰の遊離リン脂質の存在は極力回避しなければならない。この点についての検定も必要である。

(c) 残存PEG量

Hbをリポソームにて包埋後、それらのリポソーム粒子の凝集を抑制するために粒子表面にPEG修飾をおこなう。PEGそのものの毒性は比較的小ない²¹⁾。しかし余剰のPEGが製剤(溶液)内に残存していた場合、製品封入用のプラスチック製品と反応することもあり、その残存がないように努めるべきである。

(d) 遊離Hb

前述にしたごとく遊離Hbは血管内皮細胞の産生するNOを吸収するため生体には有害である。それゆえHbV製剤内に残存することは許されず、その検定は不可欠である。

(e) 内毒素

発熱物質としての内毒素は製造過程の各部において混入しうる。したがって最終製品として完成した時点でその存在の有無を検定する。すなわちin vitro検査とともに生物学的手法にて確認しておくべきである。

(f) 無菌性

病原性の有無にかかわらず製剤中に微生物体を検出しない状態が当然要求される。HbVを加熱滅菌することは不可能であるので、最終製造工程に至るまで、完全な無菌加工操作が必要である。そして最終段階での微生物体の混入の有無に関して適確な検定が必要である。

以上これらの製剤安全性検査は各ロット毎に確認する。

2) 製剤の生体内投与での安全性確認

製剤投与後の生体に対する安全性、すなわち生体機能に即時的に、また遅発的に障害を与えないことが要求される。一方、検討すべき生体機能は多岐にわたる。しかしその個々について可能なかぎり検討していかねばならない。もちろん最終検査はヒトを対象とした、いわゆる治験結果を必要とするが、それ以前に動物を対象とした前臨床試験にて検討しておかねばならない。以下、それら検討すべき項目と、いかなる手法、検査法によつ

て確かめていくか述べたい。なおそれらの検査値の異常判定、ならびにその重症度の判定に関しては平成4年6月29日厚生省薬務局安全課長通知「薬安第80号による“医薬品等の副作用の重症度分類基準について”を適応する。

(a) 精神活動、習性反応

臨床治験においては問診による精神活動の検査、記憶テスト、ならびに知能テストによる検定が可能である。これに対して前臨床試験では動物の行動知能習性変化を迷路試験、食事摂取試験などから推定する。急性期反応(即時型反応)を投与後24-48時間に、また慢性期反応(遅発性反応)を投与後2、6月にわたり観察して判定すべきである。

(b) 中枢神経、および末梢神経機能

前臨床試験、臨床治験とも、脳波検査、聴覚皮質反応検査、あるいは末梢神経刺激反応試験から検査しうる。精神活動検査同様、投与後24-48時間の急性期、投与後数ヶ月から6月にわたり慢性期に観察する。

(c) 鞘帯、骨格筋機能

臨床治験の場合には自由運動への障害の有無、前臨床試験の場合には神経電気刺激とともに四肢骨格筋運動反応、筋電図所見、血清CPK(creatine phosphokinase)値変動から判定可能である。そして急性期反応として投与後24時間まで、慢性期反応として投与後48時間から1ヶ月の観察から判定する。

(d) 血清電解質組成の保持

血清電解質(Na, K, P, Ca, Mg, Cl, HCO₃)値が投与直後から投与後少なくとも12時間以内は生理的範囲に維持されていることを観察する。

(e) 循環機能

i. 心筋収縮力

HbV投与後において心筋収縮力が生理的範囲内に保たれていることが必要条件である。また循環系への負荷(前負荷、後負荷)に対して、少なくとも生理的な反応範囲で対応しうることが必要である。これらの検定は前臨床試験、臨床治験とともに心拍出量測定、心室取縮容量/圧曲線(心エコー的観察、必要に応じて血管内カテーテルを用いた観血的観察)、心作動曲線、血管内脈波速度測定、心電図観察等の総合評価から判定する。

ii. 心拍出量の各臓器・組織分布

前臨床試験では心拍出量測定ならびに所定臓器の組織酸素分压測定、その還流静脈酸素分压測定、フレチスマグラフから判定可能である。心腔内に注入したmicrosphereの各臓器、組織への分布から確認しうる。

iii. 循環血液量の血管内分布

前臨床試験では放射性同位元素標識赤血球を用いた臓器、組織血液量測定から判定可能である。またF cell ratioを測定することにより大血管、末梢微小循環系における赤血球分布状況をも検定できる。またこれらは臨床治験においても一部臓器では

rocyte), E-mix (erythrocyte mixed colony), また直径 2 mm 以上のコロニーをHPP-CFC (high proliferative potential-colony forming cell) とした。

3. 結果

3. 1. CD34⁻KSL細胞に直接作用するサイトカイン

セルソーターを用いてCD34^{-low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻細胞を一個づつウェルにソートした。ウェルには造血前駆・幹細胞集団に対して作用すると考えられる因子を予め添加しておき、培養とともに造血細胞数の変化を測定した。(Fig. 1)

まず50個あるいは16個のCD34⁻KSL細胞について各サイトカインを単独で作用させ、CD34⁻KSL細胞に対する直接的な効果

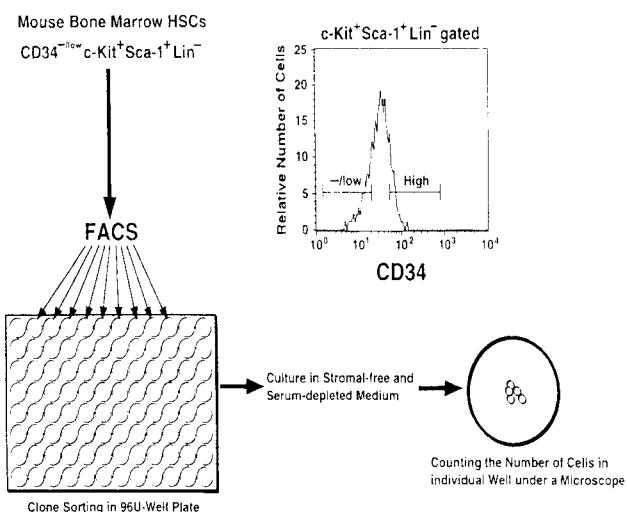


Fig. 1 Schema of single cell culture. CD34^{-low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ cells were deposited at one cell per well with cell sorter. The cells were cultured in serum-depleted medium supplemented with various cytokines. The number of cells per well was monitored under a microscope until day 8 of culture.

Table 1. Effects of Cytokines on Clonal Proliferation of CD34⁻KSL cells in Serum-Free Culture

Cytokine	No. of wells analyzed	Cells / Well			
		0	1	2-7	8 [≥]
SCF	50	6	4	40	0
TPO	50	16	8	22	4
Flt-3 ligand	50	49	1	0	0
IL-3	32	12	4	1	0
VEGF	32	30	2	0	0
Epo	16	14	2	0	0
G-CSF	16	13	3	0	0
GM-CSF	16	14	2	0	0
IL-6	16	14	2	0	0
IL-11	16	15	1	0	0
LIF	16	13	3	0	0
Oncostatin M	16	15	1	0	0

Single CD34^{-low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ cell were seeded in each well containing serum-depleted medium supplemented with the indicated cytokines. After 5 to 6 days of culture, the number of cells in each well were scored.

を検討した結果、確実に分裂を誘導する活性が検出されたのはSCFとTPOを添加したウェルのみであった(Table 1)。SCFの単独添加では、79.3±8.1%のCD34⁻KSL細胞がSCFに反応し増殖した。また、TPOの刺激では50.0±15.6%のCD34⁻KSL細胞が増殖した(Fig. 2, Table 2)。

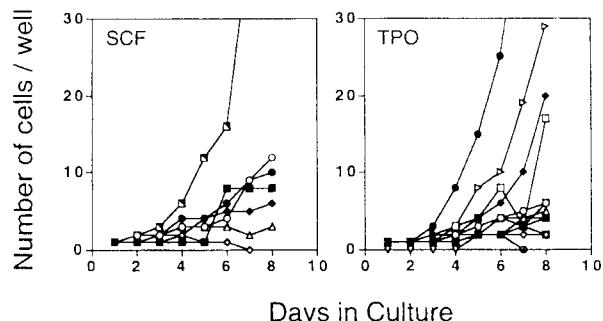


Fig. 2 Effects of SCF and TPO on clonal proliferation of CD34⁻KSL cell. Single CD34^{-low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ cells were individually cultured in 200 μ l serum-depleted medium supplemented with 100 ng/ml mSCF or 20 ng/ml mTPO. Data from one representative experiment are shown.

Table 2. Effects of SCF and TPO on proliferative response of single CD34⁻KSL cell

Cytokine	% proliferative clones
SCF	79.3 ± 8.1
TPO	50.0 ± 15.6
SCF+TPO	90.0 ± 5.7

CD34^{-low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ cells were sorted at one cell per well in serum-depleted medium supplemented with indicated cytokines. (n=50 cells) Clonal growth in each well was evaluated after 5 days culture. The data represent the mean percentages ± SD of clones that underwent cell division at least ones in three individual experiments.

統いて、SCFとTPOの協調的作用について検討した。SCFとTPOを培養開始時に同時に添加、あるいは培養開始時にSCFあるいはTPOを添加し、2日後にTPO、SCFを添加しウェル中の細胞数を計数した(Fig. 3)。SCFとTPOを同時に添加したウェルでは、90.0±5.7%の細胞が増殖し、SCF添加後TPOを添加した(TPO遅延添加)場合、TPO添加後にSCFを添加した(SCF遅延添加)場合では、それぞれ68.7%, 75%のCD34⁻KSL細胞が刺激に対して反応した。SCF遅延添加とTPO遅延添加では異なる細胞増殖のカイネティクスを示した。すなわち、培養6日での増殖細胞数の平均(細胞増殖が見られたウェルの細胞数を平均した)は前者では35個、後者では84個であり、TPOで培養を開始した場合の方が、より細胞が増殖している。培養8日目では100細胞以上に増殖しているウェルは前者では25% (4/16)であるのに対し、後者では62.5% (10/16)であり、最初の2日

boelastogramの測定を行ない判定する。

ii. 同様に血小板機能に影響を与えないことを血小板凝集能、血小板粘着能から判定する。

iii. 同様に纖維素溶解機能への影響をthromboelastogram、ならびに血漿FDP、D-dimer、TAT、FPA値から判定する。

iv. 臨床治験においては血管損傷とともに微小血管の収縮機能を出血時間、Rumpel-Leede法から判定する。

(m) 造血機能

前臨床試験、臨床治験ともに、末梢血液細胞解析(赤血球数、網細胞数、白血球数、白血球分画、血小板数、Hb値、Hct値)、骨髄細胞解析を投与後4週間まで行ない、その結果から判定する。

(n) 各種内分泌機能

各種ホルモン、ACTH、TSI、ADH、prolactin、thyroxin、triiodothyronine、insulin、cortisol、aldosterone、血漿renin活性、estrogen、progesteron、testosteroneの血液中濃度変化を投与直後、1週間、4週間と観察して判定する。

(o) 生体防御機能、免疫機能

i. HbV投与後に血漿中の免疫グロブリン、補体濃度に影響がないこと、すなわちHbV投与後、1-24時間の血液中免疫グロブリン、補体濃度に変化が生じないことを確認する。

ii. HbV投与後にHbVに対して抗体を産生しないこと、すなわち前臨床試験、臨床治験ともに1-10週時の血清とHbVとの反応をin vitroにて観察する。また臨床治験ではパッチ試験、皮刺試験にて反応を検査する。前臨床試験では上記期間中にその動物に少量のHbVを皮内、または静脈内に投与して反応を観察する。

iii. 貪食能を含む細胞免疫機能に影響を及ぼさないこと、すなわち前臨床試験ではHbV投与後の生体網内系での貪食能を炭素微粒子法にて観察、臨床治験では末梢血液内マクロファージの貪食能(in vitro)を炭素微粒子、イースト粒子貪食能検査法から判定する。

(p) 化学的メディエータの遊離

前臨床試験、臨床治験ともに、HbV投与後、1-4時間での血液中histamine、serotonin、leukotriene等の化学的メディエータ値を測定、それらに異常な変化がないことを確認する。

(q) 生殖機能

前臨床試験ではHbV投与後1-12月間、周期的に動物の性周期、卵子、精子生産状況を観察、同時に生殖能力を観察する。また臨床治験では同期間中の性周期観察(女性)、精子性状の観察(男性)から判定する(ただし臨床治験では妊娠の希望のある、あるいは可能性のあるものを対象としない)。

(r) 催奇形性

前臨床試験でHbV投与個体から3代目までの継代個体まで観

察して確認する。

(s) 悪性腫瘍誘発性

前臨床試験でHbV投与個体から3代目までの継代個体まで観察する。そして非投与個体との比較において腫瘍の発生率を増加させないことを確認する。

(t) 薬剤相互作用

臨床にて頻繁に使用される薬剤とin vivo、in vitroにおいて、ともに反応しない、あるいはそれらの薬剤の薬効に影響を与えないことを検討する。

また原則としてHbVとの相互作用を防ぐため、HbVの血液中半減期の4倍の期間、すなわち1~2週間内での脂肪乳剤の投与は回避することが望ましいと思われる。またHbVと他の輸液剤との混合(in vitro)注入は行なわないことは原則となる。しかしその他の薬剤については適宜選択して臨床治験にて検討せざるをえない。

おわりに

以上開発する人工血液、とりわけHbVを中心にそれに付帯されるべき有効性、安全性について述べた。有効性に関しては少なくとも24時間内は酸素運搬能力と循環血液量維持能力とがあることが必要条件である。しかし安全性に関しては初期段階から全てを網羅することは困難である。事実、医薬品製造指針¹⁷⁾においてもその限界を指摘している。そのため一般的に検討すべき諸点について前臨床試験、臨床治験にて一律に確認し、次に遭遇する特殊な点について順次検討していくべきであろう。一方、緒言にて述べたごとく人工血液の開発は急務である。そのため最小限の、そして有効性に関して最も重要な点、安全性でもっとも憂慮される諸点を優先的に検索すべきである。事実、現在われわれが手にしている人工血液、すなわちHbVについてもなお問題点を残している。それらの点は速やかに改善し、一刻も早く臨床使用に供しなければならないと痛感する。

Reference

- 渡辺 嘉久、高橋幸喜、掛川裕通、黒木奈津子、赤座達也、岡 功夫、田所憲次、十字猛夫 日本の将来推計人口をもとにした今後30年間の輸血用血液の需給予測 日輸会誌 1998;44:328-335.
- Spahn DR, van Brempt R, Theilmeier G, Reibold J-P, Welte M, Heinzerling H, Birck KM, Keipert PE, Messmer K. Perflubron, emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery Anesthesiology 1999;91:1195-1208.
- Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J, Mallory MN, 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.
- 高折益彦. 赤血球代替物の臨床応用をめざして. 人工血液 2000;8:85-89.

サイトカインによる造血幹細胞の増殖制御

Cytokines that directly affect hematopoietic stem cells

日野原 敦, 西川 光郎
Atsushi Hinohara, Mitsuo Nishikawa

和文抄録

造血幹細胞は、個体から直接幹細胞を分離できる数少ない組織特異的な幹細胞である。造血幹細胞に直接作用する因子を同定することで、幹細胞としての性質をより詳しく理解することができる。正常マウス骨髄中に存在する造血幹細胞はCD34^{-low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ (CD34 KSL) の表現型を示す。われわれは、高度に純化されたCD34⁻KSL細胞に対する種々のサイトカインの直接的な作用を無血清条件のクローナル培養系において検討した。その結果、従来造血前駆細胞、幹細胞の培養に使用してきたサイトカインのほとんどが単独でCD34⁻KSL細胞の増殖を刺激しなかった。検討したサイトカインの中で、SCF、あるいはTPOが、それぞれ単独でCD34⁻KSL細胞に増殖刺激を入れた。8日間の培養でSCFでは79.3±8.1% (n=50) の細胞が増殖し、TPO添加群では50.0±15.6% (n=50) の細胞が増殖した。SCF単独添加で2日間培養後にTPOを添加、あるいはTPO単独で培養後にSCFを添加した場合には、培養開始後6日目の細胞数の増加は、後者においてより増殖能の高い造血細胞が誘導されることから、培養系にTPOをあらかじめ添加した方が造血幹細胞の増幅に有効であることが示された。また、SCF、TPO単独で5日間培養した際には、増殖したCFCのうち49%がHPP-CFCであり、TPOで培養した際には増殖したCFCのうち65%がHPP-CFCであった。以上の結果から、TPO、SCFはともにCD34⁻KSL表現型を示す造血幹細胞に直接作用し、増殖を誘導するが、それらの因子の造血幹細胞に対する作用メカニズムは異なることが示唆された。

Abstract

Organ specific stem cells are defined as the cells that have the capability to self-renew and differentiate into functional cells. Among these stem cells, hematopoietic stem cells (HSCs) are unique population since they can be enriched according to their cell surface markers. Mouse bone marrow HSCs can be highly enriched in CD34^{-low} c-Kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻ (CD34 KSL) cell fraction and we evaluated direct effects of various cytokines on CD34⁻KSL cells clonally in serum depleted culture conditions in order to define which environmental factors affect HSCs. Most of cytokines, act on hematopoietic cells, did not sustain CD34 KSL cell survival and proliferation. Only stem cell factor (SCF) or thrombopoietin (TPO) alone stimulated proliferation of CD34⁻KSL cell. CD34⁻KSL cell proliferation were observed in 79.3 ± 8.1 % of wells (n = 50) in the presence of SCF, and 50.0 ± 15.6% (n = 50) in the presence of TPO after 8 days of culture. When CD34⁻KSL cells were cultured in the presence of SCF or TPO alone 2 days and subsequently cultured in the presence of both SCF and TPO for 4 days, better proliferation of CD34⁻KSL cells was observed in the culture that was initiated with TPO at the end of culture period. More HPP-CFCs were observed in colony-forming cells (CFCs) arose from 5 days culture in the presence of TPO (65%) than in SCF (49%). These data strongly support the notion that TPO and SCF directly affect the HSCs and stimulated proliferation, and that SCF and TPO has discriminating effects on HSCs.

Keywords

hematopoiesis, hematopoietic stem cells, cytokine, cell division, stem cell factor, thrombopoietin

1. はじめに

幹細胞システムは、組織特異的な機能細胞を供給するとともに幹細胞の自己複製を行い生体の恒常性を保っている。分化し

た細胞と異なり、幹細胞は増殖能が低く、特定の部位(niche)に存在することが確認されている¹⁾。通常、ヒトでは臓器障害などにおいても、幹細胞が動員され臓器が修復されることはない。

キリンビール株式会社医薬カンパニー医薬探索研究所 群馬県高崎市宮原町3番地 Pharmaceutical Research Laboratories, Pharmaceutical Division, Kirin Brewery Co., Ltd. 3 Miyahara, Takasaki, Gunma, Japan

論文受付 2002年5月18日 権論受理 2002年6月17日

原著

ラットhemodilutionモデルにおける NRC (Neo Red Cell) の効力持続性評価

Duration of efficacy of NRC (Neo Red Cell) in a rat hemodilution model

筒井洋治, 木村哲寛, 石塚隆伸, 大森伸二, 志澤 隆, 後藤 博, 緒方嘉貴, 金田伸一
**Youji Tsutsui, Tetsuhiro Kimura, Takanobu Ishizuka, Shinji Oomori, Takashi Shizawa, Hiroshi Goto,
Yoshitaka Ogata, Shinichi Kaneda**

和文抄録

カプセル型人工酸素運搬体であるNRC (Neo Red Cell) は、リポソーム表面を親水性高分子で修飾することにより血中滞留性を向上させている。しかし、生体内ではNRC中のヘモグロビンのメト化に伴い、NRCの酸素運搬能が低下することから、その実質的な機能の半減期（有効半減期）は、リポソームとしての半減期にメトヘモグロビンの生成速度を加味したものであると考えられた。そこで、ラットhemodilutionモデルにおいて、NRCの有効半減期と酸素代謝改善効果との関係について検討し、その効力の持続性を明確にすることを試みた。

麻酔下でWistar系雄性ラットを用い、同種血漿による75%血液交換を行った後、NRCあるいは対照とするヒトまたはラットの洗浄赤血球もしくは生理食塩水を投与し、酸素代謝の指標として血中乳酸値・血液ガスを測定した。NRC群に関しては、さらにその動態変化の指標としてクリット値・メト化率を測定した。

生理食塩水群および未投与群では観察時間中に死亡する個体が認められ（4/5例、3/5例）、生存例においても血中乳酸値・血液ガスの基準値への回復は観察されなかった。一方、NRC群でのこれら酸素代謝の指標は、洗浄赤血球群と同様に投与終了6時間後まで概ね正常値の範囲内で推移した。この時、NRCクリット値・メト化率の測定結果から有効半減期は6時間程度と推定された。これらの結果、NRCの酸素代謝改善効果は、その有効半減期に相当する時間まで持続することが示された。

Abstract

NRC (Neo Red Cell), liposome encapsulated hemoglobin, as a blood substitute has a long circulation time achieved by modification of the liposomal surface with hydrophilic polymer. However, due to methemoglobin generation, it is thought that "half-life of efficacy" as the period to reduction by half of actual oxygen transport efficiency should be estimated by circulation time of liposome and rate of methemoglobin generation. In this study, to clarify the duration of efficacy of NRC, we examined the relationship between half-life of efficacy and efficiency in improving oxygen metabolism in a rat hemodilution model. Male wistar rats were anaesthetized, and 75% blood exchange was carried out with a homologous plasma. Either of NRC, RBC of human or rat or saline was administered at a dose of 20ml/kg. Indexes of hemodynamics and blood lactate, blood gases as indexes of oxygen metabolism were measured. In addition, NRC-crit and methemoglobin generation were measured in the NRC group. The results of NRC-crit (NRC volume as a percentage of blood) and methemoglobin generation suggested the half-life of efficacy of NRC was about 6 hours. All of the rats of NRC and RBC groups survived, while some of the rats of saline and no-infusion groups were dead within 6 hours after administration. The indexes of hemodynamics and oxygen metabolism in the NRC group were maintained the same as them in RBC group for 6 hours after administration. These results confirmed that oxygen metabolism in rats administered NRC can be maintained during the half-life of efficacy.

Keywords

NRC (Neo Red Cell), half-life of efficacy, oxygen metabolism, blood exchange, blood lactate

テルモ株式会社 研究開発センター 〒259-0151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500 Terumo Corporation R&D Center, 1500 Inokuchi,
Nakai-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa 259-0151, Japan
論文受付 2002年5月1日 受理 2002年5月29日

機会に報告したい。

謝辞

本研究の一部は、厚生科学研究（高度先端医療研究事業；人工血液開発分野）および日本学術振興会科学研究費補助金（B12558112, B12480268）によって行われた。記して謝意を表す。

参考文献

- Glick MR, Ryder KW. Double trouble: hemolysis and stabilized hemoglobins (so you think you're seeing red now?). *Clin Chem* 1993;39:1761-1763.
- Ma Z, Monk TG, Goodnough LT, McClellan A, Keipert PE, Scott MG, et al. Effect of hemoglobin- and perflubron-based oxygen carriers on common clinical laboratory tests. *Clin Chem* 1997;43:1732-1737.
- Sarkozi L, Jacobs E, Clark T, Gawryl MS, Simson E. Effect of hemoglobin-based oxygen carrier-201 on common chemistry laboratory procedure. *Clin Chem* 1997;43:1792-1793.
- Chance JJ, Norris EJ, Kroll MH. Mechanism of interference of a polymerized hemoglobin blood substitutes in an alkaline phosphatase method. *Clin Chem* 2000;46:1331-1337.
- Alonsozana GLG, Elfath MD, Mackenzie C, Gregory LC, Duh SH, Trump B, Christenson RH. In vitro interference of the red cell substitute pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene with blood compatibility, coagulation, and clinical chemistry testing. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997; 11:845-850.
- Wolthuis A, Peek D, Scholten R, Moreira P, Gawryl M, Clark T, Westerhuis L. Effect of the hemoglobin-based oxygen carrier HBOC-201 on laboratory instrumentation: cobas integra, chiron blood gas analyzer 840, sysmex SE-9000 and BCT. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:71-76.
- Kazmierczak SC, Catrou PG, Best AE, Sullivan SW, Briley KP. Multiple regression analysis of interference effects from a hemoglobin-based oxygen carrier solution. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:453-464.
- Ali ACY, Mihas CC, Campbell JA. Interferences of o-raffinose cross-linked hemoglobin in three methods for serum creatinine. *Clin Chem* 1997;43:1738-1743.
- Ali ACY, Campbell JA. Interference of o-raffinose cross-linked hemoglobin with routine Hitachi 717 assay. *Clin Chem* 1997;43:1794-1796.
- Balion MC, Champagne PA, Ali ACY. Evaluation of HemoglobindTM for removal of o-raffinose cross-linked hemoglobin (HemolinkTM) from serum. *Clin Chem* 1997;43: 1796-1797.
- Callas DD, Clark TL, Moreira PL, Lansden C, Gawryl MS, Kahn S, Bermes Jr EW. In vivo effects of a novel hemoglobin-based oxygen carrier on routine chemistry, therapeutic drug, coagulation, hemorheology, and blood bank assays. *Clin Chem* 1997;43:1744-1748.
- Kazmierczak SC, Catrou PG, Boudreau D. Simplified interpretative format for assessing test interference: studies with hemoglobin-based oxygen carrier solutions. *Clin Chem* 1998; 44:2347-2352.
- Moreira PL, Lansden CC, Clark TL, Gawryl MS. Effect of HemopureTM on the performance of Ektachem and Hitachi Clinical Analyzer. *Clin Chem* 1997;43:1790-1791.
- Izumi Y, Sakai H, Hamada K, Takeoka S, Tsuchida E, Kobayashi K, et al. Physiologic responses to exchange transfusion with hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier in anesthetized rats: changes in mean arterial pressure and renal cortical tissue oxygen tension. *Crit Care Med* 1996; 24:1869-1873.
- Sakai H, Tsai AG, Rohlfis RJ, Hara H, Tsuchida E, Intaglietta M. Microvascular responses to hemodilution with Hb vesicles as red blood cell substitutes: influence of O₂ affinity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999;276:553-562.
- Sakai H, Tsai AG, Kerger H, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M, et al. Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with red cell substitutes consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J Biomed Materials Res* 1998;40:66-78.
- Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Molecular Dimensions of Hb-based O₂ Carriers Determine Constriction of Resistance Arteries and Hypertension in Conscious Hamster Model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:908-915.
- Sakai H, Yuasa M, Onuma H, Takeoka S, Tsuchida E. Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: objective comparison between cellular and acellular types. *Bioconjugate Chem* 2000;11:56-64.
- 金井泉, 金井正光 編. 臨床検査法提要(改訂第31版). 東京:金原出版, 1998;459-682.
- U.S. Department of Health and Human Services, Division of Laboratory Systems. Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA), Current CLIA Regulations (through 12/29/2000), Section 493.931, <http://www.phppo.cdc.gov/clia/regis/toc.asp>
- Glick MR, Pieper J, Ryder KW. Interference-reduced methodologies for Boehringer-Mannheim/Hitachi analyzers: validation using a recombinant hemoglobin "blood substitute" product. *Clin Chem* 1998;44(Suppl):A140-1.
- Sakai H, Takeoka S, Park SI, Kose T, Nishide H, Izumi Y, Yoshizu A, Kobayashi K, Tsuchida E. Surface modification of hemoglobin vesicles with poly (ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjugate Chem*

交換終了後(HD), サンプル投与終了後5 min, 3 hr, 6 hrの5点とし, 総頸動静脈よりそれぞれ採血を行い, 測定に用いた。Pre採血・測定を行い, 動脈血pHが7.35-7.45の範囲内にあることを確認後, 総頸静脈よりラット血漿(ヘハリン採血, 遠心処理後に血漿採取を行い, -80°Cにて保存し, 使用時には流水にて解凍した)を1.0ml/kg/minの速さで投与しながら総頸動脈より脱血を同速度で行い, 血液交換を60分間実施した。血液交換終了後, 直ちにHD採血・測定を実施した。統いて, 総頸静脈より被検物質もしくは対照物質20ml/kgを2.0ml/kg/minの速さで投与した。投与終了後の観察時間中も保温マット使用および採血を行うため, 水分補給として総頸静脈より生理食塩水の投与を1.0ml/hrの速度で実験終了時まで持続した。なお, 投与終了後の観察時間は, 後述のtopload投与実験の結果を踏まえて6時間と設定した。

2.5. 測定項目

topload投与実験ではNRCクリットおよびメト化率について, HD実験では下記に示した項目全てについて測定した。

循環指標として血圧および心拍数の測定を実施した。平均血圧(MBP)については次式より算出した。

$$\text{平均血圧(mmHg)} = \frac{\text{拡張期血圧} + (\text{収縮期血圧} - \text{拡張期血圧})/3}{2}$$

血液ガスおよび血中乳酸値は血液ガスシステム(ABL-555, ラジオメータートレーディング株)を用いて測定した。但し、過剰塩基(B.E.)値は次式にて算出した(式中のヘモグロビン濃度は赤血球およびNRC由来の合計である)⁶⁾。

$$\text{B.E. (mmol/L)} = (1 - 0.023 \times \text{Hb (mmol/L)}) \times ((\text{HCO}_3^- - 24.1) + (7.7 + 2.3 \times \text{Hb (mmol/L)}) \times (\text{pH} - 7.4))$$

ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値は多項目自動血球分析装置(SE-9000, 東亜医用電子株)を用いて測定した。NRCクリットは以下の方法にて測定した。採取した血液をテキストラン(平均分子量188000, SIGMA製)8%を含む生理食塩水と1:1の割合で混和後, ヘマトクリット毛細管にて吸引した。吸引した溶液の長さ(A1)をノギスにて測定した。遠心処理(15000g, 45分間)後, NRCの長さ(A2)をデジタルノギスにて測定し, 次式よりNRCクリットを算出した。

$$\text{NRCクリット (\%)} = \frac{A2}{A1} \times 2 \times 100$$

NRCメト化率は以下の方法にて測定した。実験終了後に採血を行い, 遠心分離(1300g, 4°C, 10分間)により上清を回収した。上清を超遠心分離(50000g, 10°C, 120分間)によりNRCを回収し, 生理食塩水に浮遊させた後, テキストラン(平均分子量188000, SIGMA製)12%を含む生理食塩水と2:1の割合で混和した。液体窒素による凍結融解処理後, 遠心分離(1300g, 4°C, 10分間)を行い, 上清にNRC由来ヘモグロビンを回収し, シアンメト法によってメト化率を測定した。

NRCクリットおよびメト化率の結果より, 酸素運搬能を保持するNRCのクリットを次式にて算出した。

$$\text{酸素運搬能を保持するNRCクリット (\%)} = \text{NRCクリット (\%)} \times (100 - \text{NRCメト化率 (\%)}) / 100$$

2.6. 統計解析

HD実験の結果に関して統計処理を実施した。値を平均値±標準偏差で表した。各採血ポイントでの群間比較としてTurkey's検定を実施し, 有意水準5%とした。但し死亡例が認められた場合, その採血ポイントでの群については統計解析を行わなかった。

3. 結果

3.1. topload 投与実験

NRC投与終了5分後のNRCクリットは平均9.7%であり, 24時間後には平均3.4%と半分以下に減少した。さらにメト化率の結果から, NRCの有効半減期はおよそ6時間程度と推定された。なお, 投与終了48時間後ではNRCクリット値が4分の1以下に減少し, 充分量のNRCを確保できず, メト化測定するに至らなかった(Fig. 1)。

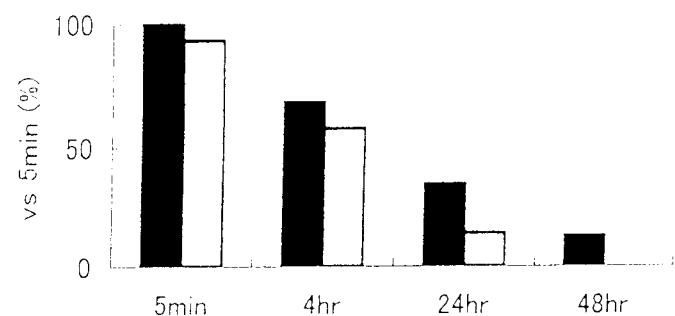


Fig. 1. Blood concentration of NRC on topload model. ■: total NRC-crit (% vs 5min), □: NRC-crit with function estimated by NRC-crit and methemoglobin ratio (% vs 5min of total NRC-crit).

3.2. HD実験

3.2.1. 赤血球の酸素飽和度

ヒトおよびラット洗浄赤血球のP₅₀はそれぞれ26.5, 31.8mmHgであり, ラット洗浄赤血球の酸素解離曲線の方が低親和性方向(右側)にシフトしていた(Fig. 2)。

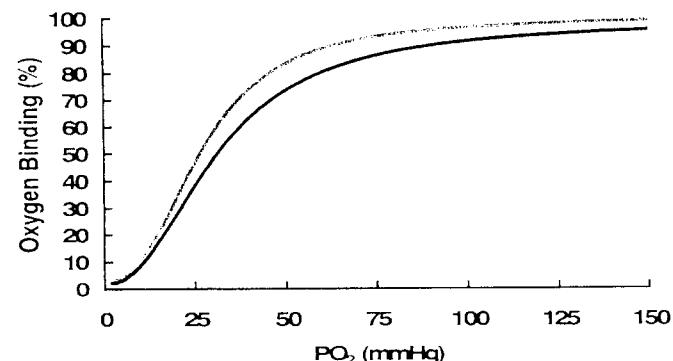


Fig. 2. Dissociation curve of HRBC (gray line) and RRBC (black line).

3.2.2. 生存数

未投与群および生理食塩水群では投与終了5分後から3時間

HbV分散液中のHbV粒子の占有体積は39.5%であるので、血清とHbV分散液を混合した系列は、生理食塩水やHb溶液を混合した場合に比較して実際の希釈度は小さい。そこでHbVを分離した血清中の各測定項目の濃度に関しては、HbVの占有体積を考慮して濃度補正を行った。例えば、血清3 mLとHbV分散液2 mLを混合した場合（混合比40%）、実際には $1.21 \text{ mL} = 2x(1 - 0.395)$ の生理食塩水を使って血清を希釈したことになる。デキストラン溶液を10 vol%添加した系についても、同様の補正を行った。精製Hb溶液を混合した系列ではこのような補正是行わなかった。

かった。

血清と生理食塩水の混合系列で得られた各混合比での測定値を基準値とし、Hb、HbV混合系列およびHbV分離系列で得られた値と基準値との較差（誤差）をパーセント表記した。米国FDAのClinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) の規定する測定誤差の許容範囲(CLIA limit)²⁰⁾を測定可否の判断基準とした⁷⁾。CLIA limitが規定されていない測定項目に関しては、測定値誤差の許容範囲を仮に20%とした。測定誤差がCLIA limitまたは20%を越えない上限のHb、HbV混合比を求めた。

Table 1 Summary of the influence of the presence of Hb or HbV on blood serum clinical chemistry and the effect of removal of HbV by ultracentrifugation or centrifugation in the presence of Dex to avoid the interference effect of HbV (Fig. 4). (+) and (-) indicate the direction of interference effect with a deviation exceeding the CLIA limits (ref. 20). We set the deviation limit of 20% for the analytes which do not have CLIA limits (indicated as ND). The degree of interference effect was expressed as the volume ratios (vol%) of the Hb solution or the HbV suspension mixed with the pooled serum at which the deviations do not exceed the CLIA limits or 20%. "50 vol%" indicates that the deviation does not exceed the limit up to the maximum mixing ratio of 50 vol% (Hb concentration = 5 g/dL), and "<10 vol%" indicates that the deviation exceeds the limit at the mixing ratio of 10 vol% (Hb concentration = 1 g/dL). The concentrations of the analytes of the pooled serum are expressed in Fig. 4.

Analyte	CLIA limit	Volume ratio of Hb or HbV of which the deviation does not exceed the CLIA limit or 20%			
		Hb-mixed	HbV-mixed	HbV-ultracentrifuged	HbV/Dex-centrifuged
1) Total protein	± 10%	(+), < 10 vol%	(+), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
2) Albumin	± 10%	(+), < 10 vol%	(+), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
3) Albumin/globulin ratio	ND, used ± 20%	(-), < 10 vol%	(-), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
4) AST ^a	± 20%	(+), < 10 vol%	(+), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
5) ALT ^b	± 20%	(+), < 30 vol%	(+), < 10 vol%	(+), < 20 vol% ^c	(+), < 40 vol% ^c
6) LDH ^d	± 20%	(+), < 10 vol%	(-), < 30 vol%	50 vol%	50 vol%
7) ALP ^e	± 30%	50 vol%	(-), < 30 vol%	50 vol%	50 vol%
8) γ-GTP ^f	ND, used ± 20%	(-), < 20 vol%	(-), < 30 vol%	50 vol%	50 vol%
9) Total bilirubin	± 0.4 mg/dL or ± 20% ^g	(-), < 40 vol% ^h	(-), < 10 vol% ^h	50 vol% ^h	50 vol% ^h
10) Direct bilirubin	ND ^h	(-), < 10 vol% ^h	(-), < 10 vol% ^h	50 vol% ^h	50 vol% ^h
11) Creatinine	± 0.3 mg/dL or ± 15%	(+), < 20 vol%	(-), < 20 vol%	(+), < 40 vol%	(-), < 40 vol%
12) Urea nitrogen	± 2 mg/dL or ± 9%	(+), < 40 vol%	(-), < 30 vol%	50 vol%	(-), < 30 vol% ⁱ
13) Uric acid	± 17%	(-), < 20 vol%	(-), < 20 vol%	50 vol%	50 vol%
14) Amylase	± 30%	(+), < 20 vol%	(+), < 50 vol%	50 vol%	50 vol%
15) Lipase	ND, used 20%	(-), < 50 vol%	(+), < 30 vol%	50 vol%	50 vol%
16) CPK ^j	± 30%	(+), < 20 vol%	(+), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
17) Total cholesterol	± 10%	50 vol%	(+), < 10 vol%	(+), < 50 vol%	50 vol%
18) Free cholesterol	ND, used ± 20%	(+), < 40 vol%	(+), < 10 vol%	(+), < 40 vol% ^k	(+), < 20 vol% ^k
19) β-Lipoprotein	ND, used ± 20%	(+), < 10 vol%	(+), < 10 vol%	(+), < 30 vol% ^k	(+), < 10 vol% ^k
20) HDL-cholesterol	± 30%	50 vol%	(+), < 50 vol%	50 vol%	50 vol%
21) Neutral fat (Triglyceride) ± 25%		50 vol%	50 vol%	(-) ^l	50 vol% ^l
22) Phospholipid	ND, used ± 20%	50 vol%	(+), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
23) Free fatty acid	ND, used ± 20%	(-), < 40 vol%	(+), < 40 vol%	50 vol%	50 vol%
24) Total lipid	ND, used ± 20%	50 vol%	(+), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
25) K ⁺	± 0.5 mmol/L (used ± 11%)	50 vol%	50 vol%	50 vol%	50 vol%
26) Ca ²⁺	± 1 mg/dL (used ± 10%)	(+), < 20 vol%	(+), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
27) Inorganic phosphate	ND, used ± 20%	(+), < 10 vol%	(+), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%
28) Mg ²⁺	± 25%	50 vol%	(-), < 30 vol%	50 vol%	50 vol%
29) Fe ²⁺	± 20%	(+), < 10 vol%	(-), < 20 vol%	50 vol%	50 vol%
30) Cu ²⁺	ND, used ± 20%	50 vol%	(-), < 10 vol%	50 vol%	50 vol%

a) aspartate aminotransferase.

b) alanine aminotransferase.

c) L-lactate dehydrogenase.

d) alkaline phosphatase.

e) γ-glutamyltransferase.

f) creatine phosphokinase.

g) Interferences are seen even after the removal of HbV, however, the deviations are significantly decreased in comparison with the samples before the HbV removal (see Fig. 4, No. 5, 18, and 19).

h) Due to the low concentrations of bilirubin in the pooled serum used (Total bilirubin 0.5 mg/dL, Direct bilirubin 0.2 mg/dL) which are close to the CLIA limit (0.4 mg/dL), the interference effect was judged if the analyte concentration is completely inhibited and the deviation shows -100%.

We determined that the ultracentrifugation and centrifugation allowed measurement.

i) A part of urea should bind to HbV/Dex precipitate.

j) Neutral fat should be phase separated on the top of the supernatant.

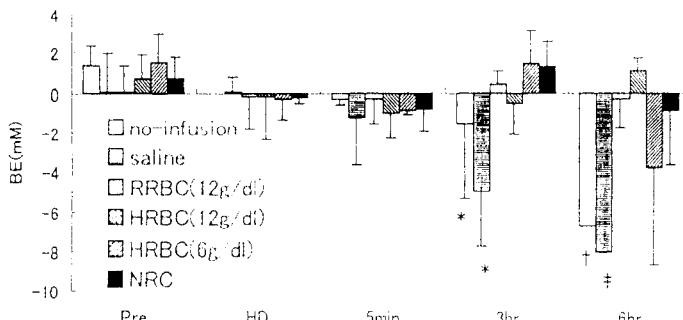


Fig. 4. Base excess of arterial blood. Data means average ($n=5$) \pm S.D. *: $n=4$, †: $n=2$, ‡: $n=1$.

3.2.6. ヘマトクリット値, NRCクリット値, NRCメト化率

HD時でのヘマトクリット値はいずれも9-12%の範囲内であった。このときの各個体の血液交換率は71.7-78.8%の範囲内であり、各群の平均値は約76%であった。

試料投与終了5分後のNRCクリット値は $10.4 \pm 0.4\%$ であった。投与終了6時間後には約 $7.4 \pm 0.5\%$ に減少した。さらにNRCメト化率の結果から、酸素運搬能を保持するNRCとしてのクリット値は約5.7%と算出され、投与終了5分後に比べて半減したことから、その有効半減期は6時間程度と推定された(Fig. 5)。

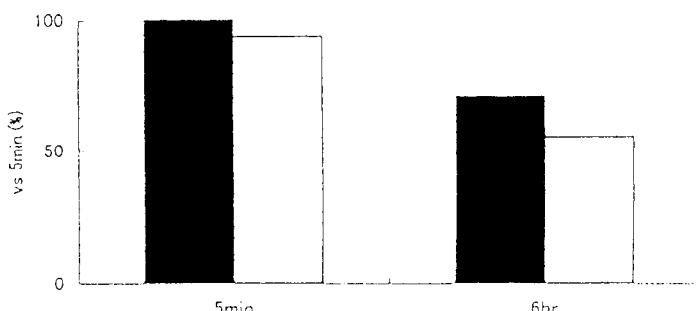


Fig. 5. Blood concentration of NRC on hemodilution model. ■: total NRC-crit (% vs 5min), □: NRC-crit with function estimated by NRC-crit and methemoglobin ratio (% vs 5min of total NRC-crit).

4. 考察

日本厚生省の血液製剤の使用指針によると¹⁰⁾、外科的適応(術中投与)の場合、循環血液量の20-50%出血時には、細胞外液系輸液薬(乳酸リソングル液、酢酸リソングル液など)および赤血球濃厚液を投与し、必要に応じて人工膠質液(HES、デキストランなど)を投与すると記されている。NRCは主にこの赤血球濃厚液に置き換わる人工酸素運搬体としての適応を想定しているため、まず循環血液量を確保した上での使用が望ましいと考えられる。また、American Association of Blood BanksのTechnical manualによると¹¹⁾、循環血液量が充分にコントロールされているような状態では、輸血開始の判断基準の一つにヘモグロビン濃度7g/dl以下(ヘマトクリット値約20%以下)と記されている。一方、いわゆる術前の10/30ルール(ヘモグロビン濃度10g/dL、ヘマトクリット値30%以上)に関しては慣習的なものであり根

拠がない。循環血液量が確保されていれば、ヘモグロビン濃度が10g/dl以下に低下しても酸素分圧のA-V較差が大きくなる結果、酸素運搬効率が高まり、組織への酸素供給を充分に行うことが可能になる。実際に酸素供給量が生体の VO_2 を満たすことができなくなるのは、理論上、クリティカル DO_2 と呼ばれるヘマトクリット値10%を下回ったときといわれている¹²⁾。そこで、NRCの投与によって VO_2 を満たし、酸素代謝改善効果がどの程度持続するのか検証するため、血液交換によりヘマトクリット値を10%程度にまで低下させた後、各サンプルを投与する評価モデルにて実験を実施した。

未投与群・生理食塩水群では一部死亡例が認められ、生存例においてもpH・重炭酸イオン濃度・B.E.値の低下、血中乳酸値の上昇が認められたことから、組織での乳酸蓄積による代謝性アシドーシスの状態であったと判断した。生理食塩水群では投与終了3時間後の乳酸値は全例で明らかな上昇が認められたが、未投与群では投与終了6時間後に初めて乳酸値が上昇した個体が一部存在した。死亡数も前者の方が多かったことから、サンプル投与による容量負荷・血液交換による影響は否定できないと考えられた。一方、NRCの血中動態については、hemodilution modelにおいても、topload modelでの投与実験の結果と概ね同様の傾向を示していたことから、血液交換による影響は小さいと考えられた。

RRBCの酸素解離曲線はHRBCのそれと比べて低親和性方向(右側)にシフトしており、酸素運搬能が異なるため、RRBCのみをNRCの薬剤対照として用いることには疑問が残る。このことから、HRBCも加えた上で比較検討することとした。但し、異種血液であるHRBCを投与することに関しては細網内皮系による貧血能・補体系への影響が否定できない。そこで、RRBC(12g/dl)群との比較を行ったところ、概ねHRBC(12g/dl)投与群と同様の結果が得られたこと、HRBC投与後に異種血液投与によるショック症状などは特に認められなかったことから、少なくとも単回投与で観察期間の短い本実験においては薬剤対照として妥当であると判断した。

HRBC(12g/dl)・RRBC(12g/dl)・NRC群ではサンプル投与による平均血圧の回復が認められ、実験終了時まで血液ガス値や血中乳酸値も基準値を大きく外れることはなかった。現在米国で開発中の非カプセル型人工酸素運搬体では、血中動態に関しては血中ヘモグロビンの濃度変化を指標として示されている¹³⁻¹⁴⁾。しかし、生体内ではヘモグロビンのメト化進行もあり、その実質的な機能の半減期である有効半減期は、ヘモグロビン濃度としてのそれよりも短くなると考えられる。同様のこととはNRCについても言え、投与終了6時間後のNRCの動態データから、ラットでの有効半減期は6時間程度と推定された。

HRBC(6g/dl)群では実験終了時まで酸素代謝改善効果が持続した個体と乳酸アシドーシスの状態になった個体とに分かれた。クリティカル DO_2 のポイントまで血液交換を行う厳しい条件のため、効果が持続した個体においても辛うじて VO_2 を満たすことができた状態で、このことがばらつきの原因と考えられた。一方、NRC投与群では概ねその効果が持続していた。両投与群のv-p O_2 の変動パターンは同様の傾向を示していたことから、酸

1. 緒言

血液生化学的検査の項目数は年々増大する傾向にあり、自動分析装置によって日常的に測定され、その簡便さから病態を知るための一次検査として欠かすことのできない診断法の一環であることは言うまでもない。ところが、欧米で進展している非細胞型の修飾ヘモグロビン (Hb) 溶液の臨床試験において、採血を遠心分離しても血清中に修飾Hbが混在するため(図1)、比色法や比濁法で得られた検査値が実際の値から著しく解離することが問題になっている^{1,2)}。修飾Hbは血漿蛋白質と分子量が同等であるため除去が困難で³⁾、影響を受ける測定項目について、自動分析装置の利用が不可能となり、測定法や機種の厳密な検討を行って独自の方法を臨床試験に備えて確立しておく必要がある。

我々はこれまでに細胞型のHb小胞体 (HbV) の投与試験からその十分な酸素運搬機能を実証してきた^{4,5)}。HbVの粒子表面はホリエチレングリコール (PEG) 鎮で修飾してあるため血中における分散安定度が高く⁶⁾、投与後の採血を通常の遠心分離をした後でもHbVは血清中に存在するため、自動分析装置を用いた血液生化学的検査において不可能となる項目があった。特にHbV粒子の場合は、内水相のHbに起因する特有の紫外・可視光領域の吸収に由来する影響に、更に粒子分散液に起因する光散乱の影響が加算され(図2)、比色法や比濁法による定量において著しい阻害作用を示すので、対応策の確立が急務となる。そこで本研究では、ヒト血清に各種混合比でHbまたはHbVを添加して血液生化学的検査を行い、HbVの阻害作用を明確すると共に、遠心分離操作によりHbVを除去する方法を検討した。

2. 方法

HbVの調製は従来法^{7,8)}に従って行った。脂質成分としては、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine、コレステロール、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerolが5/5/1のモル比で含まれる。更に外表面にはPEG脂質 (PEG DSPE) が0.3mol%導入されている。HbVは生理食塩水に分散

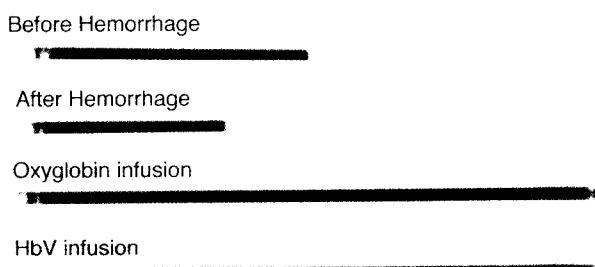


Figure 1 Pictures of glass capillaries for the hematocrit measurements during the resuscitation of hemorrhagic shocked hamsters. The centrifuged glass capillary containing blood after the infusion of Oxyglobin (glutaraldehyde-polymerized bovine Hb, Biopure Co.) showed a red colored supernatant due to the presence of Hb components. In the case of HbV infusion, HbV does not precipitate at the normal centrifugation condition (10,000g, 5 min), therefore, the supernatant is red and turbid.

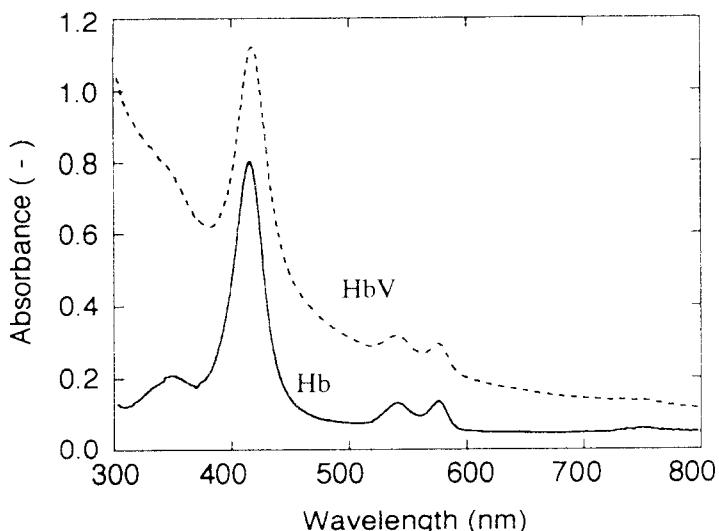


Figure 2 Absorption spectrum of Hb and HbV at $[Hb] = 0.01 \text{ g/dL}$ in a 10 mm cuvette measured using a UV-vis spectrophotometer. The significant turbidity is confirmed especially at shorter wavelength for an HbV suspension.

させ、Hb濃度を10 g/dLに調節した。その他の物性値：粒径 251 ± 80 nm, [metHb] < 5%, [HbCO] < 3%, [リン脂質] = 6.3 g/dL, 「コレステロール」 = 2.7 g/dL, $P_{50} = 31 \text{ Torr}$ 。また、比較試料として精製Hb溶液 (10 g/dL, 生理食塩水に溶解) を用いた。

ヒトフル血清に0, 10, 20, 30, 40, 50%の混合比で精製HbまたはHbV、生理食塩水を混合し検体とした(図3)。また、HbV混合試料については、超遠心分離 (50,000g, 20 min), または高分子量テキストラン (分子量20万、白血球分離用、和光純薬製) の20 wt%水溶液を10 vol%添加してから通常の遠心分離 (2,700g, 30 min) を行い、得られた上清液を回収して検体とした。血液生化学的検査30項目の測定を行った(BML社依頼, Hitachi 7450, JEOL JCA BM12 analyzer)。カリウムイオン濃度に関しては電極法によって測定されるが、その他の測定項目には紫外可視光領域の吸光度を測定する操作が含まれる¹⁹⁾。

Blood Serum is diluted (~ 50 vol%) with

- ① Saline
- ② HbV suspension ($[Hb] = 10 \text{ g/dL}$, in saline)
- ③ Hb solution ($[Hb] = 10 \text{ g/dL}$, in saline)

For ②, HbV particles are removed by

- ④ Ultracentrifugation (50,000g, 20 min)
- ⑤ Centrifugation (2,700g, 30 min)
in the presence of dextran (Mw = 200 kDa)

Clinical laboratory tests for the samples ① - ⑤.

The samples ② - ⑤ are compared with ① as a standard.

Figure 3 Experimental procedures for the study of clinical chemistry of blood serum containing HbV.

人工血液を用いた灌流液による肝常温灌流装置の開発

Development of ex vivo normothermic liver perfusion system using artificial blood.

桂巻 正, 縫 明大, 菊地 仁, 久木田和磨, 永山 稔,
日黒 誠, 木村 仁, 平田公一

Tadashi Katsuramaki, Akihiro Nui, Hitoshi Kikuchi, Kazuma Kukita, Minoru Nagayama,
Makoto Meguro, Hitoshi Kimura, Koichi Hirata.

和文抄録

生体血液を用いた肝常温灌流法は報告されているが、生体物質を用いない人工的産物による常温肝灌流法の開発は報告されていない。われわれは人工血液を用いた人工産物組成による灌流液を作成し、豚肝を体外で常温灌流させて機能を維持させることができあるか検討した。体重20kgの豚の肝臓を摘出し、門脈に流入用チューブ、肝下部下大静脈に流出用チューブを挿入し、灌流液を37°Cに保温しながら人工肺にて酸素化しつつ、300ml/minの流速で9時間灌流した。灌流液は人工産物による組成で、テルモ社より供給された人工血液 (Neo Red Cell) 600ml、肝細胞用培養液L15 40ml、蒸留水240ml、アルブミン27g、NaHCO₃ 2.2g、50%ブドウ糖2ml、NaOH 90mg、KCl 3.6ml、インスリン0.6ml、デキサメザン0.9mlを混和させて作成した。灌流中は門脈へ流入する灌流液の酸素分圧は400Torr以上を維持でき、酸素消費量は灌流4時間までは10ml-O₂/min以上を維持できたが、それ以降は漸減した。ATP産生とアミノ酸代謝も確認された。組織学的検討では灌流中の肝組織の構築は保たれており、PAS染色にてグリコーゲン顆粒が肝細胞に蓄積されていた。以上の結果から人工血液を用いた灌流液によって体外で肝臓の機能を維持させることが可能であった。

Abstract

Although there were normothermic extracorporeal liver perfusion circuits using physiological blood, true artificial perfusion systems have not been developed. We tried to make an ex vivo functioning liver with an artificial perfusate that consisted of artificial blood in the pig liver. A liver graft from a female pig weighing 20 kg was harvested in the usual manner. The perfusion solution used consisted of artificial blood, (Neo Red Cell, Terumo Co.) L-15 medium, distilled water, bovine serum albumin, NaHCO₃, NaOH, KCl, human regular insulin, 50% glucose solution, and dexamethasone. The isolated liver was perfused with this oxygenated perfusate through the portal vein at a rate of 300 ml/min for 9 hr. During perfusion, oxygen consumption of the liver was maintained at over 10 ml-O₂/min until 4 hr after perfusion, however gradually decreased after then. Production of ATP and amino acid metabolism was recognized. Histological examination showed almost normal hepatic architecture. Although liver cells at just after laparotomy showed the absence of glycogen deposits by PAS staining, numerous liver cells exhibited PAS-positive cytoplasmic glycogen deposits after 4 hr perfusion. These observations indicated that we succeeded in developing an ex vivo functioning liver with an artificial perfusate employing use of artificial blood.

Keywords

liver, normothermic perfusion, artificial blood, extracorporeal perfusion

はじめに

近年のバイオテクノロジーの発達により肝細胞培養が可能となり¹⁾、さらに再生医学の発達によって小型肝細胞などから成熟

した肝細胞を作り出すことも可能となっている²⁾。しかしながら、胚細胞から臓器を作り出すには、細胞が増殖してある程度の細胞塊を形成した時点で充分な酸素と栄養が細胞塊全体に行き渡

札幌医科大学医学部 外科学第一講座 〒060-8543 札幌市中央区南1条西16丁目 First Department of Surgery, Sapporo Medical University, School of Medicine, South 1, West 16, Chuo ku, Sapporo, 060-8543, Japan.

論文受付 6月17日 受理 6月28日

であり、充分に酸素が肝臓全体に行き渡っていない可能性がある。また、本実験では肝動脈から灌流液を流していないが、肝全体に酸素を供給するためには肝動脈からの灌流も必要であるかもしれない。さらに、灌流液自体の組成もまだ検討する余地がかなりあると考えられる。たとえばアルギニンが灌流後1時間で消失しているが、アルギニンは血管拡張作用を有する一酸化窒素(NO)の供給源となるアミノ酸なので、NO低下による微少循環不全の出現も考えられる。灌流途中でアルギニンのような物質を補充する必要があるかもしれない。その他に老廃物の蓄積による肝障害も考えられ、透析回路の設置も考慮する必要があるだろう。しかしながら、5時間までは本灌流装置で充分に機能させることができたと考えられるので、今後さらに上記のような問題点を改良できれば長時間の灌流維持が可能になると思われる。

人工血液を用いたほぼ完全な人工産物による灌流液によって、豚肝を機能させながら体外で常温灌流することが可能であった。再生能力旺盛な肝臓のような臓器では体外で肝臓を再生させることは可能と思われ、再生医学分野における応用が期待できる。われわれは臓器培養法の開発を最終目標としているが、これが可能になれば正常に機能する臓器を常に維持できることで緊急的な臓器移植にグラフト臓器を常に供給できること、心停止ドナーからのグラフト臓器など障害のあるグラフト臓器を移植前に回復させること、灌流された臓器のみに特定の遺伝子を導入させること、などが可能になると想定している。今後、このような研究を続けることで人工血液の新たな利用分野が期待できると思われる。

参考文献

- Mitaka T, Sattler CA, Sattler GL, Sargent LM, Pitot HC. Multiple cell cycles occur in rat hepatocytes cultured in the presence of nicotinamide and epidermal growth factor. *Hepatology* 1991;13:21-30.
- Mitaka T, Sato F, Mizuguchi T, Yokono T, Mochizuki Y. Reconstruction of hepatic organoid by rat small hepatocytes and hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology* 1999; 29:111-125.
- Rodriguez-Reynoso S, Portilla E, Garcia D, Larios F, Romero M, Muniz J, Vazquez G, Leal C. Blood flow rate and energy charge in the isolated perfused canine liver. *J Surg Res* 2001;99:40-46.
- Foley DP, Vittimberga FJ, Quarfordt SH, Donohue SE, Traylor AN, MacPhee J, McLaughlin T, Ricciardi R, Callery MP, Meyers WC. Biliary secretion of extracorporeal porcine livers with single and dual vessel perfusion. *Transplantation* 1999;68:362-368.
- Nakamura N, Kamiyama Y, Takai S, Kamiya T, Imamura A, Matsui Y, Wei T, Kaibori M, Satoi S, Saitoh T, Yoshida H, Yoshida K, Kwon AH. Ex vivo liver perfusion with arterial blood from a pig with ischemic liver failure. *Artificial Organs* 1999;23:153-160.
- Horslen SP, Hammel JM, Fristoe LW, Kangas JA, Collier DS, Sudan DL, Langnas AN, Dixon RS, Prentice ED, Shaw BW Jr, Fox IJ. Extracorporeal liver perfusion using human and pig livers for acute liver failure. *Transplantation* 2000;70: 1472-1478.
- Borie DC, Eyraud D, Boleslawski E, Lemoine A, Sebagh M, Cramer DV, Roussi J, Imbert-Bismut F, Germain G, Hannoun L. Functional metabolic characteristics of intact pig livers during prolonged extracorporeal perfusion: potential for a unique biological liver-assist device. *Transplantation* 2001;72:393-405.
- Dutkowski P, Odermatt B, Heinrich T, Schonfeld S, Watzka M, Winkelbach V, Krysiak M, Junginger T. Hypothermic oscillating liver perfusion stimulates ATP synthesis prior to transplantation. *Surg Res* 1998;80:365-372. 1998
- Schön MR, Kollmar O, Wolf S, Cshrem H, Matthes M, Akkoc N, Cshnoy NC, Neuhaus P. Liver transplantation after organ preservation with normothermic extracorporeal perfusion. *Ann Surg* 2001;233: 114-123.
- Mei DA, Gross GJ, Nithipatikom K. Simultaneous determination of adenosine, inosine, hypoxanthine, xanthine and uric acid in microdialysis samples using microbore column high-performance liquid chromatography with a diode array detector. *Anal Biochem* 1996;238:34-39.

nO_2 (mmol/L) = $\left[\{ \text{酸素飽和度 (pre-post)} \times (\text{ヘモグロビン濃度 (g/dL)} - \text{メトヘモグロビン濃度 (g/dL)}) \times 10 \} / 64450 \right] \times 4 \times 1000$,
NRCから供給された酸素量 (ml/dL) = $(nO_2 \times RT/P) \times (1/10)$.

結果

1. 灌流液中酸素分圧、飽和度

流入灌流液の酸素分圧は灌流中は400Torr以上を保っていた。流出灌流液の酸素分圧は灌流4時間までは60Torr以下であったが5時間をおとると70Torr以上となりその後徐々に上昇した。同様に酸素飽和度も流入灌流液は灌流中は100%近くであったが、流出灌流液の酸素飽和度は灌流4時間までは70%以下であったが5時間を超えると徐々に上昇し70%以上となった(図3)。

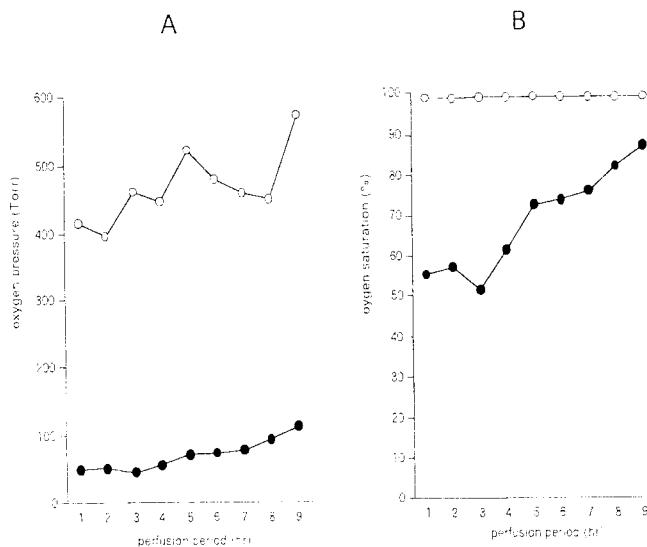


Fig. 3 Changes of oxygen pressure (A) and oxygen saturation of NRC (B). Open circles indicate perfusate of inflow, and closed circles indicate that of outflow.

2. 肝酸素消費量

肝酸素消費量は灌流4時間までは10ml-O₂/min以上を維持していたが、5時間目以降は漸減した(図4)。

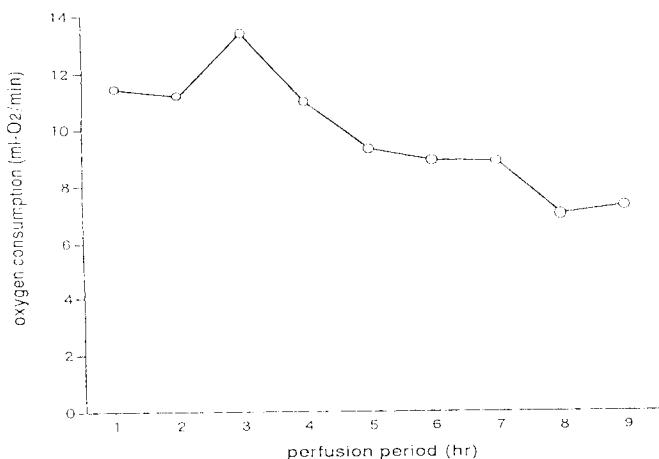


Fig. 4 Changes of oxygen consumption in perfusate. Oxygen consumption was mostly over 10 ml-O₂/min until 4hr after perfusion, and then gradually decreased.

3. 胆汁排出量

胆汁排出量は灌流開始後3時間までは2.5ml/h以上排出を認めたが4時間以後徐々に減少し、5時間以後は0.5ml/hであった(図5)。

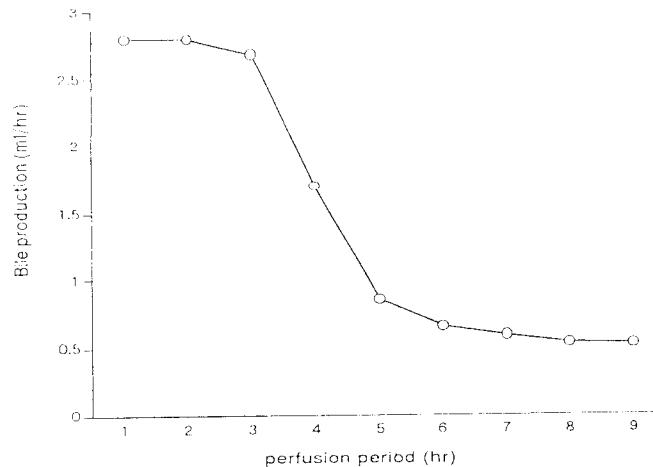


Fig. 5 Bile production. Bile was produced over 2 ml/hr until 3 hr after reperfusion. However, bile production were gradually decreased after 5 hr.

4. 灌流液中AST

灌流開始後5時間までは400IU/Lでほとんど変化がなかったが、灌流7時間目以降上昇し9時間目で1610IU/Lに達した(図6)。

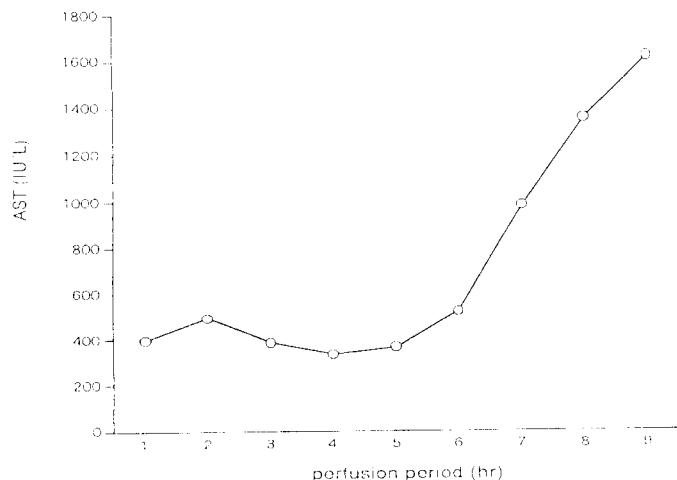


Fig. 6 Changes of AST in perfusate. AST was almost the same level until 6 hr after perfusion. However, AST was increased after 7 hr.

5. ATP測定

開腹時の肝組織のATPは1.60μmol/g-wet, energy chargeは2.23であったが、灌流5時間目ではATPは0.66μmol/g wet, energy chargeは1.81, 灌流10時間目ではATPは0.71μmol/g wet, energy chargeは1.03で灌流10時間目でも比較的エネルギー産生は保たれていた(表2)。