

目 次

人工血液

第10卷 第4号 2002年12月

総説	人工血液(HbV)安全性、有効性に関する治験計画	高折益彦	99
	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	107
	B型肝炎ウイルス表面抗原に対する 人工ヒト抗体の作製	井原征治	116
原著	自己組織化リピドヘム小胞体のナノ構造と酸素結合能	小松晃之	120
	海外文献紹介		
	獣医学領域における貧血性感染症	並河和彦	126
	事務局より		130

Contents

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 10 No. 4 December, 2002

<i>Review: Designs for Clinical Trial of Artificial Blood (HbV) For Evaluation of its Efficacy and Safety</i>	Masuhiko Takaori	99
<i>Microcirculation of Red Blood Cells in Relation to Their Rheological Properties</i> —Effective Operation of the Physiological Functions—	Nobuji Maeda	107
<i>Production of Recombinant Human Antibody against Hepatitis B Virus Surface Antigen</i>	Seiji Ihara	116
<i>Original Article:</i>		
<i>Nano-structure and Oxygen-binding Ability of Self-assembled Lipid-heme Vesicles</i>	Teruyuki Komatsu	120
<i>Topics: Infections Associated with Anemia in Veterinary Medicine</i>	Kazuhiko Namikawa	126

会 告

第10回日本血液代替物学会年次大会

第9回血液代替物国際会議

(合同開催)

(IX International Symposium on Blood Substitutes 9-ISBS)

会 期：平成15年3月3日(月)～5日(水)

会 場：京王プラザホテル

〒160-8333 東京都新宿区西新宿2-2-1

TEL: 03-3344-0111

URL: <http://www.keioplaza.co.jp/>

第9回血液代替物国際会議を第10回日本血液代替物学会年次大会と合同開催することとなりました。日本血液代替物学会の会員の皆様にはふるって御参加下さい。

詳しくはホームページを御覧ください。

学会 URL: <http://www2.convention.co.jp/9thisbs>

なお御問い合わせは下記事務局まで御連絡下さい。

学会事務局：

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL: 03-5363-3806

FAX: 03-5363-3499

E-mail: 9thisbs@convention.co.jp

第9回日本血液代替物学会年次大会の総括

第9回日本血液代替物学会年次大会会長
熊本大学医学部薬理学第二講座 西 勝英

はじめに

過去数十年にわたって、人工酸素運搬体の素材として赤血球の代替となり組織に十分な酸素を供給することが可能で、しかも生体にとって毒性のない物質を求めて、多くの研究が行なわれてきた。中でもヘモグロビンは本来赤血球中に存在する物質であり、人工酸素運搬体の開発にとって最も魅力的な物質であると考えられてきた。ヘモグロビンを利用した人工酸素運搬体には、高分子ヘモグロビン、重合ヘモグロビン、架橋ヘモグロビンが開発され、それぞれの物質について主に物理化学的な見地から、酸素飽和度および、生体での酸素運搬供給能力などが示されてきた。しかしながら、これまでに開発してきた人工酸素運搬体については、生理、薬理学的観点からの詳細な検討がかならずしも十分に行なわれてきたとはいがたい面があったことは否めない。特にバクスター社の分子内架橋型ヘモグロビンの臨床試験における失敗例は、少なからずヘモグロビンの酸素運搬隊としての開発に反省すべき点を提供すると同時に、今後深重な学際的研究の重要性を語りかけてくれたものとしての認識が必要であろう。特に人工酸素運搬体としての性質上、血液成分製剤とか他の薬剤の投与とは異なり、生体機能が著しく低下した状況下での大量投与が要求されるので、従来の薬物開発研究における一般薬理試験、急性毒性試験、効果判定試験とは異なる観点からの学際的な検討が必要であろう。今後新たな観点からの研究の進展が望まれる。

シンポジウム

この点を考慮に入れ今回第9回の年次大会を開催するにあたり、シンポジウム「人工赤血球開発の展望」を企画し、我が国独自の立場に立った新たな展開について毎年この問題に取り組んでこられた上田英俊教授〔早大・理工〕にオーガナイズしていただいた。上田教授より同研究グループが開発したヒトヘモグロビン・リン脂質二分子膜小胞体「人工酸素運搬体＝リボソーム封入型ヘモグロビン(HbV)」の開発研究状況について報告があった。本物質の生体内投与実験が進行中であり、現在までに血流維持と組織酸素化が確認されており、前臨床試験に続いて臨床試験が実施に向けて準備中である。池田氏（北海道赤十字血液センター）は、HbVの血小板機能に対する影響について検討を行った。その結果、血小板の諸機能、補体系についてもHbVとの相互作用は認められず、ヒト血液との適合性にすぐれていると結論した。末松氏ら（慶應大・医・医化学、外科；早大・理工）は、肝臓微小循環のショック・モデルを作成し、再還流時に自己血、生理食塩水、遊離ヘモグロビン、HbVを投与し、肝臓網内系機能の変化について検討した。今後このようなショック・モデルについての検討が必要であろう。続いて小林教授（慶應大・医・外科）は、同研究グループで実験動物を用いて行なってきたHbVとの交換輸血試験、出血モデル試験等の結果を概観し、今後の臨床応用として出血性ショック、体外循環補填液、臓器還流液としての十分に応用可能であると報告した。最後に佐久間教授ら（北大院・医、東北大院・医、神戸学院大・薬、麻布大・獣、熊本大・薬）は、独自に開発したSニトロソ・ポリエチレンリコール修飾ヘモグロビン(SNO-PEG-Hb)の実験動物での虚血モデルについての研究等について報告すると同時に、新規パーフルオロカーボン製剤の創製をめざしての研究に着手したとの報告があった。今後の研究の進展が期待されるところである。いずれの研究も現段階では臨床試験に供するための十分な試料が得られている訳ではないが、今後我が国独自の立場での研究と評価が望まれる所である。

血液代替物として血清中の物質を今後いかにして人工的に開発していくかという問題についてシンポジウム「血清蛋白質の新展開」を企画した。本シンポジウムでは「血清アルブミンと α 1-酸性糖蛋白質の新たな機能を求めて」

というタイトルで小田切教授（熊本大・薬）により、従来炎症指標としての機能しか評価されていなかった α 1-酸性糖蛋白質の物性、生理活性について概観し、今後の生体内物質有効利用の可能性について報告された。丸山氏ら（熊大・薬、熊大・医）は、小田切教授の講演を受けて、現在進行中の α 1-酸性糖蛋白質の体内動態と生物活性の研究について報告した。アルブミン等の問題については、武岡氏ら（北大・理工、慶大・医）より認識たんぱく質結合アルブミン重合体の血小板代替物質としての可能性についての報告があり、今後の研究の発展が期待された。最後に、オランダのクローニング大学からDr. Meijerにより細胞標的指向性を有するアルブミン修飾体の研究の現状と将来の展望について報告があった。今後細胞標的指向性アルブミン修飾体は標的細胞あるいは組織に薬物を搬送する手段としての有用性が期待される。

特に今回、大会では従来取り上げられていなかった人工抗体の研究・開発の現状と臨床応用について黒澤教授（藤田保健衛生大）にシンポジウム「治療薬としてのヒト抗体開発の現状」を企画していただいた。なお、この分野の研究は著しい発展をとげており、今後感染症、ガン治療に新たな戦略を提供するものと期待される所である。詳しい内容については、筆者の専門の分野を越える学問領域であり、紹介を割愛させていただく。

ワークショップ

今回大会を開催するにあたり、新たな血液代替物質の開発・研究には我が国の産学共同による学際的研究が望まれるため、「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」というタイトルのもとにワークショップを企画した。四つの関連企業の血液代替物質の開発・研究の現状について報告がなされた。それぞれの企業にあっては、公開できない部分もあったかもしれないが、詳細な研究報告がされた。西谷氏（富士レビオ）指向性を持つ輸送担体による薬物搬送システムとして特に癌細胞をターゲットとするナノ粒子構築の概念、機能性ペプチドを固定したナノ粒子の創製について多面的研究を展開しているとの報告があった。中島氏（化血研）は遺伝子組み替え由来ヒト血清アルブミンの性状についての詳しい分析結果について報告し、ヒト血清アルブミンとのあいだに各種測定値に差異は認められなかつたと結論した。石塚氏（テルモ）は、同社が開発したリポゾーム埋没型ヘモグロビン（NRC）を、急性大量出血モデル動物に投与した時の全身および臓器代謝に対する影響に関する検討結果について報告した。今後本物質の酸素運搬体として有用性についての基礎的研究の進展が期待される。甲斐氏ら（ニプロ、早大・理工、慶應大・医）は、新たな酸素運搬体として可能性を有している合成ヘム蛋白質（アルブミン-ヘム）の開発を行っており、その生体内での特性について詳しい報告を行った。現在安全性と効果の解明についての研究が進行中のことであり、その成果が期待される。このような我が国での血液代替物質開発の現状報告をふまえ、高折氏（東宝塚さとう病院）より今後の問題点等につき安全性、有効性の面からさらに検討する必要があろうとの報告があった。

おわりに

血液代替物質の研究に直接、間接的に関連する話題につき特別講演として、寺崎秀則教授（熊大・医）に同教授が長年にわたり開発研究に携わってきた「膜型人工肺による生命維持装置の開発と応用について」、前田一浩教授（熊大・医）に、「高分子治療剤開発の現状」について、さらに、前田信治教授（愛媛大・医）に人工酸素運搬体開発にあたって重要な要素となる「微少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」について、池田康夫教授（慶應大・医）には「人工血小板の開発の現状と将来展望について」の講演をお願いした。今後の血液代替物質研究の進展に参考になれば幸いである。

本大会を通じて血液代替物質に関する幅広い討論が行われ、長年に期待である血液代替物質の臨床応用への一步が大きく踏み出されることを期待し、大会に参加し協力を惜しまれなかった会員の皆さまに感謝するとともに本学会のますますの発展を祈念した。末尾ながら、本大会の開催にあたり多大な協力をいただいた日本血液代替物質学会事務局の諸氏に感謝の意を表したい。

人工血液(HbV)安全性, 有効性に関する治験計画

Designs for Clinical Trial of Artificial Blood (HbV) For Evaluation of its Efficacy and Safety

高折益彦

Masuhiko Takaori, M.D.

和文抄録

早稲田大学理工学部で作成されたヒト・ヘモグロビンをリボソームに内包した人工赤血球（HbV）については過去十数年にわたりその有効性と安全性とについて動物実験、すなわち前臨床試験がおこなわれている。その結果、なお未だ数点の検討課題を残すものの、現時点では臨床試験に導入されても許されるべき状態に達したと評価されている。しかし臨床試験を計画するに当たってはまず医学倫理的観点から満足したものでなければならない。そして十分な科学的立証性が得られるような計画でなければならぬ。本稿ではそのための3計画を立案し、それらについて考察した。すなわち（1）希釈式自己血輸血でのHbVの使用、（2）希な血液型患者での一般輸血への代替、（3）予想せざる手術時出血への使用、である。ただしHbVはその媒質が生理食塩水であり、膠質を含有しないため、上記の臨床治験の際にはなんらかの市販の代用血漿剤を補充する必要性がある。そして治験例に対する対照群には酸素運搬機能がほとんどない代用血漿剤を用い、これにHbV使用量と同量の生理食塩水の注入を加える。これらの計画のなかで希釈式自己血輸血での使用計画はもっとも実行可能なものと思われ、かつそれによりHbVの有効性に関しても適確な成績を得ることができるものと思われる。

Abstract

Recently developed artificial blood (HbV), liposome encapsulated hemoglobin suspended in the physiological saline, has been tested for its efficacy and safety in a number of animal experiments. HbV seemed considerably acceptable as artificial blood and to be faced on clinical trials in the near future. The clinical study, however, must be regulated by human ethics and its design should be composed adequately to obtain scientific evidence. Three plans for phase II study were designed, namely (1) autologous blood transfusion with normovolemic hemodilution with HbV, and substitution of homologous blood transfusion (2) for patients with uncommon blood type and (3) for intraoperative, unexpected massive hemorrhage. In these studies, commercially available plasma substitute should be used compensating absence of colloid osmotic pressure in HbV. As control for HbV, the plasma substitute alone will be used associated with infusion of the saline of same volume of HbV used. Among those plans, the autologous blood transfusion with normovolemic hemodilution with HbV is proposed to be most preferable and practical and further to be consistent to obtain significant results evaluating the efficacy of HbV.

Keywords

artificial blood, clinical trial, study schedule, evaluation of safety, evaluation of efficacy

はじめに

この10数年代用血液開発への関心がたかまり、種々の人工血液、とりわけ人工赤血球の開発が進められて來た。すなわち赤血球に代わり肺にて物理的に（酸素分圧差により）酸素と結合し、末梢組織で物理的に酸素を放出する人工物の開発、製造に

努力が払われてきた。このような人工赤血球は細胞型と非細胞型とに大別される。すなわち細胞型は生理的な赤血球のように細胞膜となる人工膜の内部に物理的に酸素を抱合、放出する物質を含有し、上記の目的を達するタイプのものである。また非細胞型の人工赤血球では生理的赤血球のヘモグロビン（以下、

Hb) のように物理的に酸素を抱合、放出する物質を人工血漿内に溶解させるか、あるいはエマルジョンとして浮遊させたものである。物理的に酸素を抱合、放出する物質にはすでに自然界に存在するもの、たとえば赤血球に含まれる Hb、あるいは全く化学的に合成したもの、たとえば過ヨウ素化炭化物(perfluorocarbon)、ヘム誘導体である。すでに30年前に旧ミドリ十字がFluosol DA[®]なる商品名にて perfluorodecalin と perfluorotripropylamineの配合体を発売し、限定された臨床治療に用いた。しかしその酸素運搬能は低く、代用血液として広く用いられるには至らなかった。とはいえた後の研究、開発の成果としてすでに幾つかの製品が前臨床試験を通過し、治験段階に向かっている(表1)。そしてこれらの人工赤血球、人工血液の中で臨床治験にまで進んだものは、diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb、HemAssist[®] Baxter社)、ならびにpefluoroburon (Perflubron、Oxygent[®]、Alliance社)がある。HemAssist[®]は臨床治験にまで進んだが、最終目的である治療効果で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¹⁾、開発は中断された。また後者、Oxygent[®]もPhase IIIまで進められたが²⁾、使用後に血小板の異常な凝集性をみとめ、脳出血を来たす症例があったためその後に開発が中断されている。

表(1) 最近のインターネット上に提示された各社製品とその開発進捗状況

Products	Manufacturer	compound	indication	Clinical trial
PHP	Apex Bioscience → Curacyte(Ger)	Pyridoxylated human Hb	NO-induced hypotension	PIII No more blood substitute
HemAssist	Baxter Healthcare	Diaspirin cross-linked Hb	Trauma	PIII Discontinuation → recombinant Hb
Hemopure	Biopure	Glutaraldehyde polymerised bovine Hb	Acute anemia (orthopedic surgery)	PIII / NDA Accepted for review by FDA approved in US (veterinary field)
PEG-hemoglobin	Enzon	PEG-conjugated Bovine Hb	Radiosensitization, stroke	PIIb
Hemopur	Sangart (Dr. Winslow)	PEG-conjugated Human Hb		PI complete (Sweden, May 2002)
Hemolink	Hemosol Ltd (Canada)	o-Raffinose cross-linked human polyHb	CABG surgery	PIII (UK & Canada)
PolyHeme	Northfield Lab (Canada)	Glutaraldehyde cross-linked pyridoxylated human polyHb	Trauma and surgery	PIII / Refused to file by NDA
Oxtris	Somatogen joined Baxter HC	Recombinant tetrameric human Hb		preclinical
Oxygent	Alliance Pharma Baxter HC (?)	80% perflubron emulsion	general surgery (with ANH) cardiac surgery	PIII/EP PIII/US (suspended?)
Perftoran	Perftoran	FDC/F-cyclohexylolipoprotein emulsion (10%)	burn trauma etc.	Approved Russia

a) HemAssist:
In the PIII trial, 46.2% of the patients using the product died, compared to the 17.4% death rate in the control.
b) Hemopure
c) PolyHeme
In the PIII trial, only 171 subjects were received PolyHeme without control group.

わが国においては人工赤血球はあくまで細胞型であるべきとの理論的論拠³⁾に基づき、今までliposome encapsulated hemoglobinに関する研究、開発を進めてきている⁴⁻⁶⁾。そしてなお確認しなければならない諸点を残すものの現在までの前臨床試験にてその安全性と有効性とはほとんど確認されて来ている⁷⁾。すでに日本血液代替物学会では臨床治験をおこなう際の指針、事務上の手続、informed consentなどを作成、前臨床試験での完成に待機している。このような状況をふまえて本稿では将来臨床治験へ移行する場合の具体的な計画案について検討することとした。

治験計画立案での基本要項

1. 適確な有効性と安全性の評価と倫理性への配慮

1) 確実なデータの取得

すべての治験について適応することはあるが、その治験薬

の有効性はplacebo、そしてその対象疾患に対する既存の治療薬との比較において検討されなければならない。すなわち前臨床試験にても検討されているように、人工血液を投与してその有効性を判定する際、酸素運搬能を持たない、品質液、膠質液(すなわち代用血漿剤)との比較において生体の酸素代謝、ならびに酸素代謝の維持を基盤としてその他の生体機能への影響において優れていることを証明しなければならない。そしてまた既存の治療法(治療薬)である輸血と比較して劣っていないことを提示しなければならない。ただし治験においては対象がヒト、患者であるため、前臨床試験におけるごとく生存率をもって比較することはできない。またそれに近い状態での検討も実際問題として不可能である(註-1)。また輸血(たとえそれが自己血であろうと、同種血であろうと)と比較して完全に同等の効果がある点まで追求することも不可能である。すなわち人工血液はあくまで、生理的な赤血球の酸素運搬機能の代替を果すことのみを目的としている。しかもその効果も全く同等の域までに達することは不可能であることを考慮すべきである。すなわちわれわれが治験を試みようとしている人工血液では確かに細胞型の人工赤血球ではあるが、その膜構造、その膜の内部構造においては生理的な赤血球とは全く異なるものである。そしてその形状も生理的な赤血球のbiconcaved discoidではなく球形である。さらにmechanical stressに対する変形能はなく剛体である。一方、生体の微小循環系の構造も生理的な赤血球に適合した構造となっていて、人工赤血球の機能を十分に発揮するような構造とはなっていない。またたとえこの人工赤血球が全く生理的な赤血球と同様の構造、性状を有していたとしても、その他の血液成分は人工血液には含まれていない。そのためそれらの欠如にともなう障害の発生は当然ながら懸念される。たとえば、大量使用にともなう血液凝固障害、出血傾向の発生の問題がある。したがって人工赤血球投与の効果は生理的な赤血球に較べ部分的であるとの基本姿勢に立たねばならない。そのため開発する人工赤血球、人工血液の治療効果も輸血のそれに比して部分的であることで妥協しなければならない。ただ今後の研究によらなければならないが、現在われわれが手にしている粒子の直径が0.2μmという人工赤血球の性格を利用して特殊な治療目的(たとえば 微小血管狭窄)に応用する可能性は否定できない。しかしそれはあくまで人工赤血球の特殊応用の領域であって、人工赤血球、人工血液開発の本来の目的ではない。

客観的なデータの取得は適切な治験計画によって得られる。すなわち(1) 対象症例の無作為的選択、(2) 人工血液使用前、使用後での必要データの取得、(3) 対照治療薬との比較、を行なうことによってその目的は達成されよう。ただ三重盲検法の適応は製品の性質上部分的に可能としかいえない。

(註-1) たとえ動物を対象とした前臨床試験でも血液酸素運搬体喪失(貧血)にともなう生体組織酸素欠乏という極限状態での研究にはデータを得る以前に対象動物の循環動態の悪化から測定値そのものの精度が低下したり、研究対象として適切なサンプルが得られなかったりする危険性がある。

2) 倫理性遵守

(1) 治験計画はあくまで治療を目的としたものでなければならない。しかも(2)それが既存のもっとも適切と評価されている処置法、治療法に比較して遜色ないという条件で行なわなければならない。そしてさらに(3)治験施行に対する対象者に対しての十分な説明とその本人の十分な理解と納得(informed consent)を得た上で施行されなければならない。そして当然のことながら治験計画はそれを施行する施設での倫理委員会での検討、承認を得た上でなければならない。

ここで述べる(1)については従来ならば輸血を行なうことがその患者の病状の改善、治療になるところであるが、人工血液を使用することでもその目的を達することができる条件でなければならない。すなわち貧血状態の患者の症状改善、救命が対象となる。しかし現在開発されつつある人工血液の性格上、すなわちその血液中滞留時間から慢性貧血の患者への使用は適応外となろう。そのため対象者は急性貧血、すなわち急性出血患者となろう。(2)の問題は従来の治療法、すなわち一般的な輸血に比較して遜色ないことをとりあげれば、前項1)確実なデータの取得性にて述べたごとく、人工血液と生理的な血液、すなわち輸血血液と比較すれば人工血液はいまだ完全なる生理的血液の代替物となっていない。したがって生理的血液との比較において遜色ないという条件を満たす範囲、すなわちその使用量において当然制限されなければならない。

上記1)、2)に共通する条件としてそれぞれの治験対象患者の治験実施にはその実施前にある一定の時間を得ることが必要となる。各施設の倫理委員会での検討はすでに治験計画採択の時点で終了している。しかし個々の症例に対する施行申請、許可には数時間も、治験対象患者へのinformed consentにも同様数時間が必要となろう。また治験を行なう医療グループの治験への体制整備にもほぼ同等の時間が必要となると思われる。したがって一般予定手術に限定されよう。ただこのような時間的制約が解決できる準緊急手術にも場合によっては適応されよう。

2. 人工血液使用適応症例の選択

表(2)

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-dibromosalicylyl)fumarate (DBBF).

^bOxygen transporting efficiency: the difference in oxygen saturation (%) between p_{50} of 40 and 100 mmHg.

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

Takeoka, S., Sakai, H., Kobayashi, K., Tsuchida, E.: Evaluation of the oxygen transporting capability of hemoglobin vehicles. In: Blood Substitutes Present and Future Perspectives ed. Tsuchida, E. Elsevier Science S.A. Amsterdam, Netherlands 1998 p.171-184

治験に使用する人工血液(治験薬)は表(2)にしめされる物理・化学的性状を有する。そして前臨床研究にて動物生体に投与した際にみとめられた種々の生理学的性格をふまえて治験使用の適応を選択しなければならない。

1) 人工血液HbVの物理・化学的性状

現時点ではわれわれが用いることができる人工血液の物理化学的性状についてはとくに臨床使用上問題となる点、すなわち人工血液の保管環境、使用時間、投与方法を制約する点はみとめられない。しかしその生理学的性格については以下の諸点について考慮する必要がある。

2) 人工血液 ヘモグロビン小胞体(HbV)の生理学的性状

(1) 膠質浸透圧の欠如

表(2)にしめされるごとく現時点では治験薬としての人工血液は人工赤血球(liposome encapsulated hemoglobin)を生理食塩水に浮遊させたものである。人工赤血球の媒質である生理食塩水は投与後速やかに血管外に移行して、投与された液体成分の容量を維持することができない。しかし本治験薬の治療目的は血液の代替えであって、酸素運搬効果とともに血液量を維持することも要求される。そのためにはなんらかの膠質物質、すなわち代用血漿剤の併用が必要となる。もちろん今後現在の人工赤血球を膠質液に浮遊させればこの問題は解決されよう。しかし現段階ではこの代用血液の投与と同時に膠質液を投与することが必要となる。

(2) 血液凝固機能、止血機構への影響

HbVはあくまで代用赤血球を主体としたものであり、その媒質には生理的に存在する血液凝固因子、ならびに血小板を含有しない。そのため大量使用、すなわち生体の循環血液量の2/3-3/4以上の量を置換する事態となれば生理的血液凝固機能、止血機構に破綻をきたすこととなる。したがって次項のHbVの血管内滞留時間の問題とともにHbV使用量に制限が加えられる。

(3) HbV内hemoglobin (Hb)のメトヘモグロビンへの変化率

前臨床研究では動物の血液中に投与されたHbVではHbV内のHbのメトヘモグロビンへの変化速度は24時間で全Hb量の80%に達していた⁸⁾。しかし最近の技術改良、すなわちHbV内へのカタラーゼ包埋⁹⁾によりこの問題はほぼ解決される。そしてHbVの血管内滞留時間内でのメトヘモグロビンへの変化量が全内蔵Hb量の10%以上とならないことによりこの問題は解消されよう。

(4) HbVの血管内滞留時間

現時点での人工赤血球の血液中半減時間は24時間と報告されている⁴⁾。一方急性出血後の生体の新生赤血球生産量は1-2 ml/kg·day^{10,11)}である。また実験的急性血液希釈での完全代償Hb値が5.5 g/dl¹²⁾であること、米国麻酔学会、米国血液銀行協会の貧血認容値6.0 g/dlを考慮すると平均的な体格の治験対象者で、術前のHbが10 g/dl以上であった場合、上記の血液中半減時間があれば1200 mlの出血に対応できるものと推定できる¹³⁾。

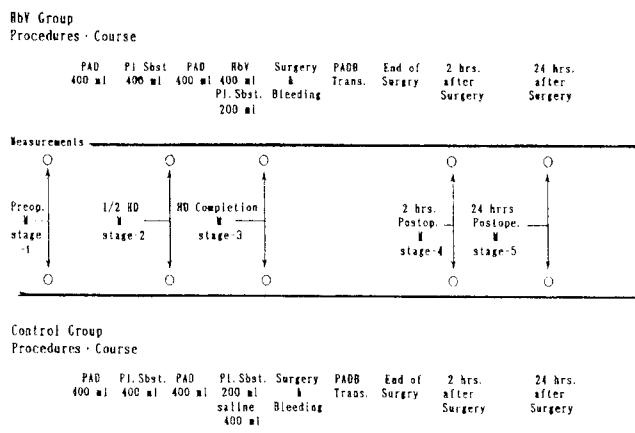
具体的な治験案

上記の治験計画の基本的条件に基づき選択される実施案として以下の諸案が考えられる。

1. 希釗式自己血輸血への応用

希釗式自己血輸血を施行する場合、原則として予定手術を対象とする。そのため治験対象患者との対話、そしてinformed consent 収得が可能である。そして人工血液投与前のデータの確保も可能である。さらに希釗式自己血輸血のために採取する血液量も一般的に800-1,000mlであって上記人工血液HbVの生理学的性状の条件を満足させる。

1) 部分的HbV血液交換治験（部分希自輸血）—図(1)



図(1) Autologous Blood Transfusion with HbV (1)

治験対象症例、治験対照症例ともにASA分類PS 1-2で、手術にともなう出血量が600-800mlと予想される症例とする。全身麻酔（一般にプロポフォール静脈麻酔併用したセボフルラン、またはイソフルラン吸入麻酔）を導入、呼吸は筋弛緩薬を任意に使用して調節呼吸にて管理する。その際の吸入気酸素濃度は40%を基準とする。そして動脈ライン、中心静脈ライン（カテーテル先端を三尖弁をわずかに越えた右心室に留置）を設置する。またもし可能ならばSwan-Ganzカテーテルを中心静脈ラインに代えて肺動脈基幹部にまで挿入する。また経尿道的に膀胱カテーテルを挿入、以下のべる測定時間の尿量の測定に供する。

循環、呼吸状態が安定した時点で心電図、動脈圧、右室圧（または肺動脈圧）を測定、動脈血、混合静脈をそれぞれのカテーテルから採取し、それぞれの血液ガスを測定する。また動脈血乳酸値、Hb値、ヘマトクリット(Hct)値を測定する（測定1）。なお動脈血酸素飽和度、呼気炭酸ガス濃度（分圧）は連続的にモニターする。2つの輸液路を確保し、それぞれから細胞外液補充液剤、維持輸液剤を2 ml/kg・hの速度にて注入する。

治験対象症例、治験対照症例ともに麻酔開始直後から上記輸液路の一方から10ml/kg量の細胞外液補充液剤を15-20分以内に投与し、その終了とともに自己血の採取を静脈穿刺により開始する。その採取は循環動態に著変を来たさないかぎり、可及的速やかにおこなう。これに平行して同時に代用血漿剤（ヒドロキシ澱粉製剤、たとえば6-HES[®]、Hespander[®]）を自己血の採取速度と同速度にて、採血量と同量、静脈内に投与する。自己

血採取量が400ml（あるいは8 ml/kg）に達し、代用血漿剤の投与も完了した時点で、上記（測定1）と同様の生理的諸因子の測定をおこなう（測定2）。この測定終了と同時に再度上記の自己血採取を開始する。この採血に対して治験対象群では前回投与した代用血漿剤を採血量の1/2量注入し、さらに採血量と同量のHbVを前回同様の注入速度にて投与する。対照群においてはHbVの投与に代え、第1回の血液希釗で使用した代用血漿剤と生理食塩水とを第2回目の血液希釗に使用する。すなわち代用血漿剤は採血量の1/2量、生理食塩水は採血量の等量とする。そして再度の採血量が400ml（あるいは8 ml/kg）に達したときにHbV、代用血漿剤、生理食塩水等の注入を停止し、HbVeritの測定を加えて前回同様の生理的測定を行なう（測定3）。手術を開始して出血があった場合にはその出血に対して採血した自己血を投与し、手術終了時に総出血量を確認する。出血量が400ml（あるいは8 ml/kg）に達しない場合には治験症例群、ならびに対照群から除外する。ただし確保した自己血は手術後2-3時間に利尿剤を併用して対象症例に輸血する。手術中の出血量が400ml（あるいは8 ml/kg）以上かつ、800ml（あるいは16ml/kg）未満の場合には採血しておいた自己血すべてを1時間以内に投与し、治験症例群とする。手術中に出血量が800ml（あるいは16ml/kg）以上となった場合には必要に応じて同種血を輸血する。しかしこの場合は治験症例群、ならびに対照群から除外する。ただし同種血輸血をおこなわなかった場合には治験症例群、ならびに治験対照群として採用する。これらの群においては手術後2時間、ならびに24時間後に（測定3）と同様の生理学的諸因子の測定をおこない、これらをそれぞれ（測定4）、（測定5）とする。なお測定項目は表(3)に示すもの、ならびにそれら測定値から算出したものである。治験症例群、対照群の選択の順番は今回の治験計画を開始する直前に治験統括者が無作為的に決定し、研究適合症例の手術予定の報告があった場合に、研究施行者にその症例の治験症例群、対照群の別を告げる。

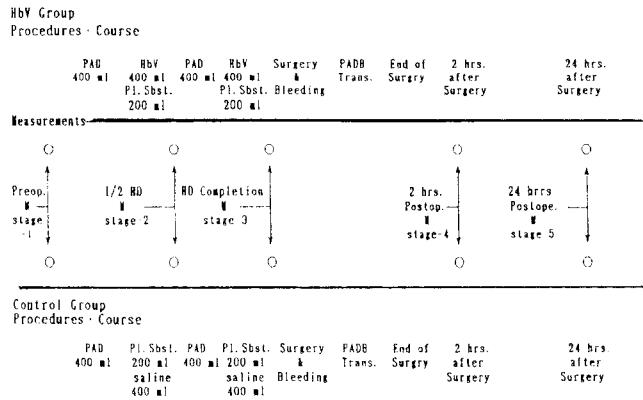
表(3) Physiological parameters scheduled to be measured in clinical studies

systemic arterial blood pressure	arterial blood oxygen partial pressure
pulmonary artery blood pressure *	arterial blood carbon dioxide partial pressure
right ventricular end diastolic pressure	arterial blood pH
heart rate	arterial blood base excess
cardiac output *	arterial blood lactate level
electrocardiogram	arterial blood hemoglobin level
urine volume	arterial blood hematocrit and Hb-Vcrit
routine chemical analysis of urine	mixed venous oxygen partial pressure
	mixed venous oxygen saturation and content
	arterial & venous oxygen content difference
	oxygen consumption *

* if Swan-Ganz catheter could be allowed to use

2) 完全HbV血液交換治験（全希自輸血）—図(2)

希釗式自己血輸血の操作以外、対象治験症例の選択、麻酔、生理的測定諸項目の測定、ならびにその測定時期など1)の（部分希自輸血）での研究方法と同様に行なう。ただし希釗式自己血輸血での置換液は第1回目の自己血採取に際し1)の（部分



Abbreviation: PAD: preoperative autologous blood donation, HD: hemodilution, M: measurement, Pl.Sbst.: plasma substitute, PADB: PAD bland, Preop.: preoperative, Postop.: postoperative

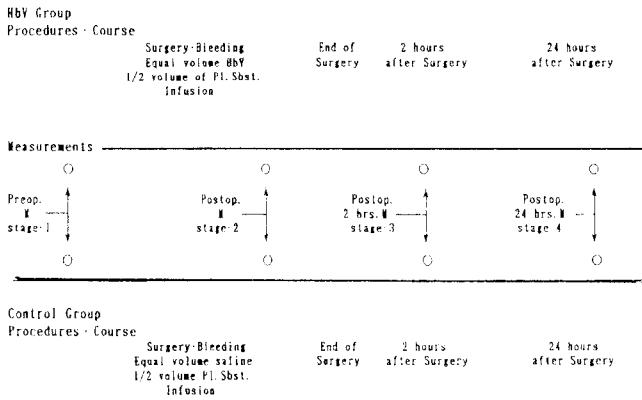
図(2) Autologous Blood Transfusion with HbV (2)

希自輸血)と異なり、採血量と等量のHbVとその1/2量の代用血漿剤を注入する。そして第2回目の自己血採血でも採血量と等量のHbVと採血量の1/2量の代用血漿剤とを注入する。自己血の採血速度、置換液の注入速度は1)の(部分希自輸血)の場合と同様とする。また対照群での置換液には採血量の1/2量の代用血漿剤と採血量と等量の生理食塩水とを使用する。

出血量が400ml(あるいは8ml/kg)に達しない場合には1)(部分希自輸血)の場合と同様に治験症例群、ならびに対照群から除外する。ただし確保した自己血は手術後2~3時間で利尿剤を併用して対象症例に輸血する。手術中の出血量が400ml(あるいは8ml/kg)以上であって出血量が800ml(あるいは16ml/kg)未満の場合には採血しておいた自己血すべてを1時間以内に投与し、治験症例群とする。手術中に出血量が800ml(あるいは16ml/kg)以上となった場合には必要に応じて同種血を輸血する。しかしこの場合は治験症例群、ならびに対照群から除外する。ただし同種血輸血をおこなわなかった場合には治験症例群、ならびに治験対照群として採用する。治験症例群、対照群の選択の順位は今回の治験計画を開始する直前に治験統括者が無作為的に決定し、治験研究適合症例の手術予定の報告があったに場合に、施行者に治験群、対照群の別を告げる。また手術後に血圧など循環動態に変化がみられ治療が必要と認められた場合、手術後2時間以内では可及的血液交換で使用した代用血漿剤で対処し、それ以後の場合には同種輸血を含む、いかなる治療にも制限を付けないものとする。

2. 希な血液型患者(不規則抗体陽性患者を含む)の輸血代替え(希血患輸血)-図(3)

このような患者で適合輸血血液の入手が困難とみとめられた場合に輸血用血液に代えてHbVを使用する。すなわちこのような該当患者が出現した場合、このような理由に基づくことの informed consentを経て治験を行なう。対象患者は希な血液型患者で適合輸血血液の入手が困難であり、かつ手術にともなう出血量が600~800mlと予想されるASA分類PS 1~2の患者とす



Abbreviation: M: measurement, Pl.Sbst.: plasma substitute, Preop.: preoperative, Postop.: postoperative

図(3) Substitution of Blood Transfusion for Patients with Uncommon Blood Type Infusion against Intraoperatively Unexpected Hemorrhage

る。全身麻酔(一般にプロポフオール静脈麻酔併用したセボフルラン、またはイソフルラン吸入麻酔)を導入、呼吸管理は筋弛緩薬を任意に使用して調節呼吸にておこなう。なお吸入気酸素濃度は40%を基準とする。そして動脈ライン、中心静脈ライン(カテーテル先端を三尖弁をわずかに越えた右心室に留置)を設置する。ただSwan-Ganzカテーテルの挿入は症例に応じて、その必要性が認められるものに限定する。また経尿道的に膀胱カテーテルを挿入、以下のべる測定期間の尿量の測定に供する。循環、呼吸状態が安定した時点にて心電図、動脈圧、右室圧(または肺動脈圧)を測定、動脈血、混合静脈の血液ガスをそれぞれ測定する。また動脈血乳酸値、Hb値、Hct値を測定する(測定1)。なお動脈血酸素飽和度、呼気炭酸ガス濃度(分压)は連続的にモニターする。2つの輸液路を確保し、それぞれから細胞外液補充輸液剤、維持輸液剤を2ml/kg/hの速度にて注入する。手術開始とともに出血が発生した場合、出血量に相当した量のHbVとその1/2量の代用血漿剤とを出血速度と同速度で注入する。手術が終了して、出血がなくなった時点でHbVcritの測定を加えて(測定1)と同様の諸因子の測定をおこなう(測定2)。(測定2)と同様の諸因子の測定は手術後2時間(測定3)、24時間(測定4)に施行する。対照群としては800ml(16ml/kg)の出血までは出血量と等量の生理食塩水とその1/2量の代用血漿剤にて対処したものとする。出血量が400ml(8ml/kg)以上で、800ml(16ml/kg)未満の場合はそれぞれ治験症例群、治験対照群とする。出血量が400ml(8ml/kg)以下に止まった場合は治験症例群、対照群から除外する。手術中に出血量が800ml(あるいは16ml/kg)以上となった場合には必要に応じて同種血を輸血する。しかしこの場合は治験症例群、ならびに対照群から除外する。ただし同種血輸血をおこなわなかった場合には治験症例群、ならびに治験対照群として採用する。治験症例群、対照群の選択の順位は今回の治験計画を開始する直前に治験統括者が無作為的に決定し、研究適合症例の手術予定の報告があった場合に、上記研究施行者にHbVの使用、代用血漿剤のみの使用の別を治験実施者に告げる。また手術終了後において循環動態の変動を生じ、治療を必要とする場合は1)(部分希自

輸血)の場合と同様に処理する。

3. 術中予測せざる急性出血での治験(予想外出血)-図(3)

一般的に400-600mlの出血が予想されるASA分類PS 1-2の症例に対して治験を計画する。このような症例では低い確率での輸血用血液準備の不合理性と非社会性に合わせて、同種血輸血にともなうリスク、HbVの安全性、有効性、ならびに血液希釈の安全性の限界を説明し、あらかじめHbV使用、あるいは対照として代用血漿剤を使用することのinformed consentを取得しておく。そして実際に予想を超える出血が発生した場合に治験へと移行する。このような症例においては少なくとも中心静脈圧をモニターすることは普遍化している。ただSwan-Ganzカテーテルの挿入は症例に応じ、患者への説明を必要としよう。麻酔方法、患者監視システムは上記1.、2.での治験の場合と同様とする。また手術開始前の生理学的諸因子の測定もすべて1.、2.と同様におこなう。そして手術により出血量が400mlを超えるまでは品質液、そして出血量の1/2量の代用血漿剤にて循環血漿量を維持し、出血量が400mlを超え、さらに600-800mlの出血が予想される場合にはHbVをそれまでの出血量を加えて注入する。なお出血量が800mlを超えるまでは出血量と同量のHbVとその1/2量の代用血漿剤を注入する。対照群として800mlまでの出血に対して出血量の1/2量の代用血漿剤と出血量の等量の生理食塩水を投与する。その後の測定は出血がなくなった手術終了時に(測定1)にHbVerit加えた測定を(測定2)、手術後2時間(測定3)、手術後24時間目に(測定4)おこなう。出血量が400ml(8ml/kg)以上で、800ml(16ml/kg)以下の場合は治験症例群とする。なお出血量が400ml(8ml/kg)以下に止まった場合には治験症例群から除外する。手術中に出血量が800ml(あるいは16ml/kg)以上となった場合には必要に応じて同種血を輸血する。しかしこの場合は治験症例群、ならびに対照群から除外する。ただし同種血輸血をおこなわなかった場合には治験症例群、ならびに治験対照群として採用する。治験症例群、対照群の選択の順位は今回の治験計画を開始する直前に治験統括者が無作為的に決定し、治験研究適合症例の手術予定の報告があつた場合に、研究実施者に治験症例群、対照群の別を告げる。また手術終了後において循環動態の変動を生じ、治療を必要とする場合は1)(部分希自輸血)の場合と同様に処理する。

以上のいずれの治験計画案でも治験対象群、対照群とともにそれぞれ1群につき10例で構成することを目的とする。しかし諸般の事情により目的症例数が獲得できなかつた場合には最低7例以上をもってそれぞれの群を構成する。

考察

上記すべての治験計画ではHbVの使用とともに、常にその使用量の半量の代用血漿剤を併用することとしている。すなわち製品化されるHbVは生理食塩水にHbを含有したliposome粒子を浮遊させたものである。そのためこのようなHbVで出血で失われる循環血液を順次補えば、次第に循環血液の膠質浸透圧が低下し、そのため循環血液量の減少をもたらす。出血をともなわない生体へ20-60ml/kg量の品質液の投与では、その投与量の10-

20%のみが血管内にとどまり¹⁴⁾、出血量に相当する循環血液量の欠損は補われない。また出血に対してその補いとして品質液を投与した場合、出血にともなう血漿蛋白の喪失、注入する品質液による希釈のためさらに血漿量維持効果は低下して血漿量、血液量の減少をもたらす¹⁵⁾。そのため膠質液である代用血漿剤の補充を必要とする。一般に出血に対して等量の代用血漿剤を投与した場合、その投与直後に投与量の1.2-1.3倍の増加をみとめるが^{16,17)}、その後の動態は各代用血漿剤の性状に応じて異なる。一方Hiippalaら¹⁸⁾は通常使用されている代用血漿剤の膠質濃度を1/2に希釈して出血に対して使用しても、十分生体の循環血液量を維持しうることを認めており、そこで今回の治験計画では自己血採血量、あるいは出血量の1/2量の代用血漿剤と、自己血採血量、あるいは出血量と等量のHbV、あるいは生理食塩水とを併用して循環血液量を維持することとした。すなわちこの治験計画ではHbVは容量維持の面からは生理食塩水と同等に取り扱った。投与水分量の面からは部分希自輸血でも全希自輸血で8ml/kgの水分負荷となる。この水分負荷に対しては第1回自己血採血後の輸液、2ルートそれぞれ2ml/kg・hを1ml/kg・hに減量することも考慮できる。しかしながら8ml/kg水分負荷が生体に大きな影響をあたえるとは考え難く¹⁹⁾、生体の水分調節機能に依存して、そのまま放置しても問題ないものと考えた。そのため対照群でも自己血採取量あるいは出血量と等量の生理食塩水とその1/2量の代用血漿剤を投与し、治験群に対する正確な対照群とした。

治験における有効性と安全性の適確な評価を得ることと倫理性を重視する点を考慮すれば適応は予定手術のみに限定される。すなわち上記治験計画案のすべてでこの点に絞られている。しかしこの内、2. 希血患輸血への適応は倫理面での正当性、また実地医療面での有効性は評価されるが適応患者の数が少ない。たとえ特定の施設において適当数の症例が得られても、治験がおこなわれる他施設では期待できず、全体での総合判断が求められる場合には好ましいとは言い難い。

部分希自輸血、全希自輸血での治験施行は予定手術に適応させることができ、かつ上記計画案での出血量の症例を対象とすれば、HbVのもつ物理化学的性格と生体の生理学的適応機能とからもっとも治験施行に適した選択といえる。ただ希釈式自己血輸血の経験のない施設においてはある程度の抵抗は予想される。しかし計画通りに治験を進めうる点においてはもっとも適合した治験計画といえる。さらにHbVの人工血液としての評価をより明確にする、すなわち酸素運搬能を有しない代用血漿剤との比較を際立てたいと望む場合には全希自輸血での治験実施が選択されよう。

これに反し部分希自輸血ではHbV使用量が少なく、末梢組織への酸素供給に関する諸因子で対照群との間に差を得ることが困難であろうと予想される。しかしそれでTakaoriら²⁰⁾はこの部分希自輸血に準じた実験モデルを用いて対照群との間で酸素運搬能の差を認めている。またSpahnら²¹⁾はperfluorocarbonであるperflubronでの治験をこの部分希自輸血モデルでおこなっている。しかしSpahnらの成績では同種血輸血をおこなうとする時期を目標(end point)としていて、わずかながら対照群との間に差を

みとめたに過ぎなかった。Takaoriら²⁰⁾の研究はビーグル犬を用いた動物実験では、きわめて調整された条件であったため対照群との間に差を見いだすことができたと解釈される。しかし臨床試験においてはきわめて調整された条件を各症例に得ることは困難である。たとえば循環血液量は各症例において異なる。したがって各症例での血液希釈の程度も異なる。さらに対象者は異なる疾患を有する患者である。このことから対照群との差を得ることが困難となることが予想される。この点を考慮すれば部分希自輸血での治験は全希自輸血での治験に劣るものと思われる²¹⁾。なお体外循環を使用した心臓手術などでも希釈式自己血輸血が施行される。しかし体外循環にともなう生体への侵襲度を考慮すれば治験計画案として採用することがより困難であろう。

対象症例を多く得る点においては予想外出血群での治験施行が選択されるかも知れない。しかし治験から外される多くの症例に対して完全な informed consent を取得しておかねばならない。また一般術前検査データの数よりも多い検査が行なわれる点において倫理上の問題点が生じる可能性もある。また治験施行者が徒労を強いられることにも問題がある。そしてさらに各症例での出血量が異なることから部分希自輸血、全希自輸血治験のような細々とした血液希釈が得られないために成績が分散することの問題点もある。種々の条件を考慮して 1, 2) の（全希自輸血）が治験実施基本要項にもっとも順応した実施案と思われる。

治験をおこなう各施設にはそれぞれの施設の特性が存在する。したがってこれらの案のいずれでも採用することができるようにしておくことも一策であろう。いずれの治験案でも血液希釈がおこなわれ、これに対して HbV が赤血球の代替として投与され、これに対しての対照として酸素運搬能のない代用血漿剤が用いられることでは共通している。そこで各施設にて得られたデータについて血液希釈前後の酸素運搬機能、循環動態の比較に主眼をおいて HbV の有効性、安全性を評価することは可能である。

むすび

本稿においては前臨床試験にて HbV の安全性、有効性が納得できる程度に確認されたとの仮定にもとづき、また臨床使用を満足させる量の HbV が十分に供給されることの前提に立って施行可能な治験計画案を提案した。一日も早くこのような治験が現実に施行されることを願うものである。

この研究は高度先端医療研究事業(医薬安全総合研究事業)：人工血液開発研究分野—臨床応用可能な人工赤血球の創製に関する研究(HI12-医薬-009)での厚生労働省の研究補助金をうけて行なわれた。

Reference

- 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.
- Spahn DR, van Brempt R, Theilmeyer 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.
- 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.
- Takeoka S, Sakai H, Kobayashi K, Tsuchida E. Evaluation of the oxygen transporting capability of hemoglobin vesicles. *Blood Substitutes-Present and Future Perspectives* ed. Tsuchida E. Elsevier Science S.A. Amsterdam, Netherlands 1998 p:171-184
- 池田久實. ヘモグロビン小胞体と血液成分の相互作用. *人工血液* 2002; 10: 82.
- 小林紘一. 人工酸素運搬体の投与試験による機能と安全性の評価. *人工血液* 2002; 10: 83.
- 高折益彦. 人工血液としての条件 liposome-encapsulated hemoglobin の有効性、安全性への検討. *人工血液* 2002; 10: 28-35.
- 小林紘一. ヘモグロビン小胞体の投与試験による酸素運搬能機能と安全度の評価. 厚生科学研究(高度先端医療開発事業)班会議発表 慶應大学リサーチパーク 平成14年4月25日
- 寺村裕治, 阿闍友保, 武岡真司, 上田英俊. 活性酸素に対するヘモグロビン小胞体の安定性. *人工血液* 2002; 10: 88.
- Takaori M, Safar P, Galla SJ. Changes in body fluid compartments during hemodilution with HES and dextran 40. *Arch. Surg.* 1970; 100: 263-268.
- 中山雅人, 小川重男, 高折益彦. 拡大血液希釈性自己輸血に関する研究. *日本輸血学会雑誌* 1984; 30: 168-174.
- Takaori M, Safar P. Critical point in progressive hemodilution with hydroxyethyl starch. *Kawasaki med. J.* 1976; 2: 212-222.
- 高折益彦. 希釈式自己血輸血 高折益彦著編 *自己血輸血マニュアル 改訂第2版* 克誠出版社 東京 1966; 79-121
- 望月興弘, 古妻嘉一, 高折益彦. 細胞外液補給における低分子デキストラン, 乳酸加リンゲル液の意義. *新薬と臨床* 1970; 19 : 115-120.
- Takaori M, Safar P. Acute, severe hemodilution with lactated Ringer's solution. *Arch. Surg.* 1967; 94: 67-73.
- Takaori M, Safar P, Galla SJ. Changes in body fluid compartments during hemodilution with HES and dextran 40. *Arch. Surg.* 1970; 100: 263-268.
- 川崎洋子, 木井照久, 高折益彦. 代用血漿剤 Modified Fluid Gelatin に関する実験的研究(2). *麻酔* 1969; 18: 932-941.
- Hiippala S, Linko K, Myllylae G, Lalla M, Hekali R, Maekelaeinen, A. Replacement of major surgical blood loss by hypo-oncotic or conventional plasma substitutes. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 1995; 39: 228-235.
- 高折益彦, 木井照久, 川崎洋子, 小田武雄. 電解質液大量注

入に関する限界. 呼吸と循環 1971; 19: 515-525.

20. Takaori M, Fukui A. Treatment of massive hemorrhage with liposome encapsulated human hemoglobin (NRC) and hydroxyethyl starch (HES) in beagles Artif. Cells Blood Substs. Immobilizat. Biotechnol. 1996; 24: 643-654.

21. 高折益彦. 赤血球代替物としてのPerflubron治験論文への論評 : Comments on clinical study on perflubronand for clinical trials on new red cell substitute in the future. 人工血液 2000; 8 : 26-29.

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

Microcirculation of Red Blood Cells in Relation to Their Rheological Properties — Effective Operation of the Physiological Functions —

前田信治
Nobuji Maeda

和文抄録

物質輸送を目的とする血液の生理機能を理解する上で、赤血球のレオロジー的性質と微小循環における赤血球の流動挙動は極めて重要である。とりわけ、赤血球の流動特性は組織への酸素供給に密接に関連している。血液循環の最も基本的なボアズイユの法則に示される血液の粘度を理解する上で、血液の非ニュートン流体としての基本的な知識に加えて、微小循環領域における赤血球の特徴的かつダイナミックな流れにもとづいた解釈が重要である。本総説では、(1)赤血球の微小循環の関わる基本的な特徴、特に各血管領域におけるヘマトクリットのダイナミックな変化ならびに血管内での赤血球流動分布と血漿層の形成、(2)赤血球のレオロジー特性、特に非ニュートン流体の基盤となっている赤血球の変形と集合現象(定義と意義、測定の基本的原理、支配要因と障害)、ならびに微小血管網における赤血球の流動挙動とこれらのレオロジー的性質との密接な関連性、(3)微小循環における赤血球から組織への酸素放出のダイナミックスと赤血球に備わった効果的な酸素放出機構を基本として、血液中の赤血球量の変動、流れの中での赤血球の変形障害、および赤血球の集合流が赤血球からの酸素放出に与える影響のメカニズム、について解説した。最後に、赤血球のレオロジー・微小循環・酸素輸送の総合的観点から、赤血球代替物としてるべき姿について言及した。

Abstract

Rheological properties of erythrocytes and their flow behavior in microcirculatory system are very important for understanding the physiological function of blood, i.e., transport of various substances. In particular, the flow behavior of erythrocytes is closely related to oxygen transfer to tissues. Blood viscosity expressed in Poiseuille's law, the most essential law in blood circulation, should be dynamically understood on the basis of characteristic flow of erythrocytes in the microcirculatory system, in addition to the fundamental properties of blood as a non-Newtonian fluid. This review describes about (1) essential characteristics in the microcirculation of erythrocytes, especially dynamic changes of hematocrit in microvascular system and formation of cell-free plasma layer along the vessel wall related to the cell distribution in microvessels. (2) rheological characteristics of erythrocytes, especially the cell deformation and aggregation (definition, pathophysiological meanings, principle of the measurements, factors affecting the rheological properties and so on) which provide non-Newtonian characteristics of blood, and close correlation of the rheological properties to the flow behavior of erythrocytes in microvascular network. (3) mechanisms of effective oxygen release from erythrocytes to tissues in the process of tissue oxygenation and the changes of oxygen release due to alterations of erythrocyte content in blood, erythrocyte deformation, and erythrocyte aggregation/accumulation. Finally, desirable characteristics required for erythrocyte substitutes was discussed from the comprehensive standpoint of erythrocyte rheology, microcirculation and oxygen transport.

Keywords

Microcirculation, Erythrocytes (red blood cells), Blood rheology (hemorheology), Blood viscosity, Plasma proteins, Oxygen transport

1. 緒言

生体の各臓器が正常に機能する上で、組織への物質の輸送、特に酸素の輸送は組織の機能を維持する上で重要である。このために組織の微小血管網内への血液の流れが様々な機構で調節されている¹⁾。血液は、細胞成分として血液全体の40-45%を占める赤血球と0.5%以下の白血球と血小板、そして55%の液体成分としての血漿から成る。したがって、微小循環動態を考える上で、赤血球の運動挙動、特に物理的外力による赤血球の変形現象や低流速で起こる赤血球の集合現象など赤血球のレオロジー的性質の変化が重要な意味をもってくる^{2,3)}。白血球の血管壁への粘着や血小板による凝集塊の形成も循環に与える影響は大きいが、ここでは、赤血球のレオロジー的性質が微小循環に与える影響ならびにこれと関連させて赤血球からの酸素放出に与える影響を中心に、病態生理学的視点から解説する。

2. 血液の循環における血液粘度の重要性

循環に関する基本的な法則にボアズイユPoiseuilleの法則がある。この法則によれば、細管内の液体の流量(Q)は管の半径(r)の4乗ならびに管両端の圧力差(ΔP)に比例し、液体の粘度(η)ならびに管長(l)に逆比例する。この法則はあくまでも微小剛管にあてはまるものであり、不規則な分岐と管内構造をもつ生体の微小血管に適用するには無理があるが、定性的な判断には便利である²⁾。すなわち、ボアズイユの法則を適用すれば、組織への循環血液量(Q)は、血圧(ΔP)、血管の収縮と拡張(r)、血液の粘度(η)の兼ね合いで決まる。換言すると、血圧は心拍出量、血管径、血液粘度によって決まる。

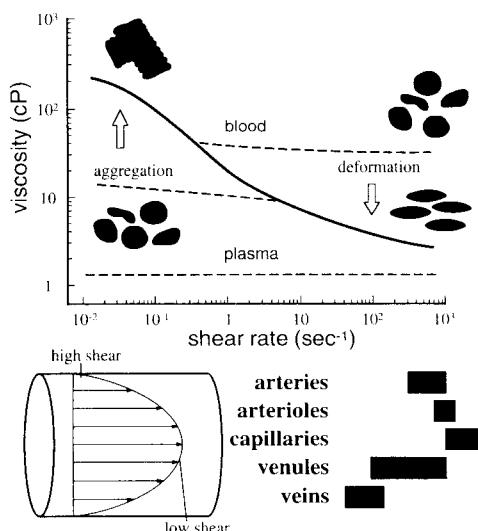


Figure 1. Shear rate-dependent changes of blood viscosity, and shear rate in a blood vessel and mean shear rate in circulatory system

一般に、微小血管の流動抵抗(R)は、その上流点と下流点の圧力差(ΔP)と赤血球流速から推定される流量(Q)から $R = \Delta P/Q$ で求められるが²⁾、その内容は $\pi r^4 / (8\eta \cdot l)$ である。生体では、 r は神経性ならびに血管作動性物質によって化学的に調節される⁴⁾。一方、血液の粘度(η)は、Fig. 1に示すように、ズリ速度に依存し

て変化する、いわゆる非ニュートン流体non-Newtonian fluidである。

ズリ速度shear rateとは、流速の勾配(cm/s/cm)を示し、次元は/sで与えられる。血管内の流速は壁近傍から管軸に向けて急激に増加し、管の中心部で最大となって平坦化する。したがって、ズリ速度は、血管壁に接する部分で最も大きく、血管の中心部で0となる。血管内の平均流速(\bar{v})は、流量を Q 、血管の半径を r とすれば、 $Q/(2\pi r^2 \bar{v})$ となる。ズリ速度の平均値は $4\bar{v}/r$ で与えられ、Fig. 1に示すように、動脈領域で大きく、毛細血管では最大となり、静脈領域で最小になる。ちなみに、ズリ応力shear stressはズリ速度に粘度を掛けた値である。

高ズリ速度領域では、赤血球が変形して流体力学的有効容積を減らすために粘度は低下し、低ズリ速度領域では、赤血球同士が集合するために流体力学的有効容積を増して粘度は著しく上昇する⁵⁾(後述)。また、ヘマトクリット(血液全体に占める赤血球の容積比)が正常値(約45%)を越えると、血液粘度は急激に増加する(Fig. 4参照)。血漿粘度(1.2-1.3 cP)は、血漿タンパク質の分子サイズと形ならびにその濃度によって決まる。しかし、これらの粘度を支配する要因は独立に取り扱えるものではなく、相互に関連している。病的な血液粘度の上昇を過粘症候群hyperviscosity syndromeといい、時に致死的となる。

3. 微小血管内の赤血球の流れ

各臓器の微小血管網への血流は、主に細動脈の収縮状態によって調節されているので、微小循環領域の血圧は急激に低下して20-25mmHgとなり、心臓による拍動流も弱まって連続的な流れとなる。微小血管網の血流は、血管網の構築状態、微小血管の構造、微小血管の局所における調節、血液の流動特性に依存している^{2,4)}。この領域では、血管内径に対して赤血球のサイズが有意となるために血管径に応じて赤血球の特徴的な流れが発現する^{2,3)}。また、細動脈脈領域から毛細血管領域に移行するにともない、赤血球流は多層流から単層流に変化するので、これに伴っても赤血球の流動パターンならびに流動抵抗は大きく変化する²⁾。白血球や血小板と血管内皮細胞との相互作用、すなわち粘着や凝集、の有無によって、赤血球の流れも変化し、流動抵抗も変わる⁶⁾。通常、小さな血小板は管壁近くを流れる²⁾。

Table 1. Factors affecting the thickness of cell-free plasma layer, and the pathophysiological causes

- | |
|---|
| (1) Increase of cell-free layer thickness |
| Decrease of hematocrit (anemia) |
| Microcytic changes of erythrocytes (iron deficiency anemia) |
| Acceleration of erythrocyte aggregation (increased high molecular weight plasma proteins, hyperlipidemia) |
| Reduction of surface negative charge of erythrocytes (increased sialidase activity in plasma) |
| (2) Decrease of cell-free layer thickness |
| Increase of hematocrit (erythrocytosis) |
| Macrocytic changes of erythrocytes (pernicious anemia) |
| Reduction of blood flow velocity (circulatory insufficiency) |
| Reduced erythrocyte deformability (oxidative damages and hereditary diseases of membrane cytoskeletal proteins) |

微小血管内のズリ速度は、Fig. 1 にも示す通り、管壁近くが最大であり、管の中心部で最小であるから、このズリ速度差によって管壁近くの赤血球は回転しながら管軸方向へと移動する(軸集中axial accumulationという)。この結果、管壁に沿って赤血球の存在しない数 μm の血漿層cell-free plasma layerが形成される^{2,3,7}。血漿層の形成状態は微小血管内の赤血球の流動挙動を示す一つの定量的な指標となる⁸。この血漿層の形成に影響する要因をTable 1 に示す^{2,8,10}。

血漿層の形成にともなって、赤血球は流速の速い微小血管の中心部を流れ、血漿は流速の遅い管壁近くを流れる。すなわち、赤血球の流速に比べて血漿の流速が相対的に遅くなるので、太い血管内のヘマトクリット(HD)に比べると、細い管内のヘマトクリット(HT)が低下する。この現象をファーレウスFahraeus効果といいう^{2,3,11}。この現象は内径300 μm 以下の微小血管領域で明瞭に発現し、内径15~20 μm でHT/HD比は最小になる。HT/HD比の減少の程度はヘマトクリットの低下、流速の増加によって増強される²。Fahraeus効果と関連して、微小血管内での血液粘度が低下する。この現象はファーレウス・リンクストFahraeus-Lindqvist効果と呼ばれる^{2,12}。粘度の低下には、赤血球の管内分布状態や赤血球と内皮細胞との相互作用が影響する¹²。

管径が約20 μm 以下になると、赤血球の流れが多層流から二層流、単層流に変化し、管内に赤血球の占める比率が逆に高くなるのでHTは再び増加する。この現象はFahraeus効果の逆転と呼ばれる^{2,11}。管径が6 μm 以下では、赤血球の変形が最大となるので、HT/HD比は流速やヘマトクリットと無関係になる²。管内での赤血球の複雑な挙動が管内での粘度に反映されるために、Fahraeus-Lindqvist効果の逆転はFahraeus効果の逆転に比べて細い管5~7 μm 以下で起こる¹²。

微小血管網では、個々の微小血管において赤血球と血漿との流速差で発現する“vessel” Fahraeus効果に加えて、その複雑な血管分岐の状態と分岐血管後の各微小血管内の流速の差によって赤血球と血漿が不均等に流れ、時に極端なヘマトクリットの低下、すなわち“network” Fahraeus効果が発現する¹¹。流速の速い血管側に赤血球は流れやすいし、内径が30 μm 以下の分岐微小血管の入口では、流れの状況によって赤血球が排除され、管壁近くの血漿層の部分だけが流れ込む。赤血球の変形能が低下すると、排除されやすくなる²。したがって、赤血球の流れる毛細血管においては組織への酸素の供給が行われるので機能毛細血管functional capillaryと呼ばれ、血漿のみが流れている毛細血管は非機能毛細血管と呼ばれる。しかし、これらは定常的なものではなく、流れの状況に応じて動的に、相互に変動している。

4. 赤血球のレオロジーと微小循環

赤血球の微小循環に関する基礎研究は、毛細ガラス管を始めとして各種の人工微小路を用いて行われてきた。動物実験では、生体で行われる場合と単離された臓器、組織を用いる場合がある。単離した微小血管網を用いると、血液のレオロジー要因を任意に調整した赤血球浮遊液を任意の流速で灌流でき、灌流された赤血球は再循環しないので便利である⁸。微小血管網で

は、その複雑な血管構築、赤血球の流動挙動ならびにそのレオロジー的性質のために、HT-流量関係は直線にならず²、その流動抵抗は血液のレオロジー的性質から予想される人工細管での流動抵抗に比べて高い¹³。人工路と微小血管での実験結果は定性的に一致することが多いが、定量的には異なる。微小血管では、ガラス毛細管に比べて、ヘマトクリットの低下および流速の増加による血漿層の増厚がより顕著に発現する¹⁴。微小血管でも血管壁を硬くすると、ガラス毛細管の場合と類似の結果が得られる¹⁵。この様な違いから、微小血管の場合には、血管壁の弾力性(伸縮)が流動挙動に与える影響が大きい。その他、赤血球と内皮細胞表面との相互作用、内皮細胞の形態と配列と変形による物理的影響、血管分岐の状態などを考慮する必要がある^{2,3}。また、微小血管内では、流れの状態とその環境が刻々と変化するので、ある定常的な流れの状態での赤血球の流動挙動は観察できても、赤血球の流動挙動(例えば、赤血球の変形や集合の状態)が平衡状態に達する前に次の流路環境に入るので平衡状態での観察は難しい。

4-1. 赤血球の変形現象

赤血球の変形erythrocyte deformationとは、物理的外力が加わったときに赤血球が受動的に形を変える現象をいい、その能力を赤血球の変形能deformabilityという。一概に変形能といつても、赤血球全体から膜の変形にいたるまで、まちまちである⁵。しかし、赤血球の変形能が低下したときに粘度が増すのは、Fig. 2 に示すように、流れの中で占める、いわゆる流体力学的有效容積が増大することに起因する。異型な赤血球でも同様である。



Figure 2. Increased hydrodynamic effective volume of erythrocytes accompanied with decreased deformability (middle) and echinocytic transformation (right)

赤血球変形能の測定法には様々な方法がある。濾過膜通過能(通過時間、濾過圧)、一定のずり応力下での楔円板状変形(短径・長径の測定)、毛細管への吸引(吸引圧と吸引された赤血球の状態)、細い纖維状の糸に引っかけて赤血球が引き延ばされる状況を観察する方法などあるが、それぞれの測定法によって見ている赤血球の物性が異なる。毛細管吸引法でも毛細管の孔径によって見ている赤血球の物性が異なる。

赤血球の変形能は、微小血管領域での流動抵抗を減らすだけでなく、自らの径(約8 μm)よりも狭い毛細血管を通過する上で重要である。赤血球の変形能に影響する要因として、以下のものが挙げられる⁵。(a)赤血球膜の粘弾性は、脂質二重膜とこれを支持する骨格タンパク質の網目構造の状態によって決まる。特に、赤血球のズリ応力変形には、赤血球骨格タンパク質のネ

ットワーク構造が重要である。酸化的ストレスを受けた赤血球は骨格構造が硬くなつて流動抵抗を増す。また各種遺伝性疾患に見られる赤血球変形の障害もこの柔軟な骨格構造の乱れに起因する。いずれについても、微小循環障害を起こして破壊されやすいので、貧血症状が顕著となる。脂質膜内のコレステロールの增量も問題であるが、各種疾患で赤血球の変形能を著しく損なうまでにはいたらない。因みに、脂質二重膜におけるコレステロールとリン脂質のモル比は、正常では、約1である。(b)赤血球は、両凹円板形の細胞であり、その表面積(約 $140\mu\text{m}^2$)に対する容積(約 $90\mu\text{m}^3$)の比率が極めて大きいために最小限のエネルギーで変形できる。球状化、有棘化すれば、変形し難くなる。保存赤血球の場合、保存日数とともに有棘化し、変形能の良い赤血球が減少し、変形能の悪い赤血球が増加するために血液粘度は増加する。(c)赤血球の内部は極めて均質であり、その粘度(6-7 cP)はヘモグロビン濃度(約33g/dl)に依存している。したがって、ヘモグロビンが変性したり(サラセミアにおけるハインツ小体形成)、結晶化する(鎌形赤血球性貧血)と、内部粘度が高まり、変形は障害される。

4-2. 赤血球の変形現象と微小循環

微小循環に対する赤血球変形能の影響は微小血管のサイズとその内部構造、微小血管網の構築状態、流速に依存している。内径 $15\mu\text{m}$ 以上の微小血管では、赤血球変形能が低下すると、血漿層の形成が貧弱になり⁸⁾、Fahraeus効果の発現も弱くなる¹⁶⁾。ただし、硬い赤血球が微小血管網を流れるとときの流動抵抗を総合的に評価する場合、血管分岐の状態に依存した流れの変化、分岐部での赤血球排除現象、Fahraeus効果などを介して流動抵抗の増大を代償性に緩和することがあるので注意する必要がある¹⁶⁾。

赤血球の流れが単層流となる毛細血管内での赤血球の変形は不均質である。均質なズリ応力が加わると、バラシート形、スリッパ形など軸対称に変形するが¹⁷⁾、不均質なズリ応力がかかると、多様な変形がおこる²⁾。流速が低下すると、赤血球と管壁との相互作用が変形に影響する²⁾。生理的には、若い赤血球は変形しやすいが、老化赤血球は変形しにくい^{18,19)}。遺伝子組換え体エリスロポエチンを投与して骨髄での赤血球造血を促し、若い赤血球を誘導すると、変形能の良い赤血球が増加する²⁰⁾。

人工的に作成した様々な硬い赤血球が単離微小血管網を用いた実験や動物実験に用いられている。Diazene-dicarboxylic acid bis[N,N-dimethylamide](略称diamide)は膜骨格タンパク質のspectrinsを選択的に重合させることができ、その程度に応じて変形能が低下する²¹⁾。微小血管網に流しても詰まらないので、正常な赤血球を流せば元の循環状態を再現することができる²⁾。Glutaraldehyde処理赤血球は、微小血管網の構築状態によっては詰まりやすく、著しく流動抵抗を増す¹⁶⁾。熱処理赤血球やformaldehyde処理赤血球にもそれぞれに特徴があり、単に変形能の低下した赤血球というだけで単一的に取り扱うには問題がある²⁾。

正常な赤血球では、赤血球変形による軸集中現象によって血管壁近傍には血漿層が形成される。この血漿層は血管内皮細胞との摩擦を減らして血液の循環抵抗を緩和し、抵抗の大きい細

動脈領域の赤血球流动を促している。しかし、変形能の低下した赤血球では、軸集中が起こり難いので血漿層の形成は悪くなる⁹⁾。また、流れの中心軸に移動しても、流れに順応できないので壁側に跳ね返されてくる。流れの中での赤血球同士の摩擦抵抗も大きく、循環抵抗は大きくなる。毛細血管領域でも、正常な赤血球の場合には、変形して容易に通過できても、赤血球変形能が低下すると、同じ流れの条件では変形し難い。しかし、この様な赤血球でも、より細い、すなわちずり応力の大きい毛細血管では変形して通過することができるが、大きな循環抵抗が発生していることには違いない。

4-3. 赤血球の集合現象

赤血球集合erythrocyte aggregationは、条件によって一次元的な連鎖rouleauxから三次元的な集合塊を形成するまで様々であるが、ズリ応力を増すと離散するのが大きな特徴である⁵⁾。すなわち、ズリ応力に依存した赤血球の集合-離散の可逆的な現象である。この現象には高分子物質の共存が必須であり、高分子が共存しなければ赤血球集合は起こらない。そのメカニズムには、高分子による赤血球間の架橋力が赤血球間に働く物理化学的な非架橋力(架橋に抗する力)に打ち勝つときに赤血球集合体が形成されるという高分子架橋モデル“Bridging model”と、赤血球近傍から高分子が排除されることによって形成される局所的な高分子の浸透圧勾配が赤血球間の隙間から溶媒を排斥することによって赤血球同士が集合するという高分子排除モデル“Depletion model”的2説がある²²⁾。簡単に言えば、前者では赤血球間に高分子が存在するが、後者では高分子が存在しない。それぞれのモデルを支持する実験結果はあるが、未だそのメカニズムは明確でない。

このような赤血球集合のメカニズムはともかくとして、赤血球集合は、(a)赤血球自身の性質、(b)高分子物質の化学的性質、(c)赤血球-高分子間相互作用を修飾する各種物理化学的要因によって影響される^{2,5,23)}。(a)赤血球自身の性質としては、赤血球の変形能の低下や形態変化は集合を阻害し、赤血球膜表面の陰性荷電の減少は集合を促進する。因みに、組換え体エリスロポエチンで誘導される若い赤血球は赤血球集合を起こしにくい²⁰⁾。(b)高分子と関連しては、フィブリノーゲン、免疫グロブリン、病的分子など高分子血漿タンパク質あるいはデキストランなど人工高分子物質の存在が不可欠である。分子量が大きいほど集合体を形成しやすいが、どの程度の分子量から集合体形成が起こり始めるかは、分子の性質によっている。因みに、デキストランの場合、分子量40,000では集合体をほとんど形成しないが、70,000になると集合体を形成する。同一分子量では、線維状分子の方が球形分子よりも集合体を形成しやすい。これら分子は高ずり速度領域での血漿粘度を増すとともに、低ずり速度領域では赤血球集合を促進させて血液粘度を増すことになる。臨床医学においては膠質浸透圧の維持の問題と関連して、人工高分子を代用血漿として用いることがあるが、赤血球集合が起こらない程度の高分子が望まれる。(c)赤血球-高分子間相互作用を修飾する各種要因としては、ズリ応力、温度、pH、浸透圧などが重要である²⁴⁾。病態によっては各要因の関わり方が異なってく

る²⁵⁾。

赤血球の集合現象は、臨床的には、赤血球沈降速度erythrocyte sedimentation rate (ESR)の測定として古くから知られている。現在、各種の測定法があるが、ズリ速度の問題、ヘマトクリットの問題、定量的な問題など、それぞれ一長一短がある。いずれの方法にしても、集合体形成に影響する要因には十分留意しておく必要はある。

4-4. 赤血球の集合現象と微小循環

赤血球集合を循環系で考えるときに重要な点は、血流速度とその流速への曝露時間である^{2,3)}。生体内における赤血球集合、特に病的な状態では、集合体形成とこれにともなう循環障害との間には、Fig. 3に示すような悪循環を考えなければならない。正常では、流速の遅い静脈領域において集合体が形成されても、動脈領域に入って高いズリ応力が加わると、個々の赤血球に離散する。しかし、集合体形成が著しいときには、形成された集合体が血管内での局所の粘度を増し、ボアズイユの法則に基づいて血流量を減少させる。このことがますます集合体形成を促進して循環障害を加速する。例えば、マクログロブリン血症では、出血症状、各種の眼症状や神経症状が現れ、意識障害、昏睡発作を起こして、時に死に至ることがある。血漿中から原因となっている高分子を除去すれば（この操作をプラスマファレーシスplasmapheresisという）、身体症状は回復する。

Vicious Cycle in Erythrocyte Aggregation

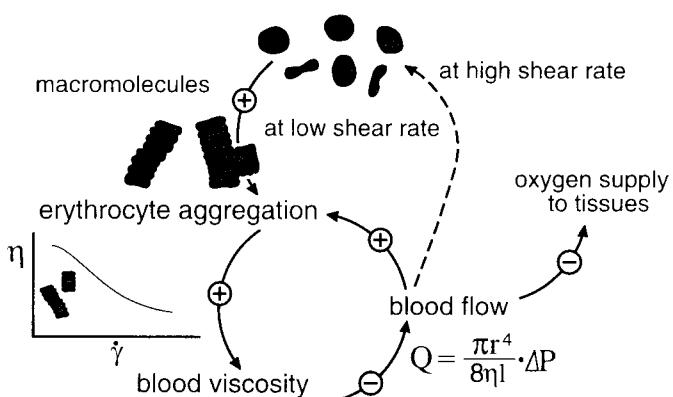


Figure 3. Vicious cycle in erythrocyte aggregation

微小循環における赤血球集合の影響は、一般にデキストラン（分子量：70-1,000 kDa）を用いて調べられる²⁾。例えば、動物から腸間膜を単離して細動脈領域（高流速領域）に赤血球浮遊液を灌流する。灌流する赤血球浮遊液中に加えるデキストラン（分子量：70 kDa）濃度を増すと、灌流抵抗は増大する。やがて集合体が血管の中心部を索状物となって流れ始めるが、血漿層の形成が顕著となり、このことによって灌流抵抗の増加は明らかに緩和される⁹⁾。同時に、赤血球の流速分布は放物線型から台形型に変わる²⁶⁾。毛細血管領域では、赤血球が列車のように連結

して流れるか、不均等に断片化した赤血球集合体の不連続な流れになる^{9,27)}。赤血球集合は、Fahraeus効果ならびにFahraeus-Lindqvist効果を一層促進するとともに、血管分岐部では著しい血漿層の形成によって赤血球排除現象が促進されて微小血管網内の赤血球の分布は著しく不均質になる²⁸⁾。低流速の細静脈領域の微小循環になると、血管網の幾何学的構築状態によって管内における集合体の流动挙動と流动抵抗が変化する^{29,30)}。垂直方向での流れでは、管壁に沿って形成される厚い血漿層によって流动抵抗が減るが、水平方向では、赤血球集合体が管底に沈殿するので流动抵抗が増し、血流量の著明な減少を招く^{28,31)}。赤血球集合を起こす高分子の濃度や分子量によっても事情は異なる。例えば、分子量500 kDaのデキストランを輸注すると、その高い粘性と赤血球集合の促進によって、代償性に血管が拡張したり、一時的な微小血管の閉塞を他の血管が代償して血流を維持することがある²⁾。このような現象も微小血管網全体としての循環抵抗を評価する上で重要である³²⁾。赤血球集合体が微小血管の中心部を流れると、白血球は管壁に沿って流れるので内皮細胞との相互作用が増して循環抵抗が増大することもある³³⁾。

5. 赤血球の微小循環と酸素放出

血液を介する組織への酸素の輸送は、組織への効果的な血液の循環convectionと血液から組織への酸素の拡散diffusionによって成り立っている。微小血管網における血液から組織への酸素の移動は、毛細血管で最大であるが、細動脈や細静脈レベルでも有意な酸素量が放出されている^{19,34)}。したがって、細動脈-毛細血管-細静脈相互間ならびにこれらの微小血管と組織との間の複雑な酸素の拡散移動によって組織が均質に酸素化されることになる³⁵⁻³⁷⁾。微小血管網での赤血球の流动挙動はこれら血液の循環と微小血管内から組織への酸素の移動に大きな影響を及ぼす。すなわち、赤血球の持つレオロジー特性は、微小循環系における赤血球の流动挙動、そして赤血球から組織への酸素の効果的な拡散と極めて密接に関連する。

赤血球内のヘモグロビンから解離した酸素が外部に拡散するとき、その過程を支配するのは拡散距離と拡散面積である。赤血球のもつ特徴的な両凹円板型形態は、赤血球内部のどの部位からも最短の距離で拡散が可能であり、かつ赤血球の容積に対して拡散表面積は極めて大きい。同径の球と比べると、赤血球では、最大拡散距離は1/4であり、表面積/容積比は2倍以上もある。また、赤血球に物理的外力が加わったときの赤血球の変形は内部を攪拌し、赤血球内部から外部への酸素の拡散過程を促進する^{19,38)}。特に、この効果は赤血球が自らの径よりも小さい毛細血管を通過するときに最大限に發揮される。球形であれば、ほとんど変形できない。さらに、微小血管内では、赤血球から放出してきた酸素が血管外へと拡散するとき、微小血管内で赤血球がどのような流动挙動をとるかによって組織への酸素の拡散過程に大きな影響が現れる¹⁹⁾。

5-1. 赤血球量と酸素輸送量

組織への酸素輸送量 $Q(O_2)$ は単位血液量中の酸素量 $Ca(O_2)$ と組織への血流量 Q の積で表すことができる。確かに、酸素運搬体

としての赤血球量（あるいは、ヘマトクリット Ht）の増加は $C_a(O_2)$ を増やすことができるが、血液の粘度 η が増すので、ボアズイユの法則にもとづいて Q が減少する。Fig. 4 に示すように、 $Q(O_2) = k \cdot Ht \cdot (1/\eta)$ で与えられるので、（厳密に言うと）ズリ速度が設定されれば、最大の $Q(O_2)$ を与える至適ヘマトクリットが決まつくる³⁹⁾。これが正常なヒトのヘマトクリットである。ここで大切なことは、ヘマトクリットが 30-50% の範囲で組織への酸素輸送量はほとんど変わらないことである。言い換えれば、少々の貧血でも組織への酸素輸送量は血液の粘度が低下することによる血流量の増加で代償できることになる。しかし、同じ赤血球量でも、赤血球自身のレオロジー的性質が変化して血液の粘度が上昇するようになると、 Q が低下し、 $Q(O_2)$ の曲線は左下に移動する。言い換えれば、血液粘度が増大した分をヘマトクリットを下げて血流量を増すことで代償しようとするが、酸素輸送量が減少することには違いない。

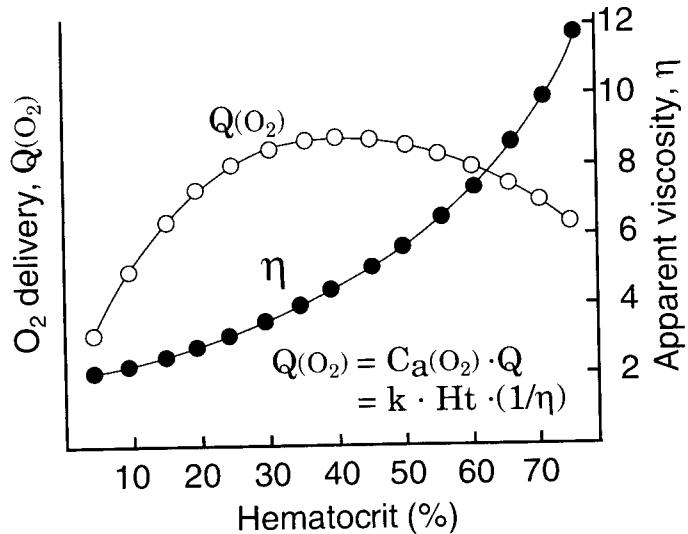


Figure 4. Effect of hematocrit on blood viscosity and oxygen delivery (Harris, 1965)

5-2. 赤血球の変形現象と酸素放出

赤血球の変形能が低下すると、赤血球からの酸素放出が妨げられる典型的な例を示す。赤血球脂質二重膜内のコレステロールが増すにつれて、Fig. 5 に示すように、赤血球の変形能が低下するとともに、赤血球からの酸素放出が抑制される⁴⁰⁾。この結果は、赤血球膜が硬くなることによって赤血球の変形による赤血球内部から外部への酸素の拡散促進効果が障害されていることを示している。

Fig. 6 には、陰イオン性薬物の作用による赤血球からの酸素放出の障害を示す。脂溶性陰イオン性薬物が作用すると、これらの薬物は赤血球の脂質二重膜の外層に入るため赤血球は有棘化（外方突出型形態変化）を起こす。薬物の濃度に依存して形態変化は著しくなるとともに、変形能は低下し (Fig. 2 参照)、酸素放出速度は遅延する⁴¹⁾。この場合、酸素放出障害には赤血球変形能の低下だけでなく、赤血球の形態変化が関与している。有棘化によって一見表面積が増しているように見えるが、球形

化しているので拡散距離が増大している。さらに、赤血球が有棘化することによって赤血球の周りに赤血球と流動挙動を共にする溶媒の淀み層 stagnant layer が増して大きな酸素の拡散障壁になっている。

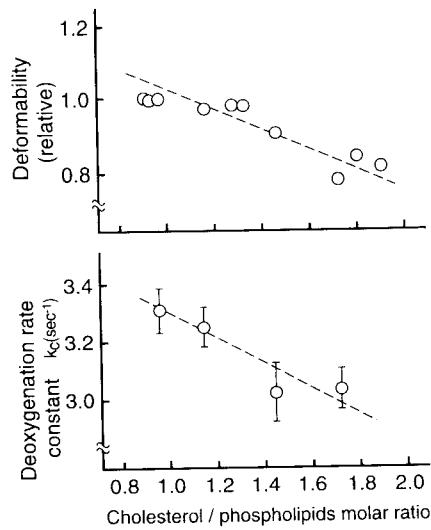


Figure 5. Decrease of erythrocyte deformability (upper) and reduced rate of oxygen release from the erythrocytes (lower) with increase of membrane cholesterol. The deformability was measured by micropipette aspiration technique, and the oxygen release (expressed as first order deoxygenation rate constant) was measured by stopped flow method⁴⁰⁾.

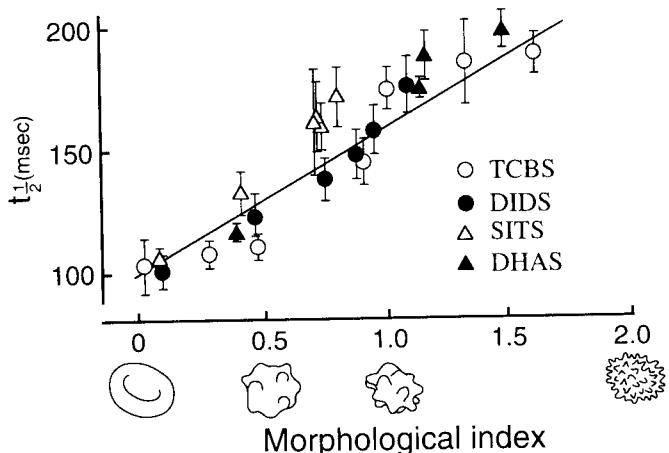


Figure 6. Reduced rate of oxygen release with echinocytic transformation of erythrocytes with various anionic drugs. The degree of transformation was expressed as morphological index. The oxygen release from the transformed cells was measured by stopped flow method, and the rate was expressed as half time of deoxygenation⁴¹⁾.

TCBS, trichlorobenzene sulphone;

DHAS, dehydroepiandrosterone sulphate;

SITS, 4-acetamido-4'-isothiocyanato-2,2'-disulphonic stilbene;

DIDS, 4,4'-diisothiocyanato-2,2'-disulphonic stilbene.

5-3. 赤血球の集合現象と酸素放出

微小流路内での赤血球の流動挙動が赤血球からの酸素放出に

与える影響を明瞭に検出できるのが赤血球集合を誘導した場合である。デキストラン（分子量：70 kDa；Dx-70）を加えた赤血球浮遊液を酸素透過性のある人工微小流路（フッ化エチレンプロピレン細管：内径25μm、外径100μm）に灌流し、流路の周囲の酸素分圧を低下させる⁴²⁾。デキストラン濃度が増すと、ある濃度で流路内に赤血球集合が始まると同時に血漿層が増大し、これと一致して赤血球からの酸素の放出が抑制される。なお、赤血球集合を起こさないデキストラン（分子量：40 kDa；Dx-40）を加えて粘度を増しても、赤血球の流动挙動と酸素放出は影響されない⁴²⁾。4 g/dl Dx-70あるいは5.2 g/dl Dx-40を加えた赤血球浮遊液をこの人工微小流路に灌流して得られた結果をFig. 7に示す。

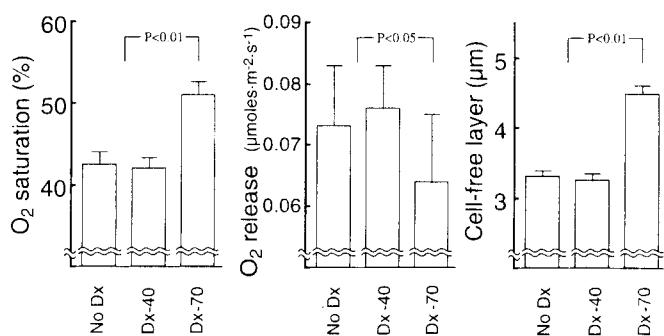


Figure 7. Effect of erythrocyte aggregation on the oxygen release and the cell-free layer formation examined using an oxygen-permeable narrow tube. Oxygen release from flowing cells was induced by the exposure of the narrow tube to deoxygenated environment. Oxygen saturation was measured at a traveling distance of 100 mm and the oxygen release was expressed as the amount of oxygen released from unit inner surface area of narrow tube in unit time. Experimental conditions: hematocrit of erythrocyte suspension, 30%; erythrocyte flow velocity, 0.5 mm/s.

赤血球の流动挙動が酸素放出に与える影響を示す他の例を紹介する。この例は直径80cmの回転板上に測定装置を組み上げて実験したものであり、回転により観察部位で最大10Gの遠心力を流路（赤血球の流れ）と直角方向に加えることができる。遠心力を増すと、赤血球流柱は圧縮され、その結果、血漿層は、遠心力側で縮小し、求心力側で拡大する。Fig. 8に示すように、正常なヘマトクリットでは、殆ど影響はないが、ヘマトクリットが低い状態（貧血状態）では明らかに酸素放出は抑制される⁴³⁾。したがって、このような場合には、赤血球量の減少と赤血球の流动挙動の変化が相まって酸素放出量が減少することになる。

高分子デキストランを用いて流れの中で赤血球を集合させた場合、遠心力で赤血球流を圧縮した場合、いずれの場合もFig. 9に示すように、赤血球流の集合・圧縮状態と酸素放出の低下がよく相關する。要するに、流れの中で赤血球が集まることが赤血球内部あるいはその周囲からの酸素の拡散を抑制している最大の要因である⁴³⁾。

赤血球が集まって流れることによって赤血球からの酸素放出は抑制される現象は、先に述べた赤血球自身の特徴的な形態にもとづいた効果的な酸素放出機構と密接に関係している。赤血

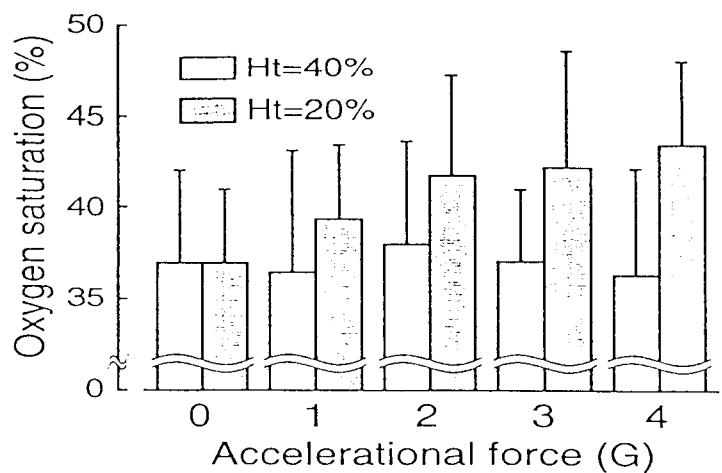


Figure 8. Effect of accelerational force-induced erythrocyte accumulation on the oxygen release using an oxygen-permeable narrow tube. Oxygen saturation was measured at a traveling distance of 100 mm. Experimental conditions: hematocrit of erythrocyte suspension, 20% and 30%; erythrocyte flow velocity, 0.7–0.8 mm/s. Details in Fig. 7.

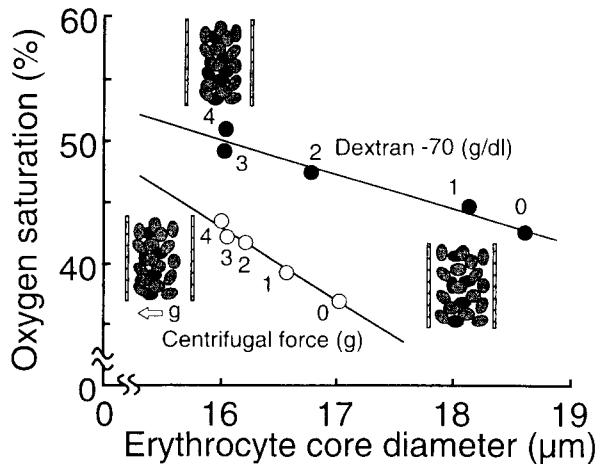


Figure 9. Effects of Dextran-70 (Dx-70)-induced erythrocyte aggregation and accelerational force-induced erythrocyte accumulation on the oxygen release. Data from Figs. 7 and 8. Numbers in the figure shows the concentration of Dx-70 (g/dl) and accelerational (centrifugal) force (g), respectively.

球が集合することによって、集合体自身が1個の酸素供給単位として挙動することに起因する。すなわち、①集合体内部からの拡散距離が延長する、②集合体の容積に対する表面積が減少する、③集合体あるいは集合体を構成する個々の赤血球の変形（内部攪拌）が抑制される、④集合体周囲の淀み層（拡散障壁）が拡大する、⑤集合体内部に包埋された血漿は攪拌されないので酸素拡散の障壁になる。なお、血漿層自身は流れの中で良く攪拌されているので、たとえ酸素の拡散障壁となっていても、前述の要因に比べると極めて小さいものと考えられる。

微小血管網における活動組織への酸素放出には、様々な機構が作動していると考えられる。各種代謝産物が血管を拡張させて局所の血流を増すことは良く知られている。最近の研究によ

ると、赤血球内の酸素含量が低下してくると、赤血球内からATPを放出して局所の血管拡張を起こして血流を増す、すなわち赤血球自身が組織への酸素供給のためのセンサーの役割を果たしている⁴⁴⁾。

6. 赤血球レオロジー

—微小循環—酸素輸送の視点からの赤血球代替物

生体における微小循環は各臓器の代謝状態に応じて神経性ならびに液性に血管平滑筋の収縮状態を変化させて調節されている。また、赤血球の変形や集合現象などレオロジー的性質は、これら各臓器への血流状態に大きな影響を与えるので、組織への酸素の供給を左右する重要な要素である。

現在の臨床医学は、輸血に関して様々な問題を抱えている。例えば、移植片対宿主反応(GVHD)のような免疫学的危険性がある。輸血には、常に、安全性、安定性、入手性、緊急性などが求められている。したがって、現在の赤血球保存血の余裕性を考慮したとしても、血液代替物の必要性は依然として将来にわたって考慮しなければならない重要な課題である。今回の知見にもとづいて、流体力学的性質ならびに酸素拡散の視点から、血液代替物のあるべき物性について考察してみたい。

先ず、流体力学的視点からは、①酸素のキャリアーはヘモグロビンの遊離型よりは細胞型の方が粘度を低く維持できて良い。特に、遊離重合型の場合には分子量が大きくなるにつれて、血漿粘度を高めると同時に、赤血球集合を促進しかねない。②ベシクル内にヘモグロビンを内蔵するならば、血漿タンパク質存在下でベシクル同士が集合を起さないことが必要である。また、膠質浸透圧の維持のために輸注されるデキストランなど各種高分子化合物の存在下でも確認しておく必要がある。③ベシクルはずり応力が加わると変形でき、内部のヘモグロビンを攪拌できることができることが望ましいが、ベシクル自身球形である限り不可能であろう。

酸素拡散の視点からは、④ベシクルが球形であるとすれば、赤血球のサイズから考えて、直徑1~2μm以下のサイズが望ましいと考えられる。より効果的な酸素拡散を考えて、ベシクルのサイズを小さくしすぎると、逆に粘度が増して流れにくくなり、血圧の上昇につながる。⑤ベシクル内ヘモグロビンの酸素に対する親和性は有機リン酸化合物などを同時に封入して赤血球並に調整できると良い。

その他、⑥ベシクルは生体内で循環の過程において機械的、酸化的ストレスなどに対して安定であり、適切に代謝されなければならない。⑦赤血球代替物に加えて、造血ホルモンとして遺伝子組換え体エリスロポエチンの同時活用も考慮すると、一層効果的な対応が可能ではないかと考えられる。ただし、この場合、多血症にならないように配慮することが必要である。現在、我々の生体内に存在する赤血球は長年にわたって自然淘汰を受けつつ進化した最適の形態と機能を備えたものと考えられる。したがって、赤血球代替物もこの赤血球に最も望ましい条件を求めるべきであろう。血液代替物学会の研究者の多くの研究成果を考えたとき、そのような望ましい条件を備えた赤血球代替物が生まれる日はそう遠くはないはずである。

Reference

- Pries AR, Reglin B, Secomb TW. Structural adaptation of microvascular networks: functional roles of adaptive responses. *Am J Physiol* 2001; 281: H1015-H1025.
- Maeda N. Erythrocyte rheology in microcirculation. *Jpn J Physiol* 1996; 46: 1-14.
- Mchedlishvili G, Maeda N. Blood flow structure related to red cell flow: a determinant of blood fluidity in narrow microvessels. *Jpn J Physiol* 2001; 51: 19-30.
- Tritto I, Ambrosio G. Spot light on microcirculation: an update. *Cardiovasc Res* 1999; 42: 600-6006.
- Shiga T, Maeda N, Kon K. Erythrocyte rheology. *Crit Rev Oncol Hematol* 1990; 10: 9-48.
- Helmke BP, Bremner SN, Zweifach BW, Skalak R, Schmid-Schonbein GW. Mechanisms for increased blood flow resistance due to leukocytes. *Am J Physiol* 1997; 273: H2884-H2890.
- Goldsmith HL. The microrheology of human blood. *Microvasc Res* 1986; 31: 121-142.
- Tateishi N, Suzuki Y, Soutani M, Maeda N. Flow dynamics of erythrocytes in microvessels of isolated rabbit mesentery: Cell-free layer and flow resistance. *J Biomech* 1994; 27: 1119-1125.
- Soutani M, Suzuki Y, Tateishi N, Maeda N. Quantitative evaluation of flow dynamics of erythrocytes in microvessels: influence of erythrocyte aggregation. *Am J Physiol* 1995; 268: H1959-H1965.
- Suzuki Y, Tateishi N, Maeda N. Electrostatic repulsion among erythrocytes in tube flow, demonstrated by the thickness of marginal cell-free layer. *Biorheology* 1998; 35: 155-170.
- Goldsmith HL, Cokelet GR, Gaehtgens P, Robin Fahraeus: evolution of his concepts in cardiovascular physiology. *Am J Physiol* 1989; 257: H1005-H1015.
- Pries AR, Neuhaus D, Gaehtgens P. Blood viscosity in tube flow: dependence of diameter and hematocrit. *Am J Physiol* 1992; 263: H1770-H1778.
- Pries AR, Secomb TW, Gessner T, Sperandio MB, Gross JF, Gaehtgens P. Resistance to blood flow in microvessels in vivo. *Circ Res* 1994; 75: 904-915.
- Suzuki Y, Tateishi N, Soutani M, Maeda N. Flow behavior of erythrocytes in microvessels and glass capillaries: Effects of erythrocyte deformation and erythrocyte aggregation. *Int J Microcirc* 1996; 16: 187-194.
- Maeda N, Suzuki Y, Tanaka J, Tateishi N. Erythrocyte flow and elasticity of microvessels evaluated by marginal cell-free-layer and flow resistance. *Am J Physiol* 1996; 271: H2454-H2461.
- Lipowsky HH, Cram LE, Justice W, Eppihimer MJ. Effect of erythrocyte deformability on in vivo red cell transit time and

- hematocrit and their correlation with in vitro filterability. *Microvasc Res* 1993; 46: 43-64.
17. Suzuki Y, Tateishi N, Soutani M, Maeda, N. Deformation of erythrocytes in microvessels and glass capillaries: Effect of erythrocyte deformability. *Microcirculation* 1996; 3: 49-57.
 18. Nakajima T, Kon K, Maeda N, Tsunekawa K, Shiga T. Deformation response of red blood cells in oscillatory shear flow. *Am J Physiol* 1990; 259: H1071-H1078.
 19. Maeda N, Shiga T. Velocity of oxygen transfer and erythrocyte rheology. *News Physiol Sci* 1994; 9: 22-27.
 20. Maeda N, Kon K, Tateishi N, Suzuki Y, Sekiya M, Taniguchi T, Seike M, Nakajima T, Shiga T, Tanaka K, Shinkura H. Rheological properties of erythrocytes in recombinant human erythropoietin-administered normal rat. *Brit J Haematol* 1989; 73: 105-111.
 21. Maeda N, Kon K, Imaizumi K, Sekiya M, Shiga T. Alteration of rheological properties of human erythrocytes by crosslinking of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1983; 735: 104-112.
 22. Baumler H, Neu B, Donath E, Kiesewetter H. Basic phenomena of red blood cell rouleaux formation. *Biorheology* 1999; 36: 439-442.
 23. Maeda N, Shiga T. Red cell aggregation, due to interactions with plasma proteins. *J Blood Rheol* 1993; 7: 3-12.
 24. Maeda N, Seike M, Kon K, Shiga T. Erythrocyte aggregation as a determinant of blood flow: effect of pH, temperature and osmotic pressure. *Adv Exp Med Biol* 1988; 222: 563-570.
 25. Ben Ami R, Barshtein G, Zeltser D, Goldberg Y, Shapira I, Roth A, Keren G, Miller H, Prochorov V, Eldor A, Berliner S, Yedgar S. Parameters of red blood cell aggregation as correlates of the inflammatory state. *Am J Physiol* 2001; 280: H1982-H1988.
 26. Bishop JJ, Nance PR, Popel AS, Intaglietta M, Johnson PC. Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules. *Am J Physiol* 2001; 280: H222-H236.
 27. Osterloh K, Gaehtgens P, Pries AR. Determination of microvascular flow pattern formation in vivo. *Am J Physiol* 2000; 278: H1142-H1152.
 28. Bishop JJ, Popel AS, Intaglietta M, Johnson PC. Rheological effect of red blood cell aggregation in the venous network: a review of recent studies. *Biorheology* 2001; 38: 263-274.
 29. Evans S-A, Adams R, Nash GB. What do measurements of filterability of blood tell us about the effect of red cell aggregation on flow resistance in small vessels? *Biorheology* 1999; 36: 453-455.
 30. Alonso C, Pries AR, Kiesslich D, Lerche D, Gaehtgens P. Transient rheological behavior of blood in low-shear tube flow: velocity profiles and effective viscosity. *Am J Physiol* 1995; 268: H25-H32.
 31. Bishop JJ, Nance PR, Popel AS, Intaglietta M, Johnson PC. Erythrocyte margination and sedimentation in skeletal muscle venules. *Am J Physiol* 2001; 281: H951-H958.
 32. Baskurt OK, Bor-Kucukatay M, Yalcin O. The effect of red blood cell aggregation on blood flow resistance. *Biorheology* 1999; 36: 447-452.
 33. Pearson MJ, Lipowsky HH. Influence of erythrocyte aggregation on leukocyte margination in postcapillary venules of rat mesentery. *Am J Physiol* 2000; 279: H1460-1471.
 34. Tateishi N, Maeda N, Shiga T. A method for measuring the rate of oxygen release from single microvessels. *Circ Res* 1992; 70: 812-819.
 35. Ellsworth ML, Ellis CG, Popel AS, Pittman RN. Role of microvessels in oxygen supply to tissue. *News Physiol Sci* 1994; 9: 119-123.
 36. Pittman RN. Influence of microvascular architecture on oxygen exchange in skeletal muscle. *Microcirculation* 1995; 2: 1-18.
 37. Intaglietta M, Johnson PC, Winslow RM. Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 632-643.
 38. Diller TE, Mikic BB, Drinker PA. Shear-induced augmentation of oxygen transfer in blood. *J Biomech Eng* 1980; 102: 67-72.
 39. Usami S. Physiological significance of blood rheology. *Biorheology* 1982; 19: 29-46.
 40. Shiga T, Maeda N, Suda T, Kon K, Sekiya M. Influences of cholesterol on red cell deformability. *Clin Hemorheol* 1982; 2: 77-83.
 41. Kon K, Maeda N, Shiga T. The influence of deformation of transformed erythrocytes during flow on the rate of oxygen release. *J Physiol (London)* 1983; 339: 573-584.
 42. Tateishi N, Suzuki Y, Cicha I, Maeda N. O₂ release from erythrocytes flowing in a narrow O₂-permeable tube: effects of erythrocyte aggregation. *Am J Physiol* 2001; 281: H448-H456.
 43. Tateishi N, Suzuki Y, Shirai M, Cicha I, Maeda N. Reduced oxygen release from erythrocytes by the acceleration-induced flow shift, observed in an oxygen-permeable narrow tube. *J Biomech* 2002; 35: 1241-1251.
 44. Ellsworth ML. The red blood cell as an oxygen sensor: what is the evidence? *Acta Physiol Scand* 2000; 168: 551-559.

B型肝炎ウイルス表面抗原に対する人工ヒト抗体の作製

Production of Recombinant Human Antibody against Hepatitis B Virus Surface Antigen

井原征治¹⁾, 城戸 勲²⁾, 前田史子¹⁾, 坂本朋昭¹⁾, 竹腰正隆¹⁾

Seiji Ihara¹⁾ Isao Kido²⁾ Fumiko Maeda¹⁾ Tomoaki Sakamoto¹⁾ and Masataka Takekoshi¹⁾

和文抄録

抗HBs抗体はHBVを中和する活性がある。この抗体のFab領域を大腸菌で発現させ、抗体医薬として使用することを考えた。まず、抗HBs抗体価の高いヒトのB細胞にEBVを感染し、モノクローナルおよびオリゴクローナルな抗HBs抗体産生細胞株を樹立した。次いで、これらの細胞株のRNAを材料にRT-PCRで抗体のL鎖とH鎖Fd領域を増幅して発現ベクターにクローニングし、大腸菌でFab抗体を発現させた。Fabクローニングのうち、HBs抗原に対する親和性が高い株を選び、プラスミドDNAを大量生産に適した構造に変更し、ジャーファーメンターで大量培養を行った。その結果、0.42g/Lの可溶化抗体が得られ、さらに精製法も確立した。

Abstract

Human anti-HBs antibody shows neutralizing activity against HBV. We planned to express Fab portion of this human antibody in *E. coli* and utilize it as the antibody medicine. For this purpose, we first infected EBV to human B cells, which were derived from an individual who had high antibody titer against HBs, and established monoclonal and oligoclonal cell clones producing anti-HBs antibodies. In the next step, L- and H-chain fragments of antibody were amplified by RT-PCR using RNA extracted from antibody producing cells, and both fragments were cloned to expression vector constructed for Fab antibody production. Plasmid DNAs were introduced to *E. coli* and induced the Fab antibodies. One Fab clone, which showed high affinity against HBs antigen, was selected and its DNA structure was altered to appropriate form for large-scale culture. Transformed bacteria were cultured in fermentor. In result, 0.42g/L of soluble Fab antibody was obtained and further, purification procedure was also established.

Keywords

recombinant human antibody, anti-HBs antibody, Fab, antibody medicine

抗体医薬は、疾病を誘発する原因物質に特異的に結合して機能を失活させ、その結果治療効果が発揮される。現在認可・販売されているヒト抗体医薬は世界で9種類ある。うちわけは、マウス抗体のFv領域とヒト抗体を融合したキメラ抗体（ヒト抗体領域は全体の66%）が4種、マウス抗体のCDR領域を切り出しヒト抗体のCDR領域に組み込んだヒト化抗体（同90%）が5種である^{1,2)}。これらの抗体に含まれるマウス配列により、ヒト抗マウス抗体が生ずる可能性は潜在的に存在すると想われる。このような背景から、次世代の抗体医薬として完全ヒト配列からなる抗体（人工ヒト抗体）の作製が各國で精力的に行われており、最近になり抗TNFα人工ヒト抗体が作られ臨床試験で効

果が認められ、認可・販売申請が出されるにいたっている。

成人がB型肝炎ウイルス(HBV)に感染した場合、肝炎を発症することがあるが、ほとんどの例で完治する。しかし、母親がウイルスキャリアーの場合、出産時に子供はHBVに感染し、免疫能が未発達であるためウイルスを排除できずキャリアーとなってしまう。日本では、かつては母児感染が大きな社会問題であったが、予防体制が整い新生児キャリアーの発生率は年間300～400人にまで低下した。しかし、中国や東南アジア諸国では依然として高い数字を示している。HBVの感染防御にはエンベロープの表面抗原(HBs)が標的となる。市販されているHBVワクチンは組み換えHBsであり、抗HBs抗体はウイルスの増殖を

1) 東海大学医学部分子生命科学2, 〒259-1193 神奈川県伊勢原市望星台 Department of Molecular Life Science 2, Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa. 2) 明治乳業株式会社医薬事業部, Pharmaceuticals Development Department, Meiji Dairies Corporation
論文受付 2002年11月9日 受理 2002年12月13日

中和する。母親がキャリアの場合、新生児には誕生の初期に抗HBs抗体活性の高いアグロブリン製剤を受動的に投与してウイルスを失活させ、数ヶ月後にワクチン接種を行いHBVキャリアーになることを阻止する。以上の理由から、抗HBs人工ヒト抗体を作る意義は大きい。

人工ヒト抗体の作製は、①目的抗体を高力価で產生するヒトの血液を材料にして目的抗体遺伝子をクローニングする方法³⁾、②ヒト染色体を持ち免疫でヒト抗体を作るマウスの利用⁴⁾、等いくつかの方法がある。我々は、ヒト血液を材料にして、B型肝炎ウイルス(HBV)を中和するヒト抗体の作製に取り組んできた。その結果、強い親和性を持つFabクローンの分離に成功した。また、大腸菌での大量培養と精製法も確立し動物実験を実施し、体制を整えるにいたっている。本報告では、これらの我々の取り組みについて述べる。

実験方法は以下の手順をふむ。抗HBs抗体活性の高いヒトから抹消血の提供を受け、B細胞にEBVを感染して細胞を不死化した。約一ヶ月の期間細胞をトランスファーすることなく培養を続け、多数のクローンに収束させ、抗HBs IgG抗体を产生するモノクローナル、あるいはオリゴクローナルからなる細胞群を樹立した。次に、これらの細胞から抗体遺伝子のクローニングをするため細胞からRNAを抽出し、ヒト抗体用プライマー⁵⁾を使ってRT-PCRでFab(L鎖の全領域、およびH鎖のFd領域)を増幅し、これらを発現ベクターpRPLS/Fab-Iベクター⁵⁾にクローニングして抗体ライブラリーを作り、直接スクリーニングを行って抗HBs活性のあるクローンを得た。

抗HBs抗体產生細胞株の分離

HBV表面抗原(HBs)に対する抗体活性の高い健康人のB細胞 7×10^7 をEBVでトランスフォーム、異なる細胞数でwellにまいて培養を続けた。抗HBs抗体陽性wellの出現率を調べたところ、 $1 \times 10^3/\text{well}$ の細胞を120wellにまいた時、抗HBs抗体陽性wellは0(0%)、 1×10^4 を480wellにまいた時は19well(4%)で陽性、 2×10^5 で120well中18well(15%)、 1×10^6 で38wellで25well(66%)であり、まく細胞数が多いほど抗体陽性になる割合は高い結果となった⁶⁾。抗体陽性wellから抗HBs抗体產生モノクローナル細胞、およびオリゴクローナル細胞を樹立した(Table 1)⁶⁾。このうちの1株(細胞株301)はモノクローナルな株で、かつ抗HBs抗体活性が高かった。そこで、培養上清中に分泌される抗体を使用してチンパンジーでのHBV感染防御実験を行ったところ、予防効果が認められた⁷⁾。

Anti-HBs Antibody Producing Cell Clones

Clone	Anti-HBs titer (PHA)	Determinant
301	12800	a
303	6400	a
305	6400	d
308	128	a

Table 1. Anti-HBs antibody producing cell clones were selected from human B cells transformed by EBV. Cell culture supernatants were used for analysis of antibody titers. Clone 301 is monoclonal, but other clones are all oligo-clonals.

Fab抗体の作製と特異性の分析

EBVトランスフォーム細胞は、抗体産生が不安定で、産生量が減少したり、消失したりすることが知られている。またEBVはガンウイルスであり、EBVトランスフォーム細胞が産生する抗体はヒトへの応用は不適当である。そこで、抗体遺伝子の単離と抗体の大腸菌での発現を意図し、細胞株301、および、その他いくつかの細胞株からRNAを抽出し、ヒト抗体用プライマーを使用したRT-PCRで抗体遺伝子のFab領域(L鎖の全領域、H鎖のFd領域)の増幅とpRPLS/Fab-Iベクターへのクローニングを行った。Fab抗体の発現はプラスミッドDNAを大腸菌に導入し行った。上述通り、細胞株301はモノクローナルな細胞で1種類の抗体(Mab-CL4)を产生する。RT-PCRで増幅したDNA断片はL鎖もH鎖Fdも1種類であった。これらの断片を発現ベクターにクローニングして作製したFabクローンをFab-CL4と名付ける⁸⁾。細胞株303と308はいずれもオリゴクローナルな細胞で、事実これらの細胞株から分離したFabクローンはDNA塩基配列および抗体のサブクラスの異なるものが存在する。これらの抗体間に認識するエピトープやHBs発現細胞を染色する能力に差が認められた(論文準備中)。Fabクローン間に存在する特異性の差はHBsへの結合部位や結合様式に差がある事を示しており、混合して使用すればHBsの機能を失活させる相乗効果が期待できる。

細胞株301が产生するMab-CL4はHBsに対して高親和性を示す抗体であるが、この特性はFab-CL4でも保たれていた。Figure 1にMabとFabの親和性の分析結果を示す。ここではFabがMabより親和性が高い結果になっているが、MabとFabでは分子形態に差があり親和性を単純には比較できない。我々はFab-CL4は親株のMab-CL4とほぼ同等の親和性を有すると考えている。

Quantification of anti-HBs antibodies by ELISA

OD650

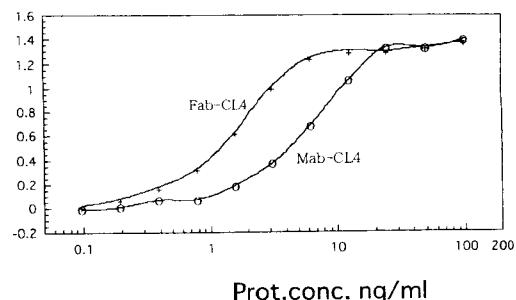


Figure 1. Serially diluted solution of purified Mab-CL4 and Fab-CL4 were incubated in microtiter plates precoated with HBs antigen. HRP conjugated anti-human F(ab')₂ goat antibody was then added. Assays of Mab-CL4 and Fab-CL4 were carried out on the same plate simultaneously.

Fab抗体の大量生産・精製

Fab-CL4は、ファージディスプレイ用のベクターにクローニングしたものであるが、発現Fabには本来の抗体分子には無い配列が付加されており、またベクターは繰り返し構造を含む。この繰り返し構造はプラスミッドを不安定にする可能性があり、大量生産には不都合である。そこで、余分な配列を取り除き、安定性を増加させるため抗体DNAおよびベクターDNAを改変し

た。使用した発現ベクターはpQE30 (QIAGEN社) で、改変後のプラスミッドpCL4M7の構造はFigure 2に示す。

Structure of pCL4M7 Vector Constructed for Large Scale Culture

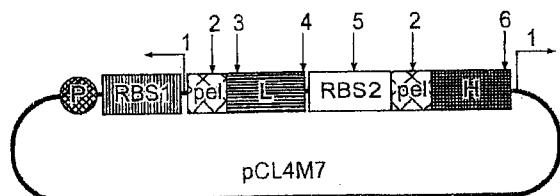


Figure 2. Genes of L and H chains were originally cloned to pRPLS/Fab-1 vector. Fab antibody produced from pRPLS/Fab-1 vector includes extra amino acid sequence compared to original antibody, which was added by PCR amplification, and in addition this vector carries repeated structure, too. Extra sequence and repeated structure were eliminated in pCL4M7 vector. Numbers described in top are the altered points compared to pRPLS/Fab-1 vector.
P: tac promoter, RBS: ribosome binding site, pel: leader sequence of pectate lyase gene
L: L chain of antibody.
H: Fd portion of H chain of antibody.

このプラスミッドを大腸菌に導入し、①フラスコで振とう培養した場合と、②ジャーファーメンターを使用して培養を行った場合の抗体発現量の比較を行った。

使用したジャーファーメンターの容量は10L、開始培地量は3.5Lで、pH、溶存酸素、浸透圧、温度、菌体量、残存グルコース濃度、を指標に培養した。その結果、isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を加える時期により抗体産生量に大きな差が観察され、菌体が対数増殖期の後半に加えたときに産生抗体量が最も多く、それより早くても遅くとも産生抗体量は減少した。菌体濃度 (A600nm) はIPTG誘導で53、誘導無しで93に達し、フラスコ培養の10倍となった(IPTG、および発現H鎖は大腸菌に対し毒性を示す。そのためIPTG誘導よりも誘導無しの方が大腸菌の増殖は良い)。培地あたりの菌体内に含まれる可溶性組み換えFab-CL4 (rFab-CL4) 発現量は培養22時間後に最大となり、0.42g/Lに達した。フラスコ培養をした菌体からは可溶性抗体の収量は1mg/L程度であるから、ジャーファーメンターで得られた結果はフラスコの約400倍にもなる。SDS-PAGEで調べると菌体当たりの組み換え蛋白質発現量はフラスコ培養とジャーファーメンターではほぼ同等であるから、ジャーファーメンター培養では封入体形成量が減少し、可溶性のrFab-CL4として菌体内に蓄積すると考えられる。

精製法としては、収量、精製の容易さから抗Fab抗体カラムや、HBs抗原カラムなどを用いたアフィニティー精製を考えられる。しかし、これらの方法は、生体由来物質を用いるために安全性等の規格、試験が必要になること、コストの増大が予測されることから、イオン交換、ゲルfiltration、ハイドロフォーピッククロマトグラフィー等の組み合わせによる精製が望ましい。

各種精製法を検討した結果、以下の精製法を用いたとき最も優れた結果が得られた。まず、上記の方法でIPTG誘導した菌体を超音波で破碎処理をした。遠心を行い、上清をSP陽イオン交換クロマトグラフィーに供し、磷酸バッファーを基本とし、NaCl濃度勾配で精製を行った。破碎上清中の総蛋白質に存在するrFab-CL4は1.2%であった。各分画の吸光度(280nm)、電気伝導度、抗HBs抗体活性 (ELISA測定値) をFigure 3に示す。代

表的な画分のSDS-PAGE・染色の結果をFigure 4に示す。これらの分析からわかるように、rFab-CL4は低塩濃度で溶出し、最も活性の高い画分では90%の純度となった。

Purification of rFab-CL4 by HiTrapSP Column Chromatography

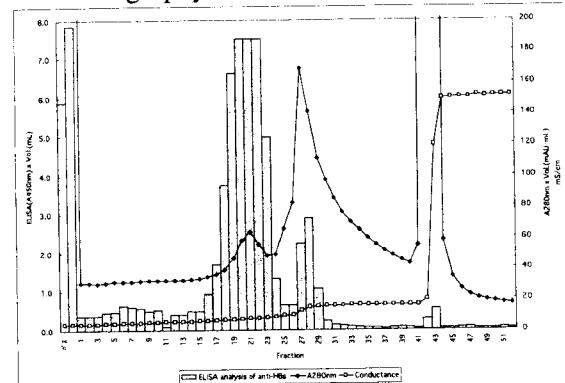


Figure 3. IPTG-induced bacteria were sonicated and supernatants were collected after centrifugation. Recombinant Fab antibodies were purified by cation exchange column chromatography.

SDS-PAGE Analysis of Fractions by Cation Exchange Chromatography

1 2 3 4 5 6

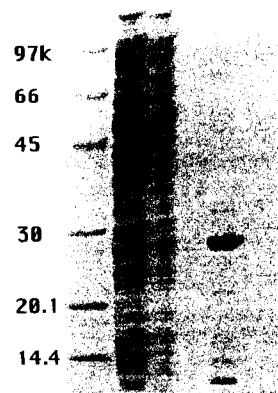


Figure 4. Each fractions were analyzed by reduced SDS-PAGE.
1. molecular weight marker, 2. centrifuged supernatant,
3. flow-through, 4. washed fraction, 5. eluted fraction,
6. 2M NaCl wash

今後の取り組み

抗HBsヒトFab抗体の大量生産・精製の体制は整った。次の課題はrFab-CL4のHBV中和活性の評価実験である。しかし、HBVでは *in vitro*での確実な測定法ではなく、また *in vivo*ではHBVの宿主がチンパンジーとヒトに限定される。評価をするには、複数頭のチンパンジーが必要であるが、必要頭数の確保、飼育、抗体活性の評価には専門施設および専門家の協力が不可欠となる。これらの問題を解決し、臨床試験に向けての課題に是非取り組みたいと考えている。

なお、我々は植物でのMab-CL4の発現系も確立した(論文準備中)。今後、大腸菌発現系と合わせて、抗体をより簡便に大量調製できる体制を整えていきたい。

倫理面への配慮

血液提供者に対しては人権には十分に配慮し、採血の際は研究の内容を説明し、書面で承認を得たのち採血を実施している。なお、人工ヒト抗体の作製研究は、東海大学医学部倫理委員会に申請をし、認可を得た。

Reference

1. 横山勇生, 増田智子. 次世代バイオ医薬の本命. 抗体医薬 日経バイオビジネス 2001年8月号; 48-61.
2. C. エゼル. 新世代のモノクローナル抗体医薬. 日経サイエンス 2002年3月号; 30-39.
3. Burton DR, Barbas CF. Human antibodies from combinatorial libraries. *Advances of Immunology* 1994; 57:191-280.
4. Kuroiwa Y, Tomizuka K, Shinohara T, Kazuki Y, Yoshida H, Ohguma A, Yamamoto T, Tanaka S, Oshimura M, Ishida I. *Nature Biotech.* 2000; 18:1086-1090.
5. Takekoshi M, Maeda F, Tachibana H, Inoko H, Takakura I, Kenjyo T, Hiraga S, Ogawa Y, Horiki T, Ihara S. Human monoclonal anti-HCMV neutralizing antibody from phage display libraries. *J.Virol. Meth.* 1998;74: 89-98.
6. 松井 孝舗. ヒト単クローニング抗HBs抗体の安全性とHBウイルス感染防御効果. 日大医誌 1982; 41(12):1163-1171
7. 小野 魁. B型肝炎ウイルスに対する単クローニングヒト抗体の研究. *Medical Bulletin* 1984; No2;30-35.
8. Maeda F, Nagatsuka Y, Ihara S, Aotsuka S, Ono Y, Inoko H, Takekoshi M. Bacterial expression of a human recombinant monoclonal antibody Fab fragment against Hepatitis B surface antigen. *J Med Virol.* 1999;58:338-345.

原著

自己組織化リピドヘム小胞体のナノ構造と酸素結合能

Nano-structure and Oxygen-binding Ability of Self-assembled Lipid-heme Vesicles

小松晃之，森武美保，土田英俊
Teruyuki Komatsu, Miho Moritake, Eishun Tuchida

和文抄錄

生理条件下(生理塩水中, pH7.3, 37°C)で酸素を可逆的に吸脱着できる鉄ボルフィリン(ヘム)の組織体を構築し,それを臨床応用可能な完全合成型の人工酸素運搬体として利用する試みを進めている。リン脂質類似構造の置換基を有する両親媒性ヘム(リビドヘム)は、水相系で自発的に会合して様々な形態の組織を形成するが、特に4つのジアルキルホスホコリン基をボルフィリン面上に共有結合したテトラフェニルボルフィリン鉄錯体は二分子膜小胞体を構成し、安定な酸素配位錯体を与える。今回、ジアルキル鎖の結合部位として新たにトリメチロールエタンを導入した新しいリビドヘムを設計・合成し、それが自己集合して形成する小胞体のナノ構造と酸素結合能を明らかにした。電子顕微鏡観察、原子間力顕微鏡観察から、リビドヘムと1-ドデシルイミダゾールが水中で均一分散して、粒径約100nmの一枚膜小胞体を形成することを解明。その膜厚(10nm)がリビドヘム分子長(4.6nm)の2倍に相当したことから、小胞体はリビドヘムの分子二層膜からなると考えられる。酸素親和性($P_{1/2}$)は30Torr(37°C)でヒト赤血球の値に近く、酸素錯体半減期は17hr(37°C)と長い。レーザーフラッシュホトリシス法から決定した酸素結合・解離速度定数は、ヘモグロビンの値と同等で、これは酸素吸脱着の速度が赤血球に比べ1,500倍速いことを意味する。また、酸素分子の配位構造を磁気共鳴法で解析し、ヘモグロビンと同じbent end-on型であることを実証した。

Abstract

ABSTRACT
Molecular assemblies made of iron-porphyrins (hemes), which can reversibly bind and release oxygen molecule under physiological conditions (in saline solution, pH 7.3, 37°C), have been synthesized and tried to use as totally synthetic oxygen-carriers in clinical situations. It is known that amphiphilic hemes having phospholipid-like substituents are self-organized in aqueous media to form various shaped assemblies, in particular, tetraphenylporphinatoiron complexes with four dialkylphosphocholine groups on the porphyrin ring plane produce bilayer vesicles and form stable oxygen-adduct complexes. Recently, we have synthesized new lipid-heme, in which trimethylolethane is introduced as an attaching moiety for two long acylchains, and evaluated the nano-structure and oxygen-binding ability of its self-assembled vesicles. Electron microscopy and atomic force microscopy revealed that lipid-heme and 1-dodecylimidazole were homogeneously organized in water to give spherical unilamellar vesicles with a diameter of approximately 100 nm. Since the thickness of the membrane (10 nm) coincided to the twice of the length of lipid-heme molecule (4.6 nm), it can be supposed that the vesicles were composed of double layer membrane structure. The oxygen-binding affinity ($P_{1/2}$) was 30 Torr (37°C), which is close to that of human red blood cells, and its half-life time ($\tau_{1/2}$) was enough long (17 hr at 37°C). The oxygen association- and dissociation-rate constants determined by laser flash photolysis showed similar values of hemoglobin's, which indicates that oxygen absorption rate of the lipid-heme vesicles is 1,500-fold faster than that of red blood cells. Furthermore, the coordination structure of oxygen molecule was evaluated by magnetic circular dichroism and infrared spectroscopies, and found to be bent/end-on structure as same as hemoglobin.

Keywords

Keywords: Lipid-heme, bilayer vesicles, nano-structure, oxygen-binding, totally synthetic oxygen-carrier, oxygen-coordination structure

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, 3-4-1 Okubo, Shinjuku, Tokyo 169-8555
論文受付 2002年11月25日 受理 2002年12月6日

1. 緒言

ヘモグロビン (Hb) の酸素結合席である鉄プロトボルフィリノIX (ヘム) の酸素吸脱着能を合成のボルフィリン鉄錯体で再現しようとする試みは1970年代から始まり¹⁻³⁾、これまでに有機化学の英知を結集した数多くの修飾ヘム誘導体が精密合成されてきた^{4,5)}。合成化学、生物無機・有機化学からのアプローチが主流であったため、そのほとんどは非プロトン性有機溶媒中の修飾ヘムを対象としたモデル研究であったが、(i) ボルフィリン骨格の立体的・電子的構造因子と酸素配位平衡の相関、(ii) 酸素結合ダイナミクス、(iii) 配位酸素の電荷分極構造など、重要な知見が集積してきた。Hbからヘムを単離し室温で酸素と接触させても、水中はもちろん有機溶媒中でもヘム鉄は瞬時に不可逆酸化され、酸素分子の配位を見ることはない。一般にヘム錯体への可逆的な酸素結合を可能とするためには、(i) 酸素錯体にもう一つのヘムが結合して μ -oxo二量体を形成する二分子酸化過程を禁止し、さらに(ii) 配位酸素にプロトン(水)が付加する一分子酸化過程を抑制する必要がある。Hbにおけるグロビン鎖の役割の一つは、ヘムを疎水的分子環境(ヘムポケット)内へ固定し、上記条件を満足させることにあるといつてよい。加えて、ヒスチジン残基(E7 His)のイミダゾール π -軌道から鉄d_{xy}への π -donationが、軌道の電子密度を増大させ、中心鉄から酸素へのback donationを促進、ヘムの酸素親和性を増大させている。

実際に合成ヘムを利用して、生理条件下で酸素輸送のできる人工酸素運搬体を具体化した最初の例は、著者らの両親媒性ヘムをリン脂質二分子膜中に包埋した系であった⁶⁾。つまり我々は、両親媒性のボルフィリン鉄(II)錯体(リビドヘム)をリン脂質が構成する二分子膜層間に配置固定すると、水中でも安定な酸素錯体が得られることを初めて見出したのである。この発見を契機にリビドヘム誘導体の設計・合成を幅広く展開⁷⁻¹¹⁾、興味あることに、ジアルキルホスホコリン基をボルフィリン面上に導入した化合物の一群が、水中で自発的に集合してヘム鉄のみからなる二分子膜小胞体を形成することを明らかにした^{12,13)}。アルキレン側鎖が規則配列して構築する疎水場の中央にヘムが二次元配列するため、結果として上記二つの酸化過程が同時に抑制され、安定な酸素錯体が得られる。リビドヘム小胞体の酸素親和性はヒト赤血球と同程度で、酸素結合解離速度もヘモグロビンと同等、所望の濃度([ヘム]=5-10mM)に調整したリビドヘム小胞体水分散液は、赤血球の酸素輸送能を十分に代替できる完全合成型の人工酸素運搬体となり得る。また、この自己組織化リビドヘムの完成により、従来共成分として混合していたリン脂質の添加は不要となり、同ヘム濃度水分散液中の固形成分量は、大幅に低減できるようになった。唯一、この系に残された課題は、リビドヘムの合成工程が多段階からなるため、総収率が低く、量産が難しいことにあった。

ごく最近、我々は、ジアルキルホスホコリン基の骨格部位であるグリセロールと同じ三価アルコールであるトリメチロールエタンに変換すると合成工程が大幅に簡略化され、収率高くジアルキレン側鎖構造が構築できることを見出した¹⁴⁾。得られた新しいリビドヘム(I, Fig. 1)は、二分子膜小胞体を形成し、酸素を可逆的

に結合解離できる。本報では、この自己組織化リビドヘム小胞体のナノ構造と酸素結合能、酸素配位構造について報告する。

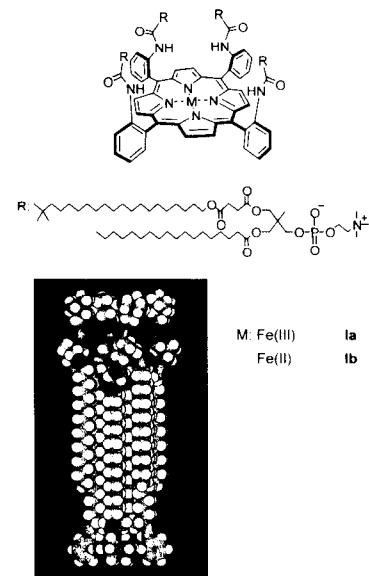


Fig. 1 Structure of lipid-heme molecule and its space-filling model.

2. 実験方法

2.1 試薬、装置

リビドヘム(Ia)、1-ドデシルイミダゾール(DIm)は、既報に従い合成した¹⁴⁾。イオン交換水はADVANTEC GS-200を用いて調製。紫外可視吸収(UV-vis.)スペクトルはJASCO V-570を用い、300-700nmの範囲で測定した。

2.2 リビドヘム水分散液の調製と集合構造観察

Ia/DImの混合薄膜(1/2.2-3.4(モル比))をナス型プラスコ底部に作成し、そこへ60°Cに加温したリン酸緩衝液(1 mM, pH7.3)を加え、十分に水和させた後、水浴中、N₂雰囲気下で超音波照射(日本精機 TS-600, 60mW, 3min)すると、茶褐色透明のリビドヘム水分散液([ヘム]=20μM)が得られた。室温で少なくとも12時間静置してから、各測定に供した。

得られたIa/DIm水溶液と酢酸ウラニル水溶液を混合し、親水化処理装置(JEOL HDT-400)で前処理した電子顕微鏡用支持膜付きグリッドの上にのせ、室温で乾燥させた後、透過型電子顕微鏡(TEM)観察を行った(JEOL, JEM-100CX)(ネガティブ染色法)。また別途グラファイト(HOPG)基板上に乾燥させたIa/DIm水分散液について、原子間力顕微鏡(AFM)観察(Digital Instruments, Nanoscope III)を実施した。小胞体の粒径とその分布は動的光散乱粒径分布測定装置(COULTER MODEL N4SD)を用いて測定した。

2.3 酸素結合パラメーター

Ia/DIm水分散液([Ia]=20μM, pH7.3)に窒素雰囲気下で小過剰のNa₂S₂O₄水溶液を添加すると、中心鉄(III)が還元され、酸素配位活性な鉄(II)錯体が得られる。余剰のNa₂S₂O₄を

ゲルfiltration (Sephadex G-25) により除去した後、分光分析用石英製セル ($1\text{cm} \times 1\text{cm}$) に移し、セブタムラバーで密栓した。そこへ酸素、一酸化炭素を通気し、UV-vis.スペクトルを測定、スペクトルパターンから酸素錯体、一酸化炭素錯体の形成を観測した。また、異なる酸素分圧に対するUV-vis.スペクトルの連続変化から、酸素結合解離曲線を作成、酸素親和性 ($P_{1/2}$) を決定した。酸素錯体吸収帶 ($\lambda_{\max}: 542\text{nm}$) 吸光度の経時変化から酸素錯体半減期 ($\tau_{1/2}$) を算出。さらに、レーザーフラッシュホトリシス分光装置(UNISOKU TSP-600, Nd:YAGレーザー第二高調波 (532nm)) を用いて、酸素、一酸化炭素結合解離速度定数 (k_{on}, k_{off}) を決定した¹⁵⁾。

2.4 磁気円偏光二色性 (MCD) スペクトル、赤外吸収 (IR) スペクトル

Ib/DIm水分散液 ($[Ib] = 8\mu\text{M}$, pH7.3) を、窒素、酸素、一酸化炭素雰囲気下で、各々2.5mLずつ分光分析用石英製セル ($1\text{cm} \times 1\text{cm}$) に分注し、1.5T (15kG) の磁場下、300–700nm の範囲でMCDスペクトルを測定した(JASCO J-820, 積算回数: 2回, 25°C)。また、0TにおけるCDスペクトルをベースラインとして使用した。

Ib/DIm水分散液 ($[ヘム] = 3\text{mM}$, pH7.3) を、窒素、一酸化炭素、酸素 ($^{16}\text{O}_2$), $^{18}\text{O}_2$ (Isotec Inc. (USA) 99%) 雰囲気下で、各々150μL採取し、CaF₂セル(JASCO, 1103-7157E, セル長: 0.025mm)に注入、400–4000cm⁻¹の範囲でIRスペクトルを測定した(JASCO FT-IR-410, 分解能: 4 cm⁻¹, 積算回数: 64回, 25°C)。

3. 結果および考察

3.1 集合組織の形態とナノ構造

得られたりビドヘム水分散液 (**Ia/DIm**, $[ヘム] = 10\mu\text{M}$ –10mM) はきわめて安定で、調製6ヶ月後でも沈殿凝集は認めない。この水溶液の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察から**Ia**とDImが水中で均一に分散して、粒径約100nmの一枚膜小胞体を形成することを明らかにした(Fig. 2 (A))。膜厚 (10nm) がリビドヘム分子長 (4.6nm) の二倍に相当したことから、小胞体はリビドヘムの分子二層膜からなると考えられる。著者らは以前、ジアシル鎖の結合部位として天然のリン脂質(例えば、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC))と同じグリセロールを用いたりビドヘムを合成し、それが水中で自己集合して二分子膜小胞体を形成することを報告しているが¹²⁾、このリビドヘム (**Ia**) も単独、または軸塩基配位子としてのDImが共存する条件下で同様な小胞体を形成できる。グリセロール部分をトリメチロールエタンに変換しても、小胞体形成能に変化はなかった。動的光散乱法により測定した小胞体の粒径は $97 \pm 73\text{nm}$ で、TEM観察の結果と一致した。

また、**Ia/DIm**水分散液をグラファイト基板上で乾燥させ原子間力顕微鏡 (AFM) 観察を行うと、小胞体が潰れて変形した円盤状組織像が認められた(Fig. 2 (B))。これはDPPCなどのリン脂質からなる小胞体に見られる現象と類似しており、内水相を有する小胞組織のAFM観察では一般的である¹⁰⁾。円盤の高さは

均一で19.5nm。この高さがリビドヘム二分子膜の厚みの二倍と一致したことからも、分子二層膜構造が裏付けられた。

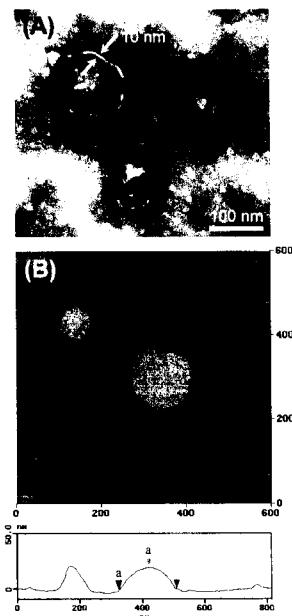


Fig. 2 (A) TEM of **Ia/DIm** vesicle stained by uranyl acetate. (B) AFM image of the evaporated sample of **Ia/DIm** vesicles on HOPG.

3.2 酸素結合能

Ib/DIm小胞体のUV-vis.スペクトルは、窒素雰囲気下で $\lambda_{\max}: 436, 538, 568\text{nm}$ を示し、**Ib**の両軸配位座にDImが結合した6配位鉄(II)低スピニ錯体の形成を示した。そこへ酸素を通気するとスペクトルパターンは速やかに酸素錯体型 ($\lambda_{\max}: 435, 543\text{nm}$) へ移行し、この酸素結合解離は酸素／窒素の吹き込みに伴い可逆的に変化した(Fig. 3)。また、一酸化炭素を吹き込むときわめて安定なカルボニル錯体 ($\lambda_{\max}: 433, 545\text{nm}$) が得られた。異なる酸素分圧に対するUV-vis.スペクトル変化から算出した酸素親和性 ($P_{1/2}$) は30Torr (37°C) でヒト赤血球の値 (27Torr) に近く¹⁶⁾、酸素錯体の半減期も17hr (37°C) と長い。酸素結合サイトであるヘム部が小胞体表面から約4.0nm内側の疎水場に規則正しく二次元配列して固定されているため¹⁴⁾、 μ -oxo二量体形成とプロトン酸化が同時に抑制されるのである。また、この二分子膜小胞体は約23,000分子のリビドヘムから構成されており、その全てに酸素分子が結合できる(Fig. 4)。Hbの酸素結合過程に見られる協同現象(いわゆるアロステリック効果)は観測されないが、例えは肺 ($P_{O_2}: 110\text{Torr}$) ~ 末梢組織 ($P_{O_2}: 40\text{Torr}$) 間におけるリビドヘム小胞体の酸素運搬効率 (20%) は、赤血球の値 (22%) に匹敵することから、人工酸素運搬体として十分な酸素輸送能力を有しているといつてよい (Fig. 5)。

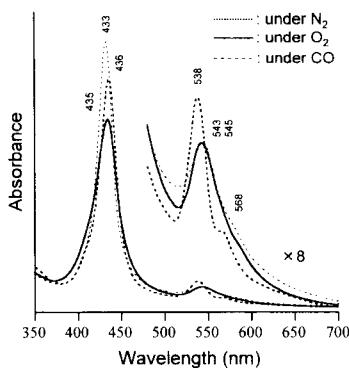


Fig. 3 UV-vis. absorption spectral changes of **Ib**/DIm vesicles in phosphate buffer solution (pH 7.3) at 25 °C.

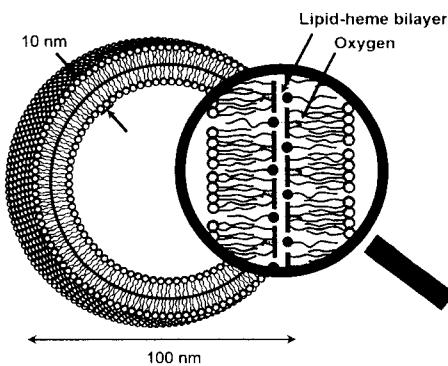


Fig. 4 Schematic illustration of **Ib**/DIm bilayer vesicles.

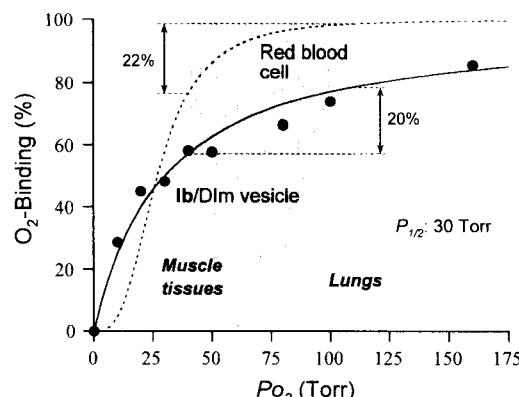


Fig. 5 O₂-equilibrium curve of **Ib**/DIm vesicles in phosphate buffer solution (pH 7.3) at 37 °C.

Ib/DIm (CO) 小胞体水分散液にレーザーフラッシュを照射すると、配位COの解離と再結合が観測される。この瞬時に起こる非平衡状態から平衡状態へのUV-vis.スペクトル変化から、配位気体分子の結合解離速度定数(k_{on} , k_{off})が算出できる。レーザー照射10μs後における過渡吸収スペクトルは、空素、一酸化炭素雰囲気下における吸収帯の差スペクトルとは異なるパターンを示した。つまりこの実験条件下では、レーザー照射により一酸化炭素が解離した後、近傍に存在するDImが第6配位座に配位することなく、一酸化炭素の再結合が先行して生起する。レ

ーザフラッシュホトリシス法により決定したリピドヘム小胞体の k_{on} , k_{off} はHbの値と同等値を示し^{17,18}、これは生体膜に内包されている構造の赤血球と比較した場合、酸素吸脱着の速度が1,500倍速いことを意味する¹⁹。

Table 1 O₂- and CO-binding rate constants of **Ib**/DIm vesicle in phosphate buffer solution (pH 7.3) at 25 °C.

	O ₂		CO
	k_{on} [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{off} [s ⁻¹]	k_{on} [M ⁻¹ s ⁻¹]
Ib /DIm vesicle	1.6×10^7	2.5×10^2	1.2×10^7
Hb(T-state) α ^{a)}	2.9×10^6	1.8×10^2	2.2×10^5
Red blood cell ^{b)}	1.1×10^4	1.6×10^1	1.4×10^4

^{a)}pH 7.0-7.4, 20 °C, ref.17, 18. ^{b)}pH 7.4, ref. 19.

3.3 リピドヘムの軸配位構造と酸素配位構造

ヘムやヘム蛋白質の磁気円偏光二色性(MCD)スペクトル測定からは、その酸化状態、スピニ状態、配位構造に関する重要な知見が得られる^{20,21}。**Ib**/DIm小胞体の窒素、酸素、一酸化炭素雰囲気下におけるMCDスペクトルは、それぞれ異なるパターンを示した(Fig. 6)。これらはCollmanらが報告しているテトラフェニルボルフィリン鉄(II)-ビス(N-メチルイミダゾール)[FeTPP (N-MeIm)₂]錯体、FeTPP (N-MeIm) (CO) 錯体、および近位結合型置換FeTPP (O₂) 錯体のパターンとよく一致した²¹。つまり、窒素雰囲気下では、2つのDImが向軸配位座に結合した鉄(II)6配位低スピン錯体構造をとるが、そこへ酸素、一酸化炭素を通気すると、DImの1つがO₂、COに置き換わりSoret帶領域に対称性の高い大きなMCDが出現する。この結果は、従来UV-vis.スペクトルから考察していた**Ib**/DIm小胞体の軸配位構造変化が正しいことを示している。

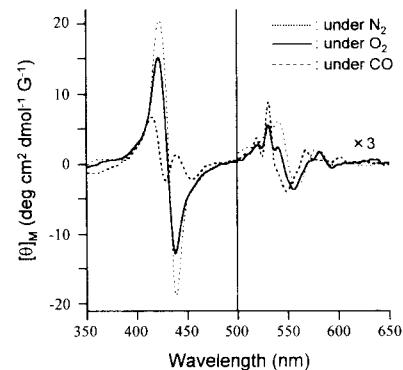


Fig. 6 MCD spectral changes of **Ib**/DIm vesicles in phosphate buffer solution (pH 7.3) at 25 °C.

ヘム錯体における配位酸素の伸縮振動(ν_{O_2})は、IRスペクトルにより直接観測することができるが、一般に水溶液の場合、水の吸収が大きいため、差スペクトル法を用いて定量する。**Ib**/DIm (¹⁶O₂) 錯体から**Ib**/DIm (CO) 錯体のIRスペクトルを差し引くと、1155cm⁻¹に配位酸素の伸縮振動($\nu^{16}O_2$)が観測された(Table 2)。この値がスーパーオキサイド(1145cm⁻¹)に近いこ

とから、類似のFeTPP誘導体と同様、リビドヘムの酸素配位構造はbent end-on型と考えられる²²⁾。さらに、**Ib**/DIm (¹⁸O₂) 錯体-**Ib**/DIm (CO) 錯体の差スペクトルにはν¹⁸O₂ (1081cm⁻¹) が出現し、ν¹⁶O₂-ν¹⁸O₂間 同位体シフト値 (74cm⁻¹) は、計算値 (74cm⁻¹) とよく一致した。これらの事実は、間違いなく分子状酸素がリビドヘム小胞体のヘム鉄に配位していることを示す結果である。また、配位-酸化炭素の伸縮振動 (ν_{CO}=1969cm⁻¹) も類似のFeTPP誘導体の値と一致した。自己組織化したリビドヘム小胞体の中でも、軸塩基であるDImの中心鉄への配位に歪みはないと考えられる。

Table 2 IR spectral data of **Ib**/DIm vesicle in phosphate buffer solution (pH 7.3) at 25 °C.

	O ₂		CO
	V ¹⁶ O ₂ - ¹⁸ O ₂ [cm ⁻¹]	V ¹⁸ O ₂ - ¹⁸ O ₂ [cm ⁻¹]	V ¹³ C-C ¹³ O [cm ⁻¹]
Ib /DIm vesicle	1155	1081	1969
FeTpivPP(MIm) ^{a)}	1159	1075	1969
O ₂ or CO (gas)	1556	-	2143
O ₂ ⁻	1145	-	-

^{a)}FeTpivPP(MIm): Picket-fence Fe(II)porphyrin(1-methylimidazole) complex (Nujol) (ref. 22).

4. 結 論

リン脂質置換基のシアシル鎖結合部位としてトリメチロールエタンを導入した新しいリビドヘムを合成し、それが水相系で自己集合して形成する二分子膜小胞体のナノ構造と酸素結合能を明らかにした。グリセロールをトリメチロールエタンに置換しても、小胞体形成能に変化はない。実際に、二つのパルミトイル鎖をトリメチロールエタンで連結したリン脂質も、DPPCと同様に水相系で自発的に会合して二分子膜小胞体を与えた。グリセロールより対称性の高いトリメチロールエタンを含む分子構造のほうが、二分子膜を形成した際の分子充填率は高い可能性もある。このリビドヘムに軸塩基配位子として1-ドデシルイミダゾールを添加して調製した粒径約100nmの一枚膜小胞体は、酸素の吹き込みに伴い、安定な酸素錯体を形成した。酸素親和性は30Torr (37°C) でヒト赤血球の値に近く、酸素錯体半減期は17hr (37°C) と実用に耐える安定度を持つ。この二分子膜小胞体は約23,000分子のリビドヘムから構成されているので、その全てに酸素分子が結合できることになる。酸素結合・解離度定数は、ヘモグロビンの値と同等で、これは酸素の吸脱着速度が赤血球に比べ1,500倍速いことを意味している。さらに、酸素の配位構造がヘモグロビンと同じbent end-on型であることを証明した。現在、高濃度リビドヘム小胞体水分散液の溶液物性、血液適合性、生体内酸素輸送能について検討を進めている。

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：人工赤血球開発分野）および日本学術振興会科学研究費補助金(13650938)により行われた。記して謝意を表する。

参考文献

- Collman JP, Gagne RR, Halbert TR, Marchon JC, Reed CA. Reversible oxygen adduct formation in ferrous complexes derived from a “picket fence” porphyrin. A model for oxymyoglobin. *J Am Chem Soc* 1973;95:7868-7870.
- Chang CK, Traylor TG. Solution behavior of a synthetic myoglobin active site. *J Am Chem Soc* 1973;95:5810-5811.
- Almog J, Baldwin JE, Huff J. Reversible Oxygenation and autoxidation of a “capped” porphyrin iron(II) complex. *J Am Chem Soc* 1975;97:227-228.
- Momenteau M, Reed CA. Synthetic heme dioxygen complexes. *Chem Rev* 1994;94:659-698.
- Collman JP, Fu L. Synthetic models for hemoglobin and myoglobin. *Acc Chem Res* 1999;32:455-463.
- Matsushita Y, Hasegawa E, Eshima K, Tsuchida E. Synthesis of amphilic porphinato iron complexes having phosphorylcholine groups. *Chem Lett* 1983;1983:1387-1390.
- Komatsu T, Nakao K, Nishide H, Tsuchida E. Octopusporphyrins. Their assembly and oxygen-binding in aqueous medium. *J Chem Soc Chem Commun* 1993;1993:728-730.
- Tsuchida E, Komatsu T, Toyano N, Kumamoto S, Nishide H. Lipid-porphyrin fibers: morphology and incorporation into phospholipid vesicle. *J Chem Soc Chem Commun* 1993;1993:1731-1733.
- Komatsu T, Yamada K, Tsuchida E, Sigel U, Böttcher C, Fuhrhop JH. Micellar fibers of octopus porphyrin. Photoinduced electron transfer reactions in aqueous media. *Langmuir* 1996;112:6242-6249.
- Komatsu T, Tsuchida E, Böttcher C, Donner D, Messerschmidt C, Sigel U, Stocker W, Rabe JP, Fuhrhop JH. Solid vesicle membrane made of meso-tetrakis[*b*ixinylamino]-o-phenyl]porphyrins. *J Am Chem Soc* 1997;119:11660-11665.
- Komatsu T, Yanagimoto T, Tsuchida E, Sigel U, Fuhrhop JH. Monolayer assemblies made of octopusporphyrins with pyridinium headgroups: Electron transfer reactions in non-covalent porphyrin-quinone platelets in aqueous media. *J Phys Chem B* 1998;102: 6759-6765.
- Tsuchida E, Komatsu T, Arai K, Yamada K, Nishide H, Fuhrhop JH. Self-assembled lipidporphyrin bilayer vesicles. Microstructure and dioxygen binding in aqueous medium. *Langmuir* 1995;11:1877-1884.
- Tsuchida E, Komatsu T, Arai K, Yamada K, Nishide H, Böttcher C, Fuhrhop JH. Monolayered octopus-porphyrin vesicle: Microstructure and oxygen-binding in aqueous medium. *J Chem Soc Chem Commun* 1995;1995:1063-1064.
- Komatsu T, Moritake M, Nakagawa A, Tsuchida E. Self-organized lipid-porphyrin bilayer membranes in vesicular form: Nanostructure, photophysical properties and dioxygen coordination. *Chem Eur J* 2002;8:5469-5480.
- Tsuchida E, Komatsu T, Arai K, Nishide H. Synthesis and

- dioxygen-binding properties of double-sided porphyrinatoiron(II) complexes bearing covalently bound axial imidazole. *J Chem Soc Dalton Trans* 1993;1993:2465-2469.
16. Severinghaus JW. Blood gas calculator. *J Appl Physiol* 1966; 21:1108-1116.
17. Sawicki CA, Gibson QH. Properties of the T state of human oxyhemoglobin studied by laser photolysis. *J Biol Chem* 1977;252:7538-7547.
18. Steinmeier RC, Parkhurst LJ. Kinetic studies on the five principal components of normal adult human hemoglobin. *Biochemistry* 1975;14:1564-1571.
19. Tsuchida E, Yuasa M, Nishide H. Rate parameters for oxygen and carbon monoxide binding to liposome-embedded heme under physiological conditions. *J Chem Soc Dalton Trans* 1985;1985:65-68.
20. Collman JP, Basolo F, Bunnenberg E, Collins TJ, Dawson JH, Ellis Jr PE, MMarrocco ML, Moscowitz A, Sessler JL, Szymanski T. Use of magnetic circular dichroism to determine axial ligatiiion for some sterically encumbered iron(II) porphyrin complexes. *J Am Chem Soc* 1981;103:5636-5648.
21. Collman JP, Bruman JI, Doxsee KM, Halbert TR, Bunnenberg E, Linder RE, LaMar GN, Gaudio JD, Lang G, Spartalian K. Synthesis and characterization of "tailed picket fence" porphyrins. *J Am Chem Soc* 1980;102:4182-4192.
22. Collman JP, Bruman JI, Halbert TR, Suslick KS. Nature of O₂ and CO binding to metalloporphyrins and heme proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:3333-3337.

海外文献紹介

Manual of Canine and Feline Infectious Diseases.
Dorset: British Small Animal Veterinary Association: 65-88, 2001

獣医学領域における貧血性感染症

Infections Associated with Anemia in Veterinary Medicine

Ian Ramsey, Danièle Gunn-Moore and Susan Shaw

並河和彦, 須永藤子, 菅野康則
Kazuhiko Namikawa, Fujiko Sunaga and Yasunori Kanno

Abstract

In Japan, veterinarians encounter many anemic infections in clinical medicine. The system supplying blood for transfusion is incompletely provided for use. Private veterinarians each keep a few species of animals as the donors for blood transfusion and give a blood transfusion after crossmatching in different cases and animals. However, blood transfusion can not be easily carried out in case of emergency because of blood group incompatibility, the short stocking period of whole blood, and many species of animals to be treated. The pathogens causing anemia in veterinary medicine include feline leukemia virus, feline infectious peritonitis virus, feline immunodeficiency virus, canine parvovirus, *Haemobartonella felis*, *Babesia gibsoni*, and canine hook worms. The infections with these pathogens occur and their frequency is fairly high in our country. If the donor animals for blood transfusion are subclinically infected with these pathogens, iatrogenic infections will occur in recipient animals by blood transfusion. Especially, in the case where abnormal autoantibodies are produced, the erythrocytes transmitted to recipients do not function, but also the recipients are danger of the infection with the pathogens transmitted from donors. This case must be immediately treated with the substitute for erythrocytes. The treatment also prevents the infection with pathogens transmitted from the subclinically infected donors. From the reasons above, it seems necessary to develop the better substitute for erythrocytes and to apply it to clinical veterinary medicine.

はじめに

獣医学臨床で遭遇する貧血性疾患は多い。しかし、現在、輸血用血液の供給システムは必ずしも完全ではなく、開業獣医師は個人で供血動物を飼育し、症例ごとに交叉適合試験などの検査を行った後、同種血輸血を行っている。しかし血液型不適合や血液の長期保存ができないなどの問題や、対処しなくてはならない動物種が犬猫はもとより、兎、フェレットなど多岐にわたることなどから、緊急時における対応はなかなか困難である。

これらの問題を解決するために、血液型はもとより、動物種をも考慮する必要が無く、長期保存が可能であり、しかも異常な自己抗体が産生される免疫介在性溶血性貧血等の赤血球輸血が困難な疾患に対しても応用可能な、赤血球代替物の開発が期待される。

そこで今回は、獣医学領域における貧血性感染症に対する赤血球代替物応用の可能性を論ずるにあたり、犬猫の疾患の中で貧血が問題となる感染症の概要を文献¹⁾から紹介する。

貧血性感染症

犬と猫で貧血を起こす病原体には、以下のものがある(表1)。

表1 貧血の原因となる主な感染性病原体と疾病

	猫	犬
ウイルス	猫白血病ウイルス 猫伝染性腹膜炎ウイルス 猫免疫不全症ウイルス	犬パルボウイルス
細菌及びリケッチア	<i>Haemobartonella felis</i>	<i>Ehrlichia</i> <i>Haemobartonella canis</i>
原虫	<i>Babesia</i> <i>Cytauxzoon felis</i>	<i>Babesia</i> <i>Hepatozoon canis</i>
蠕虫		犬鉤虫
非感染性疾患		腎臓病、出血、鉄欠乏症、慢性病

麻布大学獣医学部伝染病学研究室 〒229-8501 相模原市淵野辺1-17-71
Azabu University 1-17-71 Fuchinobe, Sagamihara City, 229-8501, Japan
論文受付 2002年7月12日 受理 2002年10月11日

Department of Infectious Diseases, School of Veterinary Medicine,

多くの感染症が慢性経過中に軽度の貧血を伴うので、基礎疾患を見つけるために検査を行う必要がある。その際に参考となる貧血に伴う臨床徴候は次の通りである。

- ・可視粘膜の蒼白
- ・嗜眠
- ・頻脈と頻呼吸
- ・血性雑音
- ・食欲不振
- ・異嗜

これらの徴候のいくつかは、猫ではあまり明瞭には認められない²⁾。慢性の貧血では、急性貧血よりも赤血球数が少ないにもかかわらず、臨床徴候は軽度であることがあるのに対し、急激に重度の貧血が起こると呼吸困難と顕著な嗜眠に陥る。

貧血症例で原因として感染症が疑われる場合には、特に次の点に注意を払うべきである。

- ・猫が白血病状態であったり、猫白血病ウイルスに感染した可能性がある病歴がある場合。例えば多頭飼育されている場合など。
- ・必ずしも最近でなくても海外旅行をした経験がある。*Ehrlichia*属は検疫期間を過ぎても体内に潜伏し、発病しないことがある。
- ・胸部や腹部に腫瘍がある。猫白血病はリンパ腫を示すことがある。
- ・斑状や点状の出血がある。出血は腹部表面や口内にしばしば見られる。*Ehrlichia*属は血小板減少症を引き起こすことがある。
- ・眼の検査で、網膜の出血やブドウ膜炎などが見つかる。猫伝染性腹膜炎では両側性に眼の病変が見られることがある。

ルーチンの血液検査は、全ての貧血症例で行う必要がある。治療を始める前に適切な検体を採取するが、重度の貧血を起こしている場合には、検査用の血液を採取した後は、診断の手順を進めてゆく前に、輸血をして状態を回復させる必要がある。網状赤血球数と住血原虫を検査するための新鮮血の塗抹標本検査は、ルーチンとするべきである。

猫では、猫白血病ウイルスについて抗原の検定ないしウイルスの分離をするべきであるが、猫免疫不全ウイルスと猫伝染性腹膜炎ウイルスの抗体検査は、どちらのウイルスも通常は重症な貧血を起こさないので、あまり重要ではない。

ルーチンの生化学検査の診断的価値は限られているが、早い時期に慢性腎不全の有無を知ることは重要である。尿検査は、*Haemobartonella felis*等の感染による溶血性貧血症例では、尿中の血色素を検出するための一助となる。詳細に貧血を調べるために、レントゲン検査、超音波検査、骨髄穿刺、Coombs'試験、凝固検査を行う。

1. 貧血を起こすウイルス類

猫白血病ウイルス

本ウイルスはレトロウイルス科に属し、全国的に発生が見ら

れる。ウイルスは感染後、全身のリンパ系および骨髄で増殖するので、貧血している猫はリンパ腫を示している猫と同様に、猫白血病ウイルスに罹っている可能性がある。現在のところ有効な抗ウイルス療法は実用化されていないので、貧血が発現した症例では輸血で症状を改善しながら、化学療法を行う³⁾。予防には組換え型および不活化ワクチンが用いられる。

猫伝染性腹膜炎ウイルス

猫伝染性腹膜炎ウイルスはコロナウイルス科に属する。本病は、ウイルスと産生された抗体が免疫複合体を形成し、小血管壁やその周囲に沈着して脈管炎や血栓形成を起こすことにより、腹水あるいは胸水の貯留を特徴とする滲出型と、各種臓器における多発性化膿性肉芽腫形成による腫瘍大やブドウ膜炎、あるいは中枢神経症状を特徴とする非滲出型の病型に分けられる。猫伝染性腹膜炎を発病した猫はこれらの臨床徴候が強く出るので、貧血は通常観察される中心的徴候ではないが、感染猫の約40%は貧血を示す⁴⁾ので、延命させるためには輸血で対処する必要がある。

猫免疫不全症ウイルス

猫免疫不全症ウイルスは、レトロウイルス科に属するウイルスで、通常、猫白血病ウイルスほど貧血を示す症例は多くなく、その程度も一般に軽度(PCV20%以上)である⁵⁾。ある研究によると、自然感染猫の18%が検査時に貧血を示した。

犬パルボウイルス

犬パルボウイルスは、血便を伴う消化器症状と白血球減少症を起こすため、胃腸からの出血と敗血症による激しい貧血を生じる。症状は急激に発現するが、輸血や輸液、抗生物質の早期投与により急速に回復する。予防には生ワクチンと不活化ワクチンが用いられる。

2. 貧血を起こす細菌およびリケッチャ類

Haemobartonella felis

*Haemobartonella felis*は、元来リケッチャに分類され、猫の赤血球に感染する病原体で、最近の研究ではマイコプラズマに非常に近い関係にあることが示されている。その生活環に関する記述は少ない。*H. felis*の伝播におけるノミなどのベクターの役割は実験的に証明されていないが、多くの研究者が、重要な役割を持っていると考えている。

貧血の原因としての*H. felis*の重要性はここ数年間論争されており、貧血を起こす主原因であるとする考え方と、免疫不全状態にある個体でのみ重大な問題を起こす日和見的病原体とする考え方がある。*H. felis*は、健康な猫でも見つかることがあり、感染率と貧血の程度の相関は乏しい。*H. felis*による直接的な溶血はおそらく例外的であり、免疫介在性すなわち自己產生した抗赤血球膜抗体による赤血球破壊が貧血を進行させる主な原因である。

猫白血病ウイルスは、*H. felis*感染による貧血を助長する因子

であることが示されている⁶⁾。猫免疫不全ウイルスの本症に対する役割は調べられていないが、このウイルスに自然感染している猫の10%が*H. felis*にも感染しているという報告がある⁵⁾。

診断：*H. felis*は、採血直後の血液の薄層塗抹標本で確認されるが、*H. felis*小体は、1時間ごとに末梢血中で増減を繰り返すので、数時間間隔をおいて繰り返し検査することが望ましい。染色法はGiemsa染色よりMay-Grunwald-Giemsa染色の方が優れているが、アクリジンオレンジ染色がもっと優れている。しかし、アクリジンオレンジ染色の場合、標本作成後数分以内に蛍光顕微鏡で観察しなければならない。

*H. felis*は、染色液の顆粒やHowell-Jolly小体と紛らわしいものがあるので、鏡検に習熟する必要がある。*H. felis*が検出された場合は陽性と診断できるが、陰性結果は単にその猫が検査時に*H. felis*が検出されなかつたということを示しているにすぎず、この病原体を見つけるためには、7日間連日検査をしなくてはならない。

最近、PCR法による*H. felis*感染の診断が、実験感染猫で行われているが⁷⁾、臨床状況でのこの方法の価値は確立されていない。

治療：*H. felis*感染症には、tetracyclineの投与に、同時に免疫抑制剤のprednisoloneを併用することがある。prednisoloneの効果は、赤血球の貪食作用を抑制することと、二次的な免疫介在性溶血性貧血を減らすことである。

輸血は、貧血による臨床徵候が生命を危かすようになった例において必要であり、猫が輸血を必要とするかどうかは、Ht値よりも臨床徵候の重症度や、貧血の進行の程度が重要な因子である。

Haemobartonella canis

*Haemobartonella canis*は時折報告されるが、*H. felis*との関連性はわかつていない。

感染はダニや輸血によって広まり、もし犬が免疫抑制状態であったり、摘脾されていたらしく、臨床徵候が表れることがあるが、そのような動物でも、臨床徵候は猫の*H. felis*症よりも軽い。

診断と治療は、*H. felis*と同様であるが、*H. canis*の病原体は連鎖を形成する傾向があり、同定はより容易である。

*Ehrlichia*属

犬の*Ehrlichia*症は、クリイロコイタマダニ (*Rhipicephalus sanguineus*)によって媒介されたりケッチアの*E. canis*が犬の単核球に感染し、白血球と血小板の減少および貧血を起こす感染症で、わが国でも報告例はあるが常在することはない。

3. 貧血を起こす原虫類

犬寄生の*Babesia*属原虫

犬の*Babesia*属原虫は赤血球内に寄生し、わが国ではフタトゲチマダニ (*Haemaphysalis longicornis*)により媒介される*Babesia gibsoni*によるものが関西以西に常在し⁸⁾、沖縄県では、クリイロコイタマダニにより媒介される*B. canis* var *vogeli*の存在が確

認されている⁹⁾。ヨーロッパではアミメカクマダニ (*Dermacentor reticulatus*)とクリイロコイタマダニにより媒介される*B. canis*によるものが多く、*B. gibsoni*によるものは少ない。

一般に*B. gibsoni*の病原性は強いが、*B. canis*の病原性は株によって異なり、*B. canis* var *canis*は中程度の病原性を示し、*B. canis* var *vogeli*は比較的軽度である。*B. canis* var *rossi*は病原性が強くアフリカ南部で認められている。症状は甚急性、急性、慢性および不顯性感染であり、潜伏期間は通常10-21日で、不顯性感染犬が漸続的に発病を繰り返す。

臨床徵候：症状の強さは、犬の年齢、免疫状態に左右される。急性溶血性貧血やショックに付随して発熱、食欲不振、嗜眠状態が起り、またしばしば可視粘膜の蒼白、様々な程度の黄疸、衰弱、呼吸促進が、血色素尿症、脾腫、肝腫と組み合わせて起こる。感受性の高い動物では、虚脱、昏睡し死亡する。

貧血の原因として、赤血球の膜抗原を標的とした抗赤血球膜抗体が産生されることが知られており¹⁰⁾、多くの犬でCoombs'試験が陽性になる。

病気の常在地から帰ってきた犬では、自己免疫性溶血性貧血と*Babesia*症との類症鑑別を行うべきである。*Ehrlichia*症の病原体と*B. canis*はベクターが同じであるため、ヨーロッパでは両者の併発が一般的に見られる。

診断：診断は、臨床像や旅行歴を加味しながら、血液塗抹Giemsa染色標本を作成し住血原虫を証明する。

他にELISAや蛍光抗体法などのいくつかの血清学的反応が用いられるが、これらの方では不顯性感染犬や慢性感染犬は診断できるものの、急性あるいは甚急性例では陽性を示さない。PCR法では、*Babesia*の種類や株の鑑別が可能である。

治療と予防：現在行われている治療プログラムでは、病原性の強い株による*Babesia*症を完治させることはほとんどない。ストレスやグルコルチコイドの投与、他の病気の併発により不顯性感染状態から再発が起こる。

急性の溶血性貧血を起こしている症例に対しては、酸素吸入、輸液、輸血が必要と思われるが、抗赤血球膜抗体を産生した症例では、赤血球輸血による効果は見られない。

Imidocarb dipropionateやtrypan blueは*B. canis*による症例には効果的な薬剤であるが、*B. gibsoni*にはあまり効果が見られない。現在*B. gibsoni*に確実に効果を示す薬剤は見つかっていないが、metronidazoleはやや効果があり、clindamycinの投与も推奨されている¹⁰⁾。

ワクチン接種は、近年フランスで利用されているが、病原体の株が変わることにより効力が限られる。

有効な抗ダニ剤を併用することは本症の予防のために必要である。*Babesia*症の伝播を予防するためには吸血後の2-3日以内にダニを殺滅しなくてはならない。

猫寄生の*Babesia*属原虫

アフリカとアジアでは数種の*Babesia*がまれに猫に感染することが知られている。わが国での猫の本症の発生は知られていない。

猫の症状は犬と同様であるが、より軽度で、溶血はまれにし

か見られない。猫は貧血に順応するが、ストレスにより衰弱し、虚脱を起こすこともある。

Cytauxzoon felis

*Cytauxzoon felis*は、猫の赤血球に感染する原虫で、わが国では発生を見ないが、アフリカとアメリカ合衆国の特定地域で見られる。おそらくダニの寄生により原虫が感染する。本来の宿主はボブキャットであり、家猫ではないであろう。

感染後の経過は原虫の株により色々で、致死的な病気を起こす株もあるが、軽症あるいは無症候性の株もある。感染動物は、発熱、貧血、黄疸などの症状を示す。病気の後期にリング状の原虫が感染赤血球に見られる。

Hepatozoon canis

*Hepatozoon canis*は、ベクターであるクリイロコイタマダニを犬が経口的に摂取することにより感染し、わが国でも存在が知られている。犬の好中球と単球の細胞質に寄生する原虫で、症状として貧血が見られることがある¹²⁾。

4. 貧血を起こす蠕虫類

犬鉤虫

鉤虫(*Ancylostoma caninum*)は、わが国に常在する蠕虫(線虫)である。感染犬の糞便中に排泄された卵から孵化した感染幼虫が、経口、経皮、胎盤・経乳的に感染する。成虫は犬の小腸壁に鋭い鉤で咬着して、吸血するため、出血性の下痢が起こり、失血のために貧血が起こる。

子犬や幼犬では、経過は甚急性ないし急性で粘血便や出血性の下痢を起こし、死亡することがある。成犬では症状は軽いことが多いが、慢性的に貧血が続く。

診断は糞便中の虫卵を検出することで容易にでき、有効な治療薬もいくつか知られている。子犬や幼犬では経過が早いため、早急に輸血をする必要がある。

まとめ

獣医学領域において貧血を起こす感染症はいくつもあるが、猫白血病ウイルス、猫伝染性腹膜炎ウイルス、猫免疫不全ウイルス、犬パルボウイルス、*Haemobartonella felis*, *Babesia gibsoni*, 犬鉤虫による感染症は、現在わが国に常在しており発生率も高い。

これらの感染症は臨床症状を示さない不顯性感染があるため、供血動物が潜在的に感染していた場合、医原性感染が起こりうる。特に、異常な自己抗体を產生した症例では、赤血球輸血の効果が見られないばかりか、輸血により病原体に感染の場を与えてしまう恐れがある。この様な症例に対しては化学療法を始めとする他の治療が効果を示すまで、赤血球代替物で早急に対

処しなければならない。それは同時に、不顯性感染した供血動物からの感染を予防することになる。

このような理由で、今後これらの貧血を示す感染症に対処するため、よりよい赤血球代替物を開発し、臨床応用してゆく必要があると考える。

参考文献

1. Ramsey I, Gunn-Moore D, Shaw S. The haemopoietic and lymphoreticular systems. In: Ramsey I, Tennant B eds. Manual of Canine and Feline Infectious Diseases. Dorset: British Small Animal Veterinary Association, 2001;65-88.
2. Ramsey IK, Gould S. Feline anaemia. In Practice 1999;415: 507-517.
3. Cotter SM. Anemia associated with feline leukemia virus infection. J Am Vet Med Assoc 1979;175:1191-1194.
4. Sparkes AK, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Feline infectious peritonitis: a review of clinicopathological changes in 65 cases and a critical assessment of their diagnostic value. Vet Rec 1991;129:209-212.
5. Sparkes AK, Hopper CD, Millard WG, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Feline immunodeficiency virus: clinicopathologic findings in 90 naturally occurring cases. J Vet Int Med 1993;7:85-90.
6. Bobade PA, Nash AS, Rogerson P. Feline haemobartonellosis: clinical, haematological and pathological studies in natural infections and the relationship to infection with feline leukaemia virus. Vet Rec 1995;122:32-36.
7. Berent LM, Messick JB, Cooper SK. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections using a polymerase chain reaction assay. Am J Vet Res 1998;59:1215-1220.
8. 並河和彦, 須永藤子, 喬野康則. *Babesia gibsoni*病の診断と治療—ミニレビュー—. 動物の原虫病;2002;17:1-14.
9. 石橋徹, 須永藤子, 並河和彦, 岸川正剛, 喬野康則. 沖縄本島の犬からの*Babesia canis*の分離. 日獣会誌 1994;47:202-204.
10. Adachi K, Yoshimoto A, Hasegawa T, Shimizu T, Goto Y, Makimura S. Anti-erythrocyte membrane antibodies detected in sera of dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. J Vet Med Sci 1992;54:1081-1084.
11. Taboada J. Babesiosis. In: Greene CE, ed. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1998; 473-481.
12. Craig TM. Hepatozoonosis. In: Greene CE, ed. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: W.B.Saunders Co., 1998;458-465.

●事務局たより

日本血液代替物学会 総会

1. 日 時：

平成14年9月4日(水) 13:30~13:45

2. 場 所：

熊本市国際交流会館 7階ホール
〒860-0806 熊本県熊本市花畠町4番8号
Tel: 096-359-2020

3. 議 題：

報告事項 ①年次大会の開催状況
②会員動向

審議事項 ①平成13年度事業報告
②平成13年度収支決算
③平成14年度事業計画及び収支予算案

以下審議内容を略記します。

報告事項

①年次大会の開催状況として下記事項が報告された。

- 1) 第9回日本血液代替物学会年次大会（会長西勝英 熊本大学医学部教授）
- 2) 平成14年9月4日(水)～5日(木)
- 3) 熊本県熊本市花畠町4番8号 熊本市国際交流会館
- 4) 日本血液代替物学会会員、
臨床医学・理工学研究者、
国内の大学および医療機関臨床医、
血液センター関係者
約300名

②会員状況は以下のとおり。

- 1) 維持会員：5社
- 2) 賛助会員：5社
- 3) 正会員：148名
- 4) 購読会員：25箇所

審議事項

①平成13年度事業報告(平成13年4月1日～平成14年3月31日)
が行われ各々承認された。

- 1) 定期総会の開催 平成13年9月4日(火)
シェーンバッハ・サボー(東京)にて開催された。
- 2) 第8回年次大会(大会長 清水 勝)
平成13年9月4日(火)～5日(水)
シェーンバッハ・サボーで行われた。
- 3) 会誌「人工血液」の発行
第9巻2号、3号、4号、第10巻1号を発行。

②平成13年度収支決算が行われ承認された。

平成13年度 会計報告収支決算表
(自 平成13年4月1日 至 平成14年3月31日)

収 入		支 出	
摘要	金額	摘要	金額
前期繰越金	5,665,795	会誌出版費	1,758,523
正会員会費	640,000	集会・委員会費	1,863,297
賛助会員会費	1,400,000	年会補助金	1,000,000
維持会員会費	10,000,000	事務人件費	1,785,660
講読会員会費	102,000	事務費	612,650
広告代・雑収入	320,000	基金に繰入	4,000,000
寄付	500,000	次期繰越金	7,617,177
利息	9,512		
計	18,637,307	計	18,637,307

③平成14年度事業計画

- 1) 定期総会の開催
平成14年9月4日(水) 13:30～13:45
熊本市国際交流会館 7階ホール
- 2) 第9回年次大会の開催(大会長 西 勝英)
平成14年9月4日(水)、5日(木)
於 熊本市国際交流会館
- 3) 「人工血液の発行」の発行
第10巻2号(7月)、3号(8月)、4号(12月)、
第11巻1号(平成15年2月)の発行予定。
- 3) 平成14年度収支予算案は承認された。
- 4) 第10回年次大会の開催(会長 小林紘一)
第9回血液代替物国際会議(IX International Symposium on Blood Substitutes)と合同開催することが承認された。
平成15年3月2日(火)～5日(水)於 京王プラザホテル

●事務局たより

日本血液代替物学会 役員名簿 (平成14年度)

顧問	尾形利郎 高久史麿 堀原一 遠山博 桜井靖久	東海大学医学部 教授 自治医科大学 学長 筑波大学 名誉教授 埼玉医科大学総合医療センター 名譽所長 東京女子医科大学 名誉教授	土田英俊 友田燐夫 西勝英 西出宏之 宮尾秀樹(会計) 湯浅晋治	早稲田大学理工学部 名誉教授 東京医科大学 教授 熊本大学医学部 教授 早稲田大学理工学部 教授 埼玉医科大学総合医療センター 教授 埼玉県赤十字血液センター 所長
会長	小林紘一	慶應義塾大学医学部 教授	清水勝	杏林大学医学部客員 教授
副会長	池田康夫	慶應義塾大学医学部 教授	阿岸鉄三	板橋中央総合病院血液浄化療法センター プラッドアクセス治療センター 所長
理事	池田久實 池淵研二(庶務) 川村明夫 北畠顕 武岡真司	北海道赤十字血液センター 所長 東京医科大学 助教授 札幌北楡病院 理事長 北海道大学医学部 教授 早稲田大学理工学部 助教授	(事務局長) 堀之内宏久 (会誌担当) 武岡真司	慶應義塾大学医学部 講師 早稲田大学理工学部 助教授

日本血液代替物学会 評議員名簿 (平成14年度)

青木 克憲	浜松医科大学医学部 教授	平 明	鹿児島大学医学部 名誉教授
阿岸 鉄三	板橋中央総合病院 血液浄化療法センター プラッドアクセス治療センター 所長	高折 益彦	東宝塚さとう病院 名誉院長
浅野 茂隆	東京大学医科学研究所 教授	高久 史麿	自治医科大学 学長
阿部壹代司	筑波大学医療技術短期大学部 教授	高橋 晃	テルモ(株) 専務取締役
飯塚哲太郎	法政大学工学部 教授	高橋 英嗣	山形大学医学部 助教授
池田 久實	北海道赤十字血液センター 所長	高橋 恒夫	東京大学医科学研究所 教授
池田 康夫	慶應義塾大学医学部 教授	武岡 真司	早稲田大学理工学部 助教授
池淵 研二	東京医科大学 助教授	上田 英俊	早稲田大学理工学部 名誉教授
伊藤 俊之	京都府立医科大学 助教授	土屋 喜一	早稲田大学理工学部 名誉教授
岩田 博夫	京都大学再生医科学研究所 教授	遠山 博	埼玉医科大学総合医療センター 名譽所長
大島 宣雄	筑波大学基礎医学系 教授	友田 燐夫	東京医科大学 教授
大塚 節子	岐阜大学医学部 講師	豊田 忠之	東部地域病院 元院長
大柳 治正	近畿大学医学部 教授	仲井 邦彦	東北大学医学部 助教授
尾形 利郎	東海大学医学部 教授	中井 一士	麻薬覚醒剤乱用防止センター 専務理事
岡野 光夫	東京女子医科大学医用工学研究施設長	長澤 俊郎	筑波大学臨床医学系 教授
片岡 一則	東京大学工学部 教授	西 勝英	熊本大学医学部 教授
鍵谷 昌男	三菱ケルファーマ(株) 生産本部長	西出 宏之	早稲田大学理工学部 教授
川村 明夫	札幌北楡病院 理事長	西谷 孝子	慶應義塾大学医学部 特別研究教員助教授
北畠 顕	北海道大学大学院医学研究科 教授	ジムス・R・ハーレイ	バクスター(株) 代表取締役社長
黒澤 良和	藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授	半田 誠	慶應義塾大学医学部 講師
小林 紘一	慶應義塾大学医学部 教授	平澤 博之	千葉大学医学部 教授
小室 勝利	国立予防衛生研究所 教授	福島 昭二	神戸学院大学薬学部製剤学
斎藤 英彦	名古屋大学医学部 教授	藤井 寿一	東京女子医科大学 教授
酒井 清孝	早稲田大学理工学部 教授	藤島清太郎	慶應義塾大学医学部 講師
佐久間一郎	北海道大学大学院医学研究科 講師	船津 昭信	(財)化学及血清療法研究所 常務理事
桜井 靖久	東京女子医科大学 名誉教授	堀 進悟	慶應義塾大学医学部 助教授
佐藤 誠	ニプロ(株) 医薬品研究所長	堀 原一	筑波大学 名誉教授
鮫島 達也	青山学院大学理工学部 名誉教授	宮尾 秀樹	埼玉医科大学総合医療センター 教授
清水 勝	杏林大学医学部 客員教授	宮崎 保	札幌通信病院 名譽院長
清水 慶彦	京都大学再生医科学研究所 教授	村田 満	慶應義塾大学医学部 講師
十字 猛夫	日本赤十字社中央血液センター 所長	湯浅 晋治	埼玉県赤十字血液センター 所長
末松 誠	慶應義塾大学医学部 教授		

(ア順敬称略)

日本血液代替物学会 会則

第1章 総 則

第1条：(名称) 本会は日本血液代替物学会 (The Society of Blood Substitutes, Japan) と称する。

第2条：(事務局) 本会の事務局は当分の間、会長の所属機関内に置く。

2. 事務局には事務局長を置き、会長の統括のもと本会の事業および会計に関する一般事務を司る。

第3条：(目的) 本会は、血液代替物およびその関連分野の研究の進歩ならびに普及を計り、会員の研究発表、知識の交換、連絡提携の場となり、血液代替物の評価や今後の指針を提言する活動を通して、学際、国際間に広く貢献することを目的とする。

第4条：(事業) 本会は前条の目的達成のため、次の事業を行う。

- 1) 総会、年次大会(一般演題も含める)、研究講演会、シンポジウムなど。
- 2) 会誌“人工血液”的刊行。
- 3) その他本会の目的に沿った事業。

第2章 会 員

第5条：(種別) 本会会員は次の分類とする。

- 1) 正会員 本会の目的に賛同する個人で所定の手続きを行い、会費を納入した者とする。
- 2) 賛助会員 本会の目的を賛助する団体または個人とする。
- 3) 維持会員 本会の目的を賛助する団体または個人であり、本会の維持に格段の協力をする会員をいう。

第6条：(会費) 会員は、つぎの種別に従って会費を納めなければならない。

- 1) 正会員 年額 1万円
 - 2) 賛助会員 年額 1口以上 (1口20万円)
 - 3) 維持会員 年額 10口以上 (1口20万円)
2. 既納の会費はいかなる理由があっても、これを返還しない。

第7条：(入会) 本会に入会希望者は、正会員1名の紹介により、所定の入会申込書に入会金5千円と一年分の会費を添え事務局宛に提出し、理事会の承認を経なければならぬ。

第8条：(退会) 退会しようとする会員は、理由とその旨を届け出て、理事会の承認を経なければならぬ。

第9条：(除名) 本会の目的に反する行為あるいは本会の名前を損なう行為のあった会員は、評議員会の議決によってこれを除名することができる。

第3章 役員、顧問、評議員および職員

第10条：(設置および定数) 本会に次の役員を置く。

- 1) 会長 1名
- 2) 副会長 1名以上5名以内
- 3) 理事 7名以上15名以内(会長、副会長を含む)
- 4) 監事 2名
- 5) 顧問 若干名

第11条：(役員の選任) 役員は、別に定めるところにより、正会員の内から評議員会で選出し、監事は正会員の中から総会で選出する。

2. 顧問は、会長が委嘱し、その任期は役員の任期に準ずる。

第12条：(任期) 役員および監事の任期は2年とし、再任を妨げない。

第13条：(会長) 会長は、各事業を司り本会を代表統括する。

第14条：(副会長) 会長を補佐し会長に事故があるときはその代理となる。

第15条：(理事) 理事は理事会を組織して、この会則に定められた事項のほか、評議員会および総会の権限に属する事項以外の事項を評議し、施行する。

第16条：(監事) 監事は、資産の状況および理事の会務執行状況を監査する。

第17条：(顧問) 顧問は、理事会および評議員会に出席して、意見を述べることができる。

第18条：(評議員) 評議員は正会員の中から総会で選出し、任期は2年とする。ただし再任を妨げない。

2. 評議員は、評議員会を組織し、この会則に定められた事項を決議するほか、会長を補佐して本会の運営を助ける。

第19条：(事務局および職員) 本会の事務を処理するため、事務局および職員を置く。

2. 職員人事は会長が任命権者となり、有給とする。

第4章 年次大会長

第20条：（大会長と職務）本会に年次大会を主宰する大会長1名をおく、また、大会長を補佐し、大会長に事故があったとき、または欠けたときには、その職務を代行する副大会長1名をおくことができる。

第21条：（選任）大会長および副大会長は、評議員の中から、理事会の議決によって選任される。

2. 理事会の議決によって、副大会長を次年度の大会長とすることができます。

第22条：（任期）大会長および副大会長の任期は、選任された日に始まり、学会年次大会が終了した日に終わる。

第5章 会議

第23条：（会議）本会の会議は、つきの3種とする。

- 1) 理事会
- 2) 総会
- 3) 評議員会

第24条：（理事会）理事会は、理事をもって構成する。

2. 理事会は年4回以上会長が召集する。ただし、会長が必要と認めたとき、または、理事の3分の1が会議の目的および事項を示して請求したときは、臨時理事会を召集することができる。
3. 理事会の議長は会長とする。
4. 理事会は、理事会構成現在数の3分の2以上が出席しなければ、議事を開き、議決することができない。ただし、当該議事について文書によってあらかじめ意志を表示した者は、これを出席者とみなす。
5. 監事は、理事会に出席して、本会の運営について意見を述べることができる。

第25条：（総会）総会は、通常総会、臨時総会の2種とし、会長が召集する。

2. 総会は、正会員をもって構成する。
3. 通常総会は、年一回開く。
4. 臨時総会は、次の場合に召集する。
 - 1) 理事会で必要と認めた場合
 - 2) 監事、または会員50名以上から会議の目的を示して請求があった場合

第26条：（総会議長）通常総会の議長は会長とし、臨時総会の議長は、会議の都度会員の互選で定める。

第27条：（総会の通知）総会の召集は、その開会期日1週間前までに、総会に付すべき事項、日時および場所を記録した書面または会誌で、会員に通知しなければならない。

2. 出席会員の3分の2以上の同意があったときは、あら

かじめ通知しなかった事項について審議し、議決することができる。

第28条：（審議事項）次の事項は、通常総会の承認を求めなければならない。

- 1) 事業報告および会員の異動状況書
- 2) 収支決算、財産目録、貸借対照表
- 3) 事業計画および収支予算
- 4) 前記各項のほか、理事会で必要と認めた事項

第29条：（総会の定足数）総会は、正会員現在数の5分の1以上出席しなければ、議事を開き、議決することができない。ただし、当該議事について、あらかじめ書面をもって意志を表示したものは出席者と見なす。

2. 総会に出席できない正会員は、出席正会員を代理人として、その権限を委任することができる。
3. 総会の議決は、出席会員の過半数をもって決し、可否同数のときは議長の決するところによる。

第30条：（総会議事録の通知）総会の議事の要領および議決した事項は、正会員に通知する。

第31条：（評議員会）評議員会は、評議員で組織し、必要がある場合に会長が召集する。

2. 会長は評議員会の議長となる。

第32条：（審議事項）評議員会は、この会則に定めるものほか、理事会で必要と認めた事項を審議する。

第33条：（評議員会の定足数）評議員会は、評議員現在数の2分の1以上の出席がなければ、議事を開き、議決することができない。ただし、当該議事について、あらかじめ書面をもって意志を表示したものは出席者と見なす。

2. 評議員会の議事は、出席評議員の過半数をもって決し、可否同数のときは、議長の決するところによる。評議員会に出席できない評議員は、出席評議員を代理人として、その権限を委任することができる。
3. 会長は、書面で評議員の意見を求めて、評議員会の召集および前項の議決にかえることができる。

第34条：（議事録の保存）全ての会議には議事録を作成し、議長および出席者代表者2名以上が署名押印のうえ、これを保存する。

第6章 資産及び会計

第35条：（資産）本会の資産は次の通りとする。

- 1) 会費
- 2) 寄付金
- 3) 事業にともなう収入

4) 資産から生じる果実

5) その他の収入

第36条：（資産の管理）本会の資産は、会長が管理し、現金は理事会の議決によって、確実な有価証券を購入するか、または定額郵便貯金とするか、もしくは確実な信託銀行に信託するか、あるいは定額預金として会長が保管する。

第37条：（寄付の受領）寄付金品は、理事会の議決を経てこれを受領する。

第38条：（経費）本会の経費は、会費、刊行物に対する購読料、寄付金、資産から生じる果実などの運用資産をもって支弁する。

第39条：（事業計画および収支予算）本会の事業計画およびこれにともなう収支予算は、毎年会計年度開始前に会長が編成し、理事会、評議員会の議決を経て、総会の承認を受けなければならない。

第40条：（収支決算）会計報告は会長が毎年一回、会計報告書を作成し、監事の監査を経て、評議員会および総会の承認を得る。

第41条：（会計年度）本会の会計年度は4月1日より翌年3月31日までとする。

第7章 会則の変更ならびに解散

第42条：（会則の変更）本会の会則の変更には理事会の発議と総会の議決を要する。

第43条：（解散）本会の解散は、理事会、評議員会および総会の各々において出席会員の4分の3以上の同意を得なければならない。

第44条：本会の解散にともなう残余財産は、理事会、評議員会および総会の各々において出席会員の4分の3以上の議決を経て、本会の目的と同種または類似の公益事業に寄付するものとする。

第8章 補 則

第45条：この会則を施行するために必要とされる細則は、理事会および評議員会の議決を経て、別に定める。

付 則 この会則は、平成5年7月21日設立総会において議決され、当日から施行する。

贊助会員および維持会員細則

1997年9月7日 評議員会 承認
1997年9月7日 総会 承認

第1条：本会の贊助会員および維持会員については、会則第5条に定めるものほか、この細則の定めるところによる。

第2条：贊助会員および維持会員は、会誌“人工血液”の配布を受けることができる。会誌の配布数は、次の通り会員数に応ずるものとする。

1. 贊助会員 1～4人 2部
2. 贊助会員 5～9人 3部
3. 維持会員 10人以上 5部

第3条：贊助会員および維持会員は、会員名簿の配布を受けることができる。

第4条：贊助会員および維持会員は、学会の出版物および資料を、正会員と同じ条件で配布を受けることができる。

第5条：贊助会員および維持会員は、総会、年次大会のほか、本会が主催する研究講演会、シンポジウムなどの行事に参加することができる。

第6条：贊助会員および維持会員は、年次大会のほか、本会が主催する研究講演会、シンポジウムなどの行事に、次の人員を個人正会員と同様に出席させることができる。

1. 贊助会員 1～4人 2名
2. 贊助会員 5～9人 3名
3. 維持会員 10人以上 5名

第7条：維持会員および贊助会員の代表者は、個人正会員と同様に、評議員の候補になることができる。

維持会員に関する覚書

1. 理事会は、維持会員の代表者を評議員候補として推薦し、総会に承認を求めることができる。

2. 維持会員は、必要に応じて理事会に出席して、意見を述べることができる。

(以 上)

関連学会の開催のお知らせ

慶應義塾大学医学振興基金 第13回医学・生命科学国際シンポジウム

Research and Development of Artificial Oxygen Carrier
— Its Frontline —

平成15年2月28日(金)・3月1日(土)

於 慶應義塾大学 信濃町キャンパス

〒160-8582 新宿区信濃町35

TEL: 03-3353-1211

国外より22人の研究者を招請し、人工酸素運搬体の開発研究について、現在までの足跡から最新の研究成果までを網羅する国際シンポジウムを開催します。

参加を御希望の方は、下記事務局まで御連絡ください。

シンポジウムのホームページを下記URLにて開設しております。是非御覧ください。

<http://www.ms-fund.keio.ac.jp/oxygen.htm>

事務局

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL: 03-5363-3806

FAX: 03-5363-3499

E-mail: horinouc@sc.itc.keio.ac.jp

厚労科学研究(医薬安全総合研究事業)

平成14年度 研究成果発表会

参加費：無料

(一般者向け用)
の公開ですので、どなたでも
参加できます。

輸血の現状と人工血液に対する期待

厚生労働省 医薬局 血液対策課長 橋爪一貴

治療現場からの人工血液の適用

-内科から-

北海道大学 医学部 教授 北畠頭

治療現場からの人工血液の適用

-外科から-

慶應義塾大学 医学部 教授 小林 純一

人工赤血球の開発はどこまで来ているのか？

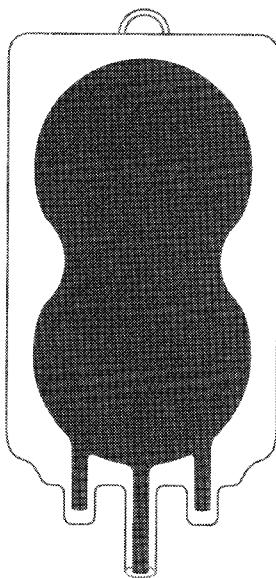
早稲田大学 理工総研 名誉教授 土田英俊

止血のしくみ

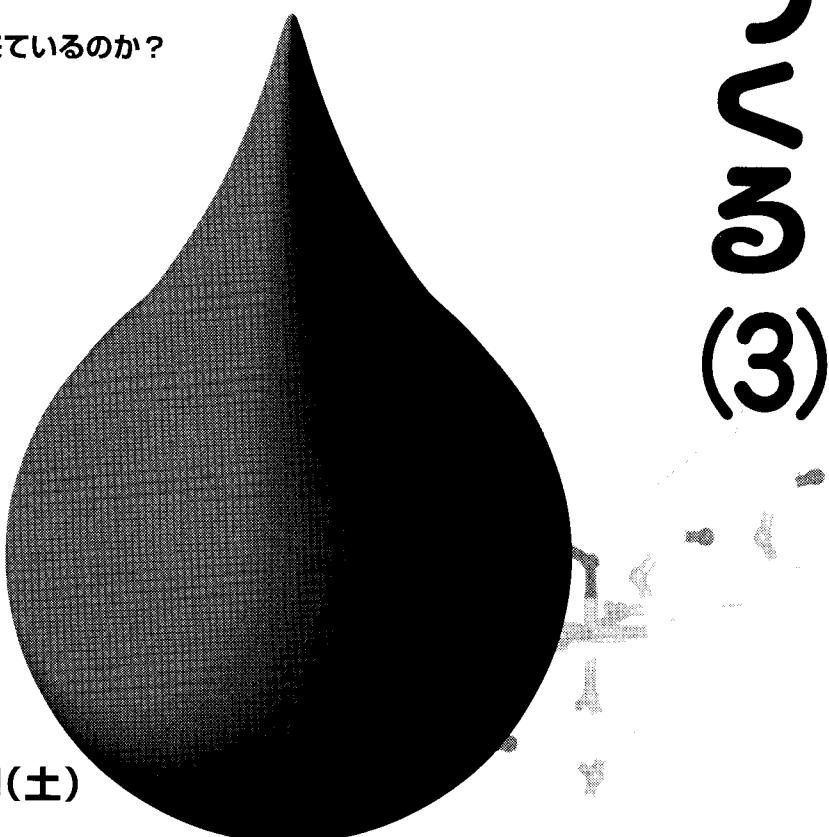
慶應義塾大学 輸血センター 助教授 半田誠

人工血小板はどのようにして作るのか？

慶應義塾大学 医学部 教授 池田康夫

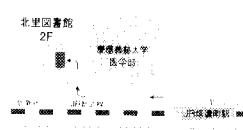


人工血液をつくる(3)



平成15年3月22日(土)
時間：13:00～16:00

慶應義塾大学 医学部 北里講堂
JR総武線信濃町駅下車徒歩3分
〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 電話：03-5363-3784



共 催：(医薬安全総合研究事業)主任 研究者 池田康夫／北畠頭／土田英俊

財団法人 日本公定書協会

後 援：日本血液代替物学会

連絡先：早稲田大学 理工総研 558-7011 担当：武岡真司 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1

電話：03-5286-3120, 03-5286-3217 FAX：03-3295-4740

e-mail: takeoka@waseda.jp home page: http://okipura.com/art-bl

●編集後記●

本号では、今年9月に行われた第9回日本血液代替物学会年次大会の発表原稿が多く集まり安堵した。まず、大会長の西先生（熊本大学医学部 教授）より本年次大会の総括がなされ、高折先生（東宝塚さとう病院 名誉院長）より人工血液の治験計画が披露された。これに関しては多くの読者の関心を集めるものと思われ、反響を期待したい。更には、血液代替物には不可欠な微小循環とレオロジー特性の基礎を前田先生（愛媛大学医学部 教授）にご解説頂いた。また、今大会から人工抗体のシンポジウムが設置され、早速その投稿が東海大学医学部の伊原先生から寄せられた。更には、全合成系酸素運搬体としてリビドヘム小胞体の原著論文、獣医学領域における赤血球代替物の期待と、今後の新しい展開の一端が感じられた。

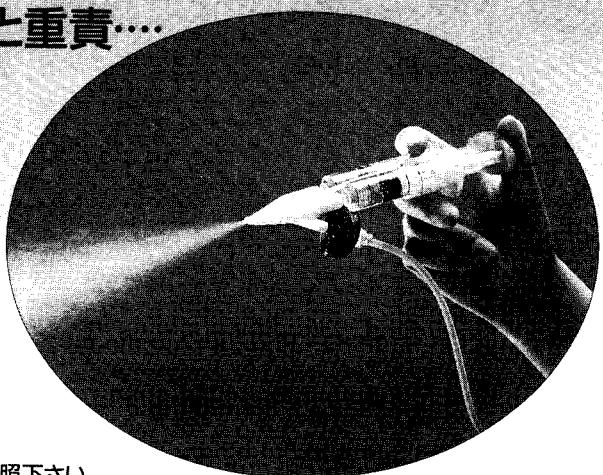
次号は、第10回日本血液代替物学会年次大会のプログラム、予稿集となる。第10回年次大会は、小林本会会長（慶應義塾大学医学部 教授）により IX International Symposium on Blood Substitutes (9-ISBS)と兼ねて、明年3月2日～5日に京王プラザホテルにて開催される。それに先立ち、2月28日と3月1日に人工酸素運搬体に焦点を絞った第13回医学・生命科学国際シンポジウムが慶應義塾大学 信濃町キャンパスで開催され、3月22日には一般向け研究発表会「人工血液をつくる(3)」が同キャンパスで開催される予定となっており、関連行事が目白押してある。会員の皆様の振るってのご参加ならびにご投稿を期待しております。

(武岡真司)

Bolster & Heal

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 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
 熊本市大窪1-6-1 〒860-8568

資料請求先：帝人株医薬事業本部第2学術部
 化学及血清療法研究所営業部

☎011-79810 作成年月 1998年10月

B52

にっぽんの血液製剤です。

献血であることの誇りと重責…



禁忌（次の患者には投与しないこと）

本剤の成分に対しショックの既往歴のある患者

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

本剤の成分に対し過敏症の既往歴のある患者

冷蔵保存から室温保存になりました。

指定医薬品

血漿分画製剤

献血由来 静注用人免疫グロブリン製剤

献血ベニロン-I®

（乾燥スルホ化人免疫グロブリン）

生物学的製剤基準

Kenketsu Venilon-I

本剤は、献血による貴重な血液を原料として製剤化されたものです。問診、感染症関連の検査等の安全対策を講じていますが、血液を原料としていることに由来する感染症の伝播等の危険性を完全に排除することはできないことから、疾病の治療上の必要性を十分に検討の上、必要最小限の使用にとどめるようお願いします。「使用上の注意」の項参照。●ご使用に際しましては、製品添付文書をご参照下さい。

販売元・販売

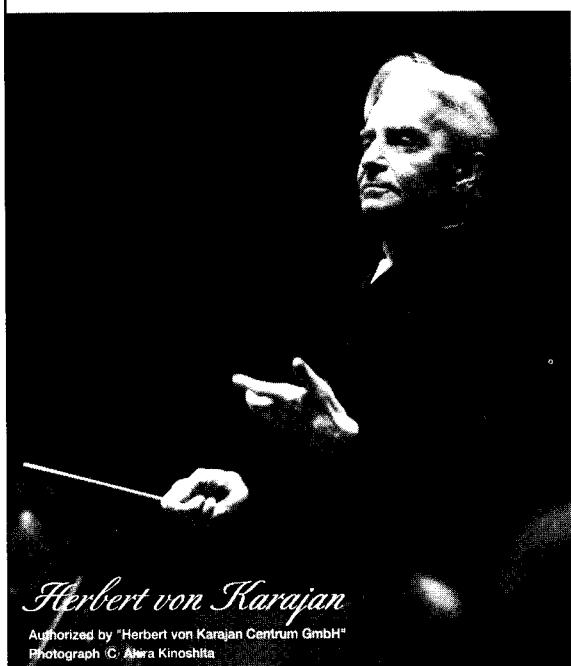
製造元・販売

資料請求先：帝人(株)医薬医療事業本部学術情報部
 (財)化学及血清療法研究所営業管理部

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
 資料請求先：帝人株医薬医療事業本部学術情報部

化血研 化学及血清療法研究所
 熊本市大窪1-6-1 〒860-8568
 資料請求先：(財)化学及血清療法研究所営業管理部

☎011-79810 作成年月 1998年10月



Herbert von Karajan

Authorized by "Herbert von Karajan Centrum GmbH"

Photograph © Alera Kinoshita



Roche ロシュ グループ

5-HT₃受容体拮抗型制吐剤

劇薬、指定医薬品、要指示医薬品

薬価基準収載

カトトリル® KYTRIL®

塩酸グラニセトロン製剤

注意 医師等の処方せん・指示により使用すること

※効能・効果、用法・用量、禁忌を含む使用上の注意、
用法・用量に関する使用上の注意等については
製品添付文書をご参照ください。

〔資料請求先〕

輸入製造発売元 中外製薬株式会社

〒104-8301 東京都中央区京橋2-1-9

TEL 0120-189706

2002年10月作成

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-ニチヤク[®]

〈乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン〉



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

製造(資料請求先)



日本製薬株式会社

〒101-0031 東京都千代田区東神田一丁目9番8号

販売



武田薬品工業株式会社

〒540-8645 大阪市中央区道修町四丁目1番1号

TEL 06-6311-5555

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、井上圭二編、リホソーム、東京：南江堂、1988;21-40.
- 3) Fowler SA, Andracki M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22:27-42.
- 4) Reichert CM, Kelly VL, Macher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985;111-60.
- 9) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
- 10) 既発表の図表、その他を引用、転載する場合には、あらかじめ版権所有者の許可を得ること。また、掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

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

編集委員会

●武岡真司(委員長)、池淵研二、津田良夫、伸井邦彦、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(4) 2002年12月27日発行

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL(03)5363-3493 FAX(03)5363-3499

〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1

早稲田大学理工学部65-208室

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

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

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

再生紙を使用