

人工血液

第 17 巻 第 1 号 2009 年 6 月

目 次

追悼	Dr. Robert M. Winslow (1941-2009)	2
会告		4
原著	ヘモグロビン小胞体を含む血液検体の臨床検査 -デキストラン添加による干渉作用の回避- 宗 慶太郎 他	6
総説	膠質浸透圧特性に基づいた周術期の ハイドロキシエチルスターチ製剤の選択: 体液動態シミュレーションによる分析 多田羅 恒雄	16
	ヒトES細胞からの血液産生 辻 浩一郎	29
トピックス	E-Cell Systemによるヒト赤血球 代謝シミュレーションの展開 西野 泰子 他	37

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 17 No. 1 June, 2009

Contents

<i>Eulogy: Dr. Robert M. Winslow (1941-2009)</i>	<i>2</i>
<i>Announcement from the Society</i>	<i>4</i>
<i>Original Article:</i> <i>Clinical Laboratory Test of Blood Specimens Containing Hemoglobin-vesicles - Interference Avoidance by Addition of Dextran- Keitaro Sou, et al.</i>	<i>6</i>
<i>Review: Perioperative Choice of Hydroxyethyl Starch Solutions Based on Colloid Osmotic Properties: Analysis Using Fluid Dynamics Simulation Tsuneo Tatara</i>	<i>16</i>
<i>Generation of blood cells from human ES cells Kohichiro Tsuji</i>	<i>29</i>
<i>Topics : Development and Applications of Human Erythrocyte Simulation using E-Cell System Taiko Nishino, et al.</i>	<i>37</i>



Dr. Robert M. Winslow (1941-2009)

カリフォルニア大学サンディエゴ校（UCSD）教授でSangart, Inc.社の創設者であられたDr. Robert M. Winslowが脳腫瘍のため、2009年2月2日にご自宅にて永眠されました。享年67歳でした。Dr. Winslowは血液代替物および高地生理学の先駆者でした。2007年10月に北京で開催された第11回国際血液代替物学会では、いつも通りの元気なお姿をお見せになりましたが、2008年春に発病、余りにも早いご逝去でした。

Dr. Winslowは、1941年9月30日にミネソタ州ニューアームで生まれました。1962年にミネソタ大学を首席で卒業。1966年ジョンス・ホプキンス大学メディカルスクールを卒業し、1970年まで国立衛生研究所（NIH）研究員。その後臨床研修のためジョンス・ホプキンス大学に戻り、NIHの主任研究員となり1974年までフェローおよび講師として在籍。1979年に疾病対策センター（CDC）に移籍し、血液学部の異常ヘモグロビン症部門の主任、医学部長補佐となりました。1985年サンフランシスコ・プレシディオのレターマン陸軍研究所の陸軍血液研究部門主任、後に副司令官。1991年に公職を退き学会活動に戻り、UCSDでNIH支援のプロジェクトを開始し、修飾ヘモグロビンを用いる酸素運搬体に関する研究を開始。その成果を基にSangart, Inc.社を設立し、人工酸素運搬体の製品開発を継続。2008年6月までSangart, Inc.社の代表取締役、CEOおよびChief Medical Officerを、そして2008年12月まで会長を務められましたが、病状の進行のため後任にその責を委譲していました。

Dr. Winslowの研究には、ペルー、チリ、ネパールにおけるのべ5回の高所野外研究が含まれ、低酸素環境下の住民の血液についての研究を行いました。また、極端な高度におけるヒトの急性順応を研究するため、1981年にはAmerican Medical Research Expedition to Mount Everest 探検のメンバーでした。これらの功績に対し、公衆衛生局および陸軍から勲功章など数多くの賞を受けました。長年にわたり、食品医薬品局、世界保健機構、連邦航空局、汎米保健機構など多くの政府機関の顧問を務めました。また200以上の学術論文を執筆し、酸素運搬の生理学や人工酸素運搬体に関する出版の著者および編者となっております。他方、日本血液代替物学会の活動にも貢献してくださり、本学会設立記念シンポジウム（1993）、第4回年次大会／第7回血液代替物学会国際会議（1997）、第8回年次大会（2001）、第10回年次大会／第9回血液代替物学会国際会議（2003）、第12回年次大会（2005）、などにてご講演を頂いております。

Dr. Winslowには、人工酸素運搬体の開発やその臨床応用に関してまだまだ教えて頂かなければならないことが沢山ありました。私達は先生のご意志を継いで、人工酸素運搬体の臨床応用を目指して更に邁進して行く決意を新たにしております。どうぞ私達の活動を見守って下さい。

ここに謹んで哀悼の意を捧げ、ご生前の数多くのご業績に衷心より敬意を表し、お別れの言葉と致します。

小林 紘一
慶應義塾大学 名誉教授
日本血液代替物学会 会長

追記

Dr. Winslowは2009年2月20日、サンディエゴ郡のValley Center Cemeteryで密葬されました。また、UCSDのFaculty Clubにて偲ぶ会が執り行われ、120名余の参列がありました。Dr. Winslowの妻Mrs. Nancy Lessman Winslowをはじめ、ご遺族は献花の代わりに出身大学であるUniversity of Minnesota Foundationへ寄付するよう希望されておりましたので、その意に沿うように日本血液代替物学会ならびに慶應義塾大学と早稲田大学の有志4名より、condolence contributionとしてMrs. Winslowにお渡ししました。日本からは代表として早稲田大学理工学術院 酒井宏水 准教授がご参列されました。その後、Mrs. Winslowより丁寧なお礼のお手紙を頂いております。

Bob Winslow and the special blood substitutes trans Pacific connection between Japan and the U.S.

Marcos Intaglietta

Distinguished Professor of Bioengineering, University of California, San Diego
La Jolla, California

It is said that we will know a person when we consume a kilogram of salt together. Having joined for lunch at least once a month at our UCSD faculty club for almost twenty years must have taken us close to this threshold. To the end, he did not cease to surprise me with innovation, style and the relevance of his ideas, perceptions and scientific questions.

At the time that we first met, at UCSD, my laboratory was engaged in the analysis of microvascular function in health and disease. Bob was on a mission: the development of blood substitutes, an era that begun at the Army Letterman Institute, where he spawned the development of many of the molecules that are still under study today. It is clear that he convinced me to join that mission, rather than the other way around.

Under Bob's leadership we established an NIH program project at UCSD to promote the development of blood substitutes. This attracted national and international attention, leading Bob and I to start the series of symposia Current Issues in Blood Substitutes Research and Development, in 1994, in the attempt to provide an academic forum primarily directed at reporting and discussing the science underlying blood substitutes.

The attendance to these meetings was extraordinary because of diversity and wide ranging scope of interests represented. The Japanese representation was particularly remarkable because of the evident national commitment to blood substitute development. The scientific leaders of the group were Professor Eishun Tsuchida, an old friend of Bob, and clearly one of the world leaders of polymer chemistry, being holder of fractions of the Kodak Color patents, and Professor Koichi Kobayashi, a distinguished specialist in lung surgery at Keio University who was and remains the principal clinical force that since then drives the Japanese development of artificial blood.

With these premises as a stage it is insightful to dwell deeper in the ambient in which Bob Winslow worked and operated since I knew him. Even though he was a professor of hematology at UCSD his aura was that of a scientist, entrepreneur and an elegant and difficult person. However, Bob was and will always be in my memory the ultimate professor. Professors exist in the context of research, teaching and intellectual exploration. Bob did all of these superlatively, being an eloquent lecturer and the mentor of many students. He felt very strongly about transcending barriers, between

disciplines, professions, and those due to geography, leading him to promote the work of many young investigators. This is how Dr. Hiromi Sakai was jointly sponsored to bridge the Japanese developments in polymer chemistry applied to blood substitutes with the physiological studies of Bob's Program Project.

It is worth to reflect that both Bob and Eishun Tsuchida recognized early on that PEG (polyethylene glycol) is a necessary component for introducing hemoglobin based oxygen carriers into the circulation and lower or eliminate side effects. However this approach appears to reach a limit as the resulting encapsulation efficiency, i.e., quantity of pay load (i.e., oxygen carrier) vs. non carrier material is seldom greater than 70% regardless whether we deal with a molecular solution (PEG-Hb), an emulsion (Perfluorocarbons), or Hb vesicles (HbV).

Bob was dispassionately aware of limitations and virtues of virtually all proposals on how to deliver oxygen to the tissue, and held in very high regard the Japanese developments on how to accomplish this. In fact, in the Spring of 2008 we had a conversation where he proposed that Hb vesicles might represent the next step in the evolution of blood substitutes, and asked me to discuss with Eishun Tsuchida the possibility of using Bob's know how to test and help to bring his hemoglobin vesicles to the market.

We should remain cognizant of Bob's proposal, because he had a fundamental knowledge of oxygen transport. And his proposals for oxygen carriers were derivatives of this knowledge of how oxygen is managed and used in our organisms. He would often state that oxygen being the source of energy for metabolism was the most protected and guarded organic process, and that our intervening in this process with oxygen carriers should be done with extremes care, and profound understanding.

Finally it is also said that we should not mourn the death of a traveler, but the death of a road. For me and the trans Pacific readers of this note I proposed a moment of reflection for a Professor who principally contributed to our times and knowledge. For the remaining and possible futures I entrust them to the younger generation, like Hiromi Sakai, Hirohisa Horinouchi, Andre F. Palmer, Pedro Cabrales and Amy G. Tsai. I welcome colleagues in the field to enlarge this cadre, an initiative that I am certain that Bob Winslow would have enthusiastically endorsed and that will ensure that the road of blood substitutes reaches destination.

会 告

第16回日本血液代替物学会年次大会

テーマ：世界をリードする血液代替物

会 期：平成21年10月16日(金)，17日(土) 午前9時～午後17時

会 場：慶應義塾大学医学部 信濃町キャンパス内医学情報センター 北里講堂

参加費：\ 8,000 (懇親会費を含む)

総 会：平成21年10月16日 正午

シンポジウム：細胞型人工酸素運搬体をつくる 平成21年10月16日

早稲田大学理工学部 酒井宏水先生 Hb溶液から包埋粒子まで

ニプロ株式会社研究部 横江淳一先生 創薬領域でのペグ化と将来への展望

ベネシス株式会社研究部 柚木幹弘先生 生物製剤の安全性確保とHbVの無菌化

テルモ株式会社開発部 金田伸一先生 HbV工業生産への道－その障害を乗り越えて

特別発言：東京大学生産技術研究所 酒井康行先生

特 別 講 演：人工血小板の過去，現在，未来 平成21年10月17日

慶應義塾大学医学部 半田 誠 先生

：微小循環系でのナノ粒子の不思議な流れ 平成21年10月17日

岡山大学理学部 百武 徹 先生

特別発言：慶應義塾大学神経内科 富田 裕 先生

：獣医医療における血液代替物の意義

酪農大学獣医学部 萩原克郎先生

特別発言：麻布大学獣医学 並河和彦先生

一 般 演 題：発表 各発表時間12分 (質疑応答を含み15分)

発表予定

平成21年10月16日 (午前，午後) 15題程度 平成21年10月17日 (午前，午後) 15題程度

応募演題数により設定時間に多少の変更もあります。

評 議 員 会：平成21年10月16日 正午頃

総 会：平成21年10月17日 ランチョンセミナー終了後

ランチョンセミナー：平成21年10月17日 正午

代用血漿剤HES 埼玉医科大学医療センター 宮尾秀樹 先生

(主催：フレゼニウス・カービ・ジャパン株式会社)

懇 親 会：平成21年10月16日 17：30－20：00

慶應義塾大学病院新館11階 パレスホテル・オアシス

会費は参加費に含まれております。

会員の方々、いまだ入会されておられない方、本学会の研究テーマにご興味をおもちの方、ならびに関係分野でご研究の方々のご発表、ご参加を心からお待ちいたしております。

演 題 申 込：演題名，演者名（ローマ字付き），共同発表者名，ご所蔵，電話番号，Fax番号，E-mail
番号と800字以内の抄録を

E-mailにて 1) kita@kenkousya.jp
2) r-kobayashi@mail.hts-hsp.com
の2箇所にお送り願います。

演題申込締切り：平成21年7月21日

なお今後この日本血液代替物学会ホームページ

<http://www.blood-sub.jp/art-bl/>

に学会関係の連絡事項を逐次掲載いたしますので検索をお願いいたします。

平成21年 6 月吉日

第16回日本血液代替物学会年次大会

会長 高折益彦 東宝塚さとう病院

〒665-0873 兵庫県宝塚市長尾町2番地1号

Tel：0797-88-2200 Fax：0797-88-5782

ヘモグロビン小胞体を含む血液検体の臨床検査 -デキストラン添加による干渉作用の回避-

Clinical Laboratory Test of Blood Specimens Containing Hemoglobin-vesicles - Interference Avoidance by Addition of Dextran-

宗 慶太郎⁽¹⁾, 小峰 梨沙⁽²⁾, 酒井 宏水⁽¹⁾, 小林 紘一⁽³⁾, 土田 英俊⁽¹⁾, 村田 満⁽²⁾

Keitaro Sou⁽¹⁾, Risa Komine⁽²⁾, Hiromi Sakai⁽¹⁾, Koichi Kobayashi⁽³⁾, Eishun Tsuchida⁽¹⁾, Mitsuru Murata⁽²⁾

和文抄録

ヘモグロビン (Hb) 小胞体 (250 nm) は赤血球 (8 μ m) に比べ1/30程度の大きさの人工酸素運搬体である。Hb小胞体を含む血液検体を遠心分離操作するとHb小胞体は血清に浮遊し、Hb小胞体による干渉作用が血液生化学検査を阻害することが解っているが、その他にも免疫学検査、凝固線溶検査、血糖検査などにおけるHb小胞体の干渉作用を検討する必要がある。本研究では、これらの検査におけるHb小胞体の干渉作用を明らかにすると共に、その回避法を明らかにすることを目的とした。遠心分離により血球と同時にHb小胞体を沈降分離させるため、各種分子量のデキストラン (Dex) を添加して血液中のHb小胞体を凝集させる条件を設定した。さらにヒト血液にHb小胞体を15vol %混合した試料についてこの分離条件を適用し、各検査項目について干渉の有無を検討した。Dexの分子量 (487 kDa) および濃度 (終濃度: 2.6 g/dL) の設定により、通常の遠心分離 (3000-5000 rpm, 10 min) でHb小胞体を沈降分離できることを確認した。Hb小胞体は生化学および凝固線溶検査の多くの項目で干渉作用を示したものの、Dexを添加して遠心除去することにより大部分の項目で干渉を回避できた。ただし、Dex添加により生化学検査でリポプロテインの低下、および凝固線溶検査でvon Willebrand factor (vWF) 活性の低下、トータルplasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) の上昇を認め、これらについてはDex添加による干渉を受ける項目として注意を要する。血糖検査項目として検討したグルコースとグリコヘモグロビンは、Hb小胞体とDexの干渉なく測定できた。従って、Hb小胞体投与後の血液検体に本法を利用すれば、従来通り遠心分離で血清や血漿が得られ、生化学・免疫学検査、凝固線溶検査、血糖検査の多くの項目で干渉なく検査ができる。

Abstract

Hemoglobin-vesicle (HbV) is an artificial oxygen carrier of which the size (250 nm) is 30 times smaller than red blood cells (8 μ m). HbVs remain in serum after centrifugation because of its small size and as a result, HbV interferes with the clinical laboratory test. Here we examine the interference of HbV in other clinical laboratory tests such as immunological test, coagulation fibrinolysis examination, and blood sugar test. To precipitate the HbV by conventional centrifugal separation of blood, we determined an appropriate condition to aggregate HbV by an addition of Dextran (Dex). The obtained plasma or serum was evaluated by common clinical laboratory test. HbV could be precipitated by addition of Dex (Mw. 489 kDa, final concentration: 2.6 g/dL in blood) with conventional centrifugation (3000-5000 rpm, 10 min). Though the presence of HbV interfered with the measurement of many analytes, the interference could be removed by the addition of Dex. However, it should be cautioned that this method underestimates lipoprotein concentration and von Willebrand factor (vWF) activity, and overestimates total plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1). Blood sugar tests for glucose and glycated hemoglobin (Hb_{A1c})

(1) 早稲田大学 理工学術院 理工学研究所 Research Institute for Science and Engineering, Waseda University

(2) 慶應義塾大学 医学部 臨床検査医学 〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 Department of Laboratory Medicine, School of Medicine, Keio University, 35 Shinano-cho Shinjuku-ku Tokyo 160-8582, Japan

(3) 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 Department of Thoracic Surgery, School of Medicine, Keio University

論文受付 2009年1月13日 論文受理 2009年1月30日

could be performed without interference effect of HbV and Dex. Taken together, the present method will be useful to separate serum and plasma from the blood specimens containing HbV for accurate clinical laboratory tests.

Keywords

Hemoglobin-vesicles, oxygen carrier, blood specimen, clinical laboratory test, interference, dextran

1. はじめに

輸血代替物として人工酸素運搬体の使用が想定される救命救急や大手術では、各種の臨床検査やモニタリングにより患者の容態の管理が行われる。大量に投与される人工酸素運搬体の臨床応用を円滑に進めるには、人工酸素運搬体の投与が周辺の医療技術や機器にどのような影響を及ぼすか把握しておく必要がある。これまでに、血液検体検査のほか、Co-oximetry, pulse oximeter,あるいはmagnetic resonance (MR) oximetryによる酸素飽和度のモニタリングなどにおいて人工酸素運搬体の影響が調べられてきている¹⁻¹⁹⁾。Hbベース、パーフルオロカーボン(PFC)ベースを含め、人工酸素運搬体は血球成分に比較して小粒径のため、遠心分離を経てなお血漿層に浮遊する。このため、人工酸素運搬体の特性吸収や濁度が血液生化学検査の多くの項目で測定値に影響を与える。血漿タンパク質と同程度の大きさの修飾Hbは実験的にも血漿から分離するのが極めて困難であり、干渉作用の少ない機器の選定や修飾Hb濃度の関数として干渉分の補正係数を算出することで対処せざるを得ない^{5,10,12,13)}。ただし、干渉は濃度だけでなく、経時的に変化するMetHb含量などの影響を受けるため¹¹⁾、実際にはこれらの因子を複合的に考慮した補正が必要となる。特定の測定機種について独自の補正を含めた解析手法は臨床試験データの詳細解析には有効と思われるが、補正係数が測定機種に依存するため一般に普及する方法としては適していない。

一方、リン脂質二分子膜でHb溶液を被覆したHb小胞体(250 nm)は、赤血球(8 μ m)に比較すれば1/30程度の大きさであるが、血漿タンパク質や修飾Hb(数nm)に比較すれば数十倍の大きさがある。この大きさになると、超遠心分離機を使用すれば比較的短時間で沈殿させることができ、また、デキストランなど高分子凝集剤の添加によりHb小胞体を凝集させれば、遠心分離操作で血清からHb小胞体を分離できる。このような分離法の工夫により血液生化学検査における干渉を回避できることがわかっている^{8,9)}。本研究では、デキストラン添加によるHb小胞体の凝集現象を利用し、血液から一段階の遠心分離操作により血漿や血清を分離する条件を検討した。更にこの条件で得られる血清や血漿について生化学・免疫検査、凝固線溶検査、血糖検査を実施し、Hb小胞体による干渉作用を回避できる項目、およびデキストラン添加による干渉作用のある項目を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

2.1. デキストラン(Dex)添加によるHb小胞体の凝集

市販の分子量の異なるDex粉末(分子量; 11, 19,6, 40,2, 72,2, 124, および487 kDa, SIGMA)を生理食塩水に溶解させて高

子凝集剤として使用した。Hb小胞体分散液(Hb; 0.05 g/dL, 3 mL)とDex溶液(20 g/dL, 0.3 mL)を混合し(Dex終濃度: 1.8 g/dL), 25°Cに静置して溶液濁度の変化($\lambda = 700$ nm)から凝集を検出し、その経時変化を観測した。この結果からHb小胞体の凝集生起に要するDex分子量および時間に関する知見を得た。

2.2. 血清分離条件の検討

Hb小胞体が浮遊する血液から血清を分離する実験では、出血蘇生試験のためHb小胞体を投与したビーグル犬から採取した血液を使用した²⁰⁾。循環血液量の50%を脱血した後に、同量のHb小胞体分散液([Hb]=8.6 g/dL, 5% リコンビナントアルブミンに浮遊)を投与し、4時間経過した時点での採血液を利用した。採血液(5 mL)とDex溶液(20 g/dL, 0.5 ~0.88 mL)を混合し、25°Cで10分間静置した。この混合液を遠心分離(5000 rpm, 10分)して上澄み液からのHb小胞体の除去を観測した。これらの結果から、Dexの分子量と濃度についてHb小胞体を完全に除去できる条件を決定した。

2.3. ヒト血液検体検査

健康成人から採血した新鮮血8.5容に対しHb小胞体を1.5容の割合で混合し各種採血管(ベノJECT II, テルモ)に分注した。さらに予めDex(分子量400~500 kDa, SIGMA)を20 g/dLになるよう生理食塩水に溶解した溶液を終濃度2.6 g/dLで添加混合した。10分間室温放置後3000 rpm, 10分遠心分離し血清または血漿を得た。得られた血清の生化学検査[総タンパク, アルブミン, 総ビリルビン, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT), γ グutamiltランスペプチダーゼ(γ -GTP), 乳酸脱水素酵素(LDH), ロイシンアミノペプチダーゼ(LAP), クレアチニンキナーゼ(CK), コリンエステラーゼ(ChE), 尿素窒素, 尿酸, 総コレステロール, エステル型コレステロール, 遊離型コレステロール, リポプロテイン(A), トリグリセライド, リン脂質, 遊離脂肪酸, 高密度リポタンパク質-コレステロール(HDL-C)定量, カリウム, カルシウム, 無機リン, クレアチニン, C反応性蛋白(CRP)定量, フェリチン, ハプトグロビン], 免疫学検査[免疫グロブリンG(IgG), 免疫グロブリンM(IgM), B型肝炎ウィルス表面(HBs)抗原, B型肝炎ウィルス表面(HBs)抗体, B型肝炎ウィルス(HCV)抗体], 血漿の凝固線溶検査[活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT), プロトロンビン時間(PT), アンチトロンビンIII(ATIII), トータルプラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1(PAI-1), フィブリノゲン, フォン・ヴィレブラン

ド因子 (vWF) 抗原, vWF 活性, D-ダイマー, フィブリン分解産物 (FDP)], 糖尿病関連検査 [血中グルコース, グリコヘモグロビン (Hb_{A1c}) は血液検体で測定] をそれぞれ実施した。これら全ての検査を株式会社エスアールエル (東京) に依頼した。比較は Hb 小胞体添加血液に生理食塩水を添加し得られた血清または血漿と, 生理食塩水添加血液に Dex または生理食塩水を添加し得られた血清または血漿とした。また血清採取用真空採血管は凝固促進剤, 血清分離剤が収容されているものなど幾つか種類があるので (Fig. 3 の採血管収容物を参照), 採血管の違いによる影響も調べた。干渉作用の有無の判定では, 米国 FDA の Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) の規定する臨床試験に関する測定誤差の許容範囲 (CLIA limit) を判断基準とし^{5,8)}, 基準値との較差 (誤差) が許容範囲を正に超える項目を (↑), 負に超える項目を (↓) と表記した。また, 基準値との較差が許容範囲内である場合には干渉作用無 (none) と判断した。CLIA limit が規定されていない項目に関しては, 較差の許容範囲を 20% として判定した。今回はコントロールとの比較による干渉の有無の判定を目的としたため, 血液に Hb 小胞体, Dex 溶液ないし生理食塩水を添加して希釈率を統一 (1.35 倍希釈) して比較した。希釈率の補正は行っていない。

3. 結果および考察

3.1. Dex 添加による Hb 小胞体の凝集

まず, Hb 小胞体に各種分子量の Dex を添加し, 溶液濁度変化 (Δ O.D.) を経時的にモニターした結果を Fig. 1 に示す。分子量 72.1 kDa 以下の Dex を Hb 小胞体に添加してもほとんど溶液濁の変化を認めないが, 分子量 124 kDa の Dex では溶液濁度の上昇が観測され, さらに分子量 487 kDa の Dex 添加により著しい溶液濁度の増大が観測された。粒子による光散乱強度は粒子径の 6 乗に比例するため, 凝集による粒子径の増大は溶液濁度の増大 (光散乱強度の増大) として検出される。高分子添加により懸濁粒子が凝集する現象はよく知られ, リン脂質小胞体

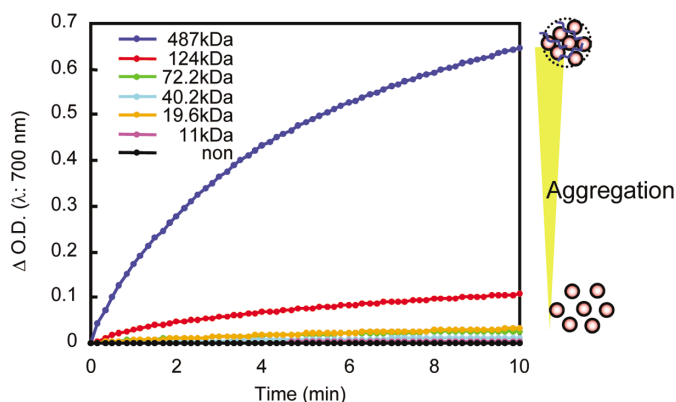


Fig. 1. Kinetics of aggregation of HbV in the presence of 1.8% dextran at 25°C. Dex solution was added to the HbV dispersion. Increase of the Δ O.D. indicates the formation of larger aggregate of HbV by the addition of Dex.

は共存する高分子との相互作用が比較的詳しく調べられている²¹⁻²⁴⁾。高分子による小胞体凝集の主要な作用として, 小胞体表面の電荷 (ゼータ電位) の中和あるいは遮蔽による粒子の不安定化, 小胞体間の架橋, 高分子による粒子の排除 (枯乾効果) などが知られ, 一般に同一の繰り返し単位を有する高分子であれば高分子量体ほど凝集能が高く, 凝集生起の臨界分子量の存在が認められる²³⁾。今回の結果より, 分子量 487 kDa 程度の Dex が Hb 小胞体の凝集に適していると考えられる。Hb 小胞体の凝集は数分間で進行するため, Dex を添加して Hb 小胞体を凝集させる条件を室温 (25°C) で 10 分間静置に設定した。

3.2. 血清分離条件の検討

Hb 小胞体の浮遊する採血液に対し分子量の異なる Dex 溶液を添加し, 10 分間静置した後に遠心分離した採血管を Fig. 2a に示す (Dex 終濃度: 1.8 g/dL)。Dex 分子量の効果は明確で, 487 kDa の Dex を添加した系のみ透明な血漿が得られた。124 kDa では Hb 小胞体の沈殿を認めるものの不十分であり, それ以下の分子量では沈殿を認めなかった。遠心加速度 ($r\omega^2$) による粒子の沈降速度 (v) は次の式 (1) で表すことができる。

$$v = \frac{d^2}{1.8} \times \frac{(\sigma - \rho)}{\eta} \times r\omega^2 \quad (1)$$

ここで, d (cm): 粒子の直径, σ (g/cm³): 粒子の密度, ρ (g/cm³): 溶液の密度, η (g · cm⁻¹ · s⁻¹): 溶液の粘度。沈降速度は粒子直径の 2 乗に比例するため, 凝集により見かけ上の粒子の直径を大きくすることで沈降速度が増大する。Fig. 1 の結果との対応から, Dex 487 kDa の添加による Hb 小胞体の著しい凝集により遠心で沈降できる大凝集体が生起するものと考えられる。この結果より, Dex の分子量を 487 kDa に設定した。

次に, Dex 487 kDa の濃度条件を検討した。7 mL 採血管 (プレーン) に高分子凝集剤として Dex 487kDa の 0.3~0.75 mL を添加した採血管を作成し, 採血液 (5 mL) を各採血管に採取して, 25°C で 10 分間静置した。この混合液を遠心分離 (5000 rpm, 10 分) して血漿層からの Hb 小胞体の除去の有無を観測した。結果として, 透明な血漿層が得られるのは Dex 487kDa を終濃度で 1.8 g/dL 以上添加した場合であり, 更に血漿層を超遠心分離して分析すると, 2.6 g/dL 以上でほぼ完全に Hb 小胞体が除去されることを確認した (Fig. 2b)。血漿層に Hb 由来の吸収はなく Dex 487kDa 添加による赤血球や Hb 小胞体の溶血もない。沈殿物は下層の血球層と上層の Hb 小胞体で明らかな界面を認め, 容易に各々の沈降占有容積率 (クリット値) を計測できる。また Hb 小胞体の沈殿と血漿の界面も明確であるため, 血漿採取は比較的容易である。以上より, Hb 小胞体投与後には, Dex 487kDa が終濃度 2.6 g/dL となるように封入された採血管を使用すれば, 従来通りの遠心分離にて濁度や Hb 吸収の干渉作用のない血漿ないし血清を採取できることが示された。

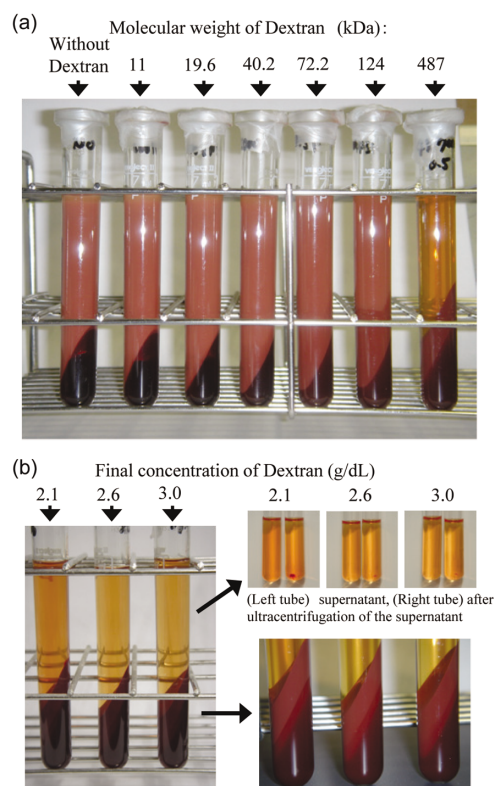


Fig. 2. Precipitation of the aggregated HbV by centrifugation. (a) Effect of the molecular weight of the Dex. (b) Effect of the concentration of the Dextran. HbV could be precipitated in centrifugation of blood sample in presence of 2.6 g/dL Dex (Mw. 487 kDa). Aggregated HbV forms pellet on a red blood cell pellet after centrifugation.

3.3. ヒト血液検体検査

高分子量Dex添加によりHb小胞体を除去する方法について、血液検体検査への適合性をヒト血清、血漿の外観と検査結果で評価した。Hb小胞体添加血液に生理食塩水を加えて遠心分離した血清、血漿はHb小胞体が浮遊しているため赤色であった。しかしDex添加によりHb小胞体を除去した血清と血漿 (Fig. 3) は一部の血清採取用採血管 (Fig. 3c, d) で少し赤みが帯びていたもののほぼ黄色であった。赤みが帯びていた血清はDexと血液の混和が不十分であったためHb小胞体を除去しきれなかったことが考えられる。Hb小胞体の除去効果は血清、血漿の外観から肉眼で確認可能であった。各検査においてHb小胞体浮遊血清、血漿は以下のような干渉作用を示した。生化学検査 (Table 1~3) においては総タンパク、アルブミン、LDH、CK、クレアチニン、CRP、ハプトグロビンの上昇が見られた。また、総コレステロール、エステル型コレステロール、遊離型コレステロール、リン脂質ではHb小胞体の脂質膜が影響し上昇した。尿素窒素とIgMは低下し、ChEは低下傾向を示した。総ビリルビン、AST、ALT、 γ GTPにおいては検査不能と判断された。免疫学検査項目であるHBs抗原・抗体、HCV抗体いずれもHb小胞体による影響は認められなかった。これらの結果は4種すべての血清採取用採血管で同様であった。生化学・免疫学検査の全32項目中、Hb小胞体の干渉作用により適切な測定値が得られない項目は17ないし18項目に上った (Table 1~3)。一方、Dexの添加によりHb小胞体を除去することで、3ないし4項目 (遊離脂肪酸、リポプロテイン、遊離コレステロール、フェリチン、ALT、AST) を除き適切

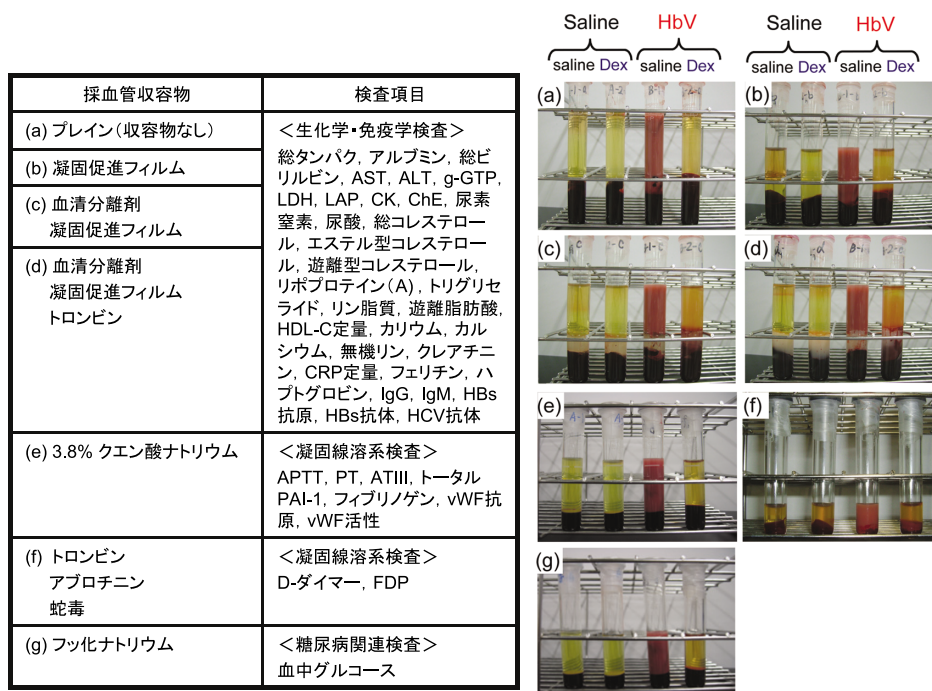


Fig. 3. Blood collecting tubes and analytes of clinical laboratory tests. (a)-(g) Blood samples after centrifugation. The blood collecting tube contain blood+saline+saline (control), blood+saline+Dex (interference effect of Dex), blood+HbV+saline (interference effect of HbV), or blood+HbV+Dex (this method).

Table 1. Clinical chemistry and immunological tests (Blood collection tube without contents)

Analytes	Units	CLIA limits	Blood+Saline			Blood+HbV			
			+Saline (Control)	+Dex	IF*	+Saline	IF*	+Dex	IF*
Total protein	g/dL	± 10%	5.1	4.8	none	14	↑	4.8	none
Albumin	g/dL	± 10%	3.3	3.2	none	4.3	↑	3.2	none
Total bilirubin	mg/dL	±0.4mg/dL or ± 20%	0.2	0.1	none	impossible	×	0.1	none
AST	IU/L	± 20%	11	10	none	impossible	×	10	none
ALT	IU/L	± 20%	7	7	none	impossible	×	7	none
γ-GTP	IU/L	± 20%	8	8	none	impossible	×	7	none
LDH	IU/L	± 20%	134	118	none	270	↑	127	none
LAP	IU/L	ND, ± 20%	63	62	none	58	none	64	none
CK	IU/L	± 30%	46	46	none	89	↑	47	none
ChE	IU/L	ND, ± 20%	243	242	none	215	none	247	none
Urea nitrogen	mg/dL	± 2 mg/dL or ± 9%	6.1	6.0	none	1.2	↓	6.3	none
Creatinine	mg/dL	±0.3 mg/dL or ± 15%	0.39	0.43	none	2.03	↑	0.47	none
Uric acid	mg/dL	± 17%	2.6	2.5	none	2.5	none	2.7	none
Total cholesterol	mg/dL	± 10%	129	119	none	334	↑	113	none
Cholesterol ester	mg/dL	ND, ± 20%	99	92	none	238	↑	92	none
Free cholesterol	mg/dL	ND, ± 20%	30	27	none	96	↑	21	↓
Triglyceride	mg/dL	± 25%	90	73	none	86	none	69	none
phospholipid	mg/dL	ND, ± 20%	163	156	none	235	↑	153	none
Free fatty acid	mEQ/L	ND, ± 20%	0.08	0.08	none	0.09	none	0.14	↑
HDL-C	mg/dL	ND, ± 20%	43	43	none	39	none	45	none
Lipoproteins	mg/dL	± 30%	12	5	↓	15	none	6	↓
K ⁺	mEQ/L	±0.5 mmol/L	2.4	2.5	none	2.5	none	2.6	none
Ca ²⁺	mg/dL	±0.25 mmol/L	6.2	6.2	none	5.9	none	6.2	none
Inorganic phosphate	mg/dL	ND, ± 20%	2.1	2.0	none	2.2	none	2.2	none
CRP	mg/dL	ND, ± 20%	≤ 0.02	≤ 0.02	none	0.1	↑	≤ 0.02	none
Ferritin	ng/mL	ND, ± 20%	3.5	3.0	none	3.4	none	2.8	↓
Haptoglobin	mg/dL	ND, ± 20%	80	74	none	117	↑	80	none
IgG	mg/dL	± 25%	747	734	none	655	none	744	none
IgM	mg/dL	ND, ± 20%	93	86	none	60	↓	88	none
HBs antigen	IU/mL	positive or negative	< 0.05	< 0.05	none	<0.05	none	< 0.05	none
HBs antibody	mIU/mL	positive or negative	< 10.0	< 10.0	none	< 10.0	none	< 10.0	none
HCV antibody		positive or negative	0.0	0.0	none	0.0	none	0.0	none

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, γ-GTP: γ-glutamyltranspeptidase, LDH: lactate dehydrogenase, LAP:

leucine aminopeptidase, CK: creatine kinase, ChE: cholinesterase, HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, CRP: C-reactive protein,

HBs: hepatitis B surface, HCV: hepatitis C virus. * IF means interference. (↑) overestimation, (↓) underestimation, (none) no interference.

Table 2. Clinical chemistry and immunological tests (Blood collection tube containing clot activator)

Analytes	Units	CLIA limits	Blood+Saline			Blood+HbV			
			+Saline (Control)	+Dex	IF*	+Saline	IF*	+Dex	IF*
Total protein	g/dL	± 10%	5.2	4.8	none	14.3	↑	4.9	none
Albumin	g/dL	± 10%	3.3	3.2	none	4.2	↑	3.2	none
Total bilirubin	mg/dL	±0.4mg/dL or ± 20%	0.1	0.1	none	Impossible	×	0.1	none
AST	IU/L	± 20%	11	11	none	Impossible	×	12	none
ALT	IU/L	± 20%	5	8	↑	Impossible	×	8	↑
γ-GTP	IU/L	± 20%	7	7	none	Impossible	×	7	none
LDH	IU/L	± 20%	131	114	none	265	↑	115	none
LAP	IU/L	ND, ± 20%	61	62	none	58	none	62	none
CK	IU/L	± 30%	48	47	none	73	↑	48	none
ChE	IU/L	ND, ± 20%	239	236	none	220	none	241	none
Urea nitrogen	mg/dL	± 2 mg/dL or ± 9%	6.1	6.3	none	Impossible	×	5.9	none
Creatinine	mg/dL	±0.3 mg/dL or ± 15%	0.45	0.41	none	1.80	↑	0.42	none
Uric acid	mg/dL	± 17%	2.5	2.5	none	2.3	none	2.7	none
Total cholesterol	mg/dL	± 10%	126	126	none	333	↑	119	none
Cholesterol ester	mg/dL	ND, ± 20%	95	96	none	239	↑	91	none
Free cholesterol	mg/dL	ND, ± 20%	31	30	none	94	↑	28	none
Triglyceride	mg/dL	± 25%	88	80	none	82	none	69	none
phospholipid	mg/dL	ND, ± 20%	162	157	none	229	↑	157	none
Free fatty acid	mEQ/L	ND, ± 20%	0.08	0.08	none	0.09	none	0.15	↑
HDL-C	mg/dL	ND, ± 20%	41	42	none	39	none	43	none
Lipoproteins	mg/dL	± 30%	14	11	none	14	none	4	↓
K ⁺	mEQ/L	±0.5 mmol/L	2.4	2.4	none	2.5	none	2.6	none
Ca ²⁺	mg/dL	±0.25 mmol/L	6.0	6.1	none	5.7	none	6.0	none
Inorganic phosphate	mg/dL	ND, ± 20%	2.1	2.0	none	2.8	none	2.1	none
CRP	mg/dL	ND, ± 20%	≤ 0.02	≤ 0.02	none	0.08	↑	≤ 0.02	none
Ferritin	ng/mL	ND, ± 20%	2.8	2.5	none	2.8	none	2.6	none
Haptoglobin	mg/dL	ND, ± 20%	78	78	none	118	↑	82	none
IgG	mg/dL	± 25%	736	721	none	640	none	742	none
IgM	mg/dL	ND, ± 20%	90	84	none	55	↓	85	none
HBs antigen	IU/mL	positive or negative	< 0.05	< 0.05	none	< 0.05	none	< 0.05	none
HBs antibody	mIU/mL	positive or negative	< 10.0	< 10.0	none	< 10.0	none	< 10.0	none
HCV antibody		positive or negative	0.0	0.0	none	0.0	none	0.0	none

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, γ-GTP: γ-glutamyltranspeptidase, LDH: lactate dehydrogenase, LAP:

leucine aminopeptidase, CK: creatine kinase, ChE: cholinesterase, HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, CRP: C-reactive protein,

HBs: hepatitis B surface, HCV: hepatitis C virus. * IF means interference. (↑) overestimation, (↓) underestimation, (none) no interference.

Table 3. Clinical chemistry and immunological tests (Blood collection tube containing clot activator, inert barrier material, and thrombin)

Analytes	Units	CLIA limits	Blood+Saline			Blood+HbV			
			+Saline (Control)	+Dex	IF*	+Saline	IF*	+Dex	IF*
Total protein	g/dL	± 10%	5.0	4.8	none	14.0	↑	5.0	none
Albumin	g/dL	± 10%	3.3	3.2	none	4.3	↑	3.2	none
Total bilirubin	mg/dL	±0.4mg/dL or ± 20%	0.1	0.1	none	Impossible	×	0.1	none
AST	IU/L	± 20%	9	11	↑	Impossible	×	11	↑
ALT	IU/L	± 20%	6	8	↑	Impossible	×	7	none
γ-GTP	IU/L	± 20%	8	7	none	Impossible	×	7	none
LDH	IU/L	± 20%	113	110	none	260	↑	117	none
LAP	IU/L	ND, ± 20%	61	62	none	59	none	63	none
CK	IU/L	± 30%	48	47	none	55	none	49	none
ChE	IU/L	ND, ± 20%	239	240	none	225	none	244	none
Urea nitrogen	mg/dL	± 2 mg/dL or ± 9%	5.9	6.1	none	0.2	↓	5.8	none
Creatinine	mg/dL	±0.3 mg/dL or ± 15%	0.39	0.40	none	1.90	↑	0.5	none
Uric acid	mg/dL	± 17%	2.6	2.6	none	2.6	none	2.7	none
Total cholesterol	mg/dL	± 10%	127	123	none	337	↑	121	none
Cholesterol ester	mg/dL	ND, ± 20%	95	93	none	245	↑	92	none
Free cholesterol	mg/dL	ND, ± 20%	32	30	none	92	↑	29	none
Triglyceride	mg/dL	± 25%	89	79	none	84	none	70	none
phospholipid	mg/dL	ND, ± 20%	161	160	none	232	↑	157	none
Free fatty acid	mEQ/L	ND, ± 20%	0.07	0.08	none	0.09	↑	0.14	↑
HDL-C	mg/dL	ND, ± 20%	40	41	none	40	none	43	none
Lipoproteins	mg/dL	± 30%	14	9	↓	13	none	4	↓
K ⁺	mEQ/L	±0.5 mmol/L	2.4	2.4	none	2.5	none	2.7	none
Ca ²⁺	mg/dL	±0.25 mmol/L	6.1	6.1	none	6.0	none	6.1	none
Inorganic phosphate	mg/dL	ND, ± 20%	1.9	1.9	none	2.3	↑	2.2	none
CRP	mg/dL	ND, ± 20%	≤ 0.02	≤ 0.02	none	0.08	↑	≤ 0.02	none
Ferritin	ng/mL	ND, ± 20%	3.1	2.6	none	2.7	none	2.6	none
Haptoglobin	mg/dL	ND, ± 20%	77	82	none	121	↑	83	none
IgG	mg/dL	± 25%	736	729	none	670	none	748	none
IgM	mg/dL	ND, ± 20%	89	85	none	60	↓	87	none
HBs antigen	IU/mL	positive or negative	< 0.05	< 0.05	none	< 0.05	none	< 0.05	none
HBs antibody	mIU/mL	positive or negative	< 10.0	< 10.0	none	< 10.0	none	< 10.0	none
HCV antibody		positive or negative	0.0	0.0	none	0.0	none	0.0	none

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, γ-GTP: γ-glutamyltranspeptidase, LDH: lactate dehydrogenase, LAP:

leucine aminopeptidase, CK: creatine kinase, ChE: cholinesterase, HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, CRP: C-reactive protein,

HBs: hepatitis B surface, HCV: hepatitis C virus. * IF means interference. (↑) overestimation, (↓) underestimation, (none) no interference.

Table 4. Coagulation fibrinolysis examination

Analytes	Units	CLIA limits	Blood+Saline			Blood+HbV			
			+Saline (Control)	+Dex	IF*	+Saline	IF*	+Dex	IF*
APTT	second	±15%	38.5	41.2	none	Impossible	×	40.8	none
PT	second	± 15%	12.2	12.2	none	Impossible	×	11.9	none
fibrinogen	mg/dL	± 20%	157	149	none	Impossible	×	161	none
ATIII	%	ND, ± 20%	69	67	none	82	↑	70	none
vWF antigen	%	ND, ± 20%	48	34	↓	Impossible	×	43	none
vWF activity	%	ND, ± 20%	52	24	↓	Impossible	×	21	↓
Total PAI-1	ng/mL	ND, ± 20%	6	15	↑	3	↓	12	↑
FDP	μg/mL	ND, ± 20%	≤ 2	≤ 2	none	≤ 2	none	≤ 2	none
D-dimer	μg/mL	ND, ± 20%	0.22	0.2	none	≤ 0.10	↓	0.18	none

APTT: Activated partial thromboplastin time, PT: Prothrombin time, ATIII: AntithrombinIII, PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1 ,

FDP: fibrinogen degradation products. * IF means interference. (↑) overestimation, (↓) underestimation, (none) no interference.

Table 5. Blood sugar tests

Analytes	Units	Blood+Saline			Blood+HbV			
		+Saline (Control)	+Dex	IF*	+Saline	IF*	+Dex	IF*
Glucose	mg/dL	65	66	none	57	none	69	none

Analytes	Units	Blood+Saline	Blood+HbV	IF
Hb _{A1C}	%	4.8	4.8	none

Hb_{A1C} : glycated hemoglobin. * IF means interference. (↑) overestimation, (↓) underestimation, (none) no interference.

な測定値が得られた。遊離コレステロール、フェリチン、ALT、ASTの干渉作用は試験管によるため、検体数を増やして確認する必要がある。採血管の種類に依らず共通して干渉作用のある項目は、遊離脂肪酸とリポプロテインの2項目であった。血液にDexを添加した検体でもリポプロテインの低下を認めるため、脂質粒子として血漿中に存在するリポプロテインが、Dex添加により凝集して一部が沈降することで低値となったものと考えられる。遊離脂肪酸は血液にHb小胞体とDexを共存させた検体でのみ増大し、血液にHb小胞体あるいは血液にDexを添加した検体では干渉を認めなかった。このことから、Hb小胞体にDexを添加することにより遊離脂肪酸として検出される成分が増大したと考えられ、遊離脂肪酸についてはDexを添加しない方が正確な測定値が得られている。

凝固線溶検査ではHb小胞体の存在によりATIIIで上昇、トータルPAI-1で低下を示し、その他FDP、D-ダイマーを除くすべての検査で測定不能と判断された (Table 4)。一方、Hb小胞体浮遊血液にDexを添加し遠心分離で除去した血漿では、vWF活性の低下とトータルPAI-1の上昇を除き干渉作用を回避できた。この2項目では、Hb小胞体の有無に依らず血液に

Dexを添加した場合にも同程度のvWF活性の低下とトータルPAI-1の上昇を認めることから、Dexの添加が干渉作用の原因と考えられる。これらの項目については他の方法を模索する必要がある。糖尿病関連検査に関してはグルコース、Hb_{A1C}ともにHb小胞体の影響を受けずに測定可能であった (Table 5)。本研究では、一回の測定であるが多くの項目でHb小胞体の干渉作用を回避できる効果が示された。生化学・免疫学検査や凝固線溶検査は人工酸素運搬体の安全性を評価する上でも重要な検査項目であり^{25, 26)}、今後はこの方法で測定検体を増やし、統計的に信頼性を解析すると共に、Hb小胞体の投与が想定される各種病態における血液検体における評価も必要に応じて実施する必要がある。

4. 結論

Hb小胞体が混在する血液検体では、通常の遠心により血液検査に適した血漿を得ることができず、多くの項目で測定が干渉される。一方、Dex (分子量400～500 kDa) の添加 (終濃度: 2.6g/dL) により、従来通りの遠心で血清または血漿が得られる。生化学・免疫学検査、凝固線溶検査、糖尿病関連検査の大部分

の検査項目について干渉作用なく測定できることが確認され、Hb小胞体投与後の血液検体検査が容易になると考える。ただし、Dex添加の影響により生化学検査ではリポプロテイン (A) の低下、凝固検査ではvWF活性の低下、トータルPAI-1の上昇が見られているので、これらの項目については注意を要す。

謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）によって行われた。記して謝意を表す。

参考文献

1. Ma Z, Monk TG, Goodnough LT, McClellan A, Gawryl M, Clark T, Moreira P, Keipert PE, Scott MG. Effect of hemoglobin- and Perflubron-based oxygen carriers on common clinical laboratory tests. *Clin Chem* 1997;43:1732-1737.
2. Callas DD, Clark TL, Moreira PL, Lansden C, Gawryl MS, Kahn S, Bermes EW Jr. In vitro effects of a novel hemoglobin-based oxygen carrier on routine chemistry, therapeutic drug, coagulation, hematology, and blood bank assays. *Clin Chem* 1997;43:1744-1748.
3. Ali AC, Campbell JA. Interference of o-raffinose cross-linked hemoglobin with routine Hitachi 717 assays. *Clin Chem* 1997;43:1794-1796.
4. Alonzoana GL, Elfath MD, Mackenzie C, Gregory LC, Duh SH, Trump B, Christenson RH. In vitro interference of the red cell substitute pyridoxalated hemoglobin-polyoxyethylene with blood compatibility, coagulation, and clinical chemistry testing. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 1997;11:845-850.
5. Kazmierczak SC, Catrou PG, Best AE, Sullivan SW, Briley KP. Multiple regression analysis of interference effects from a hemoglobin-based oxygen carrier solution. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:453-64.
6. Wolthuis A, Peek D, Scholten R, Moreira P, Gawryl M, Clark T, Westerhuis L. Effect of the hemoglobin-based oxygen carrier HBOC-201 on laboratory instrumentation: cobas integra, chiron blood gas analyzer 840, Sysmex SE-9000 and BCT. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:71-6.
7. Chance JJ, Norris EJ, Kroll MH. Mechanism of interference of a polymerized hemoglobin blood substitute in an alkaline phosphatase method. *Clin Chem* 2000;46:1331-1337.
8. 酒井宏水, 富山賢一, 政田陽平, 武岡真司, 堀之内宏久, 小林紘一, 土田英俊. 酸素輸液（ヘモグロビン小胞体）を含有する血清の生化学的検査. *人工血液* 2002;10:47-53.
9. Sakai H, Tomiyama K, Masada Y, Takeoka S, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Pretreatment of serum containing hemoglobin vesicles (oxygen carriers) to prevent their interference in laboratory tests. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:222-231.
10. Jahr JS, Osgood S, Rothenberg SJ, Li QL, Butch AW, Gunther R, Cheung A, Driessen B. Lactate measurement interference by hemoglobin-based oxygen carriers (Oxyglobin, Hemopure, and Hemolink). *Anesth Analg* 2005;100:431-436.
11. Osgood SL, Jahr JS, Desai P, Tsukamoto J, Driessen B. Does methemoglobin from oxidized hemoglobin-based oxygen carrier (hemoglobin Glutamer-200) interfere with lactate measurement (YSI 2700 SELECT Biochemistry Analyzer)? *Anesth Analg* 2005;100:437-9.
12. Björkholm M, Fagrell B, Przybelski R, Winslow N, Young M, Winslow RM. A phase I single blind clinical trial of a new oxygen transport agent (MP4), human hemoglobin modified with maleimide-activated polyethylene glycol. *Haematologica* 2005;90:505-515.
13. Moon-Massat PF, Tierney JP, Hock KG, Scott MG. Hitachi Hemolytic Index correlates with HBOC-201 concentrations: impact on suppression of analyte results. *Clin Biochem* 2008;41:432-5.
14. Cameron SJ, Gerhardt G, Engelstad M, Young MA, Norris EJ, Sokoll LJ. Interference in clinical chemistry assays by the hemoglobin-based oxygen carrier, Hemospan ((R)). *Clin Biochem* 2009;42:221-224.
15. Ali AA, Ali GS, Steinke JM, Shepherd AP. Co-oximetry interference by hemoglobin-based blood substitutes. *Anesth Analg* 2001;92:863-9.
16. Shepherd AP, Steinke JM. CO-oximetry interference by perflubron emulsion: comparison of hemolyzing and nonhemolyzing instruments. *Clin Chem* 1998;44:2183-90.
17. Hughes GS, Francom SF, Antal EJ, Adams WJ, Locker PK, Yancey EP, Jacobs EE. Effects of a novel hemoglobin-based oxygen carrier on percent oxygen saturation as determined with arterial blood gas analysis and pulse oximetry. *Ann Emerg Med* 1996;27:164-9.
18. Lurie F, Driessen B, Jahr JS, Reynoso R, Gunther RA. Validity of arterial and mixed venous oxygen saturation measurements in a canine hemorrhage model after resuscitation with varying concentrations of hemoglobin-based oxygen carrier. *Anesth Analg* 2003;96:46-50.
19. Chan FP, Jahr JS, Driessen B, Daunt DA, Li KC. Validation of in vivo MR measurement of oxygen saturation after resuscitation with a hemoglobin-based oxygen carrier in a rabbit model. *Acad Radiol* 2001;8:583-90.
20. 池田達彦, 堀之内宏久, 井澤菜緒子, 泉陽太郎, 河野光智, 渡辺真純, 川村雅文, 酒井宏水, 土田英俊, 小林紘一, Beagle犬

を用いた50%脱血ショックにおけるHb小胞体の蘇生効果
および酸素運搬能の評価, 第13回日本血液代替物学会アブ
ストラクト, 人工血液 2006;14:21.

21. Sunamoto J, Iwamoto K, Kondo H, Shinkai S. Liposomal membranes. VI. Polysaccharide-induced aggregation of multilamellar liposomes of egg lecithin. *J Biochem* 1980;88:1219-26.
22. Meyuhas D, Nir S, Lichtenberg D. Aggregation of phospholipid vesicles by water-soluble polymers. *Biophys J* 1996;71:2602-12.
23. Takeoka S, Sou K, Arase S, Ohgushi T, Tsuchida E. Critical

molecular weight effects in the aggregation of phospholipid vesicles triggered by water-soluble polymers and an integrated glycolipid. *Macromolecules* 1996;29:8132-8136.

24. Sakai H, Sato A, Takeoka S, Tsuchida E. Rheological properties of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) suspended in a series of plasma-substitute solutions. *Langmuir* 2007;17;23:8121-8.
25. 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.
26. 高折益彦. 酸素運搬体の臨床治験へ. 人工血液 2004;12:67-73.

膠質浸透圧特性に基づいた周術期の ハイドロキシエチルスターチ製剤の選択: 体液動態シミュレーションによる分析

Perioperative Choice of Hydroxyethyl Starch Solutions Based on Colloid Osmotic Properties: Analysis Using Fluid Dynamics Simulation

多田羅 恒雄

Tsuneo Tatara

和文抄録

代用血漿剤の血漿増量効果は、代用血漿剤の膠質浸透圧（COP）と各種病態における毛細血管の血管内皮細胞間隙の大きさに依存する。ハイドロキシエチルスターチ（HES）製剤に含まれる膠質の分子量は分布幅を持っているため、HESのCOPは時間に依存したパラメータである。つまり、血管内皮細胞間隙より大きなHES分子は有効なCOPを維持するのに対し、血管内皮細胞間隙より小さなHES分子は一過性にCOPを発揮する。重量平均分子量70,000（HES 70）、130,000（HES 130）、200,000（HES 200）、670,000（HES 670）の6% HESのCOPを*in vitro*で測定すると、分画分子量1,000の半透膜を使用した時は、HES 70が最も高いCOP（80 mmHg）を発揮したのに対し、分画分子量50,000の半透膜を使用した時のこれらHESのCOPはほぼ同一（16～20 mmHg）であった。Microvascular exchange modelに基づいた体液動態シミュレーションでは、毛細血管の透過性が正常な状態では、HES 70、HES 130、HES 200の血漿増量効果はほぼ同様であった。しかし、血管透過性が亢進した開腹手術時の急性出血に対して、HES 200は、HES 70とHES 130にくらべて緩徐ではあるが持続の長い血液量回復効果を発揮した。

Abstract

Volume expanding effects of plasma substitutes depend not only on their colloid osmotic pressure (COP) but also on capillary permeabilities in various clinical conditions. Given that hydroxyethyl starch (HES) solutions are all polydisperse regarding their molecular weights, COP of HES is a time-dependent parameter. HES molecule the radius of which is larger than that of capillary pore maintains effective COP, while small HES molecule exerts COP only transiently. The *in vitro* COP measurement for 6% HES of weight average molecular weight 70,000 (HES 70), 130,000 (HES 130), 200,000 (HES 200), and 670,000 (HES 670) showed that COP of these HES were comparable with semipermeable membrane of molecular weight cut-off 50,000 (16-20 mmHg), while HES 70 exerted highest COP (80 mmHg) with semipermeable membrane of molecular weight cut-off 1,000. The fluid volume simulation based on microvascular exchange model showed that volume expanding effects of HES 70, HES 130, and HES 200 were similar in the normal capillary integrity. However, after acute hemorrhage during abdominal surgery with capillary leakage, HES 200 showed a slow but long-lasting restoration of blood volume compared to HES 70 and HES 130.

Keywords

Plasma substitute, Fluid volume, Plasma, Interstitium, Hemorrhage, Injury

はじめに

代用血漿剤は、周術期における血漿量維持のために広く使用されている。特に、ハイドロキシエチルスターチ (hydroxyethyl starch, HES) は、デキストラン (dextran, DEX) に比べてアレルギー反応が少ないため、臨床において最も使用されている。しかし、現在日本で臨床使用可能な HES は、重量平均分子量が 70,000 のものに限定されており、中・高分子量 (重量平均分子量: 130,000 ~ 670,000) の HES を使用する欧米に比べ、その選択性はきわめて限られている。しかし、今後数年以内に日本でも重量平均分子量 130,000 および 670,000 の HES が市販される見込みである。これに伴い、臨床における HES 選択の余地は大きくひろがることになるが、逆に「どのような場合にどの HES を選択するのか」という問題に直面することになる。本稿では、「出血」と「血管透過性亢進」という周術期の典型的な病態において、体液動態シミュレーションモデルを使ってこの問題にアプローチする。特に、HES の分子量の違いに基づく膠質浸透圧特性が周術期の体液動態におよぼす影響に焦点をあてる。

1. 代用血漿剤の膠質浸透圧特性

代用血漿剤に含まれる膠質分子は、イオンや糖などの低分子にくらべて毛細血管の血管内皮細胞間隙を透過しにくいいため、血漿と細胞間質間に膠質浸透圧 (colloid osmotic pressure, COP) が発生する。この結果、代用血漿剤は晶質液にくらべて血管内により多くの水をとどめることにより血漿増量効果を発揮する。しかし、ここで重要なことは、「血管内皮細胞間隙を透過しない膠質分子のみが有効な COP を発揮する」ということである。つまり、代用血漿剤に含まれる膠質は人工合成されているため、その分子量は均一ではなく、ある程度の分布幅

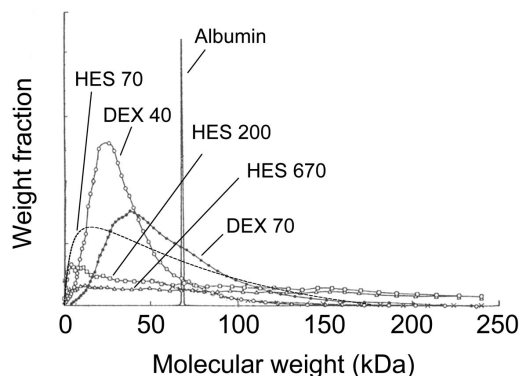


Fig. 1. Molecular weight distribution of plasma substitutes. HES 70: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 70,000; DEX 40: dextran of weight average molecular weight 40,000; HES 200: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 200,000; HES 670: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 670,000; DEX 70: dextran of weight average molecular weight 70,000. Molecular weight distribution for HES 70 was theoretically derived based on a statistical model describing a probability distribution for molecular weight. Cited in part from "Arfors K-E, Buckley PB. Pharmacological characteristics of artificial colloids. Baillière's Clinical Anesthesiology 1997;11:15-47."

(polydispersity) を有している¹⁾。この分子量の分布パターンは、代用血漿剤によって大きく異なり (Fig. 1)、代用血漿剤に含まれるすべての膠質分子が有効な COP を発揮するわけではない。また、膠質分子にとって半透膜となる血管内皮細胞間隙の大きさも臓器や部位によって異なり、また同一部位においても炎症などの病態により大きく変化する。このように、代用血漿剤に含まれる膠質分子、血管内皮細胞間隙のいずれの大きさにも「不均一性」が存在することが、様々な病態において代用血漿剤を適切に選択する際のキーポイントとなる。

① 膠質分子量の分布

代用血漿剤に含まれる膠質の分子量は、通常、重量平均分子量により記述される。代用血漿剤に含まれるすべての膠質分子をその分子量にしたがって分類し、分子量が M_i である分子の重量分率 (分子量が M_i であるすべての分子の総重量/代用血漿剤に含まれるすべての膠質分子の総重量の比) を w_i とすると、重量平均分子量 (M_w)、数平均分子量 (M_n) は、それぞれ

$$M_w = \sum_i (w_i \cdot M_i)$$

$$M_n = \frac{1}{\sum_i (w_i / M_i)}$$

と表される。重量平均分子量は、重量分率による平均であるため高分子量成分の影響を受けるのに対し、数平均分子量は、溶液中の膠質の総重量を分子の個数で割ったものであるため、低分子量成分の影響を敏感に受ける。

代用血漿剤に含まれる膠質分子の分子量分布は、重量平均分子量/数平均分子量の比により表され、この数値が大きいほど分子量分布が広い。たとえば、重量平均分子量がともに 70,000 である DEX (DEX 70) と HES (サリンヘス[®], フレゼニウス・カービー・ジャパン, HES 70) の数平均分子量は、それぞれ 41,000 と 19,000 であり、重量平均分子量/数平均分子量の比はそれぞれ 1.7, 3.7 となる (Table 1)。つまり、Fig. 1 からわかるように HES 70 は DEX 70 に比べて低分子量の膠質を多く含んでいる。この分子量分布のため、代用血漿剤に含まれる膠質分子のうち、血管内皮細胞間隙よりも大きい分子は血管内皮細胞間隙を透過せず有効な COP を発揮するのに対し、血管内皮細胞間隙よりも小さい分子は血管内皮細胞間隙を透過するため有効な COP を有さない。近年、欧州において開発された重量平均分子量が 130,000 の HES (Voluven[®], Fresenius Kabi, HES 130) は、アレルギー反応の原因となる非常に大きな分子量の膠質分子と血管内皮細胞間隙を容易に透過するため有効な浸透圧を発揮しない非常に小さな分子量の膠質分子を排除することにより、分子量分布の幅を狭めている²⁾。

② 膠質分子の大きさ

代用血漿剤に含まれる膠質分子は異なった分子量分布を有し、またその形状が代用血漿剤により異なるため、膠質分子の大きさを単純にその平均分子量により比較できない。このため、

Table 1. Comparison of plasma substitutes in terms of molecular weight

Colloid	M_w (daltons)	M_n (daltons)	M_w/M_n ratio
DEX 40	40,000	25,000	1.6
DEX 70	70,000	41,000	1.7
HES 70	70,000	19,000	3.7
HES 130	130,000	not available	not available
HES 200	200,000	not available	not available
HES 670	670,000	69,000	9.7

M_w : weight average molecular weight; M_n : number average molecular weight.

DEX 40: dextran of weight average molecular weight 40,000 (low molecular weight dextran 40®, Otsuka Pharmaceutical); DEX 70: dextran of weight average molecular weight 70,000; HES 70: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 70,000 (Salinhes®, Fresenius Kabi Japan); HES 130: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 130,000 (Voluven®, Fresenius Kabi); HES 200: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 200,000 (HAES-steril®, Fresenius Kabi); HES 670: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 670,000 (Hetastarch®, Hospira, previously described as HES 450).

Cited in part from "Traylor RJ, Pearl RG. Crystalloid versus colloid: all colloids are not created equal. Anesth. Analg 1996;83:209-12."

通常、膠質分子の大きさの比較には、水中における膠質分子の拡散速度から計算した流体力学的分子半径（Stokes-Einstein radius, SE半径）が用いられる。DEXのSE半径については、下記の近似式がある³⁾。

$$R = 0.033 \cdot M^{0.463} \quad (1)$$

ここで、 R はDEXのSE半径（nm）、 M はDEXの（重量平均）分子量（Da）である。式（1）を使用して求めた重量平均分子量が40,000であるDEX（低分子デキストランL注®, 大塚製薬工場, DEX 40）およびDEX 70のSE半径は、それぞれ、4.5 nm, 5.8 nmとなる（Fig. 2）。

一方、膠質分子のSE半径は、分子が球形であると仮定して次の関係式により膠質溶液の固有粘度からも近似的に求められる⁴⁾。

$$R = \left(\frac{3[\eta]M}{10\pi N} \right)^{1/3} \cdot 10^7 \quad (2)$$

ここで、 R は膠質分子のSE半径（nm）、 $[\eta]$ は膠質溶液の固有粘度（cm³/g）、 M は膠質分子の（重量平均）分子量（Da）、 N はAvogadro定数（ 6.02×10^{23} , mol⁻¹）である。HESのSE半径については文献的資料が得られないため、著者が毛細管粘度計を用いて測定したHESの固有粘度を式（2）に代入して求めたSE半径をFig. 2に示す。比較のため、DEXのSE半径を粘度法により求めたところ、DEX 40については4.6 nmと式（1）により求めた値とほぼ一致したが、DEX 70については6.5 nmとなり式（1）により求めた値をやや上回った。

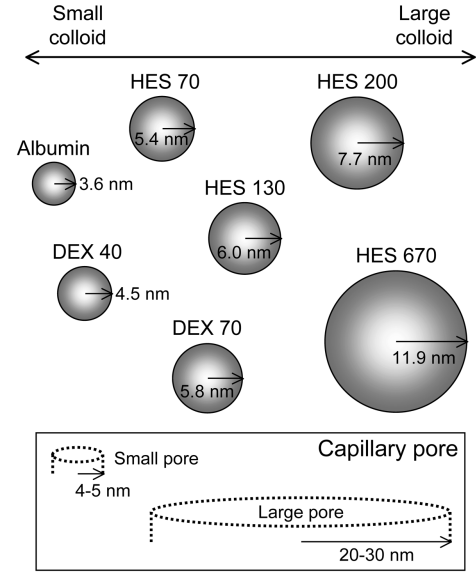


Fig. 2. Stokes-Einstein radius of plasma substitutes. DEX 40: dextran of weight average molecular weight 40,000; DEX 70: dextran of weight average molecular weight 70,000; HES 70: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 70,000; HES 130: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 130,000; HES 200: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 200,000; HES 670: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 670,000. Stokes-Einstein radius of plasma substitute (denoted by the number in nm) was obtained from equations in the text for dextran, and from intrinsic viscosity of plasma substitute for hydroxyethyl starch. Stokes-Einstein radius of albumin was cited from "Venturoli D, Rippe B. Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: effects of molecular size, shape, charge, and deformability. Am J Physiol 2005;288:F605-13." The radius of capillary pore (denoted by the number in nm) was cited from "Michel CC, Curry FE. Microvascular permeability. Physiol Rev 1999;79:703-61."

予想されるように、代用血漿剤の中では、DEX 40の分子半径が最も小さく、重量平均分子量が670,000であるHES（Hetastarch®, Hospira, HES 670）の分子半径が11.9 nmと最大になる。また、DEX 70とHES 130を比較した場合、HES 130の重量平均分子量はDEX 70のほぼ2倍であるにもかかわらず、分子半径はわずか0.2 nmしか異なる。代用血漿剤の分子半径をFig. 2に付記した血管内皮細胞間隙の大きさ⁵⁾と比較すると、DEX 40はsmall poreを比較的自由に透過すると予想される。HES 70の分子半径はsmall poreのサイズとほぼ同じであるため、ある程度の膠質分子がsmall poreを透過する。これに対し、DEX 70, HES 130, 重量平均分子量が200,000であるHES（HAES-steril®, Fresenius Kabi, HES 200）, HES 670はsmall poreを透過しにくいと予想される。一方、いずれの代用血漿剤もlarge poreを自由に透過する。これらの結果は、ハムスターの骨格筋において、DEX 40が血管内皮細胞表面層（endothelial surface layer, ESL）を容易に透過したのに対し、DEX 70はESLを透過しなかったという知見⁶⁾と一致する。

注意すべきことは、アルブミンの分子半径がDEX 40よりも

小さいことである。生体内では、アルブミンが有する負電荷がESLの負電荷と反発するため、アルブミンは血管内皮細胞間隙を透過しにくい⁶⁾。つまり、電荷を持たない代用血漿剤については、膠質分子の大きさが血管内皮細胞間隙の透過性を決定するが、電荷（アルブミンなど）や極性（ゼラチンなど）を持った膠質分子の場合は、分子の大きさだけでなく、膠質分子とESLの負電荷との相互作用が血管内皮細胞間隙の透過性を決定する重要な因子となる⁷⁾。

③ 膠質浸透圧の動的特性

半透膜を介した代用血漿剤のCOPは、代用血漿剤が、
a) どのくらい多くの膠質分子を含むか？
b) どのくらい多くの大きな膠質分子 (non-permeating colloid) が、半透膜を透過せずに溶液内に残存するか？
c) どのくらい多くの小さな膠質分子 (permeating colloid) が、どのくらい速く半透膜を透過するか？
により決まる⁷⁾。つまり、代用血漿剤のCOPは、静的なパラメ

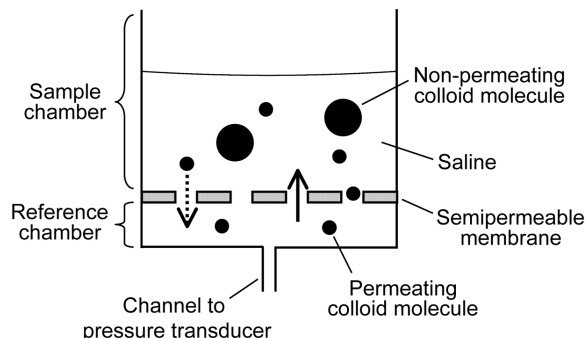


Fig. 3. Schematic representation of osmotic flow cell for measurement of colloid osmotic pressure. Water flows from the reference chamber to the sample chamber due to the osmotic force exerted by the colloid molecules (thick arrow). Permeating (i.e., small) colloid molecules diffuse from the sample chamber to the reference chamber (dotted arrow). Cited from "Tatara T, Tashiro C. Analysis using a linear viscoelastic model of the in vitro osmotic kinetics of polydisperse synthetic colloids. Biomacromolecules 2005;6:1732-8."

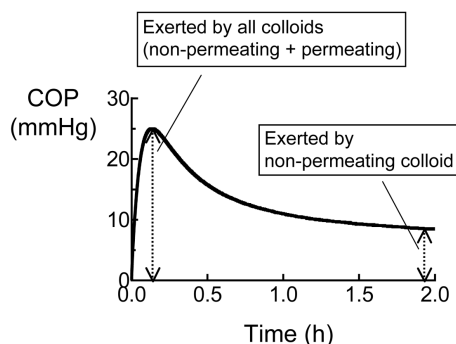


Fig. 4. Typical time-course of colloid osmotic pressure for polydisperse colloid. The data shows colloid osmotic pressure for 6% dextran of weight average molecular weight 40,000 using the osmotic flow cell with semipermeable membranes of molecular weight cut-off 50,000. COP: colloid osmotic pressure.

ータではなく、経時変化を伴った動的パラメータである。著者が作成した膠質浸透圧計 (Fig. 3)⁸⁾ を用いて、代用血漿剤のCOPを経時的に測定すると、COPは時間により大きく変化する⁷⁾。たとえば、分画分子量（この値以上の分子量の分子を透過させない）50,000の半透膜（日本ミリポア社 限外ろ過ディスク PBQK, 孔の推定半径: 4.8 nm)⁹⁾ を用いて6% DEX 40のCOPを測定すると、COPは最初の約10分間に25 mmHg程度まで急上昇した後に徐々に低下し、約8 mmHgで一定となった (Fig. 4)。この一過性の浸透圧上昇には、分画分子量より小さい膠質分子 (permeating colloid) が関与している。つまり、低分子量の膠質分子は一時的にCOPを発揮するが、これらの膠質分子が半透膜を透過するのにしたがって、これらの膠質分子に起因するCOPが徐々に消失する。一方、最終的な平衡状態におけるCOPは半透膜を透過しない大きな膠質分子 (non-permeating colloid) により引き起こされる。

HESのCOPを半透膜の分画分子量を変えて測定すると、COPの経時変化パターンは分画分子量によって異なる。分画分子量1,000の半透膜（日本ミリポア社 限外ろ過ディスク PLAC, 孔の推定半径: 1.3 nm)⁹⁾ を使用した場合、HESに含まれる膠質分子のほとんどが半透膜を透過しないため、COPは徐々に上昇した後平衡に達し、その後もこの値を維持した (Fig. 5, 上図)。一方、血管内皮細胞間隙に近い大きさの孔を有する半透膜（分画分子量50,000, 孔の推定半径: 4.8 nm) を使用すると、HESのCOPは、いったん上昇した後、徐々に低下した (Fig. 5, 下図)。COPの最初の立ち上がりが急峻なの

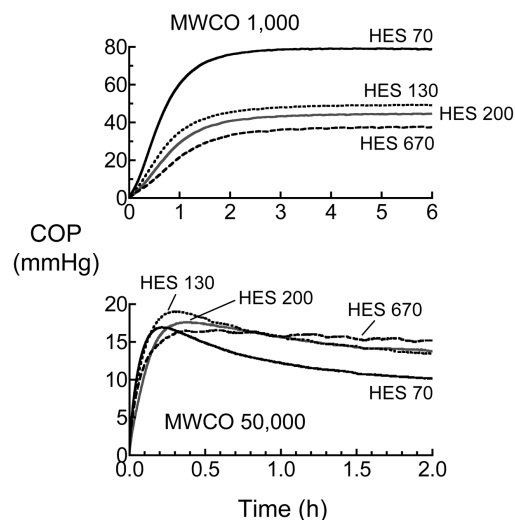


Fig. 5. Representative recordings of colloid osmotic pressure for 6% hydroxyethyl starch solutions using the osmotic flow cell with semipermeable membranes of molecular weight cut-off 1,000 (upper panel) and 50,000 (lower panel). COP: colloid osmotic pressure; MWCO: molecular weight cut-off; HES 70: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 70,000; HES 130: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 130,000; HES 200: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 200,000; HES 670: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 670,000.

はHES 70である。これは、HES 70に多く含まれる小さな膠質分子が、一過性ではあるが急激に浸透圧活性を発揮するためである。一方、HES 200とHES 670は、分画分子量より小さな膠質分子をわずかしかな含まないため、COPが最高値を示した後のCOPの低下が小さい。しかし、HES 200とHES 670は、HES 70とHES 130にくらべてCOPの最初の立ち上がりが遅い。つまり、HES 200とHES 670は、HES 70とHES 130にくらべて緩徐に浸透圧活性を発揮する。これは、浸透圧が引き起こす水移動が半透膜表面における膠質-水交換過程に基づいており、膠質分子が大きいほどこの膠質-水交換速度が低下するためである⁷⁾。

6% HESのCOPの最高値を分画分子量が異なる半透膜間で比較した (Fig. 6)。溶質が半透膜をほとんど透過しない場合、溶液の浸透圧は基本的に溶液に含まれる溶質の数により決まるため、COPは代用血漿剤に含まれる膠質分子の総数を反映する。つまり、分画分子量 1,000の半透膜 (孔の推定半径: 1.3 nm) を使用して測定したCOPは、小さな膠質を多く含むHES 70で最大となり (80 mmHg), HES 130, HES 200, HES 670の順に小さくなった。しかし、正常時の血管内皮細胞間隙に近い大きさの孔を有する半透膜 (分画分子量50,000, 孔の推定半径: 4.8 nm) を使用すると、HES 70は16 mmHg, HES 130とHES 200は20 mmHg, HES 670は18 mmHgのCOPとなり、COPの大きさの順序が逆転した。さらに大きいサイズの孔を有する半透膜 (分画分子量100,000, 日本ミリポア社 限外ろ過ディスク PBHK, 孔の推定半径: 6.2 nm)⁹⁾ を使用すると、HES 70とHES 130はほとんどCOPを生じなかったが、HES 200とHES 670は2~3 mmHgのCOPを発揮した。

このように代用血漿剤のCOPの経時変化が半透膜の分画

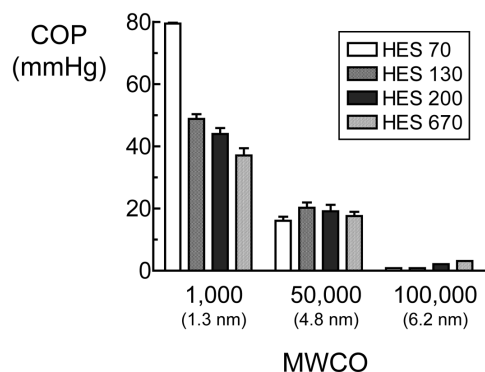


Fig. 6. Comparison of peak colloid osmotic pressure for 6% hydroxyethyl starch solutions using the osmotic flow cell with semipermeable membranes of molecular weight cut-off 1,000, 50,000 and 100,000. COP: colloid osmotic pressure; MWCO: molecular weight cut-off; HES 70: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 70,000; HES 130: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 130,000; HES 200: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 200,000; HES 670: hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 670,000. The numbers in the parenthesis denote estimated pore radius of semipermeable membranes. The measurements were carried out at room temperature in duplicate.

子量に依存することは、生体内における代用血漿剤の血漿増量効果を考える上で非常に重要である。つまり、炎症により毛細血管の血管内皮細胞間隙が拡大すると、より多くの膠質分子が有効なCOPを発揮しなくなることになり、正常時の代用血漿剤の浸透圧特性を炎症時の体液動態にそのまま適用することはできない。

2. 体液動態シミュレーション

では、これら代用血漿剤の浸透圧特性は、臨床における体液動態にどのように反映されるのだろうか。臨床研究では、研究条件、たとえば、手術の規模・時間、輸液量・投与速度、輸液剤の種類などが異なるため、周術期における代用血漿剤の適切な使用方法について統一した見解を得ることは困難である。これに対し、コンピュータを用いたシミュレーションでは、研究条件を自由に変更することにより各体液分画の体液量変化をリアルタイムに分析することができる。モデルに使用するパラメータ値の多くが動物での値であることやパラメータ値が対象者により異なることから体液量の絶対値の信頼性は高くないが、その相対値、つまり経時変化や異なる研究条件間の比較にシミュレーションは威力を発揮する¹⁰⁾。ここでは、生理学的な体液動態モデルを用いたシミュレーションにより、様々な条件下における代用血漿剤投与時の体液動態を分析する。

① モデルの作成

体液動態シミュレーションに使用するモデルは、Bertら¹¹⁾, Gyengeら¹²⁾により提唱された生理学的モデル (microvascular exchange model) である。このモデルでは、各体液分画間の水・溶質 (イオン、タンパク質) の移動を数式化し、時間につ

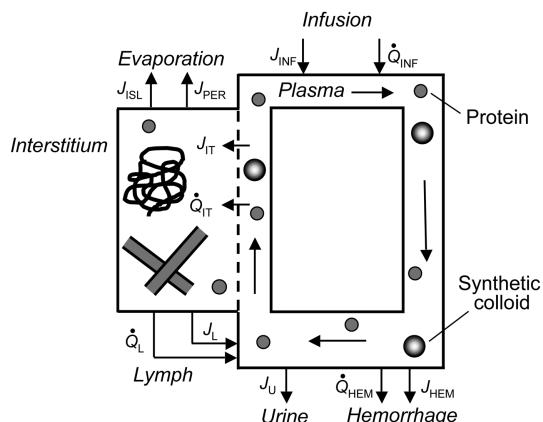


Fig. 7. Schematic diagram showing the compartmental model of the body and the relevant mass flows of fluid, protein and synthetic colloid in the normal state. J_{HEM} : hemorrhage rate; J_{INF} : fluid infusion rate; J_{ISL} : insensible water losses; J_{IT} : rate of fluid transfer from plasma to interstitium; J_L : rate of fluid transfer from interstitium to lymphatics; J_{PER} : perspiration rate; J_U : rate of urine production; $\dot{Q}_{HEM}$: rate of protein or synthetic colloid transfer by hemorrhage; $\dot{Q}_{INF}$: rate of protein or synthetic colloid transfer by fluid infusion; $\dot{Q}_{IT}$: rate of protein or synthetic colloid transfer from plasma to interstitium; $\dot{Q}_L$: rate of protein or synthetic colloid transfer from interstitium to lymphatics.

いての微分方程式を解くことにより、体液量の変化量を経時的に算出することができる。周術期の体液変化は主として細胞外液の変化であることから、今回は、彼らのモデルを簡略化し、血漿、細胞間質液の変化のみを考慮した (Fig. 7)。さらにリンパ流、尿排泄、不感蒸発を考慮し、各体液分画間の水、タンパク質、代用血漿剤に含まれる膠質の移動に関する数式を作成した。数式の詳細については、文献^{13,14)}を参照していただきたい。正常状態におけるモデルパラメータの値を Table 2 に示す。なお、今回のシミュレーションはすべて体重 70 kg の男性を対象として行った。

Table 2. Normal steady-state values for fluid and protein in the compartments and parameters related to capillary exchange, lymphatics and kidney in a 70 kg male¹¹⁻¹⁴⁾

Variables	Values
Plasma volume (mL)	3200
Hematocrit (%)	40
Interstitial volume (mL)	8400
Plasma hydrostatic pressure (mmHg)	11
Plasma protein concentration (g/mL)	0.07
Interstitial protein concentration (g/mL)	0.0298
Reflection coefficient for protein	0.875
Fluid filtration coefficient (mL·mmHg ⁻¹ ·h ⁻¹)	321.4
Permeability-surface area product for protein (mL/h)	200.7
Lymph flow sensitivity (mL·mmHg ⁻¹ ·h ⁻¹)	43.1
Lymph flow rate (mL/h)	75.7
Rate of urine production (mL/h)	60.0

② モデルにおける仮定

体液動態シミュレーションを施行するには、次のような仮定 (モデルの簡略化) が必要となる。

a) 毛細血管内の静水圧は、血漿量の増減に比例して増減する。実際には、毛細血管内の静水圧は、心拍出量や血圧の変動により変化し、さらに毛細血管の動脈側の括約筋が収縮するとその遠位側の血管内静水圧が低下する²⁾。

b) 血漿タンパク質は、すべてアルブミンと同じ特性 (分子量など) を持つ。
血漿の膠質浸透圧は、血漿総タンパク質濃度の関数として計算した¹³⁾。

c) 正常時における毛細血管壁の水および高分子 (タンパク質、代用血漿剤に含まれる膠質分子) に対する透過性は、生体内で均一である。

血管内皮細胞間隙の多くは continuous capillary に存在する small pore であるが、残りは venule に存在する large pore である (Fig. 8)¹⁵⁾。Small pore と large pore の数の比率は、4,000 : 1 (骨格筋) から 1,000 : 1 とされている⁵⁾。血管内皮細胞間隙は

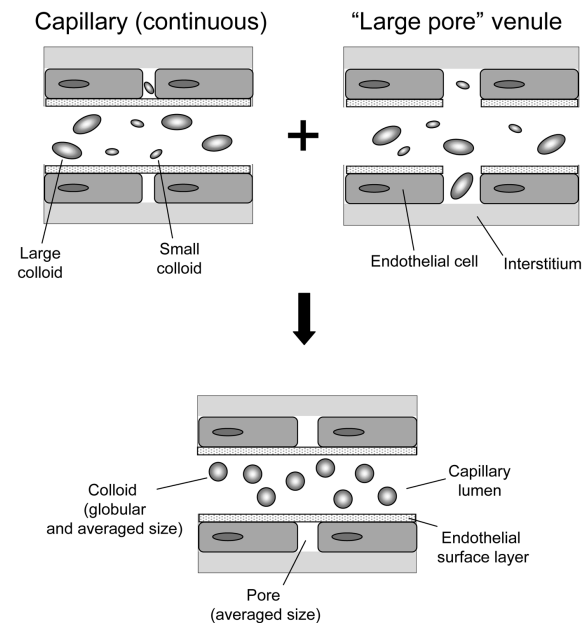


Fig. 8. Schematic representation of permeation of polydisperse colloids through pores of different size in vascular beds. The fluid distribution simulation assumed that polydisperse colloids were globular molecules of averaged size, and pores in vascular beds had averaged radii. Cited and modified from "Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Stoeckelhuber M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. The endothelial glycocalyx affords compatibility of Starling's principle and high cardiac interstitial albumin levels. Cardiovasc Res 2007;73:575-86."

フリーなスペースではなく、血管内皮細胞表面の糖鎖ゲルからなる ESL が血管内皮細胞間隙を介した水および膠質移動を決定している (Fig. 8)。Continuous capillary における ESL の厚みは、0.5 μm 程度であるのに対し、venule における large pore は ESL を欠いている。したがって、ほとんどの膠質は large pore を自由に透過し細胞間質に分布する¹⁵⁾。体液動態シミュレーションにおいては、全身における平均的な血管内皮細胞間隙の半径 (7.6 nm) を仮定し、この半径と膠質分子の SE 半径の関係から毛細血管壁における膠質の反発係数を算出した。

d) 尿生成速度は、血漿量の増減に比例して増減する。

実際には、尿生成速度は腎血流量に依存し、出血や手術侵襲時に増加するストレスホルモンは、尿生成を抑制する。

e) 代用血漿剤に含まれる膠質分子の大きさは均一である。
代用血漿剤に含まれる膠質の分子量は均一ではないため、シミュレーションにおいてはその平均的な大きさとして SE 半径を使用した。

f) 代用血漿剤に含まれる膠質分子の生体内における代謝および腎排泄は考慮しない。

代用血漿剤に含まれる低分子量 (50,000 ~ 60,000 以下) の膠質分子は、投与直後から腎臓からすみやかに排泄される²⁾。また、HES の高分子量成分は、血液中的のアミラーゼによって数時間のうちに低分子量の膠質分子に分解される²⁾。たとえば、ヒトに HES 70 1,000 mL を 1 時間かけて投与した際、投与終了 1 時間

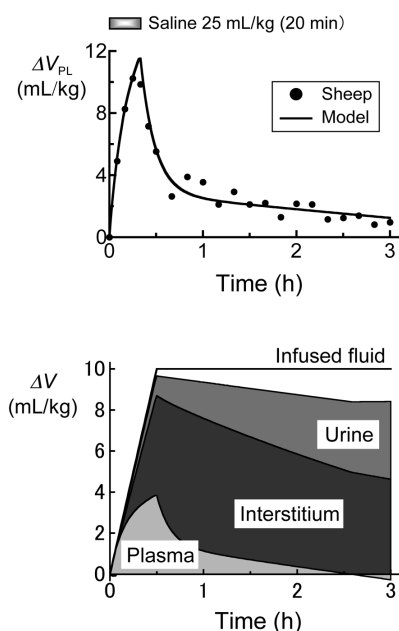


Fig. 9. Plasma volume changes during saline infusion of 25 mL/kg over 20 min (upper panel) and fluid distribution during saline infusion of 10 mL/kg over 30 min (lower panel) in a simulated 70 kg male. ΔV_{PL} : plasma volume change relative to baseline; ΔV : volume change relative to baseline. Filled circles denote experimental data in sheep and the solid line denotes the model-fitted curve (upper panel). Cited from "Tatara T, Tashiro C. Quantitative analysis of fluid balance during abdominal surgery. Anesth Analg 2007; 104: 347-54." The experimental data in sheep was obtained from "Connolly CM, Kramer GC, Hahn RG, Chaisson NF, Svensén CH, Kirschner RA, Hastings DA, Chinkes DL, Prough DS. Isoflurane but not mechanical ventilation promotes extravascular fluid accumulation during crystalloid volume loading. Anesthesiology 2003;98:670-81."

後において投与した HES 70 の 77 %, 投与終了 3 時間後においては 67 % が血管内にとどまっていた¹⁶⁾。このアミラーゼによる HES の分解は、HES のグルコース環の水酸基をハイドロキシエチル基によって置換する度合い (置換度) に依存する。置換度が高いほどアミラーゼによる分解を受けにくくなるため、HES の血中半減期が長くなる²⁾。したがって、置換度が 0.7 である HES 670 に比べて、置換度が 0.5 である HES 70 は、アミラーゼによる分解を受けやすいため、血漿増量効果の持続時間は短くなる。

g) 代用血漿剤は、毛細血管壁における水およびタンパク質の透過性に影響を与えない。

実際には、HES 130 が、炎症時における毛細血管内から細胞間質への水およびタンパク質漏出を減少させることが報告されている¹⁷⁾。

③ 輸液時の血漿量の経時変化

<晶質液>

正常時のヒツジにおける晶質液投与時の血漿量の経時変化¹⁸⁾を体液動態シミュレーションモデルと比較することにより、モ

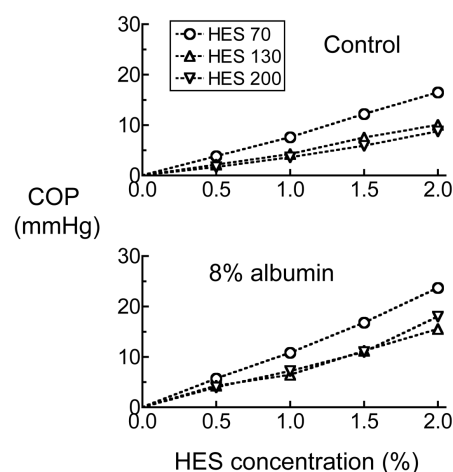


Fig. 10. Colloid osmotic pressure of hydroxyethyl starch (HES) solutions as a function of HES concentrations using the osmotic flow cell with semipermeable membranes of molecular weight cut-off 1,000. The hydroxyethyl starch (HES) solutions were diluted by physiological saline (control, upper panel) or 8 % albumin solution (lower panel). COP: colloid osmotic pressure; HES 70: HES of weight average molecular weight 70,000; HES 130: HES of weight average molecular weight 130,000; HES 200: HES of weight average molecular weight 200,000.

デルに用いる毛細血管の透過性パラメータの最適値を求めた¹³⁾。この結果、シミュレーションモデルが、輸液時の血漿量の経時変化を良好に予測できることがわかった (Fig. 9, 上図)。そこで、このシミュレーションモデルを用いて晶質液 10 mL/kg を 30 分間で投与した時の血漿量、細胞間質液量、尿量の変化を算出した (Fig. 9, 下図)。晶質液投与終了時、血漿量は投与輸液量の約 40 % だけ増加した後、急激に減少した。細胞間質液量は、晶質液投与により徐々に増加し、投与開始 3 時間後、投与輸液量の約 50 % が細胞間質に分布した。最終的に投与輸液量の約 40 % が尿として失われた。つまり、投与された晶質液は、投与終了後約 30 分間で血管内から細胞間質へすみやかに移動し、投与終了 2 時間後では血管内にほとんどとどまらない。

<代用血漿剤>

代用血漿剤投与時の体液動態シミュレーションには、各代用血漿剤の COP 値が必要となる。特に、血漿、細胞間質にはアルブミンが存在するため、アルブミン濃度が代用血漿剤の COP におよぼす影響を調べる必要がある。そこで、臨床的な膠質の血漿濃度 (0.5 % ~ 2 %) において、アルブミン非添加 (コントロール) および 8 % アルブミン添加での HES の COP を分画分子量 1,000 の半透膜を用いて測定した (Fig. 10)。この結果、8 % アルブミン存在下では、コントロールにくらべて、2 % HES の COP は、いずれの製剤でも 5 ~ 10 mmHg 上昇した。これには、アルブミンの排除体積効果 (アルブミンと HES が同一の空間を占めることができないため、HES の実効濃度が上昇する) が関与している。

これらの COP 値を使用して、6 % HES 70 1,000 mL を 1 時間かけて投与した時の血漿量の経時変化 (総輸液量に対する血漿変化量のパーセント) をシミュレーションにより算出した

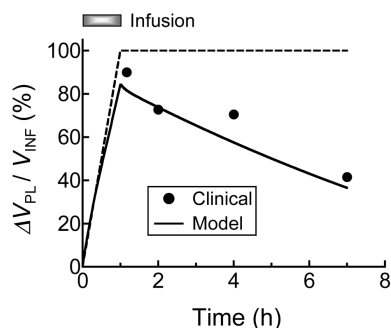


Fig. 11. Plasma volume changes during 1000 mL infusion of 6% hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 70,000 over an hour in a simulated 70 kg male in a normal state. ΔV_{PL} : plasma volume change relative to baseline; V_{INF} : totally infused fluid volume. The dashed line denotes percent of fluid infusion volume relative to totally infused fluid volume. Clinical data in patients hospitalized for minor surgical conditions was cited from "Metcalf W, Papadopoulos A, Tufaro R, Barth A. A clinical physiological study of hydroxyethyl starch. Surg Gynec Obstet 1970;131:255-67."

(Fig. 11). この結果は、小手術予定患者の術前または術後に HES 70 を同条件下で投与した時の血漿量変化¹⁶⁾とおおよそ一致した。HES 70 投与終了 10 分後の血漿量増加が、臨床では 90%とシミュレーションでの値 (82%)をやや上回っているのは、実際には、HES 70 に含まれる小さな膠質分子が一過性に高い浸透圧活性を発揮するためと考えられる。

次に晶質液、5% アルブミン、6% HES (HES 70, HES 130, HES 200) をそれぞれ 15 mL/kg, 30 分間かけて投与した時の血漿および細胞間質液量の経時変化をシミュレーションにより求めた (Fig. 12)。この結果、血漿増量効果は晶質液で最

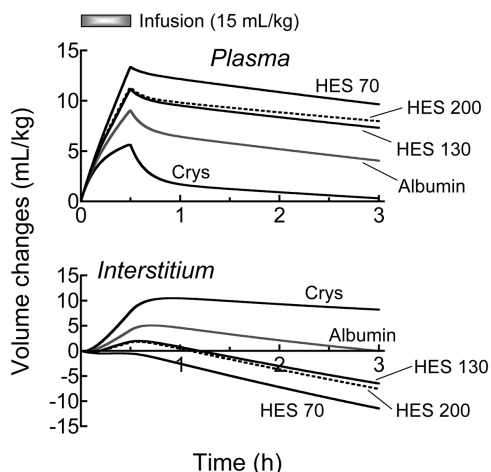


Fig. 12. Time course of changes to plasma and interstitial volume during crystalloid or plasma substitute infusion of 15 mL/kg over 30 min in a simulated 70 kg male in a normal state. Crys: isotonic crystalloid solution; HES 70: 6% hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 70,000; HES 130: 6% hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 130,000; HES 200: 6% hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 200,000; Albumin: 5% albumin solution.

も小さく、投与終了時の血漿増加量は投与量の約 40%であった。一方、HES については、投与終了時の血漿増量効果は、HES 70 において最大であり、投与終了時の血漿増加量は投与量の約 90%となった。HES 70 は小さな膠質分子を多く含むため、実際には投与終了時の血漿増加量はシミュレーション値よりやや高く、逆に投与終了後は、小さな膠質分子の血管外への漏出のためシミュレーションの結果よりすみやかに血漿増量効果は消失すると考えられる。つまり、HES 70 の血漿増量効果は、Fig. 5 に示した HES 70 の COP の経時変化に類似した経過をとる。この結果は、帝王切開を施行された患者において、晶質液および 6% HES 70 を 30 分間でそれぞれ約 25 mL/kg および約 16 mL/kg 投与した際、投与終了時の血漿増加量が、それぞれ投与量の 28% および 100% であった結果¹⁹⁾とおおよそ一致する。HES 130 と HES 200 については、血漿増量効果の経時パターンはほぼ同様であり、投与終了時の血漿増加量は投与量の約 75% で、投与終了後 2.5 時間でも投与量の約 50% が血管内にとどまっていた。この結果は、婦人科手術患者において、手術開始時から手術終了 6 時間後までに血圧、心拍数を安定化させるのに必要であった 6% HES 130 と 6% HES 200 の総量に有意な差がなかったとする報告と一致する²⁰⁾。また、ボランティアにおいて、HES による等容量性血液希釈を行った際のヘマトクリット値の経時変化を HES 70, HES 130, HES 200 間で比較した研究では、異なった HES 間でヘマトクリット値に有意な違いは認められなかった (Fig. 13)²¹⁾。この結果は、これら 3 種類の HES がほぼ同等の血漿増量効果を有していることを示している。HES 投与終了後、ヘマトクリット値が徐々に上昇しているのは、血漿の一部が尿として排泄されるためである (血液濃縮)。

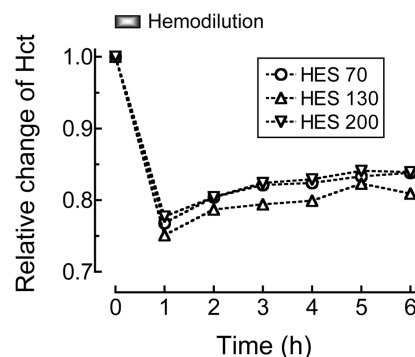


Fig. 13. Relative hematocrit changes during acute normovolemic hemodilution by hydroxyethyl starch solutions in volunteers. Hct: Hematocrit. Within 30 min, volunteer donated 18% of his or her own blood. In parallel, the respective 6% hydroxyethyl starch (HES) solution was infused in a ratio of 1.2:1 to the donated blood volume. There were no statistical differences of hematocrit between different HES groups. The data was cited from "Standl T, Burmeister M-A, Schroeder F, Currlln E, Schulte am Esch J, Freitag M, Schulte am Esch J. Hydroxyethyl starch (HES) 130/0.4 provides larger and faster increases in tissue oxygen tension in comparison with prehemodilution values than HES 70/0.5 or HES 200/0.5 in volunteers undergoing acute normovolemic hemodilution. Anesth Analg 2003;96:936-43."

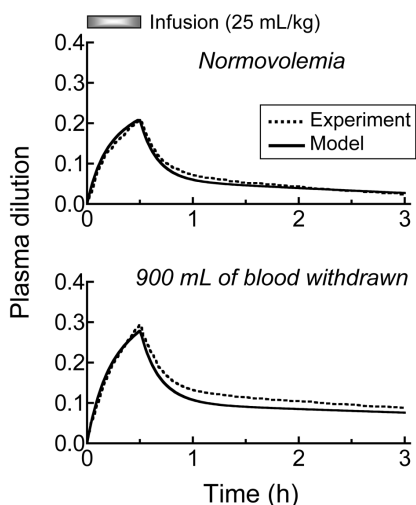


Fig. 14. Comparison of plasma dilution between experimental data and that predicted by our simulation model during 25 mL/kg crystalloid infusion over 30 min in a 76 kg male when he was normovolemic (upper panel) and when 900 mL of blood was withdrawn over 15 min (lower panel). The experimental data in normovolemic state cited from "Drobin D, Hahn RG. Volume kinetics of Ringer's solution in hypovolemic volunteers. Anesthesiology 1999;90:81-91." was used to obtain estimated values of the fluid filtration coefficient and the permeability-surface area product for protein by a fitting procedure using our model (upper panel). The time-course plasma dilution during crystalloid infusion after 900 mL of blood withdrawal was calculated by our model using these parameter values (lower panel). Cited from "Tatara T, Tsunetoh T, Tashiro C. Crystalloid infusion rate during fluid resuscitation from acute haemorrhage. Br J Anaesth 2007;99:212-7."

一方、5% アルブミンは、血漿増量効果が膠質液の中では最も小さく、投与終了時の血漿増加量は投与量の約60%であった。投与終了後、血漿量は徐々に減少した。Rehmら²²⁾は、婦人科手術患者20名を対象として、手術開始前に15分かけて5% アルブミンまたは6% HES 200を20 mL/kg投与し、投与終了30分後に血漿量を測定した。その結果、それぞれ投与した5% アルブミンおよび6% HES 200の38 (±21) %, 43 (±26) %が血管内にとどまっていた。同時点での血漿量増加は、シミュレーションではそれぞれ43%, 66%であった。

細胞間質液量は、晶質液および5% アルブミンでは増加したのに対し、HESでは正常値以下まで徐々に減少し、その効果はHES 70において最大であった (Fig. 12, 下図)。この結果は、HESが細胞間質から血管内へ水を動員することにより血漿増量効果を発揮することを示している。

④ 出血時の体液動態

血液量の20%以内の出血 (～15 mL/kg) に対しては、晶質液の投与により対応できることが多い。教科書によると血液量の回復には「出血量の約3～4倍の晶質液が必要」であり、これは「投与した晶質液の約20%が血管内にとどまるため」と説明されている。しかし、Fig. 9に示したように晶質液投与時の血

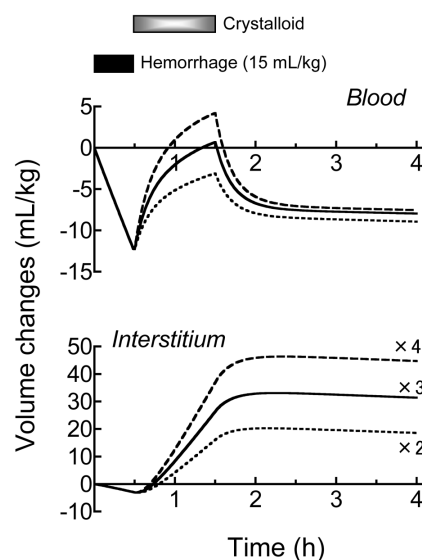


Fig. 15. Time course of changes to blood and interstitial volume during fluid resuscitation by crystalloid solution from acute hemorrhage of 15 mL/kg over 30 min in a simulated 70 kg male in a normal state. Isotonic crystalloid solution of 2, 3 or 4 times the hemorrhage volume was intravenously administered over 60 min.

漿量増加は時間経過により大きく変化する。そこで、シミュレーションモデルを用いて出血時の晶質液による蘇生の分析を行った¹⁴⁾。

まず、正常時における晶質液投与時 (25 mL/kgを30分間で投与) の血漿希釈 (血漿増加量/晶質液投与前の血漿量の比) の経時変化の臨床データ²³⁾をもとにモデルにおける毛細血管の透過性パラメータの最適値を求めた (Fig. 14, 上図)。このパラメータ値を用いて、体重76 kgの男性において15分間に900 mLの出血終了直後に25 mL/kgの晶質液を30分間で投与した時の血漿希釈をモデルにより求めた結果、臨床データとおおよそ一致した (Fig. 14, 下図)。

では、急性出血による血液量減少を補うには、出血量の何倍の輸液量が必要だろうか。急性出血 (30分間に15 mL/kg) 後に60分間にわたって出血量の2, 3, 4倍量の晶質液を投与した時の血液量と細胞間質液量の経時変化を示す (Fig. 15)。出血終了時の血液量の減少が12.4 mL/kgと出血量よりやや少なくなっているのは、出血による血漿量の減少を補うために水が細胞間質から血管内に動員されたためである。血液量を回復するには、出血量の2, 3倍の輸液では不十分で、出血量の4倍の輸液が必要であった (Fig. 15, 上図)。しかし、出血量の4倍の輸液でもボラス投与のみでは血液量は40分間程度しか回復しなかった。つまり、投与された輸液は徐々に血管内から細胞間質に移動するため、出血量の4倍の輸液では細胞間質液量は約45 mL/kg増加した (Fig. 15, 下図)。

今度は、急性出血 (30分間に15 mL/kg) 後に出血量と同量の5% アルブミンまたは6% HES (HES 70, HES 130, HES 200) を30分間にわたって投与した時の血液量と細胞間質液量

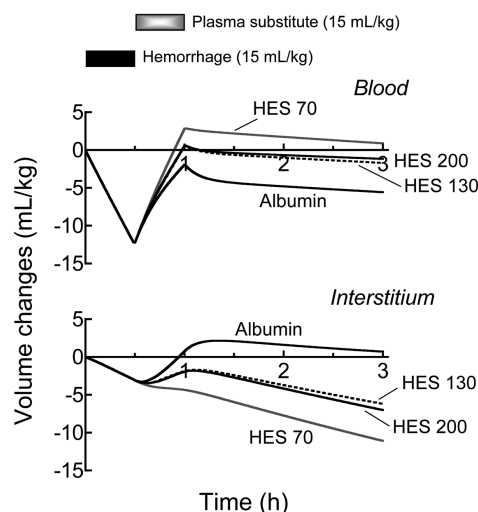


Fig. 16. Time course of changes to blood and interstitial volume during fluid resuscitation by plasma substitute from acute hemorrhage of 15 mL/kg over 30 min in a simulated 70 kg male in a normal state. Plasma substitute of equal to the hemorrhage volume was intravenously administered over 30 min. HES 70: 6% hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 70,000; HES 130: 6% hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 130,000; HES 200: 6% hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 200,000; Albumin: 5% albumin solution.

の経時変化を示す (Fig. 16). 6% HESでは、いずれの製剤でも投与終了時に血液量はほぼ出血前値まで回復したが、5%アルブミンでは血液量は出血前値まで回復しなかった。HES 70は小さい膠質分子を多く含むため、投与終了後の血液量回復効果はよりすみやかに消失すると考えられるが、HES 130およびHES 200については、投与終了2時間後でも出血前の血液量を維持していた。HESが細胞間質から血管内へ水を動員する結果、細胞間質量は出血前値にくらべて減少するが、この作用はHES 70において著明であった。

⑤ 手術時の体液動態

手術時には手術侵襲により手術部位の組織に炎症が生じる。この結果、毛細血管壁の水およびタンパク質に対する透過性が亢進するため、水が血管内から細胞間質に漏出し、細胞間質の浮腫が生じる。この結果、輸液を行っているにもかかわらず、低血圧や尿量減少などの血漿量不足 (hypovolemia) の臨床兆候を呈する。これに関し、「代用血漿剤は血漿量を維持し、細胞間質の浮腫を軽減させることができる」との考えがある一方、「細胞間質に漏出した膠質分子がかえって細胞間質の浮腫を増強させる」との可能性が指摘されてきた²⁴⁾。集中治療室入室患者を対象とした研究では、4%アルブミン投与群と生理食塩水投与群の間で、集中治療室入室日数や人工呼吸を必要とした日数などに有意な違いは認められなかった²⁵⁾。一方、敗血症患者を対象とした研究では、HES 200投与は、乳酸リンゲル液投与にくらべて急性腎不全の発生率を増加させた²⁶⁾。しかし、こ

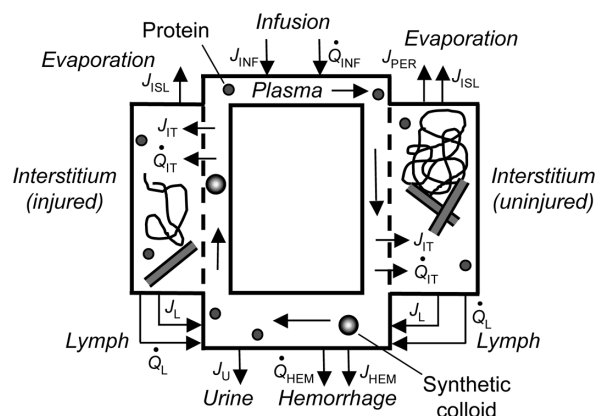


Fig. 17. Schematic diagram showing the compartmental model of the body and the relevant mass flows of fluid, protein and synthetic colloid during abdominal surgery. J_{HEM} : hemorrhage rate; J_{INF} : fluid infusion rate; J_{ISL} : insensible water losses from whole body or injured tissue; J_{IT} : rate of fluid transfer from plasma to interstitium; J_L : rate of fluid transfer from interstitium to lymphatics; J_{PER} : perspiration rate; J_U : rate of urine production; $\dot{Q}_{HEM}$: rate of protein or synthetic colloid transfer by hemorrhage; $\dot{Q}_{INF}$: rate of protein or synthetic colloid transfer by fluid infusion; $\dot{Q}_{IT}$: rate of protein or synthetic colloid transfer from plasma to interstitium; $\dot{Q}_L$: rate of protein or synthetic colloid transfer from interstitium to lymphatics. Cited and modified from "Tatara T, Tashiro C. Quantitative analysis of fluid balance during abdominal surgery. Anesth Analg 2007;104:347-54."

の研究では、投与されたHES 200の濃度が10%と高濃度であることから、HES 200の組織への蓄積による有害事象が発現した可能性がある。このように、大規模な臨床研究では、対象患者の違い (手術患者、重症患者)、代用血漿剤の濃度の違いなどのため、代用血漿剤の適正な使用に関する見解が異なる。

そこで、手術患者を対象として、手術中の輸液を晶質液のみで施行する場合と代用血漿剤を併用する場合の体液動態をシミュレーションにより比較した。

<モデルの作成>

上または下腹部の開腹消化管手術を仮想し、手術操作がおよぶ上または下腹部を手術部位、四肢・胸部など手術操作がおよばない身体部位を非手術部位とした。体液動態シミュレーションモデル (Fig. 7) において全身を手術部位と非手術部位にわけ、全身の体液の20%が手術部位に分布するとした (Fig. 17)。これにより、手術部位・非手術部位の細胞間質の体積をそれぞれ算出することができる。さらに、ネコ骨格筋での炎症時のデータをもとに、手術部位では、手術侵襲に伴う炎症の進行に伴い毛細血管壁の水ろ過係数が正常時の31%だけ増加し、毛細血管壁のタンパク質反発係数が正常時の30%だけ減少するとした¹³⁾。なお、炎症時には、細胞間質のゲル構造が変化することにより、細胞間質の静水圧が正常時にくらべて陰圧となる²⁷⁾。この静水圧勾配にしたがって血管内から細胞間質に水が移動するが、体液動態シミュレーションモデルは、この特性を考慮していない。

<手術時の体液動態シミュレーション>

8時間の開腹消化管手術において、基本となる晶質液投与速度を6 mL/kg/hとした。そして、1時間の尿量が1 mL/kgを下回った時は、晶質液投与を一時中断し、15分間かけて晶質液、5% アルブミンまたは6% HES (HES 70, HES 130, HES 200) をそれぞれ250 mL ボーラス投与した。輸液の体液動態への影響を明確にするため、手術中の出血はなしと仮定した。手術中の血漿量、手術部位・非手術部位における細胞間質液量および尿量の経時変化を求め、異なる輸液製剤間で比較した (Fig. 18)。

手術が進行するにしたがい、晶質液を投与しているにもかかわらず、手術開始2時間後には血漿量不足の状態になった。これに起因する尿量減少に対し、晶質液をボーラス投与しても血漿量の増加はわずかであり、血漿量不足がさらに進行した。これに対し、5% アルブミンまたは6% HESのボーラス投与は血漿量を正常値まで回復させることができたが、その効果は5% アルブミンが最も小さく、HES 70, HES 130, HES 200はほぼ同等であった (Fig. 18, 上段)。しかし、血漿量を維持する時間は、HES 200が最も長かった。これは、分子量が大きいHES 200は、血管透過性が亢進している状態においても血漿量を維持する効果を有していることを示している。

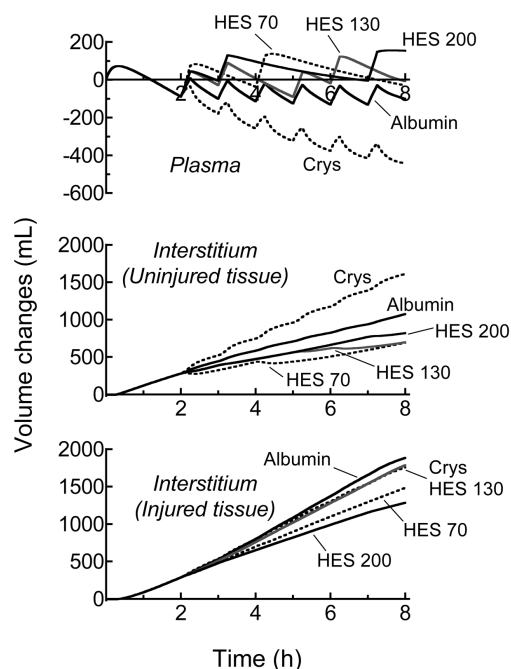


Fig. 18. Time course of changes to plasma and interstitial volume during 8 h-abdominal surgery in a simulated 70 kg male. Isotonic crystalloid solution was intravenously administered at a rate of 6 mL/kg/h. When urine volume for an hour was below 1 mL/kg, 250 mL bolus of crystalloid, 5% albumin or 6% hydroxyethyl starch (HES) solution was intravenously administered over 15 min (shown by incremental increases of plasma volume) instead of crystalloid infusion of 6 mL/kg/h. Crys: isotonic crystalloid solution; HES 70: HES of weight average molecular weight 70,000; HES 130: HES of weight average molecular weight 130,000; HES 200: HES of weight average molecular weight 200,000.

細胞間質については、5% アルブミンまたは6% HESの投与は、晶質液のみの投与にくらべて非手術部位における体液貯留を著明に抑制した。その効果は、アルブミンよりもHESが大きく、HESの投与は晶質液のみの投与にくらべて非手術部位における体液貯留を半減させた (Fig. 18, 中段)。これに対し、手術部位の体液貯留は、晶質液のみの投与とHES 130の投与ではほぼ同程度、逆にアルブミンの投与では晶質液のみの投与の場合をわずかながら上回った (Fig. 18, 下段)。これに対し、HES 70およびHES 200の投与は、晶質液のみの投与にくらべてそれぞれ約15%、約30%だけ手術部位の体液貯留を軽減させた。これは、HES 200に含まれる大きな膠質分子が、手術部位においてもある程度の有効なCOPを発揮することにより、細胞間質の浮腫を軽減する可能性を示している。

結果として、HESの併用は、晶質液のみの投与にくらべて手術中に必要となる総輸液量を約10%減少させたが、アルブミンは総輸液量を減少させなかった (Fig. 19)。また、アルブミンおよびHES投与は、晶質液投与にくらべて、それぞれ約15%、40~60%だけ尿量を増加させた。この結果は、手術中の血漿量不足に対するHES投与が循環動態を安定化させ、肺などの非手術部位の水分貯留を抑制することにより開腹消化管手術後の回復を早める可能性を示している。

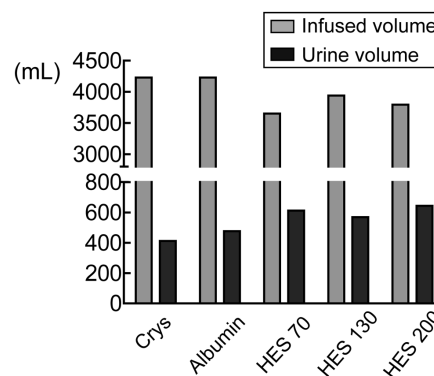


Fig. 19. Comparison of totally infused volume and urine volume during 8 h-abdominal surgery in a simulated 70 kg male for crystalloid, albumin or hydroxyethyl starch solution. Crys: isotonic crystalloid solution; Albumin: 5% albumin solution; HES 70: 6% hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 70,000; HES 130: 6% hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 130,000; HES 200: 6% hydroxyethyl starch of weight average molecular weight 200,000.

⑥ 手術時の出血

手術侵襲により毛細血管の透過性が亢進した状態での急性出血は、周術期体液管理の大きな課題である。つまり、先述のような正常時における出血の場合と異なり、血管透過性が亢進した状態では、投与した輸液製剤の多くが血管外へ漏出するため、血液量の回復が困難となる可能性がある。そこで、先述の開腹消化管手術において、基本となる晶質液投与速度を8 mL/kg/hとし、手術開始3時間後に急性出血 (30分間に15 mL/kg) が生じたとした。そして、出血終了後に5% アルブミンまたは

6% HES (HES 70, HES 130, HES 200) を30分間にわたって出血量と同量投与した時の血液量の経時変化を示す (Fig. 20). この結果, アルブミンは血液量を回復させる効果が最も乏しかった. 一方, 一時的に血液量を回復させる効果は, HES 70 が最も大きく, 次にHES 130とHES 200がほぼ同程度であった. 注目すべきことは, 代用血漿剤の投与終了後, HES 130では徐々に血液量が減少したのに対し, HES 200では逆に血液量が徐々に増加した. これは, HES 200が, 手術時でも血管内の有効なCOPを維持することにより, 細胞間質から血管内へ水を緩徐に動員することを示している.

3. シミュレーションのまとめと臨床的意義

正常時および急性出血時には, HES 70, HES 130, HES 200の血漿増量効果はほぼ同程度であった (Fig. 12, Fig. 16). しかし, 手術侵襲により毛細血管の透過性が亢進した状態では, 血漿増量効果の持続時間はHES 200において最も長かった (Fig. 18). このため, 手術時の急性出血に対して, HES 200は血液量回復効果を長く維持することができた (Fig. 20). HES 70も, 一時的ではあるが大きな血液量回復効果を示した. これら代用血漿剤投与時の体液動態シミュレーションは, 周術期におけるHESの選択に関するヒントを与える.

HES 70は, 分子量の小さな膠質分子を多く含むため, 一時的ではあるが大きな血漿増量効果を速効性に発揮する. しかし, これら分子量の小さな膠質分子はすみやかに血管外へ漏出するため, 血漿増量効果の持続時間は短い. したがって, HES 70は, 麻酔薬による血管拡張に起因する一時的な血圧低下を防いだり, 毛細血管の透過性が正常な状態における急性出血に対する血液量の回復に適している. あるいは, 開腹消化管手術など

の侵襲の大きな予定手術において, 手術中の晶質液投与を制限し, 血漿量不足をHES 70により補えば, 肺などの非手術部位組織の浮腫を軽減することができる. しかし, 敗血症のように高度に毛細血管の透過性が亢進した状態では, HES 70は有効なCOPを発揮しないため, HES 70の血漿増量効果はほとんど期待できない.

一方, HES 130とHES 200は, 正常時においてはHES 70とほぼ同等の血漿増量効果を示した. しかし, 高分子量膠質を含むHES 200は, 毛細血管の透過性が亢進した状態でも大きな膠質分子が血管内にある程度とどまるため, 持続の長い血漿増量効果を発揮する可能性がある. したがって, HES 200は, 手術後患者や敗血症など毛細血管の透過性が高度に亢進している症例における血漿量維持に適している. さらに, HES 130は, 抗炎症作用や血管透過性亢進を抑制する作用が報告されており²⁸⁾, 今回のシミュレーションでは把握できない新たな効果を手術侵襲時の体液動態におよぼす可能性がある.

おわりに

代用血漿剤の血漿増量効果は, 代用血漿剤の膠質浸透圧特性と各種病態における血管内皮細胞間隙の大きさの両者に依存する. 最近発表された周術期輸液に関する総説では, 従来の晶質液中心の輸液を見直す必要性が提唱されている²⁹⁾. つまり, 晶質液投与を必要最小限にとどめ, 急性出血などによる血漿量不足に対して代用血漿剤を積極的に使用することが, 患者の予後を改善する. 今回の体液動態シミュレーションは, 多くの仮定に基づいているため, あくまで体液量変化の目安として理解すべきである. しかし, これまで臨床にそくした体液動態を記述するモデルはほとんどなく, 臨床現場では手探りの体液管理を余儀なくされてきた. これに対し, 体液動態シミュレーションは輸液時の体液動態を予測するのに有用であり, 教育面での効果, さらに臨床研究を行うための予備的実験としての役割が期待される. 今後, 臨床データへのフィードバックによりモデルの妥当性を評価し, モデルに改良を加えていくことが必要である. これにより, 体液動態シミュレーションが, 科学的な根拠に基づいた代用血漿剤の適切な使用に少しでも貢献できることを期待する.

引用文献

1. Arfors K-E, Buckley PB. Pharmacological characteristics of artificial colloids. *Baillière's Clinical Anesthesiology* 1997;11:15-47.
2. 上山博史. 術中膠質液の基礎. 宮尾秀樹 編. 周術期輸液の最前線. 東京:真興交易医書出版部;2004;126-45.
3. Venturoli D, Rippe B. Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: effects of molecular size, shape, charge, and deformability. *Am J Physiol* 2005;288:F605-13.
4. Armstrong JK, Wenby RB, Meiselman HJ, Fisher TC. The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on

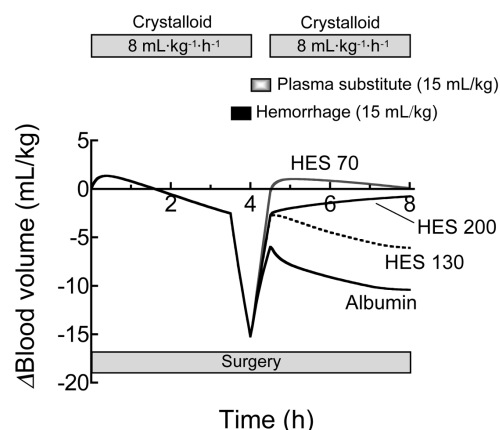


Fig. 20. Time course of changes to blood volume during fluid resuscitation by albumin or hydroxyethyl starch solution from acute hemorrhage of 15 mL/kg over 30 min during 8 h abdominal surgery in a simulated 70 kg male. The 5% albumin or 6% hydroxyethyl starch (HES) solution of equal to the hemorrhage volume was intravenously administered over 30 min after acute hemorrhage. Albumin: 5% albumin solution; HES 70: 6% HES of weight average molecular weight 70,000; HES 130: 6% HES of weight average molecular weight 130,000; HES 200: 6% HES of weight average molecular weight 200,000.

- red blood cell aggregation. *Biophys J* 2004;87:4259-70.
5. Michel CC, Curry FE. Microvascular permeability. *Physiol Rev* 1999;79:703-61.
6. Vink H, Duling BR. Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume. *Am J Physiol* 2000;278:H285-9.
7. Tatara T, Tashiro C. Analysis using a linear viscoelastic model of the in vitro osmotic kinetics of polydisperse synthetic colloids. *Biomacromolecules* 2005;6:1732-8.
8. Tatara T. The contribution of solute-solvent exchange at the membrane surface to the reduction by albumin of the hydraulic permeability coefficient of an artificial semipermeable membrane. *Anesth Analg* 2003;97:1137-42.
9. 妹尾 学. 膜の化学. 東京: 大日本図書. 1996.
10. 多田羅恒雄. 周術期の水動態 —シミュレーションによる分析— 飯島毅彦 編. 周術期の輸液. 東京: 克誠堂, 2008;20-40.
11. Bert JL, Bowen BD, Reed RK. Microvascular exchange and interstitial volume regulation in the rat: model validation. *Am J Physiol* 1988;254:H384-99.
12. Gyenge CC, Bowen BD, Reed RK, Bert JL. Transport of fluid and solutes in the body I. Formulation of a mathematical model. *Am J Physiol* 1999;277:H1215-27.
13. Tatara T, Tashiro C. Quantitative analysis of fluid balance during abdominal surgery. *Anesth Analg* 2007;104:347-54.
14. Tatara T, Tsunetoh T, Tashiro C. Crystalloid infusion rate during fluid resuscitation from acute haemorrhage. *Br J Anaesth* 2007;99:212-7.
15. Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Stoeckelhuber M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. The endothelial glycocalyx affords compatibility of Starling's principle and high cardiac interstitial albumin levels. *Cardiovasc Res* 2007;73:575-86.
16. Metcalf W, Papadopoulos A, Tufaro R, Barth A. A clinical physiological study of hydroxyethyl starch. *Surg Gynec Obstet* 1970;131:255-67.
17. Marx G, Pedder S, Smith L, Swaraj S, Grime S, Stockdale H, Leuwer M. Attenuation of capillary leakage by hydroxyethyl starch (130/0.42) in a porcine model of septic shock. *Crit Care Med* 2006;34:3005-10.
18. Connolly CM, Kramer GC, Hahn RG, Chaisson NF, Svensén CH, Kirschner RA, Hastings DA, Chinkes DL, Prough DS. Isoflurane but not mechanical ventilation promotes extravascular fluid accumulation during crystalloid volume loading. *Anesthesiology* 2003;98:670-81.
19. Ueyama H, He Y-L, Tanigami H, Mashimo T, Yoshiya I. Effects of crystalloid and colloid preload on blood volume in the parturient undergoing spinal anesthesia for elective cesarean section. *Anesthesiology* 1999;91:1571-6.
20. Sander O, Reinhart K, Meier-Hellmann A. Equivalence of hydroxyethyl starch HES 130/0.4 and HES 200/0.5 for perioperative volume replacement in major gynaecological surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 2003;47:1151-8.
21. Standl T, Burmeister M-A, Schroeder F, Currllin E, Schulte am Esch J, Freitag M, Schulte am Esch J. Hydroxyethyl starch (HES) 130/0.4 provides larger and faster increases in tissue oxygen tension in comparison with prehemodilution values than HES 70/0.5 or HES 200/0.5 in volunteers undergoing acute normovolemic hemodilution. *Anesth Analg* 2003;96:936-43.
22. Rehm M, Haller M, Orth V, Kreimeier U, Jacob M, Dressel H, Mayer S, Brechtelsbauer H, Finsterer U. Changes in blood volume and hematocrit during acute preoperative volume loading with 5 % albumin or 6 % hetastarch solutions in patients before radical hysterectomy. *Anesthesiology* 2001;95:849-56.
23. Drobin D, Hahn RG. Volume kinetics of Ringer's solution in hypovolemic volunteers. *Anesthesiology* 1999;90:81-91.
24. Marik PE, Iglesias J. Would the colloid detractors please sit down! *Crit Care Med* 2000;28:2652-4.
25. Finfer S, Bellomo R, Boyce N, French J, Myburgh J, Norton R. A comparison of albumin and saline for fluid resuscitation in the intensive care unit. *N Engl J Med* 2004;350:2247-56.
26. Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, Moerer O, Gruendling M, Oppert M, Grond S, Olthoff D, Jaschinski U, John S, Rossaint R, Welte T, Schaefer M, Kern P, Kuhnt E, Kiehntopf M, Hartog C, Natanson C, Loeffler M, Reinhart K. Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *N Engl J Med* 2008;358:125-39.
27. Wiig H, Rubin K, Reed RK. New and active role of the interstitium in control of interstitial fluid pressure: potential therapeutic consequences. *Acta Anaesthesiol Scand* 2003; 47:111-21.
28. Vincent J-L. The pros and cons of hydroxyethyl starch solutions. *Anesth Analg* 2007;104:484-6.
29. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Rehm M. A rational approach to perioperative fluid management. *Anesthesiology* 2008;109:723-40.

ヒト ES 細胞からの血液産生

Generation of blood cells from human ES cells

辻 浩一郎

Kohichiro Tsuji

和文抄録

輸血療法は、現在の先端医療においてもなお重要な治療法といえるが、ドナー人口の減少、感染症のリスクなど、輸血医療には多くの問題があり、安全な輸血用血液の安定的確保が強く求められている。そこで、半永久的に増殖でき、血液細胞を含む全ての組織細胞に分化可能なヒト胚性幹細胞（ES細胞）が、輸血用血液の新たな供給源として注目されている。しかし、ヒトES細胞由来の血液が実際の輸血医療に臨床応用されるためには、技術的にも、倫理的にも数多くの解決されるべき問題が残されており、我々はそれらを着実に克服していく必要がある。

Abstract

Blood transfusion is an important therapy even at the developed present medicine. The main problems impeding progress in blood transfusion are the inconsistency of supply and the risk for infection of various microorganisms. Therefore, increased interest in the use of human embryonic stem (ES) cells has emerged to procure a large quantity of safe blood for therapeutic transfusion, because they can proliferate in culture without apparent limits and also differentiate all cell types including blood cells. Although there remain a number of technological and ethical issues for the clinical use of human ES cell-derived blood cells, we have to solve them step by step to achieve it.

Keywords

Embryonic stem cells, Induced pluripotent stem cells, Blood cells, Blood transfusion, Hematopoietic stem cells, Erythropoiesis

はじめに

患者の体内循環中に血液を輸注する輸血療法は、様々な疾患に対する治療の補助療法として極めて重要な治療技術といえる。特に近年の移植医療などの医療技術の高度化に伴い、輸血療法の重要性はこれまで以上に高まってきている。現在輸血療法として用いられている血液細胞としては、赤血球、血小板、好中球などがあり、これらは成分輸血として効率的に利用されるようになってきた。

赤血球輸血は歴史的には最も古くから行なわれてきたが、現在の先端医療においても不可欠な治療法であることには変わりはない。しかし輸血用赤血球の供給は今なお多くのドナーの善意に依存しているため、ドナーの対象となる青壮年層の人口減少とともに輸血用赤血球の供給量の絶対的不足が社会問題となりつつある。さらに、輸血用赤血球は不特定多数のドナーから採取されるため、種々の感染症の危険性など、その安全性も大きな問題となっている。そのため充分量の安全な輸血用赤血球

の安定確保が強く求められている。

一方近年需要が増加している血小板輸血についても、恒常的なドナー不足に悩まされている。さらに好中球輸血については、重症感染症に対する有効性（特に抗がん剤治療などにより好中球減少をきたしている患者において）が証明されているにもかかわらず、ドナー不足のために実施できない場合が多い。

こうした社会状況を背景に、半永久的に増殖可能なヒト胚性幹細胞（ES細胞；embryonic stem cell）から輸血用血液を産生しようという研究が進んでいる。本稿では、我々のヒトES細胞からの赤血球産生の試みを例にとりながら、そうしたヒトES細胞からの血液産生の研究の現状と課題を概説する。

造血における幹細胞システム

我々の体の組織には各組織特異的に、幹細胞と呼ばれるごく少数の細胞集団を頂点とする幹細胞システムが存在し、我々の生体を一生にわたり維持していると考えられている。こうした

東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 細胞療法分野 〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1 Division of Cellular Therapy, Advanced Clinical Research Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo, 108-8639 Japan

論文受付 2009年1月7日 論文受理 2009年1月24日

我々成人の各組織に存在する幹細胞は、体性幹細胞あるいは成体幹細胞、組織幹細胞と呼ばれ、自分と同じ能力を有する幹細胞を複製する能力（自己複製能）と複数の機能細胞に分化する能力（多分化能）という二つの能力を併せ持つことによって、恒常的に死滅していく各組織の細胞を過不足無く補充している。造血組織にも造血幹細胞を頂点とする体性幹細胞システムが存在し、造血幹細胞は、各々固有の寿命で崩壊している形態と機能を異にする種々の血液細胞を一生の間供給し続けている。

Fig. 1は造血幹細胞から血液細胞が産生される過程を示している。恒常状態では多くの造血幹細胞は静止期にあり、必要に応じて細胞周期に入り細胞分裂する。造血幹細胞が細胞分裂すると、その娘細胞は自己複製して再び造血幹細胞となるか、あるいは分化して多能性造血前駆細胞（multipotential hematopoietic progenitor）となる。多能性造血前駆細胞はすでに分化することが運命づけられた細胞で、多分化能は有しているが自己複製能は持たないことより造血幹細胞とは区別される。

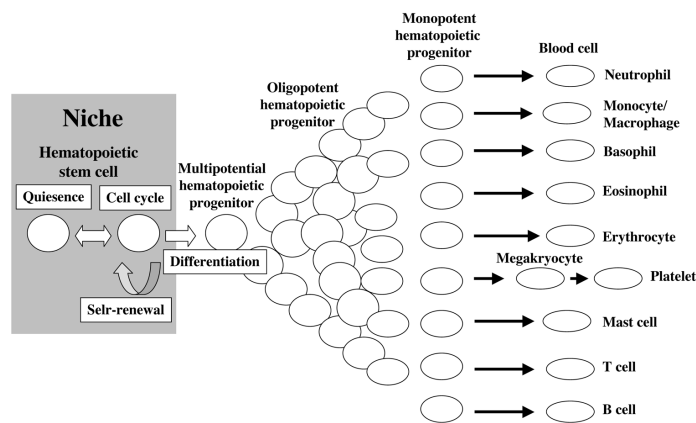


Fig. 1. Proliferation and differentiation of hematopoietic stem cells.

造血幹細胞由来の多能性造血前駆細胞は細胞分裂を繰り返しながら次第にその多分化能を失い、数種類の血球系細胞への分化能のみを有する寡能性造血前駆細胞（oligopotential hematopoietic progenitor）を経て、単一の血液細胞への分化を運命づけられた単能性造血前駆細胞（monopotential hematopoietic progenitor）となり、最終的にはリンパ球を含む全ての血液細胞を産生する。この造血幹細胞から血液細胞が産生される過程は、主に血液細胞を取り囲んでいるストローマ細胞と細胞外マトリックスから成る「造血微小環境」（ニッチ（Niche）とも呼ばれる）と、種々の細胞から産生される液性因子であるサイトカインにより制御されている。特に単能性造血前駆細胞から血液細胞への分化には、各血液細胞に特異的なサイトカインが重要な役割を担っている。赤血球造血の場合はエリスロポエチン（EPO: erythropoietin）、巨核球造血では trombopoietin（TPO: thrombopoietin）、好中球造血では G-CSF（granulocyte colony-stimulating factor）がこれにあたる。

造血幹細胞から赤血球への分化

Fig. 2は、赤血球造血という観点から成人造血幹細胞から成熟赤血球への分化を示している。前述の通り、造血幹細胞から分化した多能性造血前駆細胞は、細胞分裂を繰り返しながら次第に多分化能を喪失し、赤血球への分化を運命づけられた赤血球系前駆細胞（erythroid progenitor）となる。この分化段階までの細胞は小リンパ球様で、形態学的に区別することは困難とされている。赤血球系前駆細胞は、分化段階によって BFU-E（erythroid burst-forming unit）と CFU-E（erythroid colony-forming unit）に分けられる。この名称は、造血前駆細胞の in vitro 検出法である血液細胞コロニー形成法（hematopoietic colony-forming assay）に由来する。

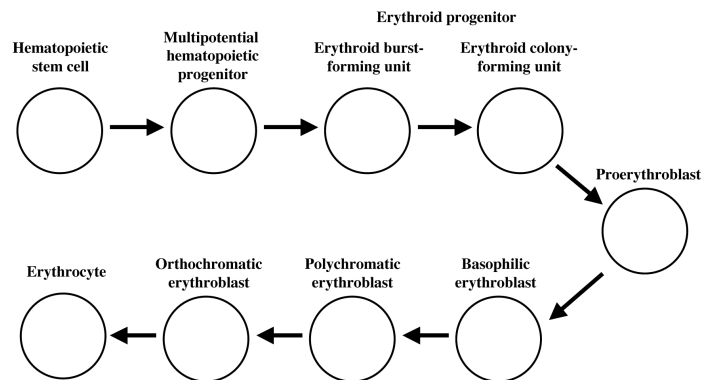


Fig. 2. Differentiation of hematopoietic stem cells into erythrocytes in human adult.

血液細胞コロニー形成法とは、造血前駆細胞を EPO などの種々の造血に必要なサイトカインを含むメチルセルロースのような半固形培地を用いて、炭酸ガス培養器中で培養する方法である（Fig. 3）。半固形培地の中で増殖するため、1個の造血前駆細胞から産生された血液細胞は拡散することなく細胞塊として観察され、これを血液細胞コロニーと呼ぶ。この血液細胞コロニーに含まれる血液細胞を解析することにより、その血液細胞コロニーの起源となった前駆細胞を推定することができる。例えば、顆粒球、マクロファージなどの骨髄系細胞からなる顆粒球・マクロファージコロニーならば骨髄球系前駆細胞、顆粒球、マクロファージ、赤血球が混在するコロニー（混合コロニーと呼ぶ）ならばいずれの血液細胞にも分化可能な多能性造血

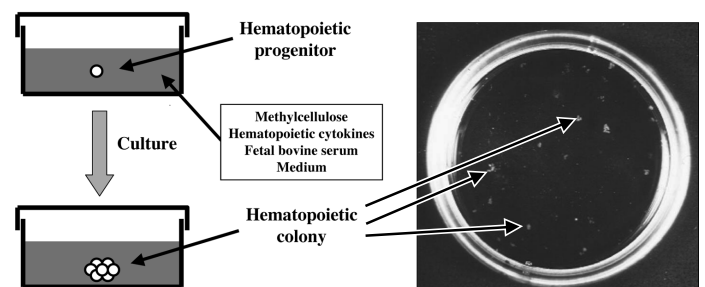


Fig. 3. Hematopoietic colony-forming assay.

前駆細胞を起源すると判断される。

赤血球系前駆細胞を血液細胞コロニー培養法で1週間培養すると、約50～100個の赤血球系細胞からなる赤い球状の細胞集団が出現する (Fig. 4A)。このコロニーは赤血球コロニーと呼ばれ、このコロニーの起源となった前駆細胞がCFU-Eと呼ばれる。一方2週間培養すると、赤血球コロニー (これをサブコロニーと呼ぶ) が数個から数十個集まったような細胞集団が出現する (Fig. 4B)。この細胞集団は倒立顕微鏡下ではバースト (爆発) のように見えることから赤血球バーストと呼ばれ、その前駆細胞はBFU-Eと呼ばれる。

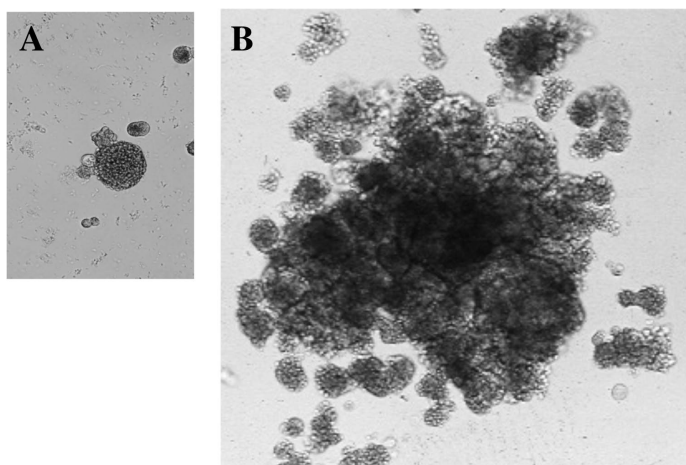


Fig. 4. Erythroid colony (A) and erythroid burst (B).

成体のCFU-EとBFU-Eではサイトカインに対する感受性が異なっている。成体の赤血球コロニーはEPO刺激のみで形成されるが、赤血球バーストは形成されない。赤血球バーストが形成されるためにはEPOの他にSCF (stem cell factor), interleukin (IL)-3などのサイトカイン刺激が必要であり、これらのサイトカインの活性はバースト促進活性 (BPA: burst-promoting activity) と表現される。このことは、EPOに対する感受性を獲得する一言い換えれば細胞表面にEPO受容体を発現してくるのはCFU-Eからで、BFU-EはEPO受容体を発現していないことを示している。一方BFU-EはSCFの受容体 (c-Kit) やIL-3の受容体を発現しており、これらのサイトカインはBFU-EからCFU-Eへの分化を促進していると考えられる。

EPO刺激によりCFU-Eが前赤芽球 (proerythroblast) へと分化すると形態学的にもそれと判断することが可能となる。前赤芽球ではすでにヘモグロビン (Hb: hemoglobin) 合成が始まっており、その後好塩基性赤芽球 (basophilic erythroblast), 多染色赤芽球 (polychromatic erythroblast), 正染色赤芽球 (orthochromatic erythroblast) と形態を変えつつ分化する。成人正染色赤芽球は最終的には脱核を果たして赤血球となる。

単に赤血球を産生するだけならば、必ずしもES細胞から赤血球を作る必要はなく、造血幹細胞、多能性造血前駆細胞、あるいは赤血球系前駆細胞からも赤血球産生は可能である。しかし多能性造血前駆細胞や赤血球系前駆細胞の増殖能には限界が

ある一方、in vivoでは半永久的に自己複製し続ける造血幹細胞もin vitroでの増幅率は、現在までの報告では数倍から数十倍に留まっている¹⁾。そこで、大量の赤血球産生の供給源として、半永久的に増殖可能なヒトES細胞が注目されるようになってきた。

ES細胞研究の歴史

受精卵は卵割を繰り返して、胎生初期に胚盤胞 (blastocyst) となる (Fig. 5)。ES細胞は、この胚盤胞内の未分化な幹細胞集団である内部細胞塊 (inner cell mass) から分離した細胞を、マウス胎仔線維芽細胞 (MEF; mouse embryonic fibroblast) などのフィーダー細胞と共培養することにより樹立される。1981年にマウスにおいて初めてES細胞が樹立された^{2,3)}。マウスES細胞は、MEF以外にもSTO細胞などのフィーダー細胞あるいはLIF (leukemia inhibitory factor) 存在下の培養により未分化な状態のまま増殖継代される⁴⁾。

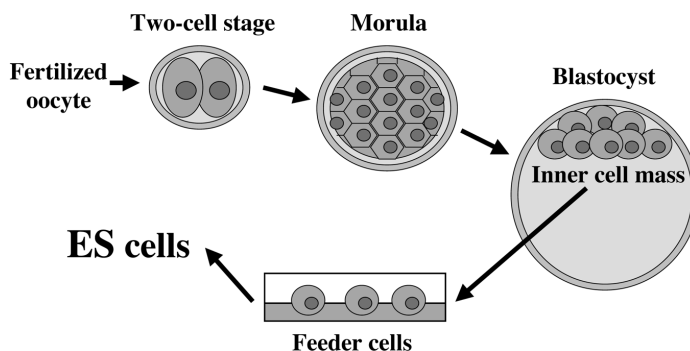


Fig. 5. Establishment of ES cells.

マウスES細胞を同系マウスや免疫不全マウスの皮下や精巢内に移植すると、外胚葉、中胚葉、内胚葉の3胚葉に属する細胞が混在するテラトーマが形成される。また、マウスES細胞を注入された胚盤胞を成体雌マウスの子宮に移植すると、ES細胞由来細胞を有するキメラマウスが作られ、このキメラマウスの交配によりES細胞由来の完全なマウス個体ができる。こうしたES細胞由来の個体の作製は遺伝子改変されたES細胞でも可能であり、これを利用して多くの遺伝子改変マウスが作製され、数々の遺伝子の機能解析に大きく貢献してきた。同時にこのことは、ES細胞が生殖細胞を含めた全ての組織細胞に分化可能であり、最終的には個体全体を形成することができることを示している。その意味においてES細胞は、体性幹細胞の多能性に対して全能性を有する幹細胞といわれる。

その後マウス以外の動物でもES細胞が樹立されたが、ついに1998年にヒトES細胞が樹立された⁵⁾。当然のことながらヒトES細胞からキメラ個体が作製できるか確認することはできないが、ヒトES細胞を免疫不全マウスに移植すると、マウスES細胞と同様に3胚葉由来の組織を含むテラトーマが形成されることより (Fig. 6)、ヒトES細胞もマウスES細胞と同様に全能性を有していると考えられている。しかしヒトES細胞は、

マウス ES 細胞と比較して栄養芽細胞に分化しやすい、マウス ES 細胞の維持に有用な LIF が有効でない、発現する分化マーカーに違いがあるなど、マウス ES 細胞と異なる性質を有することも指摘されており、実際マウス ES 細胞の研究結果がヒト ES 細胞に適応できないことはしばしば経験される。そこにヒト ES 細胞を研究する意義があり、困難さもあるといえる。

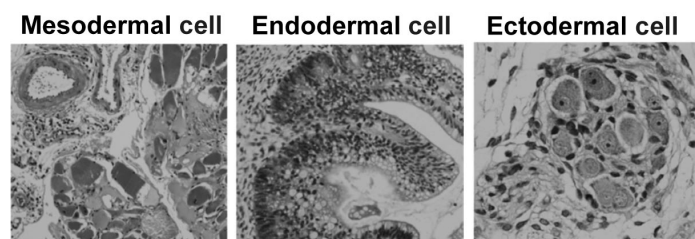


Fig. 6. Generation of teratoma from human ES cells in an immunodeficient mouse.

ES 細胞の分化

マウス ES 細胞から *in vitro* で分化誘導可能な細胞としては血液細胞⁶⁻⁸⁾、血管内皮細胞⁹⁾、神経細胞¹⁰⁾ などが報告されている。こうした誘導法の多くは、ES 細胞をフィーダー細胞非存在下で浮遊培養により形成される胚様体を利用したもので、胚様体を種々の条件で培養し胚様体内部の細胞分化を誘導する方法^{9,10)}、初期胚様体から形成される芽細胞コロニーから分化誘導する方法⁷⁾ などがある。また胚様体を用いない方法としては、ES 細胞を種々のストローマ細胞上で培養する方法⁶⁾、ある程度分化させた ES 細胞の中から特定の分化能を有する細胞を細胞表面マーカーなどにより選別して分化させる方法⁸⁾ などがある。さらに最近では、種々の細胞分化に関わる転写因子の遺伝子を導入することにより、ES 細胞を特定の機能細胞へ分化誘導しようという試みも行われている。例えば、myoD により筋細胞へ、Hox11 により血液細胞へ、PDX-1 により膵β細胞への分化誘導などが試みられている。

一方ヒト ES 細胞では、神経細胞¹¹⁾、心筋細胞¹²⁾、膵β細胞¹³⁾、内皮細胞¹⁴⁾ などへの分化誘導が報告されている。ヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導については、胚様体を用いた培養法¹⁵⁾ とストローマ細胞を用いた培養法¹⁶⁾ が報告されている。しかし、そのいずれの方法でも血液細胞への分化誘導効率は必ずしも高くなく、また分化誘導された血液細胞が実際に臨床応用可能な機能を有しているかについても十分に検討され

ていない。我々は、ヒト ES 細胞から血液細胞への分化誘導が従来の培養法では非効率であった理由として、胎生期を起源とする ES 細胞から血液細胞への分化誘導には、胎生期の特定な時期に特定な部位で特異的に機能する分子の刺激が重要であると推測し、ヒト ES 細胞から血液細胞へ効率的に分化誘導するためには胎生期の造血環境を再現することが有効ではないかと考えた。

そこで、研究計画「ヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) から造血細胞への分化誘導法の開発」を、東京大学倫理審査委員会の承認を得た後、平成 14 年 7 月 8 日に文部科学省特定胚及びヒト ES 細胞研究専門委員会に申請した。同年 12 月 20 日に同委員会により本研究は承認され、文部科学大臣の確認を得て開始された。しかしヒトの胎生期造血については、倫理的問題からヒト胎児の詳細な解析が困難であるため、十分に解明されているわけではない。また同様に倫理的な理由から、ヒトの胎児組織を実験に使用することもできない。ただ幸いなことに、ヒトと同じ哺乳類であるマウス由来のストローマ細胞の多くがヒト造血支持能を有することが報告されていたので、マウス胎仔の造血環境を *in vitro* で構築することを計画した。

マウス胎生期造血

哺乳類では胎仔が母体の子宮内で发育するため、これまでマウスにおいても胎生期造血の解析は必ずしも容易ではなかったが、近年の解析技術の進歩によりその全体像が次第に明らかとなりつつある。マウスに限らず哺乳類の胎生期造血の最大の特徴は、造血臓器が胎仔の发育に伴い移動することである (Fig. 7)。ただし最近まで、造血細胞自身が実際に造血臓器間を移動するのか、あるいは各々の造血臓器で新たな造血が発生するのかについては、厳密に検証されていなかったが、解析技術の進歩により胎生期造血においては実際に造血細胞が造血臓器間を移動することが明らかになってきた¹⁷⁾。

Fig. 7 に示すように、マウス胎生期造血においては、初期の造血は胎生 7～8 日に胚体外組織である卵黄嚢 (yolk sac) の血島で発生し、これを一次造血 (primitive hematopoiesis) という。一方中期以降の造血を担うことになる二次造血 (definitive hematopoiesis) は胎生 10 日頃の胚体内の AGM 領域 (AGM region: 大動脈 (aorta)、性腺 (gonad)、中腎

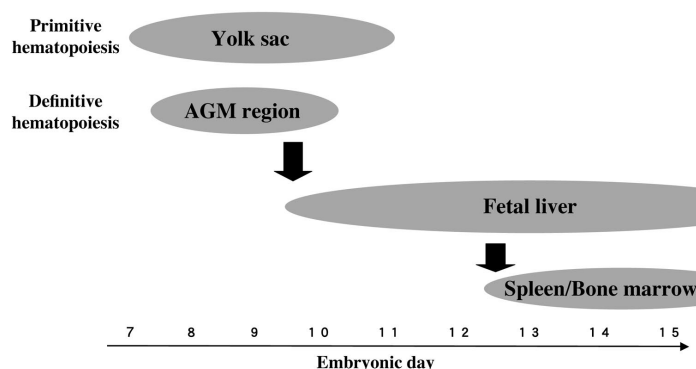


Fig. 7. Mouse embryonic hematopoiesis.

(mesonephros)を含む領域)と呼ばれる部位に出現^{18,19)}, その後造血の場を胎仔肝(fetal liver)に移す²⁰⁾. そこで造血細胞は劇的に増幅した後, 最終的には骨髄, 脾臓へと移動し, その後一生にわたって血液細胞を供給し続けることになる.

このように, 胎生期の造血細胞が胎児の発育とともに, あたかも最適な造血環境を求めるかのごとく造血臓器を移動していくことは, 胎生期の造血細胞にとって, その発達段階に応じたニッチが極めて重要な役割を果たしていることを意味している. 実際, マウスのAGM領域から樹立されたストローマ細胞はマウスの胎仔組織からの造血幹細胞の発生を支持することができる²¹⁾, 胎子肝から樹立されたストローマ細胞は造血細胞の分化・増殖を支持することができる²²⁾.

一次造血と二次造血

一次造血と二次造血では, 造血幹細胞やリンパ球造血は一次造血には存在せず二次造血において初めて出現する, また一次造血と二次造血では関連する遺伝子が違うなど, 明らかな違いがあるが, 両者の赤血球造血にも大きな違いが認められる.

1) 形態学的違い

哺乳類の一次造血で作られる赤血球(胚型赤血球)は成熟しても脱核することなく有核のままだが, 二次造血の成熟赤血球(成体型赤血球)は最終的には脱核し, 小型の赤血球となる. また一次造血の胚性赤血球は, 二次造血の成体型赤血球と比較して寿命が短期であることも知られている.

2) EPOに対する依存性の違い

既述のように, 二次造血である成体の赤血球造血においては, Fig. 2の分化過程のCFU-E以降の分化はEPOに依存している. ところが血液細胞コロニー形成法を用いて, 一次造血に由来する胎生8日のマウス胎仔の卵黄嚢と二次造血に由来する胎生15日の胎仔肝のCFU-Eを培養してみると, 後者では赤血球コロニー形成にはEPOが不可欠であるが, 前者においてはEPOは必須ではなく, SCFだけでも赤血球コロニーは形成される. またEPOあるいはEPO受容体遺伝子欠損マウスでは, 一次造血の赤血球造血は減少するものの保持されるが, 二次造血の赤血球造血のCFU-E以降の分化は完全に障害される^{23,24)}. これらのことは, 二次造血の赤血球造血にはEPOは不可欠であるが, 一次造血においてはEPOが必ずしも必須でないことを示している.

3) Hbの違い

Hbは4分子のヘムと2対のグロビン-ペプチド鎖から構成され, グロビン-ペプチドは1対の α 様グロビンと1対の β 様グロビンから成る四量体である. ヒトのHbとしては, 2種類の α 様グロビン(α , ζ)と4種類の β 様グロビン(β , γ , δ , ϵ)の組み合わせにより, 少なくとも6種類のHbが一次造血と二次造血で出現するが, 両者の赤血球では合成されるHbが異なっている.

Fig. 8に示すように, ζ グロビン, ϵ グロビンは一次造血においてのみ, β グロビン, δ グロビンは二次造血においてのみ産生される. 一方 α グロビンは一次造血から一生にわたり産生され続ける. γ グロビンも一次造血から産生されるが, 出生直前から急激に産生が低下し生後6ヶ月以降はほとんど産生されなくなる. その結果, 一次造血ではHb Portland($\zeta_2\gamma_2$), Hb Gower I($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower II($\alpha_2\epsilon_2$)の3種類のHbが, 二次造血ではHb F($\alpha_2\gamma_2$), Hb A($\alpha_2\beta_2$), Hb A₂($\alpha_2\delta_2$)の3種類のHbが産生される.

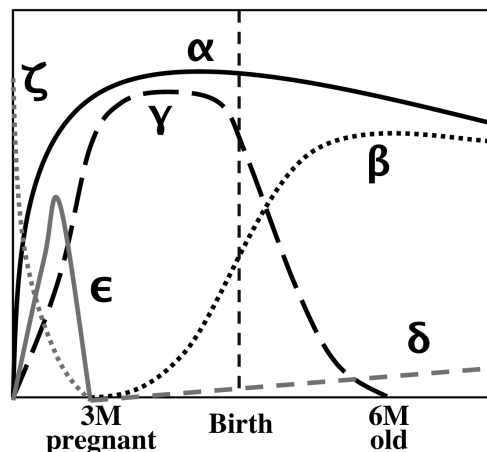


Fig. 8. Globins in human fetus and infant.

ただFig. 8からも予想されるように, 二次造血初期の赤血球で合成されるHbの多くはHb Fで, 臍帯血中の赤血球ではHb Fが80%, Hb Aが20%を占める. しかし, 出生直前からHb Fの合成量は急激に低下し, 生後6ヶ月の乳児の赤血球ではHb Aが97%, Hb A₂が2.5%を占め, Hb Fは0.5%以下となりその後はこの比率は大きくは変わらない. Hb AとHb Fでは酸素結合能が異なっている. 従って, 臍帯血と成人末梢血の酸素解離曲線を比較すると, 同じ酸素分圧では臍帯血の方が酸素結合能が高い. 胎盤では, この結合能の差により臍帯血と母体血の間で酸素の受け渡しが行なわれると考えられる.

ヒトES細胞から血液細胞への分化

前述の様に, マウス胎生期造血においては, 一生を担うことになる二次造血は胎生中期の胎仔肝で爆発的に増幅して大量の血液細胞が産生されることから, 我々は胎生14~16日のマウス胎仔肝からストローマ細胞を樹立し, ヒトES細胞との共培養を試みた.

ヒトES細胞をマウス胎仔肝より樹立されたストローマ細胞と共培養すると, 培養3日目頃まではヒトES細胞は未分化な状態を維持して増殖し続けるが, 4日目頃より分化を開始し, 小型の円形細胞が出現し始める(Fig. 9). これらの小型円形細胞は次第に増加し, 培養10~12日目頃には, その一部は未分化な造血細胞の増殖を示す, いわゆるcobble stone area(CSA)(未分化な造血細胞がストローマ細胞下を這うようにして増殖

する様子が、敷石を敷きつめたように観察されることから、この名称で呼ばれる)を形成し、その数は次第に増加する。CSAの数が最大となる培養14~16日目頃にこれらの培養細胞を採取し、EPO、TPO、IL-3、SCF、G-CSF、GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) 存在下で血液細胞コロニー培養すると、赤血球系前駆細胞に由来する赤血球コロニーおよびバースト、骨髄球系前駆細胞に由来する顆粒球・マクロファージコロニー、多能性造血前駆細胞に由来する混合コロニーなど、様々な血液細胞コロニーが形成される²⁵⁾。これらの血液細胞コロニーには赤血球、好中球、マクロファージ、巨核球などの血液細胞が含まれており、特にヒトES細胞由来の赤血球は、HbAを合成する二次造血由来の赤血球であり、その酸素運搬能も確認することができた²⁶⁾。

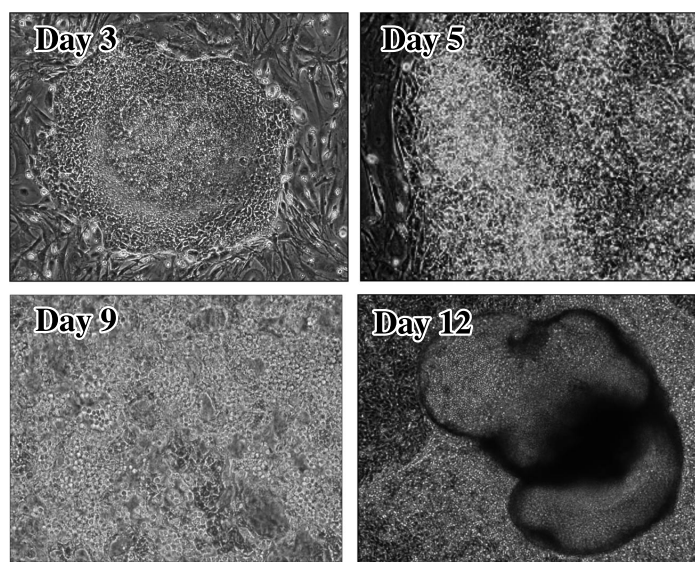


Fig. 9. Coculture of human ES cells with murine fetal liver-derived stromal cells.

以上の結果は、我々の開発したマウス胎仔肝由来ストローマ細胞を用いた培養法により、ヒトES細胞から多能性造血前駆細胞を含む種々の造血前駆細胞が分化誘導され、さらにそれらの前駆細胞から多くの血液細胞への分化誘導が可能となったことを示している。

ヒトES細胞からの血液産生における技術的問題

前述のようにヒトES細胞から血液細胞の分化誘導が可能となり、その臨床応用が現実のものとなりつつある。しかしそれが実際に実現されるためには、解決されねばならない幾つかの技術的問題がある。

1) ヒトES細胞の樹立および維持培養に関わる問題

ヒトES細胞の樹立や維持に、現時点ではMEFやウシ胎仔血清が必要とされているという問題がある。異種間感染ということを考えれば、こうした異種の細胞や血清に依存しないヒトES細胞の樹立、維持培養法が開発されねばならない。

2) ヒトES細胞から血液細胞への分化誘導に関わる問題

ヒトES細胞から血液細胞への分化誘導においても、我々の方法と同様にその多くの分化誘導法が動物細胞や動物血清に依存していることが問題となる。またヒトES細胞が半永久的に増殖可能であるとしても、現在の小規模な分化誘導法では大量の血液細胞の産生は難しい。実際に臨床応用に十分な量の血液細胞をヒトES細胞から産生するためには、分化誘導培養法のスケールアップが必須である。

さらに、ヒトES細胞から種々の血液細胞が分化誘導されたといっても、ヒトES細胞の一部が分化誘導されたというだけであって、全てのヒトES細胞を血液細胞に分化誘導できる方法は確立されていない。ただ、目的とする血液細胞だけを選別して用いることは可能かもしれない。例えば我々の方法でヒトES細胞から分化誘導された赤血球系コロニーでは、RT-PCRレベルでも未分化なES細胞などの血液細胞以外の細胞は検出できないので²⁵⁾、これらのコロニーを多数採取すれば赤血球系細胞のみを集められる。さらに集められた赤血球系細胞に放射線照射可能なことから、増殖可能な細胞を含まない赤血球系細胞集団を作製することができる。

またこれまでのところ、ヒトES細胞から安定的に造血幹細胞を分化誘導する方法は確立されていない。もしヒトES細胞から造血幹細胞への分化誘導が可能となれば、造血幹細胞移植医療におけるドナー不足を解決できるかもしれない。さらには、ヒトES細胞由来造血幹細胞を使用することによって、これまで一過性にしか効果を発揮することができなかった種々の先天性造血不全や免疫不全の遺伝子治療の効果を恒久的に維持することが可能となるかもしれない。ただしヒトES細胞由来の成熟血液細胞の輸血と違って、ヒトES細胞由来の造血幹細胞を移植するためにはHLA (human leukocyte antigen) という免疫学的バリアーを克服しなければならない(ヒトES細胞由来赤血球を輸血する場合には、血液型を一致させるだけでよい)。

移植免疫の克服

前述のように、ヒトES細胞から目的とする造血幹細胞がin vitroで分化誘導できたとしても、実際の移植医療に利用するためには移植に伴う免疫反応を克服しなければならない。ただし、臍帯血移植に用いられる造血幹細胞が必ずしも全てのHLAを一致させる必要がないことを考えれば、ヒトES細胞から分化誘導された造血幹細胞を用いた移植においても患者のHLAと完全に一致させなくてもよい可能性はあるし、あるいはその方がGVL (graft versus leukemia) 効果という点では有利かもしれない。しかし現時点では、安全性という点を考慮すればHLAが完全に一致するヒトES細胞を用意するのが妥当と考えられる。もちろん外傷などにより損傷した組織の治療というような場合には、患者と全く同じ遺伝子をもったヒトES細胞を用意することが理想といえる。そうしたヒトES細胞由来の移植片を用いた移植における免疫学的問題を解決する方法としては、現在以下のようなことが考えられている。

1) ヒト ES 細胞バンク

現行の臍帯血移植医療における臍帯血バンクの成功を考えれば、様々な HLA を有するヒト ES 細胞を作製しこれをバンキングしておき、移植時にドナーと一致する HLA を持った ES 細胞から必要な造血幹細胞を作製するという方法が考えられる。しかし、仮に用意する ES 細胞が臍帯血と同程度の HLA の一致度でよいとしても、実際には多数のヒト ES 細胞の樹立と維持ということには、技術的にも倫理的にも多くの困難がともなうと予想される。

2) ヒト ES 細胞の遺伝子改変

マウス ES 細胞で培われてきた遺伝子改変技術を駆使して、HLA の問題を解決しようという考えがある。方法としては、相同遺伝子組換えを利用してドナーの HLA 遺伝子をヒト ES 細胞に導入する方法、さらには内在する HLA 遺伝子を破壊したヒト ES 細胞を作製し、これに必要とされる HLA 遺伝子を導入する方法などが考案されている。

3) 体細胞核移植の応用

あまりにも有名な羊のドリーの成功²⁷⁾以来、体細胞核の未受精卵への移植によるクローン動物の作製技術は畜産分野において著しい進歩を遂げた。この核移植技術を用いて組織適合性の問題を解決しようという試みが提案されている。核移植のレシピエント細胞としてはヒト ES 細胞自身とヒト未受精卵が考えられている。前者においては、患者の体細胞核を移植された ES 細胞を分化誘導して患者と同じゲノムを持った移植片を得ることになるが、現在のところ技術的にまだ困難な点が多い。一方後者においては、患者の体細胞核をヒト脱核未受精卵を移植されたクローン胚から得られた胚盤胞を用いて、患者本人のゲノムを持つ ES 細胞を樹立し、この ES 細胞から移植片を作製する。この方法は、少なくとも現時点では前者よりも実現性は高いが、その過程で作製されるクローン胚から得られた胚盤胞を成人女性の子宮に移植すれば、理論的にはいわゆるクローン人間の作製が可能であり、このことが後述する倫理的問題をはらんでいる。

ヒト ES 細胞をめぐる倫理的問題

ヒト ES 細胞を用いた再生医療に関わる倫理的問題は大きくは、ヒト ES 細胞の作製に必要とされるヒト胚に関わる問題と、免疫学的問題を克服するために作製されるヒトクローン胚に関わる問題に分けられる。ただこうした倫理的問題の背景には、個人あるいは社会が抱える宗教、思想、生命観の違いがあり、全ての人々が納得する回答はないともいえる。実際、これらの倫理的問題に対する取り組みには世界各国でかなりの違いがある。

我が国においては、ヒト ES 細胞の作製と使用について 2001 年に文部科学省より「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針」が示された。この指針では、ヒト胚を「生命の萌芽」と位置付け慎重に扱われねばならないとした上で、同省の審査委員

会の承認を得た研究についてはヒト ES 細胞の作製と使用が認められることとされている。我々の研究についても本指針を遵守して実施されている。

ヒトクローン胚研究については、2001 年に成立した「ヒトに関するクローン技術等の規制に関する法律」（クローン技術規制法）によりクローン人間の誕生は法的に禁止されている。しかしクローン胚を用いた研究については、2004 年 7 月に総合科学技術会議の生命倫理専門委員会により、科学的妥当性が検証されたヒトクローン胚研究については基本的に認めるという最終報告書がまとめられた。ただこの報告書に対しては批判も多く、現在のところはクローン胚研究の科学的検証のための枠組みの構築がほとんど進んでおらず、実質的にはモラトリアム状態にある。

そうした状況下で、京都大学の山中伸弥教授が、ヒト体細胞である皮膚繊維芽細胞に 4 つの遺伝子 (Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4) を導入することにより、ヒト ES 細胞に類似した性質を有する iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell) の樹立に成功した²⁸⁾。もしヒト iPS 細胞がヒト ES 細胞の代替細胞として医療に応用可能であるならば、ヒト胚を破壊することなくの ES 細胞類似の iPS 細胞を作製できることとなる。同時に患者固有の iPS 細胞の樹立が可能となれば、免疫学的問題を克服するためにクローン胚を作製する必要もなくなり、ヒト ES 細胞を用いた再生医療における倫理的問題の多くが解決されたことになる。もちろんヒト ES 細胞と iPS 細胞が全く同様の性質を有するか否かについては、今後の厳密な検討を待たねばならない。

まとめ

ヒト ES 細胞や iPS 細胞から安全な輸血用血液や造血幹細胞が大量に産生できるようになれば、現在の輸血医療や造血幹細胞移植医療は大きく様変わりするであろうし、先天性造血障害や免疫不全が遺伝子治療により治癒することも夢物語ではなくなる。しかしその実現のためには数多くの克服されるべき課題があり、我々は拙速に陥ることなくひとつひとつの問題を確実に解決していかなければならない。

参考文献

1. Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, et al: Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt-3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest* 2000;105:1013-1021.
2. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-156.
3. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:7634-7638.
4. Smith AG, Nichols J, Robertson M, et al. Differentiation inhibiting activity (DIA/LIF) and mouse development.

- Dev Biol 1992;151:339-351.
5. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-1147.
 6. Nakano T, Kodama H, Honjo T: Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 1994;265:1098-1101.
 7. Kennedy M, Firpo M, Wall C, et al: A common precursors for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. *Nature* 1997;386:390.
 8. Nishikawa SI et al: Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hematopoietic lineages. *Development* 1998;125:1747-1757.
 9. Wang R, Clark R, Bautch VL: Embryonic stem cell-derived cystic embryoid form vascular channels: an in vitro model of blood vessel development. *Development* 1992;114:303-316.
 10. Bain G, Kitchens D, Yao M, et al: Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 1995;168:342-357.
 11. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000;18:399-404.
 12. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001;108:407-414.
 13. Assady S, Maor G, Amit M, et al. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001;50:1691-1697.
 14. Levenberg S, Golub JS, Amit M, et al. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4391-4396.
 15. Wang L, Li L, Shojaei F, Levac K, et al. Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity* 2004;21:31-41.
 16. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, et al. Hematopoietic colony-stimulating cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Sci USA* 2001;98:10716-10721.
 17. Sugiyama D, Arai K, Tsuji K. Definitive hematopoiesis from acetyl LDL incorporating endothelial cells in the mouse embryo. *Stem Cells and Dev* 2005;14:687-696.
 18. Medvinski AL, Samoylina NL, Muller AM, et al. An early pre-liver intra-embryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 1993;364:64-67.
 19. Godin IE, Garcia-Porrero JA, Coutinho A, et al. Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains Bla cell progenitors. *Nature* 1993;364:67-70.
 20. Kinoshita T, Sekiguchi T, Xu M, et al. Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuated fetal liver hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:7265-7270.
 21. Matsuoka S, Tsuji K, Hisakawa H, et al. Generation of definitive hematopoietic stem cells from murine early yolk sac and paraaortic splanchnopleures by aorta-gonad-mesonephros region-derived stromal cells. *Blood* 2001;98:6-12.
 22. Ma F, Wada M, Yoshino H, Ebihara Y, et al. Development of human lymphohematopoietic stem and progenitor cells defined by expression of CD34 and CD81. *Blood* 2001;97:3755-3762.
 23. Wu H, Liu X, Jeanisch R, et al. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 1995;83:59-67.
 24. Lin C, Lin S, D'Agati V, Constantini F. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev* 1996;10:154-164.
 25. Ma F, Wang D, Hanada S, Ebihara Y, et al. Novel method for efficient production of multipotential hematopoietic progenitors from human embryonic stem cells. *Int J Haematol* 2007;85:371-379.
 26. Ma F, Ebihara Y, Umeda K, et al. Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:13087-13092.
 27. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810-813.
 28. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131, 1-12.

E-Cell Systemによるヒト赤血球代謝シミュレーションの展開

Development and Applications of Human Erythrocyte Simulation using E-Cell System

西野 泰子^(1,2), 谷内江 綾子^(1,3), 富田 勝^(1,2,4)Taiko Nishino^(1,2), Ayako Yachie-Kinoshita^(1,3), Masaru Tomita^(1,2,4)

和文抄録

分子生物学の進歩により精緻で信頼性の高い細胞モデルの構築が可能になりつつある現在、生体細胞を対象としたコンピュータシミュレーションは生物学や医学の分野においても注目を集めている。慶應義塾大学にて発足したE-Cellプロジェクトでは、ヒト赤血球代謝モデルを構築し、シミュレーションの結果を生物学的な視点に基づいて考察することで赤血球生理機能の解明に取り組んできた。本稿では、G6PD異常症の解析、赤血球低酸素応答の解明、そして輸血用保存赤血球の代謝予測といったこれまでに行われてきた赤血球代謝シミュレーションについて概説し、細胞シミュレーション研究の意義や臨床応用へ向けた展望についての所感を述べる。

Abstract

E-Cell project has been founded in Keio University in order to facilitate cell simulation for experimental biologists and medical scientists, who are unfamiliar with computer science. We developed computer model of human erythrocyte metabolism and discussed simulation results from the biological viewpoint. Here we explain simulated results of E-Cell erythrocyte model: analysis of G6PD deficiency, prediction of hypoxia-induced metabolic alterations, and computational approach for prolonging cold preservation of erythrocytes. We also suggest the significance and the perspective of living cell simulation research.

Keywords

Erythrocyte metabolism, Computer simulation, G6PD deficiency, Hypoxia-induced metabolic alteration, Blood preservation

はじめに

ヒトをはじめとした哺乳類の赤血球は、核や小胞体、ミトコンドリアなどの細胞小器官を成熟段階で失い、内部にヘモグロビンを大量に有する非常に単純な袋状細胞である。赤血球はこのようなきわめて簡単な構造を持つことやサンプル採取のしやすさから、古くから様々な分野で研究材料として用いられてきた。細胞シミュレーションの研究分野でもヒト赤血球はモデルケースとして重用されており、数々の数理モデル¹⁻¹²⁾が発表されている (Table 1)。細胞シミュレーションとは、生化学や分子生物学で得られた知見を元に細胞内で起きている生命プロセ

Table 1. 赤血球代謝モデルの特徴

	特徴	出典
Rapoport <i>et al.</i>	解糖系モデル	[1-2]
Joshi and Palsson	赤血球細胞の包括的モデル	[3-6]
Mulquiney and Kuchel	2,3-BPG代謝系, pHによる酸素親和性の変化	[7-9]
Nakayama <i>et al.</i>	GSH合成系, GSSG排出系	[10]
Kinoshita <i>et al.</i>	ヘモグロビン還元系	[11]
Kinoshita <i>et al.</i>	ヘモグロビンと酸素の関係	[12]

スを再構築してその動的挙動を理解しようとする試みである。Fig. 1に細胞シミュレーション研究の概要を示した。生命システムの作用原理の解明に向けたシミュレーションが主流であるが、測定機器の限界や倫理的な問題から生物学実験では観察が

(1) 慶應義塾大学 先端生命科学研究所 〒252-8520 神奈川県藤沢市遠藤5322 Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Endo 5322, Fujisawa, Kanagawa 252-8520, Japan

(2) 慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科 Systems Biology Program Graduate School of Media & Governance, Keio University

(3) 慶應義塾大学 医学部 医化学教室 School of Medicine, Keio University, Biochemistry and Integrated Medical Biology, Keio Univ.

(4) 慶應義塾大学 環境情報学部 Environment & Information Studies, Keio University

論文受付 2008年11月12日 論文受理 2008年12月3日

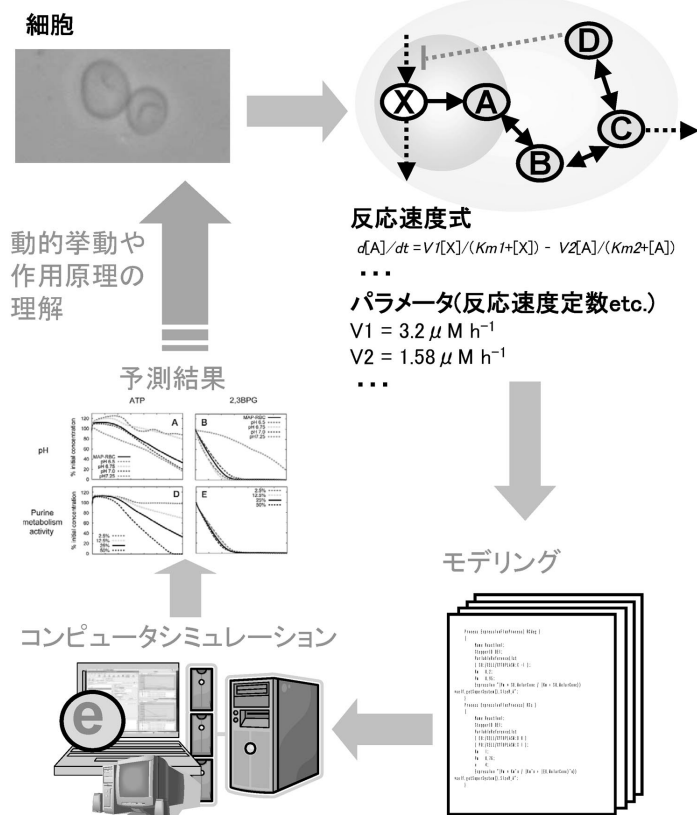


Fig. 1. 細胞シミュレーション研究の概要

不可能な生命現象も予測できるという利点があり、薬効の作用機序の予測や人工臓器の開発への展開も期待されている。1997年に慶應義塾大学環境情報学部で発足したE-Cellプロジェクトでは、全細胞シミュレーションの実現に向けたシミュレーションプラットフォーム (E-Cell System / E-Cell Simulation Environment) の技術開発とそれを用いた細胞モデル構築に取り組んでいる¹³⁾。このプロジェクトの一環として、ヒト赤血球の主要な代謝制御機構とそれに関連した物質の輸送機構を再現するシミュレーションモデルをE-Cell System上に構築してきた¹⁰⁻¹²⁾。赤血球の代謝ネットワークを対象としたシミュレーションは1980年代頃から盛んに行われてきた (Table 1.)。その理由として、細胞システムの抽象化が容易であること、モデル構築の際に必要な生化学的な情報がすでに揃っていることなどが挙げられる。E-Cellヒト赤血球代謝モデルでは、これまでは部分的に表現されていた数種類の代謝系、膜輸送系、イオンポンプ機構を統合し、すべての酵素反応をその特性にあわせた反応速度式で表現することに成功している。E-Cellヒト赤血球代謝モデルで再現されている代謝経路をFig. 2とTable 2に示す。

本稿では、E-Cell Systemを用いたシミュレーションとメタボローム解析を主軸に展開されている赤血球生理機能の解明に向けた取り組みについて解説し紹介する。

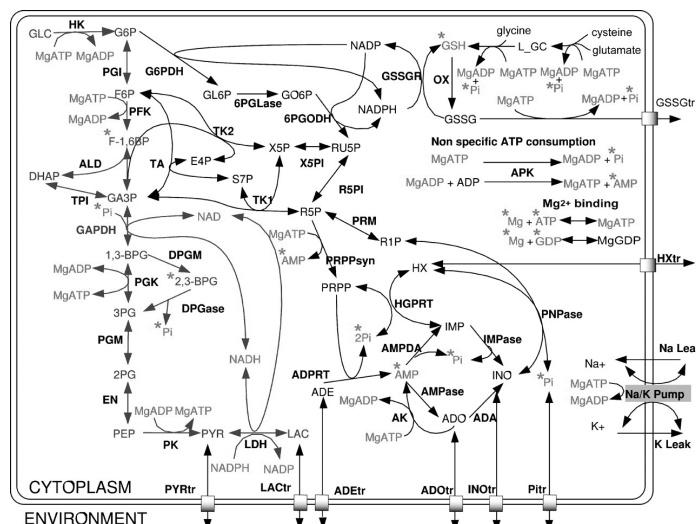


Fig. 2. E-Cell ヒト赤血球代謝モデルに含まれる代謝経路
代謝物質の略称はTable2を参照。[12]から転載。

Table 2. E-Cell赤血球代謝モデルに含まれる反応・代謝物質・略語一覧

代謝系	代謝物質	略記	代謝系	酵素反応プロセス	略記
解糖系	Glucose	GLC	解糖系	Hexokinase	HK
	Glucose 6-phosphate	G6P		Phosphoglucose isomerase	PGI
	Fructose 6-phosphate	F6P		Phosphofructokinase	PFK
	Fructose 1,6-bisphosphate	F-1,6BP		Aldolase	ALD
	Dihydroxyacetone phosphate	DHAP		Triose Phosphate isomerase	TPI
	Glyceraldehyde 3-phosphate	GA3P		Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	GAPDH
	1,3-Bisphosphoglycerate	1,3-BPG		Diphosphoglycerate mutase	DPGM
	3-Phosphoglycerate	3PG		Diphosphoglycerate phosphatase	DPGase
	2-Phosphoglycerate	2PG		Phosphoglycerate kinase	PGK
	Phosphoenolpyruvate	PEP		Phosphoglyceromutase	PGM
ペントースリン酸回路	Pyruvate	PYR	ペントースリン酸回路	Enolase	ENO
	Lactate	LAC		Pyruvate kinase	PYR
				Lactate dehydrogenase	LDH
核酸代謝	Glucosylated 6-phosphate	GL6P	核酸代謝	Glucose 6-phosphate dehydrogenase	G6PDH
	Ribulose 5-phosphate	R5P		6-Phosphogluconate dehydrogenase	6PGDH
	Sedoheptulose 7-phosphate	S7P		Transaldolase	TA
	Xylulose 5-phosphate	X5P		Transketolase I	TK1
	Erythrose 4-phosphate	E4P		Transketolase II	TK2
	Glutathione (reduced)	GSH		Ribose 5-phosphate isomerase	R5PI
	Glutathione (oxidized)	GSSG		Xylulose 5-phosphate isomerase	X5PI
	Ribose 5-phosphate	R5P		Glutathione transferase	GT
				Glutathione reductase	GSSGR
膜輸送系	Ribose 1-phosphate	R1P	膜輸送系	Adenosine deaminase	ADA
	5-Phosphoribosyl 1-phosphate	PRPP		Adenine phosphoribosyl transferase	ADPRT
	Inosine monophosphate	IMP		Adenosine kinase	AK
	Inosine	INO		Adenosine monophosphate deaminase	AMPA
	Adenine	ADE		AMP phosphohydrolyase	AMPase
	Adenosine	ADO		Adenylate kinase	APK
	Hypoxanthine	HX		Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase	HGPRT
				Inosine monophosphatase	IMPase
				Purine nucleotide phosphorylase	PNPase
				Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase	PRP
膜輸送系	Nicotinamide adenine dinucleotide	NAD	膜輸送系	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase	PRPPsyn
	Nicotinamide adenine dinucleotide	NADH		Adenine transport process	ADTr
	Nicotinamide adenine dinucleotide	NADP		Adenosine transport process	ADTr
	Nicotinamide adenine dinucleotide	NADPH		Hypoxanthine transport process	HXTr
	Potassium ion	Ki		Inosine transport process	INOTr
	Sodium ion	Nai		Lactate transport process	LACTr
	Inorganic phosphate	Pi		Pyruvate transport process	PYRTr
	Total adenosine diphosphate	tADP		Inorganic phosphate transport process	Pitr
	Total adenosine monophosphate	tAMP		GSSG transport process	GSSGTr
	Total adenosine triphosphate	tATP		Leak of potassium	KLeak
膜輸送系	Total 2,3-bisphosphoglycerate	t2,3-BPG	膜輸送系	Leak of sodium	NaLeak
				Sodium/potassium pump	NaK Pump

ヒト赤血球代謝モデルによるG6PD酵素異常症の病態解析

G6PD異常症は変異酵素の産生によって起こる遺伝性疾患で、赤血球の先天性酵素異常症でも最も患者数が多い。G6PDはペントースリン酸回路の入り口部分の反応に関与する律速酵素であり、細胞内の酸化物質であるNADPHや還元型グルタチオン (GSH) の生成に重要な役割をもつことが知られている (Fig. 3-A)。変異によってG6PDの酵素活性が低下すると、酸化物質であるNADPHやGSHが不足して酸素ストレスによる赤血球タンパク質の変性を引き起こし、急性溶血性貧血の症状をもたらす。変異酵素の性質によって臨床症状は異なり、重度の患者では酵素活性の著しい低下による慢性溶血性貧血の症状を呈する場合もある。このG6PD異常症に特有な代謝異常をシ

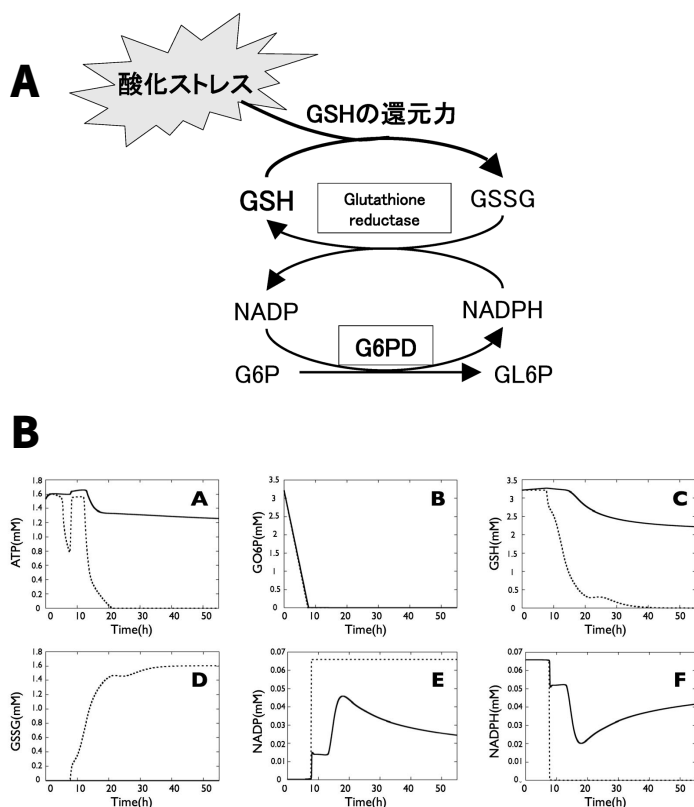


Fig. 3. G6PD異常症のシミュレーション解析

A: G6PD周辺の代謝プロセス

B: G6PD異常症シミュレーションの結果 GSH関連代謝系を組み込み前（破線）と組み込み後（実線）の赤血球モデルで200,000秒のシミュレーションを実行したときの濃度変化. ATP(A), G6P(B), GSH(C), GSSG(D), NADP(E) NADPH(F)

[10]から転載

シミュレーションによって再現し、周辺代謝系とG6PD異常症の関連性についての詳細な解析を試みた。

まず、G6PD異常症患者の赤血球から取得された酵素反応速度に関するデータを文献から入手し、構築した赤血球代謝モデルに適用してシミュレーションを行った結果、NADPHやGSHが枯渇し、溶血性貧血をもたらす病態が再現できていた（Fig. 3-B 破線）。しかし同時に、解糖系活性やATP濃度も著しく低下していた。G6PD異常症の赤血球細胞では解糖系酵素の活性やATP濃度は正常細胞と差異がないことが実証されていることから¹⁴⁾、構築したモデルではG6PD異常赤血球の代謝動態を正しく再現できていないと考えられた。この結果から、モデルには考慮されていない系がG6PD異常症の病態再現に必要な可能性が示唆され、これまでモデルに組み込まれていなかった代謝経路にも注目した。

赤血球細胞では膜を介して輸送された3種類のアミノ酸（グルタミン酸、システイン、グリシン）と2分子のATPからGSHが生合成される^{15,16)}。また、GSSGはATPの駆動力を利用して能動的に細胞外へ輸送されている^{17,18)}。これらの機構を数理モデル化し従来モデルに組み込んでG6PD異常症のシミュレーションを行ったところ、解糖系活性とATP濃度を維持しつつ、

同時に、NADPHやGSHの減少というG6PD異常赤血球に特徴的な代謝の挙動が再現されていた（Fig. 3-B 実線）。

モデル拡張前後のG6PD異常症のシミュレーション解析を通して、G6PD異常症の病態を再現するには、主要な代謝経路だけでなくGSH生合成系やGSSG排出系の存在が不可欠であることが示された。換言すれば、モデル拡張の対象としたこれらの代謝系はG6PD異常赤血球の解糖系活性やATP濃度の維持に重要な機能を果たしている、ということが指摘された。次に、効率的な酸素運搬を可能にしている赤血球の代謝酸素センサーメカニズムの理解を可能にしたシミュレーション研究を解説する。

赤血球低酸素応答のシミュレーション予測とメタボローム解析による実証

生体内における赤血球の生理的意義を考えると、その主たる機能である酸素運搬を無視することはできない。この機能はヘモグロビンが担っており、赤血球内はヘモグロビン分子が大量にひしめき合っている状態である。ヘモグロビンによる酸素運搬機能は二酸化炭素などのガス分子やATP、2,3-BPGなどの代謝物質によって複雑に制御されている。先述したように、赤血球細胞のシミュレーション研究については歴史が深く、代謝ネットワーク解析のみならず、ヘモグロビンの分子機構やヘモグロビンとガスの関係性をモデル化した研究も多い^{19,21)}。しかし、ヘモグロビンによる酸素運搬と代謝という異なる事象を関連付けたシミュレーション研究はこれまで前例がなかった。そこで、ヘモグロビンによる酸素運搬機能を付加した赤血球代謝モデルの構築に取り組んだ。ヘモグロビンが酸素を感知して代謝に影響を及ぼし、代謝の状態遷移が酸素運搬機能に反映される仕組みをFig. 4に示す。まず、酸素飽和曲線を実装し、酸素分圧とヘモグロビン飽和度の決定因子（2,3-BPG, pH, 温度, 二酸化炭素濃度）によりヘモグロビンの2つの構造（R型/T型）の存在比を算出可能にした。また、ヘモグロビンはATPや2,3-BPGといった代謝物質と結合し、これらの結合度合いはR型/T型の状態によって大きく異なっていることに注目した。この現象を再現するため、2つのヘモグロビン型と代謝物質との結合定数を文献から調査し、ヘモグロビンと代謝物質の結合を実装した。さらに、赤血球膜に最も多く含まれる陰イオン輸送タンパク質であるBand3の細胞質ドメインにヘモグロビンと解糖系酵素（PFK, GAPDH, ALD）が競合的に結合することがわかっており、これらの解糖系酵素は結合により可逆的に活性を失うことが報告されている。このタンパク質間相互作用についても同様にモデルへの実装を行った。

このシミュレーションモデルを用いて、酸素分圧を100mmHgから30mmHgへ下げることで低酸素状態を再現した結果をFig. 5-A, 5-Bに示した。Band3と酵素・ヘモグロビンの結合を考慮したモデル（Band3(+)モデル：図中では実線）では、結合を考慮しないモデル（Band3(-)モデル：図中では破線）に比べて解糖系の活性化が顕著に起こることがわかった。このとき、Band3(-)モデルでは代謝物質濃度にほとんど変化

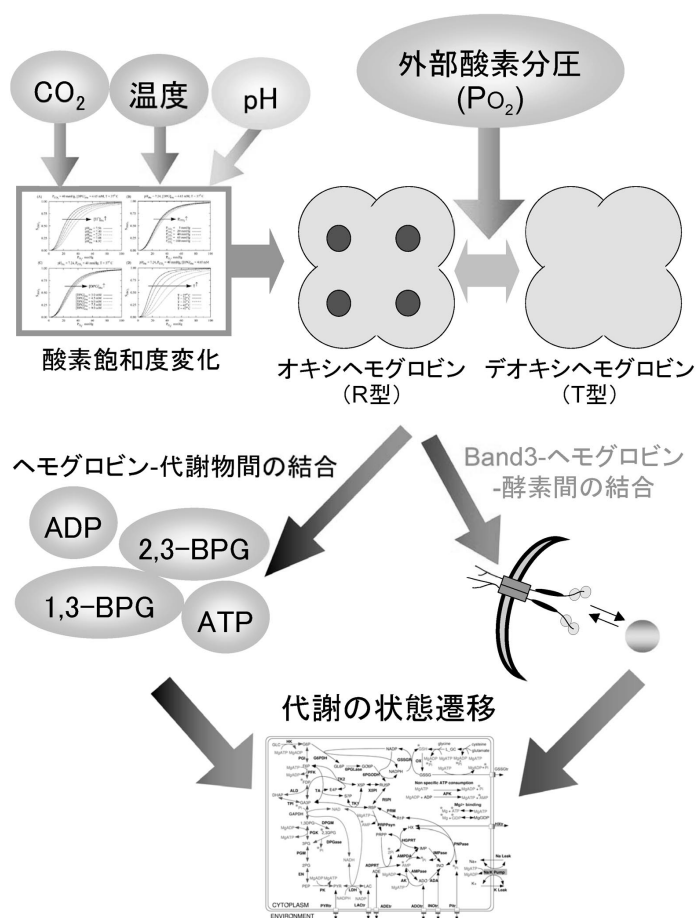


Fig. 4. ヘモグロビンの状態変化・Band3を介した赤血球代謝制御の概要

が見られなかったが、Band3(+)モデルからは解糖系前半に位置するG6PとF6P濃度は低下、解糖系後半の物質濃度は上昇（フルクトース1,6ビスリン酸濃度は一瞬低下した後上昇）、ピルビン酸は減少し乳酸量は変化しないという予測結果が得られた。

これらの予測結果を検証するため、酸素分圧が低下した時の赤血球のメタボローム測定を行った。その結果、30mmHgの低酸素状態に曝されてから3分間の解糖系代謝物質濃度の変動は、Band3(+)モデルによるシミュレーション結果と一致することがわかった (Fig. 5-B, 5-C)。この実験結果から、ヘモグロビン・膜タンパク質・代謝酵素の相互作用と酸素分圧の影響を加味した赤血球代謝シミュレーションモデルの妥当性が示された。

シミュレーションモデルによる予測とメタボローム解析による検証から、ヘモグロビン、Band3、解糖系酵素を中心とした代謝制御機構が低酸素に曝された赤血球の代謝応答に重要であることが実証できた。次項では、この酸素感知機構を盛り込んだモデルの応用研究として現在進行中である輸血用低温保存赤血球のシミュレーションによる代謝予測の取り組みを紹介したい。

低温保存赤血球の代謝予測

少子高齢化による輸血用血液の不足が深刻化する中で、保存

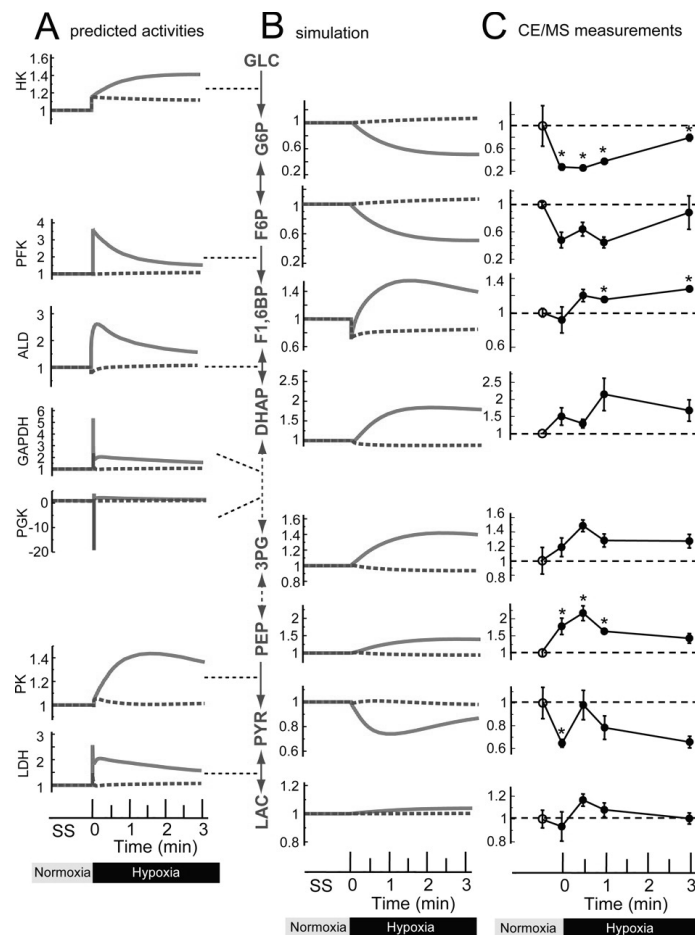


Fig. 5. 赤血球低酸素応答のシミュレーションによる予測とメタボローム解析による実測結果の比較

A: 酵素活性の予測結果 B: 代謝物質濃度の予測結果 実線はBand3(+)モデル、破線はBand3(-)モデルの結果. C: 代謝物質濃度の実測結果 [12]から転載

血液の有効期限の延長は血液資源を有効に活用するためにも重要な研究課題である。日本で最も広く用いられている輸血用血液製剤である濃厚赤血球液（RCC-LR）は、献血などで採取された血液から赤血球画分のみを分離して保存のための添加液（MAP）を混和し4℃で静置保存される。このRCC-LRは、赤血球の酸素運搬機能を左右する2,3-BPGが保存後約2週間で枯渇し、エネルギー物質であるATPも保存6週目までに半減してしまうため、42日間（実際に使用するのは21日間）という有効期限が設定されている。ATP、2,3-BPGは保存赤血球の品質を評価する指標として用いられてきたが²²⁾、保存期間中にこれらの代謝物質が減少するメカニズムは明らかになっていない。赤血球製剤保存法の改善による有効期限延長を目指すには、保存期間中の代謝動態を詳細に把握することが不可欠である。そこで、ATPや2,3-BPGをはじめとした代謝物質濃度の予測が可能なヒト赤血球シミュレータと計算機科学の分野で蓄積されてきた手法を利用して、保存赤血球の代謝不全メカニズムの解明を目指している。

まず、体内環境を想定していたこれまでの赤血球モデルを用いて保存状態を再現するために、保存液の組成や低温等の保存条件から代謝に影響を与えると考えられる要素を抽出した。これらの要素には、(1)低温条件による代謝酵素と Na^+/K^+ ポンプ活性の低下 (2)低温条件によるヘモグロビンのR型遷移 (3)赤血球内pH低下 (4)pH低下による核酸代謝系酵素の活性化、が含まれる。上記の要素を変数として既存のモデルに実装し、RCC-LRモデルを作成した。文献調査をもとに見積った値をそれぞれの変数に組み込んだモデルでシミュレーションを実施したところ、ATP、2,3-BPG濃度の挙動は実際に同じ条件で測定

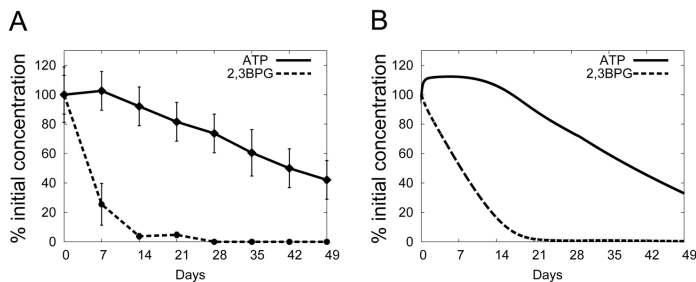


Fig. 6. RCC-LR長期保存実験とシミュレーション予測結果の比較
A：先行研究における長期保存試験の結果（[23]のデータを元に関を作成）
B：RCC-LRモデルによるシミュレーション予測結果
ATP(実線), 2,3-BPG(破線)

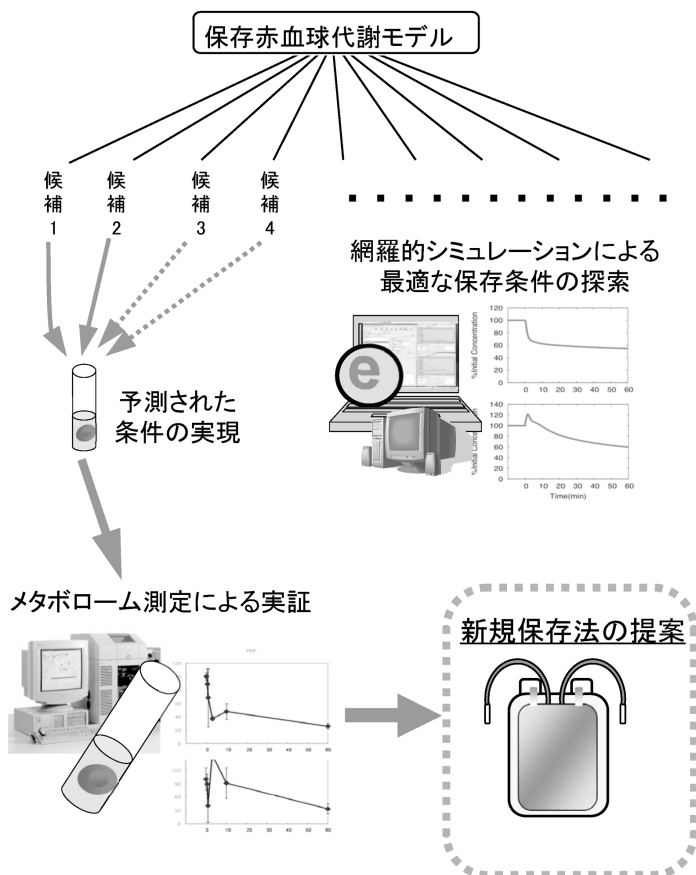


Fig. 7. シミュレーションとメタボローム解析による血液保存法の提案

された先行研究²³⁾の結果と非常によく一致しており、作成したモデルの妥当性が示唆された (Fig. 6). このモデルを用いたパラメータ解析によって、実装した各変数は保存赤血球の代謝変動を決定付ける要因として重要であることが示されている。酵素活性の低下やpH変化による影響を詳細に解析することでATPや2,3-BPGが保存中に著しく減少する代謝変化の原理が明らかになる。同時に、シミュレーションによってATP、2,3-BPGが最も維持される条件を探索し、実際にメタボローム解析と比較することで血液保存手法の提案が可能になるであろう (Fig. 7). 実時間よりもはるかに短い時間で長期の代謝予測が可能であること、さまざまな条件設定が容易であることなどの、コンピュータシミュレーションの利点を最大限に生かした応用例だといえる。

おわりに

G6PD異常症の解析では従来の知見とシミュレーションの相違点を検証し、その原因を考察することで異常症細胞における代謝不全の鍵を握る経路を見つけた。また、赤血球低酸素応答シミュレーションでは、異なる分野で議論されてきた幾つかの体系的な知見を統合した結果、血管内の酸素圧を感知するセンサー機構と代謝システムの巧妙な連携によって効率的な酸素運搬を実現していることを明らかにした。細胞シミュレーションの狭義の目的は、既に理解されている情報を元に生命現象を再構築し、その動的挙動の詳細を理解することである。しかしながら、G6PD異常症の解析や低酸素応答シミュレーションでは、単なる再現や模倣によるシステムの理解に留まらず新たな生物学的知見の発見に寄与しており、細胞シミュレーション研究の新機軸を打ち出したといえる。赤血球の低温保存シミュレーションでは、最適な保存条件の網羅的探索など計算機科学の利点を生かして、臨床に役立つ技術開発への展開を目指している。

一方で、臨床応用までを視野にいたれた細胞シミュレーションは、一般的な手法として受け入れられていると現状では言い難い。その理由として、生物学や基礎医学といったいわゆる「ウェット」な実験にたずさわっている研究者と、シミュレーションを行う計算機科学研究者との間で十分な理解が得られていないことが指摘できる。これまで協調して研究を行うことがなかった異分野間のコラボレーションによって細胞シミュレーションをさらなる段階へと発展させるためには、計算機科学と実験生物学の相互理解が重要な意味を持つ。現在、実験科学者が直感的な操作によって数理モデルを構築し、シミュレーションが実行できる環境作りが進められており、CellDesigner²⁴⁾やE-Cell IDE²⁵⁾といったソフトウェアが提供されている。加えて、計算機科学者が構築した数理モデルを第三者が簡単に再利用できるようにするために、細胞シミュレーションモデルの標準記述言語であるSBML (Systems Biology Markup Language)²⁶⁾や、生体内ネットワーク図の統一的な表記法であるSBGN (Systems Biology Graphical Notation)²⁷⁾の整備が進められている。また、臨床レベルで利用できる数理モデルを計算機科学研究者が構築するには、生命現象に関する詳細で高精度のデ

ータを効率的に計測する手法が実験生物学研究に求められる。近年のオミックス解析の発展を通じてこうしたデータが蓄積され始め、臨床的な数値モデルを構築する環境が整ってきている。本稿でヒト赤血球代謝モデルの実証実験に用いたメタボローム解析に関しても、細胞内の代謝物質を短時間で一斉に分析する技術が確立されており²⁸⁾、さらに高精度で高速な測定に向けた技術開発が行われている。

こういった研究基盤技術の充実だけでなく、実験研究者と計算機学者が議論を重ねて実験・シミュレーション研究の現状を理解しあい、互いの研究を自らの分野で活かす可能性を考えていくことが、相互理解に必要なことであろうと考えている。互いが歩み寄りを深めて分野間の垣根を低くしていくことで、今後ますます細胞シミュレーションの研究が発展し、新たな生命科学の発見や医療分野への応用に貢献することが期待される。

参考文献

1. Rapoport TA, Heinrich R, Jacobasch G, Rapoport S. A linear steady-state treatment of enzymatic chains. A mathematical model of glycolysis of human erythrocytes. *Eur J Biochem.* 1974;42:107-20.
2. Rapoport TA, Heinrich R, Rapoport SM. The regulatory principles of glycolysis in erythrocytes in vivo and in vitro. A minimal comprehensive model describing steady states, quasi-steady states and time-dependent processes. *Biochem J.* 1976;154:449-69.
3. Joshi A, Palsson BO. Metabolic dynamics in the human red cell. Part I--A comprehensive kinetic model. *J Theor Biol.* 1989;141:515-28.
4. Joshi A, Palsson BO. Metabolic dynamics in the human red cell. Part II--Interactions with the environment. *J Theor Biol.* 1989;141:529-45.
5. Joshi A, Palsson BO. Metabolic dynamics in the human red cell. Part III--Metabolic reaction rates. *J Theor Biol.* 1990;142:41-68.
6. Joshi A, Palsson BO. Metabolic dynamics in the human red cell. Part IV--Data prediction and some model computations. *J Theor Biol.* 1990;142:69-85.
7. Mulquiney PJ, Bubb WA, Kuchel PW. Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations: in vivo kinetic characterization of 2,3-bisphosphoglycerate synthase/phosphatase using ¹³C and ³¹P NMR. *Biochem J.* 1999;342:567-80.
8. Mulquiney PJ, Kuchel PW. Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations: equations and parameter refinement. *Biochem J.* 1999;342:581-96.
9. Mulquiney PJ, Kuchel PW. Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations: computer simulation and metabolic control analysis. *Biochem J.* 1999;342:597-604.
10. Nakayama Y, Kinoshita A, Tomita M. Dynamic simulation of red blood cell metabolism and its application to the analysis of a pathological condition. *Theor Biol Med Model.* 2005;2:18.
11. Kinoshita A, Nakayama Y, Kitayama T, Tomita M. Simulation study of methemoglobin reduction in erythrocytes. Differential contributions of two pathways to tolerance to oxidative stress. *FEBS J.* 2007;274:1449-58.
12. Kinoshita A, Tsukada K, Soga T, Hishiki T, Ueno Y, Nakayama Y, et al. Roles of hemoglobin Allostery in hypoxia-induced metabolic alterations in erythrocytes: simulation and its verification by metabolome analysis. *J Biol Chem.* 2007;282:10731-41.
13. Tomita M, Hashimoto K, Takahashi K, Shimizu TS, Matsuzaki Y, Miyoshi F, et al. E-CELL: software environment for whole-cell simulation. *Bioinformatics.* 1999;15:72-84.
14. Ferretti A, Bozzi A, Di Vito M, Podo F, Strom R. ¹³C and ³¹P NMR studies of glucose and 2-deoxyglucose metabolism in normal and enzyme-deficient human erythrocytes. *Clin Chim Acta.* 1992;208:39-61.
15. Meister A. Glutathione, metabolism and function via the gamma-glutamyl cycle. *Life Sci.* 1974;15:177-90.
16. Murakami K. [Glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus]. [Hokkaido igaku zasshi] *Hokkaido J Med Sci.* 1991;66:29-40.
17. Pasaoglu H, Muhtaroglu S, Gunes M, Utas C. The role of the oxidative state of glutathione and glutathione-related enzymes in anemia of hemodialysis patients. *Clin Biochem.* 1996;29:567-72.
18. Kondo T, Dale GL, Beutler E. Glutathione transport by inside-out vesicles from human erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1980;77:6359-62.
19. Song XJ, Yuan Y, Simplaceanu V, Sahu SC, Ho NT, Ho C. A comparative NMR study of the polypeptide backbone dynamics of hemoglobin in the deoxy and carbonmonoxy forms. *Biochemistry.* 2007;46:6795-803.
20. Yonetani T, Laberge M. Protein dynamics explain the allosteric behaviors of hemoglobin. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1784:1146-58.
21. Dash RK, Bassingthwaite JB. Blood HbO₂ and HbCO₂ dissociation curves at varied O₂, CO₂, pH, 2,3-DPG and temperature levels. *Ann Biomed Eng.* 2004;32:1676-93.
22. Hess JR. An update on solutions for red cell storage. *Vox Sang.* 2006;91:13-9.
23. Shiba M, Mura T, Masuyama T, Nagahashi H, Tayama T, Sasakawa S, et al. Preparation and preservation of red

- blood cell concentrates in MAP solution by quadruple bag system. Jpn J Transfusion Med. 1991;37:404-10.
24. Funahashi A, Matsuoka Y, Jouraku A, Morohashi M, Kikuchi N, Kitano H. CellDesigner 3.5: A Versatile Modeling Tool for Biochemical Networks. Proceedings of the IEEE. 2008;96:1254 - 65.
25. 櫻田剛史, 松崎由理, 小泉守義, 富田勝. 次世代統合シミュレーション技術: 4.システムバイオロジーのためのモデリング・シミュレーション環境. 情報処理. 2007;48:1089-95.
26. Hucka M, Finney A, Sauro HM, Bolouri H, Doyle JC, Kitano H, et al. The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models. Bioinformatics. 2003;19:524-31.
27. Kitano H, Funahashi A, Matsuoka Y, Oda K. Using process diagrams for the graphical representation of biological networks. Nat Biotechnol. 2005;23:961-6.
28. Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. J Proteome Res. 2003;2:488-94.

Call for Papers

***Artificial Blood*, the official bilingual journal of The Society of Blood Substitutes, Japan, welcomes papers and other articles contributing to the research and development of blood substitutes.**

If you wish to submit an article for publication, please email it to the following address after first confirming the instructions for authors.

kita@kenkousya.jp



Instructions for Authors (last revised Sept. 30, 2008)

The Journal's purpose is to publish research and related articles contributing to research on the development of blood substitutes, information on Society proceedings, regulations, and other matters of interest to the Society members, and it welcomes original articles from a range of contributors regardless of format. Although contributors should ideally be members of the Society, this is not a requirement. Decisions on acceptance of manuscripts are made by the Editorial Board based on the results of peer review. Original articles will not be accepted if they have been previously published or are being considered for publication in another journal.

If an article is coauthored, the consent of all coauthors is required before submission. As copyright to articles must be transferred to the Society, the representative of the author(s) must sign and seal a copy of the Copyright Transfer Agreement found in the Journal or downloadable from the Society's website (<http://www.blood-sub.jp/home/index.html>), and submit it to the Editorial Board by post, fax, or by email as a PDF file attachment.

Manuscripts should, as a rule, be prepared by word-processor. However, handwritten manuscripts may be accepted.

1) Articles should be categorized into one of the followings: original articles, review articles, conference reports, topical pieces, and opinion pieces. The category into which a manuscript falls should be clearly indicated at the top right-hand corner of the first page. Manuscripts that do not fall into any of these categories may also be accepted, and manuscripts may

also be re-categorized depending on the opinion of the reviewers. Submit your manuscripts to the Editor-in-Chief by either of the following methods with a covering letter (of any format):

i) Submission by email of electronic files of the text and figures (indicate the software used). Text and tables should be in DOC or TXT formats, and figures should be in PPT, JPG, or TIFF formats.

ii) Submission by post of four sets of hardcopies.

2) Manuscripts are reviewed by researchers in the field of artificial blood selected by the Editor-in-Chief, and revisions may be required depending on the opinion of the reviewers. Revised manuscripts should be submitted with a "Response to Reviewers" to the covering letter that responds to each of the points made by the reviewers, indicating any revisions made to the manuscript.

3) Once informed of the decision to accept for publication, the author should send by post files containing the text and figures of the accepted paper saved in electronic media to the address specified (indicate the software used). Text and tables should be in DOC or TXT format, and figures should be in PPT, JPG, or TIFF format.

4) Manuscripts should be typed on A4 or letter size paper. The title page should include the title, names of authors, institutions to which all the authors belong, and the address of the

corresponding author. Handwritten manuscript should be written consisting of 20 lines to 1 page.

5) Original articles, review articles, topical pieces, and opinion pieces should include an abstract and about 6 keywords on the second or subsequent pages.

6) Research conducted with the aid of an official grant must be acknowledged, and any conflict of interests (for example, if the author has an interest in a company distributing the drug described in the manuscript: being an employee or consultant to that company, receiving research funding, owning shares or patents, and so on) must be described in a footnote on the first page or in acknowledgment section.

7) If a manuscript describes the results of research on humans or animals, it should be indicated that such research was performed in accordance with the guidelines of the institute concerned in the methods or other appropriate sections of the manuscript.

8) Abbreviations should be spelled out on their first appearance. The names of drugs, medical drugs, laboratory equipment, and so on should be given. The type, distributor (manufacturer) and the address should also be indicated.

Example: Rhodamine B (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) Polygraph system (LEG-1000; Nihon Kohden Corporation, Tokyo).

9) The English fonts should be Times, Helvetica, Courier, or Symbol. Text should be typed in lower-case one byte characters. However, sentences and proper nouns should begin with an upper-case letter.

10) Figures should be expressed in Arabic numerals. Weights and measurements should be expressed in units such as the followings: m, cm, mm, μ m, L, mL, μ L, mol, g, mg, μ g, ng, pg, fg, N/10.

11) Figures and tables should be numbered in order of citation, and it should be clearly indicated where they are to appear in the main text. The title, legends and description in tables and figures should be written in English. Figures will be printed by direct offset printing. Tables will be inputted by the Editorials as originals.

12) References should be cited numerically in order of appearance in the text using superscript letters as follows: ²⁾, ^{3,5)}, ^{1, 4,6)}, etc. References should be listed using the Vancouver style as follows: Names of all authors. Title of paper. Title of journal. Year of publication; volume number: inclusive page numbers.

Abbreviations of journal names should be in accordance with *Index Medicus*. References to books should be given as follows: Names of all authors. Title of paper. Name of editor(s). Book

title. Place of publication: Publisher, year; inclusive page numbers.

References to electronic sources should be given as follows:

Name of website.

Address on new line (month and year of last access).

Examples:

1. Wong NS, Chang TM. Polyhemoglobin-fibrinogen: a novel oxygen carrier with platelet-like properties in a hemodiluted setting. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007;35:481-489.
2. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *J Am Med Assoc* 2008;299:2304-2312.
3. Sakai H, Sou K, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin vesicles as a Molecular Assembly. Characteristics of Preparation Process and Performances of Artificial Oxygen Carriers. In: Winslow RM, ed. *Blood Substitutes*. London: Academic Press (Elsevier), 2006;514-522.
4. Oxygen Infusion Project, Waseda University, Japan. <http://www.waseda.jp/prj-artifblood/index-ja.html> (last accessed Sept 2008)

13) In the case of citation or reproduction of previously published figures or tables and other content, the permission of the copyright holder(s) must first be obtained. Copyright in the published papers shall belong to the Society.

14) Regarding secondary use and copyright in works published in the Journal, secondary use may be made of the Journal, in whole or in part, via media such as CD-ROM or the Internet. Reproduction rights, translation rights, film rights, dominion, and public transmission rights (including the right to make the works transmittable) are transferred to the Society by the author's submission of the aforementioned Copyright Transfer Agreement. This clause shall not restrict reuse by the author himself/herself, but the Editor-in-Chief must be informed in the event of reuse.

15) No publication fee is charged for publication in the Journal, and the author(s) shall receive as a gift 30 offprints of their contributions. Authors will be charged for copies in excess of this number (approximately 100 yen per copy). Authors wanting prints of color photos or on art paper, etc. must pay the actual cost of such prints.

16) Address for manuscripts to be sent:

Attn: Kenkou-sya Corp. Artificial Blood Publishing office.

2F Casa-kudan, 1-1-7 Kudan-kita, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0073, Japan

Tel: +81-3-5286-3122 Fax: +81-3-3205-4740

E-mail: kita@kenkousya.jp

投稿規定（平成20年9月30日改訂）

本誌は、血液を構成するあらゆる成分について、その代替物を開発する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、査読結果に従って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。

共著者がいる場合には、共著者全員の承諾を得てから投稿する。論文の著作権は本学会に譲渡しなければならない。このため、著者の代表者は、本誌に添付の著作権譲渡同意書（Copyright Transfer Agreement）或は、本会のホームページサイト（<http://www.blood-sub.jp/home/index.html>）からダウンロードしたものに署名捺印の上、郵送、Fax、またはpdfファイルとしてE-mailにて編集委員会宛に提出する。

ワープロを用いて作製した原稿の投稿を原則とする。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) 原稿の種類は、「原著論文」、「総説」、「学会報告」、「トピックス」、「オピニオン」、「海外文献紹介」から選び、これを第1頁の右肩上に明記すること。これらに該当しない原稿も受け付ける。査読意見によっては種類が変更される場合がある。次のいずれかの方法により、送付状（任意のフォーマット）を添えて編集委員長宛に投稿する。

i) 文章と図表の電子ファイルをEメールで送付する（使用したソフトを明記すること）。文章・表のファイル形式は、doc, txtが好ましい。図は、ppt, jpg, tiffが好ましい。

ii) ハードコピー4部を郵送する。

2) 投稿論文の査読は、編集委員長が選んだ人工血液分野の研究者に依頼する。査読意見によっては、原稿の修正を求める場合がある。修正論文（Revised Manuscript）の投稿に際しては、送付状に「査読意見に対する回答」を添え、意見に対して一つ一つ回答をするとともに、修正箇所がある場合にはこれを明記する。

3) 掲載決定通知の後、著者は採択論文の文章・図表のファイルを電子媒体として、指定する宛先に送付すること（使用したソフトを明記すること）。文章・表のファイル形式は、doc, txtが好ましい。図は、ppt, jpg, tiffが好ましい。

4) 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、英文著者所属、続いて連絡の取れる著者（corresponding author）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。

5) 「原著論文」、「総説」、「トピックス」、「オピニオン」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。

6) 投稿論文に記載の研究が公的助成を受けて実施された場合には、謝辞にその旨を記載すること。また、Conflict of Interests（例えば、論文に記載された薬品を販売する企業と著者との利害関係：雇用、コンサルタント、研究助成、株式、特許など）があれば、これを第1頁の脚注、謝辞などに記載すること。

7) ヒトを対象とした研究結果、および動物実験の結果を掲載する場合には、各研究機関のガイドラインに従って実施したことを方法等に明記すること。

8) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。薬品、医薬品、測定装置等は、外国語名の場合は言語のまま用い、日本語化しているものはカタカナとする。型式、販売（製造）元とその所在地も記入すること。

（例）Rhodamine B (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), ポリグラフィシステム (LEG-1000; 日本光電工業, 東京)

9) 句読点はコンマ（,）ピリオド（.）とする。

10) 文中の英語に使用するフォントは、Times, Helvetica, Courier, Symbol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。

11) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μ m, L, mL, μ L, mol, g, mg, μ g, ng, pg, fg, N/10などを用いる。

12) FigureとTable：引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は、全て英文とすることが好ましい。本文中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。

13) 文献：本文に引用した順序に番号を付け、文中では²⁾, ^{3,5)}, ^{1, 4,6)}などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名。論文題名。誌名。西暦発行年；巻数：頁～頁。とし、誌名の省略は医学中央雑誌またはIndex Medicus に準拠する。単行本の場合は全著者名。題名。編集者名。書名。発行地：発行書店、年号；頁～頁。の順とする。電子文献の場合は、ホームページ名。改行してアドレス（引用した西暦年月）とする。

(例)

1. 高折益彦. 人工酸素運搬体:その将来への期待. 人工血液 2007;15:90-98.
2. 橋本正晴. 単回投与毒性試験. 野村 護, 堀井郁夫, 吉田武美 編. 非臨床試験マニュアル. 東京: エルアイシー, 2001;37-48.
3. Wong NS, Chang TM. Polyhemoglobin-fibrinogen: a novel oxygen carrier with platelet-like properties in a hemodiluted setting. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2007;35:481-489.
4. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. J Am Med Assoc 2008;299:2304-2312.
4. Sakai H, Sou K, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin vesicles as a Molecular Assembly. Characteristics of Preparation Process and Performances or Artificial Oxygen Carriers. In: Winslow RM, ed. Blood Substitutes. London: Academic Press (Elsevier), 2006;514-522.
5. 早稲田大学酸素輸液プロジェクト.
<http://www.waseda.jp/prj-artifblood/index-ja.html>
(2008年9月現在)

14) 既発表の図表, その他を引用, 転載する場合には, あらかじめ著作権所有者の許可を得ること. また, 掲載論文の著作権は本学会に帰属する.

15) 二次掲載について. 本誌は, 他の言語ですでに掲載された論文を和文で二次掲載することは二重投稿ではなく正当な掲載と認めるが, 著者は以下の事項を遵守する.

- a) すでに掲載された論文であること.
- b) 著者は両方の雑誌の編集者より許可を得ていること. 二

次掲載する編集者に最初に掲載されたもののコピー, 別刷, もしくは原稿のいずれかを添付すること.

- c) 論旨を変えないこと. 執筆者は同一(順不同)であること.
- d) 二次掲載版のタイトル・ページに掲載される脚注には, その論文の全体もしくは一部分がすでに掲載されている旨を明記し, 更に初出文献も示すこと. 適切な脚注の例を以下に示す. 「This article is based on a study first reported in the [...]雑誌タイトル(完全な典拠情報を添えたもの) [...]」(訳: この論文記事は, [...] に最初に報告された研究に基づくものである)」.

これらの要件を満たしている場合は, その旨を明記して, 総説または論文記事(二次掲載)として投稿する.

16) 本誌掲載著作物の二次利用および著作権について. 本誌の一部, もしくは全部をCD-ROM, インターネットなどのメディアに二次利用する場合がある. 本誌に掲載する著作物の複製権・翻訳権・上映権・譲渡権・公衆送信権(送信可能化権を含む)は, 著者が上述の著作権譲渡同意書を提出することにより, 本学会に譲渡される. 本項は, 著作者自身の再利用を拘束するものではないが, 再利用する場合は, 編集委員長に通知をすること.

17) 掲載料. 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. それを越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.

18) 原稿の送付先

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

カーサ九段2階

(株)研恒社「人工血液」編集係 宛

電話: 03-5286-3122, FAX: 03-3205-4740

E-mail: kita@kenkousya.jp

●編集後記●

グルタルアルデヒド架橋ヒトHb溶液 (PolyHeme) の臨床試験を進めていたNorthfield社が、この5月に開発を中止することを発表した。臨床第三相試験の結果に対し、FDAから安全性についての追加試験が要求されていたが、これを継続するための資金集めが困難になった為とのことである。有望とされていた開発グループがまた一つ消える事になり、非常に残念な話であるが、非細胞型Hbの宿命かもしれない。細胞型Hbを進めている日本の出番はこれからである。

本号の宗先生ほか執筆の細胞型ヘモグロビン小胞体の臨床検査法に対する影響の解析は、臨床試験を円滑に進めるために重要な知見である。多田羅先生の代用血漿剤の膠質浸透圧に関する総説は、従来に無いシミュレーションを使った体液動態の推移がまとめられている。国産の遺伝子組換えアルブミンのほか、海外から分子量の異なるヒドロキシエチルスターチが登場しようとしており、臨床現場において適切な代用血漿剤を選択・使用するために重要な知見となろう。辻先生のヒトES細胞からの血液産生は、輸血細胞治療の技術開発の最前線の問題である。実現までに立ちほだかる課題についても率直に記述頂いているが、今後のご発展を期待したい。西野先生ほかのE-cellは、コンピュータ内 (*in silico*) に構築された人工赤血球といえようか。多成分系の反応を網羅でき、輸血代替としての人工赤血球

の機能デザインにも利用できると考えられるし、また病態の解明にも利用できる、学際研究の極みといえる。今後も最先端の研究を本誌で紹介出来ればと思います。会員の皆様の話題提供を期待します。

さて、私事であるが13年前、恩師の土田英俊先生の勧めもあり、カリフォルニア大学サンディエゴ校 (UCSD) に1996年から約二年間、留学する機会を得た。公的な書類の上では、プロジェクト主任のProf. Winslowが私のSupervisorであったが、空港に私を迎えに来たのは共同研究者のProf. Intagliettaで、以来直接的にProf. Intagliettaから御指導を頂いた。未だにその理由は良くわからないが、多分、新しい物質系を追い求めるDr. Winslowと土田先生は、ライバルだったからではないかと思っている。二年間の留学の間に培ったUCSDほかの研究者との繋がりは、有難いことに今なお継続している。良き友、共同研究者であり、また時に良きライバルでもある。Dr. Winslowからこの大切なコネクションをつくる機会を頂いたこと、お会いするたびに激励の言葉を頂いたことに心より感謝申し上げます。謹んでご冥福をお祈り致します。

(酒井 宏水)

編集委員会

●酒井 宏水 (委員長), 東 寛, 大谷 渡, 武岡 真司, 寺嶋 克幸, 堀之内 宏久, 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.17 (1) 2009年6月5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 55号館S棟703号室

早稲田大学 理工学研究所 酸素輸液プロジェクト

TEL (03) 5286-3122 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