

人工血液

第 11 卷 第 4 号 2003 年 12 月

目 次

会告	192
総説	人工血小板の開発の歴史と現状	長谷川雄一 193
原著	人工酸素運搬体 (Neo Red Cell:NRC) の 分割投与による効力持続性評価	筒井洋治 200
二次掲載論文	フィブリノーゲン 鎖ドデカペプチド結合粒子の 血小板代替物の展開	岡村陽介 205
海外文献紹介	赤血球代替物を用いる蘇生法による 外傷後過剰炎症反応の変化	酒井宏水 211
事務局たより	215

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 11 No. 4 December, 2003

Contents

<i>Announcement</i>	192
<i>Review : The history and status of platelet substitute.</i>	<i>Yuichi Hasegawa</i>	193
<i>Original Article :</i> <i>Duration of efficacy of NRC (Neo Red Cell) administered in divided doses.....</i>	<i>Youji Tsutsui</i>	200
<i>Secondary Publication:</i> <i>Development of fibrinogen chain dodecapeptide-conjugated particles</i>	<i>Yosuke Okamura</i>	205
<i>Topics: Alteration of the postinjury hyperinflammatory response by means of resuscitation with a red cell substitute.</i>	<i>Hromi Sakai</i>	211

人工血小板の開発の歴史と現状

The history and status of platelet substitute.

長谷川雄一，長澤俊郎

Yuichi Hasegawa, Toshiro Nagasawa

和文抄録

血小板輸血は、ここ30年の間にがん化学療法・造血器疾患等の治療にまさに無くてはならない技術となった。一方、輸血療法は、治療関連感染症・輸血関連急性肺障害（TRALI）等の新たな問題を投げかけてきている。加えて、血小板輸血においては、その安定供給に大きな制約がある。酸素運搬体（人工赤血球）の研究が前臨床段階に比較的早く進んだのとは対照的に、血小板はその複雑な機能故に代替物の開発の萌芽は遅く、わずか10年余りの歴史を有するにすぎない。今回これまでに報告された血小板代替物を概説する。これまでの血小板代替物は、ヒト血液由来の産物を用いたものが殆どであり、通常の輸血療法と同じく、感染性疾患の危険を排除することは出来ない。我が国で開発された血小板代替物glycoprotein-Ib-poly albuminは、glycoprotein, albuminいずれの部分もrecombinant productであり、感染性疾患を伝播する可能性を著しく低下させた点で画期的な製剤である。glycoprotein-Ib-poly albuminは、in vitroにおいてvon Willebrand factorと結合し、in vivoに投与した場合、血小板減少ラットの血栓による血管閉塞時間を短縮させる能力を有すること、正常血管の閉塞を惹起しないという点が確認され、今後の臨床応用が期待される血小板代替物である。

Abstract

Platelet transfusion has been performed to manage thrombocytopenic patients with cancer or hematological diseases and improved the quality of patient's life for thirty years. On the other hand, it casts new problems such as infection and transfusion related acute lung injury (TRALI). Besides, the donor of platelet transfusion is often short. The development of platelet substitute runs far behind comparing with the one of RBC substitute, artificial oxygen carriers, due to complicated mechanism of coagulation and hemostasis. It has been only ten years since the first platelet substitute was reported. In this paper, previously reported platelet substitutes are summarized. All but one are made from human blood, and so, the risk of transfusion-related infectious disease can not be deprived. In Japan, a group led by Dr. Ikeda started the project of development of platelet substitute in 1997. This project is supported by health science research grants, ministry of health, labor and welfare. This group developed several platelet substitutes. Those are epoch-making products because almost eliminate donor-blood-born infections. In this report, *in vitro* data of those platelet substitutes are described. And *in vitro* ability of one of those platelet substitutes, the glycoprotein-Ib-polyalbumin, is introduced briefly.

Keywords

platelet substitute, glycoprotein-Ib, photo chemically induced venous thrombus

ヒト血小板輸血の歴史

カール・ランドスタイナーらがABO赤血球血液型を発見したのはわずか百余年前の1900年のことである。引き続き1902年には、De CastelloらがAB型を発見し近代的輸血の基礎が初め

て確立した。1915年には、ベルギー・アルゼンチン・アメリカで各々独立して、クエン酸ナトリウムにより血液を非凝固状態に保ち輸血用に使用することが可能となった。ABO血液型の発見と抗凝固剤の発明により輸血療法は、広く臨床の現場に普

及し、2度の大战でも多くの命を救った¹⁾。勿論、輸血療法は長い間“全血”輸血が行われていたが、血漿・赤血球濃厚液を分けて行う輸血に引き続き、ダナ・ファーバー研究所のフライが血小板濃厚液の輸血を開発し癌治療に大きな光明を掲げた。1972年になるとディスプレイセットを用いた比較的簡便な成分採血装置（Hemonetics社）が市販・臨床応用されるに至り、単一ドナーから多単位血小板濃厚液*を採取する血小板輸血が広く各地の病院施設で行われるようになった（Fig. 1,2）。{ *輸血は、全血200ml由来の血液製剤を1単位と呼称する。血小板輸血は、成人患者に対して1回あたり15~20単位の多単位の血液を要する。} 初期の成分採血装置は、血球分離ポウルに赤血球を基準量まで蓄積し、その赤血球層上に蓄積した血小板を採取するという構造をとるために体外循環量が大きく、ショックを呈しやすかった。更に返血時には、急速に大量のクエン酸加血が体内に戻ることで低カルシウム血症が頻発するなどド



Fig 1. Hemonetics V50

Hemonetics社の血液成分採取装置の1つ。プラスチックポウル形状の分離システムを持つ。大量の血液を一時的に体外に貯留し、しかもそれはヘマトクリットの低いドナー（患者）ほど多くなる。そのため、ショックをきたすことが稀でなかった。また、間歇分離を行うため、クエン酸加血の大量返血に伴う低カルシウム血症をおこしやすかった。本装置はHemonetics社の初期の装置の発展型である。IBMの連続血液分離装置の操作が複雑であったため、Hemonetics社の製品は広く普及していた。



Fig 2. 血小板濃厚液

現在輸血される血小板製剤は、殆どが一人のドナーから大量に血小板を採取して作成される（成分献血由来）。従って、多数のドナーから小単位の血小板を得ることに比べ、抗原性・感染危険は少なくなるが供給は不足しがちとなる。

ナーにかかる負担も大きかったが、連続採取・連続返血を行う少ない体外循環量の装置へ採取がシフトすることに伴い安全に成分採血が行われている（Fig. 3）。近年は、がん治療に伴う骨髄抑制から血小板製剤の需要が増大してきている。我が国での血小板製剤の供給状況は平成14年報告によれば、実に年間795万単位が供給されているという。これは、血液製剤年間供給量1718万単位の実に47%を占める。その血小板製剤は、現在殆ど全てを成分献血（血小板・血漿などの単一の血液成分のみを献血する献血形式）に頼っているが、平成11年から血小板成分献血者は、増加を見せていない²⁾。



Fig 3. Cobe Spectra

新しい世代の血液成分採血装置の1つ。IBMの連続血液分離装置から発展した装置。連続的に血液の成分分離を行い、連続的に血小板を採取した残りの血液をドナーに返血するため、ショックや低カルシウム血症を生じにくい。

同種血小板輸血の持つ問題点

現在では血小板の減少した人に健常者から血小板の供血を受け、止血機能の維持を図ることが可能となった。しかし、そこには常に感染症の問題がつきまとう³⁾。いかに既存の感染症に対する検査法が発達したとしても、かつてHIV、プリオン病に対する知識が無かったように、未知の感染症にかかる可能性は払拭できない。さらに、血小板製剤は、常温保存が原則とされるが故に、短期間の保存が可能であるにすぎない（欧米では120時間、我が国では72時間以内の使用が義務づけられている）。従って赤血球製剤・血漿製剤では、ドナーの感染症の存在が明らかとなった後に、血液製剤の使用を未然にくい止めることが可能であるが、血小板製剤に関しては既に輸血が終了している可能性が高い。加えて、既述したように1回に使用する単位数が成人で15~20単位と多いことも他の製剤と大きく異なる。

感染性疾患に受血者が罹患するリスクが高いにもかかわらず、血小板製剤の需要は大きく、常に供給不足の状態となりがちである。又、使用単位数が大きいため医療経済的にも大きな負担となっているが**、ヒト由来の製剤であるためにコストの

低下が期待したい。{* *血液製剤は、赤血球でも血小板でも1単位あたりの価格はほぼ同じである。}

このため、感染の恐れが無く、需要の緩急に迅速に対応でき、安価な製剤となる可能性を持つ人工血小板開発が強く望まれている。

人工血小板の開発

人工血小板を作成する目的には、上記のように、感染症のリスクを避ける・安定した供給を行う・医療費を抑制する、という項目が上げられる。これまでも、安定した供給を行うことを目的にして、ヒト由来血小板の保存期間延長を目的とした研究が行われてきた。一方、感染症の抑制のためには、生物由来の材料を出来るだけ使用しないことが必要であり、遺伝子組み換え材料を用いた人工血小板の研究も行われている。人工血小板について解説する際に血小板の機能を説明する必要があり、次に概説する。

血小板の働き

血小板の働きは、大きく2つに分けられる。1つは、血栓形成(止血)、もう1つは、platelet derived growth factor (PDGF), platelet factor 4 (PF4), 5-hydroxytryptamine (5-HT) に代表される分泌機能である。分泌機能に関しては、直接血小板の粘着を促進するvon Willebrand factor (vWf)やfibronectin(ファイブロネクチン)、血小板凝集を促進するadenosinediphosphate (ADP), thrombospondin (トロンボスポンジン)、凝固第V因子、血管を収縮させる5-HT、繊維芽細胞を増殖させるPDGF等が血小板の活性化に伴って分泌されることが知られている。血栓形成機能に関してその働きは、凝固因子の反応の場としての役割と、血小板とfibrinogen(フィブリノーゲン)による血小板凝集という2つの機能に分けられる。凝固因子反応の場としての血小板は、カルシウムイオンと共に豊富な膜上のリン脂質(PL)によってX(ten)ase, もしくはProthrombinase complexを形成し、凝固を出血点において効率よく進めるという極めて巧妙な働きを現すのに役立っている(Fig. 4)。血小板血栓を形成するために、血小板は破綻した血管内皮から露呈したコラーゲン繊維にvWfを介し糖蛋白(Glycoprotein:GP)Ib/IXで粘着し、その刺激が細胞内に伝えられGPIIb/IIIaの立体構造変化をもたらす。構造変化したGPIIb/IIIaがフィブリノーゲンを架橋

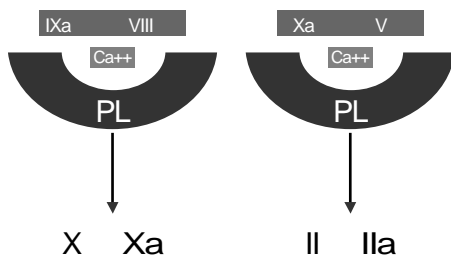


Fig 4. Phospholipid (PL) を豊富に有する血小板膜とカルシウムイオンは、第IXa, VIII凝固因子と共に第X因子を活性型Xaへ変化させる。同様に第II凝固因子をIIaへとXa, V, Ca++と共に変化させる。

として血小板の凝集塊を形成することで強固な血栓を形成する(Fig. 5)。フィブリノーゲンの血小板結合部位は、わずかにArg-Gly-Asp(アミノ酸1文字表記でRGD)の3アミノ酸で規定されているにすぎない⁴⁾。このように血小板の働きは、非常に複雑であり、未だ解明されていない機構も多く、現時点で完全な人工血小板を作成することは困難であるが、最も重要な機能を再現することが可能になれば、凝固カスケードの発動促進、残存血小板の活性化を引き起こし止血に寄与することが出来ると予測される。このような考えで人工血小板の開発が行われてきた。

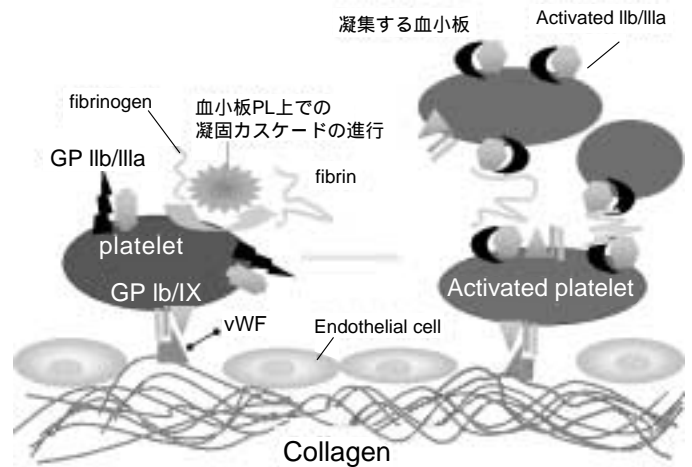


Fig 5. 血管内皮が傷害され、露出したコラーゲン繊維にvWf(von Willebrand factor)を介してIb/IX complexが結合する。その刺激が伝達され、Ib/IIIaの形態変化を生ぜしめ、フィブリンとIb/IIIaが結合する。フィブリンを介して血小板凝集塊が次々と成長する。

人工血小板開発の歴史 (Table 1)

人工血小板がいつ頃開発され始めたかは不明である。1983年にAgamがホルマリン固定した血小板が、非活性型血小板とは凝集しないが、活性型血小板とは凝集を行うことを報告した。この時Agamはfibrinogenを結合させた固定化血小板もfreshな血小板を刺激した状態では血小板凝集に巻き込まれることを報告したが、この固定化血小板-フィブリノーゲンは、血小板と結合したフィブリノーゲンの働きを研究するために作成したものであり人工血小板として創案したものではない⁵⁾。GPIIb/IIIaを血小板膜の構造と同じようにphospholipid(PL)で形成された小粒子(vesicle)に結合させる試みは1985年にParise LV, Phillips DRにより報告されているが、PL vesicleに結合させたGP I Ib/IIIaの疎水性結合、PL上でのGPの方向性、電子顕微鏡による観察などの構造研究に主眼がおかれ、血小板の働きを代替させるものとしては評価されなかった⁶⁾。同様にFujimotoらも1991年GP I Ib/IIIaをPLに挿入し、そのCa²⁺イオンchannelとしての働きを調べている⁷⁾。多くのヒト血小板糖蛋白を同時に人工的な脂質層(1,2-dimyristoylamido-1,2-deoxyphosphatidylcholine; DDPC)に移動する試みも1994年にOkumura

Table 1. これまで報告された血小板代替物

< 血小板糖蛋白を膜に結合させる試み >	
1985年	Parise LV, Phillips DR GPIIb/IIIa をPLで形成された小粒子 (vesicle) に結合させる
1991年	Fujimotoら IIb/IIIaをPLに挿入
1994年	Okumuraら 血小板糖蛋白を同時に人工的な脂質層に移す
< 血小板機能代替物の開発 >	
1992年	Coller BSら 赤血球にRGD peptideを結合させた“ thromboerythrocyte ” Agam, Livne 赤血球-fibrinogenを共有結合体
1993年	Raybak, Renzulli plateletsome ”
1996年	Chao Infusible platelet membrane (IPM)
1997年	池田ら rGPIb , rGPIa/IIaを用いた血小板代替物
2002年	Davies AR Synthocytes

らにより報告されているが、これも人工血小板開発の1段階ではあったが、止血機能を期待して行われたものではなかった⁹⁾。止血機能の検討が行われた血小板代替物の報告は、1992年まで待たなければならない。この年Coller BSらは赤血球にRGD peptideを有するビーズを結合させた“ thromboerythrocyte ”を開発し、これが*in vitro*において、活性化した血小板とGPIIb/IIIaを介し結合し血小板凝集を起こすことを報告した⁹⁾。このthromboerythrocyteは、collagenに粘着した血小板とも結合し、通常の赤血球と同様の浸透圧抵抗性・変形能を示し、溶血する事は極めて少ないことが示された。彼らの試算によれば、2単位の血小板輸血に相当する効果を50mlのthromboerythrocytesで得られると言う。同じ年、Agam, Livneは、赤血球にfibrinogenを共有結合させ*in vitro*, *in vivo*においてその有用性を検討し報告した。このfibrinogenを結合した赤血球は、赤血球としての物性を浸透圧抵抗性、ヘモグロビン量、マクロファージによる貪食処理acetylcholinesterase活性等が検討され、通常の赤血球と大きな差異が認められなかったと述べている¹⁰⁾。人工血小板の開発は、この2つの赤血球を利用した血小板代替物の報告があった1992年頃から始まったと考えるのが妥当であろう。翌1993年には、Raybak, Renzulliがdeoxycholate抽出した血小板膜をsphingomyelline, phosphatidylcholinを含むリポソーム小胞に結合させたplateletsomeを作成した。このplateletsomeは血小板に由来するGPIb, IIb/IIIa, IV/IIIを含む15種類のGPを保有し、血小板減少ラット及び血小板減少ウサギにおいて出血時間の短縮を示すものの、病理学的に大きな血栓を形成しないことを見出している¹¹⁾。PRP Inc.のChaoは、同様に期限切れの血小板を凍結・融解・超音波破砕し血小板膜成分を調整、Infusible platelet membrane (IPM) を作成した。彼らは、加熱によりウイルスの不活化を行った。IPMは、GPIb receptor, platelet factor3を保持するがGP IIb/IIIa, factorV, セロトニン欠損していた。IPMは*in vivo*での止血効果が投与4

時間まで発揮され、血中滞留時間が長いことを長所としたが、反面、血栓形成傾向が認められたという¹²⁾。IPMは、Cyplexという商標でCypress Bioscience Inc.において開発が進められた。Clinical phase II pilot studyまで施行され、血小板輸血不応を含む血小板減少者にも有効なデータを報告していたが、現在Cyplexの開発は行われておらず、その理由も明らかにされていない。この他にも、Davies AR が、フィブリノーゲンをアルブミンカプセルに結合させた物質をSynthocytesとして報告している。Synthocytesは血小板凝集に血小板側のGP IIb/IIIaを介して取り込まれ、血小板のADP凝集を促進すること、annexin-Vに対する血小板結合能を増加させることが示されている¹³⁾。Synthocytesは、Leviらによっても検討され、*in vitro*においては、血管内皮を敷いたチャンバーに血液と共に流すと血小板と結合すること、*in vivo*ではウサギの耳袋出血時間の短縮、術創からの出血量の減少を観察した¹⁴⁾。Synthocytesは、英国のNottingham大学とAndaris Groupによってpre-clinical trialの準備がされていたが、実際にclinical trialが行われたと言う報告は見出せない。

既報例の問題点

以上述べてきたようにこの10余年で幾つかの血小板代替物が創製されてきた。それらは、いずれもヒト血液に由来するか、それを含有しており、血液関連感染症のおそれを排除することは出来ていない。

我が国における人工血小板開発

我が国での人工血小板の開発は、厚生労働省の高度先端医療研究事業として慶應義塾大学の池田康夫教授を中心とし1997年から開始された。血小板の働きを発現するために血小板が粘着・凝集するために不可欠な糖蛋白GPIb, GPIa/IIaが選ばれた。GPIb は、血小板が血管内皮下に露呈したコラーゲン繊維との結合の橋渡しをするvWfの血小板側のreceptorであり、止血の第一次段階に重要なGPである (Fig. 6)。GPIa/IIaは2価の陽イオンの存在下でcollagen receptorとして血管内皮の破綻

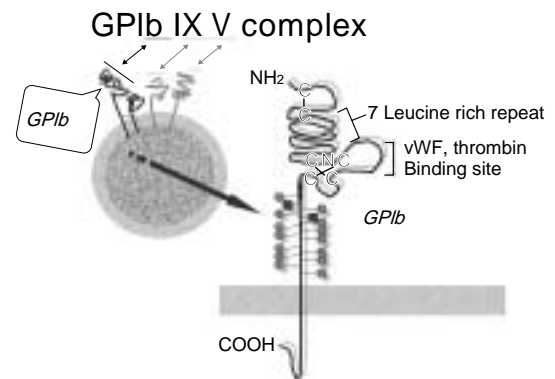


Fig 6. GPIbは、鎖と鎖からなる。鎖はN末近傍にLeucine rich repeatを有するが、この部位がnegative chargeを有するものとの結合に関与するという。Leucine rich repeatのC端よりには、vWf, thrombin結合部位が存在する。

部位での血栓形成に重要な働きを示す。このGPIb, GPIa/IIaはrecombinant (rGPIb, rGPIa/IIa)であるがゆえに、感染リスクが極めて低減されているという非常に重要な性格をこの血小板代替物に与えている。rGPIb, rGPIa/IIaのcarrier vesicleとしては、liposomeあるいはpolymerizeしたhuman albuminが使用され、現在開発・研究が進められている。ここで用いられるアルブミンもrecombinant製剤であり、pH、温度によりサイズがコントロールされ、N-succinimidyl 3-(2-pyridylidithio) propionate (SPDP)を用いpyridyl disulfide結合をし、SPDP ethanol, dithiothreitol (DTT)によりSH結合を導入したrGPIbと混和することでcarrierにrGPIbを結合させている^{15,16}。研究班の武岡は、platelet GPのcarrierとして、egg yolk lecithin, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DPPE), cholesterol, 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-4-phosphocholine (POPC)の構成比を変えた様々なphospholipid vesiclesを作成し、形態のflexibilityに富んだ材料のほうが、固着表面との結合能が高くなることを報告した¹⁷。これはligandを固相化した表面に結合する面積が増加するためと考えられている。また、rGPIb-poly albuminならびにrGPIb-latex beadsは、POPC, DPPE, cholesterol, dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC)を様々な構成比として作成したphospholipidsと結合させたrGPIbと比較して、vWf結合表面との粘着能が高いことを見出した¹⁸。rGPIb-liposomeについては、in vitroでの解析が詳しくなされている。このrGPIb-liposomeは、vWfを固相化したガラス表面にずり応力に依存して結合し、この結合は、rGPIb-liposomeとvWfの密度に依存性であった。更に、rGPIb-liposomeとvWf固相化表面の結合は、抗vWf抗体NMC-4、抗GPIb抗体GUR20-5により独立して阻害されることが知られている^{19,20}。rGPIa/IIa-GPIb-liposomeは、vWfが存在しなくてもcollagen coated surfaceに結合するが、rGPIbの密度が低いとvWfが存在しても高ずり応力下での結合が低下し、rGPIa/IIa密度が低下すると全てのずり応力下で結合が低下することが示されている。又、anti-GPIb antibody (GUT83-35)は、高ずり応力での結合を低下させ、anti-GPIa antibody (Gi9)は、全てのずり応力で結合を低下させたことが明かにされた²¹。これらの事実は、rGPIb, rGPIa/IIaがそれぞれの機能をliposomeに結合させた状態でも発現していることをin vitroにおいて証明している。我々のグループでは、これらの作成されたplatelet substitutesの機能評価をin vivoにおいて行う機会を得た。

我々は、ガンマ線照射を行い血小板減少ラットを作成した。この血小板減少ラットに血小板代替物を静脈内投与し、尾をSimplate (出血時間測定用ブレードの1つ。一定の長さで深さの切創を作ることが出来る。)により切開し生理食塩中における出血時間を測定したが、特に高度な血小板減少値において再現性に乏しいことが明かとなり、再現性のある結果を得ることが出来なかった。その為、皮膚に一定面積に陰圧をかけることで出血斑を生じさせ、定量的に測定する方法やSimplateで作った創部からの出血量を計る方法などを様々な条件の下で試み

たが、いずれも満足のいく結果を得ることができなかった。この手法も出血を引き起こす条件、特に同一条件の血管に均一の創傷を作ることが不可能であるためと考えられた。出血時間の測定法に関しては、多くの報告にみられる尾先端を切離する方法では血小板機能の評価を正しく行えないことが知られている。切創の尾軸に対する方向、実験系をどこに置くか(生理食塩水中で測定するか大気中で行うか)、温度、切創を作成する方法、実験動物にかかる麻酔の種類を変化させた結果では、Template出血時間が最も優れているが、thromboxane A2-prostacyclin balanceに関して評価できない他、5万未満の血小板数で再現性のある確立された標準化法はない²²。そこで、均一の条件下で血栓形成を評価する手法としてphotochemically induced thrombus formationを用いた^{23,24}。この方法は、血管内にFluorescent-Naを注入し、血管にフィルターを通した光を顕微鏡観察下で照射する。注入された蛍光物質からは、励起エネルギーが発生し、これが血管内皮を傷害することで血栓が形成される(Fig. 7,8,9)。これまで血小板の機能を抑制する薬剤の開発、評価に用いられていた方法を血小板代替物の評価に用い

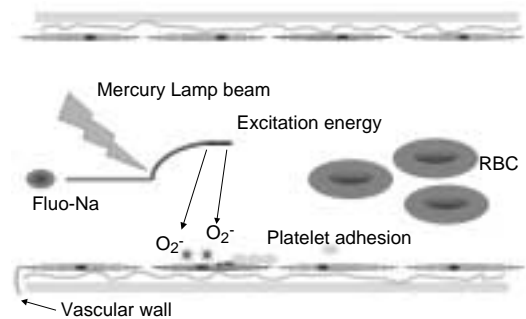


Fig 7. Photochemically induced venous thrombus の原理を表す。蛍光色素fluo-Na に水銀光からの光がエネルギーを与え、励起する。この際にfree radical が放出され、これが血管内皮を傷害することで血小板の活性化が始まる。

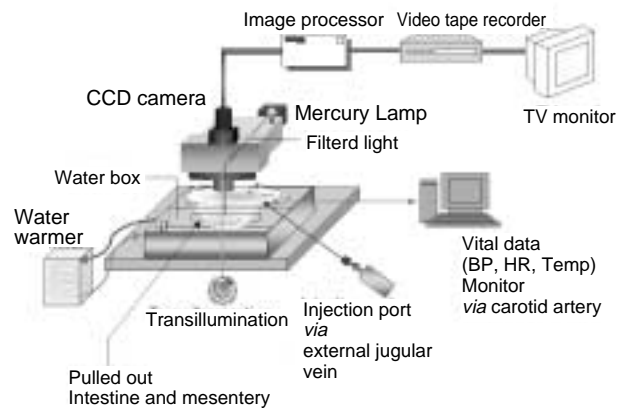


Fig 8. 実験装置の概観を示す。ラットを開腹し腸管をプラスチックボックスに露出させる。これをガラスリングを用いて固定し、適切なサイズの静脈を顕微鏡観察下に探し出す。対象とした静脈の血流に異常がないこと、分岐が不適切な場所がないこと、vital dataが安定していることを確認し、injection portから試験物質を投与する。TV monitor において血管閉塞時間を観察する

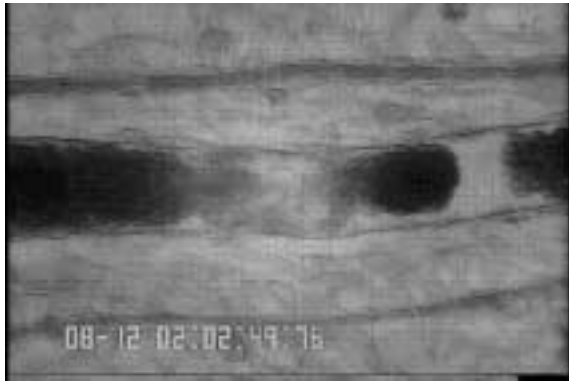


Fig 9. 顕微鏡下で観察されるphotochemically induces venous obstruction

たのであるが、本法において再現性良く血小板代替物の評価を行うことが可能となり、血栓の完全閉塞時間と残存血小板数の間には弱い負の相関が認められた。血小板減少ラットにおいて血小板代替物rGPIIb-poly albumin (rGPIIb-pol alb) 輸注後の血栓形成にかかる時間を測定した結果、残存血小板数10万未満1万以上の条件においては、これまでのところrGPIIb-pol albは血管閉塞時間の短縮を示し、血小板の極端に少ない条件においても血栓を形成する能力を補完することを確認中である²⁵⁾。更に我々は、thrombin-anti-thrombin complex (TAT) 等の凝血学的指標を用いた検討、病理学的な検討でも血栓形成の促進がなされていないことを確認した。

人工血小板に要求される機能

人工的につくられた血小板の満たすべき機能は、出血の抑制にあることは論を待たない。また、血栓形成の促進があってはならないことも満たすべき機能であろう。更に、感染性の排除も重要な必要条件である。創製された人工血小板が臨床の場において使用される為には、最終的には国の検定を受ける必要がある。我が国においては、人工血小板を検定するための指針は示されていないが、アメリカ合衆国においては、FDA (Food and Drug Administration) がガイドラインを示している²⁶⁾。そこでは、4つの大きな評価項目が挙げられている。(A: *In vitro* evaluation of platelet biochemistry and function, B: Platelet survival in circulation, C: Clinical hemostatic efficacy, D: Evaluation of platelet substitutes)。A: *In vitro* evaluation of platelet biochemistry and functionは、*in vitro*において血小板としての働きが示される事である。B以降は、*in vivo*での評価となる。ここで注目されるのは、FDAが*in vivo*評価において、従来の出血時間と手術時の出血量の間には何ら相関が見出せないと論じ出血時間を重視せず、臨床現場での止血機能を評価するには血小板寿命を補助評価項目として推奨していることである。ヒトの血小板の寿命は、11日程度と言われている。しかし、人工的に創製した物質を循環系内に10日以上その働きを保たせながら存続させ続けることは極めて困難であり、多くの物質は数時間の寿命を保持することしかできないであろう。今後血小板代替物の開発には、組織適合性が優れており、循環内寿

命が確保された製剤であることも焦点となると考えられる。また、FDA guidelineは、臨床的な出血傾向を再現するテストとして確立したものは無い、としている。従ってFDAは推奨する評価系を示していない。事実、鼻出血・点状出血等の身体所見を定量的に再現性をもって模倣するテスト法は現在報告されていない。血小板代替物の開発にあたっては、全く新たな評価系の導入が必要である。

参考文献

1. 遠山 博. 輸血の歴史. 遠山 博 編. 輸血学 東京: 中外医学社, 1989;1-20.
2. 血液製剤調査機構便り No.74
http://www.bpro.or.jp/publications/letters_pdf/
3. Dodd, RY. Bacterial contamination and transfusion safety: experience in the United States. *Transfuse Clin Biol* 2003; 10:6-9
4. Plow EF, Pierschbacher MD, Ruoslahti E, Marguerie G, Ginsberg MH. Arginyl-glycyl-aspartic acid sequences and fibrinogen binding to platelets. *Blood*. 1987;70:110-5
5. Agam G, Livne A. Passive participation of fixed platelets in aggregation facilitated by covalently bound fibrinogen. *Blood* 1983;61:186-191
6. Parise LV, Phillips DR. Platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex incorporated into phospholipid vesicles. Preparation and morphology. *J Biol Chem* 1985;260:1750-1756
7. Fujimoto T, Fujimura K, Kuramoto A. Functional Ca²⁺-channel produced by purified platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex incorporated into planar phospholipid bilayer. *Thromb Haemost* 1991;66:598-603
8. Okumura Y, Ishitobi M, Sobel M, Akiyoshi K, Sunamoto J. Transfer of membrane proteins from human platelets to liposomal fraction by interaction with liposomes containing an artificial boundary lipid. *Biochim Biophys Acta* 1994;1194:335-340
9. Collier BS, Springer KT, Beer JH, Mohandas N, Scudder LE, Norton KJ, West SM. Thromboerythrocytes. In vitro studies of potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusions. *J Clin Invest* 1992;89:546-555
10. Agam G, Livne AA. Erythrocytes with covalently bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia. *Eur J Clin Invest* 1992;22:105-112
11. Rybak ME, Renzulli LA. A liposome based platelet substitute, the plateltosome, with hemostatic efficacy. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol* 1993;21:101-118
12. Chao FC, Kim BK, Houranieh AM, Liang FH, Konrad MW, Swisher SN, Tullis JL. Infusible platelet membrane

- microvesicles: a potential transfusion substitute for platelets. *Transfusion* 1996;36:536-542
13. Davies AR, Judge HM, May JA, Glenn JR, Heptinstall S. Interactions of platelets with Synthocytes, a novel platelet substitute. *Platelets* 2002;13:197-205
 14. Levi M, Friederich PW, Middleton S, de Groot PG, Wu YP, Harris R, Biemond BJ, Heijnen HF, Levin J, ten Cate JW. Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat Med* 1999;5:107-111
 15. 小林 薫. リコンビナントアルブミンの開発. *人工血液* 2000; 8:1-5
 16. Shinji Takeoka, Yuji Teranuma, Haruki Ohkawa, Yasuo Ikeda, and Eishun Tsuchida. Conjugation of von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib to size-controlled albumin microspheres. *Biomacromolecules* 1;290-295,2000
 17. Shinji Takeoka, Yuji Teramura, Yosuke Okamura, Eishun Tsuchida, Makoto Handa, and Yasuo Ikeda. Rolling properties of rGPIb-conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibilities on vWf surface under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:765-770
 18. 武岡 真司 . 止血能を有する蛋白質高分子量体の開発. 厚生科学研究費補助金 高度先端医療研究事業 (人工血液開発分野) 平成13年度 総括・分担研究報告書 2002;33-36
 19. Nishiya T, Murata M, Handa M, Ikeda Y. Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Ib alpha to immobilized von Willebrand factor under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:755-760
 20. Kitaguchi T, Murata M, Iijima K, Kamide K, Imagawa T, Ikeda Y. Characterization of liposomes carrying von Willebrand factor-binding domain glycoprotein Ib alpha: a potential substitute for platelet transfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:784-789
 21. Nishiya T, Kainoh M, Murata M, Hanada M, Ikeda Y. Reconstruction of adhesive properties of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ib alpha under flow conditions: specific synergy of receptor-ligand interactions. *Blood* 2002;100:136-142
 22. Elizabetta Dejana, Silvia Villa, and Giovanni de Gaetano. Bleeding Time in Rats: A comparison of different experimental conditions. *Thromb Haemostas* 48;108-111, 1982
 23. M. Sato and N. Ohshima. Platelet thrombus induced in vivo by filtered light and fluorescent dye in mesenteric microvessels of the rat. *Thrombosis research* 1984;35:319-334
 24. Wada K, Umemura K, Nishiyama H, Saniabadi AR, Takiguchi Y, Nakano M, Nakashima M. Atherosclerosis. A chemiluminescent detection of superoxide radical produced by adherent leucocytes to the subendothelium following thrombolysis: studies with a photochemically induced thrombosis model in the guinea pig femoral artery. *Atherosclerosis*. 1996;122:217-24
 25. 長澤俊郎. in vivoにおける新規血小板代替物GPIb-poly albuminの機能評価 厚生科学研究費補助金 高度先端医療研究事業 (人工血液開発分野) 平成14年度 総括・分担研究報告書 2003;52-55
 26. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Biologics Evaluation and Research(CBER). Guidance for Industry. For platelets testing and evaluation of platelet substitute products. <http://www.fda.gov/cber/gdlns/platelet.pdf> 1999

人工酸素運搬体(Neo Red Cell:NRC)の 分割投与による効力持続性評価

Duration of efficacy of NRC (Neo Red Cell) administered in divided doses

筒井洋治, 石塚隆伸, 後藤 博, 木村哲寛, 緒方嘉貴, 金田伸一

Youji Tsutsui, Takanobu Ishizuka, Hiroshi Gotou, Tetsuhiro Kimura, Yoshitaka Ogata, Sinichi Kaneda

和文抄録

赤血球代替物に関しては、患者の容態をモニターしながらヘモグロビンの濃度管理を行ない、必要量を複数回に分けて投与（分割投与）する使用法も想定される。本実験では、ラット血液交換モデルを用いて、ナノカプセル型人工酸素運搬体であるNRC (Neo Red Cell) の分割投与を行い、生体の酸素消費量 (VO_2) を満たすことが可能な状態を保つことにより、NRCの酸素代謝改善効果を維持可能かどうか検討した。CD(SD)IGS雄性ラットを用い、同種血漿にて75%血液交換を行った。交換後、NRC 20 ml/kgを単回投与、あるいは10 ml/kg投与後3時間にて同用量を投与した。NRCクリット値（血液中のNRC容積率）とNRCのヘモグロビンメト化率を調べると共に、循環動態、血中乳酸値、血液ガスを測定し、投与後8時間まで状態観察を実施した。20 ml/kgの用量でNRCを単回投与した場合、クリット値とメト化率より算出された酸素運搬能保持能の指標としての半減期（有効半減期）は、投与後8時間程度と推察され、この時点においても酸素代謝改善効果が維持されることが示された。加えて、10 ml/kgずつ2回に分け、投与3時間後に再度投与した場合にも同様の効果が示され、分割投与においても生体の VO_2 を満たすことが可能な状態を保つことにより、NRCの効果を持続可能なことが確認された。

Abstract

In clinical use of blood substitute, in addition to single dosing, it is also considered preferable to give a necessary amount in multiple divided doses under controlling the hemoglobin concentration and monitoring the patient status. In this experiment, NRC (Neo Red Cell), liposome encapsulated hemoglobin, was administered to rat hemodilution model in divided doses to investigate whether it is possible to maintain the efficiency in improving oxygen metabolism by keeping VO_2 of tissue. Using male CD (SD) IGS rats, 75% of the blood was exchanged with homologous plasma. Then, NRC was administered as a single dose of 20 mL/kg or as two divided doses of 10 mg/kg at an interval of 3 hours. The NRC-crit (NRC volume as percentage of blood) and methemoglobin ratio of NRC were determined and hemodynamics, blood lactate and blood gases were measured. The rats were observed for 8 hours after administration. When NRC was administered as a single dose of 20 mL/kg, "the half-life of efficacy" calculated from the hematocrit value and methemoglobin rate as an index of actual oxygen transport efficiency was estimated to be approximately 8 hours after administration. And it was indicated that efficiency in improving oxygen metabolism was maintained until the time. In addition, when NRC was administered as two divided doses of 10 mL/kg at an interval of 3 hours, the similar effect was observed, and the efficacy of NRC was verified on maintaining the hemoglobin concentration keeping VO_2 of tissue.

Keywords

NRC (Neo Red Cell), half-life of efficacy, divided doses, oxygen metabolism, Critical DO_2

1. 緒言

我々が開発中のナノカプセル型人工酸素運搬体であるNRC (Neo Red Cell) を将来臨床使用することを想定した場合、どの程度酸素代謝改善効果を持続可能であるかを予測することは、その使用法を規定する上で重要である。過去に実施したラット血液交換モデルを用いた検討結果では、NRCの有効半減期に相当する時間、すなわち、リボソームとしての半減期にメトヘモグロビンの生成速度を加味した時間までその効果が持続することが示された¹⁾。NRCの臨床での使用方法としては必要量を単回投与する方法と、患者の容態をモニターしながらヘモグロビンの濃度管理を行い、必要量を複数回に分けて投与(分割投与)する方法が想定されるが、その場合のNRC投与効果の違いについて明確にする必要があると考えられる。

出血等によりヘモグロビン濃度が低下していくと、生体の酸素要求を満たすことが可能な限界点に達する。Winslow²⁾はこのようなポイントをCritical DO₂と報告している。このポイントを下回り、さらにヘモグロビン濃度が低下した場合には、生体の酸素要求を満たすことが出来なくなりVO₂が低下する、すなわち生体組織が酸素不足に陥った状態となる。これに対し、Critical DO₂を超える場合にはVO₂は一定に保たれることから、計算上、単位赤血球当たりの組織への酸素供給効率が低下することになる。従って、Critical DO₂を上回る状態を維持可能な最低限の条件を満たす投与方法でNRCを投与することにより、効率良くその酸素代謝改善効果を維持し、VO₂を満たすことも可能と考えられる。

本実験では、ラット血液交換モデルを用いてNRCの分割投与を行い、ヘモグロビンのCritical DO₂を上回る濃度維持、すなわち、生体のVO₂を満たすことが可能な状態を保つことによる酸素代謝改善効果について検討した。

2. 方法

2.1 NRCの製造方法³⁾

日本赤十字社より研究用として譲渡された期限切れ濃厚赤血球製剤を生理食塩水にて遠心洗浄、溶血後、フィルターによりstroma除去を行った。分画分子量100 kDaの限外濾過膜(孔径約15 nm)処理後、ヘモグロビン濃度を45 g/dlまで限外濾過により濃縮し、Stroma-free-hemoglobin (SFH)とした。Hydrogenated Soybean phosphatidylcholine : Cholesterol : stearic acid = 1 : 1 : 1 (モル比)からなる混合脂質を60の水で膨潤させ、これにSFH(-NAD 0.1 mM, glucose 20 mM, inosine 6 mM, inositol hexaphosphate 7 mM添加)を加えて乳化処理し、SFHをカプセル化した。カプセル化されなかったSFHを分画分子量300 kDaの限外濾過膜にて除去後、0.45 μmおよび0.20 μmフィルター処理し、ヘモグロビン濃度が6 g/dlになるように調整した。これにPolyethyleneglycol-conjugated phosphatidylethanolamine (PEG-PE) をリボソーム表面に導入し、NRCとした。

2.2 ラット血液交換モデルによるNRC分割投与の実施

SD(IGS)系雄性ラット(体重317.3~357.3 g)の体重を測定後、2.0%イソフルランを含む45%O₂ガス(N₂ベース)にて吸入麻酔を行い、保温マットに固定、直腸温を37±1に維持した。総頸動静脈および大腿動静脈にポリエチレンカテーテル(内径0.5 mm, 外径0.8 mm)を、気管内に留置針用カテーテル(14 G:内径1.73 mm, 外径2.17 mm)をそれぞれ留置後、大腿静脈より臭化パンクロニウム(ミオブロック, 三共株)の0.2 mg/hr持続投与を開始した。同時に人工呼吸器(SN-480-7, シナノ製作所株), 設定条件: 3.3 ml/回, 40回/分)による吸入麻酔(1.4%イソフルランを含む45%O₂ガス(N₂ベース))を開始した。大腿動脈留置カテーテルを圧カトランスデューサー(TP-400T, 日本光電株)に接続し、血圧用ひずみ圧力アンブ(AP-601G, 日本光電株)を介して動脈圧を測定した。このとき同時にアンブ出力をトリガーとして、心拍数測定ユニット(AT-601G, 日本光電株製)を介して心拍数を測定した。動脈圧, 心拍数のデータをレコーダー(RECTI-HORIZ-8K, 日本電気三栄株)にて記録した。

投与群はNRC単回投与および分割投与の計2群とし、各群n=5ずつとした。採血ポイントは血液交換開始前(Pre), 血液交換終了後(HD), NRC投与終了後5 min, 3 hr, 6 hr, 8 hrの6点とし、総頸動静脈よりそれぞれ採血を行い、測定に用いた。Pre採血・測定を行い、動脈血pHが7.35-7.45の範囲内にあることを確認後、総頸静脈よりラット血漿(ヘパリン採血, 遠心処理後に血漿採取を行い、-80にて保存し、使用時には流水にて解凍した)を1.0 ml/kg/minの速さで投与しながら総頸動脈より脱血を同速度で行い、血液交換を60分間実施した。血液交換終了後、直ちにHD採血・測定を実施した。続いて、総頸静脈よりNRCを単回投与群では20 ml/kg, 分割投与群では10 ml/kgの用量を2.0 ml/kg/minの速さにて投与した。投与終了後の観察時間中も保温マット使用および採血を行うため、水分補給として総頸静脈より生理食塩水の投与を1.0 ml/hrの速度で実験終了時まで持続した。なお、投与終了後の観察時間は前検討の結果8時間と設定し、分割投与群については、1回目のNRC投与終了3時間後の採血終了後にNRC 10 ml/kgの用量を2.0 ml/kg/minの速さにて投与した。

2.3 測定項目

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

平均血圧(mmHg) = 拡張期血圧 + (収縮期血圧 - 拡張期血圧) ÷ 3

血液ガスおよび血中乳酸値は血液ガスシステム(ABL-555, ラジオメータートレーディング株)を用いて測定した。但し、過剰塩基(B.E.)値は次式にて算出した⁴⁾(式中のヘモグロビン濃度は赤血球およびNRC由来の合計である)。

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

ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値は多項目自動血球分析装置(SE-9000, 東亜医用電子株)を用いて測定した。

NRCクリットは以下の方法にて測定した。採取した血液をデキストラン（平均分子量188000，SIGMA製）8%を含む生理食塩水と1：1の割合で混和後，ヘマトクリット毛細管にて吸引した。吸引した溶液の長さ（A1）をノギスにて測定した。遠心処理（15000 g，45分間）後，NRCの長さ（A2）をデジタルノギスにて測定し，次式よりNRCクリットを算出した。

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

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

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

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

2.4 統計解析

測定結果はいずれも平均値 ± 標準偏差で表した。各採血ポイントでの群間比較としてStudent t-testによる検定を実施し，有意水準5%とした。

3. 結果

全ての個体において死亡例は認められず，実験終了時間まで経過観察を実施した。

PreのMBP平均値は両群とも100 mmHg前後を示し，有意な

Table 1. Changes in mean arterial blood pressure (mmHg).

	Pre	HD	5 min	3 hr	6 hr	8 hr
A single dose	95 ± 29	70 ± 3*	121 ± 7	88 ± 18	102 ± 12	98 ± 15
Divided doses	111 ± 21	59 ± 7*	124 ± 12	95 ± 6	108 ± 8	101 ± 5

mean ± SD(n=5) *: P<0.05(Student's t-test)

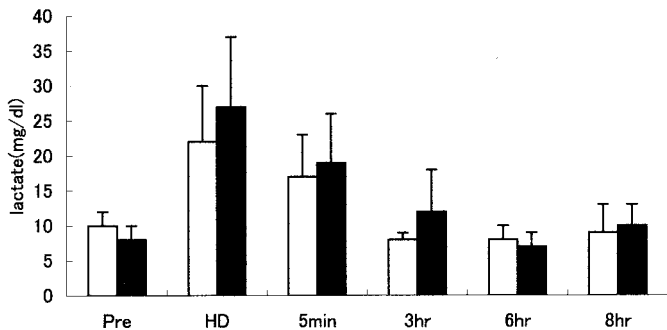


Figure 1. Concentration of lactate in mixed venous blood. Mean ± SD (n=5)

: A single dose : Divided doses

差は認められなかった。血液交換実施後に60-70 mmHg付近に低下し，NRC投与により一時的に約120 mmHgまで上昇し，その後は概ねPreの水準を維持した（Table 1）。心拍数に関しては，300-500 beats/minの範囲内で推移し，有意な差は認められなかった。

血中乳酸値は，血液交換によりいずれも上昇が認められ，NRC投与終了5分後では両群とも基準値(4-18mg/dL)⁶⁾を上回る個体が一部存在した。その後，経時的な回復傾向が認められ，投与終了6時間後以降は全て基準値の範囲内を示した（Fig. 1）。

血液ガス測定の結果，動脈血pHおよびB.E.値に関しては，両群とも血液交換後に大きく変動することはなく，NRC投与終了後についても概ね基準値⁴⁾の範囲内を示した（Table 2, Fig. 2）。混合静脈血酸素分圧に関しては，単回投与群の一部および分割投与群の全個体で一時的に30 mmHgを下回ったが，概ね30～40 mmHgの範囲内を示した（Table 3）。

Table 2. Changes in arterial blood pH.

	Pre	HD	5 min	3 hr	6 hr	8 hr
A single dose	7.402 ± 0.026	7.412 ± 0.026	7.393 ± 0.015	7.452 ± 0.016	7.417 ± 0.018	7.397 ± 0.043
Divided doses	7.411 ± 0.029	7.394 ± 0.030	7.386 ± 0.053	7.433 ± 0.047	7.386 ± 0.049	7.372 ± 0.071

mean ± SD(n=5)

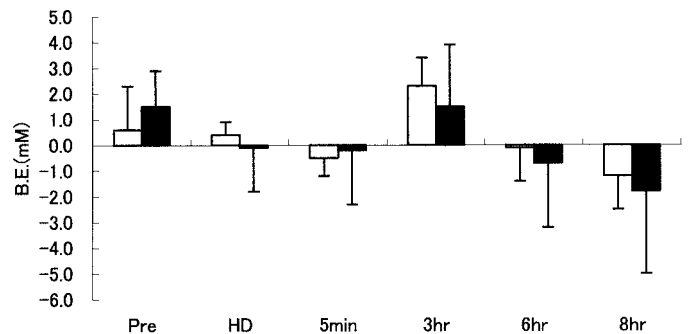


Figure 2. Base excess of arterial blood. Mean ± SD (n=5)

: A single dose : Divided doses

Table 3. Changes in mixed venous blood pO₂ (mmHg).

	Pre	HD	5 min	3 hr	6 hr	8 hr
A single dose	45.3 ± 6.4	34.3 ± 4.8	37.9 ± 4.2	30.5 ± 2.1	33.4 ± 2.2	37.0 ± 7.0
Divided doses	41.1 ± 4.6	30.4 ± 2.2	34.6 ± 4.5	29.3 ± 2.6	35.0 ± 4.7	32.3 ± 1.4

mean ± SD(n=5)

血液交換終了時のヘマトクリット値は9.8～13.0%の範囲内にあり，交換率は単回投与群では72.4 ± 3.5%，分割投与群では73.0 ± 1.7%であった（Fig. 3）。NRCクリット値は，投与終了5分後，3時間後では分割投与群に比べて単回投与群で有意に

高値を示した。一方、投与終了6時間後、8時間後では2回目のNRC投与が完了した分割投与群で有意に高値を示した (Fig. 4)。単回投与群では投与終了5分後のNRCクリット値は $8.7 \pm 0.4\%$ であった。投与終了8時間後には $6.4 \pm 0.5\%$ に減少し、さらにNRCメト化率の結果から、酸素運搬能を保持するNRCとしてのクリット値は約5.0%と算出され、投与終了5分後に比べて半減したことから、その有効半減期は8時間程度と推定された (Fig. 5)

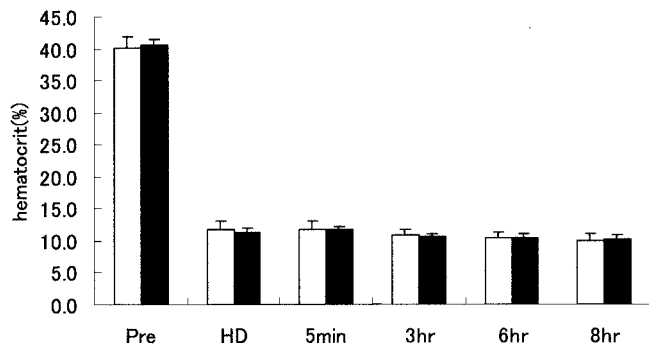


Figure 3. Hematocrit on hemodilution model. Mean \pm SD (n=5)
 : A single dose : Divided doses

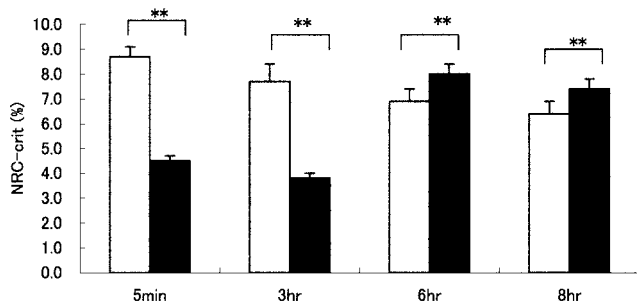


Figure 4. Blood concentration of NRC on hemodilution model. Mean \pm SD (n=5)

** : P<0.01 (Student's t-test). Following collection of blood samples at 3 hr after administration, NRC 10 ml/kg was administered in divided doses.

: A single dose : Divided doses

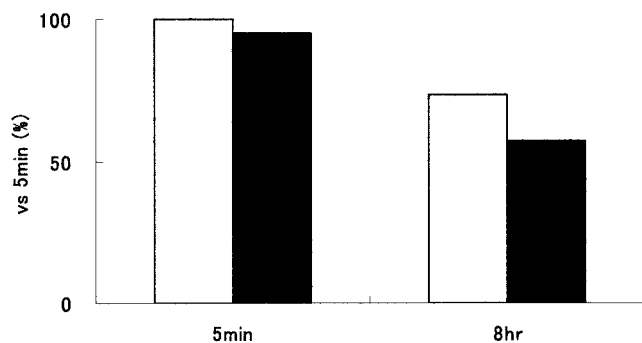


Figure 5. Blood concentration of NRC on hemodilution model (A single dose). : total NRC-crit (% vs 5min), : NRC-crit with function estimated by NRC-crit and methemoglobin ratio (% vs 5min of total NRC-crit).

4. 考察

血液製剤・血液代替物に関わらず、輸血には依然リスクが存在しているため、必要最小限の範囲内での実施が望まれる。NRCについても、必要量以上の投与は、安全性や医療経済学的見地からも望ましいことではなく、いかに効率良くその効果が発揮・持続可能か立証することが重要である。従って、NRCの臨床上的使用法を考えた場合、単回投与のみでなく、患者の容態をモニターしながらヘモグロビンの濃度管理を行ない、必要量を複数回に分けて投与(分割投与)する使用法も想定される。

通常、循環血液量が充分確保されている場合、ヘモグロビン濃度が低下しても酸素分圧の動静脈格差が大きくなることで酸素運搬効率が高まり、組織への酸素供給量を維持できる。例えば、慢性貧血のような内科的適応の場合、ヘモグロビン濃度7 g/dlが輸血実施の目安とされているが、7 g/dl未満でも輸血を必要としない場合もあるとされている⁸⁾。一方、ヘモグロビン濃度がさらに低下した場合、生体の酸素要求量を満たすことが可能な限界点、すなわち Winslow⁹⁾により Critical DO₂と報告されたポイントに達する。先の検討結果より、本実験系ではこのポイントは血液交換率70%程度(ヘマトクリット値約13%)にあることが明らかとなっている¹⁾。このポイントを下回り、さらにヘモグロビン濃度が低下した場合には、生体の酸素要求を満たすことが出来なくなる。これに対し、Critical DO₂を超える場合には生体のVO₂は一定であることから、計算上、単位赤血球当たりの組織への酸素供給効率が低下することになる。従って、Critical DO₂をわずかに上回る状態を維持する方法でNRCを投与することにより、効率良くその酸素代謝改善効果は持続可能になると考えられる。

NRCの臨床上的使用法を考えた場合、必要量を単回投与する方法と、患者の容態をモニターしながらヘモグロビンの濃度管理を行い、必要量を複数回に分けて投与(分割投与)する方法が想定される。その場合、NRCの投与方法により、効果の違いが現れるのか否かを明確にする必要があると考えられる。今回の検討において単回投与群では、全身酸素代謝指標である血中乳酸値、循環指標である血圧・心拍数、混合静脈血酸素分圧等の血液ガス値については、いずれも今回行ったNRCクリット値およびメト化率の測定から、NRC有効半減期として算出された投与終了8時間後まで概ね基準値の範囲内を示し、酸素代謝改善効果が維持された。分割投与群についても、第1回目のNRC投与終了5分後のNRCクリット値は約半分であったことから、この時点でのNRCの酸素運搬量も約半分となったと考えられたが、投与終了3時間後(第2回目のNRC投与開始前)まで前述の測定結果(血中乳酸値・循環指標・血液ガス値)については単回投与群との有意差は認められなかった。第2回目のNRC投与終了後、単回投与群でのNRC有効半減期に相当する時間までも同様に有意差が認められず、測定結果に関しても概ね基準値の範囲内を示した。これは分割投与によってもCritical DO₂を上回るヘモグロビン濃度が保持され、単回投与群と同様に酸素代謝改善効果が持続したためと考えられた。また、血中のNRCクリット値に関しては、分割投与群では第2回目のNRC投与後

は単回投与群に比べて有意に増加し観察時間終了時までその差が認められたことから、分割投与によるNRCの酸素代謝改善効果の更なる延長も期待された。

5. 結論

NRCの分割投与による、ヘモグロビンのCritical DO_2 を上回る濃度維持を行なうことにより、NRCの効果の持続が有効半減期に相当する時間まで確認された。今後、中・大動物でのNRC分割投与による効力持続性評価実験を行い、ヒトでのNRC有効性について予測する予定である。

本論文の要旨を International Symposium on Blood Substitutes (9-ISBS) にて発表した。

参考文献

1. 筒井洋治, 木村哲寛, 石塚隆伸, 大森伸二, 志澤 隆, 後藤 博, 緒方嘉貴, 金田伸一. ラットhemodilutionモデルにおけるNRC(Neo Red Cell) の効力持続性評価. 人工血液 2002;2:36-41.

2. Winslow RM. A Physiologic Basis for the Transfusion Trigger. Winslow RM, Vandegriff KD, Intaglietta M. Blood Substitutes Physiological Basis of Efficacy. Boston,MA: Birkhauser 1995;25-41.
3. Ogata Y. Evaluation of human hemoglobin vesicle as an oxygen carrier: Recovery from hemorrhagic shock in rabbits. Polym.Adv.Technol. 2000;11:1-6.
4. 松崎建三. Base Excessとbuffer base. 諏訪庸夫. 日本臨床増刊号第5版. 大阪;日本臨床社, 1999;268-272.
5. 戸谷誠之. 乳酸. 諏訪庸夫. 日本臨床増刊号第5版. 大阪;日本臨床社, 1999;642-5.
6. Miozock BA. Lactic acidosis. Dis Mon 1989;35:233-300.
7. 工藤翔二. 第4章pHと酸・塩基平衡. 浅井宏裕. 血液ガステキスト. 東京;分光堂, 1990;85-120.
8. 厚生省医薬安全局長. 血液製剤の使用指針. 厚生省医薬安全局長通知, 医薬発第715号, 平成11年6月10日.

フィブリノーゲン鎖ドデカペプチド結合粒子の血小板代替物の展開† Development of fibrinogen chain dodecapeptide-conjugated particles

岡村陽介¹⁾, 寺村裕治¹⁾, 武岡真司¹⁾, 土田英俊¹⁾, 鈴木英紀²⁾, 渡辺直英³⁾, 半田 誠³⁾, 池田康夫³⁾

**Yosuke Okamura¹⁾, Yuji Teramura¹⁾, Shinji Takeoka¹⁾, Eishun Tsuchida¹⁾, Hidenori Suzuki²⁾, Naohide Watanabe³⁾,
Makoto Handa³⁾, Yasuo Ikeda³⁾**

和文抄録

血小板代替物としての基礎知見を得るために、フィブリノーゲン鎖C末端のアミノ酸配列(400-411, CHHLGGAKQAGDV, H12)を担持したラテックスビーズ(H12-ラテックスビーズ)を用い、活性化した血小板のみを認識して結合する系の構築を検討した。フローサイトメトリーによるPAC-1結合, 抗P-セレクチン抗体結合, アネキシンV結合では, 正常血小板に対する相互作用はほとんど見られなかった。更に, H12-ラテックスビーズは, 血小板数減少症(正常値の10分の1)を再現した血液流動下において, 出血部位モデル基板であるコラーゲン基板に対して血小板の凝集を促進した。このことから, H12を担持した微粒子では, 二次凝集を引き起こすことが期待でき, 血小板代替物の認識部位として有効であると考えられた。

Abstract

In order to perform a fundamental study of platelet substitutes, novel particles that bound to activated platelets were prepared by conjugating a oligopeptide, CHHLGGAKQAGDV (H12), which is a fibrinogen γ -chain carboxy-terminal sequence (400-411). Based on the result of flow cytometric analyses of agglutination, PAC-1 binding, anti P-selectin antibody binding, and annexin V binding, the H12-conjugated latex beads showed minimal interaction with non-activated platelets. Furthermore, H12-conjugated latex beads enhanced the *in vitro* platelets thrombus formation on collagen-immobilized plates under flowing thrombocytopenic-imitation blood. These results indicate the excellent potential of H12-conjugated particles as a candidate for a platelet substitute.

Keywords

platelet substitutes, dodecapeptide (H12), fibrinogen, latex beads, flow cytometry

1. はじめに

血小板輸血は, 外科手術, 悪性腫瘍に対する化学療法, あるいは骨髄移植時において必要不可欠な補助療法であり, 医療技術の進歩と共にその使用量も年々増大している。しかしながら, 血小板製剤はその短い保存期間(72時間)のために慢性的な供給不足の状態にあるので災害など緊急時の対応は困難になるものと予想されている。核酸増幅検査(NAT)の導入により血

液製剤の安全性は著しく向上したものの, 未だにウィルス感染などのリスクは否定できず社会的な問題となっており, ヒト由来に依存しない血小板代替物(人工血小板)の開発が急がれている。最近では, 遺伝子組換え技術の向上により, 血小板機能異常症ならびに血小板輸血代替療法として, 胚性幹細胞からの血小板産生技術の開発も期待されている⁽¹⁾。

血小板代替物の開発は国内外問わずまだ緒についたところで

1)早稲田大学 理工学総合研究センター 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1 Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University, 3-4-1 Ohkubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan. 2)東京都臨床医学総合研究所循環器病研究部門 〒113-8613 東京都文京区本駒込3-18-22 Medical Research and Development Center, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, 3-18-22 Motokomagome, Bunkyo-ku Tokyo, 113-8613, Japan. 3)慶応義塾大学 医学部内科 〒169-8582 東京都新宿区信濃町 35 Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-8582, Japan.

論文受付 2004年1月15日 受理 2004年1月30日

†本論文は,2003年に掲載された「Takeoka S, Okamura Y, Teramura Y, Watanabe N, Suzuki H, Tsuchida E, Handa M, and Ikeda Y. Function of fibrinogen γ -chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003;312:773-779.(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X03022861>)」に基づき和文として作製したものである。

Copyright © 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

あり、研究段階にとどまっている⁽²⁻⁶⁾。我々のグループでは、血小板膜蛋白質GPIb あるいはGPIa/IIa複合体の遺伝子組換え体 (rGPIb、rGPIa/IIa複合体) を遺伝子組換えヒト血清アルブミンから調製した微粒子 (アルブミン重合体)⁽⁷⁾ やリン脂質小胞体⁽⁸⁾ の担体に担持させて、出血部位に特異的に集積する微粒子を作製、*in vitro*系あるいは*in vivo*系における止血能評価を行なっている⁽⁷⁻¹⁴⁾。例えば、血小板数が正常の5分の1に減少した血小板数減少症マウスを用いた動物実験では、rGPIa/IIa複合体を担持させたアルブミン重合体にて出血時間の大幅短縮に成功した (切創モデル)⁽¹¹⁾。ところが、rGPIb あるいはrGPIa/IIa複合体を認識部位として利用する微粒子は、出血部位への特異的集積はみられるものの、残存血小板を巻き込んだ血小板凝集 (二次凝集) を期待するには更なる工夫が必要である。

本論文では、出血部位へ粘着後、残存している血小板の凝集を促進する微粒子を構築するため、フィブリノーゲン鎖C末端のアミノ酸配列 (400-411, H12⁽¹⁵⁻¹⁷⁾) を認識部位として着目した。フィブリノーゲンは、溶液状態では熱変性のために不安定であり、製剤としての利用が困難である⁽¹⁰⁾。従って、活性化血小板に発現するGPIIb/IIIaを認識するH12やRGDを含むペプチドを選択し、これを*in vitro*用評価に有効であるラテックスビーズに担持させて、流動下において流動血小板の粘着挙動を解析した。

2. 実験方法

2.1 試薬, 試料

フィブリノーゲン鎖ドデカペプチド (HHLGGAKQAGDV, H12) のN末端にシステインを結合したH12とRGDを有するオリゴペプチド (C-GGRGDF, RGD) は、固相合成法により合成した (ベックス (株))。FITC標識ラテックスビーズ (Fluoresbrite™ plain, 200 nm, 1 μm) はPolysciences社、N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) はPierce Chemical社から購入した。3,3'-Di-hexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆) はMolecular Probes社、D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketone (PPACK) はCalbiochem社、FITC標識PAC-1、FITC標識抗P-セレクチン (CD62P) 抗体は、それぞれBecton Dickinson社、BD-Pharmingen社から購入した。遺伝子組換えヒト血清アルブミン (rHSA) は、三菱ウェルファーマ社 (株) より提供頂いた。

2.2 H12-, RGD-ラテックスビーズの調製

rHSA溶液 (50 mg/mL) にラテックスビーズを混合、振とうさせた (20, 2 hr)。遠心分離 (13000g, 5分, 4, 3回) にて未吸着rHSAを除去後、リン酸緩衝液 (PBS, pH7.4, 500 μL) にて再分散させた。rHSA吸着ラテックスビーズ分散液 (rHSA-ラテックスビーズ, 4.0×10⁶/μL, 500 μL) にSPDPエタノール溶液 (5 mM, 5 μL) を添加、振とうさせた (20, 30 min)。未反応SPDP, 副生成物を遠心分離 (13000g, 5分, 4, 3回) にて除去後、ピリジルジスルフィド基結合rHSA-ラテックスビーズ (PD-ラテックスビーズ) を得た。

PD-ラテックスビーズ (4.0×10⁶/μL, 500 μL) にH12 (10 mM, 8 μL) あるいはRGD (10 mM, 8 μL) を混合、振とう

させた (20, 12時間)。遠心分離 (13000g, 5分, 4, 3回) にて上清を除去後、H12-ラテックスビーズあるいはRGD-ラテックスビーズ (2.0×10⁶/μL, 1 mL) を得た。ラテックスビーズ表面のH12あるいはRGD結合量は、チオール・ジスルフィド交換反応で化学量論的に遊離する2-チオピリドンの343 nmにおける吸光度からHPLCを用いて決定した (TSK-GEL G3000SW_{XL} column, 7.8mm o.d. x 300mm h, 1 mL/min, PBS)⁽⁷⁾。

2.3 凝集計を用いた機能評価

健常人より採取した全血に3.8% (w/v) クエン酸ナトリウムを添加して (1/10 (v/v)), 遠心分離後 (100g, 15分, 22, 2) にて多血小板血漿 (PRP) を得た。遠心分離 (2200g, 10分, 22, 2) にて得た乏血小板血漿 (PPP) をPRPに添加して血小板濃度 2.0×10⁵/μLに調整した。血小板濃度は自動血球計測計 (K-4500, シスメックス社 (株)) を用いて測定した。

H12あるいはRGDを混合したPRPに、終濃度20 μMとなるようにADPを添加し、血小板凝集計 (HEMA TRACER T-638, 日光バイオサイエンス社) を用いて血小板分散液の透過光変化を連続的に計測した。同様に、PRP (160 μL) にH12-ラテックスビーズ (20 μL, 各1.0, 2.0×10², 2.0×10³/μL) を添加し攪拌後、ADP (20 μL, 3 μM) にて血小板を活性化させ、分散液の透過光変化を計測した。

2.4 フローサイトメトリーを用いた血小板解析

血小板分画からの散乱光あるいは蛍光と区別するために、粒径200 nmのラテックスビーズを用いて、H12-あるいはRGD-ラテックスビーズを調製した (2.2参照)。

H12-あるいはRGD-ラテックスビーズ (1.0×10⁵/μL) と、PRP (2.0×10⁴/μL) を混合し、パイオシェイカー (BR-13UM, タイテック (株)) を用いて攪拌後 (200rpm, 37, 30分)、ホルムアルデヒド (1.5 wt%) にて固定した。フローサイトメーター (FACSCalibur, 日本ベクトン・ディッキンソン社 (株)) を用いて側方散乱光, 前方散乱光にて血小板分画を選択し、全血小板 (20000 counts) に対してFITC由来の蛍光が検出される血小板の割合を算出した。

PRP (1.0×10⁵/μL) とH12-ラテックスビーズ (1.0×10⁵/μL) を混合し、37 にて30分間攪拌、FITC標識抗P-セレクチン抗体 (0.5 μg) を添加後、37 にて10分間振とうした。続いてホルムアルデヒド (1.5 wt%) にて固定した。また、PRP (1.0×10⁵/μL) とH12-ラテックスビーズ (1.0×10⁵/μL) を混合液にFITC標識PAC-1 (0.5 μg) を添加後、37 にて10分間振とう、ホルムアルデヒド (1.5 wt%) にて固定した。ポジティブコントロール群として、10分間ADP刺激 (20 μM, 100 μM) させた血小板を用いた。フローサイトメーターにより、血小板分画のFITC蛍光からP-セレクチン抗体あるいはPAC-1の結合率を算出した。

2.5 流動下におけるH12-ラテックスビーズの機能評価

1) コラーゲン固定化基板の調製⁽¹⁰⁾

コラーゲンI-A (3.0 mg/mL, Cellmatrix, 新田ゼラチン (株))

を終濃度30 µg/mLとなるようにPBS (4)に分散し、ガラス基板 (直径24 mm, 厚み0.5 mm) を浸漬させた (4 , 8時間). PBSにて洗浄後, ウシ血清アルブミン溶液中 (BSA, 20 mg/mL) に浸漬させた (20 , 2時間).

2) 血小板固定化基板の調製法⁽¹⁰⁾

PRPにACD溶液を混合しプロスタグランジン E₁ (PGE₁, 終濃度1 µM) を添加後2200gで7分間遠心し, 上清を除去後RCD溶液 (含1 µM PGE₁) に再分散させた. 同操作を再度行なった後, Hepes-Tyrode緩衝液で再分散して洗浄血小板溶液 (2.0x10⁵/µL) を調製した. コラーゲン基板上に洗浄血小板溶液を展開し, 37 にて1時間静置し, Hepes-Tyrode緩衝液で洗浄してから使用した.

3) 再構成血液の調製法⁽¹²⁾

血液をACD溶液と体積比10:1で混合, 100gで15分間遠心分離して, PRPを除去し, 同量のACD混合生理食塩水 (10 g/dL) に分散させた. 同操作を再度行なった後, 2200gで10分間遠心してACD混合生理食塩水に再分散後, 再度遠心分離してパフィーコート完全に除去した. 得られた再構成血液 (Hct 70.7%, 血小板数1.7x10⁴/µL) はHct 50%に調整して使用した.

4) 血小板数減少血液の調製法

全血 (含PPACK 40 µM) を白血球除去フィルター (NEO1J, 日本ポール製) に重力落差にて通過させ, 回収した血液の血球を計測した. 別に用意したPRPを添加することにより, 血小板濃度2.0x10⁴/µLに調整し, 血小板減少モデル血液とした.

5) フローチャンバーを用いたH12-ラテックスビーズの機能評価⁽¹⁰⁾

再構成血液5 mL (Hct 50%, [PLT]=4.0x10⁵/µL) にH12-ラテックスビーズ (1.0x10⁵/µL) を混合後 (37 , 10分), 血小板固定化基板上を流動 (37) させ, 蛍光顕微鏡 (ECLIPSTE-300, ニコン(株)) で観察し, CCDカメラにて収録した. また, 血小板減少モデル血液5 mL にH12-ラテックスビーズ (1.0x10⁴/µL) を混合後 (37 , 10min), コラーゲン基板上を流動させ, 同装置にて観察した.

2.6 走査型電子顕微鏡による基板観察

流動実験後のガラス基板をHepes-Tyrode緩衝液で洗浄し, 1%グルタルアルデヒドで30分間, 続いて1%四酸化オスミウムにて30分間試料固定を行った. エタノール処理による脱水後, t-ブチルアルコールから凍結乾燥した. オスミウムプラズマコーター (NL-OPC80, 日本電子データム(株)) にて試料を四酸化オスミウムで表面処理後, 走査型電子顕微鏡 (SEM, S-4500, 日立製作所) にて観察した.

3. 結果及び考察

3.1 H12-, RGD-ラテックスビーズ

ラテックスビーズ表面に吸着させたrHSAのアミノ残基に対し, 架橋剤SPDPを用いてピリジルジスルフィド基を導入後, H12あるいはRGDをそれぞれ混合した. 両者のラテックスビーズ分散液を遠心分離後, その上清の2-チオピリドンを用いてHPLCを用いて343nmの吸光度より定量したところ, それぞれ13.5,

12.1 µMであり, これはH12あるいはRGDがラテックスビーズ1粒子あたりそれぞれ約2.0x10⁵, 1.8x10⁵分子結合した計算となり, ほぼ同じ結合密度であった. 2-チオピリドンが検出されたことから, H12あるいはRGDは含有ペプチド配列にあるシステイン残基のチオール基を介してラテックスビーズに結合したことを確認した.

3.2 凝集計を用いた機能評価

Fig.1に示したとおり, 血小板凝集は, H12あるいはRGDの添加により濃度依存的に抑制が認められ, H12では4mM, RGDでは1mMでほぼ完全に抑制された. 従って, H12あるいはRGDは, そのN末端にシステインが結合していても従来の報告⁽¹⁵⁻¹⁷⁾と同様な凝集抑制機能を有するアミノ酸配列であり, GPIIb/IIIaへの認識能が低下しないこと確認した. また, H12の血小板凝集抑制能は, RGDよりおよそ4倍低いが, これはGPIIb/IIIaに対する結合部位が異なるためと考えられている⁽¹⁵⁾.

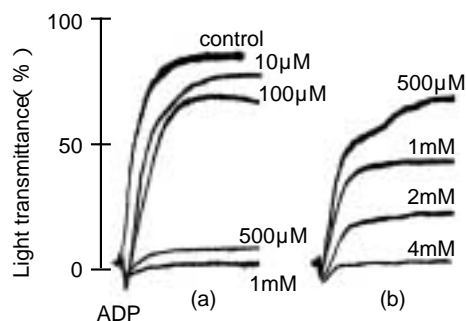


Figure 1. ADP-induced platelet aggregation in PRP ([ADP]=20 µM, [platelet]=2.0 x 10⁵/µL) in the presence of (a) RGD (10 µM to 1 mM) or (b) H12 (500 µM to 4 mM).

次に, H12-ラテックスビーズをPRPに添加し15分間攪拌後, 血球カウンターにて血小板を計測したところ, H12-ラテックスビーズの濃度によらずほぼ一定であった. これは, H12-ラテックスビーズは未活性血小板には結合しないことを示している (Fig. 2). H12-ラテックスビーズを混合したPRPに対してADPを添加すると, 直ちに透過光の増加がみられ, 活性化血

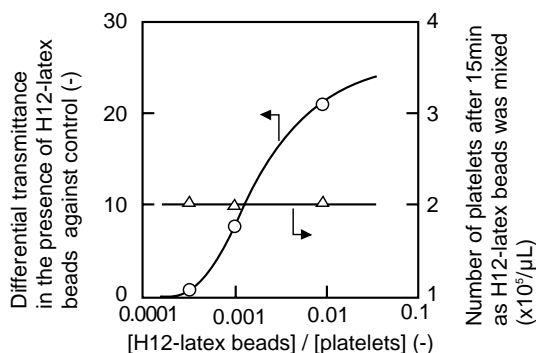


Figure 2. Number of platelets (2.0 x 10⁵/µL) in the presence of H12-latex beads (1.0 x 10² to 2 x 10³/µL) after 15 min (, [ADP]=0 µM), and facilitation of platelet aggregation involving H12-latex beads (, [ADP]=20 µM).

血小板の凝集が認められた。対照群として同濃度のラテックスビーズを添加した血小板凝集の透過光に対するH12-ラテックスビーズを添加した場合の透過光との差は、H12-ラテックスビーズ濃度の増加とともに増大した (Fig. 2)。これは、H12結合させた微粒子が血小板膜表面に発現したGPIIb/IIIaと多点結合したために、凝集促進が生じたものと考えられた。

3.3 フローサイトメトリーを用いた血小板解析

血小板 ($2.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$) に対するラテックスビーズ、H12-あるいはRGD-ラテックスビーズ ($1.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$) の非特異的粘着率をフローサイトメトリーにて算出した (Fig. 3)。ラテックスビーズあるいはH12-ラテックスビーズでは、血小板に対する非特異的粘着率に変化はみられず、血小板とほとんど相互作用しないと考えられた。他方、RGD-ラテックスビーズでは血小板に対する非特異的粘着率が $2.9 \pm 1.3\%$ 上昇した (Fig. 3)。このことから、RGD-ラテックスビーズは正常血小板と相互作用して、血流中で血栓形成を引き起こしやすいことが示唆された。

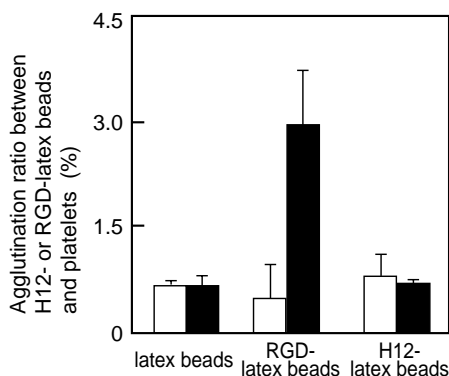


Figure 3. Agglutination ratios of RGD-latex beads or H12-latex beads to platelets by flow cytometry. Zero minute (open bar) and 30 min (closed bar), after the mixture of RGD-latex beads or H12-latex beads with platelets.

さらにフローサイトメトリーを用いて、H12-ラテックスビーズによる血小板の膜表面状態変化の有無について検討した。GPIIb/IIIaあるいはP-セレクチンは、活性化した血小板に特異的に発現される膜蛋白質であるために、それぞれに対する抗体、PAC-1と抗P-セレクチン抗体にて血小板の表面状態を解析でき、活性状態に関する知見を得ることができる⁽²¹⁻²⁴⁾。例えば、Table 1に示すように、ADP刺激した血小板では、PAC-1結合

Table 1. The bonding ratios of PAC-1 and anti P-selectin antibody to platelets in the presence of H12-latex beads.

Stirring time (min)	PAC-1 binding (%)		P-selectin expression (%)	
	0	10	0	30
PBS	0.43 ± 0.12	1.75 ± 0.41	0.50 ± 0.01	0.70 ± 0.14
H12-latex beads	0.47 ± 0.20	1.49 ± 0.26	0.53 ± 0.04	0.75 ± 0.23
Positive control	55.1 ± 6.1 ¹⁾		31.6 ± 6.9 ²⁾	

1) ADP 100 μM , 2) ADP 20 μM

率が $55.1 \pm 6.1\%$ と、未刺激 (PBS群) の血小板のそれ ($0.4 \pm 0.1\%$) と比較すると明らかなようにGPIIb/IIIaの発現を認める。また、同様にADP刺激した血小板では、P-セレクチンの発現率も著しく上昇し $31.6 \pm 6.9\%$ と非常に高くなっている。しかしながら、H12-ラテックスビーズと混合した血小板では、GPIIb/IIIaあるいはP-セレクチンの発現はいずれも認められず、PBS群とほとんど差はみられなかった。このことから、H12-ラテックスビーズは正常血小板を活性化することなく、血小板に対して不活性であることを証明した。

3.4 流動下におけるH12-ラテックスビーズの機能評価

流動下におけるH12-ラテックスビーズのGPIIb/IIIaに対する認識能の評価を行うために、まず基板に固定化した活性化血小板に対する粘着挙動を観察した。H12-ラテックスビーズは流動直後から血小板固定化基板上に一樣に粘着し、その粘着数は時間の経過とともに増加した (Fig. 4)。また、未結合H12を添加した場合にはH12-ラテックスビーズの粘着は抑制され、またラテックスビーズでも同様に粘着がみられないことから、H12-ラテックスビーズの粘着はH12と活性化血小板上に発現するGPIIb/IIIaとの特異的相互作用に起因するものであることが確認できた (Fig. 4)。また、流動血液のずり速度の上昇と共に血小板固定化基板に対するH12-ラテックスビーズの粘着数は減少した (Fig. 5)。これはGPIIb/IIIaのようなインテグリンとの相互作用に見られる現象⁽¹²⁾であり、H12-ラテックスビーズは、ず

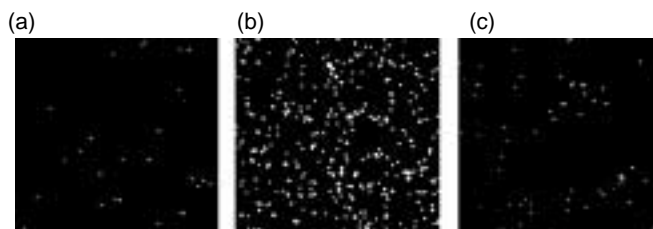


Figure 4. Observation of the interaction of (a) latex beads, (b) H12-latex beads, and (c) H12-latex beads and free H12 (4 mM) with the platelet-immobilized surface in the reconstituted blood at the shear rate of 150 s^{-1} . (Hct. 50 %, [platelet] = $5.0 \times 10^9 / \mu\text{L}$). These images were taken at 180 s after blood circulation.

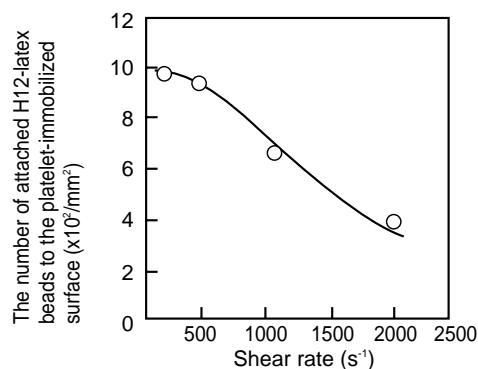


Figure 5. Changes of attached H12-latex beads to the platelet-immobilized surface at the various shear rates (Hct. 50 %, [platelet] = $5.0 \times 10^9 / \mu\text{L}$). These values were calculated from the images taken at 180 s after blood circulation.

り速度の比較的低い領域で活性化血小板と凝集することが期待される。

次に、血小板減少モデル血液中 ($2.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$, 正常の10分の1)における、コラーゲン基板へのH12-ラテックスビーズと血小板の粘着挙動を観察した。まず血小板にのみ蛍光標識後、コントロール群としてラテックスビーズを混合したところ、流動直後から血小板のコラーゲン基板への粘着が認められ、その粘着占有率は時間の経過にともない増大し、180秒後では $3.1 \pm 0.4\%$ となった (Fig. 6)。しかし、この挙動はラテックスビーズを添加しない血液の粘着占有率 ($3.0 \pm 0.6\%$, data not shown) とほとんど変わらないことから、血中のラテックスビーズは血小板粘着に影響を及ぼさないことを確認した。H12-ラテックスビーズを添加した場合、血小板の粘着占有率は180秒後で $5.1 \pm 0.3\%$ となり、コントロール群よりも約1.7倍増幅された (Fig. 6)。他方、同条件におけるH12-ラテックスビーズの粘着挙動を観察したところ、コラーゲン基板に対する粘着は、血小板のそれと比較して非常に緩やかであったが、およそ100秒後からH12結合ラテックスビーズの粘着占有率が徐々に増大する挙動が認められた (Fig. 6)。また、ラテックスビーズ

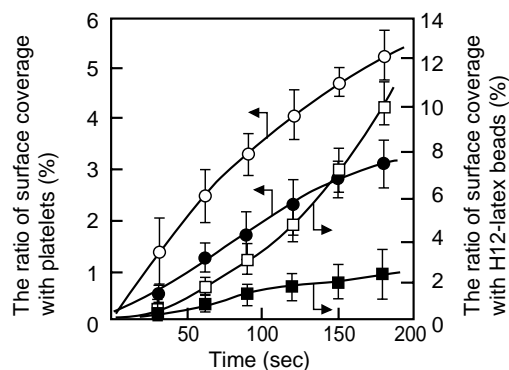


Figure 6. Changes of the ratios of surface coverage with flowing platelets (○) and H12-latex beads (□) to the collagen-immobilized surface under flow conditions of thrombocytopenic-imitation blood ([platelet]= $2.0 \times 10^4 / \mu\text{L}$, [H12-latex beads]= $1.0 \times 10^3 / \mu\text{L}$). As a control using thrombocytopenic-imitation blood containing bare latex beads, the ratios of surface coverage with flowing platelets (●) and the latex beads (■) were also monitored.

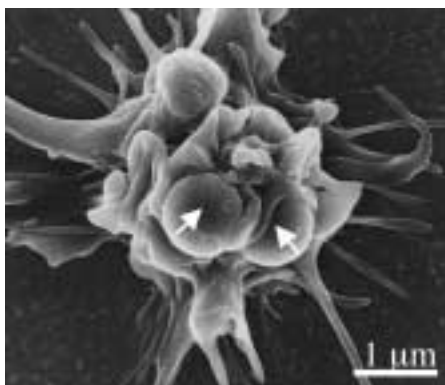


Figure 7. SEM image of platelet aggregation involving H12-latex beads (arrow).

ではコラーゲン基板への粘着はほとんどみられないことから (Fig. 6), コラーゲン基板に対して流動している血小板が粘着し活性化してGPIIb/IIIaを発現後、流動しているH12-ラテックスビーズがその血小板を認識して粘着、さらに流動している血小板が粘着したH12-ラテックスビーズを足場として血小板凝集を促進したために、粘着占有率が増大する機構が考えられた。

同実験の血液流動後の基板をSEM観察したところ、コラーゲン基板上にまず血小板が粘着した後にH12-ラテックスビーズが結合し、さらにこれを巻き込むようにして血小板が凝集している様子が確認できた (Fig. 7)。これは、H12-ラテックスビーズが、血小板凝集を促進することを支持する結果である。現在、H12を担持したアルブミン重合体やリン脂質小胞体の止血能評価を行っている。

4. 結論

H12-ラテックスビーズは正常血小板に対する非特異的な相互作用は認めなかった。血小板数減少症を再現した流動下において、本ラテックスビーズは出血部位モデル基板であるコラーゲン基板へ粘着して活性化した血小板に対して凝集し凝集塊形成を促進した。以上より、H12は血小板代替物の認識部位として有効であると考えられ、アルブミン重合体や小胞体に担持させた系による *in vitro*, *in vivo* 評価を進めている。

5. 謝辞

H12あるいはRGDの機能評価法に関して御指導、御討論頂きました、慶応義塾大学医学部内科 村田 満博士ならびに横山 健次博士に心から御礼申し上げます。本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業、11877172), 21COE実践的ナノ化学 (文部科学省) および日本学術振興会科学研究費の支援より行われた。

参考文献

- 1) Fujimoto TT, Kohata S, Suzuki H, Miyazaki H, Fujimura K. Production of functional platelets by differentiated embryonic stem (ES) cells in vitro. *Blood* 2003;102:4044-4051.
- 2) Graham SS, Gonchoroff NJ, Miller JL. Infusible platelet membranes retain partial functionality of the platelet GPIIb/IX/V receptor complex. *Am J Clin Pathol* 2001;115:144-147.
- 3) Rybak M, Renzulli LA. A liposome based platelet substitutes, the plateletsome, with hemostatic efficacy. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol* 1993;21:108-118.
- 4) Agam G, Livine AA. Erythrocytes with covalently bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia. *Eur J Clin Invest* 1992;22:105-112.
- 5) Levi M, Friedrich PW, Middleton S, De Groot PG, Wu

- YP, Harris R, Biemond BJ, Heijnen FG, Levin J, Ten Cate JW. Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat Med* 1999;5:107-111.
- 6) Collier BS, Springer KT, Beer JH, Mohandas N, Scudder LE, Norton KJ West SM. Thromboerythrocytes. In vitro studies of a potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusion. *J Clin Invest* 1992;89:546-555.
- 7) Takeoka S, Teramura Y, Ohkawa H, Ikeda Y, Tsuchida E. Conjugation of von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib to size-controlled albumin microspheres. *Biomacromolecules* 2000;1:290-295.
- 8) Kitaguchi T, Murata M, Iijima K, Kamide K, Imagawa T, Ikeda Y. Characterization of liposomes carrying von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib : A potential substitute for platelet transfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:784-789.
- 9) 寺村裕治, 武岡真司, 土田英俊, 池田康夫. 粒子径を制御したアルブミン重合体の合成とGPIIb結合体の機能評価. *人工血液* 2000;8:90-95.
- 10) Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, Handa M, Ikeda Y, Tsuchida E. Fibrinogen-conjugated albumin polymers and their interaction with platelets under flow conditions. *Biomacromolecules* 2001;2:1192-1197.
- 11) Teramura Y, Okamura Y, Takeoka S, Tsuchiyama H, Narumi H, Kainoh M, Handa M, Ikeda Y, Tsuchida E. Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003;306:256-260.
- 12) Nishiya T, Murata M, Handa M, Ikeda Y. Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Ib to immobilized von Willebrand factor under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:755-760.
- 13) Nishiya T, Kainoh M, Murata M, Handa M, Ikeda Y. Reconstitution of adhesive properties of human platelets in liposomes carrying both recombinant glycoproteins Ia/IIa and Ib under flow conditions: specific synergy of receptor-ligand interactions. *Blood* 2002;100:136-142.
- 14) Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, Tsuchida E, Handa M, Ikeda Y. Rolling properties of rGPIb -conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibilities on vWf surface under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:765-770.
- 15) Hawiger J, Kloczewiak M, Bednarek MA, Timmons S. Platelet receptor recognition domains on the chain of human fibrinogen: structure-function analysis. *Biochemistry* 1989;28:2909-2914.
- 16) Kloczewiak M, Timmons S, Hawiger J. Localization of a site interacting with human platelet receptor on carboxy-terminal segment of human fibrinogen chain. *Biochem Biophys Res Commun* 1982;107:181-187.
- 17) Kloczewiak M, Timmons S, Lukas TJ, Hawiger J. Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the chain. *Biochemistry* 1984;23:1767-1774.
- 18) Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GPIIb-IIIa: The responsive integrin. *Cell* 1991;65:359-362.
- 19) Lam SC, Plow EF, Smith MA, Andrieux A, Ryckwaert JJ, Marguerie G, Ginsberg MH. Evidence that arginyl-glycyl-aspartate peptides and chain peptides share a common binding site on platelets. *J Biol Chem* 1987;262:110-115.
- 20) Hallahan DE, Geng L, Cmelak AJ, Chakravathy AB, Martin W, Scarfone C, Gonzalez A. Targeting drug delivery to radiation-induced neoantigens in tumor microvasculature. *J Control Release* 2001;74:183-191.
- 21) Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass L. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem* 1985;260:11107-11114.
- 22) Bennett JS, Shattil SJ, Power JW, Gartner TK. Interaction of fibrinogen with its platelet receptor. *J Biol Chem* 1988;263:12948-12953.
- 23) Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7450-7454.
- 24) Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* 2000;191:1413-1422.

赤血球代替物を用いる蘇生法による外傷後過剰炎症反応の変化

Alteration of the postinjury hyperinflammatory response by means of resuscitation with a red cell substitute.

Johnson JL, Moore EE, Gonzalez RJ, Fedel N, Partrick DA, and Silliman CC.
Department of Surgery, Denver Health Medical Center, Denver, CO 80204, USA.

(訳者) 酒井宏水・土田英俊*
Hiromi Sakai, Eishun Tsuchida

訳者のコメント

北米企業を中心とした修飾Hbの臨床試験は最終段階に到達し, BLA(Biologics License Application)申請した企業もあるが, 各種副作用が問題となって開発を中断した企業も続出している. Baxter社が大々的に展開した分子内架橋型Hb(HemAssist, DCLHb)は, 血管収縮と血圧亢進, 食道の蠕動運動の異常など各種副作用の問題が続出し, また有意な蘇生効果も得られず¹⁾, 1998年にPhase III試験の継続を断念したことは本研究領域全体にとって衝撃的な出来事であった. その後Somatogen社を吸収しpoint mutationによりNO結合に対する親和度を低減させたリコンビナントHb分子に更にPEG鎖を結合させた究極的な修飾Hbの開発に移行していたが²⁾, 十分な問題解決には至らずBaxter社は2003年に完全撤退を宣言した. 他方, Hbを重合して分子量を増大させて血中滞留時間を延長させる試みは, glutaraldehyde重合ヒトHb (PolyHeme™, Northfield社), glutaraldehyde重合ウシHb (Hemopure™, Biopure社), o-raffinose重合ヒトHb (Hemolink™, Hemosol社) が知られている. このうちHemosol社は臨床試験で十分な効果が認められず2003年に中断している. Biopure社のHemopure™は南アフリカで臨床での使用が認可され, 昨年東京で開催された第9回血液代替物国際会議でも, 乳癌再建手術での使用例の発表があった³⁾. またアメリカで愛玩動物 (イヌ) への使用が認められている (Oxyglobin™). Biopure社の臨床試験結果に関する報文数は業界では最も多く, 臨床認可が期待されているが^{4,5)}, 狂牛病の問題も絡み否定的な見方もある.

Northfield社のPolyHemeは, グルタルアルデヒド重合ヒトHb (平均分子量150 kDa, [Hb] = 12~14 g/dL, 膠質浸透圧: 20~25 Torr) である. 血圧亢進が生起しないことを主張し⁶⁾, 臨床試験も順調に進行しているようであるが, 臨床試験結果の公表は幾つかのCase Reportに留まっていた^{7,8)}. しかし昨年PolyHemeを重症患者に投与した後の炎症反応の程度を, サイトカイン産生量の測定から評価し, 輸血した場合と比較した内容が発表された. サイトカインは免疫細胞から産生される糖蛋白質群 (分子量: 5~100 kDa) の総称であり, 細胞間の情報伝達物質として多様な生理活性を有していることから, 免疫反応を理解する情報源となる. 本論文ではPolyHemeの酸素運搬効果については記述が無く, また被験者数が少ないためデータの統計処理に問題があり決定的なことが言えていない印象が強いが, 副作用の多い「輸血」に対する人工酸素運搬体の優位性が主張され, 本研究分野全般にとって参考となる文献であると考えられるので以下に紹介したい.

尚, 図表は著作権の問題があるので割愛するが, 内容は文章から十分に理解できると思われる. 興味ある方は原著を一読して頂きたい.

緒言

出血ショック時の蘇生法において最も重要なのは酸素運搬の回復である. 一般的にはまず晶質液の投与で循環血液量を回復し, 次いで必要に応じて濃厚赤血球 (packed red blood cells,

*早稲田大学理工学総合研究センター 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1
Phone, 03-5286-3120; Fax, 03-3205-4740; E-mail, eishun@waseda.jp
論文受付論文受付 2004年1月21日 受理 2004年1月29日

PRBCs)を投与し酸素運搬量の増大をはかる。しかし、PRBCsの予期せぬ様々な副作用も近年特に強く認識されている。輸血の副作用としては主に、感染と免疫炎症反応(immunoinflammation)がある。

感染症については、HCVやHIV感染の可能性が未だ統計的に残されているように不安が残るし、新たな感染源出現の可能性もある。例えばプリオン(変異クロイツフェルト-ヤコブ病)や人獣共通感染症(西ナイルなど)感染の可能性は、今後集中して検討する必要がある。感染回避のために献血者プールを狭めればPRBCsの供給と利用システムへの影響は多大であろう。

ごく最近の配慮すべきこととして、また本研究の課題として、PRBCsの免疫炎症反応がある。輸血に免疫変調作用があることは周知の事であり、事実、臓器移植の歴史の初期では、これが治療のendpointであった。以来、輸血に起因する炎症反応、感染、および腫瘍再発について詳しく報告されている。PRBCsには、酸素運搬の役割だけでなく、生理活性作用もあることは明らかである。

外傷患者が死に至った場合、多臓器不全(MOF)が原因である場合が多い。その詳細な機序は明らかでは無いが、抑制不能な全身的炎症反応がその根本と考えられている。これを裏付ける事実として、好中球(PMN)機能と内皮細胞(EC)活性の変化がみられた後にMOFが生起することが動物モデルや外傷患者で観察されている。PRBCsに含有する生理活性物質によるPMNまたはECの機能変化が、postinjury MOFへ達する過程に影響を及ぼす。

MOFの原因がPRBCsであることを示唆する例もある。8年前に我々は、外傷後初期の輸血がMOF発生の危険因子であることに気付いた。そして多くの専門分野から構成された研究班を発足し、根本的原因を追求した。最大の焦点は、PRBCs保存中に産生される物質が炎症反応を変化させることであった。ここ10年間の研究結果から、PRBCsに含有する脂質やサイトカインメディエータがPMNとECの生理に変化をもたらすことが明らかとなった。

保存PRBCsの血漿分画は、PMNsとECの両方に対して炎症作用(proinflammatory effect)を示す。この血漿分画にPMNsを加えインキュベートすると、表面に接着分子(CD11b/CD18)の発現や、刺激に対する細胞毒性産物(過酸化水素、エラストアーゼ)産生の亢進などの反応を示した。血漿分画の脂質成分も生理活性を示す。同様にPRBCs由来の脂質メディエータ類似体をECに作用させると、接着分子発現量が増大する。これらの効果は総じてECのPMNに対する親和性を増大させ、またPMNが炎症反応を促進し自己毒性な組織障害をもたらす。外傷時の輸血に関連する刺激/活性化の実験によって、PMN/EC接着とEC障害が結果として得られた。

我々は、外傷患者の蘇生において、PRBCsの代わりに重合ヒトHb(PolyHeme)を使用する機会を得た。重傷患者にこの物質を投与することで、我々は免疫炎症反応についてPRBCsとPolyHemeで比較することが可能となった。このHb利用酸素運

搬体は、脂質成分を含まず、サイトカインも含まず、全てに適合した修飾ヒトHb溶液であり、開発の最終段階にある。In vitro試験では、PolyHemeがPMNを刺激しないこと、またECを活性化しないことが解っている。我々は重合ヒトHbで蘇生した場合にはPMN細胞毒性potentialは安定し、PRBCsで蘇生した場合にはPMN細胞毒性potentialの亢進がみられ、PRBCsが外傷後PMNを刺激する仮説と一致していた。

従来観察されたPMN刺激の相違が全身的な炎症反応の低下を示しているかどうかは不明である。炎症反応の評価法の一部として、proinflammatory(炎症性)サイトカイン(IL-8, IL-6など)と、免疫調節性(counterregulatory)サイトカイン(IL-10, IL-11など)、内皮細胞活性化の指標として(可溶性細胞内接着蛋白質:sICAM)および可溶性E-セレクチン(sE-selectin)を測定した。本研究では、重合ヒトHbで蘇生した場合とPRBCsで蘇生した場合で、サイトカインレベルに相違があるか確認することを目的とした。

方法

患者の選択

輸血が必要と判断された17歳以上の外傷患者を対象とした。我々の従来の危険度検査では、外傷重症度(injury severity)と投与PRBCsユニット数から判断した外傷の程度がMOF発生の予測因子であったので、このプロスペクティブ臨床研究においても、外傷後12時間以内に6ユニット以上のPRBCs投与を受けると予想されるInjury Severity Score(ISS)が15以上の患者を対象とした。被験者は、重合Hb(20ユニット以下、或いは1000 g Hb)或いは貯蔵されていた赤血球を、最初の酸素運搬蘇生液として投与を受けた。24時間生存しなかった患者は対象外とした。本研究は、研究施設評価委員会の承認を得たプロトコールに沿って実施され、また、研究ボランティア保護の原則に従った。

追加輸血必要の目安は、晶質液投与後の低血圧改善が必要となったとき、生理学的に顕著な貧血状態(例えば酸素抽出率が30%以上)になったとき、或いは極度な貧血(Hb < 7 g/dL)になったときとした。この措置は両群とも同様に行った。血圧、心拍数、pHなどのパラメータ、輸血量、年齢、およびISSを集計し、MOF研究のデータベースの一部とした。PRBCsは、保存間に白血球除去の処理をしなかった。

採血液検体の調製とサイトカイン測定

ヘパリン加全血を外傷後できるだけ早く採取し(0 hr、或いはベースライン)、その後の採血時間を3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 120時間とした。3時間以内に採血出来なかった患者は除外した。採血液を遠心分離(1回目400xg, 20 min, 2回目10000xg x 5 min)、血小板数の少ない血漿を調製した。血漿は直ちに-80 で凍結し、ELISA測定まで保存した。市販ELISAキット(R&D System, MN)を測定に用いた(IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, sE-selectin, sICAM)。

統計処理

年齢, ISS, 乳酸値, pHについては, 両群間の差はStudent's-t testで判定した. サイトカインレベルに対する経過時間の影響の検討には, 反復測定ANOVAを用いた. 経時的変化におけるベースラインと各測定時間との比較ではSheffe's testを用いた. 2群間 (PolyHeme vs. PRBCs) の比較にはANOVAを用いた. IL-11レベルは検出限界以下になることがあるので, 検定は行わなかった. 全ての比較において, p値が0.05以下のとき有意な差と判断した.

結果

患者の一般状態

全体で25名の患者の結果を最終的に統計処理にかけた. このうち7名がPRBCs投与, 残る18名がPolyHemeの投与を受けた. 年齢, ISS, 最初12時間の最低乳酸値, 最低pH値に特に有意差はなし. PolyHeme群の患者は全て生存した. PRBCs群では2名 (29%) が晩期MOFにより死亡した.

炎症性サイトカイン (IL-8, IL-6)

PRBCs群では外傷後初期に増大した. IL-8は初期値 27.4 ± 10.3 pg/mLから12時間後に最大値 4323.1 ± 2963.1 pg/mLにまで, 120倍増大した. IL-6は初期値 348.8 ± 180.1 pg/mLから6時間後に最大値 6489.5 ± 3468.2 pg/mLまで, 約19倍増大した. 一方, PolyHeme群では, 経時的変化としては有意な上昇が見られたが, 相対的な変化としてはIL-6が5倍, IL-8は12倍の増大に留まり, 僅かであった. IL-6, IL-8ともにPRBCs群の方が有意に高い値を示した.

免疫調節性サイトカイン (IL-10, IL-11)

PRBCs群では, IL-10が 276.1 ± 246.0 pg/mLから3時間後に最大値 552.4 ± 184.2 pg/mLに増大し, 約2倍となった. PolyHeme群では, IL-10は初期値 85.5 ± 18.9 pg/mLから3時間後に最大値 180.2 ± 74.3 pg/mLに増大し, 約2倍となった. 両群とも有意な増大であった. 初期値が両群で大きく異なるが, 有意な差では無かった ($p=0.20$). ANOVAでは, IL-10はPRBCs群がPolyHeme群に比較して有意に高い値となった.

IL-11は, 検出限界以下となることが多かった. 経時的に増大する傾向があり, 初期値 1.0 pg/mLから48時間後に 11.4 pg/mLにまで増大した. しかし, 36, 48時間以外の測定時間では全て検出不能であった. IL-11は僅かに測定できる程度であり, また被験者数も小さいので, 検定はしなかった.

血管内皮障害マーカー (sICAM, sE-selectin)

従来結果と同様, sICAMとsE-selectinは徐々に有意な上昇を示した. sICAMの上昇はPRBCs群で僅かに高い値を示したが, 有意な差ではなかった ($p=0.10$).

論考

保存PRBCsが免疫炎症反応の副作用を起す可能性は, これまでもex vivo試験結果から指摘されている. 我々の研究室で

も, PRBCsが外傷後にPMNを刺激し活性化させ, MOFを引起す可能性があることに注目してきた. 特に, PolyHemeに比較してPRBCsを投与した患者のPMNsの活性化が非常に高いことをex vivo試験で見出した. 赤血球の代わりにPolyHemeを投与することにより全身の炎症反応を弱めるという我々の仮説は, 今回の追加試験におけるサイトカイン測定の結果と一致している.

炎症性サイトカインIL-8およびIL-6は, PolyHeme群で6~12時間後に僅かな増大がみられる. IL-8はケモカインの一種で, PMNsを刺激して活性化し, 炎症領域への走化性を高める. 外傷後の呼吸不全とMOF発症時にIL-8の急激な増大が見られる. 更に, 保存PRBCsの血漿がex vivoでPMNsからのIL-8産生を刺激することも確認した. PRBCs群で特にIL-8が高いことから, 輸血が外傷後のIL-8産生量を増大させ, 炎症性臓器障害に移行する危険性を増大させることが考えられる. しかし, IL-8の生理活性はIL-8濃度だけでなく, 外傷後に変動する諸要素, 例えばIL-8レセプターの活性なども含めて検討しなければならない. Adamsらによれば, Ca^{2+} Fluxから測定したIL-8に対するPMNsの応答は, 外傷後1週間で大きく変化する. 1日目は鈍い応答を示し, 3日目に最大の応答を示す. 従って正味のIL-8活性は, 血漿中の濃度だけでは正確に示すことは出来ない.

IL-6は炎症性および抗炎症性サイトカインの両性質を有し, 正確な役割は未だ解っていない. 明らかなのは, IL-6の増大は, 外傷または敗血症後の悪い結果の前兆となることである. IL-8と同様, PolyHeme群のIL-6微増は全身的な炎症反応の低下傾向を反映しているのであろう.

外傷に対する反応の一つに, 炎症反応初期の刺激に対する免疫調節反応がある. この反応のメディエータとしてIL-10およびIL-11のサイトカインが推定されている. これらはPMNs, 単球, リンパ球の活性を抑制する. 一般的に, IL-10増大は予後不良の場合に見られる. しかしこれが危機的状態の指標なのか, IL-10の効果なのかは明らかではない. 治療的にIL-10で免疫炎症反応を調節する方法は, 様々な結果をもたらすが, 対照的にIL-11では全身的な炎症反応の治療的調節剤として臨床試験が進められている. 事故による外傷で見られた従来結果と同様, PRBCsで蘇生した患者にIL-10の増大が見られた. PolyHeme投与群では特に外傷後初期に, 統計学的に有意に低いIL-10レベルを示した. 従って, 外傷初期の炎症反応が増大する時期に, PRBCsの代わりにPolyHemeを投与すると, 免疫調節機能が鈍化したことを示唆する. IL-11は両群ともに増大する傾向があった. しかし濃度が極めて低く, 恐らく生理的にも意味のあるレベルでは無いと考えられ, これ以上の議論は余り意味が無いと考えられた.

サイトカイン産生の様相はPRBCs群とPolyHeme群で異なり, また以前にex vivo試験でもEC活性が異なることが明らかになったが, 今回ECの活性化/障害を反映するマーカー (sICAM/sE-selectin) には両群で有意な差は見られなかった. PRBCs群の被験者数が少ない事も原因の一つであるが, 事実, 大差は無いと判断すべきと思われる. サイトカインとPMNの

機能の測定から全身的な炎症反応の低下の証拠は得られたが、マーカーと内皮障害/活性化には変化が無い。

本研究ではデータ解釈に限界がある。先ず第一に、初期値で両群に有意な差は見られないものの、PRBCs群の患者の方がより重度の障害と生理的な乱れがあること、また被験者数が少ないことである。第二に、PRBCs群の炎症反応の増大は、PRBCs保存中に産生された炎症惹起物質が、外傷後の炎症反応に対して火に油を注いだものと考えた。このことは、保存PRBCs中の血漿がPMNの機能に及ぼした我々の従来結果と一致している。他に考慮すべきことは、PMN機能評価ex vivo試験では明らかではなかったが、PolyHemeはin vivoで免疫調節機能を有することが考えられる。この場合、PRBCsの亢進作用というよりは、PolyHemeの抑制作用が両群間の差の原因とも考えられる。本研究の結果からは判断できないが、過去にPolyHemeの投与を受けた患者が、ex vivoでPMNの感作物質に対して正常な反応を示している。従ってPolyHemeの拮抗性効果よりも、PRBCsの作動性効果が有力である。第三に、解釈上、患者のサイトカインは内因性と仮定した。しかし、白血球除去に依らず血液製剤保存中に何らかのサイトカインの産生はある筈である。これは非溶血性輸血反応の機序の一つと考えられてきたが、このような反応を示す患者で見られたサイトカインレベル上昇を説明することが出来ない。それに、本研究の患者のサイトカイン上昇は、保存物に含まれるサイトカイン濃度(文献値)よりも著しく高い。従ってほとんどの場合、内因性サイトカインの測定値であったと考えるべきである。また、PRBCs由来であれ内因性であれ、患者のサイトカインレベルは十分に生理活性を示す量であると考えられる。

これまでに幾つもの興味ある研究が、外傷後投与したPRBCsが抑制不能な全身的炎症反応を亢進する可能性があることを指摘している。我々はPolyHemeの使用により、外傷後初期の段階でPRBCsの投与を回避した患者の炎症反応を比較検討することが出来た。PRBCsの代わりにPolyHemeを投与した患者の方が、炎症性および調節性サイトカインともに低レベルを示した。従って、外傷後MOFへ移行する可能性を低下させることになるであろう。

訳者コメントの引用文献

[1] Sloan EP, Koenigsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J,

Mallory MN, Rodman G Jr. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trial. JAMA. 1999 17;282: 1857-64.

- [2] Bobofchak KM, Mito T, Texel SJ, Bellelli A, Nemoto M, Traystman RJ, Koehler RC, Brinigar WS, Fronticelli C. A recombinant polymeric hemoglobin with conformational, functional, and physiological characteristics of an in vivo O₂ transporter. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 285: H549 - 561.
- [3] Edwards G, Levien L, Benn C. Oxygen therapeutic Hemopure in Breast Cancer Reconstructive Surgery. 人工血液 2003;11:38
- [4] Sprung J, Kindscher JD, Wahr JA, Levy JH, Monk TG, Moritz MW, O'Hara PJ. The use of bovine hemoglobin glutamer-250 (Hemopure) in surgical patients: results of a multicenter, randomized, single-blinded trial. Anesth Analg. 2002;94:799-808.
- [5] Levy JH, Goodnough LT, Greilich PE, Parr GV, Stewart RW, Gratz I, Wahr J, Williams J, Comunale ME, Doblar D, Silvey G, Cohen M, Jahr JS, Vlahakes GJ. Polymerized bovine hemoglobin solution as a replacement for allogeneic red blood cell transfusion after cardiac surgery: results of a randomized, double-blind trial. J Thorac Cardiovasc Surg. 2002;124:35-42
- [6] Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Burch JM, Haenel JB, Garcia J, DeWoskin R, Moss GS. The first randomized trial of human polymerized hemoglobin as a blood substitute in acute trauma and emergency surgery. J Am Coll Surg 1998; 187:113-122.
- [7] Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Ness PM, Norris EJ, Carson JL, Hides GA, Freeman IH, DeWoskin R, Moss GS. The life-sustaining capacity of human polymerized hemoglobin when red cells might be unavailable. J Am Coll Surg. 2002;195:445-52.
- [8] Norris EJ, Ness PM, Williams GM. Use of a human polymerized hemoglobin solution as an adjunct to acute normovolemic hemodilution during complex abdominal aortic reconstruction. J Clin Anesth. 2003; 15: 220-3.

日本血液代替物学会 理事会報告

報告事項 年次大会の開催状況
会員動向

審議事項 平成14年度事業報告
平成14年度収支決算
平成15年度事業報告（経過）
平成16年度事業計画
年会費について

1月21日に理事会が開催され以下の内容が審議されました。

報告事項

年次大会の開催状況

- 1) 第10回日本血液代替物学会年次大会
(第9回血液代替物国際会議と合同開催)
- 2) 平成15年3月3日(月)～5日(水)
- 3) 東京都新宿区西新宿2-2-1 京王プラザホテル

会員状況は以下のとおり。

- 1) 維持会員：6社（うち1社手続き中）
- 2) 賛助会員：5社
- 3) 正会員：143名
- 4) 購読会員：22箇所

審議事項

平成14年度事業報告(平成14年4月1日～平成15年3月31日)

- 1) 定期総会の開催 平成14年9月4日(水)
国際交流会館(熊本市)にて開催された。
- 2) 第9回年次大会(大会長 西 勝英 先生)
平成14年9月4日(水)～5日(木)
国際交流会館(熊本市)で行われた。
- 3) 会誌「人工血液」の発行
第10巻2号、3号、4号、第11巻1号を発行。

平成14年度収支決算

平成14年度 会計報告 収支決算表
(自平成14年4月1日 至平成15年3月31日)

収 入		支 出	
摘 要	金 額	摘 要	金 額
前期繰越金	7,617,177	会誌出版費	3,512,043
正会員会費	800,000	集会・委員会費	1,959,073
賛助会員会費	2,000,000	年会補助金	1,000,000
維持会員会費	8,000,000	事務人件費	1,961,660
購読会員会費	96,000	事務費	1,003,510
広告代・雑収入	371,000	基金に繰入	2,000,000
利息	4,749	次期繰越金	7,452,640
計	18,888,926	計	18,888,926

平成15年度事業報告（経過）

- 1) 定期総会の開催
平成15年度は年次大会の開催時期を前倒しし、血液代替物国際会議と合同開催となったため本年度中に郵送にて実施予定。(理事会審議結果について後日ご報告いたします。)
- 2) 第10回年次大会の開催(大会長 小林 紘一 先生)
平成15年3月3日(月)～5日(水)
於 京王プラザホテル
第9回血液代替物国際会議(9-ISBS)との合同開催。
開催時期は平成14年度に入るが、平成15年度事業として扱うことが理事会にて承認された。
- 3) 会誌「人工血液」の発行
第11巻2号(7月)、3号(11月)、4号(1月)発行。
第12巻1号(平成16年3月)の発行予定。

平成16年度事業計画

- 1) 定期総会の開催 平成16年7月14日(水)
北方圏センターにて開催予定。
- 2) 第11回年次大会の開催(大会長 川村 明夫 先生：札幌北楡病院理事長)
平成16年7月13日(火)、14日(水)
於 北方圏センター(札幌市)
- 3) 会誌「人工血液」の発行
第12巻2号(6月)、3号(9月)、4号(1月もしくは12月)発行。
第13巻1号(平成17年3月)の発行予定。

年会費について

今までの会員枠に加えて、学生会員(年額5千円)を追加。

日本血液代替物学会 役員名簿 (平成15年度)

顧問	尾形利郎 東海大学医学部 名誉教授	高折益彦 東宝塚さとう病院 名誉院長
	高久史磨 自治医科大学 学長	武岡真司 早稲田大学理工学部 助教授
	堀原一 筑波大学 名誉教授	土田英俊 早稲田大学理工学部 名誉教授
	遠山博 埼玉医科大学総合医療センター 名誉所長	西勝英 肥後医育振興会 理事
	桜井靖久 東京女子医科大学 名誉教授	宮尾秀樹(会計) 埼玉医科大学総合医療センター 教授
会長	小林紘一 慶應義塾大学医学部 教授	湯浅晋治 埼玉県赤十字血液センター 所長
副会長	池田康夫 慶應義塾大学医学部 教授	監事 清水勝 杏林大学医学部 客員教授
理事	池田久實 北海道赤十字血液センター 所長	阿岸鉄三 板橋中央総合病院 血液浄化療法センター ブラッドアクセス治療センター 所長
	池淵研二(庶務) 埼玉医科大学 教授	(事務局長) 堀之内宏久 慶應義塾大学医学部 講師
	川村明夫 札幌北榆病院 理事長	(会誌担当) 武岡真司 早稲田大学理工学部 助教授
	北畠 顕 北海道大学医学部 教授	
	末松 誠 慶應義塾大学医学部 教授	

日本血液代替物学会 評議員名簿 (平成15年度)

青木 克憲 浜松医科大学 教授	高折 益彦 東宝塚さとう病院 名誉院長
阿岸 鉄三 板橋中央総合病院 血液浄化療法センター ブラッドアクセス治療センター 所長	高久 史磨 自治医科大学 学長
浅野 茂隆 東京大学医科学研究所 教授	高橋 晃 テルモ(株) 専務取締役
阿部喜代司 筑波大学医療技術短期大学部 教授	高橋 英嗣 山形大学医学部 助教授
飯塚哲太郎 理化学研究所播磨研究所 所長	高橋 恒夫 東京大学医科学研究所 教授
池田 久實 北海道赤十字血液センター 所長	武岡 真司 早稲田大学理工学部 助教授
池田 康夫 慶應義塾大学医学部 教授	土田 英俊 早稲田大学理工学部 名誉教授
池淵 研二 埼玉医科大学 教授	土屋 喜一 早稲田大学理工学部 名誉教授
伊藤 俊之 京都府立医科大学 助教授	遠山 博 埼玉医科大学総合医療センター 名誉所長
岩田 博夫 京都大学再生医科学研究所 教授	友田 燁夫 東京医科大学 教授
大島 宣雄 筑波大学基礎医学系 教授	豊田 忠之 東部地域病院 元院長
大塚 節子 岐阜大学医学部 講師	仲井 邦彦 東北大学医学部 助教授
大柳 治正 近畿大学医学部 教授	中井 一士 麻薬覚醒剤乱用防止センター 専務理事
尾形 利郎 東海大学医学部 名誉教授	長澤 俊郎 筑波大学臨床医学系 教授
岡野 光夫 東京女子医科大学医工学研究施設長	中島 常隆 三菱ウェルファーマ(株) 生物製剤本部長
片岡 一則 東京大学工学部 教授	西 勝英 肥後医育振興会 理事
川村 明夫 札幌北榆病院 理事長	西出 宏之 早稲田大学理工学部 教授
北畠 顕 北海道大学大学院医学研究科 教授	西谷 孝子 富士レビオ(株) 先端研究所 先端研究グループサーチディレクター
黒澤 良和 藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授	ロジャー・ゴティエ バクスター(株) 代表取締役社長
小林 紘一 慶應義塾大学医学部 教授	半田 誠 慶應義塾大学医学部 助教授
小室 勝利 国立感染症安全性研究部 部長	平澤 博之 千葉大学医学部 教授
斎藤 英彦 国立名古屋病院 院長	福島 昭二 神戸学院大学薬学部製剤学 助教授
酒井 清孝 早稲田大学理工学部 教授	藤井 寿一 東京女子医科大学 教授
佐久間一郎 北海道大学大学院医学研究科 講師	藤島清太郎 慶應義塾大学医学部 講師
桜井 靖久 東京女子医科大学 名誉教授	(財)化学及血清療法研究所 常務理事
佐藤 誠 ニプロ(株) 医薬品研究所長	堀 進悟 慶應義塾大学医学部 助教授
鮫島 達也 青山学院大学理工学部 名誉教授	堀 原一 筑波大学 名誉教授
清水 勝 杏林大学医学部 客員教授	宮尾 秀樹 埼玉医科大学総合医療センター 教授
清水 慶彦 京都大学再生医科学研究所 教授	宮崎 保 札幌通信病院 名誉院長
十字 猛夫 日本赤十字社中央血液センター 所長	村田 満 慶應義塾大学医学部 講師
末松 誠 慶應義塾大学医学部 教授	湯浅 晋治 埼玉県赤十字血液センター 所長
平 明 鹿児島大学医学部 名誉教授	四津 良平 慶應義塾大学医学部 教授

(ア順敬称略)

日本血液代替物学会 会則

第1章 総則

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

第2条：(事務局) 本会の事務局は当分の間、会長の所属機関内に置く。

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

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

第4条：(事業) 本会は前条の目的達成のため、次の事業を行う。

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

第2章 会員

第5条：(種別) 本会会員は次の分類とする。

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

第6条：(会費) 会員は、つぎの種別に従って会費を納めなければならない。

- 1) 正会員 年額 1万円
- 2) 講読会員 年額 6千円
- 3) 学生会員 年額 5千円
- 4) 賛助会員 年額 1口以上(1口20万円)
- 5) 維持会員 年額 10口以上(1口20万円)

2. 既納の会費はいかなる理由があっても、これを返還しない。

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

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

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

第3章 役員、顧問、評議員および職員

第10条：(設置および定数) 本会に次の役員を置く。

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

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

2. 顧問は、会長が委嘱し、その任期は役員の任期に準ずる。

第12条：(任期) 役員および監事の任期は2年とし、再任を妨げない。

第13条：(会長) 会長は、各事業を司り本会を代表統括する。

第14条：(副会長) 会長を補佐し会長に事故があるときはその代理となる。

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

第16条：(監事) 監事は、資産の状況および理事の会務執行状況を監査する。

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

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

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

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

2. 職員人事は会長が任命権者となり、有給とする。

第4章 年次大会長

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

第21条：（選任）大会長および副大会長は、評議員の中から、理事会の議決によって選任される。
2. 理事会の議決によって、副大会長を次年度の大会長とすることができる。

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

第5章 会議

第23条：（会議）本会の会議は、つぎの3種とする。

- 1) 理事会
- 2) 総会
- 3) 評議員会

第24条：（理事会）理事会は、理事をもって構成する。

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

第25条：（総会）総会は、通常総会、臨時総会の2種とし、会長が召集する。

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

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

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

2. 出席会員の3分の2以上の同意があったときは、あら

かじめ通知しなかった事項について審議し、議決することができる。

第28条：（審議事項）次の事項は、通常総会の承認を求めなければならない。

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

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

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

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

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

2. 会長は評議員会の議長となる。

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

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

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

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

第6章 資産及び会計

第35条：（資産）本会の資産は次の通りとする。

- 1) 会費
- 2) 寄付金
- 3) 事業にともなう収入

- 4) 資産から生じる果実
- 5) その他の収入

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

第37条：(寄付の受領) 寄付金品は、理事会の議決を経てこれを受領する。

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

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

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

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

第7章 会則の変更ならびに解散

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

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

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

第8章 補 則

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

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

編集後記

本号では、人工血小板の総説と原著論文、ならびに人工赤血球の原著論文が掲載されましたが、引き続き会員の皆様からの積極的な原著論文の投稿をお願いします。また、現在欧米で行われた修飾ヘモグロビンの臨床成績が発表されつつあります。本誌でも海外文献紹介の形で取り上げたいと思っておりますの

で、この様な投稿を期待しています。会告にもありますように、7月13、14日には第11回日本血液代替物学会年次大会が札幌にて開催されます。是非、発表時に原著論文の投稿をお願いします。

(武岡真司)

投稿規定

本誌は、血液代替物開発研究に貢献する論文、関連する情報、学会会員のための会報、学会諸規定等を掲載するが、形式にはこだわらず創意ある投稿を広く集める。本誌への投稿者は本学会会員であることが望ましいが、投稿を希望する者は誰でも投稿することが出来る。原稿掲載の採否は編集委員会が決定する。原著論文について、他誌に既発表あるいは投稿中の論文は掲載しない。

執筆規定

ワープロを用いフロッピーによる投稿を原則とする。ただし、手書き原稿による投稿でも受け付ける。欧文による投稿を歓迎する。

- 1) 原稿はワープロを用いて作成し、使用したソフト名を記載してフロッピーにより提出すること。その際、ハードコピー4部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。オリジナルのソフトおよびテキストファイル形式でも保存し提出すること。
- 2) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著者名、全著者所属、英文著者名、英文所属、ついで筆頭著者の住所、英文住所を記入する。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。
- 3) 総説、原著、および報告については、第2頁以降に和文抄録、Keywords

- (英文で6個程度)を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること。英文抄録は英文ワープロを用いて、別の「ABSTRACT」ファイルとしてハードコピーとともに提出しても構わない。
- 4) 句読点はコンマ(,)ピリオド(.)とする。
 - 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbol フォントを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名称は大文字で書きはじめること。
 - 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μ m, L, mL, μ L, mol, g, mg, μ g, ng, pg, fg, N/10などを用いる。
 - 7) FigureとTable: 引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は全て英文とすること。本文ハードコピー上に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。
 - 8) 文献: 本文に引用した順序に番号を付け、文中では⁽²⁾, ^(3,5), ^(1, 4-6)などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名・論文題名・誌名西暦発行年; 巻数: 頁~頁。とし、誌名の省略は医学中央雑誌またはIndex Medicus に準拠する。単行本の場合は全著者名・題名・編集者名・書名・発行地: 発行書店, 年号; 頁~頁。の順

とする。

1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
2. 砂本順三, 岩本 清, リポソームの調製, 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編, リポソーム, 東京: 南江堂, 1988;21-40.
3. Fowler SA, Andracki M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22:27-42.
4. Reichert CM, Kelly VL, Macher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985; 111-60.
- 9) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
- 10) 既発表の図表, その他を引用, 転載する場合には, あらかじめ著作権所有者の許可を得ること。また, 掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

掲載料は無料とし、論説、総説、原著、報告等については別刷り30部を贈呈する。それを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。

編集委員会

武岡真司(委員長), 池淵研二, 津田良夫, 仲井邦彦, 福島昭二, 堀之内宏之, 宮尾秀樹, 村田満, 渡辺真純

日本血液代替物学会 会誌

発行 日本血液代替物学会

編集・制作「人工血液」編集委員会

印刷 株式会社 研恒社

人工血液 vol.11(4) 2004年2月13日発行

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

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

〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1

早稲田大学理工学部65-208室

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

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

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