

人工血液

第 13 卷 第 4 号 2006 年 5 月

目次

会告	134
総説	分子集合科学を利用した人工血液の創製	武岡真司 136
原著	ヘモグロビン精製工程におけるS/D処理を用いた ウイルス不活化	小島潤也 148
総説	血小板代替物の開発の現状	岡村陽介 155
事務局たより	161

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 13 No. 4 May, 2006

Contents

<i>Announcement</i>	134
<i>Review: Production of Artificial Blood Using Molecular Assembling Science</i>	<i>Shinji Takeoka</i>	136
<i>Original Article:</i> <i>Virus Inactivation by Solvent / Detergent Treatment in Hemoglobin Purification Process</i>	<i>Junya Kojima</i>	148
<i>Review: Development of Platelet Substitutes</i>	<i>Yosuke Okamura</i>	155

会 告

第13回 日本血液代替物学会年次大会

会 期：平成18年8月24日(木)、25日(金)
会 場：慶應義塾大学医学部 北里講堂(北里記念医学図書館2階)
大会長：末松 誠(慶應義塾大学医学部 医化学教室教授)

参加登録申込要領

第13回日本血液代替物学会年次大会への参加は、全員参加登録が必要です。学会ホームページから参加登録をした上で、登録料を所定の銀行口座へお振込下さい(下記参照)。当日の受付は混雑することがありますので、事前にお申込み下さいますようお願い申し上げます。

参加登録料

申 込 期 間	5月1日～7月24日	7月25日～会期中
参加登録料 (消費税込み)	¥8,000	¥10,000

参加登録料振込先

・口 座 名：第13回日本血液代替物学会年次大会事務局
財団法人国際医学情報センター柳下俊江
ダイジュウサンカイニホンケツエキダイタイブツガツカイ
ネンジタイカイジムキョク
ザイダンハウジンコクサイイガクジョウハウセンター
ヤナギシタトシエ

・銀 行 名：三井住友銀行 麹町支店

・口座番号：普通預金 8808435

大変恐縮ですが、振込手数料は各自ご負担下さいますようお願い致します。

会期中の行事

・理 事 会

日 時 8月24日(木) 10:00～11:30

会 場 慶應義塾大学医学部 北里記念図書館2階 第1会議室

・評議員会

日 時 8月24日(木) 11:30～12:00

会 場 慶應義塾大学医学部 北里記念図書館2階 第1会議室

・総 会

日 時 8月25日(金) 11:45～

会 場 慶應義塾大学医学部 北里記念図書館2階 北里講堂

・懇 親 会

日 時 8月25日(金) 18:00～20:00

会 場 レストラン オアシス(慶應義塾大学病院 新棟11階)

お問い合わせ先

・運営事務局（年次大会に関するお問い合わせ先はこちらです。）

〒150-0021 東京都渋谷区恵比寿西1-20-4

(株)アロフト 内

第13回 日本血液代替物学会年次大会運営事務局

担当 藤井律子

アドレス blood-sub-2006@aloft-inc.com

TEL 03-5784-3414

FAX 03-5459-3439

・大会事務局

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部医化学教室

第13回 日本血液代替物学会年次大会

事務局長 合田巨人

学会のホームページにて、最新のお知らせ、注意事項、プログラムなどを掲載していきます。併せてご確認、ご利用下さい。

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

研究発表者への注意

予稿原稿に関すること

演題募集の内容は、下記のとおりです。ふるってご応募下さい。

・一般演題

・シンポジウム1「リボソームを基盤とした人工血液製剤開発の現状」

・シンポジウム2「血漿蛋白製剤の現状と展望」

シンポジウムは、一部公募です。

予稿原稿電子投稿締切 6月15日(木)

学会のホームページ、Information(学会のお知らせ)の電子入稿のサイトより入稿して下さい。(Windows Word対応)

文字量は日本語による換算で1344文字分(1行28文字×48行)となります。

この中に、「演題」、「所属」、「著者」、「本文」、「図」、「表」、すべてを含みます。

参加登録

全員参加登録制です。学会ホームページのInformation(学会のお知らせ)の参加登録サイトより7月24日(月)までにご登録下さい。

参加登録料は、所定の銀行口座にお振込下さい(前頁参照)。

なお、振込手数料は各自ご負担下さいますようお願い致します。

プログラム

年次大会のプログラムは、会誌「人工血液」ならびに学会ホームページに掲載します。また、「人工血液」Vol.14.No2が抄録号となります。発表時間が自分の他の発表と重なる場合は、至急運営事務局までお知らせ下さい。

学会ホームページ <http://www.blood-sub.jp/>

分子集合科学を利用した人工血液の創製

Production of Artificial Blood Using Molecular Assembling Science

武岡真司

Shinji Takeoka

和文抄録

本稿は、2005年6月6日(月)、7日(火)早稲田大学国際会議場にて開催された、第12回日本血液代替物学会年次大会における大会長講演の内容をまとめたものである。筆者は、分子集合科学の理解と実践という理工学の立場から、ヘモグロビンやアルブミンなどの蛋白質とリン脂質に代表される両親媒性分子を用いて、人工血液(赤血球代替物や血小板代替物)の創製に取り組んできた。現在までの研究のまとめとして、1.赤血球代替物としてのヘモグロビン小胞体(HbV)、2.血小板代替物として認識部位を担持したナノ粒子(アルブミン重合体、リン脂質小胞体)、3.高機能性ナノ粒子の設計、の3つの課題について紹介する。これらの技術は臨床現場で使用されなければ意味を成さず、その実現には幾つもの厳しい評価をクリアしなければならない。そのためにはもっと多くの関係者の関心と積極的な関与が必要であり、日本血液代替物学会がその場となることを期待したい。

Abstract

This manuscript was a summary of the Presidential Lecture of the 12th Annual Meeting of the Society of Blood Substitutes, Japan, which was held at International Conference Center, Waseda University, July 6-7th, 2005. We have been studying the production of artificial blood(red blood cell substitutes, platelet substitutes)by utilizing the basic knowledge and application of molecular assembling science such as interaction between hemoglobin or albumin and amphiphiles phospholipids. This manuscript introduces 1. Production of Hemoglobin Vesicles(HbV)as red blood cell substitutes, 2. Production of nanoparticles (polymerized albumin, phospholipid vesicles)bearing recognition sites as platelet substitutes, and 3. Design of intelligent nanoparticles.

Keywords

Artificial blood, Blood substitutes, Red blood cell substitutes, Platelet substitutes, Molecular assembling science, Nanoparticles, Hemoglobin, Albumin, Phospholipids

1. はじめに

今から20年ほど前(1985年)に、早稲田大学理工学部応用化学科教授 土田英俊先生の研究室の門を叩いて、漸く戴いた課題が重合性リン脂質リポソームを用いた相分離構造の可視化であった。疎水性相互作用によって自己集合して構築する二分子膜小胞体(リポソーム)の凍結乾燥体を完全な球形として走査型電子顕微鏡で観察をするのは困難とされている。大きさ数 μ mの巨大一枚膜リポソーム(ジャイアントリポソーム)を重合性リン脂質(アシル鎖の末端にステチル基が結合している)にて構築し、これを紫外光やアゾ系ラジカル開始剤を用いて重合させることによって、安定な乾燥リポソームを調製し、走査型

電子顕微鏡観察したのがFig. 1の左図である¹⁾。次に、重合性リン脂質と重合しない飽和型リン脂質と混合させて調製したジャイアントリポソームを重合させると、重合領域と非重合領域とに相分離した膜が得られる。これを溶剤処理して非重合領域を除去すると、右図の様に孔の開いたリポソーム(スケルトン化リポソーム)が観測された。一人徹夜で走査型電子顕微鏡を覗いていてこのスケルトン化リポソームがぼーっと見え、慌てて焦点を合せてくっきりと浮かび上がった時は興奮して飛び上がり、土田教授や大野弘幸助手(現東京農工大学 教授)に直ぐに報告したことを覚えている。お二人とも喜んでいただき、直ぐに論文発表され、学会誌の表紙も飾ったが、私自身は喜べ

早稲田大学 理工学術院 教授 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1 Prof. Faculty of Science and Engineering, Waseda University, 3-4 Ohkubo, shinjuku-ku Tokyo 196-8555 Japan.

論文受付 2006年4月21日 論文受理 2006年4月28日

ない状況がしばらく続いた。全く再現性が得られなかったからである。重合性脂質が極めて不安定な物質であったため、関連パラメーターを全て書き出しても数十もあった。これをしらみ潰しに検討した結果、漸く再現性も得られる様になり、その副産物として孔の数や大きさも制御できるようになっていた。Fig. 1.の左下図は、全てのリポソームに孔が一個開いているが、これはゆっくりと水中で界面活性剤・透析法で処理すると孔が融合して一つになったケースである。更に、異なる分子量の一連の内包分子の漏出挙動から孔の大きさやその制御に関する定量的な知見も整理できるようになった。これが、分子集合科学の世界にはまってしまった契機であるが、この題材は分子集合科学の基礎を理解する格好の教材でもあった。

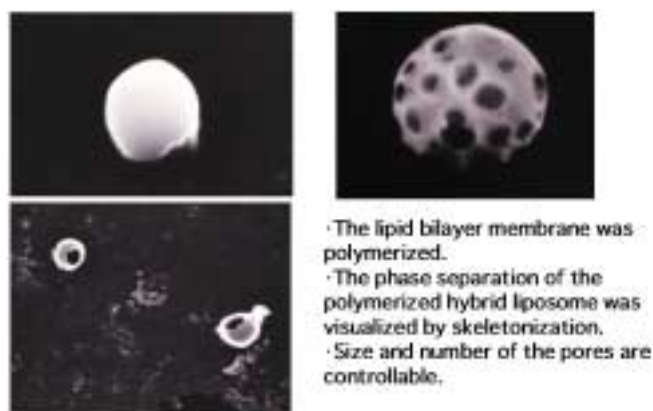


Fig. 1. Skeletonized liposomes (1985)

赤血球代替物の研究に直接関与したのは、博士論文を書き終えた1991年の春からであり、ヘモグロビンをどうやって高濃度にリポソームに内包させるのが課題であった。そこから現在に至るのであるが、ここでは、1. 赤血球代替物としてのヘモグロビン小胞体 (HbV)、2. 血小板代替物として認識部位を担持したナノ粒子 (アルブミン重合体、リン脂質小胞体)、3. 高機能性ナノ粒子の設計、の3つの課題について紹介する。

1. 赤血球代替物としてのヘモグロビン小胞体 (HbV)

Fig. 2.に簡略化したヘモグロビン小胞体 (HbV) のコンセプトを示す。赤血球は直径が約 $8\mu\text{m}$ の扁平な球形であり、 38g/dL 程度の高濃度ヘモグロビン溶液を細胞膜が被覆している。HbV は期限切れの濃厚赤血球製剤から精製したヘモグロビンを、再び合成リン脂質二分子膜にて被覆し直すことによって調製される。この被覆技術には分子集合科学が必要となり、高濃度のヘモグロビンを1から2枚の分子膜で被覆し、小胞体の粒子径を均一に揃える技術の確立に焦点を絞ってきた。また、HbVの安全性、安定性、有効性が緊急時に大量投与される赤血球代替物として満足できるものでなければならず、そのための工夫も必要であった。HbVには表面にひげの様なものが描かれているが、これはポリエチレングリコール (PEG) 鎖であり、この表面修

飾技術も分子集合科学が利用されている。

Fig. 2.の下方には、ソフトバッグ (講演時にはサンプル瓶) に充填されたHbV分散液を示す。常温で備蓄され大地震などの緊急時に即応できれば、安全保障の観点からも重要な施策となるであろう。HbVの粒子径は 250nm 程度であり、Hbが入っていない牛乳のような白濁液であるので、これとHb自体の赤色が混ざり合った色合となっている。HbVは肉眼では粒として認識できない大きさであり、光学顕微鏡でもブラウン運動している粒々としてしか見えない大きさなので、透過型電子顕微鏡を用いて電子密度の像として捕らえた (Fig. 2.のTEM写真)。HbVは黒い丸であり大きさは約 250nm 程度によく揃っているのが分かるし、縁は二分子膜構造が確認できる。電子密度の高い黒の細かい点はヘモグロビンのヘム鉄である。

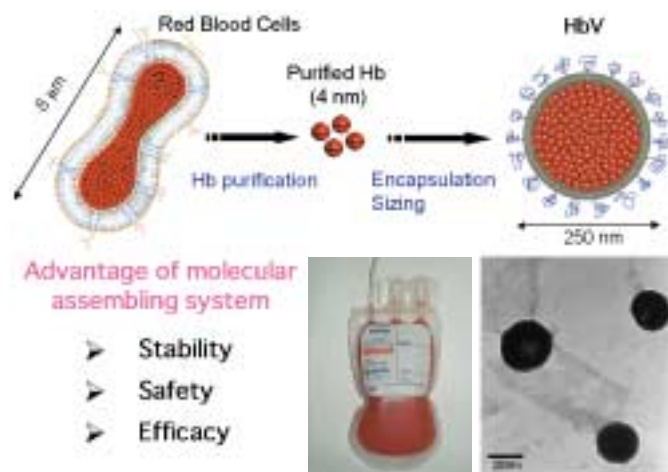


Fig. 2. Concept of Hemoglobin-vesicles (HbV)

Fig. 3.は、HbVを調製する際に考慮しなければならない点を主に工学的見地からまとめたものである、原料である、精製したHbと二分子膜を構成する脂質類の純度やウイルス、菌、エンドトキシンなどの汚染には細心の注意を払わなければならない。これは、大学の研究室でクリーンルームを自前で設置し、工学系の学生にリッタースケールの2週間連続の無菌操作を何回も依頼するのは大変なことで、これまで多くの学生の無償の労力の提供に感謝している。操作工程には、血液製剤を原料に用いているため2重、3重のウイルスに対する対策を取り入れている。また、フィルター処理による除菌は当然としてもエンドトキシンは小胞体の二分子膜やヘモグロビンと結合するために、検出や除去が甚だ困難である。我々は、HbVを界面活性剤にて処理しエンドトキシンを混合ミセル化させて正確に定量する方法を確立し、エンドトキシン値をモニターしながら無菌作業をすることによって、高い品質のHbVが得られるように工夫した。HbVの酸素運搬体としての性能には、如何に高濃度Hbを層数の少ない脂質膜 (1枚か2枚) にて被覆するのかに懸かっており、脂質成分や組成の最適化はHbのカプセル化と安定性、血液適合性の面からなされている。この際にも、表面を修

飾するポリエチレングリコール鎖の長さや密度は、保存安定性、血中滞留性、血液適合性などの観点から選択されている。また、酸素親和度を制御するアロステリック因子や抗酸化剤などの選択と一定濃度の封入や粒子径の250nmへの制御など製剤化技術や、工程中のHbのメト化を防止するためにHbの配位子を一酸化炭素として安定化させて調製し、最後に一酸化炭素を外して容器に充填する技術も工夫を要した。

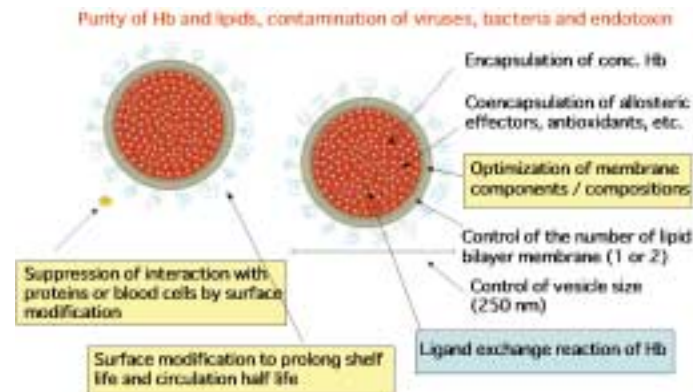


Fig. 3. Points to consider to prepare Hb-vesicles(HbV) as red cell substitutes.

HbVの製造は、混合脂質の凍結乾燥粉末を高濃度Hb溶液に水和させて、これをエクストルージョン法と言われる孔径の揃ったメンブランフィルターに高圧をかけて透過させる方法 (Fig. 4の右図) にて行う²⁵⁾。この方法では、メンブランフィルターの孔径を順次小さくして目的の粒子径とする、マイルドな製造原理を利用してHbの変性も起こらず、有機溶剤や界面活性剤は一切使用しないクリーンな方法でもある。但し、フィルターの組合せやエクストルージョン時の圧力の最適化の他、温度、濃度、pH、イオン強度、脂質膜の成分や組成などの因子がヘモグロビン分子同士、二分子膜間、ヘモグロビンと二分子膜間の相互作用に影響を与えるので、これらを一一つダイヤル合わせの様にチューニングしてゆく作業には10年の歳月を要した。

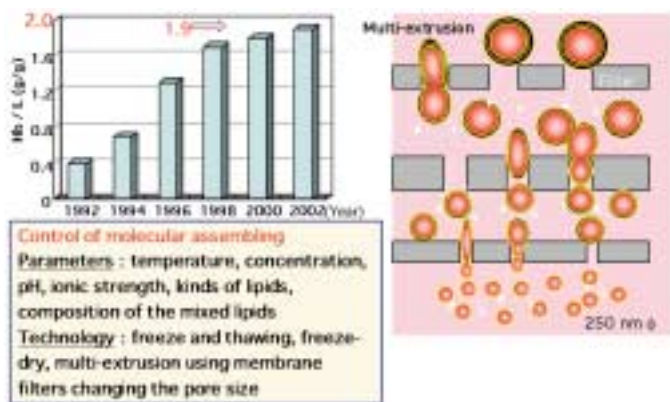


Fig. 4. Preparation of Hb-vesicles by controlling molecular assembling states by extrusion.

Fig. 4の棒グラフにある縦軸のHb/L比はHbVの性能を表す値であり、脂質重量当りのカプセル化Hb重量の比である。1992年当初は0.4程度であったが、2002年には1.9となり10年間で5倍近く増大した。尤もナノテクノロジーを応用すればこの値を更に向上させることは可能であると思われるが、工業化の現実を考えた場合には更に時間を要するであろう。

HbVの膜構成成分にも様々な工夫が凝らされており (Fig. 5.), 主成分はジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) とコレステロールである。この組合せは化学的にも物理的にも安定なリポソームの基本成分として良く用いられている。アシル鎖に不飽和基を持つオレオイル基などは化学的に不安定であるし、より短いミリスチル基では疎水性相互作用が弱く物理的に不安定な膜となり、より長いステアロイル基では膜が硬くなり過ぎてエクストルージョン法でのリポソーム調製には不向きである。コレステロールは、疎水性相互作用を高めて膜を安定にしDPPCの相転移温度 (41) 以下では膜流動性を高める効果を持っている。

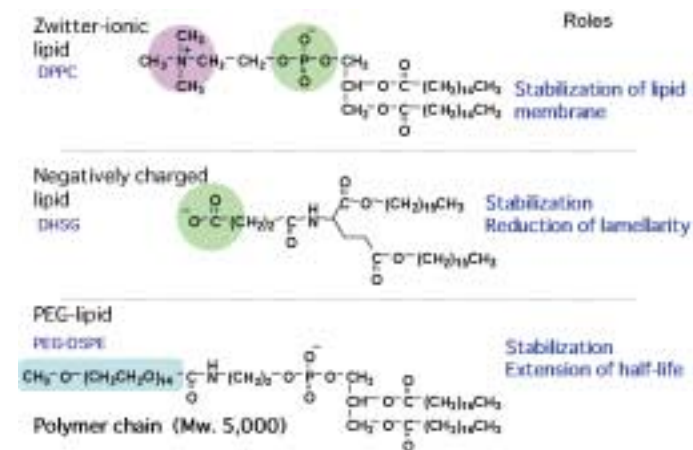


Fig. 5. Membrane components of HbV.

膜表面への負電荷脂質を導入は、二分子膜間の電荷反発による被覆層数の減少、およびリポソームの分散安定度の向上、血液適合性の向上のために必要である。更に、分散安定度や血液適合性、血中滞留性を向上させるために、ポリエチレングリコール鎖結合脂質を用いている。これらの安定化のための成分に関しては、以下に詳細に説明する。

Fig. 6は、2種類の負電荷脂質 (DHSG, DPPG) を同じ組成になるように導入したほぼ同じ粒子径のリポソーム分散液を血流量の10%相当分をラットに投与して、血液適合性の指標として補体活性CH50と血小板数を測定したデータである。負電荷脂質としては、HbVに使用されているDHSGとリポソームの膜成分として汎用されているDPPGを比較した。両方とも2本の長鎖が疎水部を構築しているが、DHSGは負電荷部位がカルボン酸基であり、DPPGはリン酸基である。補体価、血小板数ともにDPPG系の方が低下しており、DPPGリポソームが補体や血小板と相互作用してこれらを消費させていることが示唆さ

れている。他方、DHSG系では、補体価や血小板数には大きな変動は観測されなかった。HbVは、通常の静注用薬剤やリポソーム製剤の投与量と比較して桁違いの投与量が想定されるので、リポソーム膜自体にもより高い安全度が要求される訳であり、従来のリポソーム製剤で良しとされている膜成分組成でも、赤血球代替物では問題となる場合がある。我々も当初は負電荷成分としてDPPGを用いていたが、慶應義塾大学医学部医化学教室の末松 誠教授との共同研究においてラット微小循環動態を観測していたところ、血小板の異常に気が付き、愕然とした経験があった。そこで、直ぐに同評価系にて負電荷脂質の探索を行い、DHSGが絞り込まれた経緯がある。

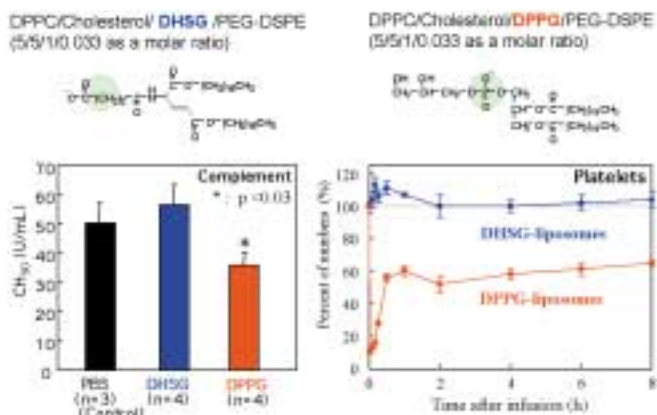


Fig. 6. Blood compatibility of negatively charged lipids(10% Top loading : rats)

ところで、HbVは分子集合体であるために二分子膜構成脂質は閉鎖系にあるリポソーム分散液中で二分子膜への集合と二分子膜からの解離との間の平衡状態となっている。その平衡は極端に二分子膜側に傾いているために、二分子膜構造は安定に保たれている。しかし、全ての構成成分が同じ平衡定数を持っている訳ではなく、各々の分子の親-疎水バランスによって異なっている。分子量約5000のPEG鎖が結合した脂質は親水部が大きいので、二分子膜構成成分と共集合している状態、遊離状態、

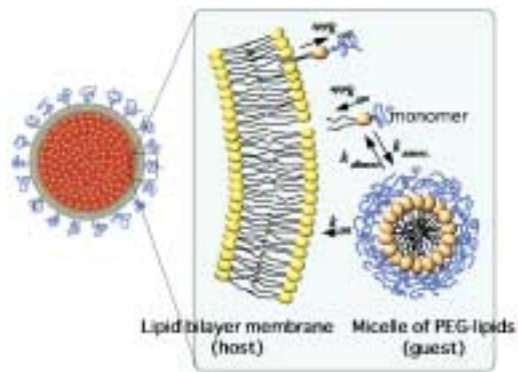


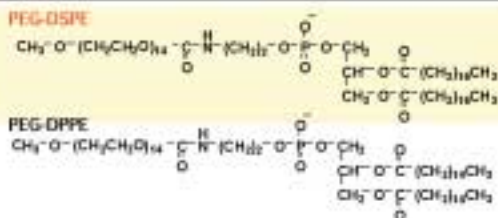
Fig. 7. Molecular dynamics of PEG-lipids in aq. dispersion with lipid vesicles.

遊離したPEG脂質がミセルとなっている状態との間で平衡を保っているものと考えられる (Fig. 7). このことは、リポソーム分散液にPEG脂質ミセルを添加すると、自発的にリポソームの表面にPEG脂質が導入される事実からも理解できるし、PEG脂質にて修飾されたりリポソームを希釈すると、一部のPEG脂質がリポソーム膜から遊離して別の平衡状態へとなる事実からも理解できる現象である。

そこで、アシル鎖炭素数が18で分子量約5000のPEG鎖が結合されたPEG-DSPEとアシル鎖炭素数が16で同じ分子量PEG鎖結合脂質をゲスト分子とし、ホスト側をDPPC単独リポソームやDSPC単独リポソームとし、そこに導入される見かけの速度係数 k_{on} と遊離の k_{off} 、平衡定数 k 、エンタルピーを H 、マイクロカロリーを用いて求めた (Table 1.)³⁾。また、リポソームの外側の膜に導入されるPEG脂質の最大導入量も求めて、同じ表で比較した。最大導入量や k_{on} は主としてPEG脂質の疎水部の長さで決まり、PEG-DPPEの方が大きかった。一方、 k_{off} は疎水部の長さの組合せが重要であった。すなわち、PEG脂質は、そのアシル鎖がホスト膜のアシル鎖よりも短いと遊離し易く、逆にホスト膜のアシル鎖よりも長いと遊離し難くなることが明らかとなった。

Table 1. Thermodynamic parameters of insertion of PEG-lipids into phospholipid membrane and dissociation.

PEG-lipids	membrane max ratio (mol%)	k_{on} ($s^{-1}M^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	$K \times 10^{-4}$ (M^{-1})	ΔH (kcal/mol)	
PEG-DPPE	DPPC	9.2	41.0	2.3	1.1	-16
	DSPC	8.9	42.8	1.5	1.7	-21
PEG-DSPE	DPPC	5.7	5.5	0.24	2.0	-13
	DSPC	5.6	5.5	0.057	7.1	-23



次にPEG脂質のPEG鎖の長さや導入量は、分散安定度の観点から検討した (Fig. 8). PEG修飾リポソーム製剤では、分子量2000のPEGと分子量5000のPEGが用いられている。リポソーム表面のPEG修飾は、リポソーム間やリポソームと血球との間の凝集を防ぐ目的や、血漿タンパク質の吸着によるオプソニ化を防ぎ血中滞留性を向上させる目的で行われている。しかし、血中投与量の極めて高い本製剤では、血中からの消失速度は細網内皮系への取込みよりも細網内皮系からのHbVの代謝速度が律速となっていると思われるので、凝集を防ぐ観点から検討した。すなわち、少量投与のリポソーム製剤では血中滞留性を高めるためにはリポソーム表面におけるPEG鎖密度は数モル%が必要であるものの、凝集を防ぐにはもっと少ないPEG鎖密度でも充分であると思われた。我々は、リポソームの凝集促進剤として水溶性高分子であるデキストランを用いた。土田英俊教授

は高分子コンプレックスの世界的権威であり研究室には30年以上もの蓄積があった。ポリアニオンやポリカチオンが形成するポリオンコンプレックスにはコンプレックス形成が起こる臨界分子量がある。そこで、分子量の異なるデキストランを用いて、リポソーム凝集を生成する臨界分子量を求めてみた (Fig. 8.)。臨界分子量が大きいほどリポソームはデキストランと凝集し難いことを示す。臨界分子量は、リポソームの表面状態を反映し、PEG鎖による表面修飾密度の増大に伴って大きくなり、ある修飾密度に到達すると一定値を示した。これは、PEG鎖修飾によってリポソームはデキストランと凝集し難くなり、ある修飾密度にてPEG鎖が表面を一様に覆うようになってデキストランとの相互作用が変化しなくなったものと考察している。興味深いことに、PEG5000と2000との比較では、5000の方がより少ないIPEG鎖修飾密度にてより凝集し難い表面を形成していることが分かる。以上の測定より、最小量のPEG修飾との観点から、HbVの表面修飾はPEG5000で0.3mol%とした。

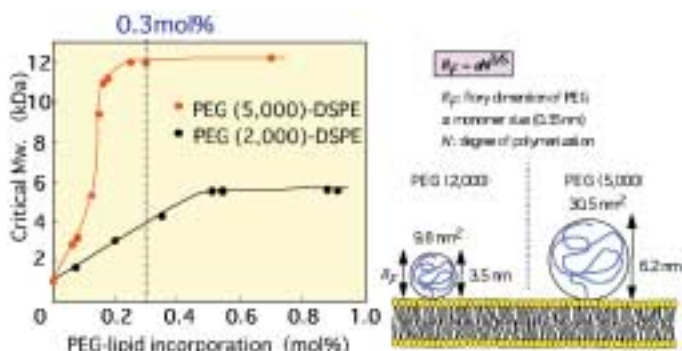


Fig. 8. Stabilization of the state of the vesicle dispersion by PEG modification.

HbVの保存安定度の検討であるが、この測定は企業としては当然行うべき試験であるが、大学で行うにはかなりの苦勞を伴った。まずは、冷凍保存が常識とされているリポソーム構成成分や冷蔵保存中に茶色に変色して変性するヘモグロビンから構成されるHbVは、当然冷蔵保存されるべきで、調製後できるだけ速やかに使用するのが常識であった。従って、2年間もの保存安定試験をすること自体が常識外れであった。また、測定者も装置も2年間同じで、条件や状態も揃えて測定しなければならなかった。Fig. 9の左図は、HbVを4、23、そして40の恒温槽にて2年間保存した結果である⁷⁾。8年程前のHbVであるので、現在のものとはスペックが異なる部分があるものの、濁度や粒子径、酸素親和度であるP₅₀値は4と23ではほとんど変化しなかった。さすがに40では12ヶ月後にP₅₀の値が変化した。この系ではpHが低下しHPLCによる膜成分の分析では、脂質の加水分解が起こっていた。メト化率の値は、保存中に内包チオール類により還元されて低下し、0%付近を推移していた。当初の予想を上回る高い安定度が得られた理由であるが、完全に窒素置換してデオキシ状態としたヘモグロビンは極めて安定な蛋白質であったこと、ヘモグロビン以外の不安定な

酵素類はほとんど除去されていること、リポソームを構成している飽和型リン脂質はリポソームの形態で水性媒体に分散している状態では化学的に安定であること、リポソーム表面をPEG鎖にて修飾しているために凝集や融合が抑制されていること、チオール類により最初数%あったメトHbも還元されて保持されていることが挙げられる。献血液では僅か3週間の冷蔵保存しか出来ないが、HbVでは、溶液状態のまま常温で2年以上保存ができるので、緊急時に開封してそのまま使用できる利点がある。

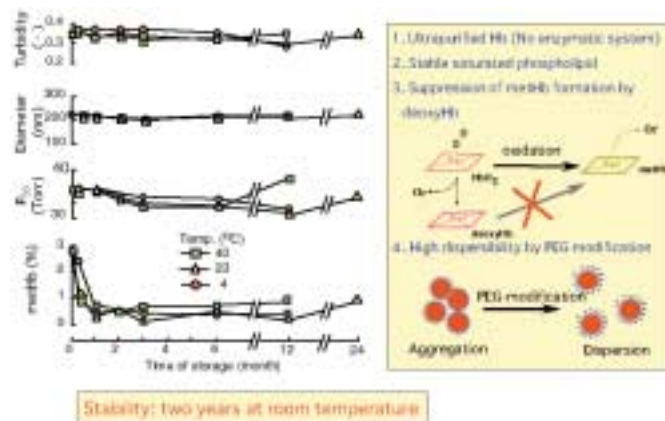


Fig. 9. Stabilization of HbV by PEG modification.

次にHbVのPEG修飾効果を血液適合性として評価したin vivo実験を紹介する。Fig. 10はUCSDのIntaglietta教授と早稲田大学理工総研の酒井宏水助教授が行った実験であり、ハムスターの血液の80%をHbVのアルブミン分散液で交換した時の皮下組織の微小循環動態の観測結果である。Fig. 10の左の写真はPEG修飾していないHbVであるが、細静脈や毛細血管のような流速の遅い部位では、赤血球と凝集してほとんど流れなくなっている状態である⁸⁾。右の写真は、PEG修飾しているHbVであるが、血管内に均一分散したHbVによって血管全体が灰色となり、所々に黒色の楕円体は希釈された赤血球である。この様に0.3mol%のPEG鎖修飾によって血流中での分散安定性が保てることが確認された。

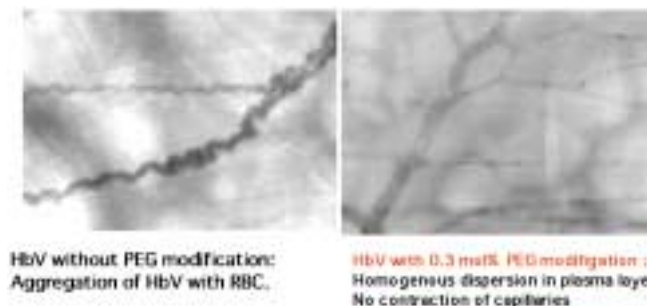


Fig. 10. PEG modification effect of HbV in hamster 80% exchange transfusion tests.

同じ実験で、パラジウムポルフィリンを担持させたアルブミンを血中投与し、測定したい箇所にレーザーフラッシュを照射して燐光寿命を測定することにより組織の酸素分圧を知ることができる。この結果をFig. 11.に示してある⁸⁾。赤いバーがPEG修飾したHbVをHb濃度換算で10g/dLとなるようにHSAに分散させた試料にて80%交換した場合であり、ピンクのバーがその半分の5 g/dLの試料にて交換した場合である。白いバーが交換試験を行う前の値であるので、赤いバーでは動脈系の酸素分圧は実験前の7割程度保持されていることが分かる。血中のHb濃度から考えても白、赤、ピンクのバーは妥当な結果である。しかし、青いバーはPEG修飾していないHbVの試料であるが、ほとんど酸素を運んでいないことが分かる。これはHbVの血液適合性が低い先の観測結果からも理解でき、やはりHbVにはPEG修飾が必要であることがわかる。

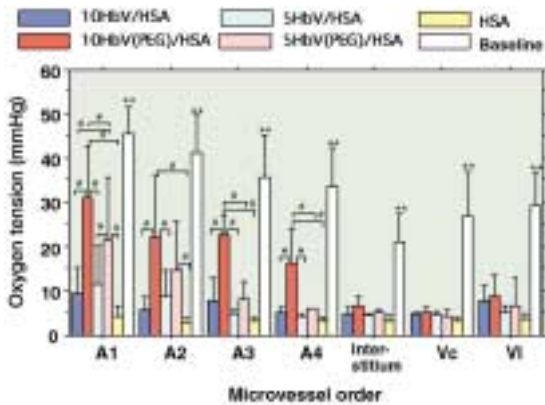


Fig. 11. Tissue oxygen tensions after 80% exchange transfusion with HbV/HSA.

投与したHbVの血中滞留時間は投与量に依存するが、血液量の25%に相当する試料（^{99m}Tcラベル化）をラットやラビットに投与したところ、その半減期はラットでは35時間、ラビットでは63時間であった（Fig. 12, UTSA Phillips博士と早稲田大学理工総研宗慶太郎助教授による⁹⁾）。ヒトでは3日間程度と見積もられる。従って、緊急時における輸血の代替物としての機能

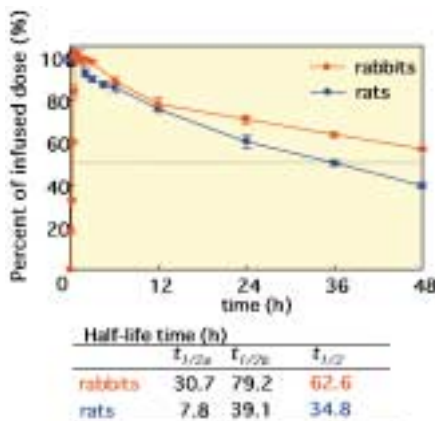


Fig. 12. Pharmacokinetics of HbV (25% top loaded : rabbits or rats)

は十分に果たすものと思われる。血中から消失したHbVは肝臓や脾臓などの細網内皮系に捕捉され、2週間程度で細網内皮系から消失することが組織学的に明らかにされている。また、血液学的、血液生化学的に現段階では特に問題は認められていない。

HbV中の酸素化したHbは、緩やかに酸化（メト化）されて中心鉄が2価から3価となり、酸素を結合する機能が失われる。チオール類がその還元剤として使用されるが、Hbや還元剤が自動酸化する際に発生する過酸化水素や生体内で発生する過酸化水素によって、Hbのメト化が促進される。メトHbのペルオキシダーゼ活性を利用してL-TyrとメトHbをHb小胞体中に封入させておくと、過酸化水素を速やかに消去してHbのメト化の進行を大幅に抑制できることを見出した（Fig. 13.）¹⁰⁾。勿論過酸化水素を消去するにはカタラーゼやペルオキシダーゼを用いれば良いのであるが、原料を考えるとHbV調製のために高純度に精製したヒトHbからmetHbを調製するのが最も簡単で安価と思われる。また、HbV中のHbのメト化を抑えるためにmetHbを利用するのは妙案ではないかと思っている。

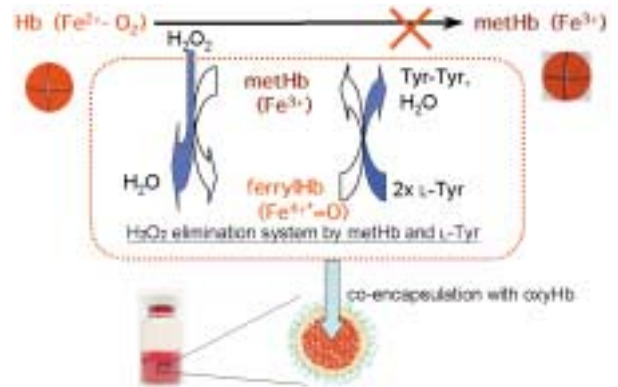


Fig. 13. HbV in 2nd generation; HbV stable against oxidation.

実際にその効果を見るためにHbV分散液に10分毎に過酸化水素の添加を繰返して行くと、HbVのメト化率は増加して行く。しかし、HbVにmetHbとL-Tyrを共封入させると、HbV中のHbの10%相当分をmetHbとし8.5mMのL-Tyrを共存させた系で

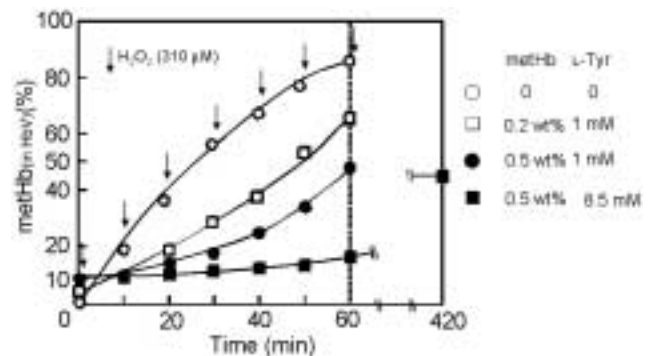


Fig. 14. Time course of metHb formation in HbV during the stepwise addition of H_2O_2 (310 μ M) to 5 wt% (775 mM) HbV dispersion at 37

は、過酸化水素によるメト化率の上昇は極めて効果的に抑制されたことから有効に過酸化水素を消去していることが分かる (Fig. 14.)⁹⁾. *in vivo*試験においてもカタラーゼを充分量内包させたHbVと同程度にメト化率の上昇を抑制しており、従来よりも大幅にHbVの機能を持続させることができると思われる。但し、metHbの保存安定性など製剤としての検討が済んでいないので、これは第2世代的な位置付けになると思われる。

2. 血小板代替物として認識部位を担持したナノ粒子 (アルブミン重合体, リン脂質小胞体)

話題を血小板代替物の開発に移す。この研究にも我々は分子集合科学を利用した物づくりの立場からの参画であり、1997年から開始された慶応義塾大学医学部教授池田康夫との共同体制(厚生科学研究補助金)にて進められたものである。血流が速い場合の一次止血の分子機構は、簡単にはFig. 15.に概説されている。出血部位にて血液が血管内皮下組織であるコラーゲンと接触する際、コラーゲンに特異的に結合して形態を変化させた血漿蛋白質のフォンビレブランド因子(VWF)に対して、血小板膜糖蛋白質であるGPIb が認識して血小板の接着とローリングが起こる。次にローリングによる刺激が血小板内シグナル伝達によってGPIa/IIaなどが活性化され、これが直接コラーゲンと結合して血小板が粘着する。同時に血小板膜のGPIIb/IIIaのコンフォメーションが折れ曲がった不活性型から伸びた活性型になると、これがフィブリノーゲンやVWFを介して血小板を架橋するので血小板の凝集が起こる。ここまでを一次凝集というが、我々はこれらのプロセスに参与する血小板膜蛋白質やフィブリノーゲンやその一部のペプチドを担持させた微粒子を用いて、血小板凝集の素過程を人工的に*in vitro*系にて再現させる共に、止血能の*in vivo*評価から止血機能を代替する微粒子系を検討してきた。

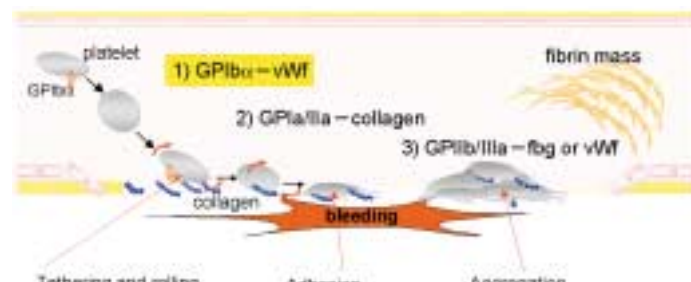


Fig. 15. Mechanism of primary hemostasis at the bleeding site by platelets.

認識部位を担持させる微粒子系には、PEG鎖にて表面修飾したヒト血清アルブミンの重合体とリン脂質小胞体(リポソーム)を血液適合性、生分解性、そして血中滞留性の観点から選択した (Fig. 16.)¹¹⁻¹⁶⁾. アルブミン重合体 (polyAlb) は、認識部位も含めて構成分子がすべて共有結合にて架橋されており、固形であるため傷口に対して充填効果が期待できる。他方、小胞体(リポソーム)は、膜構造を持つ分子集合系であるため充填効

果は左程期待できないものの、カプセル化、膜流動性や柔軟性、膜透過性などを利用した機能が期待できる。

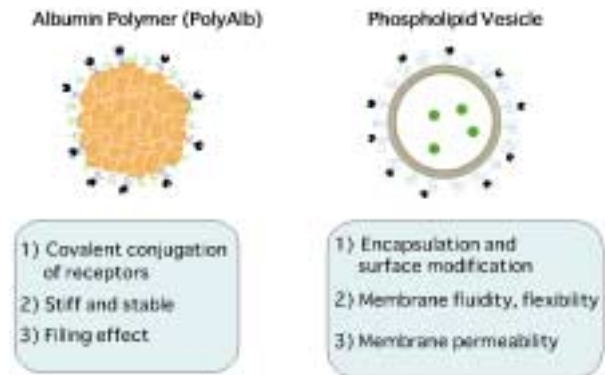


Fig. 16. Carriers (Blood compatibility, Biodegradability, Appropriate half-life) for platelet substitutes.

アルブミン重合体の調製方法をFig. 17.に簡単に示す¹¹⁾。遺伝子組換えヒト血清アルブミン水溶液のpHを10.65とすると、アルブミンはN体からB体へとコンフォメーションが変化し、分子内にある³⁴Cysのメルカプト基やジスルフィド基が露出する。80 にて加熱するとチオール・ジスルフィド交換反応によって分子内架橋が分子間架橋へと変化してオリゴマー体となる。溶液のpHを等電点近くまで下げるとオリゴマー体が凝集し、更に40 に保つと交換反応が緩やかに進行し、静置時間に応じて任意の粒子径に成長した微粒子が得られる。これは、正にアルブミン分子をモノマーに見立てた高分子の合成反応であった。更に片末端がスクシンイミド基でもう片末端がマレイミド基の分子量5000のPEG誘導体や片末端がスクシンイミド基でもう片末端がメチル基の分子量5000のPEG誘導体がある比率で表面に結合させ、そこにSPDPにてメルカプト基を導入した認識蛋白質、あるいは予め機能側とは逆側の末端にシステインを導入させた認識蛋白質の組換え体やペプチドを、アルブミン重合体表面のPEG鎖末端マレイミド基にチオエーテル結合させて導入した。

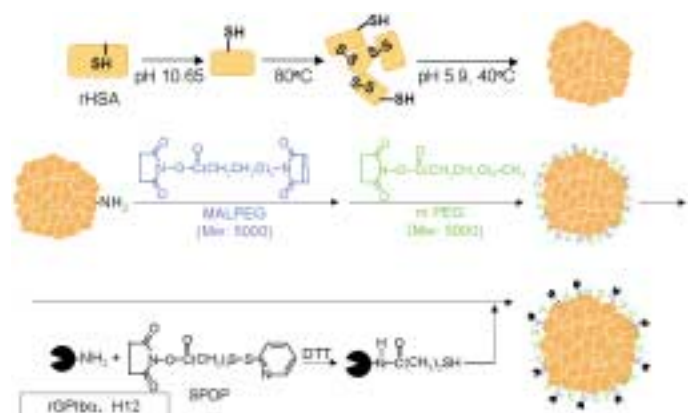


Fig. 17. Preparation scheme of polyAlb for platelet substitutes.

得られたアルブミン重合体の透過型電子顕微鏡写真をFig. 18.に示す.ヘミンをアルブミンに結合させて染色している.アルブミン重合体の形態は,硬い微粒子のイメージよりはアルブミンがフラクタル状に寄り集まった牡丹雪様であり,実際に流動している様子もその様であった.

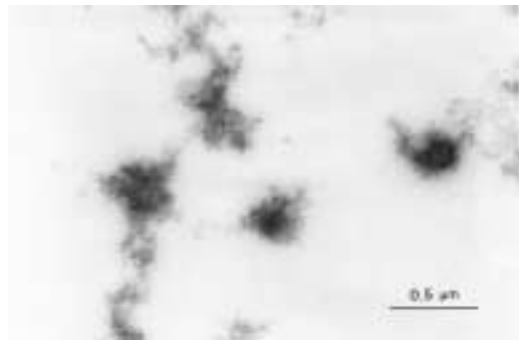


Fig. 18. TEM observation of polyAlb.

他方,リポソームの調製法をFig. 19.に示すが, DPPCとコレステロールを主成分とし,末端がマレイミド基の分子量5000のPEG脂質と末端がメチル基の分子量5000のPEG脂質を混合した脂質粉末を水和させて,エクストルージョン法にてリポソームを形成させ,表面のマレイミド基にpolyAlbの場合と同様に認識部位を結合させた血小板代替物を簡便に調製することができる.

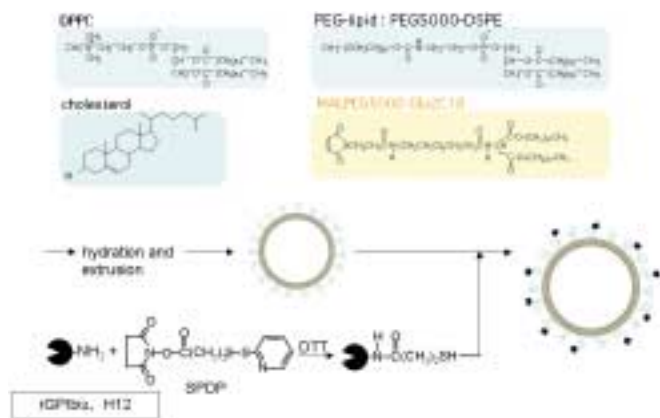


Fig. 19. Preparation scheme of vesicles for platelet substitutes.

認識部位をGPIIbとして表面を修飾したリポソームを透過型電子顕微鏡にて観察した(Fig. 20.)²⁾.左の写真がネガティブ染色したリポソームの写真であり,右の写真が抗GPIIb抗体を担持させた金コロイドにて染色した写真である.直径2~300nm程度の二分子膜リポソームとその表面に金コロイドが結合している様子からGPIIb結合リポソームであることが分かる.

蛍光標識したGPIIb微粒子をヘマトクリット50%の血小板を除去した再構成血液中に分散させ,これをVWF基板上にず

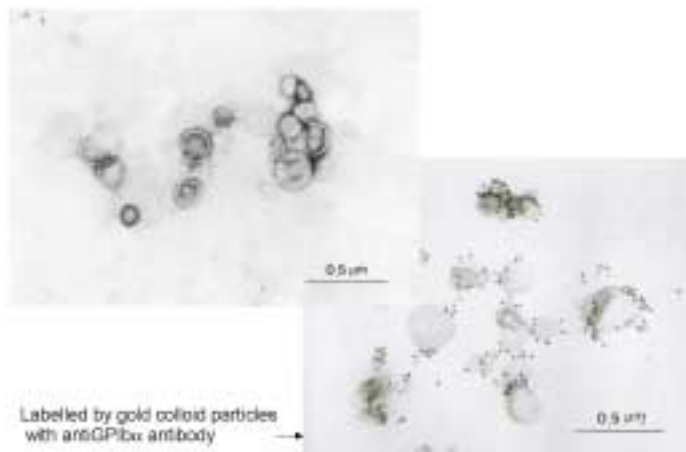


Fig. 20. TEM observation of GPIIb vesicles.

り速度 $2400s^{-1}$ にて流動させて,基板に対する挙動を蛍光顕微鏡にて観察した(Fig. 21.)²⁾.まず,蛍光標識した血小板にて再構成した血液に抗GPIIb/IIIa抗体を添加することによって,GPIIbとVWFだけの作用を観測した.血小板はVWF表面を同じ速度でローリングしている様子が観察された(講演では動画にて示す).他方,GPIIbリポソームでは,血小板と同じようにローリングの様子が観察された(講演では動画にて示す).しかし,速度は血小板ほど揃っておらず,時々脱着する様子も観察された.VWF基板を抗GPIIb抗体にて分析したところ,基板上にGPIIbのトレースとして残っており,ローリングしている間にリポソーム表面からGPIIb結合脂質が脱離してリポソームが脱着したと思われる.

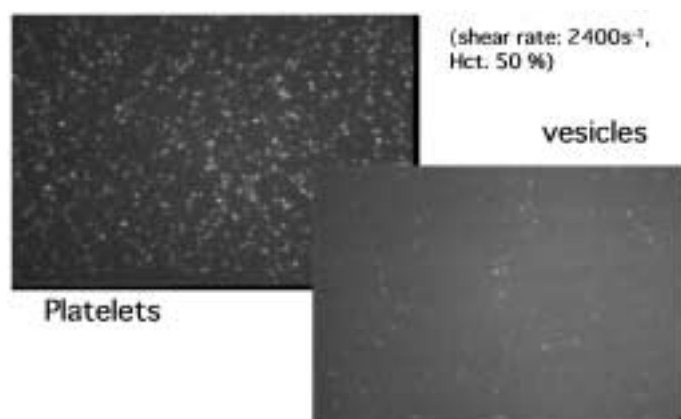


Fig. 21. Behaviors of platelets(antiGPIIb/IIIa antibody)and GPIIb vesicles on the vWf surface.

次に,GPIIb結合アルブミン重合体にて同様の観測を行ったところ,VWF基板上へのローリングは観察されず,粘着挙動のみが観察された(Fig. 22.)²⁾.牡丹雪状のアルブミン重合体が基板に衝突し潰れて広がるようなイメージであった.GPIIb結合ラテックスビーズでもオスミニウムにて血小板膜を固定した血小板でもローリング挙動ではなく粘着挙動が観測

されたことから、ローリング現象はGPIb の足場が流動性のある膜構造を持つリポソーム系に特有の現象であり、足場が重合固定されると粘着するものと考察された。

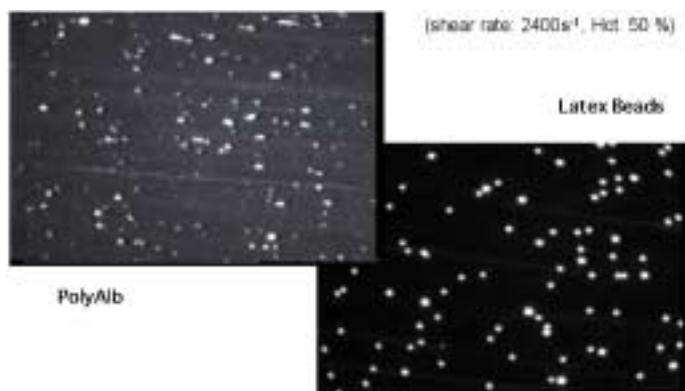


Fig. 22. Behaviors of GPIb -polyAlb and GPIb -latex beads on the vWF surface.

次に、血小板表面のGPIIb/IIIaが活性化するとフィブリノーゲンが結合して血小板間を架橋する現象を利用すれば、血小板凝集機能を持つ微粒子が構築できる。既に、フィブリノーゲンを担持させたアルブミンマイクロカプセルなどが報告されており¹⁷⁾、我々もフィブリノーゲンを結合させたアルブミン重合体を調製して、評価を行った。ところが、フィブリノーゲンは不安定な蛋白質であり、その機能は速やかに失活することがわかった¹³⁾。また、血液製剤であるフィブリノーゲンに原料を頼ることに疑問を感じたので、早速フィブリノーゲンの代替を検討した。フィブリノーゲン鎖のC末端から12番目までのシーケンスが活性化したGPIIb/IIIaを認識部位であることが明らかになっているので、このペプチド(H12)を大量合成し、これを微粒子の表面にPEG鎖を介して結合させて血小板凝集機能を持つ血小板代替物を検討した(Fig. 23.)⁸⁾。

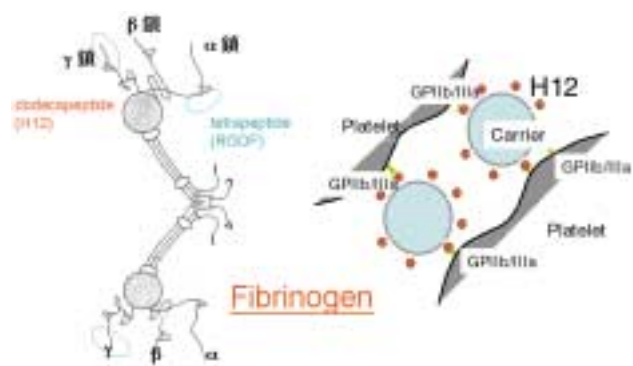


Fig. 23. Concept of H12-carriers for platelet substitutes.

先ずin vitro機能評価であるが、トロンピンによって活性化させた血小板への蛍光標識微粒子の結合性を解析した(Fig. 24.)。Poly-AlbもPEG-polyAlbも活性化血小板には結合しない

が、H12-PEG-polyAlbとH12-polyAlbは活性化血小板に結合し、抗GPIIb/IIIa抗体であるPAC-1によってこれが阻害されることが確認された。

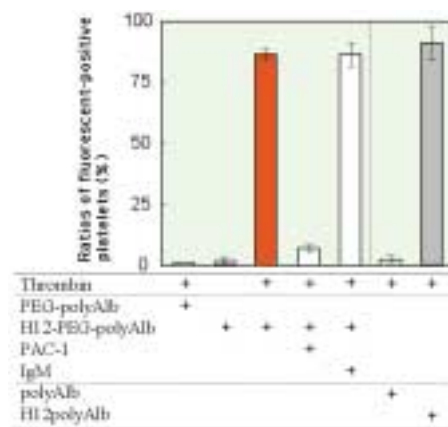


Fig. 24. Specific binding of H12-PEG-polyAlb to activated platelets.

in vivo評価では抗がん剤ブスルファンの投与によって作製した血小板減少症モデルラットを用いて、尻尾の先端から1cmの表面をクイックヒールにて切傷した後、生理食塩水に浸して出血が止まるまでの時間を測定した(Fig. 25.)⁸⁾。正常なラットの血小板数は80万/ μ L程度であるが、血小板減少症モデルラットでは20万/ μ L程度にまで減少しており、正常ラットの出血時間は 178 ± 56 秒であるのに対し、血小板減少症モデルラットでは 608 ± 56 秒まで延長した。次に、H12-polyAlbを1, 4, 10, 40mg/kg濃度で投与してから5分後に測定したところ、投与量依存的に出血時間が短縮された。しかし、投与3時間後では全く効果が無くなっていった。これよりpolyAlbの血中滞留時間が短いために効果の持続に課題があることが明らかとなった。

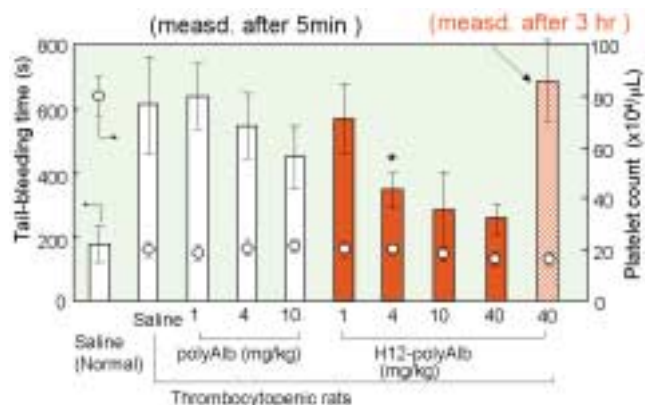


Fig. 25. Effects of H12-polyAlb on the tail-bleeding time of thrombocytopenic rats.

そこで、アルブミン重合体の表面をPEG鎖にて修飾し、その一部にH12を結合させたH12-PEG-polyAlbを用いて同様の実験を、今度は投与してから3時間後に行った。これをFig. 26.に示

すが，血中滞留性の向上により3時間後でも投与量依存的に出血時間を短縮させる効果が確認された¹⁸⁾．H12-PEG-polyAlbの血中滞留時間が3時間程度であることから，血中滞留性を増大させれば効果が持続することが分かり，更に粒子径や表面修飾状態などを工夫している．

Fig. 28.には今後の課題を簡単にまとめている．血小板代替

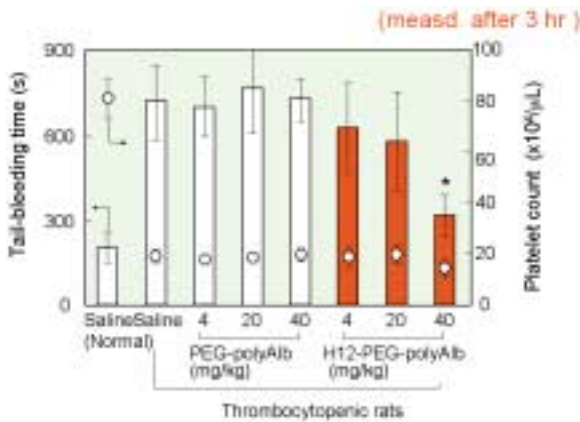


Fig. 26. Effects of H12-PEG-polyAlb on the tail-bleeding time of thrombocytopenic rats.

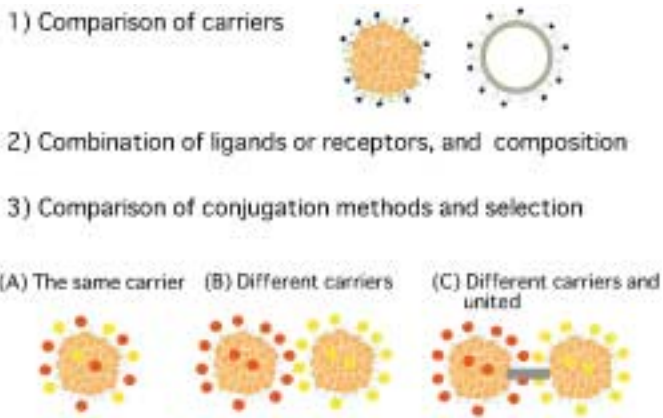


Fig. 27. Functionalized particles for platelet substitutes.

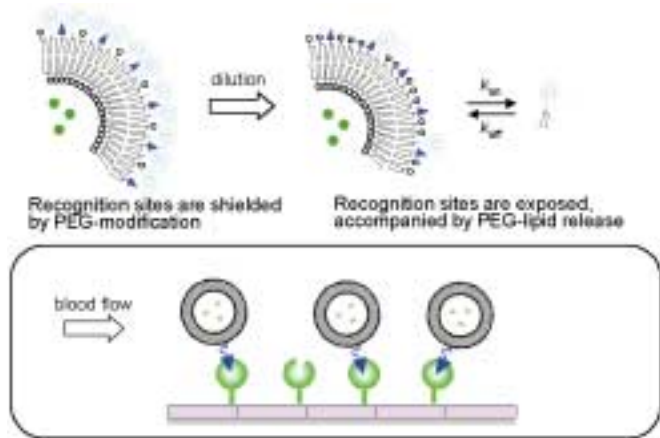


Fig. 28. Switching of molecular recognition of vesicles by dissociation of PEG-lipid.

物の担体としてアルブミン重合体とリポソームを用いてきたが，それらのどちらが適当であるのか．複数のリガンドやレセプターなどの認識分子を併用する場合には，一つの担体に付けるのか，別々の担体に付けるのか，それとも別々の担体に付けてそれを架橋させるのか．そしてそれらの組成や認識部位を結合させる方法も選択しなければならない．そのためには，短時間で効果の違いが明確に比較できるスクリーニングの方法も開発してゆく必要があると思われる．

3. 高機能性ナノ粒子の設計

さて，これまで述べてきた赤血球代替物や血小板代替物を構築する分子集合科学を利用して，現在分子集合状態が動的に変化するユニークな薬物運搬体を考えている．一つは，Fig. 28.に示した分子認識能を発現させる方法である．例えば，リポソーム表面にリガンド結合脂質を導入し，更にそれを覆う様にPEG結合脂質を導入しておく，PEG鎖によってリガンドが隠されてリポソーム自体は細胞表面のレセプターに認識されない．ところが，先に述べたように PEG脂質が膜に導入されている状態は平衡状態であるので，親-疎水性のバランスを極端に親水性側に偏らせたPEG結合脂質では，例えば系が希釈されるとPEG脂質が膜表面から脱離し，リガンドが露出してくる．例えば，この様なリポソームを血中投与すると，これは希釈と同様の現象が起こり，PEG修飾による血中滞留性を向上させる効果がなくなると共に特定の組織を認識する効果が発現することとなる．この時間は，正にPEG脂質の親-疎水バランスの制御によって調節できるものと考えられる．

次に考えているリポソームの動的変化は，脂質の化学的な構造変化によって親-疎水性バランスが変化するものであるが，特に2本足の脂質が一本足のリゾ体になることによって，この界面活性性によりリポソーム自体の膜構造の破壊や大きな乱れを引き起こすことを期待している．例えば，還元剤によって切断されるジスルフィド結合や，pHが酸性に傾くと加水分解され易いエステル結合を持つ脂質類を現在合成しており，還元応答性やpH応答性のリポソームが得られるようになってきている (Fig. 29.)．これらのリポソームは特に細胞内での還元性的

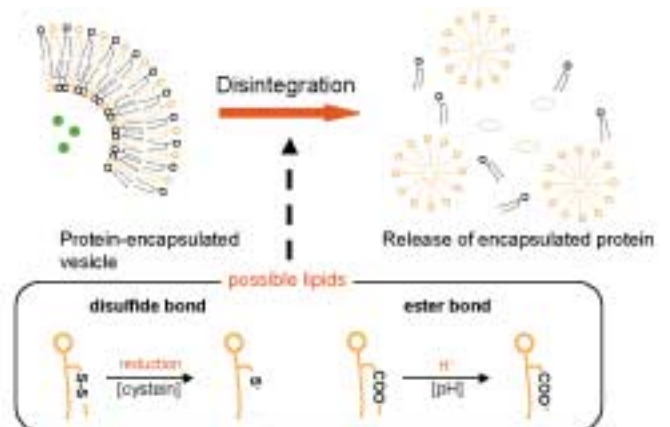


Fig. 29. Switching of release from vesicle by lysolipid formation.

雰囲気や低pH領域に応じて内包物を放出する様な細胞内薬物運搬をターゲットにしている。

付．アルブミン重合体の新展開

アルブミン重合体の方も新しい展開を模索しているので、現在の試みも簡単に紹介したい。早稲田大学はナノテクノロジーの拠点(分子ナノ工学研究拠点, 実践的ナノ化学教育研究拠点)を形成しているので、このインフラを積極的に活用して、任意の形状を持つアルブミンナノシートを構築する試みを考えている。Fig. 30.にはそのスキームを簡単に示しているが、シリコン基板の表面に疎水性の分子をカップリングさせて単分子膜を構築する。その上にスピコートによってレジスト膜を形成させ、フォトマスクを用いてレジストのパターンを作り、酸素プラズマエッチングにより疎水性のパターンを作った。この疎水性領域にメルカプト基にて修飾したアルブミンを単分子吸着させてジスルフィド架橋技術を利用すると、きれいに2次元架橋したアルブミンシート(膜厚約7nm)が形成できた。例えば、この表面にPEGを介してGPIb を結合させて、アルブミンシートを界面活性剤処理にて剥離させ、これをVWFを介してコラーゲン基板に吸着させると裏面が表面になるので、そこに例えばGPIIb/IIIaを結合させて再度剥離させると、片面がGPIb PEGにて修飾されて、もう片面がGPIIb/IIIaにて修飾されたナノシートの構築が期待できる。さらに表面のPEG鎖間の立体反発によってこのシートは湾曲するものと思われる。

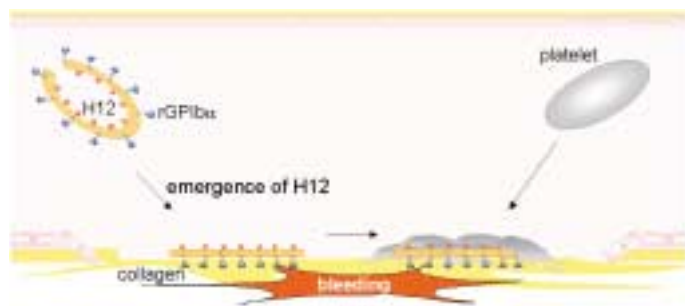


Fig. 31. Schematic image of albumin-sheets under flow conditions.

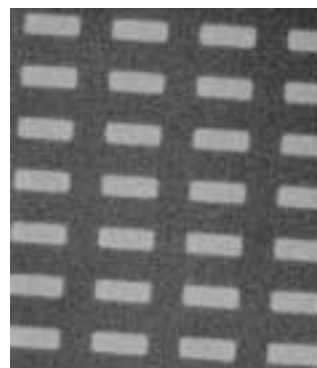


Fig. 32. Observation of rHSA-sheets using a fluorescent microscopy.

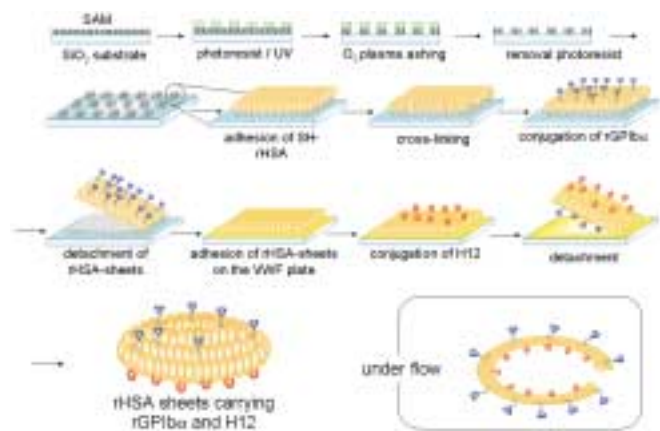


Fig. 30. Construction of albumin-sheets to the surface of patterned self-assembled monolayers)

血流中ではこのアルブミンシートは、GPIb が露出して GPIIb/IIIaの活性体が内側に隠されている様な、いわゆるジャンケンでのグーの様な形態で流動し、傷口でコラーゲンが露出している部分を認識すると、vWfを介してGPIb は結合してナノシートはグーの状態からパーの状態になってGPIIb/III側を露出する (Fig. 31.)。これが活性化した血小板をリクルートする様な機能を持てば、傷口を認識して血小板凝集を誘導するまでの過程を一つの担体で行わせることができる。また、シート状の形態は血小板代替物の形態としても興味深い。

まとめ

現在、赤血球代替物としてのHbVの製造技術は(株)オキシジェニクス・ニプロ(株)に移転され、数十リットルスケールでのGMP製造設備が出来ており、近い内に臨床試験に入ると予定と聞いている。また、血小板代替物の方もラビットを用いた安全性と効果に関する評価が進んでおり、赤血球代替物の開発に追隨して行くと思われる。また、これらの技術はリポソームを用いた新しい薬物運搬体やナノシートなどの展開へと広がってゆくものと思われる。しかし、これらの技術は臨床現場で使用されなければ意味を成さず、その実現には幾つもの厳しい評価をクリアしなければならない。もっと多くの関係者の関心と積極的な関与が必要であり、本日本血液代替物学会がその場となることを期待したい。

謝辞

本研究は、厚生労働省科学研究「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」、文部科学省科学研究費、早稲田大学21COE「実践ナノ化学」、SCOE「先端科学技術健康医療融合研究機構」によって行われた。また、以下の多くの先生方、学生諸君、企業のご協力によって行われた。記して謝意を表します。

(早大 理工) 名誉教授 土田英俊, 教授 西出宏之, 教授 酒井清孝, 教授 本間敬之, 助教授 小松晃之, 助教授 酒井宏水, 講師 宗 慶太郎, 助手 丹羽大介, 寺村裕治(京大), 岡村陽介(学振), 阿閉友保(博士課程), 小幡洋輔, 久保田恒

平, 前川一平 (修士課程) (慶大 医) 教授 小林紘一, 教授 池田康夫, 教授 末松 誠, 講師 堀之内宏久, 助教授 半田 誠, 教授, 四津良平, 教授 池田栄二, 講師 渡辺真純, 講師 泉 陽太郎, (北海道赤十字BC) 所長池田久實, 東 寛, 阿部 英樹, 藤原満博, (慶大 理工) 教授 谷下一夫, (東海大 医) 助教授 後藤信哉, (都臨床研) 鈴木英紀, (U.Penn) Prof. T. Yonetani, (UCSD) Prof. M. Intaglietta, (UTSA) Prof. W. Phillips, (Berlin F.Univ) Prof. Y. Fhurhop, (企業) 日本赤十字社, オキシジェニクス, ニプロ, 三菱ウエルファーマ, 東レ, 日本油脂, 日本精化, 関東化学, 日本ミリポア, バイオアクセラレーター, 化血研, 日本製薬

REFERENCES

1. Ohno H, Takeoka S, Tsuchida E. Skeletonized Hybrid Liposomes. *Polymer Bull* 1985;14:487-90.
2. Takeoka S, Terase K, Yokohama H et al. Interaction between phospholipid assembly and globin proteins. *J Macromol Sci* 1994;A31:97-108.
3. Takeoka S, Ohgushi T, Terase K et al. Layer-controlled hemoglobin vesicles by interaction of hemoglobin with a phospholipid assembly. *Langmuir* 1996;12:1775-79.
4. Sakai H, Hamada K, Takeoka S et al. Physical properties of hemoglobin vesicles as red cell substitutes. *Biotechnol Prog* 1996;12:119-25.
5. Sou K, Naito Y, Endo T et al. Effective encapsulation of proteins into size-controlled phospholipid vesicles using freeze-thawing and extrusion. *Biotechnol Prog* 2003;19:1547-52.
6. Sou K, Endo T, Takeoka S et al. Poly(ethylene glycol) modification of the phospholipid vesicles by using the spontaneous incorporation of poly(ethylene glycol)lipid into the vesicles. *Bioconjugate Chem* 2000;11:372-9.
7. Sakai H, Tomiyama K, Sou K et al. Poly(ethylene glycol) conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. 2000;11:425-32.
8. Sakai H, Tsai AG, Kerger H et al. Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with a red cell substitutes consisting of polyethylene glycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J Biomed Mater Res* 1998;40:66-78.
9. Sou K, Klipper R, Goins B et al. Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitutes. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:702-9.
10. Atoji T, Aihara M, Tsuchida E et al. Bioconjugate Chem 2006;submitted.
11. Takeoka S, Teramura Y, Ohkawa H et al. Conjugation of von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib to size-controlled albumin microspheres. *Biomacromolecules* 2000;1:290-5.
12. Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y et al. Rolling properties of rGPIb -conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibilities on vWf surface under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:765-70.
13. Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y et al. Fibrinogen-conjugated albumin polymers and their interaction with platelets under flow conditions. *Biomacromolecules* 2001;2:1192-7.
14. Takeoka S, Okamura Y, Teramura Y et al. Fibrinogen - chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:773-9.
15. Okamura Y, Takeoka S, Teramura Y et al. Hemostatic Effects of Fibrinogen- Chain Dodecapeptide-Conjugated Polymerized Albumin Particles in vitro and in vivo. *Transfusion* 2005;45:1221-8.
16. Okamura Y, Maekawa I, Teramura Y et al. Hemostatic effects of phospholipid vesicles carrying fibrinogen- chain dodecapeptide in vitro and in vivo. *Bioconjugate Chem* 2005;16:1589-96.
17. Levi M, Friderich P, Ten CW et al. Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat Med* 1999;5:107-11.
18. Okamura Y, Fujie T, Maruyama H et al. Prolongation Effects of Hemostatic Ability of Poly(ethylene glycol) Modified Polymerized Albumin Particles Carrying Fibrinogen- Chain Dodecapeptide *Transfusion* 2006; to be submitted.

ヘモグロビン精製工程におけるS/D処理を用いたウイルス不活化

Virus Inactivation by Solvent/Detergent Treatment in Hemoglobin Purification Process

小島潤也, 木村哲寛, 後藤 博, 上田 努, 筒井洋治, 岡本 武, 稲葉勝利, 金田伸一, 緒方嘉貴

Junya Kojima, Tetsuhiro Kimura, Hiroshi Goto, Tsutomu Ueda, Youji Tsutsui, Takeshi Okamoto,

Katsutoshi Inaba, Shinichi Kaneda, Yoshitaka Ogata

和文抄録

ナノカプセル型人工酸素運搬体 (TRM-645) の製造工程に, 原料ヘモグロビンに由来するウイルスに対する安全性向上を目指し, ウイルスクリアランス工程として, 異なる2つのウイルス不活化及び除去工程を導入するべく検討を進めてきた. TRM-645の原料として用いられる濃厚赤血球製剤は, 日本赤十字社「赤血球M・A・P」製剤のうち採血後21日間を超えて期限切れとなった製剤を用いている. 現在, 濃厚赤血球製剤のウイルスに対する安全性は, 向上しているものの, 未知ウイルスやウインドウピリオドなどの問題から, 未だ完全な安全性が保証されているという訳ではない. これまでの検討から, TRM-645のウイルスに対する安全性をより向上するため, フィルターによるウイルス除去に加えてウイルス不活化工程として, 既に血液製剤に対するウイルス不活化法として実績のある, Solvent/Detergent (S/D) 処理が, 原料ヘモグロビンの精製工程におけるウイルス不活化処理として有用であると考え, 導入を図った. S/D処理によるウイルス不活化効果は, Human parainfluenza virus 2及びHuman herpesvirus 1を用いたモデルウイルスを用いたスパイク試験にて評価した. tri (n-butyl) phosphate (TNBP) 0.3 wt% / TritonX-100 0.2 wt% を用いて洗浄赤血球を直接S/D処理することにより, 処理時間30分以内で6 log以上のリダクションファクターを得ることが出来た. S/D処理後, 精製したヘモグロビンは, 等電点電気泳動法 (IEF), 及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) による二次元電気泳動で, S/D処理を行なわなかったヘモグロビンと同一の泳動パターンを示すことを確認した. また, TRM-645の酸素運搬機能に影響する原料ヘモグロビン中のメトヘモグロビン生成は, 4時間のS/D処理においても1%未満であった.

Abstract

We have concentrated to develop TRM-645, as an artificial oxygen nano carrier, production method to insure safe of hemoglobin as a raw material against viruses. So we examined to introduce two effective steps for removal/inactivation of viruses to hemoglobin purification process. The hemoglobin as a raw material for TRM-645 is prepared from outdated human red cell "M・A・P" over 21 day's preservation. "M・A・P" is supplied by Japanese Red Cross Society. This product is sufficiently assured by this society, but not adopted thoroughgoing measures for yet undetermined virus and window period. We introduce Solvent/Detergent treatment to hemoglobin purification process in addition to nano filtration process as inactivation process applied to enveloped viruses. Human parainfluenza virus 2 and human herpesvirus 1 were used as model viruses in the spike test. S/D treatment was carried out using 0.3wt% tri(n-butyl) phosphate (TNBP) and 0.2 wt% TritonX-100 with rinsed red cells. In this case, reduction factor was reached more than 6 log within 30 minutes processing time. Furthermore we have confirmed that S/D treatment showed no noticeable effect on the quality of hemoglobin by electrophoresis. The percentage of methemoglobin that effect on the oxygen carrier function was less than 1% in 4 hours S/D treatment.

Keywords

Solvent/Detergent treatment, virus inactivation, hemoglobin, enveloped virus

1. はじめに

TRM-645は、濃厚赤血球製剤由来の精製ヘモグロビンを原料とするため、ウイルスに対する安全性の観点から、その製造工程に積極的なウイルス不活化・除去工程を組み込まなければならぬ。厚生労働省医薬審第1047号「血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドラインについて」では、血漿分画製剤の製造工程の設計には、ウイルスに対する安全性を高めるため、2つ以上の異なる方法を導入することが望ましいとされている。そこで我々は、フィルターによるウイルス除去工程に加えて、ウイルス不活化工程としてS/D (solvent/Detergent) 処理工程を導入することとした。

S/D処理^{1,5)}は、血漿製剤²⁾や血液凝固第 因子³⁾の製造工程に既に導入され、実用化されており、さらに他のヒト血液由来タンパク製剤へも利用され、その効果と安全性が広く確認されている⁵⁾。S/D処理は不活化方法としては、A型肝炎ウイルス、ヒトパルボウイルスB19等のノンエンベロープウイルスに対しては効果を示さないものの、他の肝炎ウイルスやHIVのようなエンベロープウイルスに対して、高い効果を示す⁴⁾。

既に実用化されている血漿分画製剤で用いられている処理方法では、ある程度精製された蛋白質に対してS/D処理液を加えて不活化する方法がよく知られている。同様の方法でヘモグロビンのS/D処理を行なう場合には、赤血球を溶血させた後、溶血液から赤血球膜成分を取り除いた粗精製ヘモグロビンにS/D処理を実施する方法が考えられる。しかし本報では、より簡潔な処理工程を採用することを目的として、S/D処理を、赤血球溶血及びウイルス不活化とを同時に行う単一工程とする検討を行った。

単一工程とする場合には、赤血球由来の脂質膜成分がヘモグロビン中に多量に存在するため、S/D処理によるウイルス不活化効果の低下が懸念される。そこで、赤血球膜成分存在下、及び非存在下(ヘモグロビン溶液)におけるS/D処理による不活化効果を比較検討した。次に、界面活性剤の種類、濃度、S/D処理時間がウイルスクリアランス指数(リダクションファクター)に及ぼす影響について詳細に検討した。さらに、S/D処理がヘモグロビンへ及ぼす影響について調べるため、等電点電気泳動法(IEF)、及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE)による二次元電気泳動とメトヘモグロビン含量測定を行い、ヘモグロビン性状を検討した。

2. 方法

2.1 S/D溶液調製

S/D溶液は40mM炭酸水素ナトリウムにて、S/D溶液と洗浄赤血球液を混合する各濃度の2倍溶液を調製した。界面活性剤はTween80(ポリソルベート80)、HCO60(ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60)、TritonX-100(ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル)を用い、0.1 wt%、0.2 wt%、0.4 wt%、0.8 wt%、2 wt%とし、有機溶媒はTNBP(tr(n-butyl)phosphate)を使用し、それぞれ0.6 wt% になるように調製した。

2.2 洗浄赤血球液調製

赤血球M・A・P「日赤」製剤(期限切れ/400mL由来)2バック分を遠心容器(2L)に入れ、約3倍容量の生理食塩水を加えた。緩やかに遠心容器を上下反転させ混合した後に遠心処理(2360g, 12分間)し、上清を除去した。この操作を3回繰返し洗浄赤血球液を得た。

2.3 ストローマ除去ヘモグロビン溶液調製

洗浄赤血球液65gを、20mM炭酸水素ナトリウム溶液240gに懸濁させ溶血した。懸濁した溶液は、14300gで30分遠心し、上清のヘモグロビン溶液を分離し、ストローマ除去ヘモグロビン溶液を得た。

2.4 S/D処理

ヘモグロビン溶液あるいは洗浄赤血球液0.4mlに、ウイルス溶液を0.1ml添加し、十分混合した後、S/D溶液0.5mlを混合(S/D処理溶液)した。S/D処理溶液調製後、速やかに凍結保存(-80℃)し、これを処理時間0時間とした。他の試験溶液は所定温度で、ローテーターを用い転倒混和しながら、それぞれ所定時間(0.5, 1, 2, 12時間)インキュベートした後、速やかに凍結保存(-80℃)した。添加ウイルスとして、厚生労働省医薬審第329号に例示されているモデルウイルスである、Human parainfluenza virus 2(パラミクソウイルス科パラミクソウイルス属、ウイルス核酸:RNA, エンベロープ有り, 抵抗性:低), あるいはHuman herpesvirus 1(ヘルペスウイルス科ヘルペスウイルス属、ウイルス核酸:DNA, エンベロープ有り, 抵抗性:中)を用いた。尚、本論文におけるウイルススパイクテストは株式会社エスアールエルに試験委託し、実施した。

2.5 ヘモグロビンの精製

S/D処理した溶液50Lを、湿潤した合成吸着樹脂(アンバーライトXAD16HP)10Lに4時間循環し、次に、限外ろ過膜クロスフロー(ザルトコンカセット分画分子量100K ザルトリウス)を用い、20mM重炭酸溶液20Lで5回の加水濃縮を繰り返し処理し、150Lの溶液を回収した。

2.6 モデルウイルスによる細胞感染価

12ウェル培養プレート(以下、培養プレートと略す)に、培養細胞を播種し、炭酸ガス培養器(37℃, 5%CO₂分圧)にて培養した。2日後、試験溶液を細胞培養液で100倍希釈し、更に10倍階段希釈を作製した。培養プレートの各ウェルから培養液除去後、試験毎に10倍階段希釈した各液を0.05ml/ウェルずつ、3ウェルに滴下した。培養開始翌日から4日後まで、各ウェルにおけるCPE(細胞変性効果)の有無を倒立顕微鏡にて観察した。観察結果より、Reed-Muench法にて感染価(TCID₅₀)を算出した。培養細胞として、アフリカミドリザル腎組織由来Veroまたはアカゲザル由来腎組織由来LLA-MK2を用いた。

Table 1. Virus inactivation by S/D treatment with washed red cells and hemoglobin.

Virus	sample	Log10 TCID50/ml-sample		RF*
		control	sample	
human parainfluenza virus 2	Washed Red Cells	7.2	3.0	4.2
	stroma free hemoglobin	8.0	3.0	5.0
human herpesvirus 1	Washed Red Cells	7.8	3.0	4.8
	stroma free hemoglobin	8.0	3.0	5.0

RF*: Virus Reduction factor

Processing: 8.5 ± 0.2 /12h

Detergent(TritonX-100):0.2wt%, Solvent(TNBP):0.3wt%

感染価算出は次の方法に従った。

- 1) CPE陽性となったウェル数を高希釈側から積算し、各希釈に累積陽性率(%)を求めた。
- 2) 累積陽性率50%を挟んで、高希釈側の累積陽性率をA、低希釈側の累積陽性率をBとした。
- 3) 以下の式により、ウイルス感染価を求めた。

$$\text{ウイルス感染価} : N = 10^{(B-50) \div (B-A)}$$

2.7 ウイルスクリアランス指数

ウイルス毎に、未処理試料の感染価(N_A)の常用対数から、S/D処理試料の感染価(N_B)を減じ、ウイルススクリアランス指数(リダクションファクター: RF)を求めた。

$$\text{ウイルススクリアランス指数(RF)} = \log_{10} N_A - \log_{10} N_B$$

2.8 ヘモグロビンのメト化率

試料を13800g, 15分, 4 で遠心し、脂質膜成分を沈殿させ、上澄みをフェリシアン-シアンメト法により、紫外可視吸光度法により、メト化率を算出した。メト化率測定は次のように行った。

20mMリン酸緩衝液(pH7.2), 6.2mlを試験管に採り、これにS/D処理後ヘモグロビン溶液を0.06mL加え、攪拌し、試料溶液とした。この試料溶液3mLを2個のセルに量り、試料溶液A及び試料溶液Bとした。

試料溶液Aの波長630nmにおける吸光度 A_1 を測定した。吸光度 A_1 測定後、シアン化カリウム溶液0.04mlを加えセル内で攪拌し、2分間放置後、波長630nmにおける吸光度 A_2 を測定した。試料溶液Bにヘキサシアノ鉄()カリウム0.04mlを加えセル内で攪拌し、3分間放置後、同様に波長630nmにおける吸光度 B_1 を測定した。吸光度 B_1 測定後シアン化カリウム溶液0.04mlを加えセル内で攪拌し、2分間放置後、波長630nmにおける吸光度 B_2 を測定し、次式に従いメト化率を算出した。

$$\text{メト化率(\%)} = (A_1 - A_2) \div (B_1 - B_2) \times 100$$

2.8 S/D処理ヘモグロビンの二次元電気泳動

ヘモグロビン濃度を10mg/mlに調製したS/D処理前後の精製ヘモグロビン溶液を等電点電気泳動用緩衝液(pI 3-10)で、膨潤させた分離ゲルに50μl添加した。一次元目の分離は、等電点電気泳動法(IEF)を行った。続いて二次元目として、分子量により蛋白質を分離するSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE 8-18%グラジエントゲル)を行った。二次元的に分離された蛋白質成分を、銀染色にて検出し、S/D処理した精製ヘモグロビンとS/D処理しない精製ヘモグロビンの二次元電気泳動像を比較した。

3. 実験結果

3.1 S/D処理における赤血球膜成分の影響

洗浄赤血球液をS/D処理した際に、赤血球が溶血していることを、血球分析装置により赤血球画分がみられないことから確認した。またヘモグロビン溶液及び洗浄赤血球液を処理した場合の感染価測定では、いずれの場合も感染価が3以下となり、RF4以上であることが分かった。実験条件によるRFの差異は検体への添加ウイルス感染価の差異であり、この結果からは、ノンエンベロープウイルスHuman parainfluenza virus 2(抵抗性 低)とHuman herpesvirus 1(抵抗性 中)において、S/D処理における赤血球膜成分の存在が及ぼす影響が小さいことが示唆された。

3.2 各種界面活性剤のウイルス不活化効果

各種界面活性剤のウイルス不活化効果を評価するために、有機溶媒としてTNBP 0.3 wt%, 界面活性剤としてTween80, HCO60, TritonX-100それぞれ 1 wt% を添加し、S/D処理2時間におけるリダクションファクターをウイルス感染価から算出した。いずれの界面活性剤を用いた場合でもRF6.2以上であり、界面活性剤の違いによる不活化効果に違いがないことが示唆された。

Table 2. Virus inactivation by varieties of detergent.

	Tween80	HCO60	TritonX-100
RF	6.2	6.2	6.2

Processing: 8 ~ 9 /2h

Virus: human herpesvirus 1

Detergent: 1.0WT%, Solvent(TNBP): 0.3wt%

Table 4. Reduction factor of lower concentration of TritonX-100 on virus inactivation.

Time (hr)	TritonX-100 concentration (wt%)		
	0.05	0.1	0.2
0*	4.4	5.0	6.2
0.5	3.4	5.0	6.2

Solvent(TNBP) concentration: 0.3wt%

Virus: human herpesvirus 1

Processing: 8-9

*0 hour signify freezing preservation at starting S/D treatment

Table 3. Reduction factor of various detergents and treating time on virus inactivation.

A) 0.2wt% concentration of detergents

Time (hr)	detergent		
	Tween80	HCO-60	TritonX-100
0.5	6.2	6.2	6.2
1	6.2	6.2	6.2
2	6.0	6.2	6.2

Solvent(TNBP) concentration: 0.3wt%

Virus: human herpesvirus 1

Processing: 8-9

B) 1.0wt% concentration of detergents

Time (hr)	detergent		
	Tween80	HCO-60	TritonX-100
0.5	6.2	6.0	6.2
1	6.2	6.0	6.2
2	6.0	6.2	6.2

Solvent(TNBP) concentration: 0.3wt%

Virus: human herpesvirus 1

Processing: 8-9

Table 5. Extant S/D in hemoglobin purification processes.

	extant amount(mg/g)		percentage of extant	
	TNBP	TritonX-100	TNBP	TritonX-100
S/D treatment	2.605	1.958	100	100
polymeric adsorbent chromatography	6.9×10^{-3}	5.4×10^{-3}	0.26	0.28
100kD cross-flow filtration	1.86×10^{-3}	N.D.	0.07	N.D.

Polymeric adsorption chromatography process was carried out for 4 hours.

Processing temperature; 7-10

3.3 界面活性剤の濃度 ,及びS/D処理時間とウイルス不活化効果

Table 3. 4.では各種界面活性剤の濃度とS/D処理時間がリダクションファクターに及ぼす影響について示した。Table 3.では、界面活性剤としてTween80, HCO60, TritonX-100を用い、それぞれの界面活性剤濃度を A) 0.2 wt% と B) 1.0 wt% とし、S/D処理時間を0.5 ~ 2 時間とした場合の不活化効果を、リダクションファクターで示した。いずれの界面活性剤を用いた場合でも、濃度0.2 wt%, 1 wt%の添加条件において、0.5時間以上の処理時間で、RF6.2以上となった。Table 4.ではTable 3.の条件に比べ、より低濃度の界面活性剤濃度(0.05 wt%, 0.1 wt%, 0.2 wt%)における、リダクションファクターを示した。その結果、界面活性剤濃度が0.2 wt%では、SD処理開始直後からRF6以上を得られるが、界面活性剤濃度が低い0.05 wt%、及

び0.1 wt%では0.5時間以内ではRF6以上を得られなかった。

3.4 S/D処理したヘモグロビン溶液特性

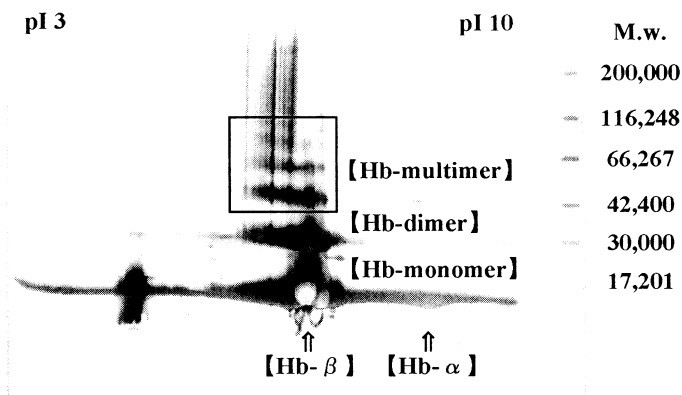
3.4.1 ヘモグロビン精製工程におけるS/D除去性能

Table 5.には、S/D処理ウイルス不活化工程後の、合成吸着樹脂(アンバーライトXAD16HP)を用いたS/D成分である、TritonX-100及びTNBP吸着除去、及び分画分子量100KDの限外ろ過膜(100K膜)によりヘモグロビン精製した後のS/D成分除去の結果を示した。合成吸着樹脂によるS/D吸着除去により、TNBPの残存率0.26%、TritonX-100の残存率0.28%まで除去され、さらに100KD限外ろ過によりTNBPの残存率 0.07%、TritonX-100は検出限界以下となり、いずれのS/D成分も99%以上が除去された。

3.4.2 ヘモグロビンに与える影響

Fig. 1.はS/D処理後精製したヘモグロビンとS/D未処理の精製ヘモグロビンについて、IEF及びSDS-PAGEによる二次元電気泳動像を示した。S/D処理の有無に関わらず、どちらもヘモグロビン由来のmonomer, dimer, multimerが確認され^{6,7)}、同一の電気泳動パターンが得られた。

I SD (-)



II SD (+)

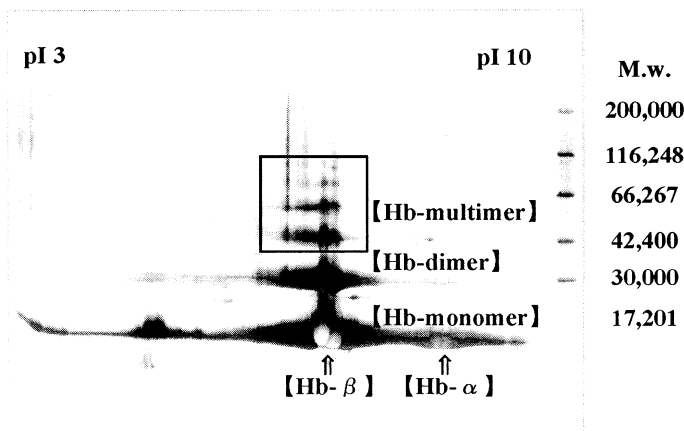


Fig. 1. Comparison of horizontal two dimensional electrophoresis image of the purification hemoglobin before and after S/D treatment. Purification hemoglobin were separated on isoelectric focusing [IEF] by immobilized pH 3-10 gradients [IPG] linear gradient 8-18%T SDS-PAGE and stained with silver-staining method.

3.5 メト化率の測定

Fig. 2.は洗浄赤血球液のS/D処理時間と、メト化率の関係を示したものである(処理温度15)。洗浄赤血球液のヘモグロビンのメト化率(0時間)0.58%に対し、S/D処理4時間までのメト化率は1%以下であり、処理によりメト化進行はほとんど認められなかった。

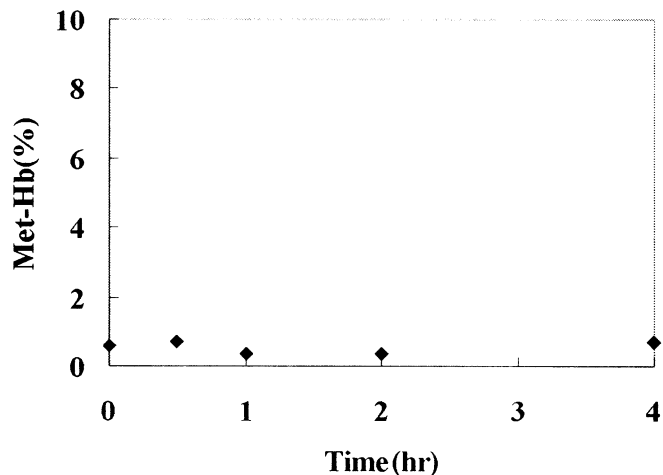


Fig. 2. Change in percentage of methemoglobin on treatment with TNBP 0.3% and TritonX-100 0.2%.

4. 考察

洗浄赤血球液を直接S/D不活化処理した場合でも、ヘモグロビン溶液をS/D不活化処理した場合と同様に、RF4以上のウイルス不活化効果を示すことが確認された。したがって、赤血球膜成分及びヘモグロビンそのものがウイルス不活化を阻害することはないと考えられ、赤血球存在下でも、ヘモグロビンのS/D法によるウイルス不活化が有用であることが確認された(Table 1.)。

B.Horowitzらは、有機溶媒、界面活性剤の種類や濃度の組み合わせが、不活化効果に大きな影響を及ぼし、また有機溶媒、界面活性剤を単独で用いた場合には不活化効果が非常に低いか、あるいは全てのエンベロープウイルスを不活化することができないことを示した。さらに、TNBP濃度0.3 wt%に対して、Tween80(濃度1 wt%), TritonX-100(濃度0.2 wt%, 1 wt%),あるいはデオキシコール酸ナトリウム(濃度0.2 wt%)を組み合わせた場合に、エンベロープウイルスに対してlog 4以上の不活化効果を得たことを報告している³⁾。他の研究においても界面活性剤と組み合わせるTNBP濃度を0.3 wt%にすることによって高い不活化効果を報告されており^{1,4,5)}、本報では有機溶媒としてTNBPを用い、その濃度基準を0.3 wt%とし検討を進めた。TNBPと組み合わせる界面活性剤については、適切な種類、最適濃度は報告によって様々であるため、不活化する試料に応じて使い分ける必要があると考えた。本報においては、界面活性剤の種類として、構造の異なるTween80(ポリソルベート80), HCO60(ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60), TritonX-100(ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル)を使用して検討したところ、いずれの界面活性剤においても、濃度0.2 wt%, 1 wt%で、RF 6.2と高い不活化効果を示され、その構造の違いによる差異は認められないと示唆された(Table 2.3.)。

これは界面活性剤の親疎水バランスを示すHLB(Hydrophilic-Lipophilic-Balance)がTween80=15.0,

HCO60=14.0, TritonX-100=13.5と比較的に近いためではないかと考える (HLB値13~16範囲は水に澄明に溶解し, o/wエマルジョンの乳化剤, 洗浄剤として使用される). また界面活性剤TritonX-100を用いた場合, 濃度0.2 wt%未満でも, 不活化効果があるものの, 濃度0.2 wt%のRF6.2以上には及ばないため, 至適な濃度は0.2 wt%以上であると考えられた (Table 3.).

S/D処理温度が不活化に与える影響は, 一般的には温度が高い方が有利であると考えられており, 低温では処理時間を十分長くしても, 不活化効率が十分でない場合がある³⁾. 本報ではヘモグロビン精製工程におけるメトヘモグロビンの生成を抑えることを考慮し, 10℃以下でのS/D不活化処理を検討した. 今回の結果では, この条件において処理時間1時間以内で十分な不活化効果が確認され, 10℃程度の温度でも不活化効果が得られることが分かった.

S/D不活化処理において, 界面活性剤の濃度, 処理時間, 処理温度がウイルス不活化効果に影響を及ぼす重要なパラメータとなるが, 不活化条件と不活化との関係は報告によって異なっている. これは処理した溶液の性質, つまり, 溶液中の脂質成分, 蛋白質成分, 及びその他の混在する成分の濃度, pH, イオン強度等が複合的に影響しているためと考えられる. また, 使用したウイルスによっても不活化効果に違いがある^{3,4)}. 本報で用いた洗浄赤血球液, Hb濃度: 約225mg/ml, pH: 約7.0, 外液: 生理食塩水 (0.9g/dl) では, 不活化効果を阻害する性質は認められず, エンペロープウイルスの中では抵抗性の高いHuman herpesvirus 1で十分な不活化効果が得られたことから, エンペロープウイルス全般に効果があるものと期待された.

S/D不活化処理によるウイルス不活化は, ウイルスの外殻であるエンペロープ膜にS/Dが作用し, 膜を破壊するため, 基本的には蛋白質そのものには影響を及ぼしにくいと考えられている. そこでヘモグロビン構造への影響が無いことを確認するために, S/D処理した精製ヘモグロビンとS/D不活化処理しない精製ヘモグロビンの電気泳動を行い, そのパターンが同一であることから, S/D不活化処理によって構造変化が見られないことを確認した (Fig. 1.). また, ヘモグロビンの機能への影響を調べるために, 洗浄赤血球液をS/D不活化処理した場合のヘモグロビンメト化率を経時的に測定した結果, 4時間までの処理時間の中でメトヘモグロビン生成に与える影響が小さいことを確認した (Fig. 2.). 以上の結果から, S/D不活化処理が, ヘモグロビン構造及びメト化に与える影響はほとんどないものと考えられた.

残存したS/D成分は生物学的に許容される範囲にまで取り除く必要があるが, その方法として吸着法, 透析法, 油抽出法, ゲルクロマトグラフィー等が知られている. Octapharma社製の血漿製剤Octaplas²⁾では, 油抽出法, 疎水性吸着によるクロマトグラフィーを採用し, 製造工程において残存TNBPを2µg/ml以下, 残存TritonX-100 5µg/ml以下の規格を定めている. 我々はTNBP濃度3000µg/g (0.3wt%), TritonX-100濃度2000µg/g (0.2wt%) のS/D不活化処理に対する除去工程として, 合成吸着剤と限外ろ過膜を用いた. その結果, Octaplasと

同等レベル以上の除去が可能となり (Table 5.), 添加したS/D成分の多くは合成吸着剤によって除去されていた. 使用した合成吸着剤はスチレン系の無極性材質であるが, S/D処理液中の有機溶媒, 及び界面活性剤との疎水性の相互作用により, 効果的に吸着させたと考えられる. 合成吸着剤と限外ろ過膜を用いることで, ヘモグロビン以外の赤血球由来成分についても除去されていることを確認した.

現在までに, 我々はメトヘモグロビン還元機構を有した人工赤血球の開発⁸⁾を行ってきた. 本報告における, ヘモグロビンの精製工程にS/D不活化工程を導入することにより, 精製法を改良した結果として, ヘモグロビンの純度の向上が見られた. その為, メトヘモグロビン還元系に関連する残存酵素活性にも影響を与える可能性があり, 現在鋭意検討中である. またマイクロウェーブを用いた超短時間高温加熱処理によるウイルス不活化を検討⁹⁾を従来報告してきたが, マイクロウェーブによるウイルス不活化は, S/D不活化処理に比較して, スケールアップにおける技術的問題があることと, ヘモグロビンのタンパク構造等に与える加熱の影響に関して, 十分な知見が得られていないことが今後の問題として考えられる. それに対してS/D処理によって赤血球存在下でのウイルス不活化が, 不活化法として有効であること, 且つ, ヘモグロビンへ及ぼす影響が示唆されなかったことから, ヘモグロビンのウイルス不活化として有用な方法であると考えられる. 今後は, ウイルスプロセスバリデーションを実施し, 原料ヘモグロビンの安全性を保証していく予定である.

5. 結論

人工酸素運搬体の原料として, 人赤血球からヘモグロビンを生成する過程において, 赤血球膜成分を含み, ヘモグロビンの活性あるいは構造を維持し, 且つ, 効率的にウイルスを不活化する方法として, S/D不活化処理は, 十分な効果を示し, 有用であることを確認した. しかしながら, 不活化効果がエンペロープウイルスに限られる, 添加S/Dの除去が必要など, 技術的な課題もある. S/D処理のみでウイルスの安全性保証は出来ないため, 原料の選定, ウイルス否定試験, その他の不活化及び除去工程など, 工程全体でウイルスの安全性を向上させるべきである.

Reference

1. By B. Horowitz, R. Bonomo, A.M. Prince, S.N. Chin, B. Brotman, and R.W. Shulman. Solvent/Detergent-Treated Plasma: A Virus-Inactivated Substitute for Fresh Frozen Plasma. *Blood* 1992;79:826-831.
2. L. Biesert, H. Suhartono, Solvent/Detergent Treatment of Human Plasma-A Very Robust Method for Virus Inactivation. Validated Virus Safety of OCTAPLAS *Vox Sanguines* 1998;74:207-212.
3. B. Horowitz, M.E.Wiebe, A. Lippin, and M. H. Stryker. Inactivation of viruses in labile blood derivatives.

- Transfusion 1985;25:516-522.
4. P. Roberts. Resistance of Vaccinia Virus to inactivation by Solvent/Detergent treatment of blood products. *Biological* 2000;28:29-32.
 5. C.A. Edwards, M.P.J. Piet, S. Chin, B. Horowitz. Tri(n-butyl) phosphate/detergent treatment of licensed therapeutic and experimental blood derivatives. *Vox Sang* 1987;52:53-59.
 6. P. Basset, Y. Beuzard, M.C. Garel, and J. Rosa, Isoelectric focusing of human hemoglobin: Its application to screening, to the characterization of 70 variants, and to the study of modified fractions of normal hemoglobins. *Blood* 1978;51:971-981.
 7. O. Golaz, G.J. Hunhes, S. Frutiger, N. Paquet, A. Bairoch, C. Pasquali, J.-C. Sanchez, J.-D. Tissot, R. D. Appel, Cl Plasma and red blood cell protein maps: Update 1993. *Electrophoresis* 1993,14:1223-1231.
 8. 緒方嘉貴, 岡本武, 鈴木一比好, 上谷利治. Methemoglobin還元機構を有した人工赤血球(NRC)の開発. *人工血液* 1994;Vol. 2, No. 3.
 9. 木村哲寛, 島村京子, 内山秀樹, 金田伸一, 緒方嘉貴. マイクロウェーブによる超短時間高温処理がヘモグロビンに与える影響. *人工血液* 1999;Vol. 7, No. 2.

血小板代替物の開発の現状

Development of Platelet Substitutes

岡村陽介⁽¹⁾, 藤枝俊宣⁽¹⁾, 半田 誠⁽²⁾, 池田康夫⁽³⁾, 武岡真司⁽¹⁾

Yosuke Okamura⁽¹⁾, Toshinori Fujie⁽¹⁾, Makoto, Handa⁽²⁾, Yasuo Ikeda⁽³⁾, and Shinji Takeoka⁽¹⁾

和文抄録

血小板は、血液凝固系と連動した巧妙かつ複雑な止血機構を有しており、これら全てを人工系で模倣することは不可能といっても過言ではない。我々は、血小板が出血部位を認識して粘着、凝集する分子機構に着目し、血管損傷部位や血小板表面を認識できる分子をナノ粒子の表面に担持できれば、出血部位へ特異的に集積して血栓形成を誘導する起点となり、集積したナノ粒子が出血部位を充填する効果が期待できるとの発想から、極めて単純な血小板代替物の設計に結びつけた。具体的には、生体投与可能なリン脂質二分子膜小胞体（リポソーム）やアルブミン重合体などのナノ粒子を構築し、認識部位の候補として血小板膜糖蛋白質の一部の遺伝子組換え体（rGPIb、rGPIa/IIa）やフィブリノーゲン鎖C末端アミノ酸配列（HHLGGAKQAGDV: H12）をナノ粒子の表面に結合させて、*in vitro*、*in vivo*にて止血能を評価し、具体的な止血効果に関する知見が得られている。

Abstract

History of platelet substitutes is shallow with few examples of research compared with red blood cells. A platelet has complicated functions, such as tethering, rolling, adhesion, aggregation, clot retraction, and procoagulant activity. It seems to be difficult to develop platelet substitutes having all these functions. On the other hand, the basic and important functions of platelets are adhesion and aggregation in primary hemostasis. This can be easily understood from the bleeding diseases such as Bernard-Soulier syndrome or Grantzmann's thrombasthenia which lacked adhesion and condensation ability.

We considered that the hemostatic effect can be expected by infusion of nanocarriers having platelet adhesion and the aggregation ability due to the assistance of the function of the remaining platelets by infused nanocarriers. Therefore, we designed two kinds of biocompatible nanocarriers such as phospholipid vesicles and polymerized albumin particles carrying recombinant GPIb, GPIa/IIa and fibrinogen γ -chain dodecapeptide (H12) in order to provide recognition ability for vascular injury.

Keywords

platelet substitute, phospholipid vesicles, polymerized albumin particles, rGPIb, rGPIa/IIa, fibrinogen γ -chain dodecapeptide (H12) hemostasis

1. はじめに

医療の目覚ましい進歩に伴い、癌・造血器腫瘍などの化学治療や放射線治療が年々増加する一方、その副作用によって血小板減少患者が増大しているのが現状である。血小板輸血は、化学治療や放射線治療や、外科手術において不可欠な補助治療法と

して非常に重要な位置を占めており、その供給量は年々増加し続け、2001年以降はほぼ横ばいとなっている¹⁾。しかし、血小板製剤の保存期間は日本の場合3日間と非常に短いため、供給不足に加えて緊急時の供給体制は整っていない。更には、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

(1) 早稲田大学大学院 理工学研究科 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1 Graduate School of Science and Engineering, Waseda University, 3-4-1 Ohkubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan.

(2) 慶応義塾大学 医学部 輸血細胞療法部 〒169-8582 東京都新宿区信濃町35 Department of Transfusion Medicine & Cell Therapy, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-8582, 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 2006年4月18日 論文受理 2006年4月28日

上したものの、未だにウィルス感染などのリスクは完全には排除かれてはいない。不必要な輸血を減少させる努力が払われているものの、赤血球輸血とは異なり自己血輸血の推進は図れず、同種血輸血を可及的に回避し得る血小板代替物の開発ならびに臨床応用は、21世紀に於ける医療において当然目指すべき方向であると考えられている²⁾。

2. 血小板の止血の機序と血小板代替物の設計

止血の重要な初期段階は、血管損傷部位に露出した血管内皮下組織、特にコラーゲンへの血小板の粘着と凝集である。血小板の膜表面には、コラーゲンやそれに結合したフォンビレブランド因子 (VWF) を認識する受容体があり、これらの相互作用により接着や粘着が起こる。高血流条件下では、血小板膜糖蛋白質Ib (GPIb) がVWFを介したコラーゲンとの相互作用によって血小板の接着 (ローリング) が起こり、ローリング速度が緩やかになる³⁾。次いで、コラーゲン受容体であるGPIa/IIa ($\alpha_2 \beta_1$ インテグリン) やGPVIがコラーゲンと直接結合してより強固に粘着する^{4,5)}。更には、接着、粘着の刺激が細胞内に伝わり、複雑なシグナル伝達経路を経て血小板膜糖蛋白質GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb} \beta_3$ インテグリン) が“折れ曲がり状態”から“立上がり状態”へと高次構造が変化し (活性化)、血漿蛋白質であるフィブリノーゲンやVWFを介した血小板凝集 (一次凝集) が起こる⁶⁾。同時に、細胞内シグナル伝達によって血小板の形態が変化して偽足を出して伸展し、血小板内の濃染顆粒が解放小管系の膜と融合して血小板活性化因子であるCa²⁺、セロトニン、アデノシン5'-リン酸 (ADP) が放出され、ポジティブフィードバックによって更に血小板の活性化が亢進する。次に、顆粒からフィブリノーゲン、VWF、P-セレクチン、フィブロネクチンなどを放出、同時にこれらの受容体を血小板表面に発現し、血小板間、あるいは白血球をも巻き込んだネットワークを形成して血小板凝集 (二次凝集、ここまで一次止血と呼ぶ) を促す⁷⁾。最後に強力な凝固系因子であるトロンボキサンA₂の放出や血小板表面が凝固系の活性化に必要な場 (ホスファチジルセリン) が提供され、血漿中の凝固系が活性化されて最終的にはフィブリノーゲンがフィブリン塊 (血餅) となって止血 (二次止血) が完了する。

このように血小板による止血は、血小板の粘着、凝集、変形や顆粒の放出など、非常に巧妙かつ複雑に制御された多段階の反応が動的に連動しているため、この機能を全て模倣した人工系の構築は不可能と言ってよい。そこで、著者らは、血小板が出血部位を認識して粘着、凝集する分子機序に着目し、血管損傷部位や血小板表面を認識できる分子をナノ粒子表面に担持できれば、出血部位へ特異的に集積して血栓形成を誘導する起点となり、集積したナノ粒子が出血部位を充填する効果が期待できるとの発想から、極めて単純な血小板代替物の設計から検討を開始した (Fig. 1.)。

3. 海外の血小板代替物の開発動向

血小板代替物の研究は、フィブリノーゲンを吸着させたラテ

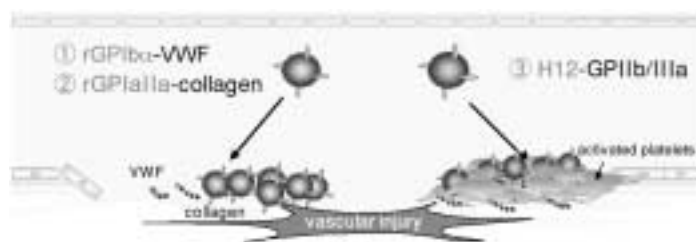


Fig. 1. Design of Platelet substitutes.

ックスピーズがADP刺激による活性化血小板と迅速に反応することをCollerら⁸⁾が1980年に報告したことに始まる。その後、担体として正常ヒト赤血球にフィブリノーゲン⁹⁾やその一部のアミノ酸配列RGD¹⁰⁾を固相化した例が報告され、血小板の凝集反応を媒介するリガンドの固相化により残存血小板の凝集能を増強する実例となった。1999年にはLeviら¹¹⁾により、フィブリノーゲンを吸着させた粒子径が約3 μm のアルブミンマイクロカプセルを調製し、血小板減少ラビットへ投与した出血時間の短縮が詳細に報告された。他方、ヒト血小板を凍結融解にて破壊後加熱処理した粉末製剤 (Infusible Platelet Membrane) が血小板減少ラビットの出血時間を短縮した例¹²⁾が報告され臨床試験が開始されたものの、作用機序が不明瞭であることなどが理由により、臨床試験は中断されている。しかし、上述の例は、全てヒト血液由来の成分を使用しており、ウイルス感染の危険性は否めない。

我が国における血小板代替物の開発は、生体投与可能なリン脂質小胞体 (リポソーム) や遺伝子組換えヒト血清アルブミン (rHSA) の重合体をナノ粒子として利用し、血小板の止血に関する分子機序を利用して、出血部位を認識させるために血小板膜糖蛋白質の一部の遺伝子組換え体 (rGPIb, rGPIa/IIa) やフィブリノーゲン鎖C末端アミノ酸配列 (HHLGGAKQAGDV: H12) を担持させて、血小板を巻き込んだ出血部位への集積により止血能の発現を期待している。

4. ナノ粒子の調製方法

リン脂質を水中に分散させると自発的に集合し、多重層の二分子膜小胞体 (リポソーム) が構築される¹³⁾。これを孔径の異なるフィルターに順次透過させると、粒子径と層数の制御と同時に様々な水溶性物質を内包できる (エクストルージョン法)。また、小胞体を形成させてから表面に認識部位を担持させることもできる (Fig. 2.(a))。一般に小胞体には次の長所が挙げられる。膜成分であるリン脂質やコレステロールは生体適合性、生分解性に優れる、水溶性や脂溶性の低分子薬物、蛋白質や遺伝子などの高分子を封入できる、粒径や脂質組成により血中滞留時間や体内動態を調節できる¹⁴⁾、小胞体の表面へ多くの蛋白質を担持させて特定部位への指向性、集積性 (ターゲティング) が期待できる¹⁵⁻¹⁷⁾。小胞体の内水相に高濃度ヘモグロビン (Hb) を内包させて、その表面をポリエチレングリコール修飾した酸素運搬体は、高い酸素運搬効果と長い血中滞留性や保存安定性を持ち¹⁸⁾、霊長類や中動物を用いてその効果と安

全性の確認が進んでいる。

他方、ヒト血清アルブミンは、5g/dLと血漿蛋白質の中で最も多い蛋白質であり、コロイド浸透圧の調節や、栄養物や代謝物などの運搬を担っている。これを利用した微粒子（例えば、アルブミン大凝集体、アルブミンマイクロスフェア、アルブミンマイクロカプセルなど）は生体適合性・生分解性を有するため、既に1950年代から静注用製剤として血管造影剤、超音波診断増感剤や徐放性薬物担体などに臨床使用されている。しかしながら、これらのアルブミン粒子は、高温加熱処理（スプレードライ法）や有機溶媒による不可逆な変性や界面活性剤や架橋剤を用いるため、粒子径の制御や添加物の除去操作が煩雑であった¹⁹。そこで我々は、遺伝子組換えヒト血清アルブミン（rHSA）²⁰をビルディングブロックとしてrHSAをジスルフィド結合にて重合する方法を用いて、重合度の制御によりナノからマイクロスケールの粒径制御を可能とし、水溶液中でのpHと温度の制御にて重合するクリーンな方法を採用して、親水性の表面を持つ粒子を調製でき、アルブミン変性がほとんどない重合体を得る方法を確立している²¹。アルブミン重合体は内部が充填された無定形な“ぼたん雪”のような形態をとっており、例えば出血部位での充填効果が期待できる（Fig. 2(b)）。

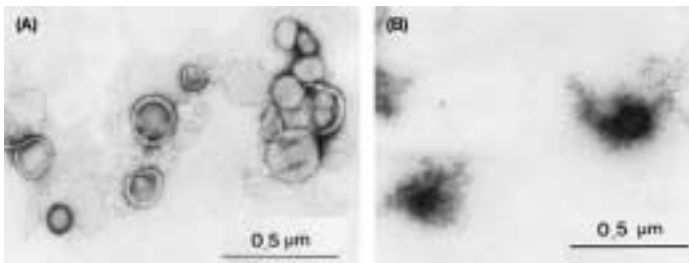


Fig. 2. TEM images of (A) phospholipid vesicles and (B) polymerized albumin particles.

5. 血小板代替物の機能評価

小胞体の表面にrGPIb²²を結合させると血小板の接着現象（ローリング）が再現できる。高血流条件下での血小板による止血は、血小板表面のGPIbがコラーゲンに結合したVWFを認識して血小板が接着することから始まる。抗GPIIb/IIIa抗体を添加した血小板をフローチャンパーに設置し流動下での*in vitro*観測を行うと、VWF固定化基板上を流動方向に沿ってローリングする現象が観察される。rGPIbを結合させた小胞体でも同様にVWF基板上をローリングすることが確認された（Fig. 3.(a)）²³。興味深いことに、そのローリング速度は、小胞体を構成するリン脂質二分子膜の柔軟性（membrane flexibility）と相関していることが明らかになった²³。即ち、粒子径やrGPIbの表面結合密度を統一して柔軟性のみの異なる小胞体を用いて比較したところ、“柔らかい”小胞体ではローリング速度は低下し、“硬い”小胞体では上昇した。これは“柔らかい”小胞体は変形しやすくVWF基板と小胞体間の接触面積が増大したためにローリング速度が低下したためと考えられる。ところが、アルブミン重合体ではVWF表面をローリン

グせずに直ちに粘着して停止する（Fig. 3.(b)）。同様の挙動は、ラテックスビーズや固定化血小板でも認められたことから、ローリングの性質を持たせるには流動性のある膜構造を持つことが必要条件であることが明らかになった。

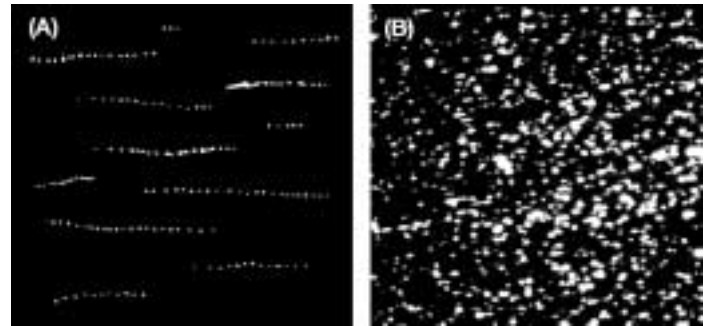


Fig. 3. Specific interaction of (A) phospholipid vesicles carrying rGPIb and (B) polymerized albumin particles carrying rGPIb with VWF-immobilized surface at the shear rate of 2400 s⁻¹. (A) and (B) were superimposed of pictures for 3 s taken at every 1/6 s.

rGPIa/IIaを結合させた小胞体では、低血流条件下でコラーゲン基板を特異的に認識して粘着する挙動が西谷らによって報告された²⁴。血流速度の増大と共にコラーゲン基板への粘着数は減少するが、一つの小胞体にrGPIbとrGPIa/IIaの両者を担持させると低血流速度から高血流速度の範囲にわたってコラーゲン基板に粘着する微粒子となる²⁵。我々は、rGPIa/IIa担持アルブミン重合体でも同様の性質を確認した。これをX線照射にて血小板数を正常値の5分の1程度に減少させたマウスに投与して尾先端を切断して出血時間の測定を行ったところ、コントロール群の出血時間（730 ± 198秒）と比較して投与量依存的に出血時間の短縮が認められた（例えば、2.4 × 10¹¹ particles/kgでは出血時間は337 ± 46秒）（Fig. 4.）²⁶。

さらに、粘着して活性化した血小板同士を架橋するフィブリノーゲンを結合させた微粒子は減少した残存血小板の凝集補助として期待できる²⁷。実際、血小板数が正常値の5分の1程度に調節された血小板減少モデル血液にフィブリノーゲンを結合させたアルブミン重合体を添加すると、添加量の増大と共に流動血小板の粘着数が増大したことから、フィブリノーゲン結合アルブミン重合体は血小板凝集増強効果を有する微粒子であることが示唆された。しかし、フィブリノーゲンは4で保存すると凝集する非常に扱いにくい蛋白質であり²⁸、水溶液中では速やかに失活することも判明した²⁷。

そこで、活性化血小板膜上のGPIIb/IIIaを認識サイトとして知られているフィブリノーゲンの鎖C末端の400-411番目のドデカペプチド（HLLGGAKQAGDV, H12）と鎖の95-98あるいは572-575番目のテトラペプチド（RGDS, RGDF）を血小板代替物の認識部位として着目し、担体にラテックスビーズを用いて両者の機能比較を行った²⁹。正常血小板（2.0 × 10⁴ / μL）に対するラテックスビーズ、H12あるいはRGDを結合させたラテックスビーズ（1.0 × 10⁵ / μL）の非特異的粘着率をフローサイ

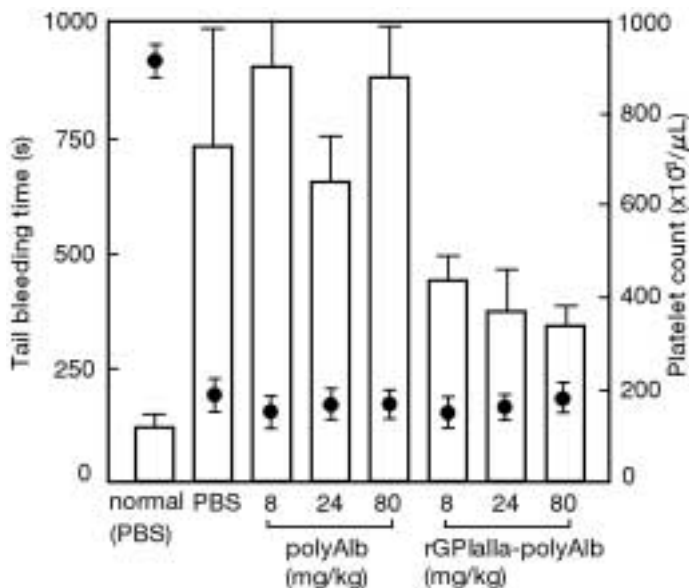


Fig. 4. Effect of the administration of polymerized albumin particles carrying rGPIIb/IIIa on the tail bleeding time(white columns) The administered amounts of polymerized albumin particles carrying rGPIIb/IIIa are 8, 24, and 80 mg/kg. Circles show platelet counts in the mouse.

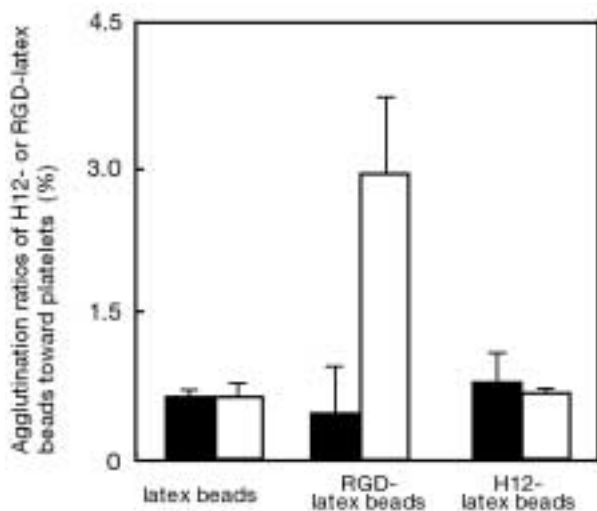


Fig. 5. Agglutination ratios of H12- or RGD-conjugated latex beads toward platelets by flow cytometry. 0 min(filled columns) and 30 min(open columns) after mixing with H12- or RGD-latex beads and platelets.

トメトリーにて算出した (Fig. 5). H12結合ラテックスビーズでは、正常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結合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 ± 1.3 %まで上昇した (Fig. 5). このことから、RGD結合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す可能性が示唆された。さらに、H12結合ラテック

スビーズと正常血小板を混合した後も血小板の活性化を引起さないことを証明した。具体的には、血小板の活性化マーカーであるGPIIb/IIIa やP-セレクチンの発現を、それぞれの抗体であるPAC-1と抗P-セレクチン抗体にて解析した²⁹⁾。例えば、Table 1. に示すように、ADP刺激した血小板はPAC-1陽性率が55.1 ± 6.1 %であり、未刺激 (PBS群) の血小板のそれ (0.4 ± 0.1 %) と比較すると明らかにGPIIb/IIIaの活性化を認める。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 ± 6.9 %と非常に高くなっている。しかしながら、H12結合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結合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化であることを証明した。

Table 1. PAC-1 binding and P-selectin expression to platelets in the presence of H12-conjugated latex beads.

Stirring time(min)	PAC-1 binding(%)		P-selectin expression(%)	
	0	10	0	10
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

次いで、血小板減少モデル血液中 (2.0x10⁴ / μL, 正常の10分の1) にH12結合ラテックスビーズを添加し、コラーゲン基板に対する血小板の粘着挙動を観察したところ、H12結合ラテックスビーズの未添加系と比較して血小板の粘着面積を約2倍も増大させた。さらに、血液流動後の基板を走査電顕観察したところ、コラーゲン基板上にまず血小板が粘着した後にH12結合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. 6). これは、H12結合ラテックスビーズが、血小板凝集を促進していること

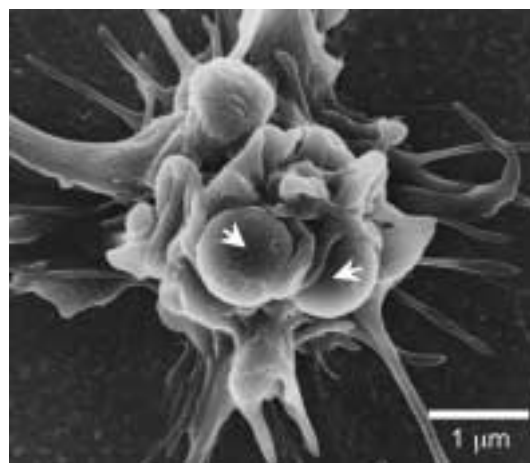


Fig. 6. SEM image obtained after platelets mixed with H12-latex beads were passed over collagen immobilized on a glass surface. Arrows in the SEM image are H12-latex beads.

を支持する結果である。

我々は、ラテックスビーズの代わりに生体適合性を持つアルブミン重合体や小胞体を用いて、これらの表面にH12を結合させることで、フィブリノーゲンを結合させた場合と同様の血小板凝集促進機能を発現することも確認している^{30,31)}。抗がん剤であるブスルファンをWister系雄性ラットに20 mg/kgを2回に分けて投与すると、その副作用によって、投与10日後に血小板数のみが正常の5分の1まで再現性よく減少する。血小板減少症モデルラットの尾先端から1 cmの箇所をクイックヒール[®]にて切傷した後、生理食塩水に浸し、出血が止まるまでの時間(出血時間)を測定したところ、再現性の良い出血時間が608 ± 152秒(正常ラット178 ± 56秒)が得られた。5分前に予めH12結合アルブミン重合体を投与してから出血時間を測定すると、出血時間が投与量依存的に有意に短縮された(Fig. 7.)³⁰⁾。また、アルブミン重合体の表面をポリエチレングリコール鎖にて修飾し、その末端の一部にH12を結合した系では、投与3時間後でもその止血効果が持続することも確認できている。また、ナノ粒子を小胞体に置き換えても、同様の止血効果が得られている(Fig. 7.)³¹⁾。しかし、この両者を同一粒子数を投与した群同士で比較した場合、アルブミン重合体の方がその効果は勝っているようである。これは、アルブミン重合体は内部が充填されているため、出血部位の充填効果が高いためと推測される。しかし、小胞体ならば内水相に血小板の活性化や凝固系を誘導する因子を内包させておき、出血部位に集積した小胞体がこれらを放出できれば、止血に有効に貢献できるはずであり、現在そのような知見も得られつつある(未発表データ)。

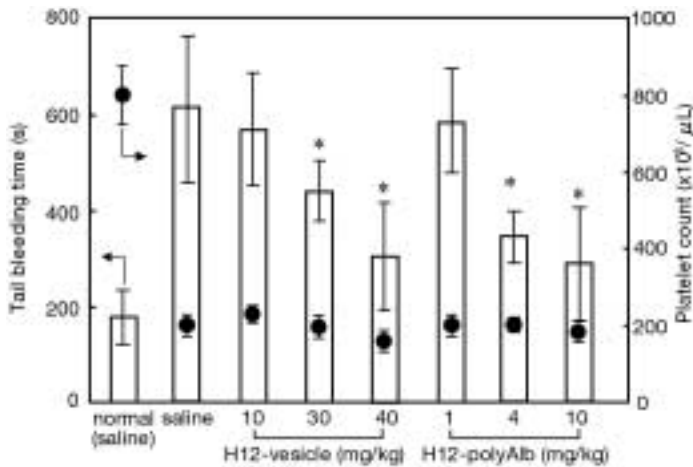


Fig. 7. Effects of the administration of phospholipid vesicles and polymerized albumin particles carrying H12 on tail bleeding time (white columns) The administered amount of phospholipid vesicles carrying H12 were 10, 30, 40 mg/kg equivalent of lipid. The administered amount of polymerized albumin particles carrying H12 were 1, 4, 10 mg/kg equivalent of rHSA concentration. ; platelet counts in the rats (N = 6-10) *P < 0.05 for H12-vesicles or H12-polyAlb group vs. saline group.

6. 将来展望と今後の課題

血小板代替物の研究開発を期待するニーズが高いにも関わらず、国際的にも限られた研究グループで研究が細々と進められているだけである。しかし、我々のグループでは、既に述べてきたように、血小板減少動物モデルを用いた止血効果に関する知見も集積されつつあり、我々の血小板代替物の設計方針が妥当であると信じている。今後は、より大型動物を用いた止血能評価やそれら微粒子における安全性試験、具体的には、投与前後における血液生化学試験、特に過剰な血栓形成や凝固系の活性化亢進の有無に関する血液凝固試験を行う予定である。更には、ナノ粒子を巻込んだ止血後の血栓の線溶系に及ぼす影響、反復投与に対する代謝系、細網内皮系、免疫系に及ぼす影響や抗原性の検討を詳細に行い、認識部位や担体の安全性に関する知見を得てゆく計画である。現在では、バイオテクノロジーやオプトエレクトロニクスの進歩により血小板の動的な機能に関する多くの情報が短期間に蓄積され、同時に遺伝子組換え蛋白質の大量製造や担体の製剤化技術の飛躍が期待できるため、近い将来に実用可能な血小板代替物が創製されるであろうし、これらの成果がDrug Delivery Systemの基盤技術の発展にも貢献することにもなる。

7. 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中央検査部教授 村田 満博士ならびに慶応義塾大学医学部血液内科 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(医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合研究事業)、早稲田大学21COEプログラム「実践的ナノ化学 教育研究拠点」、SCOE「先端科学と健康医療の融合研究拠点の形成」および日本学術振興会科学研究費(17-0429)の助成より行われた。記して謝意を表する。

8. 文献

1. 日本赤十字社ホームページ <http://www.jrc.or.jp/active/blood/index.html>.
2. 村田 満. 人工血小板(血小板代替物)血液・免疫・腫瘍 2001;6:35-9.
3. Ikeda Y, Handa M, Kawano K et al. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest* 1991;87:1234-40.
4. Santro SA, Zutter MM. The α_2 1 integrin: A collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Hemost* 1995;74:813-21.
5. Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res* 2004;114:221-33.
6. Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 2002;110:599-611.

7. Marguerie GA, Plow EF, Edgington TS. Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *J Biol Chem* 1979;254:5357-63.
8. Collier BS. Interaction of normal, thrombasthenic, and Bernard-Soulier platelets with immobilized fibrinogen: defective platelet-fibrinogen interaction in thrombasthenia. *Blood* 1980;55:169-78.
9. Agam G, Livne AA. Erythrocytes with covalently-bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia. *Eur J Clin Invest* 1992;22:105-12.
10. Collier BS, Springer KT, Beer JH et al. Thromboerythrocyte. In vitro studies of potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusions. *J Clin Invest* 1992;89:546-55.
11. Levi M, Friderich P, Ten CW et al. Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat Med* 1999;5:107-11.
12. Chao F, Reddick RL, Bode AR et al. Infusible platelet membrane microvesicles: a potential transfusion substitute for platelet. *Transfusion* 1996;36:536-42.
13. Bangham AD, Standish MM, Watkins J. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965;13:238-52.
14. Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* 1990;268:235-7.
15. Alder-Moore J, Poffitt RT. AmBiosome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:21-30.
16. Maruyama K. In vivo targeting by liposome. *Biol Pharm Bull* 2000;23:791-9.
17. Maruyama K. PEG-immunoliposome. *Bioscience Reports* 2002;22:251-66.
18. 武岡真司 . 人工血液 (人工赤血球) の開発動向 . 日本医師会雑誌2004;131:907-10.; Sakai H, Tomiyama K, Sou K et al. Poly (ethylene glycol) -conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state. *Bioconjugate Chem* 2000;11:425-32.
19. Gupta PK, Hung CT. Albumin microspheres. I: Physico-chemical characteristics. *J Microencapsulation* 1989;6:427-62.
20. Kobayashi K, Nakamura N, Sumi A et al. The development of human serum albumin. *Ther Apher* 1998;2:257-62.
21. Takeoka S, Teramura Y, Ohkawa H et al. Conjugation of von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib to size-controlled albumin microspheres. *Biomacromolecules* 2000;1:290-5.
22. Murata M, Ware J, Ruggeri ZM. Site-directed mutagenesis of a soluble recombinant fragment of platelet glycoprotein Ib demonstrating negatively charged residues involved in von Willebrand factor binding. *J Biol Chem* 1991;266:15474-80.
23. Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y et al. Rolling properties of rGPIb -conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibilities on vWf surface under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:765-70.
24. Nishiya T, Murata M, Handa M et al. Targeting of liposomes carrying recombinant fragments of platelet membrane glycoprotein Ib to immobilized von Willebrand factor under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;270:755-60.
25. Nishiya T, Kainoh M, Murata M et al. 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;100:136-42.
26. Teramura Y, Okamura Y, Takeoka S et al. Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306:256-60.
27. Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y et al. Fibrinogen-conjugated albumin polymers and their interaction with platelets under flow conditions. *Biomacromolecules* 2001;2:1192-7.
28. Wertheimer E, Shapiro B, Fodor-Salomonowicz I. Stability of fibrinogen in normal and pathological plasma. *Brit J Exp Pathol* 1944 ;25:121-5.
29. Takeoka S, Okamura Y, Teramura Y et al. Fibrinogen - chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:773-9.
30. Okamura Y, Takeoka S, Teramura Y et al. Hemostatic effects of fibrinogen- chain dodecapeptide-conjugated polymerized albumin particles in vitro and in vivo. *Transfusion* 2005;45:1221-8.
31. Okamura Y, Maekawa I, Teramura Y et al. Hemostatic effects of phospholipid vesicles carrying fibrinogen- chain dodecapeptide in vitro and in vivo. *Bioconjugate Chem* 2005;16:1589-96.

日本血液代替物学会 総会

1. 日時：

平成17年6月7日(火)

2. 場所：

早稲田大学国際会議場 3階 第1会議室
〒169-0051 東京都新宿区西早稲田 1-6-1

3. 議題：

報告事項 年次大会の開催状況
会員動向
会誌編集委員会
平成16年度事業報告
平成16年度収支決算
平成17年度事業(実績報告)

以下審議内容を略記します。

報告事項

年次大会の開催状況として下記事項が報告された。

- 1) 第12回日本血液代替物学会年次大会
- 2) 平成17年6月6日(月)～7日(火)
- 3) 東京都新宿区西早稲田 1-6-1 早稲田大学国際会議場
- 4) 日本血液代替物学会会員、
臨床医学・理工学研究者、
国内の大学および医療機関臨床医、
血液センター関係者の参加があった。

会員状況は以下のとおり。

- 1) 維持会員：5社
- 2) 賛助会員：5社
- 3) 正会員：143名
- 4) 購読会員：19箇所

会誌編集委員会からの報告は以下のとおり。

会誌「人工血液」の発行。

- ・平成16年度：第12巻1号、2号、3号、第13巻1号発行。
- ・平成17年度：第13巻2号発行。第13巻3号、4号、
第14巻1号発行予定。

平成16年度事業報告(平成16年4月1日～平成17年3月31日)
が行われ各々承認された。

- 1) 定期総会の開催
平成16年7月14日(水) 札幌市北方圏センターにて開催。
- 2) 第11回年次大会(大会長 川村 明夫)
平成16年7月13日(火)、14日(水)
札幌市北方圏センターで行われた。

平成16年度収支決算報告が行われ承認された。

平成16年度 会計 収支決算表(学会事務局)
(自 平成16年4月1日 至 平成17年3月31日)

収 入		支 出	
摘 要	金 額	摘 要	金 額
前期繰越金	7,172,194	会誌出版費	2,355,070
正会員会費	550,000	集会・委員会費	1,883,681
賛助会員会費	1,600,000	年会補助金	1,000,000
維持会員会費	14,000,000	ホームページ作成維持費	2,000,000
購読会員会費	54,000	事務人件費	2,125,760
雑収入	61,680	事務費	1,263,368
利息	1,538	次期繰越金	12,811,533
計	23,439,411	計	23,439,412

平成17年度事業(実績報告)

- 1) 定期総会の開催
平成17年6月7日(火) 早稲田大学国際会議場にて開催。
- 2) 第12回年次大会の開催(大会長 武岡 真司)
平成17年6月6日(月)、7日(火) 於 早稲田大学国際会議場
- 3) 「人工血液」の発行
- 4) 「人工血液をつくる(6)」後援

理事会報告

平成18年3月31日に理事会が開催された。

- 1) 平成17年度事業/会計経過報告
- 2) 平成18年度事業計画/予算案
- 3) 委員会報告
- 4) 役員の確認
- 5) 人工酸素運搬体製造に関する基本的留意事項についての審議

以上が報告、審議された。

人工酸素運搬体製造に関する基本的留意事項についてはアップデートしていくこととなった。現行役員は以下の通り。

日本血液代替物学会 役員名簿

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

日本血液代替物学会 評議員名簿

青木 克憲 浜松医科大学 教授	高久 史磨 自治医科大学 学長
明石 勝也 聖マリアンナ医科大学 教授	高橋 晃 テルモ(株) 代表取締役社長
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	高橋 英嗣 山形大学医学部 助教授
浅野 茂隆 早稲田大学理工学部 教授	高橋 恒夫 東京大学医科学研究所 教授
阿部喜代司 筑波大学 名誉教授	武岡 真司 早稲田大学理工学部 教授
飯塚哲太郎 理化学研究所播磨研究所 所長	土田 英俊 早稲田大学理工学部 名誉教授
池田 久實 北海道赤十字血液センター 所長	土屋 喜一 早稲田大学理工学部 名誉教授
池田 康夫 慶應義塾大学医学部 教授	遠山 博 埼玉医科大学総合医療センター 名誉所長
池淵 研二 埼玉医科大学 教授	友田 燁夫 東京医科大学 教授
伊藤 俊之 京都府立医科大学 助教授	豊田 忠之 東部地域病院 元院長
大島 宣雄 筑波大学基礎医学系 教授	仲井 邦彦 東北大学医学部 助教授
大塚 節子 岐阜大学医学部 講師	中井 一士
大柳 治正 近畿大学医学部 教授	長澤 俊郎 筑波大学臨床医学系 教授
尾形 利郎 東海大学医学部 名誉教授	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 東京大学大学院工学系研究科 教授	西 勝英 肥後医育振興会 理事
川村 明夫 札幌北楡病院 理事長	西出 宏之 早稲田大学理工学部 教授
黒澤 良和 藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授	西谷 孝子 ナノキャリア株式会社
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 国立名古屋病院 院長	平澤 博之 千葉大学医学部 教授
斎藤 英彦 早稲田大学理工学部 教授	福島 昭二 神戸学院大学薬学部製剤学 助教授
酒井 清孝 カレスサッポロ北光記念クリニック 所長	藤井 寿一 東京女子医科大学 教授
佐久間一郎 東京女子医科大学 名誉教授	藤島清太郎 慶應義塾大学医学部 講師
桜井 靖久 ニプロ(株) 医薬品研究所 所長	船津 昭信 (財)化学及血清療法研究所 常務理事
佐藤 誠 青山学院大学理工学部 名誉教授	堀 進悟 慶應義塾大学医学部 助教授
鮫島 達也 杏林大学医学部 客員教授	堀 原一 筑波大学 名誉教授
清水 勝 京都大学再生医科学研究所 教授	堀之内宏久 慶應義塾大学医学部 講師
清水 慶彦 日本赤十字血液事業本部 中央血液研究所 所長	宮尾 秀樹 埼玉医科大学総合医療センター 教授
十字 猛夫 慶應義塾大学医学部 教授	宮崎 保 札幌通信病院 名誉院長
末松 誠 慶應義塾大学医学部 教授	村田 満 慶應義塾大学医学部 教授
平 明 鹿児島大学医学部 名誉教授	湯浅 晋治 日本赤十字社血液事業本部
高折 益彦 東宝塚さとう病院 名誉院長	四津 良平 慶應義塾大学医学部 教授
高木 智史 (株)オキシジェニクス 代表取締役社長	米川 元樹 札幌北楡病院 院長

(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することができる。

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、丁度1年前に開催された第12回年次大会の大会長講演の概要と年次大会で報告されたウイルス不活化と血小板代替物に関する原稿を掲載しましたが、原稿の集まりが悪いこともあって、発刊が遅れがちになっております。本編集委員会では、この状況を深刻に受け止めまして編集方針を抜本的に変え

る方向を議論し始めております。ホームページとリンクさせて会員相互のコミュニケーションを活発にし、会員の自己紹介などを含めたレポートなども企画しております。編集方針の変更内容は、編集委員会でまとめ次第、報告をしたいと思います。

(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(、)とピリオド(．)とする。
 - 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbol フォントを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめること。
 - 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μ m, L, mL, μ L, mol, g, mg, μ g, ng, pg, fg, N / 10などを用いる。
 - 7) FigureとTable: 引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は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. リボソームの調製. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編. リボソーム. 東京: 南江堂, 1988;21-40.
 3. Fowler SA, Andracki M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular

- retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22:27-42.
4. Reichert CM, Kelly VL, Macher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985;111-60.
 - 9) 論文中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。

[本誌掲載著作物の二次利用および著作権について]
以下の点につきまして、あらかじめご了承ください。

本誌の一部、もしくは全部をCD-ROM、インターネットなどのニューメディアに二次利用させていただく場合があります。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)は本学会に譲渡されたものとします。したがって、上記の諸権利の承諾は本学会で行います(本項については、著作者ご自身の再利用を拘束するものではありませんが、再利用される場合はご一報ください)。

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), 東 寛, 池淵研二, 小林 薫, 酒井宏水, 福島昭二, 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.13(4) 2006年5月19日発行

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

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

〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1

早稲田大学理工学部65-208室

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

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

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