

人工血液

第 18 巻 第 3 号 2011 年 1 月

目 次

| | | |
|-------|--|-----|
| 会告 | | 90 |
| 原著 | Measurement of electrolyte concentrations in serum containing liposome vesiclesSeiji Miyake 他 | 91 |
| 総説 | 人工赤血球を用いた脳酸素代謝測定岡沢 秀彦 他 | 97 |
| | MWC 2 状態モデルはヘモグロビンのアロステリーと いかに調和しうるか柴山 修哉 | 102 |
| オピニオン | ヘモグロビンを含んだ血液代替物を利用した 単純性血管腫のレーザー治療の効果についての考察力久 直昭 | 110 |

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 18 No. 3 January, 2011

Contents

| | | |
|--|--|-----|
| Announcement | | 90 |
| Original Article: | | |
| | Measurement of electrolyte concentrations in serum containing liposome vesiclesSeiji Miyake, et al. | 91 |
| Review: Measurement of cerebral oxygen metabolism using artificial RBC |Hidehiko Okazawa, et al. | 97 |
| | How can the MWC two-state model be reconciled with hemoglobin allostery?.....Naoya Shibayama | 102 |
| Opinion: A consideration about advantageous effect of the laser treatment of port-wine stains with blood substitutes including hemoglobin..... | Naoaki Rikihisa | 110 |

会 告

XIII International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics (XIII ISBS 2011)

期 日 : 2011年7月27日(水)~29日(金)

会 場 : Massachusetts General Hospital, Boston, MA 02114, USA

President : Professor Warren M. Zapol
Department of Anesthesia, Critical Care and Pain Medicine
Massachusetts General Hospital

Program

Topics : Blood storage with a focus on NO
Recent clinical studies of Hb-based oxygen carriers
New Hb-based oxygen carriers
Stem cell RBC production
その他

演題募集締切り : 2011年4月1日(金)
詳細はHomepageを参照, <http://www.intsbs.info/>

連 絡 先 : Warren M. Zapol, M.D.
President, ISBS 2011
Department of Anesthesia, Critical Care and Pain Medicine
Massachusetts General Hospital, Boston, MA 02114, USA
TEL: 617-643-5757 / FAX: 617-643-5767 / Email: ISBS2011@gmail.com

Measurement of electrolyte concentrations in serum containing liposome vesicles

Seiji Miyake ⁽¹⁾, Jiro Takemura ⁽¹⁾, Hiromi Sakai ⁽²⁾, Masuhiko Takaori ⁽³⁾

Abstract

We reported in previous study that wet method using conventional electrode was not satisfactory for measurement of electrolyte(Na and Cl)ion concentration when one of artificial oxygen carrier, HbV(liposome encapsulated hemoglobin) was contained more than 1/8 volume ratio in serum. In present study we attempted to clarify the above reason using liposome in which distilled water was encapsulated and which was emulsified in distilled water. The liposome emulsion was mixed with 1.68 % saline at volume ratio of 2.5 : 1.2 and then the mixture was diluted at 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 with 0.83 % saline. Human albumin* was added at 4 % in those mixtures adapting to a clinical specimen. Subsequently Na and Cl ion concentration in the above mixtures were measured by the wet method(W method)using TBA-200FRNEO™ and dry chemistry method(D method) using VITROS250™, respectively. As results, Na and Cl ion concentration differences in the mixtures measured by either wet or dry method and either Na ion or Cl ion concentration differences between D and W method were obtained in most similar ranges. Therefore it was concluded that measurement of Na and Cl ion concentration by D method is not interfered with coexisted liposome vesicles at maximally 22 % volume ratio in serum. And it was assumed that coexistence of both hemoglobin and liposome vesicle could limit the capacity with W method for measurement of the electrolyte ion concentration in serum containing the HbV. Consequently we evaluated the D method as it can be used for measurement of electrolyte ion concentration in serum containing liposome vesicles while some correction factors might be provided necessarily. Accuracy in determination of liposomecrit, volume ratio of liposome mass in the emulsion, with ultracentrifugation and diffusion of water molecule through the liposome membrane by osmosis were also discussed in this paper.

* Human albumin powder supplied from Sigma-Aldrich contains a trace amount of Na.

Keywords

liposome encapsulation, electrolyte concentration measurement, liposome, polarographic method, phospholipid membrane permeability, artificial oxygen carrier

Introduction

Many studies¹⁻⁷⁾ have been reported on interference with hemoglobin based artificial oxygen carrier(HBOC)to laboratory examinations in clinical practice. The interference with HBOC in those studies attributed most to light absorbance of hemoglobin molecule with spectrophotometry. We expected, however, that polarographic measurement for

electrolyte(Na, K, Cl)ion concentrations in serum would never be interfered even if the serum had contained HBOC. Thus we tried to measure them in serum containing HBOC, hemoglobin encapsulated liposome vesicle emulsified in the physiological saline(HbV) The measurement could performe most satisfactorily by dry chemistry method but surprisingly was limited partially by conventional wet method⁸⁾. Namely

(1) Osaka Prefecture Saiseikai Noe Hospital 2-2-33 Higashi-Imahuku, Jyotou-ku, Osaka 536-0002, Japan

(2) Research Institute for Science and Engineering, Waseda University 3-4-1 Ohkubo, Shinjyuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan

(3) East Takarazuka Sato Hospital 2-1 Nagao, Takarazuka, Hyogo 665-0873, Japan

論文受付 2010年4月28日 論文受理 2010年6月7日

clinically acceptable value could not be obtained, if volume of the HbV in the serum exceeded over 1/8. We wondered whether liposome per se or liposome encapsulating hemoglobin would have limited the measurement.

In this study to elucidate mechanism for the above limited ability with the wet method, we prepared liposome vesicles encapsulating distilled water instead of hemoglobin solution and attempted to demonstrate sole effect of those liposome vesicles attributed to the limitation with the wet method comparing with the dry chemistry method.

Method

Liposome vesicles encapsulating distilled water were prepared in Waseda University. 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl choline, cholesterol, 1,5-*O*-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate which were supplied from Nippon Fine Chemical Co. Ltd. Osaka, Japan, and 1,2-distearoyl-*sn*-glycerol-3-phosphatidyl ethanolamine-*N*-PEG5000 from NOF Corp. Tokyo, Japan were mixed at mole composition of 5/5/1/0.033. The mixture of 10 g was dissolved in 140 ml of distilled water and stirred with a stirring machine model SFS710-AA (Advance Corp. Tokyo, Japan) overnight. After liposome vesicle formation, the vesicles were extruded out through 220 nm pore sized FM filter (Millipore Corp. Billerica, Ma. U.S.A.) under 30 kgf/cm² and their size was adjusted approximately 240 nm which was confirmed with Zeta-Sizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd. Worestershire, U.K.) Volume of vesicles (liposomecrit) emulsified in distilled water was determined to be 52 % after 100,000 G ultracentrifugation with Optima LX-80 (Beckman Coulter Co. Brea, Ca. U.S.A.) The emulsion was sealed with air and stored at 4 °C in a refrigerator. Human albumin powder (A1653-5G Sigma-Aldrich St Louis, Mo. U.S.A.) was dissolved in the emulsion, 1.68 % and 0.84 % saline at 4 % for each, simulating human serum. Then 2.5 ml of the emulsion, 1.2 ml of the 1.68 % saline and 2.5 ml of 0.84 % saline were mixed. This mixture (L₁) was diluted by the 0.84 % saline with 4 % albumin at 1:1 volume rate and prepared 1/2 mixture (L_{1/2}). Subsequently 1/4, 1/8, 1/16, and 1/32 mixture (L_{1/4}, L_{1/8}, L_{1/16}, L_{1/32}) were prepared in the same diluting fashion as for the 1/2 mixture. It spent 30 ~ 40 minutes for preparation of those mixtures. Na and Cl ion concentration in those mixtures were measured duplicated with the dry (D) and the wet (W) method, respectively, and whole measurement was performed within approximately 80 ~ 100 minutes. For measurement with D method, VITROS250™ (Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, N.Y. U.S.A.) was used and TBA-200FRNEO™ (Toshiba Medical System Corp. Ohtawara, Tochigi) was used for W method. On every study day, the 0.83 % saline with and

without the albumin were prepared and used for reference measurement of electrolyte ion concentration by D and W method, respectively. Estimated concentrations of electrolyte ion in the L₁ and serially diluted mixtures were calculated by simple, mathematical dilution equation. Incidentally (1 - 0.52) was used as ratio of outer water volume of liposome vesicles in original, undiluted liposome emulsion for the equation, since liposomecrit was determined as 52 % with the ultracentrifugation.

The human albumin powder supplied from Sigma-Aldrich company contains a few amount of Na not accompanied with Cl ion⁹⁾. We measured Na ion concentration in the 0.84 % saline with 4 % albumin and obtained 150.0 ± 1.5 mEq/L for it by D method and 143.9 ± 1.3 mEq/L by W method.

These experimental procedures were performed in Osaka Prefecture Saiseikai Noe Hospital on five separate days. Mean and standard deviations for actually measured value (Am ± SD) its corresponding estimated value (Em ± SD) and difference (Dm ± SD) between the actually measured value and the estimated value for each measurement of the mixtures were listed in Table 1. Difference between ion concentration measured by D method and by W method for each mixture, was listed in Table 2. In Table 3, difference between Na and Cl ion concentration in the same mixture measured by D method and W method was listed, respectively. Student t-test was used for statistical analysis and p < 0.05 was evaluated as significant difference.

Results

Regarding to Na ion concentration, in general, actually measured values were lower than their estimated values for each using either D method or W method. This trend was noted markedly and significantly in L₁ and L₂. As shown in Table 1., actually measured Na ion concentration was 24.8 ± 0.8 mEq/L in L₁ and 2.9 ± 0.6 mEq/L in L_{1/2} less than each corresponded estimated value by D method, respectively. The similar trend that the actually measured value was 27.9 ± 1.4 less in L₁ and 2.0 ± 1.0 mEq/L less in L_{1/2} than its corresponded estimated value was noted with W method. Every actually measured value of Na ion concentration in L_{1/8} ~ L_{1/32}, however, did not differ significantly from each estimated value not regarding to the methods used for measurement.

Actually measured Cl ion concentration in L₁ by D method was 109.5 ± 0.7 mEq/L and differed 34.2 ± 0.7 mEq/L from its estimated value. This difference was significantly greater compared with other differences for L_{1/2} ~ L_{1/32} ranged within 7.2 ± 0.7 ~ 4.4 ± 4.4 mEq/L. The similar trend

Table 1. Na and Cl ion concentration actually measured by D and W method, its estimated value and difference between actually measured and estimated value

| | | L ₁ | L _{1/2} | L _{1/4} | L _{1/8} | L _{1/16} | L _{1/32} |
|----|---------|----------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Na | Am ± SD | 123.7 ± 0.8 | 135.9 ± 0.8 | 142.2 ± 1.0 | 145.5 ± 1.0 | 147.1 ± 1.2 | 147.8 ± 1.1 |
| | Em ± SD | 148.5 | 138.9 ± 0.3 | 143.5 ± 0.4 | 146.2 ± 0.5 | 147.8 ± 0.5 | 148.6 ± 0.6 |
| | Dm ± SD | -24.8 ± 0.8 | -2.9 ± 0.6 | -1.3 ± 0.9 | -0.8 ± 0.8 | -0.7 ± 0.8 | -0.8 ± 0.6 |
| | Am ± SD | 116.0 ± 1.4 | 130.1 ± 1.2 | 137.1 ± 1.0 | 140.6 ± 1.3 | 142.2 ± 1.1 | 143.1 ± 1.3 |
| | Em ± SD | 143.9 | 132.1 ± 0.6 | 137.6 ± 0.5 | 140.6 ± 0.5 | 142.3 ± 0.6 | 143.1 ± 0.5 |
| | Dm ± SD | -27.9 ± 1.4 | -2.0 ± 1.0 | -0.5 ± 0.5 | 0.0 ± 0.9 | 0.0 ± 0.7 | 0.0 ± 0.8 |
| Cl | Am ± SD | 109.5 ± 0.7 | 122.1 ± 0.9 | 127.9 ± 0.6 | 131.5 ± 0.5 | 132.6 ± 0.7 | 133.4 ± 0.8 |
| | Em ± SD | 143.7 | 129.3 ± 0.3 | 133.7 ± 0.4 | 136.1 ± 0.3 | 137.8 ± 0.3 | 138.2 ± 0.3 |
| | Dm ± SD | -34.2 ± 0.7 | -7.2 ± 0.7 | -5.8 ± 0.5 | -4.5 ± 0.4 | -5.2 ± 0.6 | -4.8 ± 0.7 |
| | Am ± SD | 108.7 ± 0.9 | 123.3 ± 0.7 | 130.7 ± 0.7 | 134.1 ± 0.6 | 136.1 ± 0.7 | 136.8 ± 1.0 |
| | Em ± SD | 148.5 | 128.9 ± 0.4 | 134.3 ± 0.3 | 137.4 ± 0.3 | 139.0 ± 0.3 | 139.9 ± 0.4 |
| | Dm ± SD | -39.8 ± 0.9 | -5.6 ± 0.8 | -3.6 ± 0.4 | -3.3 ± 0.5 | -2.9 ± 0.4 | -3.1 ± 0.8 |

Am ± SD : mean of actually measured value ± standard deviations

Em ± SD : mean of estimated value ± standard deviations

Dm ± SD : mean of difference between actually measured and its estimated value ± standard deviations

n = 10

unit : mEq/L

D : D method W : W method

was noted in Cl ion concentration differences measured by W method, namely difference of 39.8 ± 0.9 mEq/L for L₁ which was significantly greater than those for L_{1/2} ~ L_{1/32} ranged within 5.6 ± 0.4 ~ 2.9 ± 0.4 mEq/L.

As shown in Table 2, every Na ion concentration measured by D method was higher than that by W method. Difference between the both methods ranged within 7.7 ± 1.9 ~ 4.7 ± 1.8 mEq/L for Na ion concentration. Difference of 7.7 ± 1.9 mEq/L in L₁, however, was much greater compared with differences for other mixtures. On the other hand, no significant difference for Cl ion concentration was observed in the L₁. The differences for Cl ion concentration in L_{1/2} ~ L_{1/32} measured by D method ranged within -1.2 ± 0.7 ~ -3.5 ± 0.8 mEq/L and were significantly less than those by W method.

We added human albumin powder in the liposome

Table 2. Comparison of ion concentrations measured by D and W method
Difference between Na ion concentrations measured by D and W method
Difference between Cl ion concentrations measured by D and W method

| | L ₁ | L _{1/2} | L _{1/4} | L _{1/8} | L _{1/16} | L _{1/32} |
|-----------------------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Na _D - Na _W | 7.7 ± 1.9 | 5.8 ± 1.9 | 5.1 ± 1.6 | 4.9 ± 1.9 | 4.8 ± 1.8 | 4.7 ± 1.8 |
| Cl _D - Cl _W | 0.8 ± 1.2 | -1.2 ± 0.7 | -2.8 ± 0.7 | -2.6 ± 0.8 | -3.5 ± 0.8 | -3.4 ± 0.7 |

Na_D : Na ion concentration measured by D method

Na_W : Na ion concentration measured by W method

Cl_D : Cl ion concentration measured by D method

Cl_W : Cl ion concentration measured by W method

n = 10

mean ± standard deviations

unit : mEq/L

emulsion and the serial mixtures. This procedure increased Na ion concentration in every mixture. Therefore Na ion concentration was higher than Cl ion concentration in the same mixture as shown in Table 1. Differences between Na ion and Cl ion concentration in each mixture as shown in Table 3 were ranged within 13.8 ± 1.2 ~ 14.5 ± 0.9 mEq/L with D method and 6.1 ± 0.6 ~ 7.4 ± 0.9 with W method. The latter values were less than former significantly. Those differences dispersed in relatively narrow range with each method and no significant difference was noted between each values, respectively.

Table 3. Difference between Na and Cl ion concentration for serial mixtures measured by D and W method, respectively

| | L ₁ | L _{1/2} | L _{1/4} | L _{1/8} | L _{1/16} | L _{1/32} |
|---|----------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| D | 14.2 ± 0.8 | 13.8 ± 1.2 | 14.3 ± 1.0 | 14.0 ± 0.8 | 14.5 ± 0.9 | 14.4 ± 0.9 |
| W | 7.4 ± 0.8 | 6.9 ± 0.7 | 6.4 ± 0.6 | 6.5 ± 0.9 | 6.1 ± 0.6 | 6.3 ± 0.8 |

n = 10

mean ± standard deviations

unit : mEq/L

D : D method W : W method

Discussion

Actually measured values for Na ion concentration measured by the D method, in general, were higher than those by the W method. On the other hand, values measured for Cl ion by the D method were lower than those by the W method. And actually measured values for L₁ mixture differed considerably greater from its corresponded estimated value. These differences for L₁ were greater than those for other mixtures not regarding to either ions or methods used. The similar trend was observed in the previous study⁸⁾. Those differences might be explained as interference with liposome vesicles contaminated in serum to polarographic measurement. Difference between the actually measured value and its estimated value became smaller corresponding to dilution of the liposome emulsion from the 1/2 to 1/32 mixture as shown in Table 1. It might be interpreted that less mixing of the liposome vesicle interfered less to electrolyte ion measurement with the polarographic method. Those changes in the differences, however, appeared in most similar fashion with either the D or W method. In addition differences between Na and Cl ion concentration in same mixtures were limited in relatively narrow range with either D or W method as shown in Table 3. Differences between the actually measured and its estimated value either by D or W method were most similar for every mixture. Therefore reliability upon the both methods could be evaluated likely most equivalent.

The relatively large difference between the actually measured value and its estimated value noted in the L_1 and $L_{1/2}$ mixture has never clarified in the previous and this study. However it was explained hardly for interference with liposome vesicles on polarographic measurement alone. It could not be excluded that the dilution equation to calculate estimated value was not fully adjusted. In the equation we used $(1 - 0.52)$ as water volume rate in outer phase of vesicles of the liposome emulsion. We wonder, however, whether or not the ratio of $(1 - 0.52)$ was exact value of the water volume in outer phase of liposome vesicles in the emulsion. The liposomecrit of 52 % was determined by ultracentrifugation with 100,000 G. Regarding to this procedure, it was not warranted that the centrifugal force would drive out sufficiently water in void space among the vesicles and it would be suspected that much water volume more than $(1 - 0.52)$ ratio would remain in sedimented liposome mass. We might assume that such nano sized vesicles had little deformability against extremely strong compressive force, such as 100,000 G.

Other possibility can be postulated that the vesicle would be very elastic and compressible. If so, centrifugating power was sufficient to compress vesicles and formed liposome layer on bottom of vessel showing absolute liposomecrit during the centrifugation. However, the layer would reexpand by membrane elasticity of vesicle during centrifugating power was reducing and was fixed at 52 % after the power was released. Therefore liposomecrit measured after the centrifugation would be recognized higher than that during the centrifugation. HbVcrit, vesicle mass rate of the HbV which was manufactured by the same preparing process as that for the liposome used in this study, has been defined approximately 30 %¹⁰⁾. This value was slightly lower than 36 % of the liposomecrit estimated from the actually measured value in this study. It is presumed that liposome membrane of the HbV possesses lower lamellarity. Since hemoglobin as electrolyte shields the electric repulsion between lipid bilayer membranes when hemoglobin solution was encapsulated in the vesicle. Based on the HbVcrit, we estimated values of Na and Cl ion concentration in serum containing the HbV and fit them to actually measured values relatively better, respectively, in the previous study⁸⁾. In addition, data⁸⁾ that the HbV has been composed with 9.74 g/dL of hemoglobin and 6.65 g/dL of phospholipid may support the above value of HbVcrit.

Regarding to the difference between the actually measured value and its estimated value, which was noted particularly greater in the L_1 and $L_{1/2}$, we could assume that distilled water encapsulated in the vesicle permeated through

liposome membrane by osmosis after the mixing the liposome emulsion with mixture of the 0.84 % saline of 2.0 ml and 1.68 % saline of 1.2 ml. Liposome membrane was documented as a semipermeable membrane by Chang¹¹⁾. Diffusion coefficient varies certainly depending upon its membrane composition and upon physicochemical properties of solutions in inside and outside of the membrane. In this study, measurement of Na and Cl ion concentration was carried out at 30 ~ 40 minutes after preparation of the mixtures. Such interval is considered sufficient to move water through the semipermeable membrane of liposome.

In the previous study⁸⁾ we reported that a trace amount of potassium ion was noted in the HbV. In preparation of the HbV, hemoglobin solution which obtained from hemolysed red cells was encapsulated in liposome vesicle accompanying with intracellular potassium (K) of red cells. The vesicles were rinsed several times with physiological saline after the encapsulation and excess hemoglobin and K outside of the vesicle were removed. The K encapsulated inside of the vesicle would partially diffuse out during the rinsing but not all. Therefore we anticipated that K remained inside might diffuse out through the liposome membrane during storage. In this study, however, we did not attempt to observe the above K ion diffusion through the liposome membrane. Either analyzer mounted D or W method is provided for measurement of electrolyte ion concentration in serum in practice and can be adopted for measurement of K ion concentration between 1.0 ~ 10.0 mEq/L with the W method and 1.0 ~ 15.0 mEq/L with the D method. Therefore accuracy with K ion concentration measurement is less than 1/10 ~ 1/20 that with Na ion. For this reason we used a single saline solution without K ion in this study. However either Na or K ion is monovalent ion. Therefore K ion is assumed to move most likely through a semipermeable membrane as same as Na does.

There were some limitations in this study. Analyzer, VITROS250™ for D method and TBA-200FRNEO™ for W method, both are essentially provided for measurement of samples obtained in clinical practice but not for saline or unphysiological solution, such as liposome emulsion. While we added human albumin powder in the mixtures simulating human serum, it might be not fully adjusted to their proper use. Actually measured Cl ion concentrations in 0.84 % saline, such as 134.5 ± 0.6 by D method or 137.5 ± 0.2 mEq/L by W method, was considerably less than estimated value of 143.7 mEq/L respectively. Therefore apprehension that those analyzers had been essentially inadequate for this study remained.

In the second, any data for an accurate amount of Na

contained in the human albumin powder used in this study have not been informed from Sigma Adrich company. We dissolved the albumin powder at 4 % in 0.84 % saline and obtained Na ion of 150.0 ± 1.5 mEq/L by D method and 143.9 ± 1.3 mEq/L by the W method. Subsequently we subtracted 143.7 mEq/L (essential Na ion concentration for 0.84 % saline) from the measured values and we anticipated Na ion concentration associated with 4 % albumin alone as 6.3 mEq/L by D method and 0.2 mEq/L by W method.

Conclusion

It was concluded that liposome vesicles contained in serum per se does not interfere essentially to measurement of Na and Cl ion concentration by either the dry method with VITROS250™ or the wet method with TBA-200FRNEO™. Therefore the limited capacity associated with the wet method noted in the previous study⁸⁾ was not clearly elucidated. It was suggested, however, possibly that coexistence of hemoglobin and liposome vesicle could limit the capacity with W method for measurement of electrolyte ion concentration in the serum.

The marked differences between actually measured value and its corresponded estimated value, noted particularly for the L_1 , might attribute to the accuracy of determination of liposomecrit or to the water movement across the liposome membrane.

Acknowledgement

This study was supported by the Grant for Japanese Ministry of Health, Welfare and Labor Research Project " Clinical Applications of Artificial Oxygen Carrier H18-Drug Innovation H18-General-022 ".

References

1. Callas DD, Clark TL, Moreira PL, Lansden C, Gawry MS, Kahn S, Bermes EW Jr. In vitro effects of a novel hemoglobin-based oxygen carrier on routine chemistry, therapeutic drug, coagulation, hematology, and blood bank assays. Clin Chem 1997; 43: 1744-1748.

2. Wolthuis A, Peek D, Scholten R, Moreira P, Gawry M, Clark T, Westhuis L. Effect of the hemoglobin-based oxygen carrier HBOC-201 on laboratory instrumentation : Cobas integra, Chiron blood gas analyzer 840, Sysmex SE-9000 and BCT. Clin Chem Lab Med 1997; 37: 71-61.
3. Jahr, JS, Osgood S, Rothenberrg S, Li QL, Butch AW, Osggod R, Cheung A, Driessen B. Lactate measurement interference by hemoglobin-base oxygen carriers (Oxyglobin™, Hemopure™, and Hemolink™) Anesth Analg 2005; 100: 431-437.
4. Bjorkholm M, Fabrell B, Przybelski R, Winslow N, Young M, Winslow RM. A phase I single blind clinical trial of a new oxygen transport agent(MP4) human hemoglobin modified with maleimide -activated polyethylene glycol. Haematologica 2005; 90: 505-515.
5. Miyake S, Ohashi Y, Takaori M. Blood type determination for blood which contains hemoglobin based artificial oxygen carrier : Special reference to automated analyzer Artif Blood 2007; 15: 85-89.(in Japanese)
6. Ali AA, Ali GS, Steinke JM, Shepherd AP. Co-oximetry interference by hemoglobin-based blood substitutes Anesth Analg 2001; 92: 863-869.
7. Murata M, Komine R. Effects of hemoglobin vesicles on blood cells, blood coagulation and fibrinolysis. Report for Japanese Ministry of Health, Welfare and Labor Research Project " Studies on improvement on safety of Artificial Oxygen Carrier H17-Regulatory Science for Medical Drug & Instrument - 074 " with Chief Investigator Kobayashi K. April 2006 p: 34-40.(in Japanese)
8. Miyake S, Takemura J, Takaori M. Determination of electrolyte concentrations in serum containing cellular artificial oxygen carrier(HbV)Artif Blood 2010; 18: 3-8.
9. Report from Sigma-Aldrich. Jan. 2010.
10. Tsuchida E. personal communication. Aug. 2004.
11. Chang TMS. Semipermeable aqueous microcapsules (artificial cells)with emphasis on experiments in an extracorporeal shunt system. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1996; 12: 13-19.

リポソーム粒子を含む血清での電解質イオン濃度測定

三宅誠司¹⁾, 武村次郎¹⁾, 酒井宏水²⁾, 高折益彦³⁾

1) 大阪府済生会野江病院検査科

2) 早稲田大学理工学研究所

3) 東宝塚さとう病院

和文要約 以前発表した論文に臨床検査の対象となる血清に人工酸素運搬体の一つである liposome encapsulating hemoglobin vesicle (HbV) が一定濃度以上含まれると従来の電極法, wet 法 (W 法) を用いての血清電解質測定が不可能になることが認められると発表した。今回, その機序を解明するために蒸留水を包埋した liposome 微粒子分散液を 1.16 % 食塩液と容量比において 38.5 % に混合, そしてこの混合液, さらにその 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 の希釈液, すべてにその濃度が 4 % となるように人アルブミンを添加した。そしてこれら混合液についてその Na, Cl 濃度を W 法, ならびにドライ法 (dry chemistry method) を用いて測定した。その結果ではそれぞれの測定法にて測定した各混合液での Na イオン濃度と Cl イオン濃度との差, また測定した各混合液での Na, あるいは Cl イオン濃度の測定法にともなう差はすべてそれぞれ一定の範囲内にあった。それゆえにそれぞれの測定法に適合した補正法の必要性は認められるが, それぞれの測定法での血清電解質 (Na, Cl イオン) 測定は可能であると認められた。すなわち少なくとも liposome それ自身による測定法への干渉はないと認められた。そのためすでに発表した論文にて示された一定濃度以上の HbV の混入血清での W 法によって生じた測定上の誤差は liposome 単独の影響に包埋された hemoglobin の影響が加わることで生じたものと推定した。また今回の実験結果をふまえて超遠心法にて測定された liposome のエマルジョン内での容量比 (liposomecrit), 実験中における liposome 膜を介しての水分子の拡散性についても考察した。

人工赤血球を用いた脳酸素代謝測定

Measurement of cerebral oxygen metabolism using artificial RBC

岡沢秀彦, 清野 泰, Vijay Narayan Tiwari, 森 哲也, 小林正和, 藤林靖久

Hidehiko Okazawa, Yasushi Kiyono, Vijay Narayan Tiwari,

Tetsuya Mori, Masato Kobayashi, Yasuhisa Fujibayashi

和文抄録

現在脳酸素代謝測定は、 ^{15}O 標識酸素 ($^{15}\text{O}_2$) ガス吸入によるポジトロンCT (PET) 検査で行われているが、測定法開発当初は $^{15}\text{O}_2$ 標識赤血球を頸動脈内投与する侵襲的な方法で計測された。 $^{15}\text{O}_2$ ガス吸入による検査法が確立されて以降、頭部断層画像での非侵襲的計測が可能となったが、様々な問題により、脳酸素代謝測定を実施する施設は年々減少している。PET による新たな脳酸素代謝測定法として、人工赤血球に $^{15}\text{O}_2$ を標識する計測法を現在開発中であるので、その一部を紹介する。

Abstract

Injectable $^{15}\text{O}_2$ labeling system was developed using hemoglobin-containing vesicles (HbV) a type of artificial red blood cell, and a simple bubbling method. L-cysteine was added as a reductant to protect hemoglobin molecules from HbV oxidation. Measurement of cerebral blood flow (CBF) and metabolic rate of oxygen (CMRO₂) in five normal rats was performed using a small animal PET scanner after the injection of H_2^{15}O and $^{15}\text{O}_2$ -labeled HbV ($^{15}\text{O}_2$ -HbV) to evaluate the precision of hemodynamic parameters quantitatively. The most efficient method for labeling was bubbling of $^{15}\text{O}_2$ combined with vortexing and the addition of 2.8 mM or greater L-cysteine in HbV solution. The mean radioactivity of 214.4 ± 7.8 MBq/mL $^{15}\text{O}_2$ -HbV was obtained using this method. PET scans using $^{15}\text{O}_2$ -HbV and H_2^{15}O yielded a mean CMRO₂ value of 6.8 ± 1.4 (mL/100g/min) in rats with normal CBF of 51.4 ± 7.9 (mL/100g/min). The present injectable $^{15}\text{O}_2$ -HbV labeling system was successfully utilized to measure CMRO₂ in rats, indicating that this new method could be useful for animal models to measure oxygen metabolism in the brain.

Keywords

Hemoglobin-vesicle (HbV) Cerebral metabolic rate of oxygen; Injectable $^{15}\text{O}_2$; Positron emission tomography (PET) L-cysteine.

1. はじめに

放射性同位元素 (RI) を利用した脳酸素代謝測定は、通常 ^{15}O 標識酸素 ($^{15}\text{O}_2$) ガスを用いたポジトロンCT (PET) 検査で行われている。多くの人々はPET 酸素代謝測定法開発当初から $^{15}\text{O}_2$ ガスの吸入法が用いられていると認識しているかもしれないが、実際には $^{15}\text{O}_2$ をヘモグロビン (赤血球) に結合させ、動脈内投与する方法で測定された。この検査法は、米国ワシントン大学 (セントルイス) の Ter-Pogossian 等によって始められ、1970年に論文として報告された¹⁾。その後 $^{15}\text{O}_2$ ガスを一定の濃度で吸入させるガス定常法が開発され、比較的容易かつ非侵襲的に計測可能となった²⁾。しかし、患者の呼吸状態に測定結果が影響されたり、最近特に厳しくなったPET 管理区域で

の非密封RI取り扱い規制等による、放射性ガスの厳しい使用制限など様々な理由により、脳酸素代謝測定を実施する施設は年々減少している。臨床上 $^{15}\text{O}_2$ ガスPET 検査の有用性は十分に認識されており、普及のためにはより簡便かつ扱いやすいトレーサーによる検査法の開発が望まれている。

新たな脳酸素代謝測定法として、我々は人工赤血球を用いた計測法を開発中であるので、その一部を紹介する。「人工酸素運搬体」という名称を用いず、「人工赤血球」としているのは、赤血球に標識するRIガスが $^{15}\text{O}_2$ のみでなく、一酸化炭素も ^{15}O 標識 (C^{15}O) して検査に用いるためである。 ^{15}O 標識水 (H^{15}O) あるいは ^{15}O 標識二酸化炭素 (C^{15}O_2) による脳血流検査も合わせ、これら3種類のトレーサーを全て用いて定量画像化するこ

〒910-1193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23-3 福井大学高エネルギー医学研究センター

Biomedical Imaging Research Center, University of Fukui, 23-3, Matsuoka-Shimoaizuki, Eiheiji-cho, Yoshida-gun, Fukui 910-1193, Japan.

論文受付 2010年8月4日 論文受理 2010年8月19日

とで、はじめて正確なPET 脳酸素代謝測定が可能となる。

2. 脳酸素代謝測定の歴史

1940年代後半にKetyとSchmidtにより、ヒト生体内での脳循環代謝測定が開始された。内頸動脈・内頸静脈の両方にカテーテルを留置し、動静脈の酸素分圧計測および拡散型トレーサーである N_2O (nitrous oxide) を用いた脳血流量測定から酸素代謝を定量化する方法であるが^{3,5)}、この方法では脳全体での血流・酸素代謝が計測できるのみである。その約20年後、Ter-Pogossian等は内頸動脈から H_2^{15}O および ^{15}O 標識赤血球を投与し、頭部にシンチレーション・プローブを配置することで、患者の酸素代謝を計測することに成功した¹⁾。この方法により初めて脳局所の酸素代謝がヒトで計測可能となった。これは、現在も行われているPETによる脳酸素代謝測定の原型ともいえる。彼らが開発した方法では、患者本人からの採血により血液を採取し、放射性 ^{15}O ガスの単純なパブリングにより1mCi (37MBq)/mLの標識効率が得られたと報告されている。同時に H^{15}O_2 、 C^{15}O を用いた測定も行われており、ほぼ現在の ^{15}O -PETによる脳循環代謝検査と同様のRIを用いた検査が行われていたことになる^{1,6-8)}。

その後1970年代中頃から、酸素代謝測定は $^{15}\text{O}_2$ 、 C^{15}O_2 を一定濃度の希ガスとして順次吸入させる定常法が主流となり⁹⁾、赤血球に $^{15}\text{O}_2$ ガスを標識して血管内投与するTer-Pogossian等の手法は用いられなくなった。1980年にはFrackowiak等がガス定常吸入法による脳血流酸素代謝定量法の基礎を完成させ¹⁰⁾、その後さらに様々な補正法が加えられ、現在我が国で最も一般的となっているPET脳循環代謝計測法が確立された。

しかし上述のごとく、患者の呼吸による変動や放射性ガストレーサーの取り扱いなど様々な問題があり、 ^{15}O -PET検査は次第に検査件数が減少している。また、動物実験においては、気道と脳が非常に近接し、同一断面内に高濃度の放射性ガスが存在するために大きな誤差の原因となるなど様々な問題がある。これらの問題を解決するためには、Ter-Pogossian等が行った、血管内投与可能なトレーサーでの検査が理想的である。Magata等は、人工心肺を用いた赤血球への $^{15}\text{O}_2$ 標識という斬新な方法により、動物用PETを用いた実験でラット脳の酸素代謝測定を可能とした^{11,12)}。放射性ガスの標識効率を向上させるため、通常の2倍の流路を有する人工心肺を用いた $^{15}\text{O}_2$ 標識法を開発するなど、安定した計測が可能となったが、流路の延長は循環させる血液量を増加させる必要があり、一匹の個体を検査するために何匹かのラットから血液のみを採取する必要がある。また、この方法はヒトへの応用という点でも問題が多い。

我々は、ヒトでの脳酸素代謝計測も視野に入れ、人工赤血球を用いた無菌状態での ^{15}O -gas標識法を開発し、ラットでのPET計測を可能としたので、その方法を紹介する¹³⁾。

3. 人工赤血球を用いた $^{15}\text{O}_2$ ガス標識法

人工酸素運搬体としては、ヘモグロビンの重合体が既に市販されており、米国OPK Biotech社が動物用医薬品として

Oxyglobin[®]、ヒト用酸素運搬製剤としてHemopure[®]を製造販売している。これは以前Biopure社が製造販売していた製品で、現在はOPK Biotech社が販売権を有している。いずれもウシ (bovine) の赤血球から作られた製剤であり、BSE問題のため輸入等に関しては制限が厳しい。国内での人工酸素運搬体開発はテルモ社と早慶グループで行われているが、いずれも一般臨床では用いられておらず、研究開発段階である。これらの製剤は、輸血用あるいは脳梗塞時の治療薬としての利用が検討されている¹⁴⁻¹⁶⁾。我々は後者が開発したhemoglobin vesicle (HbV)を用い¹⁷⁾、 ^{15}O -gas標識による酸素代謝計測への応用を試みた。HbVは直径約250nmのリボソーム内にヒト・ヘモグロビンが包まれた製剤で、ヒト赤血球と比較するとかなり小さい (図1)。

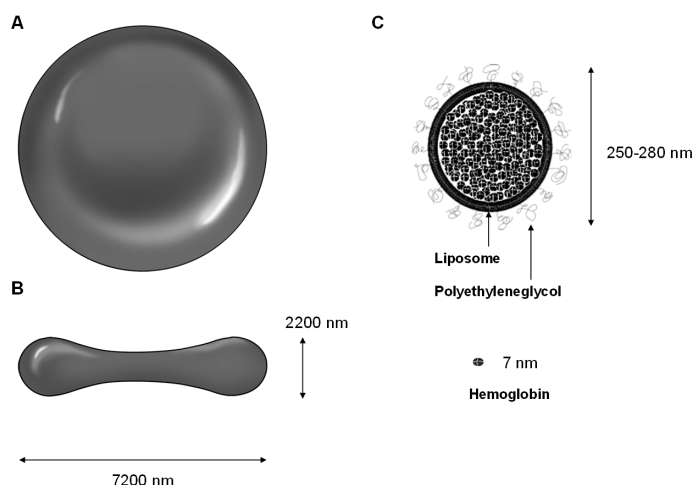


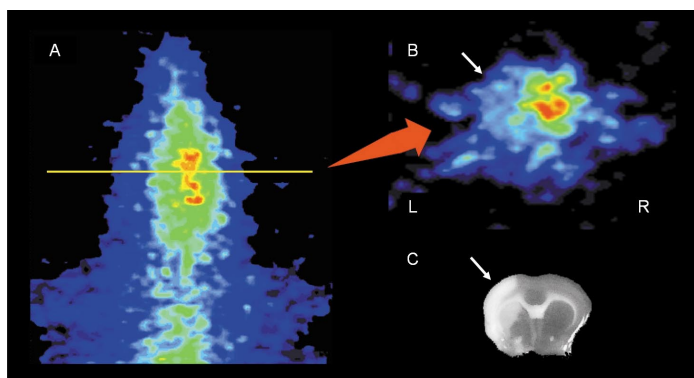
図1. A, B: ヒト赤血球の形状およびサイズ. C: 人工赤血球 (HbV) の形状およびサイズ (Oxygenix社パンフレットより), liposome内にhemoglobinが充満している。

我々は当初、Ter-Pogossian等がヒト赤血球を用いて行ったように、単純なパブリングでの ^{15}O -gas標識を試みたが、PET検査に利用するには不十分な標識効率であった。現在ヒトのPET検査では、脳血流量測定に約740MBqの H_2^{15}O を投与している。 $^{15}\text{O}_2$ の吸入の際も、これに匹敵する血中濃度が望まれるので、流速約350MBq/minの一定速度での吸入か、または流速1000～1500MBq/minでのボラス吸入によるRI投与が行われる。Ter-Pogossian等が達成した標識効率では、計算上約20mL以上の赤血球を急速に静脈内投与する必要があり、あまり実際的ではない。彼らの測定法は $^{15}\text{O}_2$ 標識赤血球を直接頸動脈内投与し、かつ断層画像でなくシンチレーション・プローブでのカウントのみの計測であったため、あまり高い比放射能を必要としなかったであろう。ヒトのPET検査に用いるためには、約5 mL程度の赤血球に700MBq以上の $^{15}\text{O}_2$ 標識が望ましいと考え、3倍以上の標識効率が必要となる。この問題は、HbVに還元剤であるL-cysteineを加えて前処置することで解決された¹³⁾。前日に約3 mMのL-cysteine加えておくと、ボルテ

ックス・ミキサーで撹拌しながら $^{15}\text{O}_2$ をバブリングすることで、平均約 200 MBq/mL の $^{15}\text{O}_2$ 標識 HbV が得られた。O-15 の半減期（約 2 分）や自動投与装置へのセットアップ時間等を考慮しても、ほぼ十分な放射濃度が得られたといえる。

H_2^{15}O 、 $^{15}\text{O}_2$ を用い、小動物用 PET 装置（SHR41000）で撮像したラット脳血流量、酸素代謝画像を提示する（図 2）。あまり良好な画質ではないが、脳梗塞モデル動物の梗塞部を反映した低血流・低酸素代謝部位が描出されている。病変局所の血流・酸素代謝計測には十分な画像である。脳血流量は平均 51.4 ± 7.9 (mL/min/100g)、酸素代謝率で平均 6.8 ± 1.4 (mL/min/100g) という結果が得られ、ほぼ従来のラット脳血流代謝測定結果と一致していた。この検討で酸素代謝率がやや高い定量値となったのは、 C^{15}O を用いた血液量計測を省略し、血液量補正（血管内にある放射能の補正）を行わなかったことも原因の一つと考えられる。現在は持続定常投与法による H_2^{15}O 、 C^{15}O -HbV、 $^{15}\text{O}_2$ -HbV PET を同一個体で順次行う full study を検討中であり、小動物での安定した脳循環代謝計測法の確立を目指している¹⁸⁾。また、虚血性疾患では梗塞を含む病変部における血管径の変化が予想され、図 1 に示されるような生体内の赤血球と HbV とのサイズの違いが $^{15}\text{O}_2$ -HbV PET による酸素代謝画像に反映されるか興味深い点である。人工酸素運搬体による治療効果との関連も含め、今後の詳細な検討が期待される。

過去の報告で、同様に $^{15}\text{O}_2$ 標識人工赤血球（liposome-encapsulated Hb = LEH）を PET 撮像に用いた検討があるが、彼らの検討では酸素が LEH により脳内へ運搬されることを確認したのみで、酸素代謝の定量測定は行われていない¹⁹⁾。ラット赤血球への標識と比べ半分以下の標識効率であったと報告されているが、L-cysteine 処理等は行われていなかったと思われる。



$^{15}\text{O}_2$ -HbV PET 画像

図 2. ^{15}O 標識 HbV で撮像した左中大脳動脈閉塞モデルラットの PET 画像（A: 冠状断, B: 横断）および脳切片の 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色 (C)。白矢印は梗塞部位を示す。

4. 脳血管障害における脳酸素代謝測定の意義

1980 年代に Powers 等により、閉塞性脳血管病変による虚血時脳循環動態の仮説モデルが提唱され、障害の病期が分類された²⁰⁾。正常で 40% 前後とされる酸素摂取率 (OEF) は、脳内灌流圧の低下に伴って上昇し、貧困灌流 (misery perfusion) と呼ばれる血行動態の機能不全状態となる（図 3）。この状態は stage II の脳虚血とされ、脳外科的バイパス術のよい適応期と考えられた。外頸動脈系と頭蓋内の内頸動脈系とのバイパス吻合術 (=EC-IC bypass) の有効性は、1985 年に発表された大規模調査での報告により残念ながら有効性を一時否定された²¹⁾。しかしその後の検討により、この調査でバイパス術施行群と経過観察群の間に有意な予後の違いが認められなかった原因は、対象となる患者を適切に選択していなかったためであることが分かり、その意義が見直されている。山内等は片側性脳血管障害の患者を追跡調査することで、貧困灌流を呈した患者群が、貧困灌流のない患者群と比べ、有意に梗塞再発率が高いことを示した²²⁾。その後我が国では、脳外科医が中心となって JET (Japanese EC-IC bypass Trial) study を実施し、stage II の脳虚血と診断された患者においては、手術群が内科的治療群より梗塞再発率が有意に低いと報告した^{23, 24)}。この研究はコホート調査によるバイパス手術の有効性を再検討した試みであり、エビデンスとしての価値は高い。2009 年に改訂された脳卒中ガイドラインでも、EC-IC バイパス術は貧困灌流を伴う患者において、エビデンスの高い治療として評価されている (Grade B)。しかし、JET study で判定法として採用されたのは SPECT での脳血流検査であり（後述）、直接酸素代謝を測定して貧困灌流の状態を確認した訳ではない。これに対し、米国で行われている COSS (carotid occlusion surgery study) では、 ^{15}O -PET でバイパス術の適応を決めており、本来の目的により即したプロトコルとなっている。

ヒトでの ^{15}O -PET 検査は通常 $^{15}\text{O}_2$ ガスによる検査以外に C^{15}O または H_2^{15}O による脳血流 (CBF) 画像、 C^{15}O による血液量 (CBV) 画像を全て撮像することで、はじめて定量性の高い酸素代謝画像を計算することができる（図 4）。 $^{15}\text{O}_2$ ガス PET 撮像時の動脈血放射能計測値と PET 画像データおよび CBF、CBV 画像を用いて OEF を計算し、これに CBF と血中 O_2 濃度 (aO_2c) を乗じたものが酸素消費量 (CMRO_2) となる ($\text{CMRO}_2 = \text{OEF} \cdot \text{CBF} \cdot \text{aO}_2\text{c}$)。ヒトの脳での酸素代謝正常値は $\text{CMRO}_2 =$ 約 3-4 mL / 100g/min ($\approx 100 \mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$) とされている²⁵⁾。現在我が国で最も一般的に行われているのは ^{15}O -gas 定常吸入法で、通常 1 セットの ^{15}O -PET 検査に約 1 時間要する。これをボーラス投与法にすることで、約 30-40 分に短縮可能であり、さらに採血を行わない簡略法にすると、約 20 分程度の検査時間で循環動態の判定が可能となる^{26, 27)}。JET study で一般化して以来、比較的普及している SPECT 脳血流検査での血行動態判定法では、安静時と血管拡張剤（ダイアモックス）負荷後の 2 回、脳血流を定量測定する必要があり、同日に両方の検査を続けて行う場合でも検査時間は 1 時間以上となる。施設によっては安静時および負荷時の計測を 2 日に分けて

行うところもある。また、酸素代謝による OEF 上昇 (= 貧困灌流) と、血管拡張によるダイアモックス負荷時の血管反応性低下が、必ずしも一致する病態とは言えないことも報告されている²⁸⁾。HbV 等人工赤血球を用いた血管内投与による安定した酸素代謝計測法が確立すれば、SPECT より短時間でより精度の高い病態評価が可能となる。そうした意味でも、ヒトへの応用は臨床的有用性が高い。また、モデル動物における実験においても、脳梗塞・虚血性病変に対する薬剤の効果判定等に役立つ有意義な計測法と言える。

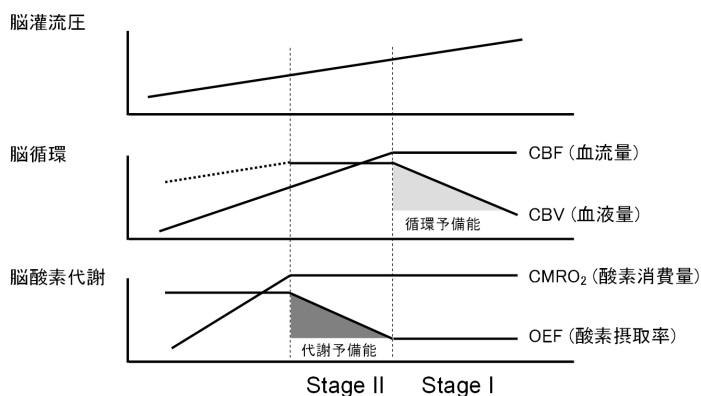


図3. 脳主幹動脈の閉塞性病変に伴う脳灌流圧の低下と、それに伴う循環・酸素代謝の変化を示した模式図。Stage Iの状態では、血管が拡張して脳血流量が維持される (autoregulation)。C¹⁵Oで計測される血液量の上昇が血管の拡張を示す。血管拡張による代償が限界に達すると、血流量は次第に低下するが、次は酸素摂取率を上昇させて酸素消費量を維持する代償が働く。この状態を貧困灌流 (miserable perfusion) と呼び、脳梗塞の発生率が有意に上昇する。

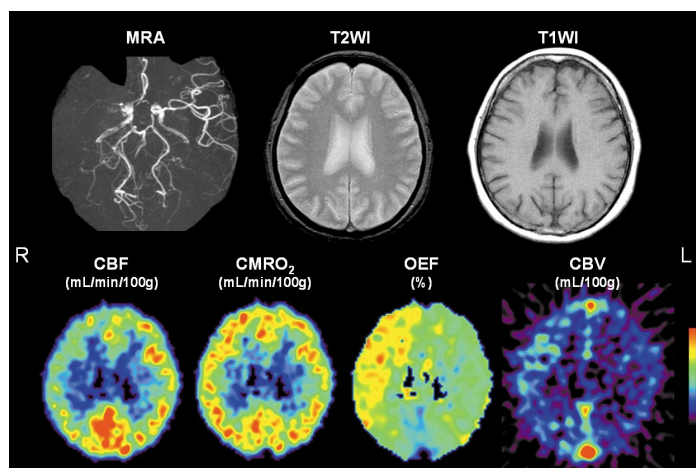


図4. 右中大脳動脈 (MCA) 閉塞症患者 (57才) のMRI (上段) および¹⁵O-PET画像 (下段)。MR angiography (MRA) で右MCAの描出が不良であり、MCA閉塞が示唆されるが、MRIのT1強調画像 (T1WI)、T2強調画像 (T2WI) では脳梗塞は認められない。¹⁵O-PET検査上、右MCA領域での脳血流量 (CBF) の著しい低下を認めるが、酸素代謝 (CMRO₂) は低下しておらず、酸素摂取率 (OEF) が高い貧困灌流の状態であると診断できる。同部位では血液量 (CBV) も増加し、血管拡張状態であることが分かる (図3参照)。R: 右、L: 左。

5. まとめ

¹⁵O-gas 標識人工赤血球を用いた脳酸素代謝測定法に関し、PET検査の歴史を交えて概説した。無菌環境下で簡便に高比放射能での¹⁵O₂標識が可能となれば、ヒトPET検査に十分応用が可能であり、一般PET施設での普及が期待できる。人工酸素運搬体の実用化とともに、治療薬としてのみでなく様々な臨床応用の可能性が示唆される。

文献

1. Ter-Pogossian MM, Eichling JO, Davis DO, Welch MJ. The measure in vivo of regional cerebral oxygen utilization by means of oxyhemoglobin labeled with radioactive oxygen-15. *J Clin Invest* 1970; 49: 381-391.
2. Jones T, Chesler DA, Ter-Pogossian MM. The continuous inhalation of oxygen-15 for assessing regional oxygen extraction in the brain of man. *Br J Radiol* 1976; 49: 339-343.
3. Kety SS, Schmidt CF. The determination of cerebral blood flow in man by the use of nitrous oxide in low concentrations. *Am J Physiol* 1945; 143:53-66.
4. Kety SS, Schmidt CF. The nitrous oxide method for the quantitative determination of cerebral blood flow in man: Theory, procedure, and normal values. *J Clin Invest* 1948; 27: 476-483.
5. Kety SS, Schmidt CF. The effects of altered arterial tensions of carbon dioxide and oxygen on cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption of normal young men. *J Clin Invest* 1948; 27: 484-492.
6. Welch MJ, Ter-Pogossian MM. Preparation of short half-lived radioactive gases for medical studies. *Radiat Res* 1968; 36: 580-587.
7. Ter-Pogossian MM, Eichling JO, Davis DO, Welch MJ, Metzger JM. The determination of regional cerebral blood flow by means of water labeled with radioactive oxygen 15. *Radiology* 1969; 93: 31-40.
8. Carter CC, Eichling JO, Davis DO, Ter-Pogossian MM. Correlation of regional cerebral blood flow with regional oxygen uptake using ¹⁵O method. *Neurology* 1972; 22: 755-762.
9. Raichle ME, Grubb RL Jr, Eichling JO, Ter-Pogossian MM. Measurement of brain oxygen utilization with radioactive oxygen-15: experimental verification. *J Appl Physiol* 1976; 40: 638-640.
10. Frackowiak RSJ, Lenzi GL, Jones T, Heather JD. Quantitative measurement of regional cerebral blood flow and oxygen metabolism in man using ¹⁵O and positron emission tomography: theory, procedure and normal values. *J Comput Assist Tomogr* 1980; 4: 727-736.
11. Magata Y, Temma T, Iida H, Ogawa M, Mukai T, Iida Y,

- Morimoto T, Konishi J, Saji H. Development of injectable O-15 oxygen and estimation of rat OEF. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 671-676.
12. Temma T, Magata Y, Kuge Y, Shimonaka S, Sano K, Katada Y, Kawashima H, Mukai T, Watabe H, Iida H, Saji H. Estimation of oxygen metabolism in a rat model of permanent ischemia using positron emission tomography with injectable $^{15}\text{O-O}_2$. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 1577-1583.
 13. Tiwari VN, Kiyono Y, Kobayashi M, Mori T, Kudo T, Okazawa H, Fujibayashi Y. Automatic labeling method for injectable ^{15}O -oxygen using hemoglobin-containing liposome vesicles and its application for measurement of brain oxygen consumption by PET. *Nucl Med Biol* 2010; 37: 77-83.
 14. Kawaguchi AT, Fukumoto D, Haida M, Ogata Y, Yamano M, Tsukada H. Liposome-encapsulated hemoglobin reduces the size of cerebral infarction in the rat: evaluation with photochemically induced thrombosis of the middle cerebral artery. *Stroke* 2007; 38: 1626-1632.
 15. Komatsu H, Furuya T, Sato N, Ohta K, Matsuura A, Ohmura T, Takagi S, Matsuura M, Yamashita M, Itoda M, Itoh J, Horinouchi H, Kobayashi K. Effect of hemoglobin vesicle, a cellular-type artificial oxygen carrier, on middle cerebral artery occlusion- and arachidonic acid-induced stroke models in rats. *Neurosci Lett* 2007; 421: 121-125.
 16. Kawaguchi AT, Haida M, Yamano M, Fukumoto D, Ogata Y, Tsukada H. Liposome-encapsulated hemoglobin ameliorates ischemic stroke in nonhuman primates: an acute study. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 332: 429-436.
 17. Sakai H, Horinouchi H, Masada Y, Takeoka S, Ikeda E, Takaori M, Kobayashi K, Tsuchida E. Metabolism of hemoglobin-vesicles(artificial oxygen carriers)and their influence on organ functions in a rat model. *Biomaterials* 2004; 25: 4317-4325.
 18. Kobayashi M, Kiyono Y, Maruyama R, Mori T, Kawai K, Okazawa H. Development of an H_2^{15}O steady-state method combining a bolus and slow increasing injection with a multi-programming syringe pump. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010;(in press)
 19. Awasthi V, Yee SH, Jerabek P, Goins B, Phillips WT. Cerebral oxygen delivery by liposome-encapsulated hemoglobin: a positron-emission tomographic evaluation in a rat model of hemorrhagic shock. *J Appl Physiol* 2007; 103: 28-38.
 20. Powers WJ, Raichle ME. Positron emission tomography and its application to the study of cerebrovascular disease in man. *Stroke* 1985; 16: 361-376.
 21. The EC/IC Bypass Study Group. Failure of extracranial-intracranial arterial bypass to reduce the risk of ischemic stroke. Results of an international randomized trial. *N Engl J Med* 1985; 313: 1191-1200.
 22. Yamauchi H, Fukuyama H, Nagahama Y, Nabatame H, Ueno M, Nishizawa S, Konishi J, Shio H. Significance of increased oxygen extraction fraction in five-year prognosis of major cerebral arterial occlusive diseases. *J Nucl Med* 1999; 40: 1992-1998.
 23. JET Study Group. Japanese EC-IC bypass trial(JET Study)-中間解析結果(第二報) - 脳卒中の外科 2002; 30: 434-437.
 24. 小笠原邦昭, 小川彰. EC-ICバイパス 脳と循環 2008; 13: 33-36.
 25. Ito H, Kanno I, Kato C, Sasaki T, Ishii K, Ouchi Y, Iida A, Okazawa H, Hayashida K, Tsuyuguchi N, Ishii K, Kuwabara Y, Senda M. Database of normal human cerebral blood flow, cerebral blood volume, cerebral oxygen extraction fraction and cerebral metabolic rate of oxygen measured by positron emission tomography with ^{15}O -labelled carbon dioxide or water, carbon monoxide and oxygen: a multicentre study in Japan. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2004; 31: 635-643.
 26. Kobayashi M, Okazawa H, Tsuchida T, Kawai K, Fujibayashi Y, Yonekura Y. Diagnosis of misery perfusion using noninvasive O-15 gas PET. *J Nucl Med* 2006; 47: 1581-1586.
 27. Kobayashi M, Kudo T, Tsujikawa T, Isozaki M, Arai Y, Fujibayashi Y, Okazawa H. Shorter examination method for the diagnosis of misery perfusion using count-based OEF elevation in ^{15}O -Gas PET. *J Nucl Med* 2008; 49: 242-246.
 28. Okazawa H, Kudo T. Clinical impact of hemodynamic parameter measurement for cerebrovascular disease using positron emission tomography and ^{15}O -labeled tracers. *Ann Nucl Med* 2009; 23: 217-227.

MWC 2 状態モデルはヘモグロビンのアロステリーと いかに調和しうるか

How can the MWC two-state model be reconciled with hemoglobin allostery?

柴山 修哉

Naoya Shibayama

和文抄録

Monod-Wyman-Changeux(MWC) の 2 状態アロステリックモデルは、ヘモグロビンの構造と機能の関係を記述する最も単純で、かつ最も説得力のあるアロステリック理論である。しかし、いったん定量的な立場に立つと、2 状態モデルの枠組みではヘモグロビンのアロステリーを統一的に理解できないこともまた知られている。最も大きな問題は、広範な結晶化条件で得られたデオキシヘモグロビンの結晶構造は全て同じ T 構造を呈するにもかかわらず、溶液の T 状態デオキシヘモグロビンの O_2 親和性は溶液条件に依存して大幅に変化することである。本稿の目的は、この問題を抱えた MWC 2 状態モデルの修正の方向を探ることにある。ヘモグロビンのアロステリック平衡の実体を解明するためには、以下の二つの研究アプローチが重要である。一つは、ヘモグロビン単結晶の O_2 平衡曲線の測定であり、もう一つは、多孔性シリカゲルのゲルマトリックス中で構造変化を凍結した状態のヘモグロビン分子の O_2 平衡曲線の測定である。前者の研究から各結晶構造の O_2 親和性が求まり、後者の研究から平衡で存在する個々の構造状態の O_2 親和性が決定できる。これらの研究の結果を合わせると、ヘモグロビンのアロステリック平衡の描像が見えてくる。結果は、MWC モデルの一斉転移メカニズムを支持するが、異なる O_2 親和性を示す 3 つ（最低 3 つ）のアロステリック状態の存在を示唆する。本稿では、3 状態モデルを示唆する実験的証拠と今後の課題について述べる。

Abstract

The Monod-Wyman-Changeux(MWC) two-state allosteric model continues to be the simplest and most conceptually appealing theory that relates the structure and function of hemoglobin. However, it is also true that the quantitative understanding of hemoglobin allostery based on the two-state model has not yet been successful. Perhaps the most serious problem is that the O_2 affinity of T-state deoxyhemoglobin in solution varies widely with solution conditions even though all the crystal structures of deoxyhemoglobin determined to date(over a wide range of crystallization conditions) adopt essentially the same T quaternary structure. The purpose of this paper is to explore a possible way to modify the MWC two-state model. To understand the true nature of the allosteric equilibrium of hemoglobin, the following two approaches are important. One is O_2 equilibrium study on single crystals of hemoglobin, and the other is O_2 equilibrium study on sol-gel entrapped hemoglobin molecules within wet porous silica gel matrices. The former approach enables direct comparison between each crystal structure and its function, and the latter enables determination of the O_2 affinities of equilibrium conformers. These studies place significant constraints on possible mechanisms for hemoglobin allostery. The results support the MWC mechanism but suggest the existence of three(at least three) distinct allosteric states with different O_2 affinities. In this paper, experimental evidence supporting a three-state mechanism and future subjects to be solved will be presented.

Keywords

hemoglobin, MWC model, allostery, cooperativity, allosteric equilibrium

はじめに

ヘモグロビンは多くの教科書に取り上げられている．一部には，基本的理解は既に達成されたかの誤解もある．タンパク質分子の機能を調節している構造変化はヘモグロビンの事例を下敷きとしてT状態とR状態の2状態平衡で説明されることが多い^{1,2)}．しかし，肝心のヘモグロビンではMonod-Wyman-Changeux(MWC)の2状態モデル的理解が定量的に成功していないのが現状である．血液ガス運搬の主役は言わずと知れたヘモグロビンである．ヘモグロビンのアロステリーに対する考え方を今一度整理し直すことは，人工血液開発に携わる研究者にとって必ずしも無駄ではないと思い，ヘモグロビンのアロステリーを記述するMWC 2状態モデルの今後の修正の方向について本稿で述べることにした．

ヘモグロビンのアロステリー

成人のヘモグロビンは，2本の鎖と2本の鎖からなる $\alpha_2\beta_2$ 型の4量体で，分子量約64,500の球状タンパク質である．鎖は141個の，鎖は146個のアミノ酸から成り，それぞれのポリペプチド鎖はヘムを1個ずつ巻き込んでいる．したがって，ヘモグロビンは1分子あたり合計4個の O_2 と可逆的に結合できるが，その4段階の酸素結合の親和性は様ではなく，初めの方に付く O_2 が後から結合する O_2 を著しく付きやすくする協同現象が見られる(Table 1). これをヘム間相互作用と呼ぶ．このヘム間相互作用のあるおかげで，ヘモグロビンの O_2 平衡曲線はS字形となり O_2 濃度の低い末梢組織でより多くの O_2 を解離することが可能となる．ヘモグロビンではヘム間相互作用以外に，pHを下げるとプロトンが結合し O_2 親和性が低くなるボーア効果， CO_2 が結合すると O_2 親和性が低くなる CO_2 効果，2,3-diphosphoglyceric acid (2,3-DPG) が結合すると O_2 親和性が低くなる2,3-DPG効果， Cl^- が結合すると O_2 親和性が低くなる塩素イオン効果，などの非ヘムリガンド結合と O_2 結合との間の相互作用も分子内に張りめぐらされている(Fig. 1). これ

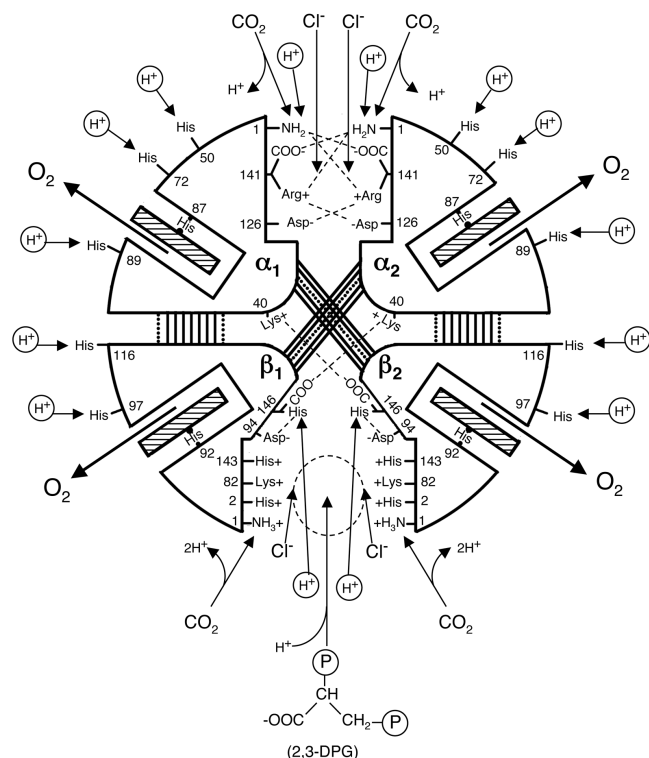


Fig. 1. Schematic representation of the reactions of hemoglobin with ligands. Arrows indicate the directions of the reactions of non-heme ligands upon O_2 dissociation. The numbers attached to the residues are the sequence numbers. The -amino groups and the -carboxyl groups are represented by $-NH_2$ (or $-NH_3^+$) and $-COO^-$, respectively. Circled protons are those binding to the Bohr groups³³⁾. Salt bridges(dashed lines) van der Waals contacts(solid lines) and hydrogen bonds(dotted lines) are also shown. Note that all the salt bridges are present in T-state deoxyhemoglobin but absent in R-state oxyhemoglobin. The 1- 2(or 2- 1) interface contains less bonds or contacts than the 1- 1(or 2- 2) interface, and can undergo significant changes upon the quaternary structure change. Reproduced with modifications from Imai(1978)³⁴⁾.

Table 1. O_2 equilibrium parameters of human hemoglobin under various solution conditions at 25¹⁰⁾

| Conditions | K_1 | K_2 | K_3 | K_4 | P_{50} | n_{max} | K_T | K_R | L_0 |
|------------------------------------|------------------------|--------|--------|--------|----------|-----------|------------------------|--------|--------------|
| | (mmHg ⁻¹) | | | | (mmHg) | | (mmHg ⁻¹) | | [T0][R0] |
| pH 9.1, 2.6 mM Cl^- | 0.170 | 0.36 | 3.4 | 3.69 | 1.04 | 2.35 | 0.148 | 3.82 | 280 |
| pH 9.1, 0.1M Cl^- | 0.0595 | 0.16 | 1.5 | 3.33 | 2.15 | 2.73 | 0.0604 | 3.34 | 2700 |
| pH 7.4, 7 mM Cl^- | 0.0647 | 0.48 | 0.45 | 4.24 | 2.05 | 2.40 | 0.0929 | 3.82 | 3700 |
| pH 7.4, 0.1M Cl^- | 0.0218 | 0.062 | 0.30 | 3.45 | 5.32 | 3.02 | 0.0241 | 3.31 | 87000 |
| pH 7.4, 0.1M phosphate buffer | 0.0136 | 0.030 | 0.15 | 3.43 | 8.73 | 3.14 | 0.0147 | 3.26 | 570000 |
| pH 7.4, 0.1M Cl^- , 2 mM 2,3-DPG | 0.00814 | 0.033 | 0.030 | 3.82 | 14.0 | 3.08 | 0.00800 | 3.00 | 3000000 |
| pH 7.4, 0.1M Cl^- , 2 mM IHP | 0.00502 | 0.013 | 0.0042 | 0.915 | 48.8 | 2.53 | 0.00601 | 0.909 | 2800000 |
| pH 6.5, 0.1M Cl^- | 0.0119 | 0.011 | 0.069 | 1.24 | 18.8 | 2.88 | 0.0117 | 1.60 | 620000 |
| pH 6.5, 0.1M Cl^- , 2 mM IHP | 0.00403 | 0.0044 | 0.0073 | 0.0339 | 136 | 1.77 | 0.00402 | 0.0635 | 4000 |

Experimental conditions are as follows: hemoglobin concentration, 0.6 mM on heme basis; in 0.05 M Tris buffer for pH 9.1, and in Bis-Tris buffer for pH 7.4 and 6.5. K_i ($i = 1, 2, 3$, or 4) s O_2 association equilibrium constant for the i -th oxygenation step(Adair constant) P_{50} is partial pressure of O_2 at half-saturation, and n_{max} is maximal slope of Hill plot. Best fit parameters for the MWC two-state model(K_T , K_R , and L_0) are also shown. All data are taken from Imai(1982)¹⁰⁾.

らの相互作用があるおかげで体内でのより効率的なO₂運搬が実現され、適応可能な環境の範囲が大幅に広がる。

ヘモグロビンの各ヘム間の距離は20 Å以上離れているので直接的な相互作用は考えにくい。したがって、ヘム間相互作用はタンパク質部分の高次構造変化を介したものと考えられる。ボア効果などの非ヘムリガンドの関与するO₂親和性調節も同様である。このように、低分子やイオンの結合がタンパク質分子の構造変化を誘起し、分子上の離れた部位の活性を調節する現象のことをアロステリーと言う。また、アロステリーを示す一群の酵素、タンパク質のことを総称してアロステリックタンパク質と呼ぶ。昔から、多くのアロステリックタンパク質には共通の分子メカニズムがあると考えられていた。それを最も手近なヘモグロビンの中に見いだそうとする研究が行われてきたのは当然の成り行きである。

MWC 2 状態モデル

1965年 Monod-Wyman-Changeux (MWC) によって酵素のアロステリーを説明するMWC 2 状態モデルが提出された¹⁾。これは、X線結晶解析で示されたヘモグロビン分子の対称性³⁾を見事に取り入れた、最も単純で、かつ、最も洗練されたアロステリックモデルである。Monodらの最も革新的なアイデアは、O₂親和性(酵素の場合は活性)の異なる2種類の4次構造の平衡(アロステリック平衡)の概念をモデルに導入した点にある(Fig. 2)。O₂親和性の低い状態をT(緊張が架かったという意味のTense)、高い状態をR(緊張が緩んだという意味のRelaxed)と呼ぶ。そしてもう一つの大事な前提は、「T状態でもR状態でも1個目から4個目までのO₂は同じ親和性で結合する」という各状態の非協同性の仮定である。そうすると、同じ分子内の4個のヘムのO₂親和性は常に同じで、分子がTからRに移るとき4個のヘムのO₂親和性は一斉に変化することになる。「2状態モデル」が「一斉転移モデル」とも呼ばれる所以である。O₂結合の協同性は、結合したO₂の個数が増えるにつれアロステリック平衡がRの方に傾いてゆくことで簡単に説明できる。

2状態モデルが他のモデルに比べてすっきりしている点は、要求するパラメータの数が少ないことと各パラメータの物理的意味がはっきりしている点である。2状態モデルでは、デオキシヘモグロビンにおけるTとRの相対的安定性を定める平衡定数(L_0)と、TとRのそれぞれのO₂結合の平衡定数(K_T , K_R)の3つのパラメータのみでO₂平衡曲線を記述することができる。通常、ヘモグロビンの4段階O₂平衡曲線の解析には独立な4つのパラメータ(各O₂結合段階の平衡定数 $K_1 \sim K_4$)を必要とするが、これよりパラメータ数が1個少ないことは特筆に値する(Table 1)。また、非ヘムリガンドの関与するアロステリック効果も、2状態平衡を仮定するとエレガントに説明できる。つまり、プロトンなどの非ヘムリガンドはTとRに異なる親和性で結合することでTとRの相対的安定性(L_0)を変え、O₂平衡機能を変化させたと解釈することができる。

2 状態モデルがヘモグロビン研究者から支持される理由

先ず、結晶構造学的見地からの理由を簡単に述べる。ヘモグロビンでは、O₂の結合していないデオキシ型結晶構造とO₂の4個結合したオキシ型結晶構造の間に大きな4次構造変化(サブユニットの再配置)があることが、1960年代には既にX線結晶構造解析によって示されていた⁴⁾。そして、40年以上たった今なおTとRの中間的なO₂親和性を持つ3つ目の結晶構造は見つかっていない。このような状況下で、O₂結合に依存して相対的安定性が変化する2つの4次構造を仮定するのは合理的であると多くの研究者は考えている。

ヘモグロビン研究者の間で2状態モデル的な考え方が広く浸透していったもう一つの理由として、O₂平衡機能を大きく変えるアミノ酸変異を持つ異常ヘモグロビンや化学修飾ヘモグロビンの中に、O₂親和性の低いデオキシ型4次構造のままO₂が4個結合したもの(例えば異常ヘモグロビン Kansas[102Asn Thr]⁵⁾)や、逆にO₂親和性の高いオキシ型4次構造でありながらO₂の結合していないもの(例えば異常ヘモグロビン Philly[35Tyr Phe]⁶⁾)が存在することが挙げられる。これらの分子状態は、2状態モデルはその存在を肯定するが通常のヘモグロビン中では存在比率が少なすぎて観測できないオキシT構造(T₄)やデオキシR構造(R₀)に対応する(Fig. 2参照)。アミノ酸置換や化学修飾が L_0 を変え2状態平衡をTあるいはRに著しく傾けたことで、これらの分子状態が安定化したと考えられる。

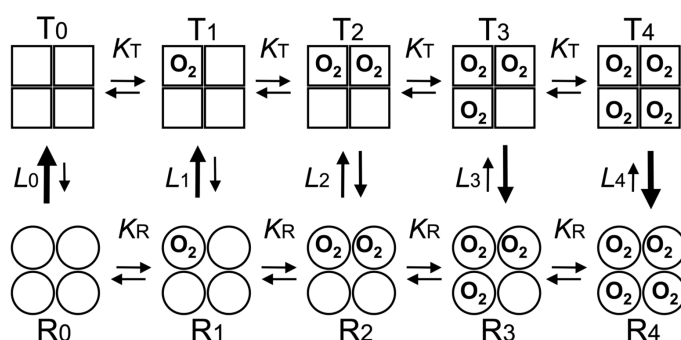


Fig. 2. An equilibrium diagram of hemoglobin oxygenation as predicted by the MWC two-state model¹⁾. The MWC model assumes an equilibrium between the two affinity conformations of the entire molecule, T and R; T denotes the tense or low-affinity quaternary structure and R denotes the relaxed or high-affinity quaternary structure (the subscripts indicate the numbers of bound O₂ molecules). K_T is the association equilibrium constant for a subunit in the T conformation, K_R is that for a subunit in the R conformation, and L_i is the equilibrium constant for the conformational equilibrium between T_i and R_i , where $L_i = [T_i]/[R_i] = L_0(K_T/K_R)^i$. The basic assumption of the two-state model is that K_T and K_R are dependent on the quaternary structure of the protein, and not on the number of O₂ molecules already bound. Thus, the cooperativity arises simply from the ligation-induced shift of the conformational equilibrium toward the R-state.

では、各状態の非協同性の仮定（一斉転移の仮定）はどうか．1991年 Mozzarelliらは、顕微分光光度計を用いてヘモグロビン結晶の O_2 平衡曲線測定に初めて成功した⁷⁾．これは、ヘモグロビンの結晶構造とその機能を直接関連づける先駆的な研究である．この研究から、ポリエチレングリコール（PEG）で作製したデオキシヘモグロビン（T）結晶の O_2 結合の親和性は非常に低く、協同性はほとんど無いことが示されている⁷⁾．測定中に結晶は壊れていないので、結晶格子力で4次構造変化が封印されT構造のまま4個の O_2 を同じ親和性で結合したと考えられる．この結果は、各状態の非協同性の仮定を支持している．現時点ではまだオキシヘモグロビン（R）結晶に関する報告はないが、筆者が予備的に行ったR型結晶の O_2 平衡曲線測定では、 O_2 結合に協同性はほとんどみられず、親和性は非常に高いことが示されている（柴山未発表データ）．

2状態モデルとよく対比されるのが、Koshland-Nemethy-Filmer (KNF)のKNF逐次モデルである⁸⁾．多くの教科書では、KNF逐次モデルはMWC 2状態モデルと並ぶアロステリック理論の双壁として紹介されている．逐次モデルは、 O_2 が結合したサブユニットだけが3次構造変化を起こしそれが（サブユニット間相互作用の変化を通して）隣接するサブユニットの O_2 親和性を高めるという考えに基づいている．しかし、この考え方では非ヘムリガンドの関与するアロステリック効果をすっきりとした形で説明することは難しい．また、上で述べたオキシT構造やデオキシR構造が存在する理由もうまく説明できない．最近筆者は、リガンドが または サブユニットに2個結合した中間状態ヘモグロビンを使って、2状態モデルと逐次モデルの最も決定的な違いであるアロステリック平衡の有無を直接判定する実験を行った⁹⁾．結果は、 O_2 親和性の大幅に異なる少なくとも2つの状態の構造平衡の存在を示し、ヘモグロビンのアロステリーの説明にはKNF逐次モデルよりもMWC 2状態モデルの方が妥当であることが明らかになっている．

2 状態モデルの問題点

先に述べたように、2状態モデルはヘモグロビンの4段階 O_2 結合の協同性をすっきりとした形で定性的に説明することができる．しかし、いったん定量的な立場に立つと、このモデルはヘモグロビンのアロステリー全般（ヘム間相互作用、ボア効果、2,3-DPG効果、塩素イオン効果）を統一的に記述することはできない．最も大きな問題は、溶液条件に依存してT状態デオキシヘモグロビンの O_2 親和性（ K_T ）が大幅に変化する事実である（Table 1）¹⁰⁾．これは、「非ヘムリガンドはTとRの O_2 親和性（ K_T , K_R ）には影響を与えずにTとRの相対的安定性（ L_0 ）のみを変えて O_2 平衡機能を変化させる」という2状態モデルの前提に抵触する．実際、 K_T の値は溶液条件に依存して40倍以上も変化することが知られているが、これは自由エネルギーに直すとヘモグロビンの示す全 O_2 親和性変化の自由エネルギーの約半分に相当する．一方、R状態の O_2 親和性（ K_R ）は、inositol hexakisphosphate (IHP) 非存在下の溶液条件ではpHやCl⁻濃度によらずほぼ一定である（Table 1）．

T状態デオキシヘモグロビンが示す O_2 親和性の幅を説明するモデルは大きく分けて二通りある．一つは、2状態モデルの大前提である状態数2は堅持したまま、T状態中での各サブユニットの O_2 結合による3次構造変化が許されるように修正した「修正版2状態モデル」である．もう一つは、TとRに加えて更にもう1つの中間的な O_2 親和性を持つ3つ目の状態を仮定した「3状態モデル」である．

修正版2状態モデル：SKモデル

ここでは、修正版2状態モデルの原型となるSzaboとKarplusのSKモデル¹¹⁾を例に挙げてその問題点を指摘してみる．SKモデルにおける O_2 結合の協同性は、結合した O_2 の個数が増えるにつれ2状態平衡がTからRの方に傾いてゆくことで説明される．この点は2状態モデルと全く同じである．しかし、SKモデルには、2状態モデルの定義する3つのパラメータ（ K_T , K_R , L_0 ）以外に、T状態中各サブユニットのボア基のプロトン化やそのサブユニットの関与する塩橋の切断に伴う自由エネルギー変化を表すパラメータが各サブユニット単位で組み込まれている．つまり、このモデルではTからRへの転移が起こらなくても、T状態中各サブユニットの O_2 結合に伴う塩橋の切断（3次構造変化）が各サブユニット単位で許されている．プロトン化のパラメータも組み込まれているので K_T のpH依存性が現れる．

この修正は一見良さそうに思われるが以下の問題がある．SKモデルを含む全ての修正版2状態モデルでは、「T状態中で O_2 が結合して塩橋が切れたサブユニットは、隣のまだ O_2 が結合していない（塩橋が架かった）サブユニットの O_2 親和性に影響を与えない」という仮定が入っている．この仮定が崩れると、2状態モデルの前提である各状態の非協同性が成り立たなくなる．しかしながら、人為的に サブユニットC末端のArg（141）を切除したT状態ヘモグロビンに関するデータを見ると、Arg（141）の関与する塩橋切断の影響はT状態 サブユニットのみならず隣の サブユニットにも同程度波及しているので、T状態中の各サブユニットの3次構造変化が独立なイメージは成り立っていない^{12,13)}．また、ヘモグロビンのCO結合は O_2 結合と同程度の協同性を示すが、各結合段階ごとのCO親和性の上昇は2段階目で16.5倍、3段階目で4.6倍、4段階目で7.7倍と段階的に上昇するので、状態数2の一斉転移モデルでは記述できないことが指摘されている¹⁴⁾．

3 状態モデル

上述のようにT状態の O_2 親和性の変化はT状態の摂動では説明しきれない．そこで、ヘモグロビンのアロステリー全般の最小限の記述法として2状態モデルに状態を1つ追加するのが3状態モデルの考え方である¹⁵⁾．各々の状態の中で協同性が無いことと、アロステリック平衡と転移の概念はMonodらの考えをそのまま引き継いでいる．また、Monodらのオリジナルの論文¹⁾でも、状態数は“最低2”というゆるい表現になっているのでMWC 3状態モデルとも呼ぶことができる．

ヘモグロビンの O_2 親和性には上限と下限がある。上限値は、ヘモグロビンの4個目の O_2 結合の平衡定数である K_4 で与えられる。これは、 K_4 がIHP非存在下の溶液条件でほぼ一定の高い値を示し($K_4 = 3.4 \text{ mmHg}^{-1}$ at 25 °C, Table 1), それが単離した または サブユニットの O_2 親和性と大体一致することから妥当と考えられる¹⁰⁾。一方下限の値は、天然のヘモグロビン、 O_2 親和性の低い異常ヘモグロビン、及び、金属置換混成ヘモグロビンの O_2 平衡曲線のデータを統合すると見えてくる。 O_2 親和性が低下する溶液条件下では、これらのヘモグロビンの K_1 (1個目の O_2 結合の平衡定数)は共通の下限値に収斂する($K_1 = 0.004 \text{ mmHg}^{-1}$ at 25 °C)⁶⁾。また、これと同時に O_2 結合の協同性は無くなり非ヘムリガンドの効果も消失してくる¹⁶⁾。 O_2 親和性の上限と下限があるということは、それぞれに対応する構造状態が存在すると考えるのが自然である。この考えを裏付けるように、デオキシヘモグロビン結晶の O_2 親和性はpHやCl⁻の濃度によらず一定で($K = 0.0037 \text{ mmHg}^{-1}$ at 25 °C)¹⁷⁾、溶液ヘモグロビンの O_2 親和性の下限とよく一致する。同様に、オキシヘモグロビン結晶の O_2 親和性も溶液ヘモグロビンの O_2 親和性の上限と大体一致するようである(柴山未発表データ)。そこで、3状態モデルではヘモグロビンの O_2 親和性の下限の状態をT(構造は従来のT型結晶構造)、上限の状態をR(構造は従来のR型結晶構造)とする。そして、中間的な O_2 親和性の状態をここでは仮にP(柔らかいという意味のPlastic、構造はまだわかっていない)と呼ぶことにする(MintonとImaiのオリジナルの論文¹⁵⁾では、 O_2 親和性の低い方からS, T, Rの順番で命名しているが、本稿では結晶構造の名称との混乱を防ぐためT, P, Rとした)。Monodらの考え¹⁾に従い、ヘモグロビンはT, P, Rの3つの状態の間の平衡にあり、各状態は非ヘムリガンドに対して異なる親和性で結合するとする。デオキシヘモグロビンは実質的にTとPの混ざりであるが、Tの方がプロトンやCl⁻の結合親和性が高いため、pHを下げたりCl⁻の濃度を上げた溶液条件ではTが支配的になり O_2 親和性は低下する。これが、従来の2状態モデル解析で求まる K_T の溶液依存性の説明である。また、先に述べた4段階CO結合の親和性が段階的に上昇する現象¹⁴⁾も、T → P → Rの2段階の状態転移を考えればうまく説明できる。

3つ目のアロステリック状態：P状態

筆者が3状態モデル的な考え方にこだわる最大の理由は、自身が行った実験の結果から、TとRの中間的な O_2 親和性を持つアロステリック状態(P状態)の存在を確信したからである。筆者は、水に溶けたデオキシヘモグロビン分子を多孔性シリカゲルの中に閉じこめ、その構造変化を凍結したまま O_2 平衡曲線を測定する実験を行った(Fig. 3)^{8,19)}。ゲル中の溶媒条件は、デオキシヘモグロビンの O_2 親和性が高くなる陰イオンの存在しない低塩条件とした。ここで大事なことは、ゲル中のヘモグロビン分子は、天然の構造を保ちつつ、ゲル・マトリックスからの外力(主にシラノール基からの静電相互作用)を受け、高次構造変化の速度が溶液中と比べて約100億倍も遅くなるとい

うことである^{20,21)}。このようなゲルに閉じこめられた個々のヘモグロビン分子は事実上構造変化を凍結されたまま非協同的に O_2 結合することが期待される²⁰⁾。実際、低塩条件のデオキシヘモグロビンの O_2 平衡曲線のヒルプロットは逆S字形となる(Fig. 3)。これは、試料中に O_2 親和性の高い成分と低い成分が共存し、各々が独立に O_2 結合したことを意味する。各状態の O_2 親和性及び含有量は、各状態に対応する直角双曲線の和でフィットする解析で求めることができる(Fig. 3)。結果は、 O_2 親和性が約100倍異なる2つの成分の存在を示し^{18,19)}、 O_2 親和性の低い方がTで、高い方をPと考えれば、これはまさしく3状態モデルの予想通りである。

上の実験結果は、TとRの中間的な O_2 親和性を持つP状態の存在を示唆しているが、その構造に関する情報は何も与えない。P状態の構造上の実体は、T構造のマイナーな摂動と考えるべ

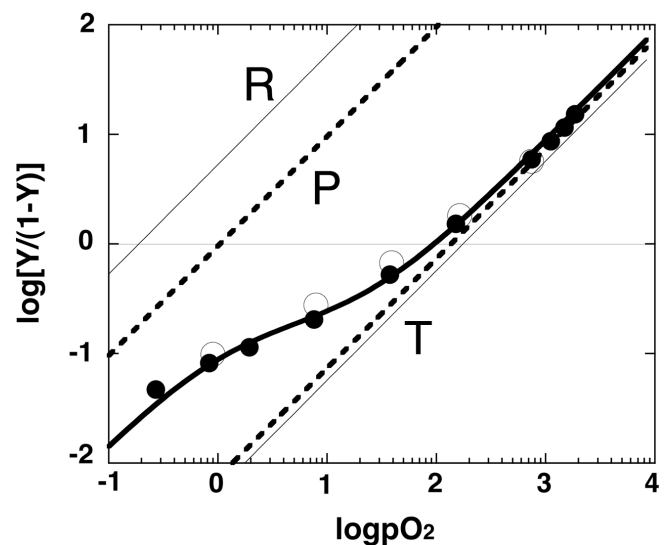


Fig. 3. Hill plot for O_2 equilibrium curve of gel entrapped hemoglobin locked in anion-free low-salt deoxy state¹⁹⁾. Sol-gel entrapment and subsequent O_2 equilibrium measurement were carried out using a modified protocol as described previously³⁵⁾. pO_2 is partial pressure of O_2 , and Y is fractional O_2 saturation. Closed circles represent the O_2 association curve measured at 20 °C in the absence of anions and in the presence of 0.1 M N [2-hydroxyethyl]piperazine- N' (2-ethanesulfonic acid) (HEPES) at pH 7.0. Open circles indicate the succeeding O_2 dissociation curve measured after the O_2 association measurement. The solid lines joining the circles are the results of analysis assuming the presence of two independent components with different O_2 association equilibrium constants. The calculated O_2 association equilibrium constants for the low- and high-affinity components of the association curve are 0.0074 mmHg^{-1} (85 %) and 0.96 mmHg^{-1} (15 %) respectively (the fractional populations are shown in the parentheses). Two dashed straight lines corresponding to the O_2 affinities of these two components (T and P) are shown. For comparison, the lowest and highest O_2 affinities of solution hemoglobin at 20 °C are shown as two thin solid straight lines (corresponding to $K = 0.0057 \text{ mmHg}^{-1}$ and $K = 5.3 \text{ mmHg}^{-1}$). These two end affinities agree well with the O_2 affinities of T- and R-state crystals of hemoglobin at 20 °C ($K = 0.0051 \text{ mmHg}^{-1}$ and $K = 5.2 \text{ mmHg}^{-1}$).

きなのか、あるいは全くの別物と考えるべきなのか、現時点でまだ結論は出ていない。しかし、この問題に対するヒントを与えてくれる研究がある。ColomboとSeixasは、pH 7.2のデオキシヘモグロビンにCl⁻あるいは2,3-DPGなどの陰イオンが十分な量結合すると、O₂親和性の低下とともに40-50個の水和水が放出されることを示した²²⁾。これは、デオキシヘモグロビンが陰イオンの結合に依存してO₂親和性の異なる2つの構造をとり、両構造の水和の程度が異なることを意味する。水和水の数少なくO₂親和性の低い方がTで、水和水の数多くO₂親和性の高い状態がPに対応する。また、陰イオン結合型デオキシヘモグロビン(T)がO₂を結合してオキシヘモグロビン(R)に転移するとき約72個の水和水が放出されることが知られているので、Pの水和の程度はTとRの間くらいに位置する²²⁾。したがって、TからPへの転移は、T状態中の局所的構造変化というよりも、分子全体のグローバルな高次構造変化と考えた方が良さそうである。

R状態に関する留意点

1) R構造の多様性

最近、従来のRとは異なる4次構造を持つCO結合型ヘモグロビンの結晶構造がいくつか見つかった。現在までに少なくとも3種類の新しい4次構造(R2²³⁾, RR2²⁴⁾, R3²⁴⁾)が報告されている。結晶のO₂平衡曲線の測定結果を待たないと結論は出ないが、いずれの構造もO₂親和性の高いR状態の構造アンサンブルを反映したものと考えられている。R状態では、T状態に比べてサブユニット間の塩橋や水素結合による構造的な制約が少ないので、4次構造に多様性が表れてもそれほど不思議ではない。実際、NMRによる¹⁵N-¹H残余双極子相互作用(residual dipolar coupling)の測定では、溶液のCO結合型ヘモグロビンの構造はRとR2の平衡になっているという結果が得られている²⁵⁾。一方、広範な結晶化条件で得られたデオキシヘモグロビンの全ての結晶構造は、従来のT型結晶構造と基本的に同じである。

2) R状態のO₂親和性

先に述べたように、ヘモグロビンのR状態のO₂親和性(K_R)は K_T で精度良く近似でき、その値は溶液条件によらずほぼ一定というのが従来の考え方である(ただし、pH 6.5では若干のボーア効果が見られる)。しかし、最近米谷らは、強力な非ヘムリガンドが存在する最も極端な溶液条件(例えば、IHPとBezafibrateが共存する溶液条件)のO₂平衡では、 K_R が K_T とほぼ同じ位まで低下することから、「ヘモグロビンの4次構造はO₂親和性の決定因子ではない」と結論づけている²⁶⁾。

しかし、2状態モデル解析の K_R と L_0 の間にはパラメータ間の補償が起こりうるのでO₂平衡曲線の解釈には注意が必要である。例えば、強力な非ヘムリガンドが存在するときのO₂平衡曲線は協同性が小さく、親和性の低いままO₂が4個結合する。このようなO₂平衡曲線は、 $K_R=K_T$ でも記述できるが、 K_R を無理に下げなくても L_0 が充分大きければ精度良く記述でき

る。前者は、非ヘムリガンドがRに強く結合して K_R を K_T 並に下げた場合に相当し、後者は、非ヘムリガンドがTに強く結合することでアロステリック平衡を著しくTの方に傾け、4段階目のO₂結合にもTが大きく関与した場合に相当する。実際、後者の可能性を示唆する実験結果も多い^{27, 28)}。この問題をはっきりさせるためには、これらの強力な非ヘムリガンドのRとTに対する結合平衡定数の比較や、非ヘムリガンドの結合したR型ヘモグロビン結晶^{29, 30)}のO₂平衡曲線の測定が重要である。

まとめと今後の課題

本稿で述べたように、3状態モデルは広範な溶液条件のヘモグロビンのアロステリーを統一的に説明するための一つの方向性を示している。しかし、このモデルはまだ主流にはなっていない。これは、2状態モデルの良さである単純性を犠牲にしてまで状態数を増やすことに抵抗感を持つ研究者が少なくないためであろう。今大事なことは、3つ目のアロステリック状態(P状態)の必要性をアピールするだけでなく、その存在の動かし難い証拠を実験で示すことである。一番説得力があるのは、P状態の結晶構造とその結晶のO₂平衡曲線を示すことである。世界的に見て筆者を含め少なくとも数グループの研究者がそのような目的の研究に取り組んでいるが、現時点ではまだ誰も成功していない。

P状態結晶化の最大の難しさは、Pは常にアロステリック平衡を通してTとRの間を行き来していることにある(Fig. 4)。このため、仮に溶液中にPが存在しても、相対的に結晶化しやすい(溶解度の低い)TまたはRの結晶が優先的に析出してしまう問題がある(ヒトヘモグロビンではT型結晶の溶解度が特に低い)。また、結晶化沈殿剤はタンパク質分子から水和水を奪う働きがあるので、Tに比べて水和水の多いPは相対的に不安定になる問題もある。実際、Colomboらのグループは、陰イオンの全く存在しないPEGのみの結晶化条件でデオキシヘモグロビンの結晶化を試みたが、結局従来のT型結晶しか得られなかった³¹⁾。我々はこの難題に立ち向かうべく、結晶性(溶解

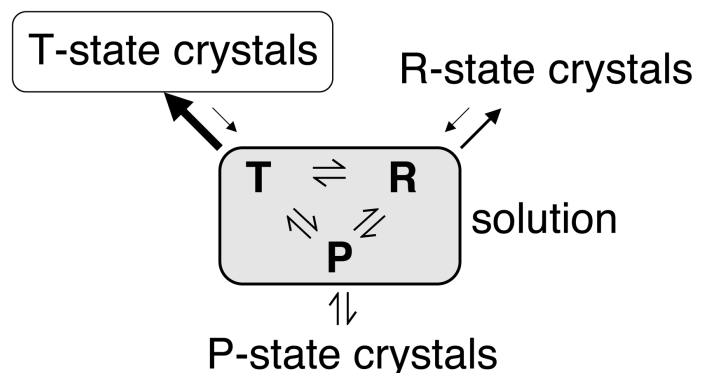


Fig. 4. Difficulty in crystallization of the P-state. In the case of human hemoglobin, the T-state can be more readily and selectively crystallized, because of its lower solubility than that of the R-state or the P-state.

度)を大きく変えるアミノ酸変異を分子表面に持つ異常ヘモグロビン(例えばヘモグロビンC[6Glu Lys]など)を使った結晶化実験や、P状態の安定化が期待できるCOを2個結合した中間状態ヘモグロビンのモデルとなる金属置換混成ヘモグロビン³²⁾を用いた結晶化実験を現在進めている。

参考文献

1. Monod J, Wyman J, Changeux JP. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol* 1965; 12: 88-118.
2. Perutz MF. Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. *Quat Rev Biophys* 1989; 22: 139-236.
3. Perutz MF, Rossmann MG, Cullis AF, Muirhead H, Will G, North ACT. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature* 1960; 185: 416-422.
4. Perutz MF. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin: haem-haem interaction and the problem of allostery. *Nature* 1970; 228: 726-739.
5. Anderson L. Structures of deoxy and carbonmonoxy haemoglobin Kansas in the deoxy quaternary conformation. *J Mol Biol* 1975; 94: 33-49.
6. Asakura T, Adachi K, Wiley JS, Fung LWM, Ho C, Kilmartin JV, Perutz MF. Structure and function of haemoglobin Philly(Tyr C1(35) replaced by Phe) *J Mol Biol* 1976; 104: 185-195.
7. Mozzarelli A, Rivetti C, Rossi GL, Henry ER, Eaton WA. Crystals of haemoglobin with the T quaternary structure bind oxygen noncooperatively with no Bohr effect. *Nature* 1991; 351: 416-419.
8. Koshland DE, Nemethy G, Filmer D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 1966; 5: 365-385.
9. Shibayama N. Functional analysis of hemoglobin molecules locked in doubly liganded conformations. *J Mol Biol* 1999; 285: 1383-1388.
10. Imai K. *Allosteric Effects in Haemoglobin*. Cambridge: Cambridge Univ Press 1982.
11. Szabo A, Karplus M. A mathematical model for structure-function relations in hemoglobin. *J Mol Biol* 1972; 72: 163-197.
12. Kavanaugh JS, Chafin DR, Arnone A, Mozzarelli A, Rivetti C, Rossi GL, Kwiatkowski LD, Noble RW. Structure and oxygen affinity of crystalline desArg141 human hemoglobin A in the T state. *J Mol Biol* 1995; 248: 136-150.
13. Shibayama N, Morimoto H, Kitagawa T. Properties of chemically modified N(II)F(II) hybrid hemoglobins: N(II) protoporphyrin IX as a model for a permanent deoxy-heme. *J Mol Biol* 1986; 192: 331-336.
14. Perrella M, Di Cera E. CO ligation intermediates and the mechanism of hemoglobin cooperativity. *J Biol Chem* 1999; 274: 2605-2608.
15. Minton AP, Imai K. The three-state model: a minimal allosteric description of homotropic and heterotropic effects in the binding of ligands to hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 1418-1421.
16. Miyazaki G, Morimoto H, Yun KM, Park SY, Nakagawa A, Minagawa H, Shibayama N. Magnesium(II) and zinc(II) protoporphyrin IX's stabilize the lowest oxygen affinity state of human hemoglobin even more strongly than deoxyheme. *J Mol Biol* 1999; 292: 1121-1136.
17. Rivetti C, Mozzarelli A, Rossi GL, Henry ER, Eaton WA. Oxygen binding by single crystals of hemoglobin. *Biochemistry* 1993; 32: 2888-2906.
18. Shibayama N, Saigo S. Direct observation of two distinct affinity conformations in the T state human deoxyhemoglobin. *FEBS Letters* 2001; 492: 50-53.
19. Shibayama N. Functional dissection of the oxygen-binding intermediates of human hemoglobin. In: Nagai M, ed. *Hemoglobin: Recent Developments and Topics*. Kerala: Research Signpost 2010(in press)
20. Shibayama N, Saigo S. Fixation of the quaternary structures of human adult haemoglobin by encapsulation in transparent porous silica gels. *J Mol Biol* 1995; 251: 203-209.
21. Shibayama N, Saigo S. Kinetics of the allosteric transition in hemoglobin within silicate sol-gels. *J Am Chem Soc* 1999; 121: 444-445.
22. Colombo MF, Seixas FAV. Novel allosteric conformation of human HB revealed by the hydration and anion effects on O₂ binding. *Biochemistry* 1999; 38: 11741-11748.
23. Silva MM, Rogers PH, Arnone A. A third quaternary structure of human Hb at 1.7 Å resolution. *J Biol Chem* 1992; 267: 17248-17256.
24. Safo MK, Abraham DJ. The enigma of the liganded hemoglobin end state: a novel quaternary structure of human carbonmonoxy hemoglobin. *Biochemistry* 2005; 44: 8347-8359.
25. Lukin JA, Kontaxis G, Simplaceanu V, Yuan Y, Bax A, Ho C. Quaternary structure of hemoglobin in solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 517-520.
26. Yonetani T, Park SI, Tsuneshige A, Imai K, Kanaori K. Global allostery model of hemoglobin: modulation of O₂ affinity, cooperativity, and Bohr effect by heterotropic allosteric effectors. *J Biol Chem* 2002; 277: 34508-34520.
27. Marden MC, Bohn B, Kister J, Poyart C. Effectors of hemoglobin: separation of allosteric and affinity factors. *Biophys J* 1990; 57: 397-403.

28. Nagatomo S, Nagai M, Mizutani Y, Yonetani T, Kitagawa T. Quaternary structures of intermediately ligated human hemoglobin A and influences from strong allosteric effectors: resonance Raman investigation. *Biophys J* 2005; 89: 1203-1213.
29. Shibayama N, Miura S, Tame JRH, Yonetani T, Park SY. Crystal structure of horse carbonmonoxyhemoglobin-bezafibrate complex at 1.55- resolution. *J Biol Chem* 2002; 277: 38791-38796.
30. Yokoyama T, Neya S, Tsuneshige A, Yonetani T, Park SY, Tame JRH. R-state haemoglobin with low oxygen affinity: crystal structures of deoxy human and carbonmonoxy horse haemoglobin bound to the effector molecule L35. *J Mol Biol* 2006; 356: 790-801.
31. Seixas FAV, de Azevedo WF, Colombo MF. Crystallization and x-ray diffraction data analysis of human deoxyhaemoglobin A₀ fully stripped of any anions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1999; 55: 1914-1916.
32. Shibayama N, Imai K, Morimoto H, Saigo S. Oxygen equilibrium properties of nickel(II)/iron(II) hybrid hemoglobins cross-linked between 82 1 and 82 2 lysyl residues by bis(3,5-dibromosalicyl)fumarate: determination of the first two-step microscopic Adair constants for human hemoglobin. *Biochemistry* 1995; 34: 4773-4780.
33. Fang TY, Zou M, Simplaceanu V, Ho NT, Ho C. Assessment of roles of surface histidyl residues in the molecular basis of the Bohr effect and of 143 histidine in the binding of 2,3-bisphosphoglycerate in human normal adult hemoglobin. *Biochemistry* 1999; 38: 13423-13432.
34. 今井清博. 特集「ヘモグロビンの構造と機能 “ 各種分子分光法の威力と限界 ”」 2. ヘモグロビンとは. *生物物理* 1978; 18: 213-217.
35. Shibayama N, Saigo S. Oxygen equilibrium properties of myoglobin locked in the liganded and unliganded conformations. *J Am Chem Soc* 2003; 125: 3780-3783.

ヘモグロビンを含んだ血液代替物を利用した 単純性血管腫のレーザー治療の効果についての考察

A consideration about advantageous effect of the laser treatment of port-wine stains with blood substitutes including hemoglobin

力久 直昭
Naoaki Rikihisa

和文抄録

単純性血管腫は生下時から存在する皮膚の赤色斑であり、真皮内に拡張した異常毛細血管が存在する疾患である。1970年代から異常血管を選択的に破壊するレーザー治療が行われてきた。レーザー工学が発展し機器の高性能化が図られてきたが、現在でも赤色斑が完全に消退する症例は少ない。人工赤血球を投与しレーザー光の標的である血管内ヘモグロビンを増量することによって、単純性血管腫に対するレーザー治療成績が向上すると予想される。

Abstract

Hemangioma simplex, so called port-wine stains (PWS) consist of dysfunctional dilated micro vessels in normal dermis. Laser treatment was introduced to achieve the selective destruction of micro vessels in 1970. The targets of laser beam are erythrocytes in micro vessels. Light energy of laser is absorbed by erythrocytes and converted into thermal energy that damages the vessel walls. The development in laser engineering has contributed to technical advantages of therapeutic instruments. And the complete removal of PWS has been challenging. It is extremely difficult to treat the larger or smaller diameter micro vessels and deeply situated vessels in dermis by laser treatment. Administration of artificial red blood cell before laser treatment is considered to have a possibility to improve the therapeutic outcome of PWS. Because the diameter of artificial red blood cell is much smaller than that of erythrocyte, administration of artificial red blood cell raises the level of hemoglobin in smaller micro vessels. The laser beam is converted to high thermal energy with abundant targets in micro vessels. A treatment with combination of artificial red blood cells and laser might be new treatment option for refractory PWS, especially in smaller diameter micro vessel cases.

Keywords

hemangioma simplex, port-wine stains, capillary malformation, artificial red blood cell, pulsed dye laser, treatment-resistant

単純性血管腫の病態

単純性血管腫は皮膚の毛細血管の拡張による、境界明瞭で平坦な赤色斑である。赤ワイン色を示すことから port-wine stains とも呼ばれている (Fig. 1)。新生児の0.3%にみられ、性差はない。生下時から存在し身体の成長に比例し拡大する。頂部・前額部正中に出現する赤色斑はウンナ母斑 (salmon patch) ともいい、2歳までに自然消退する傾向をもつ。しかしその他の部位にみられる赤色斑は生涯退縮することはなく、加齢とともに

に色調が暗紫色になり病変部が隆起し凹凸に肥厚することもある (Fig. 2)。単純性血管腫の他に幼少時にみられる赤色を呈する血管性皮膚疾患には、出生後数週間で出現する乳児血管腫 (イチゴ状血管腫) もある。この疾患は血管内皮の腫瘍性増殖病変であり単純性血管腫と病理学的に区別される。

胎生4～10週の脈管形成期に血管芽細胞から未分化な網状の毛細血管叢が形成され、さらに成熟した動脈や静脈へと分化する。この時期の異常によって毛細血管叢が残存したものが単



Fig. 1. Clinical appearance of port-wine stain on a 3 month old child. Port-wine stains are present at birth. They are flat and sharply demarcated and grow proportionately with the child. The color ranges from pale pink to deep red.

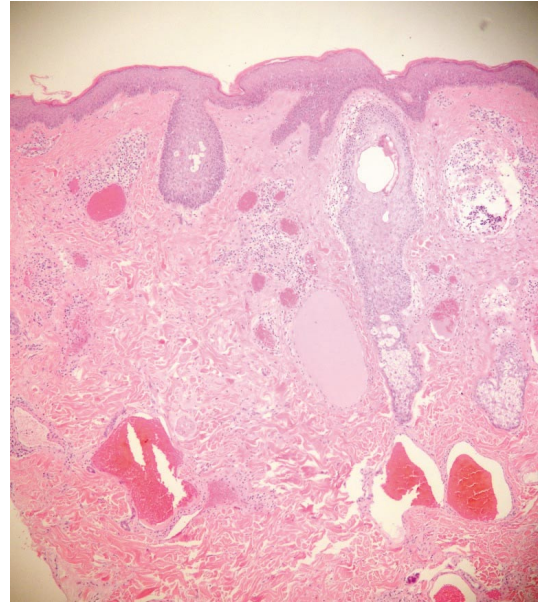


Fig. 3. Histologic appearance of port-wine stains(HE × 40) Biopsy of a 30 year old man with facial port-wine stain. Dilated capillaries filled with erythrocytes in both upper and deep dermis. The vessels walls are thin and lined by flat, mature appearing endothelium.



Fig. 2. Clinical appearance of port-wine stain on a 30 year old male face. The color of port-wine stain gradually darkens to a red shade during young adulthood and to a deep purple during middle age. In addition, with aging, the surface of the port-wine stain becomes raised and studded with nodular lesions.

純性血管腫だと考えられている¹⁾。また血管内皮細胞からのシグナルの異常によって、間葉系細胞の血管平滑筋あるいは外膜への分化誘導が障害され、異常な血管拡張が生じるとも考えられている²⁾。肉眼的には境界明瞭で平坦な赤色斑であるが、病理組織学的には真皮層の毛細血管拡張がみられ、症例ごとに真皮内の異常毛細血管の分布（密度と深さ）・血管径・血管壁の厚さ・血管拡張の程度が異なる（Fig. 3）。

単純性血管腫治療の変遷

凍結療法・放射線治療・切除術・植皮術などが行われてきたが、いずれもレーザー治療に比べて侵襲的で術後の瘢痕が目立つことが多かった。拡張血管のみ消失させ傷跡なく、患部の色調を健常な皮膚に近づけることを目標としてレーザー治療が1970年代に導入された。レーザー工学の発展とともに機器の高性能化が図られ、色素レーザーが単純性血管腫治療の現在のゴールドスタンダードとなっている。しかしこの色素レーザー療法で赤色斑が完全に消退する症例はまだ少ない。レーザー治療に反応しない難治性の単純性血管腫に対してレーザー照射方法の工夫・新たな治療方法などが考案されている³⁾。

レーザー治療の原理

レーザー光の条件を適切に設定すると、その熱エネルギーは標的とする組織に選択的に蓄積され、かつ周囲の組織には波及しない⁴⁾。単純性血管腫の治療では、レーザー光が血管内赤血球のoxyhemoglobinに吸収され、熱エネルギーに変換される。この熱エネルギーが血管壁に伝わり血管内皮が破壊され、最終的に異常血管が壊死し吸収される。熱エネルギーは血管内に留まるため血管周囲の組織には熱影響の障害を及ぼすことはない。Oxyhemoglobinへの光の吸収率と皮膚内のその他の標的となりうる水分・コラーゲン・メラニンへの吸収率の関係、また光線の皮膚への深達度といった条件から585～595nmの波長をもつ色素レーザーが単純性血管腫の治療に用いられている（Fig. 4）。

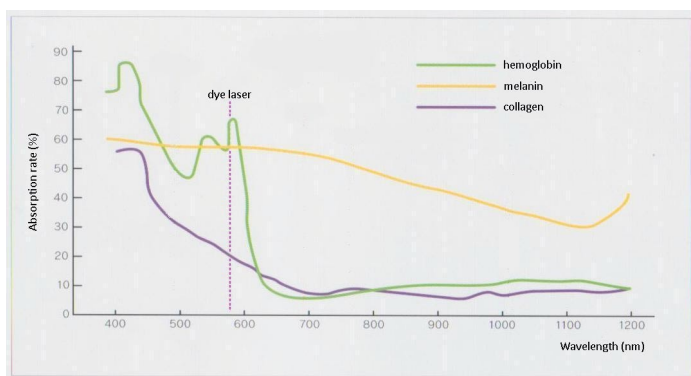


Fig. 4. Absorption spectra of cutaneous chromophores. Some wavelengths in green and yellow spectra are strongly absorbed by hemoglobin and therefore by blood vessels. The wavelength of dye laser is determined according to the second peak of hemoglobin's absorption spectrum curve. We can remove port-wine stains without injuring of the surrounding tissue with dye laser. (若松信吾他「レーザーによる母斑治療の基礎研究」日形会誌, 1983; 3: 439-445. から改変して引用)

レーザー治療の限界

単純性血管腫の治療の第一選択が色素レーザー治療となる根拠は、「異常血管のみに熱エネルギーを与えて、血管周囲の皮膚成分には熱障害を与えない」という治療原理である。しかし、正常皮膚の表面を損傷することなく治療を進めることを第一とするため、その治療の切れ味は鈍い。病変は肉眼的には境界明瞭で平坦な赤色斑を呈するが、組織学的に観察すると血管径も血管壁の厚さも異なる毛細血管が真皮層内にさまざまな密度と深さを持って存在している。このような異常血管の集団を均一なレーザー光で治療するため1回のレーザー照射で赤色斑が完全に消退することはほとんどない (Fig. 5)。レーザー治療で一定の効果を得るためには数か月単位の治療期間で複数回治療を行うことが必要である³⁾。

577nmのフラッシュランプ励起パルス色素レーザーによる血管壁障害の最深部はおおむね1.5mmであり、有意に拡張血管を消失できるのは0.6mm程度であるとの報告がある^{5,6)}。また真皮上層の血管径が中程度 ($38 \pm 18 \mu\text{m}$) の血管に有効であったとの報告もある^{7,8)}。このようにレーザー治療には物理学的な限界があるため、繰り返しレーザー照射をおこなってもわずかな色調の改善にとどまる病変も多い。ただそのわずかな色調改善が患者の希望を担う支えにもなるため、5年以上レーザー治療を続けている臨床例も少なくない。以下にレーザー治療に反応しにくい単純性血管腫の特徴を挙げる。病変が真皮層深部に存在する病変では、レーザー光が標的となるoxyhemoglobin (赤血球) に届かないため、治療効果が小さい。異常血管の血管径が非常に細い病変では、血管内のoxyhemoglobin (赤血球) が少なく熱エネルギーが十分発生しないので、治療効果が小さい。異常血管内の血液の流速が速い病変では、熱エネルギーが血管壁に効率よく伝導しないため、治療効果が小さい⁹⁾。

A



B



Fig. 5. Treatment of port-wine stain with the variable long-pulse pulsed dye laser (LPPDL) A, 4 months old child with port-wine stain on right leg before treatment. B, 1 year old, 5 months after one time LPPDL treatment.

血液代替物を利用したレーザー治療への期待

色素レーザーは毛細血管内の赤血球に吸収されるので、赤色が強い病変ほど効果が高い。このため、タッピング・加温・駆血などによって色調を回復させて照射を行うと効果的である¹⁰⁾。

ヘモグロビン小胞体の直径は赤血球の40分の1と小さいので、単純性血管腫の患者にhemoglobinを利用した血液代替物を静脈投与した時、血管内では赤血球の間を埋めるように血液代替物が存在すると考えられる (Fig. 6)¹¹⁾。毛細血管 (径 $20 \mu\text{m}$ 以下) 内での血液代替物の流動特性についての基礎研究をふまえて、適切に血液代替物を投与することが可能になれば、毛細血管内のoxyhemoglobin量を増やすことができるのではないだろうか¹²⁾。血管内の標的が増えればレーザー光は効率よく熱エネルギーに変換されるようになり、今まで色素レーザー治療が不得手としていた非常に細い異常血管に対しては特に優れた治療になると期待できる。

ヘマトポルフィリンなどの薬剤とレーザー光を組み合わせることで血管内に酸化還元反応を起こし、単純性血管腫の治療を行ったphotodynamic therapyの報告がある¹³⁾。中国では1000人以上の患者がこの治療をすでに受けており、従来の色素レーザー治療と組み合わせることで良い結果を得ている。しかし少

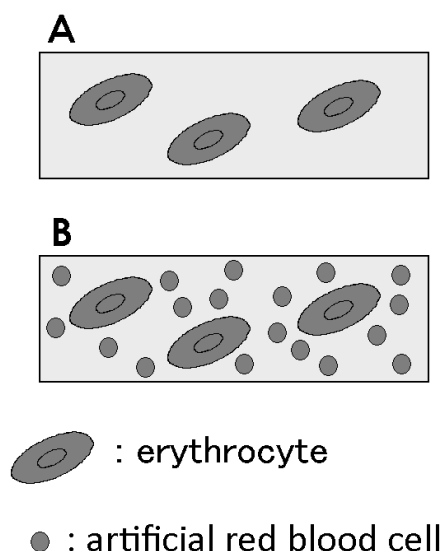


Fig. 6. Illustration of erythrocytes and artificial red blood cells(ARBC)in a micro vessel. A, erythrocytes in a micro vessel. B, erythrocytes and ARBC in a micro vessel. Because the diameter of ARBC is much smaller than that of erythrocyte, ARBC flow among erythrocytes in a micro vessel. Administration of artificial red blood cell raises the level of hemoglobin in smaller micro vessels.

量の薬剤投与と光線療法を組み合わせる血管壊死に至らせるこの治療方法は、その安全性の確保ため日光を含めた身体に浴びる光線量を術後数日間厳重に管理する必要がある。このような治療プロトコルは日本での小児例などでは使用しにくい。生理学上血管内のみに豊富に存在する hemoglobin 代謝物を標的としたレーザー治療のほうが組織選択性・安全性・エネルギー効率から有利だと考えられる。

人工赤血球と色素レーザーを組み合わせた単純性血管腫の治療では、血液代替物の熱変性による毒性も懸念されるが、一回のレーザー治療で破壊される血液代替物の量はわずかであるため副作用のリスクは少ないと予想される。レーザー治療と併用するための課題は、治療の前後に瀉血を用いて多血症による脳梗塞や心筋梗塞といった血栓症や頭痛や嘔吐などの合併症を最小限にすることや、血管内に投与した血液代替物を患部に集中させる工夫、血液代替物のレオロジーなどではないだろうか。

参考文献

1. Mulliken JB. Classification of vascular birth marks. In: Mulliken JB, Young AE, WB Saunders, ed. Vascular Birthmarks: Hemangiomas and Malformations. Philadelphia:

- W.B. Saunders, 1988; 24-37.
2. Vikkula M, Boon LM, Carraway KL 3rd, Calvert JT, Diamonti AJ, Goumnerov B, Pasyk KA, Marchuk DA, Warman ML, Cantley LC, Mulliken JB, Olsen BR. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell* 1996; 87: 1181-1190.
3. 大城貴史, 大城俊夫, 佐々木克己, 谷口由紀. 単純性血管腫に対するレーザー治療. *日レ医誌* 2010; 31: 46-52.
4. Anderson RR, Parrish JA. Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. *Science* 1983; 220: 524-527.
5. 岩崎泰政. 単純性血管腫に対する色素レーザー治療による治療効果の臨床的および組織学的検討. *日皮会誌* 1994; 104: 761-781 .
6. Tan OT, Morrison P, Kurban AK. 585nm for the treatment of port-wine stains. *Plast Reconstr Surg* 1990; 86: 1112-1117.
7. Fiskerstrand EJ, Svaasand LO, Kopstad G, Ryggen K, Aase S. Photothermally induced vessel-wall necrosis after pulsed dye laser treatment: lack of response in port-wine stains with small sized or deeply located vessels. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 671-675.
8. Fiskerstrand EJ, Svaasand LO, Kopstad G, Dalaker M, Norvang LT, Volden G. Laser treatment of port wine stains: therapeutic outcome in relation to morphological parameters. *Br J Dermatol* 1996; 134: 1039-1043.
9. Kono T, Sakurai H, Takeuchi M, Yamaki T, Soejima K, Groff WF, Nozaki M. Treatment of resistant port-wine stains with a variable-pulse pulsed dye laser. *Dermatol. Surg* 2007; 33: 951-956 .
10. 権成基, 野崎幹弘. ポートワイン血管腫に対する色素レーザー治療の新しい工夫. 平山俊, 手塚正, 大原国章編. あざの治療. 東京: 克誠堂出版, 1997; 60-169.
11. 酒井宏水, マルコス・インタリエッタ, 土田英俊. 微小循環動態の観測と赤血球代替物の評価 Efficacy of Red Cell Substitutes in Microcirculation. *人工血液* 1998; 6: 76-87.
12. 丹羽光一. 血液のレオロジーと赤血球代替物. *人工血液* 1998; 6: 101-105.
13. Gu Y, Liang NY, Pan YM, Liu FG. Clinical study of 1949 cases of port wine stains treated with vascular dynamic therapy(Gu's PDT) *Ann Dermatol Venereol* 2007; 143: 241-244.

Call for Papers

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

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



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

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

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

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

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

reviewers. Submit your manuscripts to the Editor-in-Chief by either of the following methods with a covering letter(of any format)

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

ii) Submission by post of four sets of hardcopies.

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

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

4) Manuscripts should be typed on A4 or letter size paper. The title page should include the title, names of authors, institutions to which all the authors belong, and the address of the corresponding author. Handwritten manuscript should be written consisting of 20 lines to 1 page.

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

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

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

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

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

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

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

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

12) References should be cited numerically in order of appearance in the text using superscript letters as follows: ²⁾, ^{3,5)}, ^{1, 4,6)}, etc. References should be listed using the Vancouver style as follows: Names of all authors. Title of paper. Title of journal. Year of publication; volume number: inclusive page numbers. Abbreviations of journal names should be in accordance with *Index Medicus*. References to books should be given as follows: Names of all authors. Title of paper. Name of editor(s) Book title. Place of publication: Publisher, year; inclusive page numbers.

References to electronic sources should be given as follows:

Name of website.

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

Examples:

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

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

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

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

16) Address for manuscripts to be sent:

Attn: Artificial Blood Editorial Office

The Society of Blood Substitutes, Japan

Division of General Thoracic Surgery, Department of Surgery,
Keio University, School of Medicine

35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

Tel: +81-3-5363-3493 Fax: +81-3-5363-3499

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

投稿規定（平成20年9月30日改訂）

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

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

ワープロを用いて作製した原稿の投稿を原則とする。ただし、手書き原稿による投稿でも受け付ける。欧文による投稿を歓迎する。

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

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

ii) ハードコピー4部を郵送する。

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

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

4) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著

者名、全著者所属、英文著者名、英文著者所属、続いて連絡の取れる著者（corresponding author）の住所、英文住所を記入する。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。

5) 「原著論文」、「総説」、「トピックス」、「オピニオン」については、第2頁以降に和文抄録、Keywords（英文で6個程度）を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること。

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

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

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

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

9) 句読点はコンマ（,）ピリオド（.）とする。

10) 文中の英語に使用するフォントは、Times, Helvetica, Courier, Symbolを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめること。

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

12) FigureとTable：引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は、全て英文とすることが好ましい。本文中に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。

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

(例)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

18) 原稿の送付先

〒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

日本血液代替物学会 会誌「人工血液」編集部 宛

電話: 03 - 5363 - 3493, FAX: 03 - 5363 - 3499

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

人工血液

日本血液代替物学会会誌

Artificial Blood

The Official Journal of The Society of Blood Substitutes, Japan

日本血液代替物学会

会長 小林 紘一 殿

To: Dr. Koichi Kobayashi

President

The Society of Blood Substitutes, Japan

日本血液代替物学会 会誌「人工血液」に投稿した論文

表題

Manuscript Title:

につきまして、倫理規定に準拠した内容であること、また、共著者の全員が内容を確認していることを誓約いたします。なお、掲載された論文の著作権は、貴学会に帰属することを認めます。

I attest that the content of the above manuscript, submitted for publication in *Artificial Blood*, the journal of the Society of Blood Substitutes, Japan, conforms to ethical standards and has been confirmed by all coauthors. We acknowledge that copyright will be held by the Society.

平成 年 月 日

Date:

代表著者（署名）

Corresponding Author (Signature) _____

連絡先

Contact Address:

（本用紙はコピーしたものを使用されても結構です。）

This form may be photocopied for use.

日本血液代替物学会 会誌「人工血液」編集部

〒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 E-mail : amorjsbs@sc.itc.keio.ac.jp

Artificial Blood Editorial Office

The Society of Blood Substitutes, Japan

Division of General Thoracic Surgery, Department of Surgery, Keio University, School of Medicine

35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

Tel: +81-3-5363-3493 Fax: +81-3-5363-3499 E-mail : amorjsbs@sc.itc.keio.ac.jp

編集後記

本号では先ず、野江病院の三宅先生ほかより、人工赤血球が混在することが血液の電解質測定にどのように影響するかを解析した結果についての報告がありました。三宅先生は10月の年次大会の直前にお亡くなりになりました。ご冥福を心よりお祈り致します。印刷が大幅に遅れたことを大変申し訳なく思っております。福井大学の岡沢先生らは、人工赤血球に放射性 $^{15}\text{O}_2$ 標識分子を結合させて投与し、脳酸素代謝測定に用いる方法の実験的実証、また力久先生からは、HBOCsを利用した単純性血管腫のレーザー治療について、オピニオンを頂きました。斬新な利用法のアイディアのご提供を頂きありがとうございます。是非とも臨床応用に結びつけていただくことを期待します。

また、自治医科大学の柴山先生からは、ヘモグロビンはR状態とT状態のみならずP状態の存在もありうるとのことで、ヘモグロビン分子はまだ未解明の点が多い不思議な蛋白質で、科学者の興味は尽きないと今更乍ら実感しました。会告に示しました通り、2011年7月に第13回国際血液代替物学会がボストンで開催されます。日本の血液代替物研究の成果を示す良い機会と思います。また続いて2011年10月には、札幌にて年次大会が開催されることが決定しております（大会長：米川元樹先生）。これについても逐次会告としてお知らせ致します。

（酒井 宏水）

編集委員会

酒井 宏水(委員長), 東 寛, 大谷 渡, 武岡 真司, 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.18(3) 2011年1月24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

〒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

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

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