

目 次

# 人工血液

第8巻 第3号 2000年9月

第7回年次大会プログラム .....	59
--------------------	----

Contents

# ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 8 No. 3 September, 2000

<i>The 7th Annual Meeting Program</i> .....	59
---	----

# 第7回日本血液代替物学会年次大会

The Seventh Annual Meeting of  
The Society of Blood Substitutes, Japan

テーマ

「血液代替物臨床応用への戦略」

大会長 北畠 顕  
北海道大学大学院医学研究科  
循環病態内科学 教授

会期 2000年9月7日(木), 8日(金)

会場 かでる2・7 かでるホール

〒060-0002 札幌市中央区北2条西7丁目

TEL: 011-231-4111(内線36-123)

## 年次大会大会長挨拶

人工酸素運搬体の臨床試験が開始されて10年以上となります。その過程は平坦なものではありませんでした。たとえばヘモグロビン製剤では、血管収縮、腸管収縮などの副作用が出現し、その機序は後にヘモグロビンがnitric oxideを消去する結果であることが明らかとなります。米国Baxter Healthcare社は、逆にこの血管収縮作用を利用し、出血性ショック治療への応用をめざし臨床第三相試験を実施しました。しかし一昨年、その治療効果は否定され、開発中止となりました。その後から、FDAは人工酸素運搬体の認可に際し、安全性を重視する方針を従来よりもいっそう強めています。10年以上前に着手された多くの臨床試験が、いずれも第三相を終えていない状況を鑑みますと、人工酸素運搬体の臨床応用には、いまだに解決すべき課題の多いことが暗示されます。

しかしながら、この10年間で大きな前進があったことも事実です。Apex Bioscience社は、非細胞性ヘモグロビン製剤をエンドトキシンショック治療に使用する臨床第三相試験をまさに始めようとしています。一方、Alliance社はパーフルオロカーボン製剤を用いた自己血支援プログラムの臨床第三相試験を開始しました。つい最近Baxter社がそれに合流し、臨床応用の新たな方向性を示されたと言えます。

国内を顧ますと、リポソーム封入体など新たな製剤がされ、血小板代替物研究が進展するなど、他の血液成分研究を含め、現在までわが国は多様な分野において、血液代替物研究に先駆的な役割を果たしてきました。21世紀を目前に控えた本年、平成9年度から開始された厚生省高度先端医療研究が継続されました。今年度からは臨床応用を企図した研究の推進が求められています。

それを踏まえ、本年次大会ではテーマを「血液代替物臨床応用への戦略」といたしました。会長シンポジウムは「研究開発Update2000」と題し、血液代替物研究の最前線を紹介していただきます。シンポジウムでは、臨床応用を念頭に置き「新たな人工酸素運搬体とその臨床応用」と「人工血液臨床応用をとりまく問題点と対策」を企画しました。また、特別講演を土田英俊先生とRobert M. Winslow先生に、教育講演を池田康夫先生にお願いしましたが、各分野を総括いただき、今後の示唆に富むご講演をいただけるものと思います。さらに、ワークショップ「海外における人工血液開発とわが国へのフィードバック」では、今まさに臨床治験を進めているApex社とAlliance社から開発担当者を招聘し、近況を紹介していただきます。一般演題も12題の発表があり、病態との関連性や酸素運搬体の新たな応用に関する演題など、多岐にわたる内容となっております。

9月初旬の札幌はとても爽やかな季節です。活発なご討論をいただき、本年次大会が参加者全員にとって実り多いものになることを心より期待いたします。

第7回日本血液代替物学会年次大会大会長

北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学  
北畠 顕

## ■ 参加者の方へ

### 1. 開場及び受付開始

かでる2・7の開場及び受付開始は両日とも午前8時45分となります。

### 2. 参加登録

参加登録は、総合受付(かでる2・7 1階展示ホール)において行います。

参加費は10,000円(懇親会参加費を含む)です。ネームカード(兼領収書)をお渡しますので、所属、氏名を各自でご記入の上、ご着用下さい。会期中、会場へご入場の際には必ずネームカードをご着用下さい。

### 3. 年会費および新入会受付

日本血液代替物学会に未入会の方は、総合受付にて入会手続きをおとり下さい。

年会費は10,000円です。

### 4. 収録集

収録集は会員全員に事前送付しております。それ以外にご入用の方は総合受付にて1部1,500円にて販売致しますが、部数に限りがあります。

### 5. 懇親会

参加者相互の親睦を図るため、第1日目、9月7日(木)午後6時より札幌ガーデンパレスにおいて懇親会を開催します。ぜひ御参加下さい。

### 6. 呼出・伝言

会場内での呼出は、緊急の場合に限り、総合受付にお申し出下さい。

## ■ 演題発表される方へ

シンポジウム、ワークショップの講演時間は15分、一般演題の発表時間は10分、討論時間5分です。口演終了1分前にお知らせします。スライドの枚数には制限はありませんが、時間厳守をお願い致します。

スライドプロジェクター2台、およびコンピューター用プロジェクターとVHS用プロジェクターを用意しますが、コンピューター使用の場合も予備のスライドをご用意下さい。スライド1台以外をご使用の方、またコンピューター使用の方はその種類と使用ソフトを、前もって事務局までご連絡下さい。

講演予定の30分前までに(各日最初の演題を除く)、スライド受付(1階展示ホール)にて試写をお願いします。スライドおよびVHSテープはスライド受付にて返却致します。

外国人の参加者もおられますので、スライドの図表は極力英語をご使用下さい。

## ■ 各種会議日程

理 事 会：9月7日(木) 12:00～ かでる2・7 320号室

評 議 員 会：9月7日(木) 12:30～ かでる2・7 210号室

総 会：9月7日(木) 13:00～ かでる2・7 かでるホール

編集委員会：9月8日(金) 12:00～ かでる2・7 210号室

## ■ 学会事務局

北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学

担当 佐久間一郎

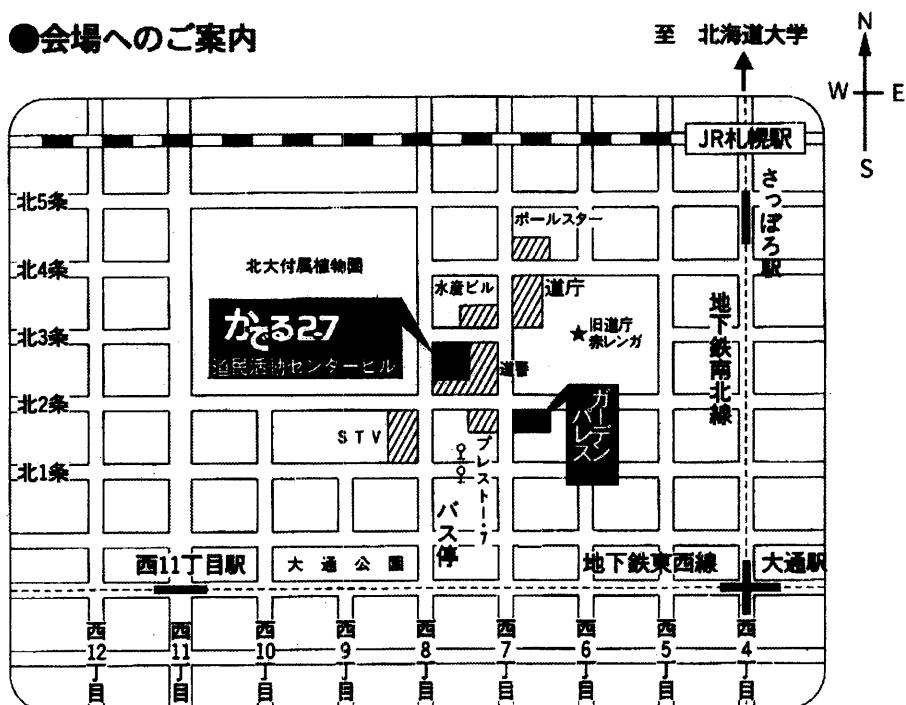
秘書 村井雅奈子

TEL: 011-716-1161 内線 6973  
(直通011-717-1132)

FAX: 011-706-7874

e-mail: cvaspr@med.hokudai.ac.jp

### ●会場へのご案内



#### ■学会会場：「かでる 2.7」

〒060-0002 札幌市中央区北2条西7丁目  
TEL 011-231-4111 (内線 36-123)

#### ■懇親会：「ガーデンパレス」

〒060-0001 札幌市中央区北1条西6丁目  
TEL 011-261-5311

## 9月7日(木)

9:00~9:15 大会長挨拶

9:15~11:00 会長シンポジウム 座長：友田燁夫，劍物修  
「血液代替物開発研究 Update, 2000」

### 1. 酸素輸液開発の現状

○ 武岡真司(早稲田大学理工学総合研究センター)

### 2. 酸素運搬体開発の方向性

○ 仲井邦彦<sup>1</sup>, 佐久間一郎<sup>2</sup>, 佐藤 洋<sup>1</sup>, 北畠 順<sup>2</sup>  
(東北大学医学系研究科環境保健医学<sup>1</sup>, 北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学<sup>2</sup>)

### 3. 血小板代替物

○ 西谷孝子(慶應義塾大学医学部内科)

### 4. 遺伝子組換えヒト血清アルブミン

○ 小林 薫(ウェルファイド株式会社創薬研究所)

### 5. 遺伝子組換えヒト抗体

○ 黒澤良和(藤田保健衛生大学総合医科学研究所)

11:00~12:00 一般演題 座長：西出宏之, 川村明夫

### 1. 全合成系酸素運搬体(アルブミンヘム)のNO配位能

○ 小松晃之, 松川泰子, 土田英俊(早稲田大学理工学総合研究センター)

### 2. ピリドキシル化ポリオキシエチレン・ヘモグロビン重合体の摘出腸管の収縮運動に対する作用

○ 村井恵良<sup>1,2</sup>, 西 勝英<sup>1</sup>(熊本大学医学部薬理学第二<sup>1</sup>, 北海道大学歯学部口腔生理学<sup>2</sup>)

### 3. 人工酸素運搬体投与時の肺微小循環動態の解析

○ 山内徳子<sup>1</sup>, 山本 学<sup>1</sup>, 大塚 崇<sup>1</sup>, 岩丸有史<sup>1</sup>, 渡辺真純<sup>1</sup>, 堀之内宏久<sup>1</sup>, 小林紘一<sup>1</sup>, 武岡真司<sup>2</sup>,  
土田英俊<sup>2</sup>(慶應義塾大学医学部外科<sup>1</sup>, 早稲田大学理工学総合研究センター<sup>2</sup>)

### 4. 血中セロトニン動態からみたヘモグロビン系人工酸素運搬体の血小板作用

○ 富樫広子<sup>1</sup>, 仲井邦彦<sup>2</sup>, 佐久間一郎<sup>3</sup>, 藤井 聰<sup>3</sup>, 佐藤 洋<sup>2</sup>, 吉岡充弘<sup>1</sup>, 北畠 順<sup>3</sup>  
(北海道大学大学院医学研究科機能薬理学<sup>1</sup>, 東北大学大学院医学系研究科環境保健医学<sup>2</sup>,  
北海道大学大学院医学研究科循環病態内科<sup>3</sup>)

12:00~13:00 昼 食

13:00~13:15 総 会(於 かでるホール)

13:15~14:00 特別講演 I 座長：湯浅晋治

### 「わが国における血液代替物研究」

○ 土田英俊(早稲田大学理工学総合研究センター)

14:00~15:00 一般演題 座長：清水 勝, 渡辺真純

### 5. 酸素輸液(ヘモグロビン小胞体)投与後の細網内皮系の病理学的検討

○ 酒井宏水<sup>1</sup>, 堀之内宏久<sup>2</sup>, 富山賢一<sup>1</sup>, 池田英二<sup>2</sup>, 武岡真司<sup>1</sup>, 小林紘一<sup>2</sup>, 土田英俊<sup>1</sup>  
(早稲田大学理工学総合研究センター<sup>1</sup>, 慶應義塾大学医学部<sup>2</sup>)

6. ヘモグロビン溶液中ウイルスの加熱による不活化  
○ 阿部英樹<sup>1</sup>, 平山順一<sup>1</sup>, 武岡真司<sup>2</sup>, 土田英俊<sup>2</sup>, 池淵研二<sup>1</sup>, 池田久實<sup>1</sup>,  
(北海道赤十字血液センター<sup>1</sup>, 早稲田大学理工学総合研究センター<sup>2</sup>)
7. ジメチルメチレンブルー(DMMB)によるストローマフリーヘモグロビン(SFH)のウイルス光不活化と  
抗酸化系への影響  
○ 平山順一<sup>1</sup>, Stephen J. Wagner<sup>2</sup>, 阿部英樹<sup>1</sup>, 加茂直樹<sup>3</sup>, 池淵研二<sup>1</sup>, 池田久實<sup>1</sup>  
(北海道赤十字血液センター<sup>1</sup>, 米国赤十字Holland研究所<sup>2</sup>, 北海道大学薬学部<sup>3</sup>)
8. リポソームがヒト末梢血白血球に及ぼす影響—TNF- $\alpha$ の產生とSOD内包化による抑制効果—  
○ 藤原収子<sup>1</sup>, 平山文也<sup>2</sup>, 緒方嘉貴<sup>3</sup>, 松田 彰<sup>4</sup>, 池田久實<sup>1</sup>, 池淵研二<sup>1</sup>  
(北海道赤十字血液センター<sup>1</sup>, 大阪府赤十字血液センター<sup>2</sup>, テルモ株式会社研究開発センター<sup>3</sup>,  
北海道大学大学院薬学研究科薬化学<sup>4</sup>)

15:00~15:15 休憩

15:15~16:00 教育講演Ⅰ 座長：宮崎 保  
「血小板輸血の課題と血小板代替物の開発」  
○ 池田康夫(慶應義塾大学医学部内科)

16:00~17:00 特別講演Ⅱ 座長：小林紘一  
「Myths and Realities of Blood Substitute Design」  
○ Robert M. Winslow, MD (Sangart, Inc.)

18:00~ 懇親会(於 札幌ガーデンパレス)

9月8日(金)

9:00~11:00 シンポジウム 座長：阿岸鉄三，池田久實  
「新たな人工酸素運搬体とその臨床応用」

1. ショック病態におけるリポソーム封入型ヘモグロビンの代謝・分解と自動酸化のメカニズム  
○ 末松 誠<sup>1</sup>, 京兼隆典<sup>3</sup>, 武岡真司<sup>2</sup>, 石村 龍<sup>1</sup>, 二村雄次<sup>3</sup>, 土田英俊<sup>2</sup>  
(慶應義塾大学医学部医化学<sup>1</sup>, 早稲田大学理工学部高分子化学<sup>2</sup>, 名古屋大学医学部第一外科<sup>3</sup>)
2. 新たなヘモグロビン修飾体  
○ 西 勝英(熊本大学医学部薬理学第二)
3. 新たなパーフルオロカーボンエマルジョンの調製と評価  
○ 福島昭二<sup>1</sup>, 西尾琢也<sup>1</sup>, 岸本修一<sup>1</sup>, 竹内由和<sup>1</sup>, 仲井邦彦<sup>2</sup>, 田村 守<sup>3</sup>, 坂野上淳<sup>3</sup>, 佐久間一郎<sup>4</sup>, 北畠顕<sup>4</sup>(神戸学院大学薬学部<sup>1</sup>, 東北大学医学系研究科<sup>2</sup>, 北海道大学電子科学研究所<sup>3</sup>, 北海道大学大学院医学研究科<sup>4</sup>)
4. 虚血心におけるSNO-PEG-Hbの冠血流増加・心筋代謝及び収縮不全の改善作用  
○ 浅沼博司<sup>1</sup>, 北風政史<sup>1</sup>, 真田昌爾<sup>1</sup>, 野出孝一<sup>1</sup>, 高島成二<sup>1</sup>, 坂田泰彦<sup>1</sup>, 朝倉正紀<sup>1</sup>, 扇田久和<sup>1</sup>, 佐久間一郎<sup>2</sup>, 北畠顕<sup>2</sup>, 仲井邦彦<sup>3</sup>, 葛谷恒彦<sup>1</sup>, 堀正二<sup>1</sup>  
(大阪大学大学院医学系研究科病態情報内科学<sup>1</sup>, 北海道大学大学院医学研究科循環病態内科<sup>2</sup>, 東北大学大学院医学系研究科環境保健医学<sup>3</sup>)
- 5.(指定発言) 人工酸素運搬体の臓器移植への応用の可能性  
○ 藤堂 省(北海道大学大学院医学研究科移植外科学)

11:00~12:00 一般演題 座長：村田満，酒井宏水

9. rGPIIa-IIa-liposomesのコラーゲン表面への粘着に対するrGPIIa-IIaとrGPIbαの表面密度の影響  
○ 西谷孝子<sup>1</sup>, 戎能美枝<sup>3</sup>, 上出佳永子<sup>4</sup>, 村田 満<sup>1</sup>, 半田 誠<sup>2</sup>, 池田康夫<sup>1</sup>  
(慶應義塾大学医学部内科<sup>1</sup>, 慶應義塾大学医学部輸血センター<sup>2</sup>, 東レ基礎研究所<sup>3</sup>, 吉富製薬研究所<sup>4</sup>)
10. フィブリノーゲンを表面に固定化したリポソーム, Fgn-liposomes  
○ 西谷孝子<sup>1</sup>, 半田 誠<sup>2</sup>, 池田康夫<sup>1</sup>  
(慶應義塾大学医学部内科<sup>1</sup>, 慶應義塾大学医学部輸血センター<sup>2</sup>)
11. アルブミンマイクロスフェアを利用した血小板代替物モデル(2)  
○ 寺村裕治<sup>1</sup>, 大川春樹<sup>1</sup>, 武岡真司<sup>1</sup>, 池田康夫<sup>2</sup>, 土田英俊<sup>1</sup>  
(早稲田大学理工学総合研究センター<sup>1</sup>, 慶應義塾大学医学部内科<sup>2</sup>)
12. SNO-PEG-Hbの血小板に及ぼす影響：血管内ステント, 心臓外科手術における体外循環, 人工血管のコーティング等臨床応用にむけての基礎的検討  
○ 藤井 聰<sup>1</sup>, 藤井ひとみ<sup>2</sup>, 仲井邦彦<sup>3</sup>, 佐久間一郎<sup>1</sup>, 劍物修<sup>2</sup>, 北畠顕<sup>1</sup>  
(北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学<sup>1</sup>, 北海道大学大学院医学研究科侵襲制御医学<sup>2</sup>, 東北大学大学院医学系研究科環境保健医学<sup>3</sup>)

12:00~ 昼 食

13:00~14:45 ワークショップ 座長：小室勝利, 堀之内宏久  
「海外における人工血液開発とわが国へのフィードバック」  
「Blood Substitute Development in Foreign Countries and Its Feedback to Japan」

1. Clinical Studies of Pyridoxalated Hemoglobin Polyoxyethylene  
Joseph DeAngelo (Apex Bioscience, Inc.)
2. Clinical Applications of Pyridoxalated Hemoglobin Polyoxyethylene (PHP) :A Modified Hemoglobin Therapeutic with Nitric Oxide Scavenging and Antioxidant Activity  
Todd Talarico (Apex Bioscience, Inc.)
3. Development Status of Oxygen<sup>TM</sup> (Perflubron Emulsion): An intravenous Oxygen Carrier For Use as a Temporary Red Cell Substitute in Elective Surgery  
Peter E. Keipert (Alliance Pharmaceutical Corp.)

14:45~15:00 休憩

15:00~17:00 ワークショップ 座長：高折益彦，仲井邦彦  
「人工血液臨床応用をとりまく問題点と対策」

1. 人工血液—工ホバの証人の立場から—
  - 金森寿憲<sup>1</sup>, 中井猛之<sup>2</sup> (工ホバの証人の医療機関連絡委員会札幌委員会<sup>1</sup>, 東京品川委員会<sup>2</sup>)
2. 臨床の立場から
  - 堀之内宏久<sup>1</sup>, 山内徳子<sup>1</sup>, 岩丸有史<sup>1</sup>, 大塚 崇<sup>1</sup>, 田島敦志<sup>1</sup>, 吉津 晃<sup>1</sup>, 泉陽太郎<sup>1</sup>, 渡辺真純<sup>1</sup>, 武岡真司<sup>2</sup>, 酒井宏水<sup>2</sup>, 小松晃之<sup>2</sup>, 土田英俊<sup>2</sup>, 小林紘一<sup>1</sup>  
(慶應義塾大学医学部外科<sup>1</sup>, 早稲田大学理工学総合研究センター高分子化学<sup>2</sup>)
3. 血液事業の立場から
  - 池淵研二, 池田久實(北海道赤十字血液センター)
4. 人工酸素運搬体, Neo Red Cellの開発現況
  - 緒方嘉貴, 金田伸一(テルモ株式会社研究開発センター)
5. 人工血液の臨床応用を展望して
  - 高折益彦(岡山県赤十字血液センター)

17:00 閉会の辞

## わが国における 血液代替物研究

(つちだ えいしゅん)

土田 英俊（早稲田大学 教授・理工学総合研究センター）

## Myths and Realities of Blood Substitute Design

Robert M. Winslow, MD

Sangart, Inc. San Diego, CA 92121, U.S.A.

人工血液開発は先ず輸血技術の確立にあり、歴史的記録は塩田広重(東大医, 1919)が初めて貧血患者(子宮出血)へ輸血(2dL)したことが最初である。その後上海事変勃発時に、大日本給血普及会が設立(1932)され乾燥血漿が開発され、第二次大戦後、民間(商業)血液銀行(1950)と、次いで日本赤十字社に献血の血液銀行が開設(1952)され、保存血輸血が普及することになった。その間 黄色い血液(頻回採血によるHct値低下)やライシャワー米大使の肝炎感染による国際問題化などもあり、売血禁止の行政措置(1969)が採択される。現在は国民の献血による血液採血が日赤血液センターにより実施され、医療に多大の貢献をしてきた。しかし問題(HIVなどウィルス感染、保存期限、供給量など)もあった。

"非使用血液の有効利用"が打出され、保存血を利用した血漿蛋白質、血小板、赤血球などの加工が実施され、Hbを利用する血液代替物の展開(1980年代)も推進されるようになってきた。1993年には日本血液代替物学会が組織され、年次大会や国際会議(1997)が定期的に開催され、血液代替物に関する将来を予測する活発な議論が展開されるようになった。リン脂質膜で高濃度ヒトHbを被覆したHb小胞体は、製造法や表面修飾の工夫により無毒で優れた酸素輸送能力と安定度を有し、現在臨床に向けた準備が進んでいる。他方、酸素結合席としてのヘム誘導体(リビドヘム)をリン脂質と共に集合させたリビドヘム小胞体や、アルブミン-リビドヘム複合体も完成の域に近付いて来て、全合成系の酸素輸液として期待されている。このほか、改良型PFCやSNO-Hbなどの新顔も展開され、注目されている。

1997年度から厚生省は、高度先端医療研究事業の中に"人工血液開発研究"を取上げている。本年からは第2期に入り、①酸素を輸送できる人工赤血球に加え、②血液を凝固させることのできる人工血小板、③感染を防止できる人工免疫を対象とした推進が計られている。このような時期に当り、大会長 北畠 顯 教授の御指示により、上述の経緯と今後の展開予測を含め、近況までを取りまとめて報告し、会員各位に御討論を戴くことになった。

Hemoglobin is a well-understood and highly conserved protein, and its structure and function are perhaps better understood than any other protein in nature. All higher organisms package hemoglobin within red blood cells; if not for this system, hemoglobin would rapidly be removed from the circulation and protein synthesis would not be capable of maintaining the hemoglobin level needed to oxygenate tissues. The circulatory system, including the microcirculation, is closely integrated with the function of hemoglobin contained within red cells. For a century, it has been assumed that the properties of cell-free hemoglobin plasma expanders should closely mimic those of red cells. Traditionally, this has focused on reproducing the oxygen equilibrium curve (OEC) of blood. However, recent studies indicate that the successful design of a safe and effective oxygen-carrying hemoglobin solution must match oxygen transport, acid-base function and CO<sub>2</sub> transport to a microcirculation already "engineered" to a cellular system. Lessons learned from hypoxia (high altitude physiology), altered rheology (sickle cell anemia) and cell-free systems (blood substitutes) allow a broad specification of the ideal properties of a cell-free oxygen carrier that is free of their prior inherent limitation: vasoconstriction. Studies in animals confirm that newly designed hemoglobin solutions, gram for gram, are superior to red cell hemoglobin in protecting tissue in severe hemorrhage.

## 血小板輸血の課題と血小板代替物の開発

## 酸素輸液開発の現状

池田康夫

慶應義塾大学医学部内科

武岡真司

早稲田大学 理工学総合研究センター

造血幹細胞移植による造血器疾患・固型癌の治療、高度な外科的治療の進展に伴い、補助療法としての血小板輸血の重要性は益々増加してきている。我が国は、諸外国と比べ、アフェレーシス血小板の供給率が著しく高く、血小板輸血の供給・安全性の面から大いに評価される得る体制を取っていると言える。しかし、血小板製剤も他の血液製剤同様、輸血後感染症、同種免疫抗体の発現などのリスクは不可避であり、また血小板製剤の保存期限を考えると、緊急時の対応に課題を残している。

このような背景のもと、近年血小板代替物の開発に注目が集まっている。血小板代替物の研究の歴史をみると、初期には体内に少数残存する血小板と凝集塊を形成することにより、止血機能を発揮する人工物として血小板 $\alpha$ IIB $\beta$ 3に結合し得るフィブリノゲン又はペプチドを担体に結合させたものが作られた。1992年に Coller 等により報告された thromboerythrocytes 等である。近年、Levi 等によりアルブミンマイクロカプセルを用いた synthocytes が報告され、いずれも動物実験でそれらの止血機能が証明されている。

我々の開発研究方針はこれらと異なり、血小板粘着機序に重要な役割を果たす血小板膜蛋白 GPIb $\alpha$  (vWF 受容体)、 $\alpha$ 2 $\beta$ 1 インテグリン (コラーゲン受容体) を大量に遺伝子組み換え体として精製し、リポソーム又はアルブミンマイクロスフェアに固相化し、血管損傷部位にのみ特異的に集積し、止血機能を発揮し得る人工物を作成した。本講演では、これらの代替物の in vitro、in vivo の評価について詳しく報告したい。

緊急時に際して血液型に關係なく、何時でも何処でも安全に必要量を供給できる酸素輸液は、次世代医療において不可欠の課題である。人体に受入れ可能な要件を満足する酸素輸液用の素材を理工学的立場から設計・合成し医学的な評価を通じ、臨床応用に繋ぐための基礎科学として展開を計ってきた。ここでは、非細胞型の修飾 Hb と非細胞型 Hb 小胞体の実験結果を整理し、Hb 小胞体の長所を述べる。

修飾 Hb の溶液物性（溶液粘度、コロイド浸透圧）は、分子構造（分子量とヘム濃度）に依存する。他方、Hb 小胞体では、低粘度でコロイド浸透圧はほぼゼロであるため、コロイド添加によって調節可能となる。また、酸素親和度も修飾 Hb では分子構造によって決定されるが、Hb 小胞体では内包させるアロステリック因子の種類と濃度によって調節可能であり、細胞型では製剤化が容易である点が長所となる。

分子量の異なる修飾 Hb と Hb 小胞体に関し、血圧および抵抗血管径との関係を明らかにし、粒子径の大きい Hb 小胞体では NO 捕捉による血管収縮と血圧上昇を共に認めないことを明らかにした。また、その影響度は分子量が大きくなる程低下した。更に、非細胞型では Hb は活性酸素との反応でフェリル体を生じ副作用の原因となるが、Hb 小胞体は膜で隔離された不均一系であるため極めて低活性であった。Hb 小胞体の代謝に関しては検討中であるが、細網内皮系にて捕捉代謝され、1 週間以内には殆ど消失する結果が得られている。現在、小胞体を構成する脂質成分についても、代謝、安定度、価格の観点から分子設計を行なっている。

## 酸素運搬体開発の方向性

仲井邦彦<sup>1</sup>、佐久間一郎<sup>2</sup>、佐藤洋<sup>1</sup>、北畠顯<sup>2</sup><sup>1</sup>東北大学 医学系研究科 環境保健医学<sup>2</sup>北海道大学 医学系研究科 循環病態内科

## 血小板代替物

西谷孝子

慶應義塾大学医学部内科

酸素運搬体開発を巡るこの1年間で最も大きな状況変化は、FDAがフェーズ3実施の例数を増やし、安全性重視の姿勢を打ち出したことであろう。詳しい状況は本学会でApex社のクリスらの招聘講演が実現すれば明瞭になるものと期待されるが、Baxter社の撤退後にFDAが姿勢を変化させたことは間違いない。昨年度のFDA主催の評価に関する会合でも、有効性ではなく、安全性と生体適合性の評価が優先された。このような変化は、臨床試験が進む一方で生体適合性に関する基礎研究がまだ重要であることを極めて強く示唆すると同時に、どのような適応病態をイメージしそのend-pointをどこに置くのか、主にこの2点に関して問題提起を行っているのではなかろうか。

酸素運搬体開発の用途を巡っては、以前から輸血代替を目指すのか、酸素治療に特化させるのか、という議論が存在してきた。もちろん両者を完全に切り離す必要もない。しかし、開発研究は常に具体的であるべきであり、どのような適応病態を念頭に置き開発を行うのか、評価のend-pointをどこに求めるのか、きわめて具体的に問われている。それはまさに輸血代替と酸素治療への関わり方とも密接な課題であろう。

我々は、酸素運搬体としてHbを用いるSNO-PEG-Hbを開発し、さらに非Hb系として新しいパーフルオロケミカル(PFC)製剤の開発に着手している。この両者は、Hb系はcell-free系として、PFCは粒子系という意味で細胞系として、分類することも可能である。それぞれの製剤が有する特徴と開発の意図、さらには欠点を述べつつ、今後の輸血代替または酸素治療における可能性と問題点について議論を試みてみたい。

1997年に厚生省高度先端医療研究事業により人工血小板研究班が組織されて以来、約3年にわたる研究で止血機能を保持しうる人工粒子の創製に成功した。具体的な研究成果としては、血管障害部位へ特異的に集積し、血小板減少時の血管壁の脆弱性を補強しうる物質として、血管内皮下組織の構成成分であるコラーゲンやvWFのレセプターである GPIIaIIa 複合体と GPIba の遺伝子組み換え体を固定化したリポソーム、rGPIIa-IIa-liposomes, を創り、このリポソームが流動状態下でコラーゲン表面に効率よく粘着することが確認された。rGPIba のみを固定化したリポソーム、rGPIba-liposomes, と vWF 表面との相互作用は可逆的、一過性で、その粘着量はずり速度が高いほど増加した。一方、rGPIIaIIa のみを固定化したリポソーム、rGPIIa-IIa-liposomes, はコラーゲン表面に強固に粘着するが、高ずり速度下では、その粘着は著しく減少した。rGPIIa-IIa-liposomes は、高ずり速度下でも効率良く強固にコラーゲン表面に粘着しており、粘着において rGPIIaIIa と rGPIba が協同的に働いていることを示している。rGPIIa-IIa-liposomes は可溶性 vWF を介して、コラーゲン表面への血小板粘着により活性化した GPIIbIIIa と特異的に相互作用して血小板凝集に巻き込まれることも確認された。また、血小板減少時に残存している正常な血小板の機能を補助、増幅できるような物質として、活性化血小板と結合しうるフィブリノーゲンを固定化したリポソーム、Fgn-liposomes, を創り、このリポソームが Fgn と活性化 GPIIbIIIa との相互作用により血小板凝集に巻き込まれることが明らかとなった。リポソームの *in vivo* でのミクロ的挙動解析法として、ラット腸間膜微小循環を用いた生体内挙動解析システムが確立され、rGPIba-liposomes の動脈内での偏在分布が確認された。さらに、rGPIba-liposomes の *in vivo* 止血能が血小板減少ラットを用いて検討され、中等度の血小板減少ラットではリポソーム輸注後の出血時間の短縮がみられた。

血小板膜糖蛋白やフィブリノーゲンを担持するリポソームの創製は人工血小板開発の有力な手段であり、これを基盤として血液凝固促進活性などを附加させることで、臨床上有用で実用化し得る血小板代替物の開発を推進している。

## 遺伝子組換えヒト血清アルブミン

小林 薫

ウェルファイド株式会社 創薬研究所

## 遺伝子組換えヒト抗体

黒澤良和

藤田保健衛生大学総合医科学研究所

現在では、遺伝子操作技術の進歩により種々の医薬品の開発が可能となっており、第VIII因子製剤や第IX因子製剤のような血漿たん白質もその例外ではない。しかしながら、医薬品としてのリコンビナントアルブミン(rHSA)の開発は、組換えDNA技術によるたん白質の生産における最も困難な目標の1つとされてきた。その理由として、まず、アルブミンの投与量が、他の組換えDNA技術により創られた医薬品と比べた場合極端に高投与量であることが挙げられる。例えば、出血性ショック症状に対して短時間に100g以上投与される場合も珍しくない。また、アルブミンのグラムあたりの単価を考えた場合、他の血漿由来たん白質製剤に比べると安価であり、しかも、大量に供給する必要があることも理由の一つに挙げられる。このように、rHSAの開発では、これまでに例の無い高純度と高生産性という相反しやすい事象を特に大量生産の場において両立させることが要求される。この目的を達成するため、我々はメタノール資化性酵母であるピキアバストリスを用いてrHSAの高生産系及び高度精製系を確立した。rHSAは酵母を用いて製造されることから酵母由来の不純物除去は特に重要であり、種々の方法によって検証している。また、アルブミン自身には、酵素活性のような活性が無いことから、精製後のrHSAを用いた非臨床試験においては血漿由来ヒト血清アルブミン(nHSA)との同等性をさまざまな観点より検討した。我々が実施したX線結晶構造解析を含む物理化学的性質、免疫学的性質、動物を用いた試験の結果について紹介するとともに、rHSAの繰返し投与試験やnHSAとの比較試験など臨床試験の主要な項目についての成績もあわせてrHSAの全容を紹介する。これら非臨床試験及び臨床試験の結果をもとに、rHSAの製造承認申請を1997年、世界に先駆けて実施した。さらに、1999年10月には、年間100万バイアルの生産が可能な実生産用大規模プラントを北海道・千歳市に完成した。現在、試運転ならびに各種バリデーションを行なっており、一部ではあるがそれらの結果についても紹介する。

細胞融合を利用して様々な抗原に対するモノクローナル抗体を得る技術はマウスでは広範に利用されているが、ヒト抗体については困難な状況であった。しかし、ファージディスプレー系を用いてヒト抗体ライブラリーを作る技術が確立し、一方で、ヒト抗体産生トランスジェニックマウスも作られ、現在では様々な抗原に対するヒト抗体作製が可能になり、今後臨床に役立つヒト抗体が薬として実用化されるであろう。私共の研究グループでは、数10名に相当するヒトBリンパ細胞より調製したmRNAから1,000億種の抗体を含むライブラリーを作製し、その中から臨床に役立つ抗体の単離調製を進めている。研究は次の構成要素からなる。(I)抗体治療の対象となり得る疾患の選定と、その際抗体が結合すべき抗原の調製、(II)その抗原に結合する抗体の単離(この段階はファージ抗体として単離される)。(III)目的とする生物活性(例えばウイルス中和能力等)を示す抗体の選別。(IV)完全なヒト抗体への変換とその調製。(V)ヒト抗体の生物活性の測定と様々な検定。(VI)ヒト抗体大量生産と精製。現在幾つかの研究室と協力して、毒素中和抗体及びウイルス中和抗体の単離を進めている。ワクチン接種、ウイルス感染等で免疫されたヒトが多数いるような疾患については性能の良い抗体が高い確率で単離できている。目的的抗体単離が容易な対象から順次より困難な対象へ広げていくことを計画している。しかし、実際に抗体を薬として臨床に使うレベルまで研究を進めるには、大量生産系一精製系の開発と同時に、現在この分野では世界的に様々な包括的内容を含む先行特許が存在し、それを如何にクリアするか、又は対処するかについても戦略的視点をもって対抗手段を講じていく必要がある。

## ショック病態におけるリポソーム封入型ヘモグロビンの代謝・分解と自動酸化のメカニズム

末松 誠<sup>1</sup> 京兼隆典<sup>3</sup> 武岡真司<sup>2</sup> 石村 異<sup>1</sup>  
 二村雄次<sup>3</sup> 土田英俊<sup>2</sup>  
 慶應義塾大学医学部 医化学<sup>1</sup>  
 早稲田大学理工学部 高分子化学<sup>2</sup>  
 名古屋大学医学部第一外科<sup>3</sup>

人工酸素運搬体は出血性ショックなどの症例における適応が考慮されているが、このような個体ではヘモグロビン-ヘムの分解系である heme oxygenase-1 (HO-1) が高誘導されているため、肝臓内での代謝、分解の速度は Km が HO-1 より高い HO-2 の発現が dominant である正常時とは大きく異なる可能性がある（文献 1, 2）。またショックに伴うサイトカイン血症により体内での NO, NO<sub>2</sub> などの生成動態にも変動を生じ、通常では起こり得ない機構でヘモグロビンの自動酸化が起こる可能性があるが、詳細は不明であった。演者らは内毒素前処置ラットを用い、分離灌流肝での遊離ヘモグロビン (Hb)、メトヘモグロビン (metHb)、リポソーム封入型ヘモグロビン (HbV) の代謝とその functional outcome を検討した。Hb 投与 (1.5g/dl) により基礎血管抵抗の上昇、類洞血管の著明な収縮とともに胆汁流量の低下が惹起された。一方 metHb ではそのような変化は起こらず、Hb により捕捉され、metHb では捕捉されない CO により血管抵抗と胆汁流量が病態下でも生理的レベルに維持されているものと考えられた。また HbV 投与では血管反応、胆汁流量とも変動を認めないことも示された（文献 3）。しかしながら HbV は内毒素ラットでは急速にメト化が促進し、10% top loading 時に 4 時間でその大半がメト化することが明らかになった。またそのメカニズムには NO の過剰生成が関与することが示され、リポソーム外で生成された NO が内部の oxyHb に作用するのを阻害する工夫が必要であることが示された。一方リポソーム膜に radical scavenger である bilirubin をコーティングすると、このモデルでのメト化の速度は著明に遅延することが明らかになった。従って、酸素運搬体のデザインを考える上で病態例に投与した際の生体適合性をさらに検討する必要があるものと思われた。

1 Goda, et al. J Clin Invest 1998

2 Hayashi, et al. Circ Res 1999

3 Kyokane, et al. Gastroenterology in press

## 新たなヘモグロビン修飾体

西 勝英  
 熊本大学医学部薬理学第二講座

人工酸素運搬体の臨床応用に対する期待は大きく、通常の医療のみならず災害時の緊急医療においてもその利益は計り知れないものがあり、世界的な開発競争が展開されている。中でもヘモグロビンは人工酸素運搬体の開発にとって最も魅力的な物質であり、西らの研究グループは、ピリドキシル化ポリオキシエチレンヘモグロビン重合体 (P H P) の人工酸素運搬体としての開発に成功してきた。当面の人工酸素運搬体の開発、臨床応用の第一義的な目的は、緊急出血時の循環器系の機能維持であり、重要臓器に対する緊急避難的酸素供給である。従って、本研究は臨床応用を前提としたより安全性の高い、しかも血液に近い流体力学的性質をもった人工酸素運搬体の開発を目的としている。そのため、従来の P H P の持つデメリットである酸化ストレスの軽減を目的として、ヘモグロビン分子をニトロソ化し過剰な過酸化由来の毒性を軽減化して、安全性と有用性を高めるとともに、西、前田により開発された赤血球潤滑剤 ( $\alpha$  1 酸性糖蛋白) を添加し、さらに微小循環系に有効に酸素を供給可能な人工血液製剤の開発試験研究を行っている。人工酸素運搬体としての性質上、血液成分製剤や他の薬剤の投与とは異なり、大量投与が要求されるので、特に新規開発物質の循環器系に対する作用について十分な検討を行うとともに将来需要が見込まれる臓器保存液としての詳細な検討を行う。一方個々に開発してきた P H P は、酸素と結合するという本来の性質以外に、NO とも強く結合する性質を有しており、血管平滑筋弛緩因子である NO を捕獲することにより、血圧上昇をもたらすが、一方ではヘモグロビン分子そのものが酸化ストレスとして作用し、細胞障害、微小循環障害を悪化させる可能性も否定出来ない。P H P をニトロソ化することにより、過剰に生産された NO を補足し、同時に NO 放出の徐放化により末梢循環を確保し低血圧ショック状態となる菌血症の治療にも有効性が期待され、このような病態モデルにおける検討を行っている。

## 新たなパーフルオロカーボンエマルジョンの調製と評価

福島昭二<sup>1</sup>、西尾琢也<sup>1</sup>、岸本修一<sup>1</sup>、竹内由和<sup>1</sup>  
仲井邦彦<sup>2</sup>、田村 守<sup>3</sup>、坂野上 淳<sup>3</sup>、佐久間一郎<sup>4</sup>  
北畠 順<sup>4</sup>

<sup>1</sup>神戸学院大学薬学部、<sup>2</sup>東北大学医学系研究科、  
<sup>3</sup>北海道大学電子科学研究所、<sup>4</sup>北海道大学大学院  
医学研究科

【緒言】高圧ジェット流反転型乳化機は新規な機構に基づき設計された乳化機であり、従来の高圧乳化機の問題点を解決した。本乳化機により、従来使用し得なかった材料での超微粒子分散製剤設計も可能となる。また DDS 技術により、これら分散製剤への RES 回避や標的指向性などの機能性付与が可能となった。酸素運搬製剤としてのパーフルオロカーボンエマルジョン(PFC エマルジョン)の臨床的有用性は明らかで、経皮的冠動脈拡張術での酸素補給液として臨床導入され、また ALLIANCE 社 OXYGENT は自己血輸血での使用が第 3 相試験に入っている。しかしこれらの製剤は従来型高圧乳化機で製造されており、製造行程や使用材料などで問題点を指摘できる。本研究では、高圧ジェット流反転型乳化機を用いた PFC エマルジョン製剤の新規製造法の開発と、新規な材料および DDS 技術を用いたより有用な PFC エマルジョン製剤の開発を目指す。【製造法の確立】デュアルフィード法とりバース法を組み合わせた他段階乳化法での検討で、製造上の問題点を明らかにした。これらの結果に基づき、現在 PFC エマルジョン製造用の最適乳化システムを製造中である。【エマルジョン製剤の製剤評価】原理の異なる数種類の粒度分布計を用い、エマルジョン製剤の製剤評価方法を新たに検討している。【処方の最適化】パーフルオロトリブチリルアミン、パーフルオロデカリン、パーフルオロオクチルプロマイドなどを使用し、主な乳化剤として精製卵黄レシチンおよび新規な材料を使用し、長期的に安定な製剤処方を検討している。【体内動態の制御】PEG 化リソリン脂質の使用はエマルジョン粒子にステルス性を与えた。処方や粒子径により体内動態の制御が可能である。【酸素運搬能の評価】試作製造された PFC エマルジョンは、血液ガス分析や脳のチトクローム酸化度などを指標としたラットでの血液入れ替え実験において、十分な酸素運搬能力を示した。

## 虚血心における SNO-PEG-Hb の冠血流増加・心筋代謝及び収縮不全の改善作用

<sup>1</sup>大阪大学大学院医学系研究科 病態情報内科学

<sup>2</sup>北海道大学大学院医学系研究科 循環器内科学

<sup>3</sup>東北大学大学院医学系研究科 環境保健医学

浅沼博司<sup>1</sup>、北風政史<sup>1</sup>、真田昌爾<sup>1</sup>、野出孝一<sup>1</sup>、

萬島成二<sup>1</sup>、坂田泰彦<sup>1</sup>、朝倉正紀<sup>1</sup>、扇田久和<sup>1</sup>、

佐久間一郎<sup>2</sup>、北畠順<sup>3</sup>、仲井邦彦<sup>3</sup>、葛谷恒彦<sup>1</sup>、

堀正二<sup>1</sup>

【目的】一酸化窒素(NO)は、血管平滑筋 cGMP レベル增加を介した、冠血管弛緩反応を惹起し、心筋虚血を軽減することが知られている。従来のヘモグロビン系酸素運搬体は、小分子のため血管内皮細胞間を通過し、血管内皮が産生する NO を Hb 分子内のヘムが血管内皮下組織でトラップし、NO を不活性化するため血管平滑筋弛緩を阻害した。そのため、NO 不活性化を代償する NO 供与体および酸素運搬体として poly-ethyleneglycol-conjugated s-nitroso-Hb (SNO-PEG-Hb) が開発された。s-nitroso-Hb は NO 消去作用が少ないだけでなく、むしろ NO 供与体として作用することが知られている。そこで SNO-PEG-Hb が虚血心筋において冠血流量を増加させ、心筋収縮・代謝不全を改善するか否かを検討した。【方法】麻酔開胸犬にて冠動脈左前下行枝(LAD)を選択的に灌流し、冠灌流圧(CPP)、冠血流量(CBF)を計測した。灌流域中心部に装着した超音波クリスタルディメンジョンゲージにて局所心筋短縮率(FS)を計測した。さらに冠動静脈血の乳酸値を計測し、乳酸摂取率(LER)を算出した。心血行動態の安定後、CBF を対照時の 33 % に低下させ以後 CPP を一定に保ち心筋虚血を作成した。CPP 低下 5 分後、10 % SNO-PEG-Hb を CBF の 2.5 % 量を LAD 内に 20 分間持続投与した。【結果】SNO-PEG-Hb の冠動脈内投与により、CBF ( $28.1 \pm 3.3 \rightarrow 43.3 \pm 4.0 \text{ ml}/100\text{g}/\text{min}$ ) 増加し、FS ( $4.6 \pm 1.2 \rightarrow 16.6 \pm 2.4 \%$ ) および LER ( $-53.6 \pm 4.2 \rightarrow 25.5 \pm 1.2 \%$ ) は改善した。【総括】SNO-PEG-Hb は虚血心筋において冠血流量を増加させ、心筋収縮・代謝不全を改善させた。SNO-PEG-Hb は血液代替物質であるだけでなく、積極的に虚血心筋保護に作用する可能性が示された。

Clinical Studies of Pyridoxalated Hemoglobin Polyoxyethylene

Joseph De Angelo

Apex Bioscience, Inc., Durham, NC, U.S.A.

Shock associated with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) is a form of distributive shock affecting over 200,000 patients per year in the U.S. and resulting in 50% mortality. The role of NO in a variety of shock states has been extensively studied and has been shown to be the primary effector in endotoxin lipopolysaccharide (LPS)-induced hypotension attendant to shock associated with sepsis or presumed sepsis. It is involved in a wide variety of shock-related pathologies and is a key target for therapeutic intervention. Mechanism of action based therapies using nitric oxide scavenger represent a promising new approach. Pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate (*PHP*) is a chemically-modified hemoglobin. It is the furthest advanced NO scavenger in clinical trials and is about to enter pivotal Phase 3 trials in patients with shock associated with SIRS.

Clinical Applications of Pyridoxalated Hemoglobin Polyoxyethylene (*PHP*): A Modified Hemoglobin Therapeutic with Nitric Oxide Scavenging and Antioxidant Activity

Christopher Privalle, Todd Talarico

Apex Bioscience, Inc. A subsidiary of VitaResc Biotech AG, Research Triangle Park, NC, USA

Hemoglobins modified for therapeutic use as either hemoglobin-based oxygen carriers intended for blood replacement during surgery and hemorrhagic shock or scavengers of nitric oxide are currently being evaluated in clinical trials. One such product, pyridoxalated hemoglobin polyoxyethylene conjugate (*PHP*) is a human-derived and chemically-modified hemoglobin which has yielded promising results in Phase II clinical trials and is entering a pivotal Phase III clinical trial for the treatment of shock associated with systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Shock associated with SIRS is a NO-induced shock. *PHP*, a new mechanism-based therapy, has been demonstrated in clinical trials to have the expected hemodynamic activity of raising blood pressure and reducing catecholamine use, consistent with its mechanism of action as a NO scavenger. *PHP* is made by derivatization of stroma-free hemoglobin with pyridoxal-5-phosphate and polyoxyethylene (POE). The conjugation of *PHP* by POE results in a surface-decorated molecule with enhanced circulation time and stability. Soluble RBC proteins, including superoxide dismutase and catalase, are also modified by POE and conjugated to *PHP*, resulting in a cell-free hemoglobin containing an antioxidant profile similar to the intact RBC. Hemoglobin-based therapeutics, due to the presence of heme and iron, have the potential to act as pro-oxidants. *PHP* has been shown to be resistant to both initial oxidative modification by oxidants such as hydrogen peroxide and subsequent ferrylhemoglobin formation. These studies suggest both that the redox activity of modified hemoglobins can be attenuated and that modified hemoglobins containing endogenous antioxidants, such as *PHP*, may have reduced pro-oxidant potential. These antioxidant properties, in addition to the intrinsic NO scavenging properties, may allow the use of *PHP* in other indications in which excess NO, superoxide, hydrogen peroxide, or ONOO<sup>-</sup> are implicated, including ischemia-reperfusion injury, hemorrhagic shock, arthritis, and IL-2 therapy.

DEVELOPMENT STATUS OF OXYGENT™  
 (PERFLUBRON EMULSION): AN INTRAVENOUS OXYGEN CARRIER FOR USE AS A TEMPORARY RED CELL SUBSTITUTE IN ELECTIVE SURGERY

Peter E. Keipert, Ph.D.  
 Alliance Pharmaceutical Corp., 3040 Science Park Road, San Diego, CA 92121, U.S.A.

The safety of donor (allogeneic) blood has improved significantly in the past two decades, but unfortunately it is impossible to attain a zero-risk blood supply. Recently, availability of donor blood and the predictions of national blood shortages have become new concerns, particularly in light of an FDA directive to defer all blood donors who have spent at least 6 months cumulative time in the United Kingdom between 1980 and 1996. The development of a "blood substitute" or temporary intravenous oxygen delivery agent has in large part been driven by the desire to reduce patient exposure to allogeneic blood transfusion. However, such a product clearly has additional potential as a therapeutic intervention in critical care situations where acute blood loss may cause tissue hypoxia.

Oxygent (60 percent w/v perflubron-based emulsion), is a temporary intravenous oxygen delivery agent ("blood substitute") being developed by Alliance Pharmaceutical Corp. (San Diego) to reduce the need for donor blood transfusions in surgical patients. The use of Oxygent is intended to permit more effective collection of greater quantities of autologous blood at the time of surgery

(Augmented-Acute Normovolemic Hemodilution), thereby allowing more patients to be their own donor without having to go through the more complex logistics associated with predonation. Oxygent is the only blood substitute in clinical development that is formulated from a synthetic raw material, and not derived from human or bovine blood. It is manufactured using commercially available raw materials, at a scale which could have a substantial blood sparing effect on the current donor blood supply. Oxygent is provided as a ready-to-use sterile emulsion that is compatible with all blood types, and can be stored for up to two years.

Alliance has recently completed patient enrollment in an international, Phase 3 Transfusion Reduction and Avoidance study which involved 491 general surgery patients at 33 medical centers in eight European countries. A complementary multicenter Phase 3 Transfusion Avoidance study in 600 cardiac surgery patients undergoing coronary artery bypass grafting under cardiopulmonary bypass is also underway in the U.S., Canada, and Europe. Previously completed Phase 2 studies have demonstrated that Oxygent enhanced oxygenation status and was significantly more effective than a unit of fresh blood at reversing physiologic transfusion "triggers" (i.e., indicators for a blood transfusion) and delaying the need for a subsequent transfusion. Nonclinical studies have demonstrated the potential for Oxygent-treatment to prevent tissue hypoxia in the presence of profound anemia. Hence, Oxygent has the potential to also provide a temporary "bridge" to transfusion in surgical situations where blood may not be immediately available. Other potential indications which can be studied in the future include prevention or treatment of myocardial and/or cerebral ischemia, enhancing tumor oxygenation to enhance radiation therapy or chemotherapy, preservation of organs awaiting transplant, and resuscitation of hemorrhagic shock.

## 人工血液－エホバの証人の立場から

金森 寿憲<sup>1</sup> 中井 猛之<sup>2</sup>  
 エホバの証人の医療機関連絡委員会  
 札幌委員会<sup>1</sup> 東京品川委員会<sup>2</sup>

近年、「輸血をめぐる益と危険の関係の危険の部分をも再評価すること、そして代替療法を探すことが必要である」(米国立衛生研究所会議、1988)といった勧告が繰り返し出されてきた。血液代替物の研究や開発で先鞭をつけておられる本学会の医師や研究者の方々も、正にこれと調和して医学会を様々と啓蒙してきた。良質で効果的な代替療法を望む患者であれば、血液代替物の研究者の方々が、長年にわたり苦節を重ねておられることに、敬意を示すと共に深く感謝しているに違いない。周知のとおり、証人たちも人工血液について、開発当初より関心と期待を抱いてきた。現在、試験段階にある酸素を運搬する輸液等の実用がいわば標準的治療法として、また、選択肢として確立される日が待たれるところである。

リュック・モンタニエは、「我々の理解の進歩は、いずれ輸血が過去のものとなることを示している」と述べているが、その時を待つまでもなく、また代替療法を望む理由の如何を問わず、すでに輸血の代替療法は人々の命を救っている。証人たちも、同種血輸血の回避策となり得る、良質で効果的な代替療法の恩恵に与かっている。血液量を維持したり、血液量減少によるショックを防ぐための輸液や、手術中の出血を大幅に抑える薬剤、急性出血を抑える薬剤等が採用されている。赤血球、白血球、血小板の産生を刺激する薬剤や、術中血液回収法、術中血液希釈法等の技術等の採用については、個々の判断に委ねられており、多くの証人たちの選択肢となってきた。

本年の2月29日に、最高裁判所第三小法廷は、無断輸血事件に関して、「人格権の一内容として尊重されなければならない」との判決を言い渡した。この判決は、輸血拒否権を「信教の自由」に求めるのではなく、人格権に求めている。したがって、宗教上の理由ではない人格的生存に重大な価値を有する正確な根拠に基づき、特定の治療を拒否し、他の治療を選択することも人格権として尊重されるべきと解せる。その意味で、本学会の研究は、そうした流れに沿っており、病気と闘う人々に極めて優れた選択肢を提供するものとして大いに期待される。

## 人工血液臨床応用をとりまく問題点と対策 臨床の立場から

堀之内宏久, 山内徳子, 岩丸有史, 大塚崇,  
田島敦志, 吉津晃, 泉陽太郎, 渡辺真純, 武岡真司\*,  
酒井宏水\*, 小松晃之\*, 土田英俊\*, 小林紘一  
慶應義塾大学医学部外科、早稲田大学理工学総合研究センター高分子化学\*

**【背景】** 手術や外傷による大量出血時の治療には、現在、赤血球の輸血を用いることにより酸素運搬能を回復させ、組織の anoxia による傷害を防いでいる。交差試験を必要としない長期可能な人工酸素運搬体を開発することができれば、現行の輸血のシステムを補完する物質として今後重要な役割を果たすと予測される。

**【目的】** 今回、われわれは人工赤血球の開発を通じて臨床応用での問題点すなわち酸素運搬能、血液内滞留時間、代謝経路、毒性、最大投与量などについて検討した。

**【方法】** 人工赤血球として開発したリピドヘム小胞体、ヘモグロビン内包型リポソーム、アルブミンヘムについてそれぞれの開発の現状と今後の課題について検討した。

**【結果 1:酸素運搬能】** 酸素運搬能については脱血ショックモデル、人工心肺モデルを用いて生体内での酸素運搬能を明らかにする実験を行い、生体内でそれぞれの人工酸素運搬体が効率よく組織の酸素化を支えていることが明らかとなった。【結果 2:血液内滞留時間】ヘモグロビン内包型リポソームの血中半減期は 23 時間であり、急性期の治療に使用するためには十分であると考えられた。アルブミンヘムでは血中半減期は 7 時間程度であり、輸血の代替には血中での安定化が必要である。【結果 3:代謝経路】ヘモグロビン内包型リポソームは、全身の細網内皮系に取り込まれた後、代謝され、各臓器に不可逆的な変化はきたさない事が証明された。他の人工酸素運搬体については現在検討中である。【結果 4:最大投与量】脱血交換試験では、最大 90% 脱血交換を行うモデルを用いて検討が行われ、ヘモグロビン内包型リポソームについては、この条件でも生存の可能性があることが証明された。

**【考察】** 人工酸素運搬体の研究は基礎的な検討が順次成果を上げているが、臨床応用までには大動物を用いて、酸素運搬能、血液内滞留時間、代謝経路、毒性、最大投与量などについての検討が必須で、適応疾患、用量、輸注方法(輸注最大速度)等についても検討することが必要である。

## 血液事業の立場から

池淵研二、池田久實  
北海道赤十字血液センター

同種血輸血は現在、年間の約600万人の献血ドナーから1800万単位の血液の提供を受け、約100万件の輸血医療に用いられている。輸血用血液の安全性を高めるため、ここ数年間に血液事業には大きな変革があった。医薬情報活動の強化、全製造過程での品質管理の徹底、GVHD予防策として放射線照射血の製造、ウイルスクリーニング検査の高感度化・核酸増幅検査(NAT)体制の確立、などがあげられる。さらに導入が検討中の課題として、プール検体から個別検体でのNAT体制への移行、血小板有効期間の延長、保存前白血球除去の導入、ウイルス不活化製剤の導入などあげられる。

このように同種血輸血はますます安全性が高められ、輸血副作用は回避されてきている。一方、アナフィラキシーショックなど非溶血性副作用、輸血に伴う同種抗原感作、免疫モジュレーションの問題は残されている。

赤血球代替物のメリットは、血液型物質がない、交差適合試験が不要、保存期間が長い、ウイルスが不活化できる、とまとめられる。それでは輸血の安全性は赤血球代替物が登場すればゼロになるか? 同種血輸血が有する副作用は確かになくなるかも知れないが、赤血球代替物そのものが保有する新規の副作用も認識しなければならない。血管収縮、血圧上昇、消化管作用、神経毒性、血液凝固、免疫反応、活性酸素による傷害などが想定され、蓄積性の副作用に関しては未だ不明である。さらに現状の赤血球代替物では血管内滞留時間が数時間から2日間程度と短いので、適応は制限され、相変わらず同種血が主流であろう。

以上から赤血球代替物の役割を整理すると、現時点では救急蘇生薬として考えられるべきであろう。緊急時、同種血輸血が準備できるまでのつなぎ、酸素運搬能を保持した輸液と解釈され、そのベネフィットは他の輸液や薬剤と比較されるべきと考えられる。想定される副作用も全体の治療効果の中で判定されるべきだろう。臓器保存液、液体換気用製剤、ガン化学療法のアジュバント剤、赤血球造血促進剤、診断薬、などとしての応用は血液代替物の範疇ではなく別途考えるべきであろう。

## 人工酸素運搬体、Neo Red Cell の開発現況

テルモ(株) 研究開発センター

緒方嘉貴、金田伸一

献血由来の検査合格期限切れ濃厚赤血球製剤から精製したヘモグロビンを、リポソームによりカプセル化した人工酸素運搬体、Neo Red Cell : NRC の開発が進行している。

NRC は、その酸素親和性:  $P_{50}O_2$  が約 45torr とヒト赤血球より低親和性にシフトさせることで、Hb 濃度が 6g/dl と低いにもかかわらず、40% 酸素吸入条件下で生体中においてヒト赤血球と同等の酸素運搬能力を示す。またその粒子径は 0.2 $\mu m$  と赤血球のおよそ 1/30 であり、リポソーム表面を Polyethyleneoxide で被覆することにより、血中での安定性を高め、生体中において 24 時間以上にわたり酸素運搬機能を持続できる事もわかってきてている。

一方人工酸素運搬体の臨床応用という観点から性能を見た場合、24 時間程度の持続性能であること、また 1000ml 程度までの投与量であること等、性能と投与量に限界があることも確かである。血液代替物としては、この人工酸素運搬体の限られた性能を生かせる適応領域の選定と、臨床治験における適切な End Point の設定が必要となる。さらに赤血球に比して粒径が小さく、梗塞部位等の赤血球が到達不可能な部分に、酸素を輸送可能である等の特徴を生かせる臨床領域への、酸素輸液製剤としてのより積極的アプローチも、今後重要となってくる。

また、企業としての収益性、医療への貢献の観点からの医療経済性はいずれも重要な要件であり、人工酸素運搬体の製造コスト低減は、開発企業として、必達の目標である。そこで、高効率で、かつ安価にヘモグロビン小胞体を製造する技術が求められており、現在処方、製造方法の最適化を行っている段階である。

これらの課題解決にむけ、現在血液代替物としての動物を用いた安全性と有効性の確認が進んでいる。また酸素輸液製剤という、新たな考え方に基づき、動物を用いた梗塞領域への酸素輸送手段としての有効性評価も開始した。本報告ではこれらの開発の Update を報告する。

## 人工血液の臨床応用を展望して

高折益彦

岡山県赤十字血液センター

人間の血液を他人に輸血する 20世紀の輸血は現在その転換期に達している。すなわち現行の輸血療法には血液型適合性、輸血血液としての保存期間、その血液を介した疾患の伝播などに問題点を有するばかりか、その供給源をわれわれ人間自身としている点に問題がある。とはいえ実際の医療の場においては、循環血液量を維持し、組織への酸素供給を目的とした現行の治療は不可欠であり、人間自身の血液に代わるべき治療薬、すなわち人工血液の開発は急務といわざるをえない。とくに緊急手術、あるいは救急蘇生の現場では上記の諸問題にとらわれない安全な、そして有効な人工血液の開発、活用が強く要望される。とりわけ製品の品質均一性、そして将来における供給源不足の観点から、また宗教的制約からの回避もふまえて、全合成性の人工血液の開発が望まれる。

しかしそのような究極的な人工血液、人工赤血球がただちに臨床の場において利用できるようになるとは期待できない。生理学的な立場からは細胞型 (cellular type) の人工赤血球が理想的であり、これを将来の人工赤血球の目標とすべきであろう。しかしその中に封入する酸素運搬体として、一時的には動物のヘモグロビンにて代用することも考慮すべきかもしれない。新製品の開発について、少なくとも赤血球代替物は酸素運搬体として有効であること、認むべき有害事象を発生させないことが必須である。これらに関する前臨床試験、臨床治験とを経て、各専門分野から安全な、そして有効な人工赤血球としての認定をうることが必要である。とはいえた製品の均一性、安定性、経済性などに関しては生産企業側での苦惱も大きい。これら人工血液についての医療面からの要求、社会的必要性、そして具体的な生産面での問題点について、4演者から忌憚なき、真剣な意見が述べられることを期待する。

## 一般演題一

全合成系酸素運搬体(アルブミンヘム)のNO配位能

小松 晃之、松川 泰子、土田 英俊  
早稲田大学理工学総合研究センター

**【緒 言】** リコンビナントヒト血清アルブミン(rHSA)にイミダゾリルアルキル基を有するテトラフェニルポルフィナト鉄(II)錯体(FeP)を包接して得たアルブミンヘム複合体(rHSA-FeP)は、生理条件下(pH 7.3, 37°C)で酸素を可逆的に結合解離できる合成ヘムタンパク質である。しかし、これを人工の酸素輸液として利用する場合には、NO(血管内皮弛緩因子)との結合反応の解明が極めて重要となる。一般に、塩基が軸配位した5配位ポルフィリン鉄錯体は、NOの通気に伴い速やかにニトロシルヘム錯体を形成するが、条件によっては軸塩基の脱離を伴うことが知られている。今回、FePとrHSA-FeP複合体のNO配位能について詳細に検討したので報告する。

**【実 験】** FePのトルエン溶液、及びrHSA-FeP水溶液にNOを吹き込み、室温及び77KにてESR測定を行った。また、異なるNO/CO分圧に伴う可視吸収スペクトル変化からNO親和性( $P_{1/2}^{NO}$ )を算出。NO結合速度定数( $k_{on}^{NO}$ )はレーザーフラッシュフォトリシス法を用いて決定した。

**【結果・考察】** 2-メチルイミダゾールが分子内配位した5配位Fe(II)高スピニン状態のFeP溶液(トルエン)にNOを通気すると、その最大吸収波長( $\lambda_{max}$ )は419、479(sh)、542 nmへ移行した。77KにおけるESRスペクトルに観測された9本線から、6配位型NO錯体の形成を明らかにした。rHSA-FeP水溶液についても類似のスペクトルが得られたことから、FePはアルブミンに包接された場合でも、イミダゾールとの結合を解離することなく6配位型のニトロシルヘム錯体を形成できることが明らかとなった。また、rHSA-FePのNO親和性及びNO結合速度定数( $P_{1/2}^{NO}$ :  $1.7 \times 10^{-6}$  Torr,  $k_{on}^{NO}$ :  $1.5 \times 10^7$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)は、トルエン中のFePの値( $P_{1/2}^{NO}$ :  $1.8 \times 10^{-8}$  Torr,  $k_{on}^{NO}$ :  $8.9 \times 10^8$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)に比べて低い。

## 一般演題二

ピリドキシリ化ポリオキシエチレン・ヘモグロビン重合体の摘出腸管の収縮運動に対する作用

村井恵良<sup>1,2</sup>、西 勝英<sup>1</sup>

<sup>1</sup>熊本大学医学部薬理学第二講座、<sup>2</sup>北海道大学歯学部口腔生理学講座

**【緒言】** 酸素代謝系の中で内臓粘膜は最もダメージを受けやすい部位である。これまでヘモグロビンをベースにした人工酸素運搬体重合体の投与により下痢あるいは便秘等の症状が生じるとの報告があり、内臓粘膜に対する人工血液の影響を検討した。

**【方法】** マウス腸管摘出標本を用い、PHPの自発性収縮に対する作用と収縮作動薬で惹起される収縮に対するPHPの作用を等尺性記録法を用いて37°Cの条件下で検討した。

**【結果と考察】** PHPは0.3g/dlの濃度までは腸管平滑筋収縮運動に影響を示さなかったが、1g/dl以上の濃度で、収縮振幅と頻度に対して抑制効果を生じた。腸管の収縮作動薬としてアセチルコリン(ACh)、プロスタグラニンF<sub>2α</sub>、E<sub>1</sub>そしてブラジキニンを用いて各収縮に対するPHPの影響を検討した結果、ACh以外の全ての薬品投与で惹起される収縮がPHP投与により有為に抑制された。このことから収縮作動薬によってPHPの作用機序が異なることが示唆された。更に、外液のカルシウム濃度を変化させた実験結果からPHPによるカルシウムキャリート作用や細胞内への影響も示唆された。

PHPはヘモグロビン(Hb)修飾型人工血液であり、Hb自体の影響も比較検討した結果、Hb単独投与時に比べ、PHP投与時に一酸化窒素(NO)除去作用による収縮が軽減されていた。しかしながら、小腸粘膜毛細血管は有窓性毛細血管であるため、溶質や血漿蛋白あるいは血球成分などの大きな物質の輸送に適した構造であるが、低分子物質の血管外漏出も指摘され、PHPの成分の漏出の可能性も示唆されることから、今後NO付加やα1-糖タンパクの結合などによる新規PHPの開発が期待される。

## 人工酸素運搬体投与時の肺微小循環動態の解析

山内徳子<sup>1</sup>、山本学<sup>1</sup>、大塚崇<sup>1</sup>、岩丸有史<sup>1</sup>、  
渡辺真純<sup>1</sup>、堀之内宏久<sup>1</sup>、小林紘一<sup>1</sup>、

武岡真司<sup>2</sup>、土田英俊<sup>2</sup>

<sup>1</sup>慶應義塾大学医学部外科、

<sup>2</sup>早稲田大学理工学総合研究センター

＜背景＞人工酸素運搬体を投与すると、肺でガス交換が行われ、各臓器への酸素輸送に携わることが明らかとなってきた。＜目的＞人工酸素運搬体の投与が肺微小循環に与える効果を観測、解析することを目的とした。＜方法＞260～280 g の Sprague-Dawley ラットに吸入麻酔による全身麻酔、気管内挿管後、人工換気下に右開胸し胸壁に石英ガラス製のウィンドウチャンバーを植え込み固定した。肺微小循環の観察は、レーザー共焦点顕微鏡を主体とした生体血流観測装置を 6-100 μm 程度の血管径の血流循環動態を解析できるように設計した。肺微小循環の可視化には尾静脈より Fluorescein isothiocyanate albumin (FITC アルブミン) を 0.1 ml(80 mg/ml) 注入して血漿部分を標識し、血管径を測定した。人工酸素運搬体としてオキシヘモグロビン(OxHb) 溶液を用いた。OxHb 溶液はヒト赤血球より細胞膜を除去し精製した後、生食に浮遊し 10 g/dl に調整した。肺微小循環を可視化し状態が安定した後、動物を OxHb 投与群と生食投与群に分けた。各々 2 ml ずつ急速静注し経時に心拍数、細小動脈径を計測した。血管径の変化は投与前を基準とし、投与後の変化率で表した。＜結果＞FITC アルブミン投与により肺微小循環が可視化され、肺胞毛細血管および血管径約 60 μm の肺動静脈を同定できた。細小肺動脈血管径は OxHb 投与群では投与前に比べ投与直後 94.8 ± 7.4%、5 分後 95.3 ± 20.5%、60 分後 91.2 ± 11.2% となり径の縮小傾向を認めたが有意差はなかった。また心拍数は投与前 163 ± 12/分であったが投与直後 220 ± 20/分に上昇、その後 1 時間にわたり心拍数の増加が継続し、その後徐々に投与前値に復した。対象群では心拍数の変動は有意でなく、肺動脈径は投与直後 108.4 ± 14.3%、5 分後 107.1 ± 23.5% となり増大傾向を示すも有意差を認めなかつた。＜考察＞生体下で人工酸素運搬体を投与したところ心拍数の上昇を認め、細小肺動脈径は減少する傾向にあり、OxHb が NOscavenger として機能している可能性を示唆した。

## 血中セロトニン動態からみたヘモグロビン系人工酸素運搬体の血小板作用

富樫広子<sup>1)</sup>、仲井邦彦<sup>2)</sup>、佐久間一郎<sup>3)</sup>、藤井聰<sup>3)</sup>、佐藤洋<sup>2)</sup>、吉岡充弘<sup>1)</sup>、北畠頸<sup>3)</sup>

1) 北海道大学大学院医学研究科機能薬理学

2) 東北大学大学院医学系研究科環境保健医学

3) 北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学

【緒言】人工酸素運搬体として非細胞性 Hb 系酸素運搬体の開発が進められている。Hb 分子内の Heme は血管内皮由来弛緩因子である一酸化窒素 (NO) に高い親和性を示す。NO は血小板凝集抑制作用を有することから、Hb 系酸素運搬体の NO の消去作用による血小板機能亢進が懸念されている。本研究は、Hb 系酸素運搬体による血小板作用を、セロトニン (5-HT) 動態から評価することを目的とした。

【方法】10-15 週齢の Wistar 系雄性ラットを使用した。ハロセン麻酔下、大腿動脈にカニューレを挿入し、血圧記録ならびに採血用とした。Hb 系酸素運搬体として未修飾 Hb (SF-Hb) ならびにその S-ニトロソ修飾体 (SNO-PEG-Hb) を用いた。SF-Hb、SNO-PEG-Hb ならびに対照として同容量の生理的食塩水は大腿静脈内に投与し、10 分後に血液を採取した。血漿中ならびに血小板中 5-HT とその代謝産物 5-HIAA は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて分離したち電気化学検出器にて測定した。

【結果】SF-Hb (31.25-250 mg/kg) の静脈内投与によって血圧は用量依存性に上昇した。SNO-PEG-Hb (62.5-125 mg/kg) 投与による血圧の上昇は認められなかつた。SF-Hb により、血漿中 5-HIAA の著明な増加と血小板中 5-HT の減少が用量依存性に観察された。SNO-PEG-Hb による血漿中 5-HIAA の変化は軽度であり、血小板中 5-HT の有意な減少は認められなかつた。

【結語】Hb 系酸素運搬体である SF-Hb と SNO-PEG-Hb の血中 5-HT 動態を比較評価した。SF-Hb により、血圧上昇とともに血小板からの 5-HT 遊離像が観察された。一方、SNO-PEG-Hb では、血圧上昇は認められず、血小板 5-HT 動態に対する影響も SF-Hb に比べ軽度であった。これら血中 5-HT 動態における結果は、両 Hb 系酸素運搬体による血小板作用の違いを反映しているものと考えられる。

## 酸素輸液(ヘモグロビン小胞体)投与後の細網内皮系の病理学的検討

酒井 宏水<sup>1</sup>、堀之内 宏久<sup>2</sup>、富山 賢一<sup>1</sup>、池田 英二<sup>2</sup>、  
武岡 真司<sup>1</sup>、小林 紘<sup>2</sup>、土田英俊<sup>1</sup>

<sup>1</sup>早稲田大学理工学総合研究センター

<sup>2</sup>慶應義塾大学医学部

**【緒言】** 酸素輸液としてのヘモグロビン小胞体(HbV)は、最終的に細網内皮系(RES)にて捕捉代謝される。そこでHbV投与後のRESへの影響を詳細に検討するため、カーボンクリアランス試験と病理学的検討を実施した。

**【方法】** Wistar系ラット(雄、約200 g)各群15匹に対し、麻酔下尾静脈よりPEG修飾HbV(10, 20 mL/kg)を投与した。投与8時間、1, 3, 7, 14日後に麻酔下頸静脈よりCarbon Particle(160 mg/kg)を投与し、4, 10, 20分後に採血して675 nmの吸光度の測定から貪食能の指標となるPhagocytosis Index(K値)を算出した。また測定後に犠牲死させて肝臓及び脾臓を摘出し、脾臓重量を測定すると共に病理検査(H/E染色、ヒトHb抗体染色、電子顕微鏡観察)を行った。

**【結果および考察】** 貪食能はHbV投与1日後に約30%低下したが、3日後には亢進して1週間後に最大値を示し、2週間後には初期値に戻った。脾臓重量は1週間後に約30%増大するが、2週間後には低下傾向にあった。投与1日後の貪食能の低下は一過性であり、生体防御の初期反応を抑制しているものと考えられる。3日後以降の亢進は投与に伴ってRESの代謝機能が促進され、HbVが順次代謝されているものと考えられ、2週間後には貪食能は正常値にまで回復したため一過性の亢進状態であったと考えられる。

病理検査において、電子顕微鏡観察では投与1日後には肝Kupffer細胞内、脾マクロファージ内に貪食されたHbV粒子の像が明確に認められたが、3日後には殆ど消失していた。ヒトHb抗体染色では、投与3日後にもヒトHbの存在が確認されたが、1週間後には殆ど消失していた。RESに捕捉されたHbVは1週間以内に代謝され、臓器に不可逆な影響を与えないことが明らかになった。

## ヘモグロビン溶液中ウイルスの加熱による不活化

阿部英樹<sup>1)</sup>、平山順一<sup>1)</sup>、武岡真司<sup>2)</sup>、  
土田英俊<sup>2)</sup>、池淵研二<sup>1)</sup>、池田久實<sup>1)</sup>

北海道赤十字血液センター<sup>1)</sup>

早稲田大学理工学部<sup>2)</sup>

**【目的】** 人工酸素運搬体の原料となるヘモグロビン溶液(SFH)の安全性をより高めるためには、ウイルス不活化法・除去法の導入は必須である。現在行われている液状加熱によるウイルス不活化効果について、空気及び一酸化炭素霧囲気下でのVSV不活化について検討した。

**【方法】** 洗浄赤血球を等量のH<sub>2</sub>Oで溶血し、vesicular stomatitis virus (VSV)を添加した。処理前検体を採取後、COガス置換し(30分間)，密閉後60℃、1時間、溶液を攪拌しながら加熱処理を行った。ガス置換を行わず空気存在下に置いても、同様に加熱処理した。処理前後の検体のVSV感染価は、Vero細胞を用いたプラークアッセイにより求めた。%Met-Hbは、シアノメトヘモグロビン法により測定した。

**【結果】** 加熱処理においては、空気及びCO霧囲気下さいの場合も、VSVは5.8 log<sub>10</sub>以上不活化された。しかし、空気霧囲気下では%Met-Hbが増大した。一方、CO霧囲気下では%Met-Hbに大きな変化はみられなかった。

**【まとめ】** SFHに添加したVSVは、60℃、1時間の処理で、5.8 log<sub>10</sub>以上の不活化が可能であった。ウイルス不活化能としては十分効果が高い処理であるといえる。ただし、加熱処理によるヘモグロビンの酸化を抑えるためには、CO置換する必要があった。以上のことから本方法は、赤血球代替物の原料となるSFHの安全性を高める方法として有効であると考えられた。

## ジメチルメチレンブルー (DMMB) による ストローマフリーヘモグロビン (SFH) の ウイルス光不活化と抗酸化系への影響

<sup>1)</sup> 北海道赤十字血液センター、

<sup>2)</sup> 米国赤十字Holland研究所、<sup>3)</sup> 北大・薬

○平山順一<sup>1)</sup>、Stephen J. Wagner<sup>2)</sup>、阿部英樹<sup>1)</sup>  
加茂直樹<sup>3)</sup>、池淵研二<sup>1)</sup>、池田久實<sup>1)</sup>

**[目的]** 人工赤血球の原料として、期限切れ赤血球製剤由来のストローマフリーへモグロビン (SFH) が注目されている。生物由来の原料を利用する場合、病原体の感染に注意が必要である。昨年度の本学会において、メチレンブルーの誘導体であるジメチルメチレンブルー (DMMB) を用いた光不活化処理により、ヘモグロビン自体に傷害を与えることなく、水疱性口内炎ウイルス (VSV) を  $6 \log_{10}$  以上不活化できる事を報告した。

リポソーム内包型へモグロビンの場合、SFH中の抗酸化酵素などが失活していなければ、リポソーム内包型へモグロビンへの酸化傷害を防げるメリットがある。本研究では、DMMBによる光不活化処理を行った時の、抗酸化酵素などへの影響について検討を行った。

**[方法]** 1) SFH；溶血液の遠心 (36000xg、30分) 上清を BMM (Benbehruig Microporous Membrane、孔径75nm) で濾過 (ヘモグロビン濃度：1.08mM)。2) 光照射；発光ダイオード照射装置 (660nm) により液厚1mmで照射。3) VSVの感染価；Vero細胞を用いたプラークアッセイ。4) 抗酸化酵素の活性測定；CALBIOCHEM社のアッセイキット。5) メト化率；シアノメトヘモグロビン法。

**[結果・結論]** DMMB光処理によりVSVを $6.1 \log_{10}$  不活化した時、メト化率、Superoxide dismutase活性、Glutathione Peroxidase活性、およびGlutathion濃度にはほとんど変化はなかった。Glutathione Reductase活性は大きく減少した (25%)。以上の結果は、Glutathionを使いつぶまでは、Superoxideや過酸化水素を消去するシステムが機能している事を示唆しており、DMMBを用いた光不活化法は、ヘモグロビンに傷害を与えないだけでなく、抗酸化システムをも維持しながら、ウイルスを不活化できる可能性のある方法であると言える。発表では、熱処理で同様の実験を行った時の結果との比較も行う。さらに、不活化すべき最も重要なウイルスであるHIVの光不活化の結果も報告する。

## リポソームがヒト末梢血白血球に及ぼす影響 - TNF- $\alpha$ の産生と SOD 内包化による抑制効果 -

藤原収子<sup>1)</sup>、平山文也<sup>2)</sup>、緒方嘉貴<sup>3)</sup>、松田彰<sup>4)</sup>、

池田久實<sup>1)</sup>、池淵研二<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 北海道赤十字血液センター

<sup>2)</sup> 大阪府赤十字血液センター

<sup>3)</sup> テルモ（株）研究開発センター

<sup>4)</sup> 北海道大学大学院薬学研究科 薬化学

### 【緒言】

リポソーム内包へモグロビン (LEH) は網内系に貪食され、TNF- $\alpha$  等の炎症性サイトカインの産生を惹起することを報告してきた。LEH による炎症性サイトカインの産生量は、同脂質の空リポソームに比べ少なく (丹羽ら、第7回血液代替物国際会議)，その原因として LEH に包埋されているストローマフリーへモグロビン (SFH) 中のスーパーオキシドディスクターゼ (SOD) の関与が考えられた。今回 SOD を高濃度に内包したリポソームを作製し、空リポソームと比較し、TNF- $\alpha$  産生への効果を検討した。

### 【方法】

SOD リポソーム (脂質組成；水添ホスファチジルコリン：コレステロール：ミリスチン酸： $\alpha$ -トコフェロール=7:7:2:0.28, ポリエチレングリコール修飾率；1.4モル%, SOD 濃度；6.2 KU/ml) と、同じ脂質組成より成る空リポソーム (生理食塩水内包) を調整した。

ヘパリン加全血に空リポソームを添加し、24時間培養後、LPS を添加した。2~24時間の培養後、リポソームを遠心により除去し、上清中の TNF- $\alpha$  を ELISA 法で測定した。SOD 内包リポソームを空リポソームと同時に SOD 終濃度が SFH と同等になるように添加し、TNF- $\alpha$  産生に対する抑制効果を検討した。

### 【結果】

空リポソームを全血に添加したところ、生理食塩水添加のコントロールに対して、用量依存的に TNF- $\alpha$  産生の増強がみられ、その産生は LPS 添加後 8 時間でピークに達した。SOD リポソームを添加すると、空リポソームのみの添加に対して最大 40% の TNF- $\alpha$  産生抑制効果がみられた。SOD リポソームの TNF- $\alpha$  産生抑制効果は濃度依存的であった。

### 【まとめ】

LEH による TNF- $\alpha$  産生を抑えるには、SOD 内包リポソームの添加が効果的であることが示唆された。

rGPIIa-IIa-Iba $\alpha$ -liposomes のコラーゲン表面への粘着  
に対する rGPIIa と rGPIba の表面密度の影響

西谷孝子<sup>1</sup>、戒能美枝<sup>3</sup>、上出佳永子<sup>4</sup>、村田満<sup>1</sup>、  
半田誠<sup>2</sup>、池田康夫<sup>1</sup>。

<sup>1</sup>慶應義塾大学医学部内科、<sup>2</sup>同輸血センター

<sup>3</sup>東レ基礎研究所、<sup>4</sup>吉富製薬研究所

〔緒言〕前回、GPIIa-IIa と GPIba の両方の遺伝子組み換え体を固定化したリポソーム、rGPIIa-IIa-Iba $\alpha$ -liposomes、が流動状態下で効率良くコラーゲン表面に粘着することを報告した。今回は、より効率良く強固に粘着するリポソームを構築するために、rGPIIa と rGPIba の膜表面密度が異なるリポソームを創り、それらの流動状態下におけるコラーゲン表面への粘着を検討したので報告する。

〔方法〕rGPIIa-IIa-Iba $\alpha$ -liposomes をローダミンで蛍光標識し、コラーゲン表面にリポソームが粘着する過程を蛍光顕微鏡で連続測定した。イメージプロセッサーを用いて画像解析を行い、リポソームの粘着力をリポソームの粘着占有面積率 (% surface coverage) で評価した。測定は洗浄赤血球中、ヘマトクリット 37.5 %, 2 mM Mg<sup>2+</sup>, 血小板濃度  $1.25 \times 10^4/\mu\text{l}$ , 37 °C で行った。

〔結果〕rGPIIa と rGPIba の膜表面密度がそれぞれ  $2.17 \times 10^3$ ,  $1.00 \times 10^4$  molecules/particle であるリポソームの粘着力は、可溶性 vWF ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) 存在下では、ずり速度が高くなるにしたがって増加したが、可溶性 vWF がないときには減少した。rGPIIa と rGPIba の密度がそれぞれ  $2.19 \times 10^3$ ,  $5.27 \times 10^3$  molecules/particle, 及び  $2.22 \times 10^3$ , 0 molecules/particle であるリポソームは、可溶性 vWF の有無にかかわらず、ずり速度が高くなると粘着が減少した。rGPIba の膜表面密度を一定（約  $1 \times 10^4$  molecules/particle）にして、rGPIIa の表面密度を  $2.17 \times 10^3$  から  $9.64 \times 10^2$  molecules/particle に減少するとリポソームの粘着力は著しく減少し、ずり速度が高くなるにしたがって減少の割合は大きくなつた。また、抗体による粘着抑制実験から、リポソームの粘着力はずり速度の増加に伴い rGPIba 依存性が高くなること、ずり速度が高いときでも rGPIIa とコラーゲンとの相互作用が重要であることが示された。

〔結論〕高ずり速度下における rGPIIa-IIa-Iba $\alpha$ -liposomes のコラーゲン表面への粘着では、rGPIIa と rGPIba が協同的に働いていることが明らかである。

フィブリノーゲンを表面に固定化した  
リポソーム、Fgn-liposomes

西谷孝子<sup>1</sup>、半田誠<sup>2</sup>、池田康夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>慶應義塾大学医学部内科、<sup>2</sup>輸血センター

〔緒言〕フィブリノーゲン又は RGD peptides を共有結合で表面に固定化した赤血球は活性化血小板と特異的に相互作用し凝集塊に巻きまれ、血小板減少症において出血傾向を緩和することが報告されている。我々は、フィブリノーゲンを表面に固定化したリポソーム、Fgn-liposomes、を創り、その活性化血小板との相互作用、及びコラーゲン表面への粘着について検討したので報告する。

〔方法〕活性化血小板と Fgn-liposomes との相互作用はレーザー散乱粒子計測型血小板凝集能測定装置 PA-200 (興和) を用い、 $2 \mu\text{M}$  ADP 存在下で測定した。流動状態下でのコラーゲン表面へのリポソームの粘着は、リポソームを蛍光標識して蛍光顕微鏡で連続測定し、イメージプロセッサーを用いて画像解析を行つた。測定は再構成血液中、ヘマトクリット 37.5 %, 37 °C で行った。

〔結果〕Fgn-liposomes が血小板減少状態で血小板凝集を増強するかどうかを調べるため、 $2 \mu\text{M}$  ADP による  $5 \times 10^4/\mu\text{l}$  の血小板凝集に対する Fgn-liposomes の影響を検討した。Fgn-liposomes は用量依存的に大きな血小板凝集塊（直径約  $85\mu\text{m}$ ）の生成を著しく増強したが、Fgn を持たない control liposomes の存在下では血小板凝集の増加は見られなかつた。また、Fgn-liposomes 上の Fgn と同じ量の free Fgn の存在下では、小さな血小板凝集塊（直径約  $20\mu\text{m}$ ）が生成するのみであった。

流動状態下での Fgn-liposomes のコラーゲン表面への粘着は、血小板濃度が高くなりコラーゲン表面に粘着する血小板が増えるのにともなつて増加した。血小板濃度が非常に低い ( $1.0 \times 10^4/\mu\text{l}$ ) ときには、ずり速度が高くなるにしたがつて Fgn-liposomes の粘着は著しく減少した。

〔結論〕Fgn-liposomes は ADP またはコラーゲン表面への粘着によって活性化した血小板と相互作用して血小板凝集を増強しており、血小板減少状態での血小板機能を補助することにより、止血能を改善する可能性を示唆している。

## アルブミンマイクロスフェアを利用した血小板代替物モデル(2)

寺村 裕治<sup>1</sup>, 大川 春樹<sup>1</sup>, 武岡 真司<sup>1</sup>, 池田 康夫<sup>2</sup>,  
土田 英俊<sup>1</sup>

<sup>1</sup>早稲田大学理工学総合研究センター

<sup>2</sup>慶應義塾大学医学部内科

**【緒言】** アルブミンマイクロスフェア(AMS)は、静注可能な微粒子として臨床応用されている。今回は、粒径制御可能な AMS の調製方法を確立し、これに血小板膜糖蛋白質の一部である rGPIba $\alpha$ を結合させ、vWf との特異的な相互作用について評価した。

**【方法】** リコンビナントヒト血清アルブミン(rHSA)を pH10.8 にて B 体とし、80°Cにて分子内・分子間チオール・ジスルフィド交換反応を生起させ、さらに pH6.02, 37°Cでの攪拌により凝集を促進させ、粒径の異なる AMS を調製した。架橋剤として N-スクシンイミジル 3-(2-ジチオブロピオネート)(SPDP)を利用して、AMS と rGPIba $\alpha$ にピリジスジスルフィド基(PD 基)を定量的に結合させた後、PD- rGPIba $\alpha$ をチオール基に還元して両者を反応させて rGPIba $\alpha$ -AMS を得た。vWf 存在下における rGPIba $\alpha$ -AMS のリストセチン凝集を観察し、また流動状態下にて FITC 標識 rGPIba $\alpha$ -AMS と vWf との相互作用をビデオ観察した。

**【結果および考察】** AMS は pH6.02, 37°Cでの攪拌時間により粒径が制御可能であった。今回は粒径 240±10nm の AMS 表面を構成している HSA1 分子に対して 5.5 個の PD 基を、rGPIba $\alpha$ に対して 1.2 個のチオール基を導入し、37°Cにて反応させて AMS1 粒子当たり 2500 個の rGPIba $\alpha$ が結合した rGPIba $\alpha$ -AMS を得た。リストセチン凝集試験により rGPIba $\alpha$ -AMS は vWf との凝集塊を形成し、これは rGPIba $\alpha$ のモノクローナル抗体 GUR20-5 により抑制された。さらに流動下においても rGPIba $\alpha$ -AMS は vWf 被覆基板に粘着し、これは AMS のみでは認められず GUR20-5 添加によって抑制された。

**【結論】** 粒径の異なる AMS の調製法及び血小板膜糖蛋白質を定量的に結合させる方法を確立した。得られた rGPIba $\alpha$ -AMS は vWf と特異的に結合することから血小板代替物として有用であると考えられた。

## SNO-PEG-Hb の血小板に及ぼす影響: 血管内ステント、心臓外科手術における体外循環、人工血管のコーチング等臨床応用にむけての基礎的検討

藤井 聰<sup>1</sup>、藤井 ひとみ<sup>2</sup>、仲井 邦彦<sup>3</sup>、佐久間 一郎<sup>1</sup>、斎物 修<sup>2</sup>、北畠 順<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学、<sup>2</sup>北海道大学大学院医学研究科侵襲制御医学、<sup>3</sup>東北大学院医学系研究科環境保健医学

**緒言** 血小板による血栓形成は急性冠症候群や脳梗塞の発生機序に深く関与する。P-セレクチン(CD62P)は血小板の  $\alpha$  顆粒に存在する膜糖蛋白で、血小板が活性化されると速やかに細胞表面に発現し接着能を発揮する。一酸化窒素(NO)は血小板凝集、粘着を抑制する。ヘモグロビン(Hb)は NO を不活化する結果血小板凝集を増強する可能性がある。そこで本研究では NO 放出能を付加した Hb 修飾体、分子バリアーとしての作用を持つポリエチレンギリコール(PEG)を付加した Hb 修飾体、その両方を付加した Hb 修飾体は血小板活性化作用がより少ないか検討した。またガラス板、コラーゲンをコーチングしたガラス板への血小板の接着に対する Hb との修飾体の影響も検討した。

**方法** 健常ヒト PRP を Hb に加え活性化された血小板表面に発現された P-セレクチンをフローサイトメトリーを用いて測定した。ガラス板、及びコラーゲンでコーチングしたガラス板に Hb またはその修飾体を塗布後 PRP を加え血小板の接着及び凝集を顕微鏡で観察した。

**結果** Hb 投与群で血小板 CD62P 発現が亢進した。SNOHb 投与群で CD62P 上昇は Hb 投与群に比べ軽度であった。コラーゲンでコーチングしたガラス板に対する血小板の接着及び凝集を顕微鏡で観察すると Hb は有意に血小板の接着及び凝集を抑制した。また、SNOHb、PEGHb、SNO-PEGHb では Hb よりもその効果が大きかった。

**考察** 血栓形成素因、糖尿病や有意な動脈狭窄が存在する場合 Hb がもたらす血小板活性化は、血栓を誘導する可能性もある。NO を付加した Hb 修飾体は NO の血小板凝集抑制作用により、分子バリアーとしての作用を持つ PEG を付加した Hb 修飾体では PEG の分子バリアー効果により、無修飾 Hb に比べ血小板に対する好ましくない作用が少ないと考えられる。両方を付加した Hb 修飾体は血小板活性化作用がより少ない可能性があると考えられた。ガラス板、コラーゲンをコーチングしたガラス板への血小板の接着に対する修飾 Hb の影響も顕著であったことから修飾 Hb は血管内ステント、心臓外科手術における体外循環、人工血管のコーチング等に臨床応用出来る可能性も大きいことが推察された。今後更に臨床応用の可能性を検討したい。

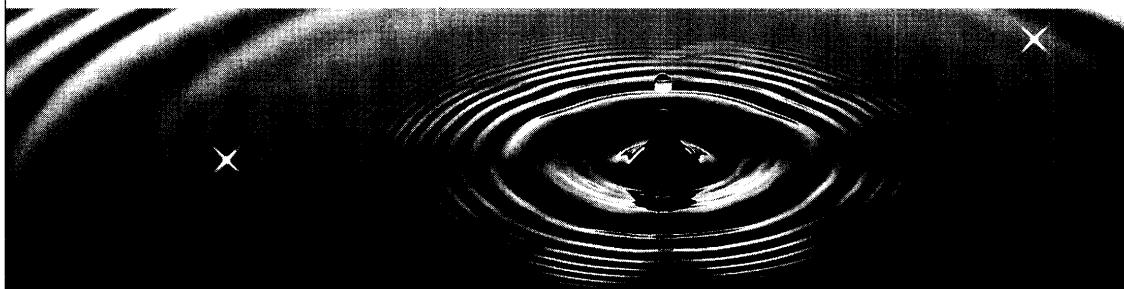
# 静注用人免疫グロブリン製剤

薬価基準収載

指定医薬品

# 献血グロベニン®I-ニチヤク

〈乾燥ポリエチレングリコール処理人免疫グロブリン〉

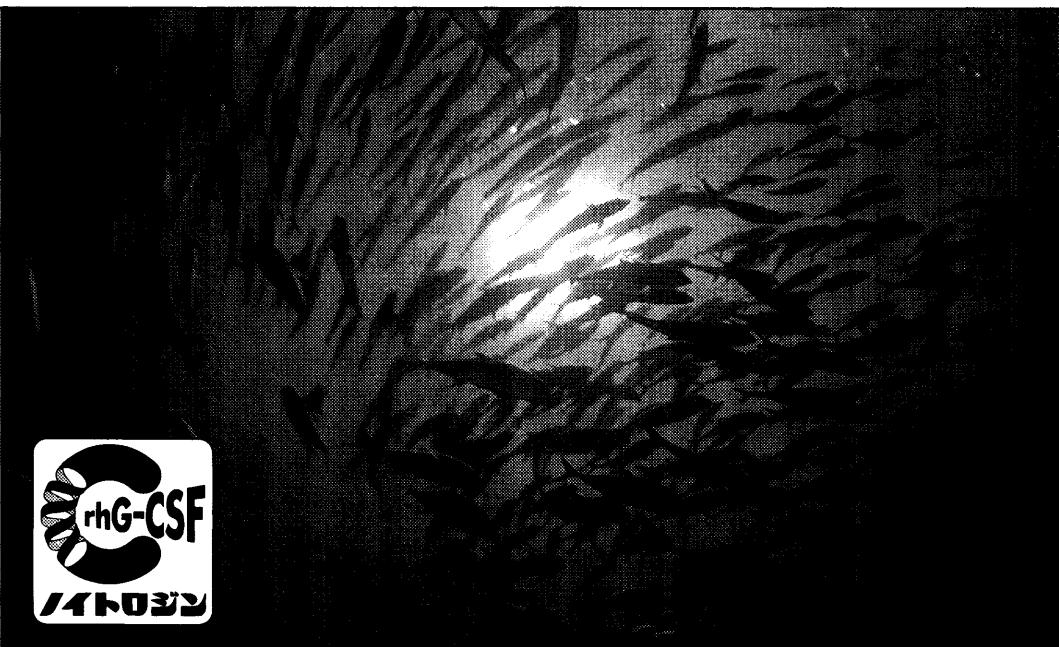


■ 効能・効果、用法・用量、使用上の注意(禁忌)等については、添付文書をご参照ください。

● 製造〔資料請求先〕  
日本製薬株式会社  
〒101-0031 東京都千代田区東神田一丁目9番6号

● 販売  
武田薬品工業株式会社  
〒540-8645 大阪市中央区道修町四丁目1番1号

1999年5月作成(K)



## 遺伝子組換えヒトG-CSF製剤

指定医薬品・要指示医薬品

薬価基準収載

ナイトロジン®  
NEUTROGIN®<sub>Injection</sub>

一般名 レノグラスチム(遺伝子組換え)

®  
50 $\mu$ g  
100 $\mu$ g  
250 $\mu$ g



[資料請求先]  
中外製薬株式会社  
〒104-8301 東京都中央区京橋2-1-9

CNU8218

※効能・効果、用法・用量、使用上の注意、取扱い上の注意等は製品添付文書をご参照ください。

---

---

事務局より

---

---

## 日本血液代替物学会事務局の FAX 番号 が変わりました。

平成 12 年 9 月 1 日より、事務局の FAX 番号が以下の通り変わりましたので御注意ください。  
※電話番号は変わりません。

**日本血液代替物学会事務局**

〒160-8582  
東京都新宿区信濃町 35  
慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

**TEL: 03-5363-3493**

**FAX: 03-5363-3499**

E-mail: [amorjsbs@med.keio.ac.jp](mailto:amorjsbs@med.keio.ac.jp)

何卒宜しくお願ひ申し上げます。

日本血液代替物学会  
事務局

## 投稿規定

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

### 執筆規定

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

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

第2頁以降に和文抄録、Keywords（英文で6個程度）を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること。英文抄録は英文ワープロを用いて、別の「ABSTRACT」ファイルとしてハードコピーとともに提出しても構わない。

- 4) 句読点はコンマ(,)ピリオド(.)とする。
- 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbol フォントを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめること。
- 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μm, L, mL, μL, mol, g, mg, μg, ng, pg, fg, N/10などを用いる。
- 7) FigureとTable：引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は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<sup>2)</sup>, <sup>3-5)</sup>, <sup>1, 4-6)</sup>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、あらかじめ版権所有者の許可を得ること。また、掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

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

### 編集委員会

●宮尾秀樹(委員長)、池淵研二、武岡真司、友田輝夫、仲井邦彦、西出宏之、堀之内宏久、村田満、山内紘一、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 高山

人工血液 vol. 8 (3) 2000年9月1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)5363-3806 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)5363-3806 FAX (03)5363-3499

〒113-0034 東京都文京区湯島1丁目1番地12号

TEL (03)3253-5311 FAX (03)3251-5339

再生紙を使用