

目 次

# 人工血液

第9卷 第3号 2001年8月

第8回次大会プログラム .....	50
-------------------	----

Contents

# ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 9 No. 3 August, 2001

<i>The 8th Annual Meeting Program</i> .....	50
---	----

# 第8回日本血液代替物学会年次大会

The 8<sup>th</sup> Annual Meeting of  
The Society of Blood Substitutes, Japan

## テーマ

「血液代替物をめぐる諸問題」

—臨床応用を目指して—

大会長：清水 勝（東京女子医科大学）

会期：2001年9月4日（火）、5日（水）

会場：シェーンバッハ・サボー

〒102-0093 東京都千代田区平河町 2-7-5  
TEL:03-3261-8386 FAX:03-3261-5449

## 年次大会 大会長挨拶

20世紀における輸血療法を顧みますと、世紀初頭にABO血液型が発見されて、免疫性輸血副作用の最大の問題を回避できることで幕が開き、世紀末には核酸増幅検査法（NAT）の導入により懸案であったウイルス感染をほぼ克服できる状況で幕を閉じました。このような輸血療法に伴う二大副作用・合併症の殆どは克服できる目途がつきましたが、残念ながら完全には回避できないことを認めざるをえません。また、殆どの先進諸国では輸血用血液を献血により確保する体制が確立し、未だ十分とは言えないまでも血液の安全性と安定供給を確保することに努めています。さらに、治療上有用な血漿蛋白については、遺伝子組み替え技術により、補完ないし代替可能な状況になってきましたが、安全性を確実に保証するためにはさらなる経過観察が必要と思われます。

さて、21世紀の輸血療法を展望しますと、科学技術のさらなる発展によって大きく変貌すると考えられ、特に質的な向上が積極的に図られることになるものと思われます。本世紀の初頭に先ず考えられることは、永年の夢でもあります人工血液（特に、人工酸素運搬体）の臨床への応用であります。この問題は前世紀からの懸案でもありますが、これまでに幾多の試行がおこなわれてきたものの、未だに日の目を見ていません。そこで本学会のテーマを「血液代替物をめぐる諸問題」—臨床応用を目指して—といったしました。人工酸素運搬体については、シンポジウムと二題の特別講演を設けて、その研究・開発の現状について報告して頂き、臨床応用を阻むものは何か、あるいは安全性の観点からの問題点などを明らかにし、その解決策及び規制の在り方なども含めて、大いに論じて頂けることを期待しております。さらに、人工代替物の適応拡大に関するワークショップの中でも、人工酸素運搬体の演題を取り上げ、従来より期待されてきた臨床応用のほかにも適応の可能性のある病態などについて、ご報告して頂くことにしました。一方、人工血小板や人工免疫グロブリンの研究・開発の現状と臨床応用の可能性についても、シンポジウムで今後の展望について大いに論じて頂きたいと思います。

また、血液代替物の研究・開発に関連すると思われる話題性に富む二つの教育講演をして頂くことにしました。今後の研究に大いに裨益するものと考えております。

本大会での有意義なご討論を通じて、長年の念願であります血液代替物の臨床応用への大いなる弾みとなることを期待しております。

第8回日本血液代替物学会年次大会大会長

東京女子医科大学中央検査部輸血科

清水 勝

## お知らせとお願ひ

### ■参加者の方へ

#### ＜会場及び受付開始＞

会場、及び受付開始時間は両日とも午前8時30分です。

#### ＜参加登録＞

参加登録は総合受付において行います。

参加費は 10,000 円(懇親会費を含む)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。

#### ＜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、総合受付で入会手続きをおとり下さい。

年会費は 10,000 円です。

#### ＜収録集＞

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

#### ＜懇親会＞

参加者相互の親睦を図るため、9月4日(火)午後6時15分よりシェーンバッハ・サボー「木曽」において親睦会を開催します。ぜひご参加下さい。

#### ＜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、討論時間は5分、特別講演は50分、討論時間10分、教育講演は40分、討論時間5分、一般演題の講演時間は10分、討論時間は5分です。口演終了1分前にお知らせします。スライドの枚数に制限はありませんが、時間厳守をお願いいたします。

スライドプロジェクターを1台用意します。講演予定の30分前までに(各日最初の演題を除く)、スライド受付で試写をお願いします。スライドはスライド受付にて返却します。

外国人の参加者のためにも、スライドの図表は極力英語をご使用ください。

### ■各種会議日程

理 事 会:9月3日(月) 18:00～ 東京會館 カトレアルーム

評 議 員 会:9月4日(火) 12:30～ シェーンバッハ・サボー「六甲」

総 会:9月4日(火) 13:30～ シェーンバッハ・サボー「淀・信濃」

編集委員会 :9月5日(水) 12:30～ シェーンバッハ・サボー「立山」

### ■学会事務局

東京女子医科大学 輸血科

〒162-8666 東京都新宿区河田町8-1

TEL:03-3353-8111 内 37231, 37232

FAX:03-5269-7360

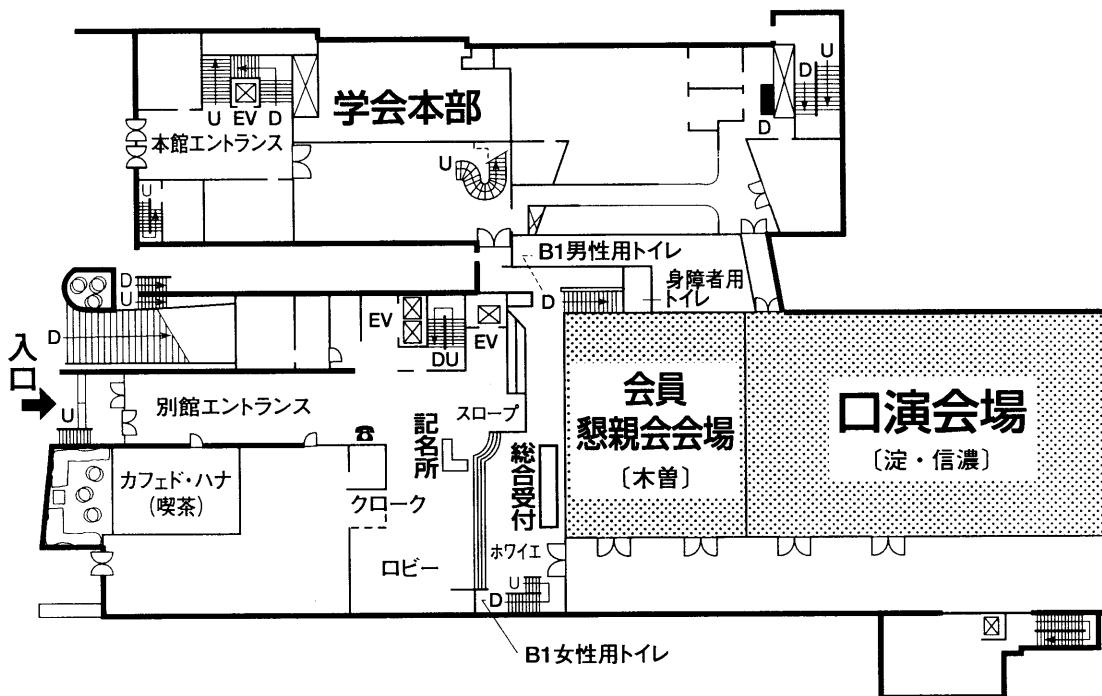
担当 藤井 寿一

## 日 程 表

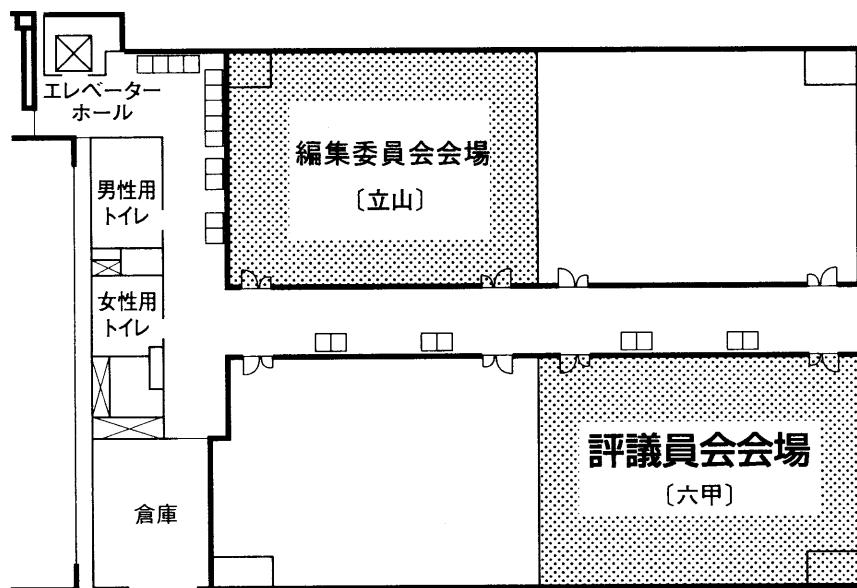
9/3(月)	9/4(火)	9/5(水)
	9:00 開会の辞	9:00 一般演題(Ⅱ)
	9:05 一般演題(Ⅰ)	
	10:30 会長シンポジウム	10:45 シンポジウム(Ⅰ)
	12:30 評議員会(昼食)	12:30 昼食
	13:30 総会	13:30 特別講演(Ⅱ)
	13:45 特別講演(Ⅰ)	
	14:45 教育講演(Ⅰ)	14:30 教育講演(Ⅱ)
	15:30 ワークショップ	15:15 シンポジウム(Ⅱ)
18:00 理事会		16:40 閉会の辞
	18:15 懇親会	

# 会場案内図

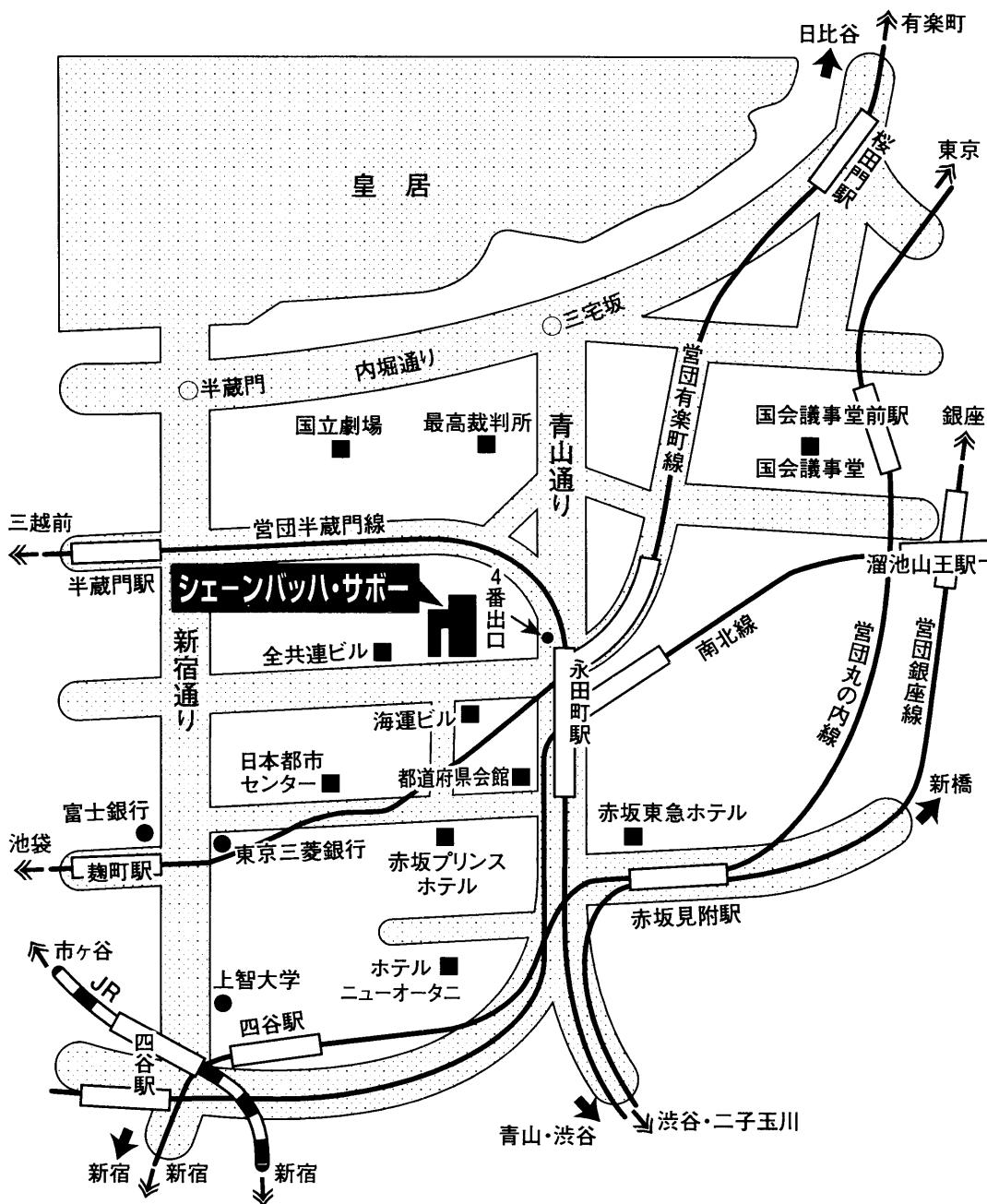
## ■ 1階



## ■ 3階



# 交通案内図



●地下鉄〔有楽町線〕〔半蔵門線〕〔南北線〕永田町駅・4番出口より徒歩1分

●地下鉄〔銀座線〕〔丸の内線〕赤坂見附駅より徒歩8分

## 9月4日(火)

9:00～ 9:05 開会の辞

9:05～10:30 一般演題(I) 座長:宮尾秀樹, 堀之内宏久

1. S-Nitro-PEG-hemoglobin 修飾体の生体適合性—急性毒性試験の成績から  
○仲井邦彦<sup>1</sup>, 富樫広子<sup>2</sup>, 佐久間一郎<sup>3</sup>, 菅原 武<sup>3</sup>, 吉岡充弘<sup>2</sup>, 佐藤 洋<sup>1</sup>, 北畠 顕<sup>3</sup>,  
(東北大学医学系研究科環境保健医学, 北海道大学医学系研究科 機能薬理学, 同循環病態学)
2. Perfluorocarbon(PFC)製剤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の可能性  
○藤井 聰<sup>1</sup>, 福島昭二<sup>2</sup>, 藤井ひとみ<sup>3</sup>, 佐久間一郎<sup>1</sup>, 仲井邦彦<sup>4</sup>, 劍持 修<sup>3</sup>, 西尾琢也<sup>2</sup>,  
竹内由和<sup>2</sup>, 北畠 顕<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>神戸学院大学薬学部製剤学, <sup>3</sup>北海道大学大学院医学研究科侵襲制御医学, <sup>4</sup>東北大学大学院医学系研究科環境保健医学)
3. コラーゲン表面における rGP I a/ II a- I b  $\alpha$ -liposomes 又は、Fbg-liposomes と血小板との相互作用  
○西谷孝子<sup>1</sup>, 戒能美枝<sup>3</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)
4. フィブリノーゲン結合アルブミン重合体の血小板代替物としての機能評価  
○岡村陽介<sup>1</sup>, 寺村裕治<sup>1</sup>, 武岡真司<sup>1</sup>, 半田 誠<sup>2</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)
5. rGP I b  $\alpha$  結合アルブミン重合体と小胞体の機能比較  
○寺村裕治<sup>1</sup>, 岡村陽介<sup>1</sup>, 武岡真司<sup>1</sup>, 半田 誠<sup>2</sup>, 池田康夫<sup>2</sup>, 村田 満<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)

10:30～12:30 会長シンポジウム 座長:清水 勝

「人工代替物開発の現状と今後の展望」

1. 我国の人工赤血球開発の現状  
○土田英俊(早稲田大学理工学総合研究センター)
2. 化学修飾型ヘモグロビンを利用した人工酸素運搬体の現状と将来への展望  
○西 勝英(熊本大学医学部薬理学)
3. パーフルオロカーボンの現状と今後の課題  
○北畠 顕(北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学)
4. 人工血小板／血小板代替物の開発研究の動向  
○池田康夫(慶應義塾大学医学部内科)
5. 治療に役立つヒト抗体開発の現状  
○黒澤良和(藤田保健衛生大学総合医科学研究所)

12:30～13:30 昼食

13:30～13:45 総会(於 淀・信濃)

13:45～14:45 特別講演(I) 座長:土田英俊

The Unusual Properties of Effective Blood Substitutes

○Marcos Intaglietta (Department of Bioengineering,  
University of California, San Diego)

14:45～15:30 教育講演(I) 座長:友田燁夫

E-CELL システムによる赤血球細胞シミュレーション

○富田 勝(慶應義塾大学環境情報学部)

15:30～18:15 ワークショップ 座長:阿岸鉄三, 北畠 顕

「人工血液の適応拡大をめぐる諸問題」

1. 議会からみた今後の人工血液への期待

○木村義雄(衆議院議員)

2. 選択的脳冷却法で用いられる血液代替物質

○太田富雄(富永脳神経外科病院)

3. 超微小人工赤血球の急性脳梗塞における効果:ラット脳梗塞モデルによる実験的検討

○川口 章(東海大学医学部心臓血管移植外科)

4. 人工酸素運搬体を用いた腫瘍酸素化の検討

○岩丸有史(国際晴嵐病院外科)

5. 人工酸素運搬体の液体換気への応用について

○田島敦志(慶應義塾大学医学部呼吸器外科)

6. 人工酸素運搬体の臓器灌流についての考察

○西 勝英(熊本大学医学部薬理学)

7. 造血幹細胞と再生医療

○西川光郎(キリンビール医薬探索研究所)

8. 無輸血治療プログラムの現状とその有用性

○有賀友則(ものの塔聖書冊子協会)

9. 厚生労働省の科学技術政策と人工血液

○鈴木英明(厚生労働省医薬局血液対策課)

18:15～ 懇親会(於 木曾)

## 9月5日(水)

9:00～10:45 一般演題(Ⅱ) 座長:池淵研二, 西出宏之

1. ヘモグロビン小胞体造粒工程の改良  
○宗 慶太郎, 内藤祉康, 武岡真司, 土田英俊  
(早稲田大学理工学総合研究センター)
2. 血液生化学的検査におけるヘモグロビン小胞体の阻害作用とその回避法  
○酒井宏水<sup>1</sup>, 政田陽平<sup>1</sup>, 武岡真司<sup>1</sup>, 堀之内宏久<sup>2</sup>, 小林紘一<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外科)
3. 全合成系酸素輸液としてのリピドヘム小胞体の構造と酸素運搬能  
○中川晶人<sup>1</sup>, 森武美保<sup>2</sup>, 小松晃之<sup>2</sup>, 小林 修<sup>1</sup>, 土田英俊<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東京大学大学院薬学系研究科, <sup>2</sup>早稲田大学理工学総合研究センター)
4. 細胞型・非細胞型ヘモグロビンと過酸化水素との相互作用とその影響  
○武岡真司<sup>1</sup>, 寺村裕治<sup>1</sup>, Takashi Yonetani<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>University of Pennsylvania, Medical Center)
5. ラット hemodilution モデルにおけるNRCの効力持続性  
○筒井洋治, 木村哲寛, 石塚隆伸, 大森伸二, 志沢 隆, 後藤 博, 緒方嘉貴, 金田伸一  
(テルモ株式会社 研究開発センター)
6. Nano-Filtration により精製したSFH のメタ化抑制に関する機序解明  
○木村哲寛, 金田伸一, 浅川芳和, 緒方嘉貴  
(テルモ株式会社 研究開発センター)
7. ヘモグロビン小胞体が血漿凝固及び血漿タンパク質に及ぼす影響  
○阿部秀樹<sup>1</sup>, 藤原満博<sup>1</sup>, 若本志乃舞<sup>1</sup>, 平山順一<sup>1</sup>, 池淵研二<sup>2</sup>, 東 寛<sup>1</sup>, 武岡真司<sup>3</sup>,  
土田英俊<sup>4</sup>, 池田久實<sup>1</sup>,  
(<sup>1</sup>北海道赤十字血液センター, <sup>2</sup>東京医科大学生化学教室, <sup>3</sup>早稲田大学理工学部応用化学科, <sup>4</sup>早稲田大学理工学総研)

10:45～12:30 シンポジウム(Ⅰ) 座長:小林紘一, 武岡真司

### 「人工酸素運搬体の臨床適応へ向けての留意点」

1. ショック病態における細胞型・非細胞型Hbの分解動態変動と肝臓機能異常  
○末松 誠(慶應義塾大学医学部医化学)
2. 全合成系酸素輸液:アルブミン-ヘム複合体—ヘム構造が酸素配位能に与える効果—  
○小松晃之(早稲田大学理工学総合研究センター)
3. SNO-PEG-Hb の生体適合性と臨床応用への可能性  
○佐久間一郎(北海道大学大学院医学研究科循環病態内科)
4. Hemospan™ : New Concepts, New Solutions  
○Robert M. Winslow (Sangart, Inc., San Diego,  
University of California, San Diego)
5. Perfluorocarbon(PFC)エマルジョン設計上の課題と臨床との連係  
○福島昭二(神戸学院大学薬学部製剤学)

12:30～13:30 昼食

13:30～14:30 特別講演(Ⅱ) 座長:湯浅晋治

Hemoglobin-based Blood Substitutes : ( I )Safety and Efficacy Evaluation  
( II )Mechanisms of Toxicity

○Abdu Alayash (Center for Biologics , Evaluation and Research , FDA)

14:30～15:15 教育講演(Ⅱ) 座長:池田久實

植物発現系を用いた医療用蛋白質生産システムの開発

○杉本千尋(帯広畜産大学原虫病研究センター先端予防治療学分野)

15:15～16:40 シンポジウム(Ⅱ) 座長:池田康夫, 長澤俊郎

「人工血小板の臨床応用への可能性を探る」

1. 血小板輸血の現状と人工血小板/血小板代替物の必要性  
○池淵研二(東京医科大学生化学)
2. アルブミン重合体を用いた血小板代替物の開発  
○武岡真司(早稲田大学理工学部)
3. リポソームを用いた血小板代替物  
○西谷孝子(慶應義塾大学医学部内科)
4. 培養骨髓巨核球から產生された血小板の形態と機能  
○長澤俊郎(筑波大学臨床医学系血液内科)

16:40 閉会の辞

## 特別講演（I）

### The unusual properties of effective blood substitutes

Amy G. Tsai, Hiromi Sakai, Reto Wettstein,  
Eishun Tsuchida and Marcos Intaglietta  
Department of Bioengineering, University of California,  
San Diego, La Jolla, California &  
Department of Polymer Chemistry, Waseda University,  
Tokyo, Japan

The design of blood substitutes or oxygen carrying plasma expanders originally contemplated the reproduction of the transport properties of blood, particularly oxygen carrying capacity, viscosity, p50, and colloid osmotic pressure, however, whether blood is the most desirable fluid in volume restitution was not specifically challenged. Changes are introduced into the organism when blood exits the circulation even in controlled conditions such experimental shock resuscitation procedures that begin with the withdrawal of blood. These changes are evident in the microcirculation where reflex vasoconstriction causes the fall of functional capillary density, and lowering of tissue oxygenation which is not universally reversed with retransfusion of blood. Current studies show that although the initial restoration of microvascular function is seldom complete oxygen carrying plasma expanders with oncotic pressure in the range of 60 - 100 mmHg, p50 of about 5 mmHg, viscosity of about 3 - 4 cP, and oxygen carrying capacity in the range of 4 - 7 g/dl equivalent hemoglobin have better microvascular function after resuscitation when compared to whole blood and oxygen carrying plasma expanders with transport properties similar to those of blood. The improved performance is in part due to the effect of high plasma viscosity which increases capillary transmural pressure, reversing the capillary collapse induces during low perfusion pressures. The high oncotic pressure has similar effects, since it brings more fluid into the circulation. The emphasis on functional capillary density as a key indicator of functional microvascular transport emerges from resuscitation studies in shock indicating that this is one of the primary determinants of survival. In this scenario, maintenance of an open and fully perfused microcirculation is more critical than insuring oxygen supply, since closed capillaries lead the accumulation of slowly diffusing byproducts of metabolism which ultimately become toxic. The required combination of properties can be achieved by conjugating hemoglobin and polyethylene glycol. Resuscitation fluids based on hemoglobin containing vesicles may provide the next level of functional improvement in the formulation of volume restitution fluids since their biophysical properties can be specifically controlled through the inclusion of specialized compounds into the vesicles, and the formulation of the suspending medium.

Research supported by USPHS HLBI BRP R24 HL-64395.

## 特別講演（II）

### HEMOGLOBIN-BASED BLOOD SUBSTITUTES: (I) SAFETY AND EFFICACY EVALUATION (II) MECHANISM OF TOXICITY

Abdu I. Alayash, Ph.D. Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland

This presentation deals with the (I) regulatory as well as (II) research aspects of hemoglobin-based blood substitutes.

#### (I) Safety and Efficacy Evaluation:

The development of blood substitutes for a variety of clinical applications has been an active area of research and development in recent years. The proposed indications for an oxygen-carrying blood substitute are primarily emergency resuscitation of trauma patients and preoperative hemodilution for surgical procedures. There is a regulatory requirement for a clinical demonstration of, at least, equivalent safety and efficacy profiles to red blood cells. A number of safety problems were found during the preclinical and clinical development of the current generation of hemoglobin-based products, these include: cardiovascular/hemodynamic effects, gastrointestinal changes, immune cell activation and coagulation changes, oxidative stress, and decreased host resistance to overwhelming infection.

#### (II) Mechanism of Toxicity:

Heme-mediated redox reactions have been suggested to contribute to organ dysfunction and/or tissue damage that occurs when using hemoglobin-based blood substitutes. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) has been extensively evaluated in vitro and in animal models, and thus represents a useful model to explore the possible correlation between structural-functional alterations and toxicity of hemoglobin-based blood substitutes. Lessons learned as well as emerging protective strategies used to overcome hemoglobin redox reactions will be discussed.

## 教育講演（I）

## 教育講演（II）

### E-CELLシステムによる赤血球細胞シミュレーション

富田勝

慶應義塾大学環境情報学部

### 植物発現系を用いた医療用蛋白質生産システムの開発

杉本千尋

帯広畜産大学原虫病研究センター

筆者らの研究室では、1996年より、汎用細胞シミュレーション環境 E-CELL の開発に取り組んでいる。この E-CELL システムは細胞内の全プロセスを再現する目的で開発され、反応速度式をベースとしたシミュレーションモデルのみならず、あらゆる形態のシミュレーション表現を行うことができる柔軟な構成となっている。E-CELL システムの仕組みは、簡単に言うと反応器 (reactor) と呼ばれるプログラム化された反応速度式が、E-CELL システムを介して物質 (substance) の量を操作するというものである。主なインターフェースとしては、Reactor の動作状況 (活性やパラメータなど) を表示する Reactor Window や、物質量の表示および操作を行う Substance Window がある。1997年秋にはこのシミュレーションシステムを用いてマイコプラズマ菌 (*M. genitalium*) を参考に仮想の原核細胞をシミュレーションモデル化した。

ヒトを含む多くの生物の赤血球は核を含まず、遺伝子の発現が起こらないことが知られており、その単純さからシミュレーションの対象として最適であると考えられる。また、ヒト赤血球は古くから代謝学的解析が行われており、これまでに膨大な実験データの蓄積が存在している。我々は特にデータが蓄積している主要な代謝経路である解糖系、ペントースリン酸経路核酸代謝経路、簡単な膜輸送系の実験データを用いて E-CELL システム上に赤血球シミュレーションモデルを構築した。このモデルはこれまでの酵素速度論的解析から得られた微分式を元に構築されており、すべての律速酵素と ATP の生産に関わるような一部の重要な酵素に関してはフィードバックも表現している。物質量の初期値としては、これまでの実験による測定結果の平均値を用いているが、半数の物質量に関しては不明のため、他の部分シミュレーションモデルの演算結果を用いた。このような初期値を用いて演算を繰り返し、定常に近い状態を再現することに成功した。

植物は光合成により物質生産が可能な独立栄養体であり、土地、水、太陽エネルギーという天然資源を基盤とする植物による物質生産体系は、環境負荷の点から考えても、他の組換え蛋白質生産系にはない特長を有している。また、可食性部分に蛋白質を発現できれば、「食べるワクチン」として利用も可能であり、種子中の蛋白質は常温乾燥条件で長期間安定であることもあわせて、動物用ワクチンやコレラなど発展途上国で問題となっている感染症に対する製剤開発に理想的な素材を提供しうる。米国ではすでに植物による研究用試薬生産が実用化され、形質転換コーンにより生産された卵白アビジンがシグマ社から発売され、日本でも入手可能である。また豚ウイルス性下痢症ワクチンも米国で実用化に近い段階に達している。

われわれの研究グループも植物発現系の有用性に注目し、植物 RNA ウィルスを外来遺伝子のベクターとして利用する方法とアグロバクテリウムによる形質転換法の二つの発現システムを利用して、動物サイトカイン（インターフェロン $\alpha$ 、TNF $\alpha$ ）、一本鎖抗体、ウイルス抗原（カリシウイルス、ロタウイルス）などの発現をジャガイモ、タバコ、ソラマメを用いて行なっている。医療用蛋白質を植物で発現させる場合、活性を保った分子を効率よく発現させるには、遺伝子設計/変更による発現制御、高次構造再現、翻訳後修飾などいくつかの技術的問題を解決しなくてはならない。今回、これまで当研究グループで動物蛋白質を発現させた実例の紹介を通じて、植物による有用物質生産の現状や有用性、研究開発動向などに言及したい。

（共同研究者；産業技術総合研究所 松村 健、北海道大学農学研究科 上田一郎、同獣医学研究科 大橋和彦、李成一、(株)サイエンスタナカ 伊藤敬三、国立感染症研究所 武田直和、堺市衛生研究所 田中智之）

## 会長シンポジウムー1

### 我国の人工赤血球開発の現状

(つちだ えいしゅん) (たけおか しんじ) (さかい ひろみ)

土田 英俊、武岡 真司、酒井 宏水 (早稲田大学)

## 会長シンポジウムー2

### 化学修飾型ヘモグロビンを利用した人工酸素運搬体の現状と将来への展望

西勝英

熊本大学医学部

高い安全度を有し体組織細胞に充分量の酸素が供給できる人工赤血球(酸素輸液)の臨床応用が、期待されてから久しい。感染の心配も血液型も無く、毒性も極めて低く、代謝排泄が容易で、安価、加えて長期保存可能な条件を満足出来れば、輸血代替物としての利用は勿論、災害時の危機対策や、新しい適応の開発も期待できる。

この計画は献血血液から分画した濃厚赤血球の溶血で採取した高純度濃厚ヒトヘモグロビン(Hb)を、新しい工程下にリン脂質二分子膜被覆して得たHb小胞体(球状粒径200nm)の表面を、ポリオキシエチレン脂質で修飾、血液成分との相互作用や融合(自己集合)を完全回避できる安定化Hb小胞体(Hb濃度10~15 g/dL)に調整、完成に近附いた。優れた酸素輸送能力と保存安定度(室温棚置き1年以上)を実現させ、vivo試験で血液希釈、出血ショック蘇生の効果、酸素輸送機能、体内動態、細網内皮系取込みと代謝過程、凝固系への影響、などの解析を通じ、従来報告に在る修飾ヘモグロビンや赤血球自体と比較しても微小循環に有利な知見が得られており、高い有効性が確認できている。

今望まれていることは、GMP基準を満足するHb精製と小胞体製造の装置による規格化試料を用い、動物試験の成果再確認と前臨床試験を厳密に実施し、成績確認に統いての臨床試験開始が緊急課題と成っている。このため試料製造装置(容量300 L/batch)設備の用意を、製薬企業などの協力を得て推進する段階にある。幸い開発研究に使用される期限切れの献血赤血球供給に、行政当局はじめ血液事業御担当の御理解も得られる見通しとなって、漸く曙光が見えてきた段階と成了った。

ヒトHbの利用は、永い歴史を持つ血液生理学の蓄積と重ねた考察を通じた展開ができるので、その成果は未知領域の酸素輸液評価に関する重要指針となり得る。他方、例えば $\gamma$ -ヒトアルブミンにヘム誘導体を包接したアルブミン-ヘム複合体の利用が、膠質浸透圧調節を極めて容易とし、NO配位の生起を巧妙に避け血圧亢進を抑止、酸素輸液の半寿命延長を実現させるなど、全合成系酸素輸液としての期待を裏切らない対象も追随してきている。

過去数十年にわたって、人工酸素運搬体の素材として赤血球の代替となり組織に十分な酸素を供給することが可能で、しかも生体にとって毒性のない物質を求めて、多くの研究が行なわれてきた。中でもヘモグロビンは本来赤血球中に存在する物質であり、人工酸素運搬体の開発にとって最も魅力的な物質であると考えられてきた。現在ヘモグロビンを利用した人工酸素運搬体には、高分子ヘモグロビン、重合ヘモグロビン、架橋ヘモグロビンがある。将来理想的な人工酸素運搬体が開発されれば、様々な臨床応用の可能性が考えられる。

人工酸素運搬体の素材としてヘモグロビンを利用した人工酸素運搬体には、高分子ヘモグロビン、重合ヘモグロビン、架橋ヘモグロビンが開発され、それぞれの物質について主に物理化学的な見地から、酸素飽和度および、生体での酸素運搬供給能力などが示されている。しかし、これまでに開発してきた人工酸素運搬体については、生理、薬理学的観点からの詳細な検討は少ない。我々の研究グループの開発した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(PHP)についての研究以外には、Waschke らのゲルタールアルデヒド重合ヘモグロビン、Moss らのシアスピリン架橋ヘモグロビンの研究があり、いずれの型の修飾ヘモグロビンでも少量投与で、一過性の血圧上昇と心拍数の減少が観察されている。

人工酸素運搬体の循環器系に対する作用について生理、薬理学的観点からの検討は、その重要な意義にもかかわらず、十分に行なわれているとは言いがたい。特に人工酸素運搬体としての性質上、血液成分製剤とか他の薬剤の投与とは異なり、大量投与が要求されるので、従来の薬物開発研究における一般薬理試験、急性毒性試験、効果判定試験とは異なった観点からの検討が必要であろう。ここでは、筆者らが数年にわたり人工酸素運搬体として開発研究に携わってきた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(PHP)の循環器系に対する作用について述べ、今後の人工酸素運搬体の展望について検討したい。

## パーフルオロカーボンの現状と今後の課題

## 人工血小板／血小板代替物の開発研究の動向

北畠 順<sup>1</sup>、福島昭二<sup>2</sup>、仲井邦彦<sup>3</sup>、佐久間一郎<sup>1</sup>  
藤井 聰<sup>1</sup>、藤堂 省<sup>1</sup>、劍物 修<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 北海道大学大学院医学研究科

<sup>2</sup> 神戸学院大学薬学部

<sup>3</sup> 東北大学大学院医学系研究科

池田康夫 慶應義塾大学医学部 内科

人工赤血球代替物の候補として、以前よりパーフルオロカーボン(PFC)エマルジョンが研究されてきた。PFCエマルジョンは、全合成であるためウイルス感染が回避され、さらに宗教上の輸血拒否者にも使用可能であり、その臨床開発が待たれている。また、その臨床的用途も輸血代替に限らず、酸素治療や臓器保護への応用も期待されており、海外ではAlliance社が、本邦ではわれわれの研究グループが開発に当たっている。

PFCエマルジョン製剤としては、以前本邦ミドリ十字のFluosol-DARが、酸素補給液としてPTCA用に製造許可を受けたものの、エマルジョンに難点があり、溶解PFC濃度の制限に由来する酸素供給能の限界や、溶解PFCの副作用等のため製造が中止された。最近、米国でエマルジョンの改良によりPFC溶解度も向上した製剤(Oxygent<sup>R</sup>)が開発され、各種臨床第三相試験までに入ったが、冠動脈バイパス手術への臨床試験途中で、血小板活性化に由来すると思われる脳卒中頻度の増加が認められたことから、試験が一次中断されている。

福島らは新規な機構に基づく高圧ジェット流反転型乳化機(DeBEE2000)を開発し、その結果従来使用し得なかった材料を用いた超微粒子分散製剤設計が可能となった。また、DDS技術により、これら分散製剤に対してRES回避や標的指向性などの機能を付加することも可能となった。この新型乳化機を用い、われわれはプロトタイプのPFCエマルジョン製剤を二種類創製し、それぞれ血管内投与用と移植臓器保存用として、現在前臨床試験を施行中である。

その結果、PFCエマルジョン製剤の血管内投与により酸素補給を行う場合では、製剤の酸素供給能による指摘投与量の問題、それが低浸透圧であることによる膠質浸透圧調節の必要性の問題など、さらにPFCエマルジョン製剤による移植臓器保存では、保存液の酸素化や、製剤の酸素供給能の問題がクローズアップされてきている状態である。

血小板輸血は、癌・造血器腫瘍などの治療や外科手術における欠くことの出来ない補助治療法として非常に重要な位置を占めており、事実、その使用量は確実に増加し続けている。更に21世紀の新たな医療の展開を考えるとき、その重要性は一層増すと思われる。血小板輸血には、供給不足・緊急時対応の問題の他、他の血液製剤同様、輸血副作用発現の危険性があり、人工血小板・血小板代替物の開発は、医学における新しいチャレンジとして、医療にもたらすインパクトは大きい。

本講演では平成9年度より厚生労働省高度先端医療研究事業として開始された人工血小板開発研究の現状を紹介すると共に、海外における研究の動向をまとめてみたい。これまで、海外ではリポソームを担体とし、デオキシコレートで可溶化した血小板膜蛋白をそれに固定化したもの(Plateletsome)、赤血球を利用し、その膜表面にヒト血小板と結合し得るフィブリノゲンやRGDペプチドを固定し、ヒト血小板との凝集を可能したもの(thromboerythrocyte)、フィブリノゲン固定化アルブミン小粒子(synthocyte)などの報告が文献上見出しえるが、臨床試験にまで至ったものは、わずかCyplex<sup>TM</sup>と呼ばれる血小板の反復凍結融解により生じた膜小片のみであり、これも開発が中止されている。

我々の人工血小板開発のストラテジーは、人工担体としてリポソーム又はアルブミン・マイクロスフェア(AMS)を選択し、これら担体に遺伝子組換え体として作成した血小板膜蛋白GPIb $\alpha$ (von Willebrand factorの結合部位を含む)、GPIa/IIa複合体(コラーゲン受容体)を固相化することによって、流動状態で血管障害部位に露出するコラーゲンに特異的に粘着し得る人工物を先ず得ることであり、これにフィブリノゲンを更に固相化することによって、粘着部位に残存血小板を有効にリクルートしようというものである。これまでに得られた実験結果についてまとめて報告したい。

## 治療に役立つヒト抗体開発の現状

## ショック病態における細胞型・非細胞型 Hb の分解動態変動と肝臓機能異常

黒澤良和

藤田保健衛生大学総合医科学研究所

末松 誠、京兼隆典、武岡真司、土田英俊  
慶應義塾大学医学部 医化学  
早稲田大学理工学部 高分子化学

我々は数 10 名のヒトリンパ球から抗体ライブラリー(1,000 億種の独立したクローンを含み AIMS ライブラリーと名付けた)を作製した。今までに様々な性質をした 28 種類の抗原に対して 332 種類の抗体を単離した。今回そのデータをまとめて詳細に解析したので、その内容を報告する。

ライブラリー作製に際し、リンパ球を提供したヒトの中に対象抗原（ウイルス、病原菌の分泌する毒素等）で免疫された経験があるヒトが含まれていると推定される場合には、確実に強い中和活性を示す抗体が単離できる。抗体ライブラリーはファージディスプレー系を用いて作製されるので、最初ファージ抗体として単離されるが、中和活性（ウイルスや毒素に対して）を示す抗体については完全な IgG 型ヒト抗体に変換することをルーティンに行えるようになった。インフルエンザウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス、ジフテリア毒素、破傷風毒素については全てこの段階に到達した。B 型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス、大腸菌 0157 の分泌する Vero 毒素についてそれぞれ中和抗体単離を開始した。更に感染症のみならず癌特異抗原に対する抗体単離や、また様々なレセプターに対してアゴニストもしくはアンタゴニスト作用を示す抗体単離も進めている。現在、膨大なデータが蓄積されており、このような方法が持つ利点及び今後克服すべき課題についても議論する。

肝臓微小循環系は毛細血管に相当する類洞血管が収縮、弛緩を介して血流を調節する特異的な構築を有しており、その内壁を構成する血管内皮細胞には篩板状小孔(fenestration: 径約 100 nm) が存在しているため、投与された無細胞型ヘモグロビン修飾体は容易に血管外に漏出し、代謝される可能性がある。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一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、分解の速度は正常時とは大きく異なることを報告した<sup>1</sup>。演者らはラット分離灌流肝を用い、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) の三者を投与したさいの胆汁分泌動態の変動を、ラット内毒素血症モデルを用いて解析した。LPS O111B4 を 4 mg/kg ip で処理し 6 時間後の肝臓では iNOS および HO-1 が主に肝細胞に発現し、NO, CO の分泌量が最大となった。NO, CO をともに捕捉できる Hb 投与により基礎血管抵抗の上昇、類洞血管の著明な収縮が惹起される一方、基礎胆汁流量は著減し、Hb の灌流回路からの除去後にも回復を認めなかった。一方 NO の捕捉のみ可能な metHb 投与では胆汁分泌低下は起こらず、ヘムの分解亢進とともに CO の過剰生成が起るため胆汁は維持された。また HbV 投与では血管抵抗、基礎胆汁分泌とも大きな変動を認めなかっただ。さらに HbV 由来のヘムは Kupffer cell を減少させた個体では分解が低下することも示された。これらより非細胞型 Hb を基盤にした酸素運搬体は、ショック時の胆汁分泌を保証するために必要な内因性 CO を消去するため、fenestration を通過しないようななんらかの修飾を加えないと実用化が難しい可能性が示唆された。

1 Kyokane, et al., Gastroenterology 2001, 120, 1227

## 全合成系酸素輸液：アルブミン-ヘム複合体 -ヘム構造が酸素配位能に与える効果-

小松 晃之、土田 英俊  
早稲田大学 理工学総合研究センター

## SNO-PEG-Hb の生体適合性と臨床応用への可能性

佐久間一郎<sup>1</sup>、仲井邦彦<sup>2</sup>、河並和彦<sup>3</sup>、藤井 聰<sup>1</sup>  
富樫広子<sup>1</sup>、吉岡充弘<sup>1</sup>、北畠 順<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> 北海道大学大学院医学研究科  
<sup>2</sup> 東北大学大学院医学系研究科  
<sup>3</sup> 麻布大学獣医学部

**【緒言】**組換え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。より安定度の高い酸素錯体を得ることを目的として、新規なテトラフェニルポルフィリン鉄(II)誘導体を合成、アルブミン包接体の酸素結合パラメータを決定し、酸素配位能に及ぼすヘム構造の効果を明らかにした。

**【実験】**軸塩基として2-メチルイミダゾリル基(Im)、メチルヒスチジンアミド基(His)、酸素配位座近傍置換基としてピバロイル基(piv)、1-メチル-シクロヘキシリ基(cyc)を導入。酸素親和性( $P_{1/2}$ )は異なる酸素分圧に対するUV-vis.スペクトル変化から、酸素結合解離速度定数( $k_{on}$ ,  $k_{off}$ )は、レーザーフラッシュホトリシス法により決定した。

**【結果および考察】** FepivP(His)ベンゼン溶液のUV-vis. ( $\lambda_{max}$ : 442, 544, 564 nm)、及び共鳴ラマンスペクトル [ $\nu(\text{Fe-Ne})$ : 219 cm<sup>-1</sup>]から、ヒスチジンが中心鉄に分子内配位した Fe(II)5配位錯体の生成を確認。そこへ酸素を通気すると速やかに酸素錯体が形成され、その結合解離は可逆的であった。FepivP(His)、FecycP(His)の酸素親和性( $P_{1/2}$ : 1.7 Torr)は、相当するイミダゾリル型よりも12~22倍高く、これは  $k_{off}$  の減少に起因する。いずれのヘムも効率よく rHSA 内に包接され、得られたアルブミン-ヘム複合体は安定な酸素錯体を形成した。FepivP(Im)の置換基を cyc に変換すると、酸素錯体半減期( $\tau_{1/2}$ )は4.5倍(9 hr)に延長。また、軸塩基を Im から His に変えると、有機溶媒中と同様に酸素親和性が約13倍に増大、 $\tau_{1/2}$ (5hr)は3倍に延長した。rHSA-FecycP(His)の $\tau_{1/2}$ は25hrと、従来系の rHSA-FepivP(Im)に比べて12倍も長く、きわめて安定な酸素錯体を形成できることが明らかとなった。

人工酸素運搬体の研究開発は最初の臨床試験が開始されてすでに10年以上が経過している。しかしながら、未だに認可には至っておらず、逆に膨大な研究開発費が投入された後に開発が中止または中断するケースが散見される。たとえば、Baxter 社は分子内架橋型 Hb 修飾体を開発したが、出血性ショックの臨床第三相試験で死亡率が増加したため臨床開発の中止を余儀なくされている。Allaince 社の PFC 製剤である Oxygent<sup>R</sup>は、心臓バイパス手術時の自己血支援への応用試験中、患者群で脳卒中が増えることが判明し、試験中断となった。従って、新しい製剤の開発では、機能面の研究開発のみならず、生体適合性と副作用の検索が極めて重要な課題であり、臨床試験開始後にそれが初めて発覚し、薬剤設計に戻って前臨床試験を含む膨大な作業をやり直すということは避けなければならない。また、赤血球代替物の臨床開発には、米国で行われているような綿密な費用対効果算出に基づく医療経済学的検討も必要である。

われわれが開発中の SNO-PEG-Hb は、従来の Hb 修飾型人工酸素運搬体製剤の欠点を NO と PEG 付加により回避することを念頭に創製された製剤である。その生体適合性については、すでにラットを用いた前臨床毒性試験を施行しており、その結果を紹介する。また、その臨床使用を拡大し、採算性を向上させることを目的として、イヌ急性原虫症への応用を試みている。

現在の人工酸素運搬体の臨床適応としては、慢性貧血への使用の可能性は低く、急性期に同種血の調達ができないような場合に有用と考えられる。また、同種血輸血のウィルス感染に関しては、今後 NAT 導入以降極めて安全性が高まることが予想されており、コストの面からもウィルス感染回避という点のみでの使用は正当化されないであろう。しかし、同種血輸血の重篤な副作用には、溶血、細菌汚染、TRALI、抗体形成などの予知が不可能でしかも臨床的に無視できないものもあり、その観点からも人工酸素運搬体使用の意義はあると考えられる。

**Hemospan<sup>TM</sup>: New Concepts, New Solutions**

*Robert M. Winslow, MD*

*Sangart, Inc., San Diego, CA., The University of California, San Diego*

A successful oxygen-carrying plasma expander must satisfy 3 fundamental requirements: it must be affordable, efficacious, and safe. Sangart, working with the University of California, San Diego, and the Albert Einstein College of Medicine, has developed a new surface-modified human hemoglobin product, called Hemospan<sup>TM</sup>, which fulfills these requirements.

Hemospan<sup>TM</sup> is based on new theoretical and experimental concepts of the way oxygen is transferred to tissues by cell-free oxygen carriers. Counter-intuitive properties, including oxygen affinity, viscosity and oncotic pressure that are higher than those of previous products are responsible for the remarkable efficacy in animal models.

Hemospan<sup>TM</sup> is prepared from outdated human blood from the American Red Cross. Stroma-free hemoglobin is first thiolated by reaction with iminothiolane (Traut's reagent), then the resulting sulphydryl groups are conjugated to maleimide-activated PEG. Tangential-flow filtration is used throughout the process, and elimination of chromatography significantly decreases cost and increases yield of the production process. Hemospan<sup>TM</sup> has a plasma half-life in rats of 24 hours.

Toxicity studies in cell culture, rats, pigs and primates have shown it to be free of any toxicity, in doses exceeding those planned for human use. Efficacy studies in a variety of models of clinical use in hamsters, rats and pigs have shown that Hemospan<sup>TM</sup> is more effective than blood in resuscitation, and that it maintains oxygen uptake ( $\text{VO}_2$ ) more effectively than equal volumes of blood.

Hemospan<sup>TM</sup> is manufactured at Sangart, Inc. in San Diego. Preclinical studies have been completed and human clinical trials will commence in the near future.

**Perfluorocarbon (PFC)エマルジョン設計上の課題と臨床との連携**

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> 藤井 聰<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薬剤学、<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>北海道大学大学院医学研究科侵襲制御医学、<sup>4</sup>北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学

酸素運搬体としての PFC エマルジョンの有用性は、製造中止になったとはいえ経皮的冠動脈拡張術での酸素供給で製造承認を受けたことや、Alliance 社による第 3 相試験が進行中であることから明らかである。しかし、解決するべき設計上の課題が多々残されているのも現実である。第一に、実用に耐え得るエマルジョンとしての保存安定性の確保が重要である。このためには、PFC が水相にガスとなって溶解し、再び PFC 粒子に吸収されるという特有の現象を抑制する必要がある。これまでガス化しにくい PFC が材料の一部に用いられたが、ガス化しにくい PFC は肺から呼気中に排泄されにくいため、体内蓄積性が高く、これに由来する副作用も報告されてきた。また、フッ素導入した界面活性剤の使用は安定性の向上に有用であるが、溶血などの毒性が強いことが多く、臨床使用される材料には制約が多かった。最近、安定性向上のため、新規材料の開発がいくつかなされており、今後の展開が期待される。次に、血中からのエマルジョン粒子消失の制御があげられる。言うまでもなく、循環血中にエマルジョン粒子が存在しなければ酸素を運ぶことはできない。細網内皮系での補足の防止と肺からの消失、および長期に渡る生体内蓄積の防止とをバランス良く制御することが必要であり、最適な粒子径制御、ステルス性などの機能性の付与等が課題としてあげられる。さらには、十分な酸素運搬能のための PFC の高濃度化、滅菌法の確立、保存条件など、解決するべき課題は多い。臨床との連携については、どのような適応を考えるかが重要である。輸血代替のみを主とした臨床応用は難しく、事実、Alliance 社の臨床試験は、Augmented ANH に限られている。酸素運搬に主眼を置いた輸血以外への適応が重要であり、古いアイデアであるが、癌治療、画像診断、臓器保存などの分野での有用性を証明する事が臨床応用への近道であり、目的に合わせた製剤設計をする必要がある。我々の検討を含め、現状をまとめてみる。

## 血小板輸血の現状と人工血小板/血小板代替物の必要性

池淵 研二  
東京医科大学生化学教室

## アルブミン重合体を用いた血小板代替物の開発

武岡 真司  
早稲田大学 理工学部

血小板輸血は造血幹細胞移植症例の増加と平行して年々増加の一途をたどっている。同時に治療抵抗例も増加し、感染症など合併症に対する治療の改善もあり、ターミナルケアーに必要な血小板輸血も増加していると予測される。

臨床の場では10単位製剤を比較的頻回に投与する方法と20単位製剤を間隔を少しあけて輸血する方法と、いづれが輸血効果が高く、かつ経済効果が高いか以前より注目されてきたが、国内外とも明確な検討結果が出されていない。

献血事業は現状では順調に推移し、血小板では成分献血が主体となり、高単位製剤が主に供給されている。ただ血液製剤の安全性確保のため3つのウイルスに対する核酸增幅検査が導入され、検査確定後の有効期間が短くなった製剤が増え、残念ながら期限切れ血小板製剤が数～10%を占めるようになり、血液事業には影響が出て来ている。さらにプレストレージ白血球除去が導入されると、一部の製剤では白血球除去過程で血小板回収率が90%程度と予想され、単位の目減りが考えられる。有効期間72時間である血小板を欧米並みに5日間とするために、細菌汚染対策が重要になってくる。S59（ソラレン系薬剤）と紫外線照射の組み合わせが最も臨床応用に近い手段と予想されている。核酸增幅検査すら素通りするウイルス、対象外ウイルス、細菌、原虫をも不活化できることに大きなメリットがある。ただしこの不活化工程で血小板の約15%が減少するとされている。本法は混入白血球も不活化するため、同種抗原感作を軽減させ、血小板輸血不応の発生頻度は減少する可能性もある。

以上に種々の要因を合わせて考えると、血小板輸血は増加すると考え対応することが必要である。

血小板代替物の開発は研究レベルで進められている。リポソーム表面に血小板膜糖タンパクを固相化させた製剤、あるいはフィブリノーゲンを結合させたアルブミン重合体製剤が有力な候補と考えられる。一方で生体の異物認識機構は精妙であり、現時点までのデータでは循環血液中の製剤の寿命は短い。頻回に投与する必要性が予想されるため、製剤の体内蓄積を視野に入れた安全性の検討が必要になってくると考えられる。

血漿中に大量に存在するアルブミンを利用する生体適合性・生分解性の微粒子は静注用製剤（主に造影剤）として長い間検討され、既にアルブミン大凝集体やナノカプセルなどが臨床応用されている。また、ヒトアルブミンのリコンビナント体が利用できる様になると、献血由来に依存しない展開が可能となる。血小板代替物（人工血小板）として、コラーゲンを認識する血小板膜蛋白質の一部を結合させたリン脂質小胞体（リポソーム）が検討されているが、アルブミン微粒子を担体とした系の研究動向を述べる。

我々は、アルブミンを単量体として、分子内ジスルフィド結合を分子間ジスルフィド結合に転換する重合法を用いて、pHと温度の変化から重合度を制御してナノからマイクロメートルの任意の粒子径を持つアルブミン重合体の構築に成功した。添加物を一切使用せず水中で重合させる本法では、微粒子の表面は親水性となり分散安定度は高い。アルブミン重合体の表面にN-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネートを用いてピリジルジチオ基を導入、任意の認識蛋白質に同試薬を用いてメルカプト基を導入して両者を混合するとチオール・ジスルフィド交換反応により、重合体の表面に認識蛋白質が導入される。

認識蛋白質が、血小板膜蛋白質の一部のリコンビナント体であるrGPIb $\alpha$ やrGPIaIIaの場合、vWF認識能やコラーゲン認識能を重合体に付与できることを確認した。一方、フィブリノーゲンを結合させた系では、血小板固定化基板に粘着して浮遊血小板の粘着を補助することが明らかとなった。また、rGPIb $\alpha$ 結合アルブミン重合体はvWF基板に粘着するが、リン脂質小胞体の場合には基板上を転がるなど、両者の機能の相違点が明確になるにつれ、例えば重合体では出血部位の充填効果、小胞体では膜流動性や内包薬物の放出特性など、機能分担による系の高度化・高次化が期待できる。

## リポソームを用いた血小板代替物

西谷孝子

慶應義塾大学医学部内科

## 培養骨髓巨核球から產生された血小板の形態と機能

長澤俊郎

筑波大学 臨床医学系 血液内科

血管傷害部位に特異的に集積する人工粒子として、遺伝子組み換え血小板膜蛋白（rGPIa/IIa, rGPIb $\alpha$ ）、または、フィブリノゲン（Fbg）を固定化したリポソームを創り、その機能評価を行った。rGPIa/IIa-Iba-liposomes のコラーゲン表面への粘着は、可溶性 vWF 存在下では、ずり速度が高くなるのに伴って増加したが、可溶性 vWFがないときには、ずり速度の増加に伴って著しく減少した。rGPIa/IIa または rGPIb $\alpha$  の表面密度をそれぞれ 50% 減少すると rGPIa/IIa-Iba-liposomes のコラーゲン表面への粘着は減少し、粘着において rGPIa/IIa-collagen 相互作用と rGPIb $\alpha$ -vWF 相互作用が相乗的に働いていることを示している。コラーゲン表面における rGPIa/IIa-Iba-liposomes または Fbg-liposomes と血小板との相互作用はずり速度が高いほど増加し、RGD-peptide、またはプロスタグランдин E<sub>1</sub> によって阻害されたが、RGE-peptide による阻害は認められなかった。また、これらのリポソームは、均一系における血小板凝集の生成を用量依存的に著しく増強した。rGPIa/IIa-Iba-liposomes と血小板との相互作用は電子顕微鏡下でも観察された。以上の結果は、rGPIa/IIa-Iba-liposomes は、可溶性 vWF を介した rGPIb $\alpha$ （リポソーム上）と活性化 GPIIbIIIa（血小板上）との相互作用、または、rGPIb $\alpha$  と血小板上の vWF との相互作用によって、コラーゲン表面上で血小板と凝集することを示唆している。Fbg-liposomes は、リポソーム上のフィブリノゲンと血小板上の活性化 GPIIbIIIa との相互作用により、コラーゲン表面上で血小板と凝集するものと考えられる。

しかし、これまでの血小板減少ラットモデル実験において rGPIa/IIa-Iba-liposomes は止血効果を示しておらず、逆に出血時間を延長させる結果となった。これは、生体内で rGPIa/IIa-Iba-liposomes は残存する血小板と競合して血管傷害部位に特異的に集積し、血小板の機能を阻害するためと考えられる。止血能を有するリポソーム作成のためには、rGPIa/IIa-Iba-liposomes に Fbg を更に固定化することによって、残存する血小板を効率良く血管傷害部位へリクルートできる機能を与えること、リポソーム表面を修飾してリポソームの血中滞在時間を長くすることが今後の課題である。

**【緒言】**悪性腫瘍の化学療法の発達に伴い、支持療法としての血小板輸血の重要性は増している。成分輸血の導入により血小板の入手は容易にはなったが、未知感染症、同種抗体の問題など、未解決の問題も多い。近年、トロンボポエチンのクローニングにより、in vitro でも巨核球造血をより生理的条件下で構築可能となった。我々は造血幹細胞から巨核球を選択的誘導し、in vitro で產生された血小板（培養血小板）の血小板輸血応用への基礎的検討を行った。

**【目的】**今回はマウス実験系により早期造血幹細胞から巨核球の選択的増幅、培養血小板の回収法、培養血小板の形態、培養血小板の in vivo での動態について検討した。

**【方法】**マウス早期造血幹細胞（CD34-/c-kit+/Sca-1+/Lin-）を FACS にて精製後、IL-6/sIL-6R の存在下 48 時間培養後、IL-3 (100ng/ml) + Tpo (50ng/ml) の存在下で 5 ~7 日間液体培養後、培養上清を回収し、培養血小板数を算定し、放射線照射ラットに輸注し、輸注前後の出血時間を測定した。

**【結果】**本方法で早期幹細胞から巨核球を誘導すると、 $2 \times 10^2$  個の早期造血幹細胞から  $10^4$  個の巨核球が誘導され、培養上清から血小板が回収された。電顕による血小板形態は正常血小板と大きな差異は認められなかった。血小板減少マウスに  $200 \times 10^3$  個の培養血小板を輸注すると、15 分後に血小板数は、期待値の 50 % の増加がみられ、出血時間の短縮を認めた。

**【結語】**培養血小板は、in vivo 投与でも止血効果を發揮すると推察した。

## 議会からみた今後の人工血液への期待

## 選択的脳冷却法で用いられる血液代替物質

木村義雄

衆議院議員

太田 富雄

富永脳神経外科病院

【背景・目的】脳神経外科領域での最大の問題は、虚血予防と出血のコントロールである。この両者を満足できる低体温法として、5℃リングル液を用い、脳のみを選択的に冷却する方法について実験検討してきた。リングル液でなく、いろいろ血液代替物を探したが、現在のところ適当なを見出せていない。

【方法】イヌを用い、頸部で両側総頸・椎骨動脈・頸静脈を露出する。5℃リングル液を灌流する一側椎骨動脈と、希釈冷却血液を体外に導出する一側頸静脈以外の動脈を結紮後、60–80 ml/min で5℃リングル液の灌流を開始する。同時に頸静脈より導出された希釈血液は、dialyser および heat-exchanger で濃縮・加温後大腿静脈に返血する。脳温は約3分で32℃、7分で25℃まで低下する。

現在、選択的脳低温を60分間維持し自然復温させている。長期生存実験および組織学的検索でも異常所見を見ない。また、cold injury を作成し、Evans-blue の漏出、および glutamate の産生を見ているが、すべて抑制的である。

【考察】現在、本法を臨床応用するにさいし、リングル液より酸素輸送能に優れ、浸透圧の面からも問題のない、代替物を探している。リングル液を5℃に冷却し、酸素をバブリングすれば、溶解する酸素量は800 mg/dl 以上であるが、赤血球の酸素運搬能と比すべくもない。

人口赤血球が量産され臨床に利用されれば理想的であるが、低温下での酸素遊離条件を明確にしておかねばならない。また、コロイド溶液の使用に関しては、大量使用による浸透圧異常を生じることが考えられる。その他、ラジカル補足剤やカルシウム・プロッカーなど、虚血条件で有利に作用する物質の混合も今後重要になってくるだろう。

【結論】低温下で大量使用可能な血液代替物の条件の決定および新製品の開発が望まれる。皆様の温かい支援により、外科学に新風を吹き込みたいと思っている。

## ワークショップー3

## ワークショップー4

### 超微小人工赤血球の急性脳梗塞における効果： ラット脳梗塞モデルによる実験的検討

川口 章<sup>1</sup>、灰田宗孝<sup>1</sup>、緒方嘉貴<sup>2</sup>、栗田大作<sup>1</sup>、  
泉 正人<sup>1</sup>、小出司郎策<sup>1</sup>、篠原幸人<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東海大学医学部

<sup>2</sup>テルモ株式会社

**背景** 脳梗塞急性期の原因療法は乏しく、脳浮腫や酸素消費を減少させることで梗塞巣周辺の切迫梗塞組織への波及を予防する間接的・補助的なものが主流となっている。

**目的** テルモ社製 Neo Red Cell (NRC) は、ヒト血色素をリポソームに入れた人工赤血球であり、ヒト赤血球と同等の酸素運搬能を有しながら、直径が  $0.2 \mu\text{m}$  と微小である。このため脳梗塞発生時には、側副血行路の有無に関わらず、赤血球が及ばない毛細血管を介して梗塞巣およびその周辺組織に酸素を供給でき、脳梗塞の新たな治療法となる可能性がある。この仮定をラット脳梗塞モデルで実験的に検討した。

**方法** SD ラットにおいて右内頸動脈から 2-0 モノフィラメント糸を挿入留置して中大脳動脈を閉塞させ、急性脳梗塞のモデルとした。この 1 分後から 10 分間で 10 ml の NRC (G1) を輸血する傍ら、同量の脱血を頸動脈から行って循環血液量の増加を避けた (G1: NRC 群)。また対照群として、ヒト血色素の入っていないリポソームを同様に輸血・脱血する群 (G2: Vehicle 群) よりび脳梗塞のみで無処置の対照群 (G3: Control) を設けた。これらの群において梗塞 24 時間後の脳浮腫の程度を MRI イメージング (GEYMS) を用いたシグナル強度として計測し大脳皮質、線状体、海馬および梨状葉で比較した。

**結果** 輸血 24 時間後の NRC 濃度はヘマトクリットとして  $10.3 \pm 1.7\%$  であった。この時点の信号強度+標準誤差を表に示す。

	N	皮質	線状体	海馬	梨状葉
G1(NRC)	5	107±5	97±05	123±10	121±07
G2(Vehicle)	6	124±3	117±04	128±05	116±10
G3(Control)	8	114±9	119±11	121±07	109±10
G1 vs G2: P=		0.009	0.012	NS	0.043
G1 vs G3: P=		NS	NS	NS	NS
G2 vs G3: P=		NS	NS	NS	NS

**結論** NRC は血色素の入っていないリポソームに比べ有意に脳浮腫を軽減した。血色素の入っていないリポソームを輸血した群で無処置群に比べて逆に脳浮腫が強い傾向にあったのは、これらのリポソーム溶液の膠質浸透圧が低いことに起因していると考えられ、これが NRC 輸血の効果を減じていることも推測された。現在、等張とした NRC 溶液を用いて再検討を行っている。

### 人工酸素運搬体を用いた腫瘍酸素化の検討

岩丸有史<sup>1,2</sup>、山本学<sup>2</sup>、大塚崇<sup>2</sup>、山内徳子<sup>2</sup>、渡辺真純<sup>2</sup>、堀之内宏久<sup>2</sup>、酒井宏水<sup>3</sup>、小松晃之<sup>3</sup>、土田英俊<sup>3</sup>、小林紘一<sup>2</sup>

<sup>1</sup>国立療養所晴嵐荘病院外科<sup>1</sup>、慶應義塾大学医学部外科学教室<sup>2</sup>、早稲田大学理工学部応用化学科高分子研究室<sup>3</sup>

**目的**：腫瘍組織は低酸素状態にあるため各種癌治療に対し抵抗性を持つ。人工酸素運搬体投与により腫瘍組織を酸素化できれば抗癌剤や放射線療法の抗腫瘍効果を増強できる。

**人工酸素運搬体**：リポソーム包埋ヘモグロビン(Hgb-v), アルブミンヘム(rHSA-FeP)は物性デザインが可能な酸素運搬体である。対照として 5% アルブミン(rHSA)用いた。

**方法**：Ascites hepatoma LY80 を Donryu rat 大腿に移植し担癌モデルとし、人工酸素運搬体を動注投与した。腫瘍酸素分圧 (PTO2) 測定には、ポルフィリンの励起後熒光減衰時間から酸素分圧を測定する Oxyspot を用いた。FiO2 0.99 陽圧呼吸下、内頸動脈よりカテーテルを総腸骨動脈分岐部に留置した。動注前の腫瘍酸素分圧の平均値をコントロールとし、その後酸素飽和させた酸素運搬体を 2.5 ml / kg / min の速度で 4 分間動注した。15 分間酸素分圧の測定を行い 30 秒ごとの平均値を求めた。酸素分圧增加率は Repeated measure ANOVA で解析し有意水準 5%未満を有意とした。

**結果**：両者とも腫瘍酸素分圧の上昇を得た。増加率は rHSA-FeP 群では最高約 2.5 倍に、Hgb-v 群では最高約 1.8 倍に増加した(rHSA-FeP 群:  $P = 0.014$ , Hgb-v 群:  $P = 0.048$ )。

**結論**：移植腫瘍モデルにおいて人工酸素運搬体の動注投与により腫瘍酸素分圧の上昇が得られた。Adjuvant あるいは neo-adjuvant として抗癌剤や放射線療法と併用することにより、抗腫瘍効果の増強が得られる可能性がある。

## ワークショップ-5

## ワークショップ-6

### 人工酸素運搬体の液体換気への応用について

田島敦志

慶應義塾大学医学部外科学教室呼吸器外科

### 人工酸素運搬体の臓器灌流についての考察

西勝英

熊本大学医学部

肺または気管・気管支内へ液体を投与して肺疾患を治療しようとする試みは第一次世界大戦時から始まった。その研究は、第一世代人工酸素運搬体とも呼ばれる Perfluorocarbon が開発されてから液体換気という方法でさらに進歩してきた。急性呼吸不全に対し液体換気を一つの治療法として臨床で実際に使用され報告されたのは、今から 12 年前の 1989 年、Greenspan らによってである。その後、様々な問題点はあるものの、数多くの動物実験や臨床利用の報告がなされ、現在は多施設による第二・三相臨床研究が終了したところである。

急性呼吸不全（主に IRDS や ARDS）はその臨床像は様々であるが、dependent lung である背側肺の無気肺が共通病変であり、これを如何に広げ recruit するかが治療のポイントとなる。液体を気管内に投与すると重力で自然に dependent lung に到達し、気相液相間の摩擦力（表面張力）がより低い液相液相間の摩擦力に変わるために、無気肺が改善されることが指摘されている。ただし、表面張力の低い液体でないと高い換気圧を必要とし、また高濃度に酸素を含有する液体でないと急性呼吸不全の治療としては意味がない。その点において、現在臨床応用されている Perfluorocarbon は表面張力は低く、酸素溶解能は血液の 3 倍とも証明されている。動物実験の *in vitro* の結果では Perfluorocarbon の特徴として、損傷肺への好中球浸潤の抑制や、肺胞上皮細胞からの IL-8 の放出抑制、肺胞内マクロファージからの酸化物質の放出抑制などの抗炎症効果も報告されている。

一方、われわれは、近年血液代替物として注目されているリボソーム包埋ヘモグロビンを液体換気に利用できないかという発想のもとに、ARDS モデルを用いた動物実験を行なっている。日本家兎を用い、生理食塩水で洗浄することで作成した障害肺モデルと、オレイン酸を静注することで作成した障害肺モデルに対し、リボソーム包埋ヘモグロビンによる部分液体換気をおこなった。その結果、障害肺の酸素化や、コンプライアンスの改善、組織学的にも肺組織の保持を認めており、液体換気に使用できるもう一つの液体として期待している。

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、ヒリドキシリ化ポリオキシエチレンヘモグロビン重合体（PHP）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、重要臓器に対しての緊急避難的酸素供給である。その開発にあたっては、生物科学・医科学的不確定要素はあるが、それでも尚現在のレベルでの十分な安全性の確認が必要である。一方、ヘモグロビン系人工酸素運搬体には酸素と結合すると言う本来の性質以外に、NO とも強く結合する性質があり、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。したがって、重要臓器に対しての血流分布に問題はおこらないか十分な検討も必要となってくる。西らは、循環器系の NO 系に対してどのような影響をおよぼすか、1) 摘出心臓冠動脈灌流、2) 下肢血管灌流、3) 肺動脈灌流、4) 腎動脈灌流、5) 腸間膜血管系のモデルを用いての実験、6) 麻酔下および無麻酔下生体における PHP の循環器系に対する作用、7) 摘出心臓灌流保存について検討を行ってきた。これらの結果に基づき、ヘモグロビン系人工酸素運搬体の臓器保存液あるいは灌流液としての有用性、ならびに問題点につき考察する。

## ワークショップ-7

### 造血幹細胞移植と再生医療

西川 光郎

キリンビール(株)医薬カンパニー  
医薬探索研究所

## ワークショップ-8

### 無輸血治療プログラムの現状とその有用性

有賀 友則

ものの塔聖書冊子協会  
ホスピタル・インフォメーション・サービス

骨髄移植、末梢血幹細胞移植、臍帯血移植が造血幹細胞移植術として実施されている。それぞれの移植術において骨髄採取時のドナー負担、動員幹細胞数不足とドナー負担、臍帯血幹細胞の絶対数不足がこれらの移植術の課題となっているが、我々は、造血幹細胞を体外で増幅することでこれらの課題を解決し、造血幹細胞移植術の改善に寄与すべく研究を行っている。

種々の細胞表面抗原を利用した FACS 解析により高度に純化した造血幹細胞を同定することが可能となるとともに、造血細胞に作用するサイトカインが分子レベルで解明されてきた。その結果、造血幹細胞に対するサイトカインの直接的な作用を解析することが可能となった。一方、分子生物学的手法、発生工学的手法の発達により個体発生メカニズムの分子レベルでの理解が飛躍的に進んできている。造血幹細胞の自己複製メカニズムを解明するには、造血幹細胞を血液細胞として捉えるとともに、幹細胞システムの観点から考察を加える必要があると認識されている。種々の幹細胞系列はサイトカイン、成長因子に加え種々の発生関連因子の影響を受けながら発生・増幅しており、これら刺激因子は幹細胞を取り巻く環境から受け取っていることが明らかにされてきた。我々は、造血幹細胞の自己複製系を確立するため、サイトカイン、発生関連因子、ストローマ細胞との相互作用など多面的に研究を継続してきた。今回は、これらの研究成果の一部を紹介したい。

近年、各組織に存在する幹細胞が他の組織の細胞に分化しうる可塑性を有することが示された。この様な知見は、造血幹細胞増幅技術が将来、自由に血液細胞を造る技術にとどまるのみならず、広範な組織再生医療へ展開する可能性を秘めていることを示しており、このような将来の可能性についても触れてみたい。

輸血の安全性を向上させるため多大の努力が払われているものの、リスク・ゼロの輸血を保証することは困難である。そうした中、血液代替物の開発に加え、同種血を用いない医療が推し進められている。現在、米国をはじめ世界で200ほどの医療機関が「無輸血治療プログラム」を施行し、それをパンフレットなどで公にしている。これらの病院は、患者が自らの信条に基づくものであれ、医学的な危険を避けたいと思う場合であれ、無輸血治療を望む患者の意向を尊重し、明確な医療契約に基づき同種血を用いずに良質の治療を施している。

無輸血手術の利点の一つは、より質の高い医療が促進されるということである。一例として、Johns Hopkins Hospitalでは、回収式や希釈式の自己血輸血をAdvanced Transfusion Practicesと位置づけ、同種血を回避した治療に努めている。また、多くの医療機関は無輸血治療プログラムを採用する理由の一つに、輸血の副作用を回避できることや、患者の回復が早いことによるコストの面でもメリットを挙げている。無輸血で良質の医療を施す医療機関としての評判ゆえに、より多くの患者が来院するという結果も見られている。

日本においてもこのような明確な取り決めを設けている医療機関は増えつつある。また、プログラムとして明確にしてはいないものの、大学病院をはじめとする数多くの医療機関が無輸血治療を望むエホバの証人のためのガイドラインを設けており、全般に患者の意思を尊重する方針が明らかにされている。しかし、その実際の運用や浸透度は様々である。ガイドラインの策定にとどまらず、無輸血治療プログラムへの参加に同意する医師や看護婦が必要に応じて医療チームを形成し、患者の要請に応じて実際に無輸血治療を行なえる態勢ができているならば、ガイドラインが真に実りあるものになると考える。

21世紀の医療として、無輸血治療はますますその必要性を増してゆくであろう。安全で効果的な血液代替物が開発されれば、無輸血治療プログラムの推進に一層拍車がかかるに違いない。

## 厚生労働省の科学技術政策と人工血液

鈴木英明

厚生労働省医薬局血液対策課

今後の科学技術基本計画の重点分野としては、①ライフサイエンス、②情報通信、③環境、④ナノテクノロジー・材料の4分野が挙げられている。

厚生労働省の科学技術政策として、少子高齢化の進展、疾病構造の変容、ヒトゲノム解析等科学技術の進展等取り巻く状況を踏まえ、研究領域に係わる基本方針としては、生命科学研究の推進、高齢者の健康維持に資する老化の研究や痴呆等の原因解明の推進、根拠に基づく医療（BBM）や情報化の推進、振興・再興感染症や化学物質への対応、画期的な医薬品や医療機器の開発と安全性の確保等である。研究については、競争的環境を整備すべく、研究課題や研究費配分の毎年見直し、事前事後評価の徹底、研究課題や成果のデータベース整備等を行っている。

人工血液の開発は、厚生科学研究事業の中で、医用マイクロマシンを治療機器へ応用する等の高度医療機器開発とともに高度先端医療研究事業として位置づけられており、輸血用血液製剤の持つ感染症や免疫反応の危険性や緊急時の安定的供給の困難性を解決し得る代替物として、その開発が期待されている。

S-Nitroso-PEG-hemoglobin修飾体の生体適合性  
—急性毒性試験の成績から仲井邦彦<sup>1</sup>、富樫広子<sup>2</sup>、佐久間一郎<sup>3</sup>、菅原 武<sup>3</sup>、吉岡充弘<sup>2</sup>、佐藤 洋<sup>1</sup>、北畠 順<sup>3</sup>東北大学医学系研究科 環境保健医学<sup>1</sup>、北海道大学医学系研究科 機能薬理学<sup>2</sup>、同 循環病態学<sup>3</sup>

【目的】酸素運搬体としてhemoglobin (Hb)修飾体が有望である。しかし、Hb修飾体にはnitric oxide (NO)消去に基づく血管収縮作用を初めとする副作用があり、その改良が求められている。最近、Hb分子β鎖SH基をS-nitroso化したSNO-Hbは、酸素供与能のみならずNO放出による血管拡張作用を有していることがわかり、我々はSNO-Hbの血中半減期を延長したSNO-PEG-Hbを作成した。今回、この新しいSNO-Hb修飾体の生体適合性について、急性毒性試験の立場から解析した。

【方法】Wistar系雄性ラットを用い、尾静脈から各種Hb溶液を1.15 g/kg (Hb濃度5%) 投与し、その1日後、3日後、7日後、及び14日後に尾動脈または下腿動脈から採血し、各種臓器を摘出し固定した。Hb溶液として、未修飾Hb (Stroma-Free Hb, SFH) 、Polyethylene glycol (PEG)修飾Hb、SNO-PEG-Hbとし、対照にウシアルブミン5%液を用いた。血液生化学検査として、GOT、GPT、BUN、creatinineを分析し、固定臓器は病理組織学的検査を行った。

【結果】全ての群で投与後に一過性のGOT、GPT増加、BUN減少が観察され、PEG-Hbで顕著な変化であり、SNO-PEG-HbはAlbumin条件とほぼ同等であった。ただし、これらの変化は投与3日後には回復し、一過性の変化であることが確認された。血中creatinineについて、SFHでは投与3日後から上昇し14日経過しても高値のままであったが、他の群では大きな変動は見られなかった。病理組織学的な検索結果は以上の血液生化学検査とほぼ同様な傾向であった。

【結語】Hb修飾体であるPEG-Hb、SNO-PEG-Hbは投与後にGOT、GPT上昇として見いだされる負荷を与えたが、これまでの報告通り一過性の現象と結論された。一方、SFHはcreatinineクリアランス低下が示唆され、未修飾Hbの標的臓器が腎臓であることが再確認された。SNO-PEG-Hbは、血中投与後に半減期4時間程度でHbからSNO体を放出する。酸素運搬体として大量投与された多量のSNOによる負荷の確認が必要であるが、急性毒性試験の結果は良好と考えられた。

## 一般演題( I )-2

Perfluorocarbon(PFC)製剤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の可能性

藤井 聰<sup>1</sup>、福島 昭二<sup>2</sup>、藤井 ひとみ<sup>3</sup>、佐久間 一郎<sup>1</sup>、仲井 邦彦<sup>4</sup>、斎藤 修<sup>3</sup>、西尾琢也<sup>2</sup>、竹内由和<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>神戸学院大学薬学部薬剤学、<sup>3</sup>北海道大学大学院医学研究科侵襲制御医学、<sup>4</sup>東北大学大学院医学系研究科環境保健医学

[緒言] 我々は完全合成系の酸素運搬体として、Polyethylene glycol(PEG)により表面修飾を施した新しいPerfluorocarbon(PFC)エマルジョン製剤の開発を行っている。製造法の開発とともにその有用性に関する評価を進めている。一方、PFC 製剤一般に関しては、血小板との相互作用が示唆され、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ため、安全性または生体適合性の評価が求められている。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。そこで、本研究では分子バリアーとしての作用を持つ PEG によるエマルジョン表面の修飾が、血小板活性化作用の抑制に有効であるか検討した。

[方法] PEG リン脂質で表面を修飾した 50%パーフルオロトリプチルアミン(PFTBA)(FC-43)エマルジョンと PEG リン脂質を使用しない 50%PFTBA(FC-43)エマルジョンを用いた。健常ヒト PRP を PFC 製剤に加えたのち、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。健常ヒト PRP を PFC 製剤に加えたのち、血小板凝集能をレーザー散乱光を用いた血小板凝集計で測定した。

[結果] PFC 投与群で血小板 CD62P 発現が亢進した(PFC 3%, 5%で対照の 176%, 167%)。PEG-PFC 投与群で CD62P 上昇は PFC 投与群に比べ軽度であった(PEG-PFC 3%, 5%で対照の 94-132%, 80-104%)。PFC 投与群で血小板凝集能は亢進しなかった(PFC 3%, 5%で対照の 96%, 89%)。PEG-PFC 投与群で血小板凝集能上昇は PFC 投与群に比べ差は乏しかった(PEG-PFC 3%, 5%で対照の 85%, 85%)。

[考案] 血栓形成素因、糖尿病や有意な動脈狭窄が存在する場合 PFC 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。分子バリアーとしての作用を持つ PEG を付加した PEG-PFC 修飾体では PEG の分子バリアー効果により、無修飾 PFC に比べ血小板に対する好ましくない作用が少ない可能性も考えられる。PEG 修飾 PFC 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。

## 一般演題( I )-3

コラーゲン表面における rGPIa/IIa-Iba-liposomes 又は、Fbg-liposomes と血小板との相互作用

西谷孝子<sup>1</sup>、戒能美枝<sup>3</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

[緒言] これまで、GPIa/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、rGPIa/IIa-Iba-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、流動状態下、コラーゲン表面における rGPIa/IIa-Iba-liposomes、または、フィブリノゲンを表面に固定化したリポソーム、Fbg-liposomes、と血小板との相互作用について検討したので報告する。

[方法] リポソームと血小板を、ローダミンとメパクリンでそれぞれ蛍光標識し、流動状態下、コラーゲン表面での相互作用を蛍光顕微鏡で連続測定し、イメージプロセッサーで画像解析をおこなった。測定は洗浄赤血球中、ヘマトクリット 37.5%, 2mM Mg<sup>2+</sup>, 10 $\mu$ g/ml 可溶性 vWF、血小板濃度 1.0 x 10<sup>5</sup>/ $\mu$ l で行った。均一系における、血小板凝集に対するリポソームの影響は、レーザー散乱粒子計測型血小板凝集能測定装置を用いて測定した。

[結果] コラーゲン表面における rGPIa/IIa-Iba-liposomes、又は Fbg-liposomes と血小板との相互作用は、ずり速度が高いほど増加した。この相互作用は、RGD-peptide (1 mM), 又はプロスタグランдин E<sub>1</sub> (1  $\mu$ M) によって阻害されたが、RGE-peptide (1 mM) による阻害は認められなかった。また、これらのリポソームは、均一系における血小板凝集塊の生成を用量依存的に著しく増強した。

[結論] rGPIa/IIa-Iba-liposomes は、リポソーム表面の rGPIba が、可溶性 vWF を介して、血小板のコラーゲン粘着により活性化された GPIIbIIIa と相互作用すること、又は、rGPIba と血小板表面の vWF との相互作用によって、コラーゲン表面上で血小板と凝集することが明らかである。Fbg-liposomes は、リポソーム上のフィブリノゲンと血小板上の活性化 GPIIbIIIa との直接相互作用により、コラーゲン表面上で血小板と凝集するものと考えられる。また、これらのリポソームは、均一系においても血小板凝集塊の生成を増強することから、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。

## フィブリノーゲン結合アルブミン重合体の 血小板代替物としての機能評価

岡村 陽介<sup>1</sup>・寺村 裕治<sup>1</sup>・武岡 真司<sup>1</sup>・半田 誠<sup>2</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

## rGPIba結合アルブミン重合体と小胞体の機能比較

寺村 裕治<sup>1</sup>, 岡村 陽介<sup>1</sup>, 武岡 真司<sup>1</sup>, 半田 誠<sup>2</sup>,

池田 康夫<sup>2</sup>, 村田 満<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】本研究では、粒径  $1800 \pm 200\text{nm}$  のアルブミン重合体を合成し、この表面に血小板凝集に関与するフィブリノーゲン(fbg)を結合させ、流動下における血小板固定化基板への粘着挙動から血小板代替物としての機能の評価を目的とした。

【方法】リコンビナントヒト血清アルブミン溶液(ウェルファイド社製)から pH と温度の制御により分子間ジスルフィド結合を生起させて粒径  $1800 \pm 200\text{nm}$  のアルブミン重合体を得た。N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)を用いてアルブミン重合体に fbg(ヒト由来、CalbioChem)を結合させ、ELISA 法にて定量した。流動下にてローダミン標識 fbg 結合アルブミン重合体と血小板固定化基板との相互作用を蛍光顕微鏡を用いて観察し、また同様に fbg 結合アルブミン重合体と共に流動させたメバクリン標識血小板の粘着挙動を解析した。

【結果及び考察】fbg 結合アルブミン重合体を血小板固定化基板上に流動させたところ、基板に接触後直ちに粘着した。アルブミン重合体のみ、または抗 GPIIb/IIIa 抗体を存在させた系では粘着が抑制されたことから、活性化血小板に対する fbg 結合アルブミン重合体の特異的相互作用が確認できた。更に fbg 結合アルブミン重合体の濃度の増加に伴い、血小板固定化基板に粘着した重合体数は増加し、また流動している血小板が血小板固定化基板に粘着した数も増加した。これは基板上の活性化血小板にまず fbg 結合アルブミン重合体が粘着した後、それを介して流動血小板の粘着が誘導されたことを示している。

【結論】血小板数減少条件下において、fbg 結合アルブミン重合体の存在により流動血小板を巻込んだ凝集塊の形成が示唆された。

【緒言】本研究では、出血部位に粘着したフォンビルブランド因子(vWF)を認識する rGPIba を、ほぼ同じ粒径のアルブミン重合体とリン脂質二分子膜小胞体に同じ結合様式で結合させ、流動下での vWF 表面に対する粘着挙動を比較検討した。

【方法】pH と温度の制御によりリコンビナントヒト血清アルブミン溶液(ウェルファイド社提供)から分子間ジスルフィド結合を生起させて粒径  $1025 \pm 250\text{nm}$  アルブミン重合体を調製し、N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)を用いてアルブミン重合体に rGPIba(ウェルファイド社提供)を結合させた。同様に SPDP を用いて粒径  $920 \pm 100\text{nm}$  小胞体(卵黄レシチン/cholesterol/DPPE = 5/5/1, モル比)に rGPIba を結合させ、流動下にて vWF 表面との相互作用を観察した( $37^\circ\text{C}$ , Hct 50%, 血小板数:  $1.0 \times 10^9/\mu\text{L}$ )。

【結果および考察】高さり速度条件下( $2400\text{s}^{-1}$ )において vWF 表面に接触後粘着した rGPIba-アルブミン重合体の粘着数は時間と共に増加した。これは抗 rGPIba モノクローナル抗体の添加により抑制されたことから、rGPIba-vWF 間の特異的相互作用による粘着であることを確認した。他方 rGPIba-小胞体では、vWF 表面上を転がる現象が輝線として観測され、すり速度の増大と共に vWF 表面上を転がる小胞体の数と転がり平均距離の増大が観察された。従って粘着数はほぼ一定であった。これらの挙動の相違は、アルブミン重合体と小胞体の担体の物性(剛直性、膜流動性)の相違に由来すると考察される。

【結論】担体の硬さや柔らかさが rGPIba 組合体の vWF 表面に対する粘着や転がりを決定する因子であることが示唆され、血小板代替物の設計において重要なと考えられた。

## 一般演題(II)-1

### ヘモグロビン小胞体造粒工程の改良

宗 慶太郎、内藤 社康、武岡 真司、土田 英俊  
早稲田大学理工学総合研究センター

【緒言】添加物を必要とせず、粒子径の揃ったヘモグロビン（Hb）小胞体の調製には、均一細孔を有するフィルターを高圧で押出すエクストルージョン法が最も優れている。しかし、高濃度 Hb 溶液中では未水和脂質の残存や小胞体凝集によるフィルターの目詰まりが課題であった。本研究では、エクストルージョン処理時間の短縮、単位面積当たり処理量の増大、収率の向上を目的とし、脂質水和法について検討した。

【方法】凍結融解により粒子径と被覆層数を制御した空小胞体を調製後、凍結乾燥させた粉末を Hb 溶液に再分散させ、エクストルージョン法により粒子径の制御と Hb の内包を同時に行う方法を検討した。凍結融解は凍結（液体窒素中で 3 分静置）と融解（40℃の水浴中で 10 分静置）を繰り返した。この凍結乾燥粉末を Hb 溶液 (>35g/dL)で水和 (25℃、2 時間攪拌) し、押出装置に加え、加圧 (20kg/cm<sup>2</sup>) しながら 14℃でフィルター (孔径 3.0μm～0.22μm；富士フィルム製) を順次透過させた。フィルター透過性は、透過液量をビデオ撮影し評価した。

【結果及び考察】混合脂質粉末を純水に分散させると平均粒子径 1μm 程度の多重層小胞体が形成された。この小胞体の粒径は凍結融解の繰返しにより減少し、3 回行うと平均 550 nm 程度まで減少した。更に凍結融解を繰返しても粒子径は大きく変化しないものの、50nm 程度の小胞体が生成することから、本条件での凍結融解は 3 回が最適であると判断した。凍結融解した小胞体の凍結乾燥粉末は、Hb 溶液へ比較的容易に分散できた。分散液の粒子径は分散前と殆ど変化しないことから、凍結乾燥前の構造が保持されているものと推察される。造粒時のフィルター透過速度は、従来法(水和攪拌のみ)と比較して全処理時間が 27 倍以上短縮できた。これは、前調製した空小胞体(550 nm 程度)の乾燥粉末の利用と、また PEG 修飾によって小胞体の凝集が抑制されたためと考えられる。Hb の内包効率の指標となる Hb/lipids は 1.6～1.8 であり、従来法の 1.7 と同等の値が得られた。

## 一般演題(II)-2

### 血液生化学的検査におけるヘモグロビン

#### 小胞体の阻害作用とその回避法

酒井宏水<sup>1</sup>、政田陽平<sup>1</sup>、武岡真司<sup>1</sup>、堀之内宏久<sup>2</sup>、  
小林紘一<sup>2</sup>、土田英俊<sup>2</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外科

【緒言】欧米で進展している非細胞型修飾 Hb 溶液の臨床試験において、採血液血清中に Hb が混在するために血液生化学検査項目、特に比色法による測定値が実際の値からずれることが問題とされている。修飾 Hb は血漿蛋白質と分子量が同等であるため除去が不可能であり、Hb 濃度との相関を検討する以外、具体的な対応策は考えられていない。一方、Hb 小胞体(HbV)でも同様に幾つかの項目で測定不能になる場合があり、臨床試験開始前に対応策を検討する必要がある。そこでヒト血清に各種混合比で Hb または HbV を添加した場合と、HbV を超遠心分離により除去した後での血液生化学検査を行い、HbV の阻害作用の確認と、超遠心分離による阻害の回避を検討することを目的とする。

【方法】ヒトプール血清に 0, 10, 20, 30, 40, 50% の混合比で精製 Hb(10g/dL)または HbV(10g/dL)、生理食塩水を混合し、検体とした。また、HbV 混合試料については、超遠心分離(50,000g, 20min)後の上清液を回収して検体とし、全 30 項目について血液生化学検査を行った(BML 社, Hitachi 7450, JEOL JCA-BM12)。

【結果及び考察】HbV 混合試料の検査では、比色法や UV 法において Hb の吸収と分散液の特徴である光散乱のために 24 項目において正確な測定が困難であった。これは、Hb 混合系の阻害作用(16 項目)よりも著しかった。しかし HbV の粒径は血球成分よりも小さく、血漿蛋白質よりも大きいため、超遠心分離により完全にこれを分離除去できた。HbV を分離した上清試料では、中性脂肪を除いた全項目での分析が可能であった。実際にラットに単回投与した後の血液生化学検査に本法を適用し、その有効性を確認できた。

## 全合成系酸素輸液としてのリピドヘム 小胞体の構造と酸素輸送能

中川 晶人<sup>1</sup>, 森武 美保<sup>2</sup>, 小松 晃之<sup>2</sup>,  
小林 修<sup>1</sup>, 土田 英俊<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 東京大学大学院薬学系研究科

<sup>2</sup> 早稲田大学大学院理工学総合研究センター

**[緒言]** 我々は、水相系で酸素を可逆的に結合解離できるヘム組織体を構築し、その分散液を全合成系酸素輸液として利用する試みを進めている。今回は、4つのジアルキルホスホコリン基(リン脂質構造)を共有結合したポルフィリン鉄錯体(リピドヘム)を設計・合成し、それが水中で自己組織化して形成する二分子膜小胞体の構造と酸素配位能について詳細に検討したので報告する。

**[方法]** ポルフィリン面上に4つのジアルキルホスホコリン基を導入したリピドヘムを合成し、その構造を各種スペクトルから解析した。リピドヘムと小過剰のイミダゾール誘導体の薄膜を作製、そこへリン酸緩衝液(pH 7.3)を加え、超音波攪拌すると、赤色均一分散液が得られる。窒素雰囲気下でアスコルビン酸を加え、中心鉄を還元した。集合体の形態は透過型電子顕微鏡(TEM)観察により、また酸素親和性( $P_{1/2}(O_2)$ )、酸素錯体半減期( $\tau_{1/2}(O_2)$ )は吸収スペクトルの変化から決定した。

**[結果および考察]** リン脂質の骨格成分であるグリセロールの代わりに、トリメチロールエタンを用いると、ジアルキルホスホコリン基部分が収率高く合成できる。この工夫により、従来計12段階からなる合成過程が計7段階に短縮することができた。得られたリピドヘム/イミダゾール誘導体の水分散液のTEM観察から、一枚膜小胞体の形成を明らかにした(粒径100 nm)。膜厚が10 nmでリピドヘム分子長の2倍に相当することから、二分子膜構造であると考えられる。得られたリピドヘム小胞体に酸素を通気すると速やかに酸素錯体を形成し、その酸素結合解離は可逆的であった。このことから、リピドヘム小胞体分散液が酸素輸液としての機能を有することが示された。

## 細胞型・非細胞型ヘモグロビンと過酸化水素との相互作用とその影響

武岡 真司<sup>1</sup>, 寺村 裕治<sup>1</sup>, Takashi Yonetani<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> University of Pennsylvania, Medical Center

**[目的]** ヘモグロビン(Hb)は過酸化水素( $H_2O_2$ )と反応し、細胞毒性を持つとされるフェリル体を生成する。本研究では、Hb分子修飾体(非細胞型)と高濃度 Hb をリン脂質二分子膜小胞体に内包させた Hb 小胞体(細胞型)について、 $H_2O_2$ との相互作用と生成物による不飽和脂質の過酸化作用について明らかにする。

**[方法]** HbあるいはHb小胞体(DPPC/cholesterol/DPPG=5/5/1, モル比)分散液に  $H_2O_2$  を 37°Cにて反応させて、UV-vis スペクトラルにて反応過程を観測した。反応後の溶液状態と濁度、そして動的光散乱法から Hb 小胞体の粒径分布を測定した。また、HbあるいはHb 小胞体を  $H_2O_2$  を反応させた後、それぞれフィルター(cut off 12000 Da)または超遠心(12000rpm, 20min)にて分離した溶液中の遊離鉄イオンを ICP 発光分析により検出した。フェリル体による卵黄レシチン小胞体の過酸化物値はTBA 法により定量した。

**[結果及び考察]** ヘム濃度に対して 10 倍モルの  $H_2O_2$  を HbあるいはHb 小胞体に反応させると主にメト体の生成され、100 倍モル以上では主にフェリル体が生成され、 $H_2O_2$  を分解するカタラーゼ様作用を認めた。Hb 溶液では  $H_2O_2$  との反応により濁度の上昇と鉄イオンの放出がみられ、またフェリル体や鉄イオンによる卵黄レシチン小胞体の過酸化促進が認められた。他方、Hb 小胞体分散液では濁度や粒子径は殆ど変化せず、外水相には鉄イオンは検出されなかった。そして、小胞体内部で生じたフェリル体や鉄イオンは卵黄レシチン小胞体を過酸化できないことが明らかとなった。

**[結論]** Hb を飽和型リン脂質二分子膜にて被覆した細胞型の Hb 小胞体は  $H_2O_2$  との反応による生成物を隔離することで高い安全性を有することが示唆された。

## ラット hemodilution モデルにおける NRC の効力持続性

筒井洋治, 木村哲寛, 石塚隆伸, 大森伸二  
志沢 隆, 後藤 博, 緒方嘉貴, 金田伸一  
テルモ株式会社 研究開発センター

### 【緒言】

細胞型人工酸素運搬体である NRC では、リポソーム表面を親水性高分子で修飾することにより血中滞留性を向上させている。一方、生体内では Hb のメト化進行もあり、酸素運搬機能の保持時間の指標としての有効半減期は粒子体としての物理的半減より短くなる。しかしながら、NRC の血中の機能保持時間と、生体の酸素代謝を改善する効力の持続性との関係については、これまで明確に出来ていなかった。そこで、血液希釈モデルにおいて、NRC の血中動態と酸素代謝の関係を検討した。

### 【方法】

Wister 系雄性ラットを用い、吸入麻酔下で、同種血漿にて血液希釈を行った（血液交換率約 75%）。血液希釈後、NRC を 20ml/kg の用量で top load 投与し、クリット値と NRC 中の Hb メト化率を調べた。さらに、同モデルに、NRC あるいは対照とするラット洗浄赤血球、生理食塩水 20ml/kg を投与し、心拍、血圧、循環血液量、血中乳酸値、並びに、血液ガス分圧を測定した。

### 【結果と考察】

20ml/kg の用量で NRC を投与した場合、有効血中半減期はクリット値とメト化率より投与後 6・7 時間程度と推定された。また、投与後 6 時間までは、循環動態、酸素代謝の指標は赤血球投与群とほぼ同等の結果となり、有効半減期まで酸素運搬機能が維持されることが示された。一方、生理食塩水投与群では、投与開始直後よりこれらの指標が悪化する傾向を示し、6 時間以内に死亡する例を認めた。

## Nano-Filtration により精製した SFH のメト化抑制に関する機序解明

木村哲寛, 金田伸一, 浅川芳和, 緒方嘉貴  
テルモ株式会社 研究開発センター

【緒言】人工酸素運搬体 NRC では、赤血球中の解糖系酵素群の機能を温存した SFH を、リポソーム内に補酵素、基質と共に封入することにより、人工酸素運搬体に必要な、保存安定性や生体内での機能を維持するシステムを構築している。しかし SFH 製造工程内に、型物質やウイルス除去することを目的として導入している Nano-Filtration による精製工程が、上記酵素群の活性を一部消失させることが明らかとなった。そこで、Nano-Filtration 工程にて処理した SFH のメト化抑制に有効な添加物の処方設計と、その作用機序の解明を行った。

【方法】Nano-Filtration により精製した SFH に添加物として、Glucose, Inosine, Adenine, NAD を種々の濃度で添加し、37°Cで 24 時間 incubation 後のメト化率を指標として、各々の至適濃度を確認した。また、添加物質の作用機序解明を目的として、解糖系、ペントースリン酸回路の同代謝中間体添加のメト化抑制に対する効果を検証した。さらに、同代謝系関連酵素活性並びに、メト Hb 還元に直接関与するチトクローム b5 還元酵素活性を測定するとともに、ヌクレオチド代謝系中間体を HPLC にて測定した。

【結果と考察】解糖系代謝のエネルギー源である Glucose 及び ATP 産生に関与する Adenine の添加効果は、Nano-Filtration 処理工程を導入したことにより減弱ないしは消失した。一方、Inosine, NAD の添加はメト化抑制に必須であったが、その至適濃度は、処理工程導入前とは異なっていた。作用機序を検証した結果、解糖系の酵素群は一部その活性が失われるか、もしくは低下していた。しかし、至適濃度の Inosine, NAD を添加した Nano-Filtration 精製 SFH では、ヌクレオチド代謝系とペントースリン酸回路の一部を介した回避的反応から NADH が供給され、最終的にチトクローム b5 還元酵素が関与する還元系によりメト Hb の還元が行われると考えられた。

## 一般演題(II)－7

### ヘモグロビン小胞体が血漿凝固及び 血漿タンパク質に及ぼす影響

阿部英樹<sup>1</sup>, 藤原満博<sup>1</sup>, 若本志乃舞<sup>1</sup>,  
平山順一<sup>1</sup>, 池淵研二<sup>2</sup>, 東 寛<sup>1</sup>,  
武岡真司<sup>3</sup>, 土田英俊<sup>4</sup>, 池田久實<sup>1</sup>

<sup>1</sup>北海道赤十字血液センター

<sup>2</sup>東京医科大学生化学教室

<sup>3</sup>早稲田大学理工学部応用化学科

<sup>4</sup>早稲田大学理工総研

【目的】人工酸素運搬体の一つであるヘモグロビン小胞体 (HbV) は従来dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG) を構成成分とし (DPPG-HbV) , またpolyethyleneglycolで表面修飾をしていたが (PEG-DPPG-HbV) , 今回新たに1,5-dipalmitoyl-L-glutamate-N-succinic acid (DPEA) を構成成分とするHbV (PEG-DPEA-HbV) が開発された. これらHbV のヒト血漿に対する生体適合性について, 外因系・内因系凝固, カリクレインーキニン系に及ぼす影響を指標とし検討した.

【方法】外因系凝固はプロトロンビン時間 (PT) , 内因系凝固は活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を指標とした. 血漿とDPPG-HbV, PEG-DPPG-HbVあるいはPEG-DPEA-HbVを20%, 40%, 60%v/vで混合し, PTおよびAPTTを測定した. 対照として, 生理的食塩水, PBSを用いた. カリクレインーキニン系の活性化は, 血漿とDPPG-HbV, PEG-DPPG-HbVあるいはPEG-DPEA-HbVを混合して24時間37°Cでインキュベートし, 遠心上清中の高分子キニノーゲンの分解をウェスタンプロットで検出した. HbVの表面荷電をゼータ電位として測定した.

【結果】PTは血漿との混合比率が上昇するにつれて, 凝固時間が遅延した. しかし, 遅延の程度に5群間で違いは見られなかった. また混合比率20%では, 目立った凝固時間の遅延はみられなかった. APTTにおいても, 血漿との混合比率が上昇するにつれて, 凝固時間が遅延した. PEG-DPEA-HbVはコントロールと同様な凝固時間の遅延をもたらしたが, DPPG-HbVは凝固時間を短縮させる傾向がみられた. 血漿との24時間のインキュベーションでは, DPPG-HbVとPEG-DPPG-HbVでカリクレインーキニン系の活性化がみられたが, PEG-DPEA-HbVではみられなかった. HbVのゼータ電位はDPPG-HbVで最も低く, 次いで, PEG-DPPG-HbV, PEG-DPEA-HbVの順であった.

【まとめ】DPPG-HbVでAPTTが短縮し, DPPG-HbV及びPEG-DPPG-HbVでカリクレインーキニン系が活性化されたのは, 両者の反応に陰性荷電表面が関与しており, 両HbVがPEG-DPEA-HbVよりも表面荷電がより陰性であることが要因と考えられた. PEG-DPEA-HbVは両反応においてコントロールと差がないことから, 血漿に対する生体適合性が従来のHbVに比べ, より優れていると考えられた.

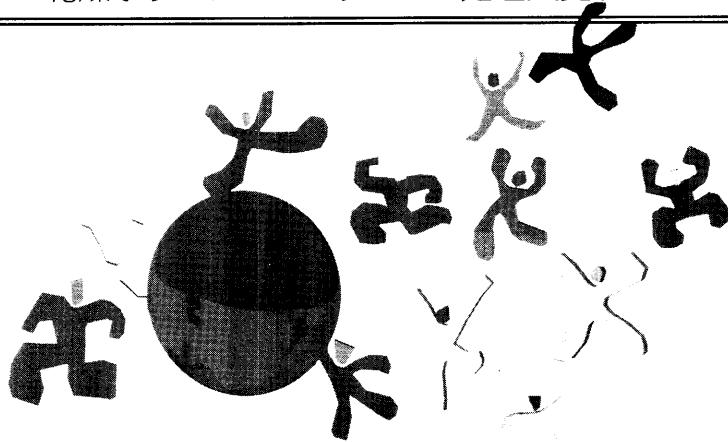
# 静注用人免疫グロブリン製剤

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

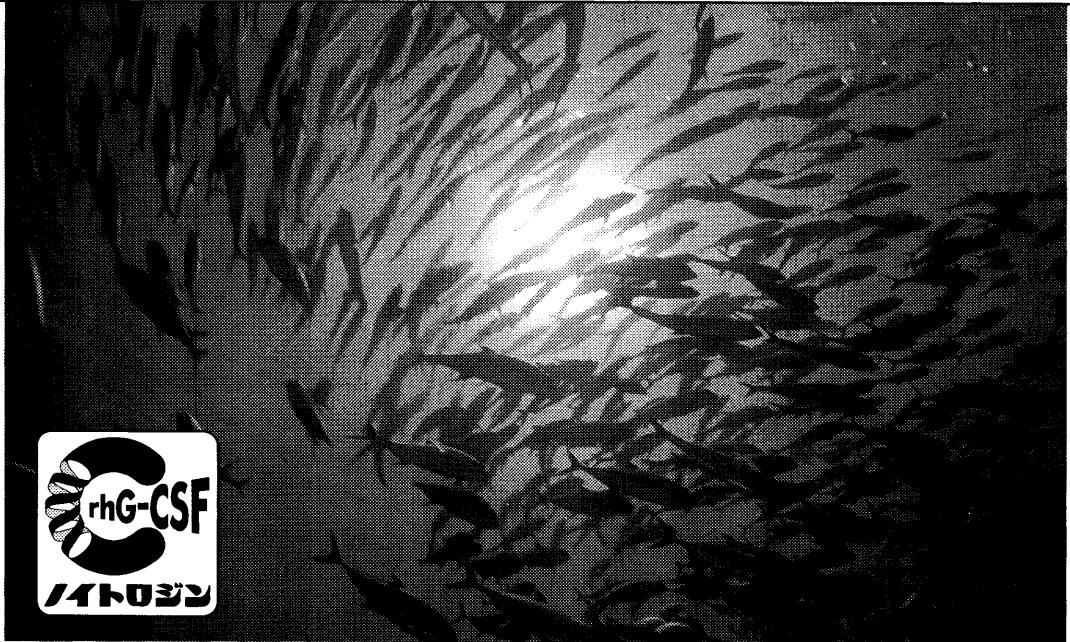
〒101-0031 東京都千代田区東神田一丁目9番8号

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

2000年10月(平成12年)



## 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

# NEUTROGIN®

NEUTROGIN<sup>®</sup> injection

一般名 レノグラスチム(遺伝子組換え)

50 $\mu$ g  
100 $\mu$ g  
注 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。

M E M O

M E M O

## 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(英語で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,  $\mu$ m, L, mL,  $\mu$ L, mol, g, mg,  $\mu$ g, ng, pg, fg, N/10などを用いる。
- 7) FigureとTable：引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字はすべて英文とすること。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</sup>, <sup>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。ただし、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, Andracci 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、津田良夫、友田燁夫、仲井邦彦、西出宏之、福島昭二、堀之内宏久、村田満、渡辺真純●

### 日本血液代替物学会 会誌

■発行 日本血液代替物学会

■編集・制作「人工血液」編集委員会

■印刷 株式会社 研恒社

### 人工血液 vol. 9 (3) 2001年8月20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)5363-3806 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