

人工血液

第10巻 第3号 2002年8月

目次

第9回年次大会プログラム	65
--------------------	----

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 10 No. 3 August, 2002

Contents

<i>The 9th Annual Meeting Program</i>	65
---	----

第9回日本血液代替物学会年次大会

The 9th Annual Meeting of
The Society of Blood Substitutes, Japan

テーマ

「血液成分の新展開」

大会長：西 勝英（熊本大学医学部薬理学第二講座）

会 期：平成14年9月4日（水），5日（木）

会 場：熊本市国際交流会館

〒860-0806 熊本市花畑町4番8号

TEL: 096-359-2020

年次大会 大会長挨拶

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ました。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ました。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きました。しかしながら、これまでに開発され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が十分に行われてきたとはいいがたく、特にバクスター社の分子内架橋型ヘモグロビンの臨床試験からの撤退は少なからずヘモグロビンの酸素運搬体としての開発にブレーキとなったことは否めないところであります。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学際的な検討が必要であろうと思います。今後新たな観点からの研究の進展が望まれます。

この点を考慮に入れ今回第9回の年次大会を開催するにあたり、シンポジウム「人工赤血球開発の展望」を企画し、我が国独自の立場に立った新たな展開についてご報告いただくようにいたしました。また、血液代替物として血清中の物質を今後いかにして人工的に開発していくかという問題についてシンポジウム「血清蛋白質の新展開」を企画し、アルブミン等の問題につき討論をお願いしました。その他人工抗体の研究・開発の現状と臨床応用についてシンポジウム「治療薬としてのヒト抗体開発の現状」にて論じていただくことにいたしております。

さらに、血液代替物質の研究に直接、間接的に関連する話題につき特別講演をお願いいたしました。今後の研究の進展に参考になれば幸いです。

本大会を通じて血液代替物質に関する幅広い討論が行われ、長年の期待である血液代替物質の臨床応用への一歩が大きく踏み出されることを期待しております。

第9回日本血液代替物学会年次大会大会長

熊本大学医学部薬理学第二講座

西 勝英

お知らせとお願い

◆参加者の方へ

〈会場及び受付開始〉

受付は7階で行います。会場、及び受付開始時間は両日とも午前9時です。

〈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ください。

年会費は10,000円です。

〈抄録集〉

抄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1,500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(水)午後7時00分より国際交流会館4階レストラン MIYUKI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(I)(II)・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30分、討論時間10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。

スライドのみの受付とします。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。終了後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4日(水) 11:30～ 国際交流会館4階 第一会議室

評 議 員 会：9月4日(水) 12:30～ 国際交流会館4階 第一会議室

総 会：9月4日(水) 13:30～ 国際交流会館7階 ホール

編集委員会：9月5日(木) 12:30～ 国際交流会館4階 第一会議室

◆学会事務局

熊本大学医学部 薬理学第二講座

〒860-0811 熊本市本荘2-2-1 TEL & FAX 096-373-5082

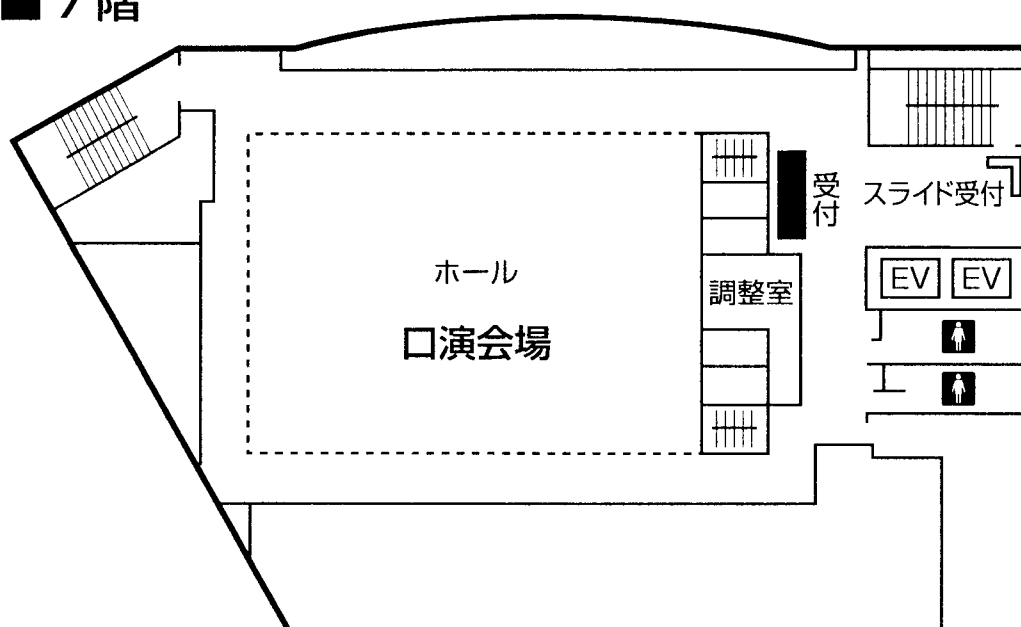
担当 徳富直史 森山智子

日 程 表

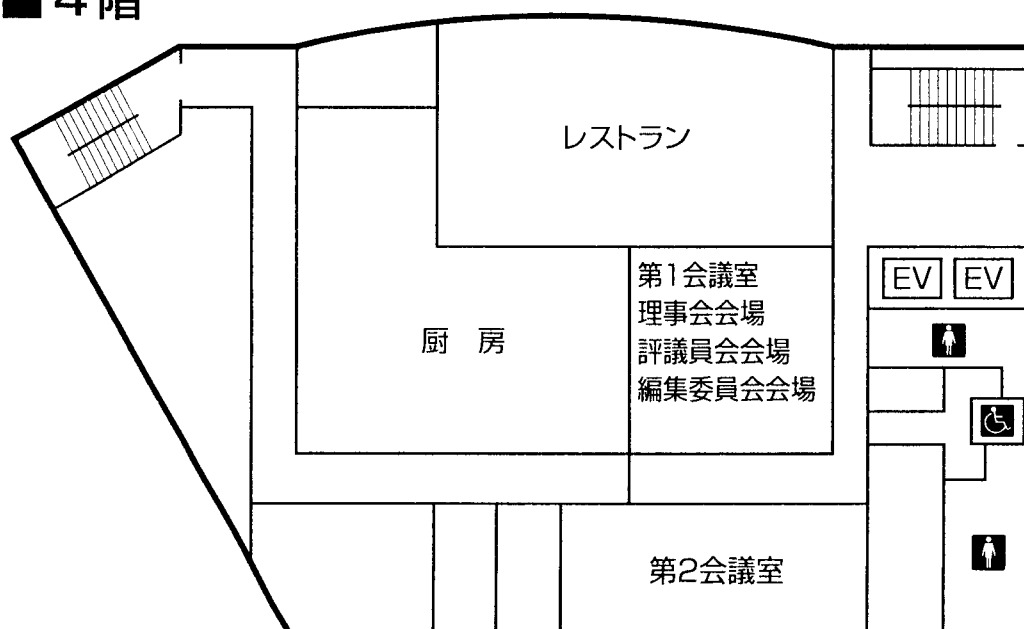
9 月 4 日(水)	9 月 5 日(木)
9 : 30 開会の辞	9 : 30 一般演題(Ⅲ)
9 : 35 会長シンポジウム	
	10 : 30 シンポジウム(Ⅰ)
11 : 30 理事会	
12 : 30 評議員会(昼食)	12 : 30 昼食
13 : 30 総会	13 : 30 特別講演(Ⅲ)
13 : 45 特別講演(Ⅰ)	14 : 10 特別講演(Ⅳ)
14 : 25 特別講演(Ⅱ)	14 : 50 シンポジウム(Ⅱ)
15 : 05 一般演題(Ⅰ)	
16 : 05 一般演題(Ⅱ)	16 : 30 閉会の辞
17 : 05 ワークショップ	
(18 : 45 終了予定)	
19 : 00 懇親会	

会場案内図

■ 7階



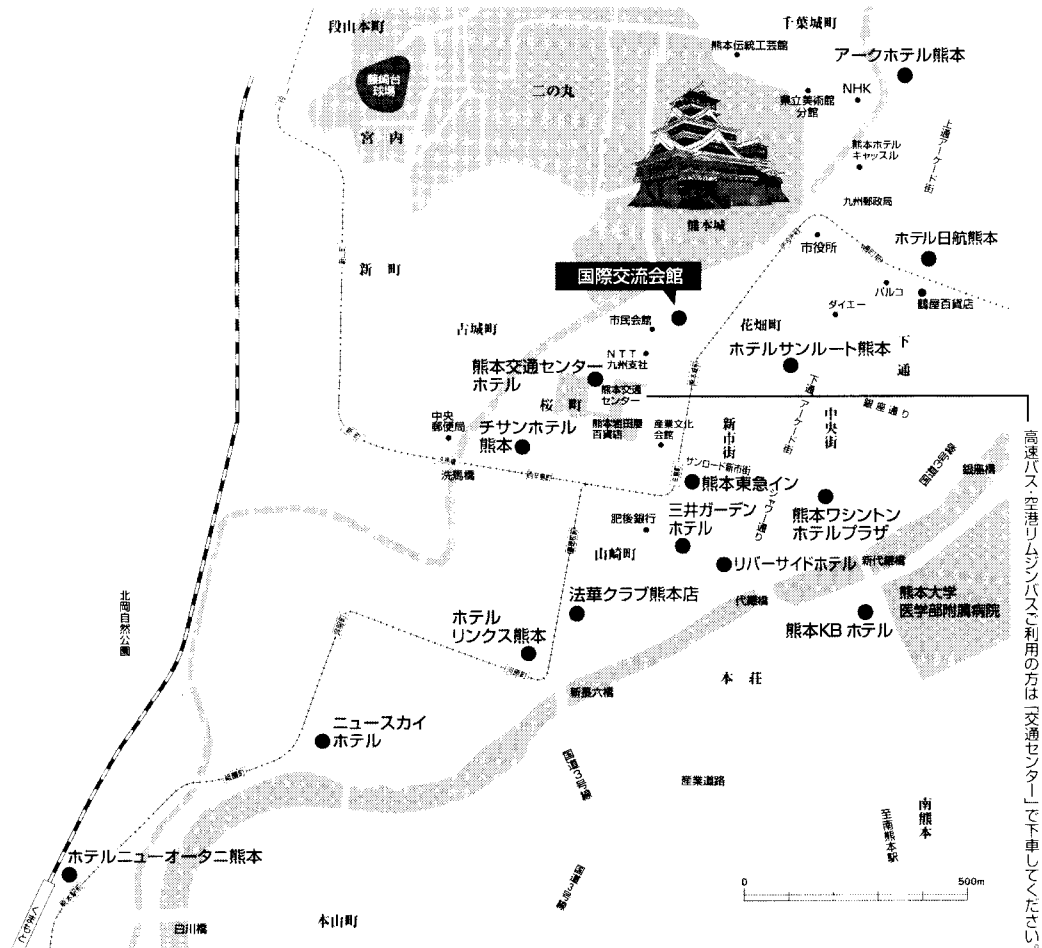
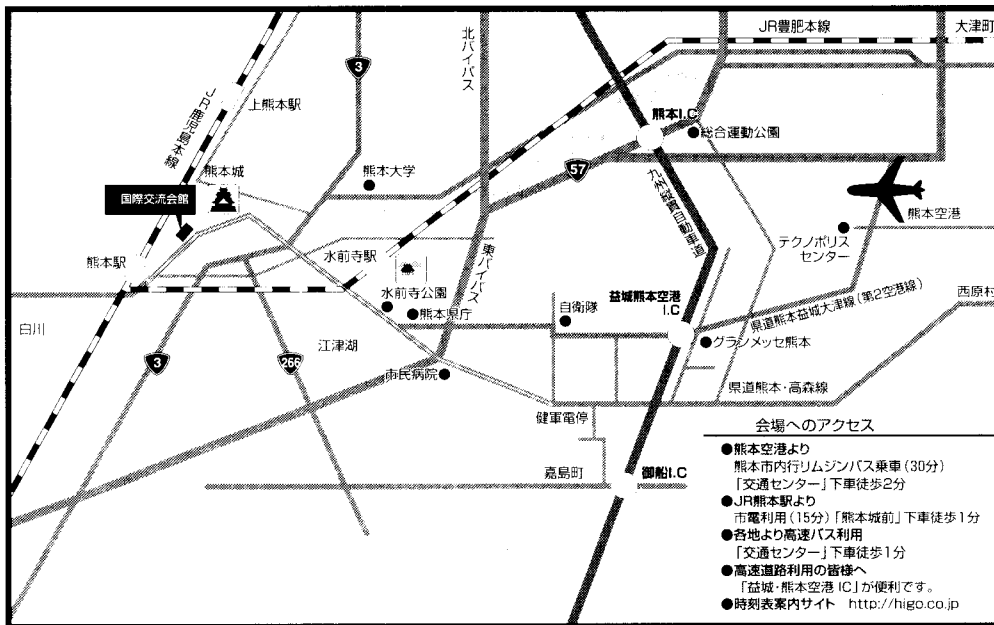
■ 4階



交通案内図

熊本市周辺地図

熊本の御案内は <http://higo.co.jp/> をご覧ください。



9 : 30 ~ 9 : 35 開会の辞

9 : 35 ~ 11 : 30 会長シンポジウム 座長：西 勝英

「血清蛋白質の新展開」

1. はじめに：血清アルブミンと α_1 -酸性糖蛋白質の新たな機能を求めて

○西 勝英（熊本大学医学部薬理学），小田切優樹（熊本大学薬学部薬剤学）

2. α_1 -酸性糖蛋白質の体内挙動と生物活性

○丸山 徹（熊本大学薬学部薬剤学）

3. 血小板代替物としての認識蛋白質結合アルブミン重合体

○武岡真司（早稲田大学理工学総合研究センター）

4. The use of modified albumins as versatile carriers for cell-specific drug delivery

○D.K.F. Meijer (Groningen Univ., the Netherlands)

11 : 30 ~ 13 : 30 昼食

13 : 30 ~ 13 : 45 総会（於 7 階 ホール）

13 : 45 ~ 14 : 25 特別講演（I） 座長：西 勝英

膜型人工肺による生命維持法の開発と応用

○寺崎秀則（熊本大学医学部麻酔科学）

14 : 25 ~ 15 : 05 特別講演（II） 座長：西 勝英

高分子治療剤開発の現状

○前田 浩（熊本大学医学部微生物学）

15 : 05 ~ 16 : 05 一般演題（I） 座長：小林紘一，武岡真司

1. 高酸素親和性を有する人工酸素運搬体の虚血部位への酸素運搬能

○浅川芳和，木村哲寛，緒方嘉貴
（テルモ株式会社研究開発センター）

2. In vitroにおけるヘモグロビン小胞体による補体活性化の検討

○阿部英樹¹，藤原満博¹，平山順一¹，若本志乃舞¹，武岡真司²，土田英俊³，東 寛¹，池田久實¹
（¹北海道赤十字血液センター，²早稲田大学理工学部，³早稲田大学理工学総合研究センター）

3. ^{99m}Tcラベル化ヘモグロビン小胞体の体内動態評価

○宗 慶太郎¹，Robert Klipper²，Beth Goins²，William T. Phillips²，武岡真司¹，土田英俊¹
（¹早稲田大学理工学総合研究センター，
²Univ. Texas Health Science Center at San Antonio）

4. 活性酸素に対するヘモグロビン小胞体の安定性

○寺村裕治，阿閉友保，武岡真司，土田英俊
（早稲田大学理工学総合研究センター）

16:05~17:05 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による交換輸血試験

○山本 学¹, 堀之内宏久¹, 小林紘一¹, 政田陽平², 酒井宏水², 武岡真司², 土田英俊²
(¹慶応義塾大学医学部, ²早稲田大学理工学総合研究センター)

2. 出血性ショック蘇生液としてのヘモグロビン小胞体の評価

○政田陽平¹, 酒井宏水¹, 武岡真司¹, 土田英俊¹, 堀之内宏久², 山本 学², 池田栄二², 小林紘一²
(¹早稲田大学理工学総合研究センター, ²慶応義塾大学医学部)

3. ヘモグロビン小胞体による出血性ショック蘇生後の全身動態と微少循環動態

○酒井宏水¹, 武岡真司¹, Reto Wettstein², Amy G. Tsai², Marcos Intaglietta², 土田英俊¹
(¹早稲田大学理工学総合研究センター, ²Dept. Bioeng., Univ. California, San Diego)

4. ヘモグロビン小胞体投与後の血液生化学的検査

○酒井宏水¹, 堀之内宏久², 政田陽平¹, 武岡真司¹, 小林紘一², 土田英俊¹
(¹早稲田大学理工学総合研究センター, ²慶応義塾大学医学部)

17:05~18:45 ワークショップ 座長:土田英俊, 西 勝英

「企業における血液成分代替物質開発の現状と今後の展望」

1. ナノバイオマシンとしての血液代替物

○西谷孝子(富士レビオ株式会社先端研究部)

2. 組換え酵母由来ヒト血清アルブミンの性状解析

○中島和幸(財団法人化学及血清療法研究所菊池研究所試作研究部)

3. 急性大量出血モデルラットにおける人工酸素運搬体(Neo Red Cell; NRC)の酸素代謝への影響

○石塚隆伸(テルモ株式会社研究開発センター)

4. 合成ヘム蛋白質(アルブミン-ヘム)の開発と酸素輸液への応用

○甲斐俊哉(ニプロ株式会社医薬品研究所)

5. 人工赤血球液—その有効性と安全性

○高折益彦(東宝塚さとう病院)

19:00~ 懇親会(於 4階 レストランMIYUKI)

9 : 30 ~ 10 : 30 一般演題(Ⅲ) 座長：池田康夫，長澤俊郎

1. アルブミン-ヘムの血液適合性：in vitroにおける評価
○黄 宇彬，小松晃之，中川晶人，土田英俊
(早稲田大学理工学総合研究センター)
2. アルブミン-ヘムのO₂，CO配位構造と再結合過程のピコ秒時間分解解析
○小松晃之，中川晶人，土田英俊
(早稲田大学理工学総合研究センター)
3. アルブミン-プロトヘム複合体の合成とその酸素配位
○中川晶人，小松晃之，土田英俊
(早稲田大学理工学総合研究センター)
4. リコンビナントGPIIb α 結合担体としてのアルブミン重合体とリン脂質小胞体の機能比較
○岡村陽介¹，寺村裕治¹，武岡真司¹，土田英俊¹，半田 誠²，池田康夫²
(¹早稲田大学理工学総合研究センター，²慶応義塾大学医学部)

10 : 30 ~ 12 : 30 シンポジウム(I) 座長：黒澤良和

「治療薬としてのヒト抗体開発の現状」

1. ヒト免疫系の再構築と抗体産生
○垣生園子 (東海大学医学部免疫学)
2. C型肝炎ウイルスエンベロープ蛋白に対するヒト型抗体の開発
○松浦善治 (大阪大学微生物病研究所エマージング感染症研究センター)
3. 抗ガングリオシド抗体および抗VEGF受容体抗体の抗腫瘍効果とそのメカニズム
○太田 聡 (協和発酵工業株式会社東京研究所)
4. 各種ウイルスに対するヒト中和抗体の開発状況
○黒澤良和 (藤田保健衛生大学総合医科学研究所免疫学)
5. 血管炎治療用の人工グロブリン開発をめざして
○鈴木和男 (国立感染症研究所生物活性物質部)
6. HBV，HCMVに対する人工ヒト中和抗体の作製
○井原征治 (東海大学医学部分子生命科学)

12 : 30 ~ 13 : 30 昼食

13 : 30 ~ 14 : 10 特別講演(Ⅲ) 座長：寺崎秀則

微小循環の生理機能の効果的発現と赤血球のレオロジー特性

○前田信治（愛媛大学医学部生理学第二）

14 : 10 ~ 14 : 50 特別講演(Ⅳ) 座長：寺崎秀則

人工血小板の開発の現状と将来展望

○池田康夫（慶応義塾大学医学部内科）

14 : 50 ~ 16 : 30 シンポジウム(Ⅱ) 座長：土田英俊

「人工赤血球開発の展望」

1. 臨床応用可能な人工赤血球の創製に関する研究

○土田英俊（早稲田大学理工学総合研究センター）

2. ヘモグロビン小胞体と血液成分の相互作用

○池田久實（北海道赤十字血液センター）

3. ショック病態における細胞型・非細胞型Hb投与による網内系機能変動の解析

○末松 誠（慶応義塾大学医学部医化学）

4. 人工酸素運搬体の投与試験による機能と安全度の評価

○小林絃一（慶応義塾大学医学部外科）

5. 臨床応用を目的とした人工赤血球の開発

○佐久間一郎（北海道大学大学院医学研究科循環病態内科）

16 : 30

閉会の辞

膜型人工肺による生命維持法の開発と応用

寺崎秀則

熊本大学医学部麻酔科学講座

緒言 呼吸不全で低酸素血症が増悪し、酸素吸入やベンチレータでは改善できず生命の危機にさらされる場合がある。膜型人工肺と部分体外循環を用いた体外式肺補助 (extracorporeal lung assist, ECLA) は、生命の危機が迫ったときに病的肺に代わってガス交換を行い、生命を維持しながら病的肺を安静に保ち救命をはかる方法である。

歴史 森岡は、1959年に蘇生法として心肺バイパスの可能性を唱え、Kolobowは、1963年にシリコン膜の人工肺、いわゆるコロボー肺を開発した。コロボー肺はFDAが長期使用を承認した唯一の膜型人工肺である。1965年、熊本大学医学部は世界に先駆けて慢性呼吸不全症例の急性増悪に対して円板型の人工肺を使用して救命した。膜型人工肺の開発と実用化に伴い、1970年代にNIHは膜型人工肺臨床応用の大規模の臨床試験を実施した。しかし、この研究の結果は悪く、その後の膜型人工肺の呼吸不全治療への応用を抑制した。これを打開したのはBartlettによる新生児ECLAとGattinoniによるextracorporeal CO₂ removal with low frequency positive pressure ventilationであった。

新しい人工肺の開発 熊本大学では、動物での世界最長の長期ECLAの安全な技術を確立し、その普及のために数年間にわたりワークショップを実施した。ECLAの最大の合併症は出血である。人工肺と体外循環回路にヘパリンを結合して抗血栓性に優れた長期ECLAの技術を開発し、出血しないECLAを確立した。

高分子治療剤開発の現状

前田 浩

熊本大学医学部微生物学講座

合成高分子が薬剤として広く用いられている例は、1960年代のポリビニルピロリドン (PVP) をベースとする消毒剤・ポビドンヨード (イソジン) がある。古くは代用血漿 (プラズマエキスパンダー) として第二次大戦中に PVP やポリエチレングリコール (PEG) が用いられ、それらが優れた生体親和性を有することは広く知られている。筆者は1970年代より制癌剤ネオカルチノスタチン (NCS) に合成ポリマー (styrene-maleic acid copolymer, SMA) を結合させた高分子型制癌剤 (SMANCS) を世界で初めて合成した。このものはアルブミンと結合し、みかけ上の分子量約8万で、もとの NCS とは全く異なり、はるかに有用な薬剤となった。即ち、高分子の血中半減期は20倍も延長し、とくに腫瘍部や炎症部には正常組織の5~10倍も集積し、まさに腫瘍に対しミサイル攻撃が可能となった。また、この高分子結合体は高い脂溶性が付与されたことから、油性造影剤 Lipiodol にとかした動注用油性製剤が可能となった。即ち、SMANCS/Lipiodol は造影能があるため、腫瘍部のみが濃染し (血中の2000倍)、本薬剤の腫瘍選択物なデリバリーにより、造影 (診断) と治療が同時に可能となった。次にこれら高分子が正常組織内に分布集積した場合は、リンパ系を介してゆるやかに回収されるが、腫瘍部からの回収は極めて遅く、一回の投与で腫瘍局所に長時間にわたり薬効を発揮する。一般に高分子薬剤の要件は、中性~酸性の水溶性で MW 5万以上である。4万以下では主として尿 (疎水性が高いものは胆汁中) から急速に排出される。ある種の高分子は皮膚への集積が、癌や炎症部に次いで高いことがある。分子量3万を5万に改変した PEG-インタフェロン α (イントロン[®]) の場合、血中 $t_{1/2}$ が8時間から80時間となり、毎日~隔日の注射が、週1回となり、薬効ははるかに高められた。SMANCS では1~3ヵ月に1回の投与で顕著な抗癌効果を達成した。これら SMANCS およびイントロンの例では何れも薬効はもちろん患者に対するコンプライアンスが格段に向上し、副作用は低減し、優れた薬剤となることがわかってきた。

微小循環の生理機能の効果的発現と
赤血球のレオロジー特性

前田信治

愛媛大学医学部生理学第二講座

血液の重要な生理機能は組織への酸素の輸送である。この過程は組織への効果的な血液の循環と血液から組織への酸素の拡散によって成り立つ。この両者に影響を及ぼすのが微小血管網での赤血球の流動挙動である。

組織への循環血液量は、ポアズイユの法則を適用すれば、血圧、血管運動、血液の粘度の兼ね合いで決まる。血液の粘度は、赤血球量、血漿粘度、赤血球の変形と集合によって決まるが、これらは独立に取り扱えるものではなく、相互に関連している。酸素運搬体としての赤血球量を増やすと、血液の粘度が増すので血流量が減少する。同じ赤血球量でも、赤血球自身の流動特性が変化して血液の粘度が上昇すると、血流量が減少する。酸化的ストレスを受けた赤血球は硬くなって流動抵抗を増す。高分子血漿タンパク質が増量すると、血漿粘度を増すだけでなく、赤血球集合が促進されて流動抵抗が増大する。赤血球のレオロジー特性が微小血管内の赤血球の流動挙動を介して循環抵抗に及ぼす影響は大きい。

組織は、細動脈、毛細血管、細静脈領域で起こる複雑な酸素の拡散移動によって酸素化される。ある分圧差で酸素が拡散するとき、その過程を支配するのは拡散距離と拡散面積である。赤血球の形態は、内部のどの部位からも最短の拡散距離を保ち、その容積に対する拡散表面積を最大にしている。物理的外力による赤血球の変形は内部の攪拌を通してこの過程を促進する。この効果は赤血球が毛細血管を通過するとき最大限に発揮される。赤血球内のヘモグロビンから解離した酸素が血管外に拡散するとき、微小血管内では赤血球の流動挙動がこの過程に大きな影響を及ぼす。赤血球の物理的応力に対する変形能が低下すると、赤血球内部での拡散が障害される。赤血球が集合体を形成すれば、集合体内部からの拡散距離が延長するだけでなく、集合体の容積に対する表面積が減少するので拡散効率が悪くなる。

赤血球の流動挙動を通して得られた結果にもとづいて、流体力学的視点から、血液代替物のあるべき物性について考えてみたい。

「人工血小板の開発の現状と将来展望」

池田康夫

慶應義塾大学医学部内科

血小板は、止血機構において中心的役割をなしており、種々の原因で起こる血小板減少症では、時に致死的な出血合併症がみられる。一方、血小板は血管内を閉塞し、重大な臓器障害をもたらす閉塞性病的血栓形成においても重要な役割を演じている事が最近明らかにされている。

血小板輸血は、血小板減少による出血の予防・治療に欠くことの出来ない補助治療法であるが、他の血液製剤と同様、輸血後ウィルス感染症をはじめとする副作用の危険性を有している。人工血小板の開発・臨床応用は21世紀の医療の当然目指すべき方向ではあるが、精緻に調節されている血小板機能を再現する人工物を創製することは容易ではない。

事実、これまで人工血小板の開発に体系的に取り組んだ研究を我々は知らない。人工血小板の条件としては、それ自身が止血機能を有する事は勿論の事、体内に残存する血小板の止血機能を増強出来ることである。流血中で血栓形成を促進させる事が決して無いこともまた重要な条件である。また、長期保存が可能で反復投与によっても副作用を生じない事も必要である。

これまで、海外ではリボソーム、アルブミンマイクロスフェア又は赤血球表面にフィブリノゲンまたはRGDペプチドを固相化した血小板代替物が作られ、それらを血小板減少動物に投与すると、出血量の減少、出血時間の短縮がみられるという。しかし、残念ながらこれらの研究は臨床試験への応用に必ずしも繋がっていない。我が国では平成9年より開始された厚生労働省高度先端医療研究事業人工血小板開発研究班を中心に研究が展開されている。開発方針は、血管傷害部位に特異的に集積すると共にそれ自身、または残存血小板と凝集塊を形成し得る生体適合性に優れた人工粒子を作成する事である。

現在までにリボソーム、アルブミン重合体を人工担体として、これに von Willebrand 因子(vWF)受容体である血小板膜糖蛋白 GPIb α 、コラゲン受容体である GPIIb/IIIa 複合体 ($\alpha_2\beta_1$ インテグリン)を組み換え体として作成し、それぞれを担体に固相化したもの、更にこれに加えてフィブリノゲンまたは dodeca peptide を固相化したものを作成し、それぞれの担体について in vitro、in vivo の機能評価を行っているところである。

人工血小板の開発研究は緒についたばかりであるが、海外に先んじた方向性を持って研究が展開されており、止血機構に関する分子レベルでの基礎研究の成果をふまえて更に進展してゆくことが期待されている。

はじめに：血清アルブミンと α 1-酸性糖蛋白質の新たな機能を求めて

小田切優樹
熊本大学薬学部

本シンポジウムで取り上げる血清アルブミンと α 1-酸性糖蛋白質は、薬物の輸送蛋白質として知られ、その構造や機能が長年研究されてきた。特に、血清アルブミンの研究はX線結晶構造解析と相まって、遺伝子工学の進展も目覚ましいものがある。事実、二、三年後には組換えアルブミンが上市されるかもしれない。この蛋白質は、そのマルチな機能を反映して医薬品のみならず、ドラッグデリバリーキャリアとしても大いに注目されている。一方、183個のアミノ酸と5本のN-結合型糖鎖からなる α 1-酸性糖蛋白質は、血清アルブミンと異なり、その構造特性も十分に解明されておらず、また多様な機能を有していると言われているものの、その生理作用は十分に明らかにされていない。

そこで本シンポジウムでは、まず、丸山徹博士（熊本大・薬）に α 1-酸性糖蛋白質の体内挙動と生物活性について、血清アルブミンと比較しながら、この蛋白質研究の新たな展開について発表して頂く。次いで、武岡真司博士（早稲田大・理工）には、血小板機能を有するミミックをアルブミン二量体に包含させた複合体について、アルブミンの構造と関連づけて、その応用と限界について話題を提供して頂く。最後に、Dr. Meijer (Groningen Univ.)には、細胞標的指向性を有するアルブミン修飾体の現状と将来について講演を頂く予定である。

長年、私達がその構造と機能に慣れ親しんできた血清アルブミンと α 1-酸性糖蛋白質について、本シンポジウムでの客観的再評価の試みが、未知の新たな機能探索の機会になればと願う次第である。

α 1-酸性糖蛋白質の体内挙動と生物活性

丸山徹¹，松元一明¹，小田切優樹¹，
徳富芳子²，西勝英²
¹熊本大学薬学部，²熊本大学医学部

血清蛋白質の一つ、 α 1-酸性糖蛋白質（AGP）は内因性物質や塩基性薬物との結合能を持つcarrier proteinとしてのみならず、炎症、感染症、癌、などの際に増加する急性期反応物質として、生体防御において重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、その体内挙動及び生物活性については未だ十分に明らかにされていない。

そこで今回、AGPの体内動態や生物活性について、最近、我々の研究室で得られた知見を中心に述べる。まず、AGP及び脱糖化AGPの体内動態について検討した。未処理AGP、糖鎖末端のシアル酸を除去したasialo-AGP、さらにガラクトースを除去したagalacto-AGPをIn-111で標識し、マウスにおける体内挙動を検討したところ、その半減期はAGP > agalacto-AGP > asialo-AGPの順に短縮された。また、濃度依存性の検討結果より、AGPは肝臓のレセプターを介して効率的に取り込まれることが示唆された。次に、AGPの生物活性を調べた。AGPは赤血球の通過時間を短縮し、通過後の溶血も抑制し、さらに、低張溶液によって誘導された溶血を抑制した。また、H₂O₂及び2, 2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochlorideによって惹起される酸化溶血を抑制した。さらに、血管に対するAGPの効果を検討した結果、マウス大動脈をphenylephrineによって収縮させた後、AGPを添加すると弛緩した。一方、AGPの血中濃度が増加する炎症時におけるAGPの及ぼす影響について、ラットcarrageenan足蹠浮腫法を用いて検討した結果、血管透過性を抑制することが判明した。

以上、AGPは生体内で糖鎖を認識するレセプターを介して組織に取り込まれて挙動すること、また、種々の生理作用を発揮して生体内の恒常性維持に関与することが示唆された。

血小板代替物としての認識蛋白質結合アルブミン重合体

武岡 真司¹、土田 英俊¹、池田 康夫²

¹早稲田大学理工学総合研究センター

²慶応義塾大学医学部血液内科

【緒言】出血部位を認識する血小板膜糖蛋白質の一部やフィブリノーゲン (fbg) をアルブミン重合 (polyAlb) に結合させ、血小板代替物としての機能評価を進めている^{1,2)}。本研究では、アルブミン重合体の構造、物性を明らかにすると共に、コラーゲンやフォンビルブランド因子 (vwf)、あるいは活性化血小板に認識蛋白質を結合させ、流動下にて認識機能を解析し、血小板代替物としての可能性を評価する。

【実験】pHと温度の制御によりヒト血清アルブミン溶液から、分子内のチオールやジスルフィド基を分子間ジスルフィド結合に変換させて任意の粒子径の polyAlb を調製、架橋剤 SPDP を用いてアルブミン重合体に rGPIb α 、rGPIaIIa、Fbg をジスルフィド結合させた。

【結果・考察】アルブミン重合体は数百 nm から数 μ m に大きさを制御可能な無定形物であった。流動下にて rGPIaIIa-、rGPIb α -polyAlb はコラーゲンあるいは vwf 基板を認識後、直ちに粘着した。また、低ずり速度での rGPIaIIa-polyAlb の粘着、高ずり速度での優先的な rGPIb-polyAlb の粘着が観測された fbg-polyAlb では基板上に固定化された活性化血小板表面に発現された GPIIb/IIIa を認識した粘着が観測され、更にこれが流動血小板の粘着を誘導した。

1) Takeoka *et al.*, *Biomacromolecules*, **1**, 290-295 (2000), 2) *ibid.*, **2**, 1192-1197 (2001).

The use of modified albumins as versatile carriers for cell-specific drug delivery

D.K.F. MEIJER, K. POELSTRA

University Centre of Pharmacy, Groningen

University, the Netherlands

Albumin is in the major drug-binding plasma protein in various species, including humans. Several binding sites are present on the albumin molecule for non-covalent binding of multiple classes of drugs and endogenous compounds. However, the albumin backbone can also be used for covalent coupling of drugs for selective delivery to cell-types that are involved in initiating and maintaining disease. In order to obtain specificity for certain organs/tissues, albumin can be chemically modified by changing the net charge as well as substitution with various sugars or oligopeptides. We and others demonstrated that in this manner, selective delivery to various diseased organs can be achieved. Within the liver cell-specific targeting to hepatocytes, endothelial cells, macrophages and stellate cells was demonstrated. Disease-induced changes in receptor expression are the basis for this cell-selectivity. The particular albumin carriers are now used for targeting of appropriate drugs to inflammatory and fibrotic tissues. Apart from serving as drug carriers, modified albumins may exhibit intrinsic therapeutic properties by blocking of target receptors, enabling dual targeting with synergistic effects of the carrier and the targeted drug.

Reference: G. Molema and D.K.F. Meijer (editors), *Drug Targeting. Organ specific Strategies*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim (FRG), volume 12, 2001
ISBN 3-527-29989-0.

ヒト免疫系の再構築と抗体産生

垣生園子¹、齋藤雄紀^{1,2}、松村拓也³、亀谷美恵¹¹東海大学医学部免疫学教室、²東海大学医学部
乳腺・内分泌外科、³防衛大学医学部第3内科

「緒言」現存するヒト・キメラ抗体やヒト抗体遺伝子をもつマウス産生抗体では、マウスアミノ酸配列やマウス型糖鎖を含むので、臨床応用するためには、有効性や安全性の面から問題が残っている。この課題解消のためには、ヒトB細胞由来の抗体を獲得することが望ましい。そこで、我々はヒト免疫系を免疫不全マウス内にて再構成する系を確立し、それらマウスを免疫することによってヒトB細胞による抗体産生を試みている。

「成果」TおよびB細胞欠損マウス(NOD-SCID)をレシピエントとして、ヒト臍帯血由来の造血幹細胞(CD34+細胞)を移植すると、末梢血中および骨髓中にヒト由来B細胞が種々の割合で出現し、ヒト由来IgM抗体も血清中に検出された。しかし、T細胞は殆ど認められなかった。すなわち、NOD-SCIDマウスにCD34+細胞を移植したのみでは、ヒトT細胞の分化誘導が不十分であり、T細胞依存性抗原に対するIgG抗体の産生は期待されないことが判明した。そこで、マウス内でヒトT細胞を分化誘導する系の開発を、*ex vivo*系および*in vivo*系で進めた。その結果、機能的に成熟したヒトT細胞をマウス胸腺環境にて分化誘導することにはじめて成功した。一方、マウス生体内で分化したB細胞を詳細に解析すると、CD5陽性のいわゆるマウスB1細胞に相当するB細胞が多数を占めていた。B1細胞はT細胞非依存性にIgMアイソタイプ自然抗体を産生するといわれている。以上のようなヒト免疫細胞が分化した免疫不全マウスを免疫すると、予想されたようにT細胞が存在していても産生された抗原特異的抗体は殆どがIgMクラスであった。以上の結果、ヒトB細胞によって産生される抗体がIgMに偏る原因の1つは、B細胞の分化自体の異常にも依存することを明らかにした。

C型肝炎ウイルスエンベロープ蛋白に対する
ヒト型抗体の開発

松浦善治

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3 番 1 号

大阪大学微生物病研究所

エマージング感染症研究センター

輸血ならびに血液製剤は近代医療に不可欠なものである反面、患者は常に感染症や免疫反応等の問題に襲われる事になる。この様な感染症の典型がC型肝炎ウイルス(HCV)の感染であったが、高感度なスクリーニング系の導入により、輸血や血液製剤に起因したHCV感染はほぼ制圧された。しかしながら、既に全世界で1億7千万、そして本邦だけでも2百万ものHCVキャリアーが存在すると推定され、HCV感染と肝臓発症の相関が血清疫学的に証明されている。さらに、現時点でHCVを効率よく増殖できる培養細胞系や感受性を示す実験動物もチンパンジー以外には見つかっておらず、ワクチンや治療薬の開発は困難を極めている。また、現行のインターフェロン療法も2-3割しか著効を示さず、副作用も大きな問題となっている。この様にHCVは今や我が国の国民病であり、キャリアーの発症予防やウイルスの生体からの排除を目的とした抗ウイルス剤や治療用ワクチンの開発が急務である。

慢性C型肝炎から自然治癒した症例では、HCVのエンベロープ蛋白(E2蛋白)がヒト細胞表面のCD81に結合するのを阻止する抗体(NOB抗体)が高率に検出されることから、HCVの生体からの排除にNOB抗体が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。しかしながら、この様な単純な結合アッセイではウイルスがリセプターに結合後、細胞膜と融合しウイルス核殻が細胞内へ侵入する複雑な感染過程を解析することはできない。そこで、細胞培養系のないHCVの感染機構を詳細に解析するため、HCVのエンベロープ蛋白による細胞融合アッセイ法、ならびにHCVのエンベロープ蛋白を被ったシェードタイプウイルスを作製した。その結果、HCVのエンベロープ蛋白(E1およびE2)が細胞表面の蛋白リセプターと結合し、エンドサイトーシスによって細胞内へ侵入することが明らかとなった。HCVリセプターとしてはCD81単独では活性を示さず、他の補助因子を必要とするのか、あるいは全く別のリセプターの存在が示唆された。

この様なアッセイ系で中和活性を示す抗HCVヒト型抗体を構築できれば、有効な治療法のない慢性C型肝炎に対する新しい治療薬としての可能性も十分に期待できると思われる。そこで、HCVの侵入過程を阻害する活性を持ったヒト抗体を慢性C型肝炎の自然治癒例からファージディスプレイ法を用いて、あるいは、ヒト型抗体を産生できるトランスジェニックマウス(ゲノマウス)をHCVの融合エンベロープ蛋白で免疫して作製した。その結果、細胞融合活性を中和できる抗E1抗体4クローンと、抗E2抗体2クローンを得ることができた。今後、これらヒト型抗体のウイルス排除活性を*in vivo*で検討する予定である。さらに、動物実験で中和活性が証明されれば、これらの中和抗体をブロープとして慢性C型肝炎に対する新しい治療用ワクチンの開発も可能になると思われる。また、これまでHCVをターゲットとして開発してきたウイルスの感染機構の解析システムは、今後人類が遭遇するであろう、培養できないエマージングウイルス感染症の抑制にも重要な示唆をあたえてくれるものと思われる。

シンポジウム(Ⅰ)－3

抗ガングリオシド抗体および抗 VEGF 受容体抗体の抗腫瘍効果とそのメカニズム

太田 聡

協和発酵工業株式会社・東京研究所

最近の抗体工学の進歩により生み出されたキメラ抗体やヒト化抗体は、従来の抗体療法の欠点であった抗原性の問題を克服することにより、血中での長期安定性と頻回投与を可能にし、多くの臨床試験においてその有効性が実証されている。現在開発が進んでいる抗体療法のターゲット分子は、1) 癌細胞表面に多数発現しているが、癌細胞の増殖や進展に直接関与しない分子、2) 癌細胞の増殖や進展に直接関与する分子、の大きく2つに分類することができる。我々は、1) のカテゴリーではガングリオシド GM2 や GD3、2) のカテゴリーでは血管新生因子 VEGF 受容体に着目して研究を進めている。

従来ガングリオシド GM2 は、神経芽細胞腫、グリオーマ、小細胞肺癌等の神経外胚葉系由来腫瘍に発現することが報告されてきた。我々は GM2 に対するキメラ抗体、ヒト化抗体を作製し検討したところ、小細胞肺癌細胞ばかりでなく、非小細胞肺癌細胞にも高発現していることを見出した。抗 GM2 キメラ抗体、ヒト化抗体は、GM2 発現ヒト小細胞肺癌に対しヌードマウス皮下移植系での抗腫瘍効果、SCID マウス系での転移抑制効果を示した。抗 GM2 抗体は強い補体依存性細胞障害活性 (CDC)、抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) を示すことから、これらが抗腫瘍効果の主要メカニズムと考えられた。さらにスフェロイドを用いた実験により、抗 GM2 抗体は GM2 陽性癌細胞をアポトーシス誘導する新たな活性を有することを確認した。

癌の増殖、転移形成は血管新生依存的であり、血管新生阻害剤は新しいタイプの抗腫瘍剤として注目されている。血管新生阻害効果を持つ抗体を評価するため、我々は腫瘍血管新生に深く関与している 2 種類の VEGF 受容体 KDR と Flt-1 に対する中和 mAb を確立した。ヒト血管内皮細胞を用いた検討で、KDR 中和 mAb は血管内皮細胞の増殖を抑制するのに対し、Flt-1 中和 mAb は血管内皮細胞の遊走を阻害した。血管内皮細胞の増殖および遊走はともに腫瘍血管新生の重要なステップであることから、KDR 及び Flt-1 中和 mAb は腫瘍血管新生阻害効果が期待される。

シンポジウム(Ⅰ)－4

各種ウイルスに対するヒト中和抗体の開発状況

黒澤良和

藤田保健衛生大学総合医科学研究所

数 10 名分に相当する各種ヒト手術除去器官を出発材料としてファージディスプレイ系を用いて作製した抗体ライブラリー (AIMS と命名、1,000 億個の独立したクローンからなる) に含まれる抗体のレパートリーは、二重の構成をしている。インフルエンザウイルスのように、多くの人が頻繁に感染している対象に対しては、非常に強い中和活性を示す成熟抗体が数多く含まれる (大阪公衆衛生研究所・奥野博士との共同研究)。インフルエンザウイルスは、中和抗体の標的であるヘマグルチニン (HA) のアミノ酸配列を年々変動 (antigen-drift) させながら、抗体による攻撃からエスケープしつつヒト集団の中で流行を繰り返している。中和抗体存在下でウイルスを培養することによりエスケープミュータントを単離して、ヒト集団で起こるプロセスを試験管内で再現することが可能になった。水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) の場合も、精製した gH タンパクを抗原として用いることにより、数種の強い中和活性を示す抗体が単離された (富山医科薬科大学・白木教授との共同研究)。本研究プロジェクトは、各疾患に対して抗原を用いて AIMS ライブラリーをスクリーニングし、単離されたファージ抗体の中和活性を測定した後、ヒト IgG 型抗体に変換して調製するまでを第一段階の目標達成と考えている。上記 2 種の疾患とは別に、B 型肝炎ウイルスの例では、強い中和活性を示す抗体を有するヒトもいるが、AIMS ライブラリー中には必ずしもそのような抗体が含まれる訳ではない。AIMS ライブラリーにとってはナীব抗原と考えられる対象の場合である。そのような例では、AIMS ライブラリーの使用とは別に、強い中和活性を示す抗体を有するヒトの協力を得て、効率的にその抗体をクローン化する技術開発を進めている。本シンポジウムでは我々のヒト抗体技術の到達段階を発表し、議論する。

鈴木和男

国立感染症研究所・生物活性物質部

難病疾患としてあらわれる血管炎やリウマチなどの自己免疫疾患が増加している。これらの疾患は、好中球など炎症性細胞の活性化により慢性化、重篤化へと進展し、しばしば腎不全、脳出血、肺出血などで生命予後を脅かすことが多々ある。その治療は現在、ステロイドパルスなど免疫抑制療法が主流であり、高齢者が多い本疾患患者においては、本治療による予後を悪くする場合もあり、新たな治療法の開発が強く望まれている。最近、ヨーロッパでは、血管炎へのガンマグロブリン製剤治療 (IVIG) が好成績を得ている。その導入要因として、ANCA(anti-neutrophil cytoplasmic antibody)関連血管炎の対応抗原が明らかにされ、IVIG と MPO(myeloperoxidase)-ANCA 抗体との関連を解明する手がかりが得られてきていることも背景にある。とりわけ、MPO-ANCA 関連血管炎は、欧米より日本で発症率が多いことから、日本でのその治療成績に注目が集まっていた。川崎病ですでに IVIG の大量療法が功を奏しているが、血管炎への応用は、血液製剤であることや高価であるなどの理由から進展しない状況であった。そこで、われわれの研究グループでは重篤な老年者の血管炎患者に IVIG を施行し、有意な血管炎の改善と免疫抑制剤投与量の減少による感染症の発症抑制が可能となることを報告した。これらの良好な治療成績は、世界的にも先駆的な成果として国際会議で評価された。一方、血管炎の病因に関する研究から、本疾患の病因性エпитープを解析し、主として MPO の H 鎖の N および C 末端に単独で反応するエпитープをもつ MPO-ANCA 抗体が重症化と関連し、病態と関連することから、MPO-ANCA のクロナリティーは、血管炎病態と関連があることが示唆された (Tomizawa et al., J. Clin. Immunol, 1999; Fujii et al, Clin Neph, 2000)。ところで、治療法開発や病因解析には、モデルマウスを用いた原因究明や治療法の研究が不可欠であり、SCG/Kj、IRF-8/ICSBP マウスおよび *Candida albicans* 由来物質誘発の冠状動脈炎マウスを用いた評価系を確立した。MPO-ANCA 関連血管炎の IVIG 治療法に的をしばり、供給源やリスクの問題を解決する大量・安定供給が可能な人工ガンマグロブリン開発をめざしてきた。すでに、病態と関連する MPO 立体構造の利用やわれわれのグループで作製した MPO 欠損マウス (Aratani et al., 1999, & 2000) を用いて、マウス MPO 特異的抗体産生ハイブリドーマを作製するとともに、MPO 抗体遺伝子を利用する系を構築している。尚、本研究は、新井孝夫 (東京理科大・理工)、佐々木次雄 (国立感染症研)、田之倉優 (東大・院農)、大野尚仁 (東薬大・薬)、武曾恵理 (北野病院)、高橋啓 (東邦大・医)、岡崎富男 (広島市民病院) の各研究者および多数の協力研究者により行われた成果である。

井原征治、竹腰正隆

(東海大学医学部分子生命科学2)

【緒言】現在世界で認可され販売されている抗体医薬は、全ての製品がキメラ抗体かヒト化抗体でマウスの配列を含むが、次世代の抗体医薬として完全ヒト配列からなる抗体 (人工ヒト抗体) の作製も追求されており、最近人工ヒト抗体で認可申請を行ったものが出現するに至っている。作製は、ヒト血液を材料にして目的抗体遺伝子をクローニングする方法、ヒト染色体を持ち免疫でヒト抗体を作るマウスの利用等いくつかの方法がある。我々は、ヒト血液を材料にして、B 型肝炎ウイルス (HBV) およびヒトサイトメガロウイルス (HCMV) を中和するヒト抗体の作製に取り組んできた。

【方法】抗体価の高いヒトから抹消血の提供を受け B 細胞に EBV を感染してトランスフォームした後、約一ヶ月の期間細胞をトランスファーすることなく培養を続けたところ、多数のクローンが収束し、安定したモノクローン、あるいはオリゴクローンからなる細胞群を得た。細胞から RNA を抽出し、ヒト抗体用プライマーを使って RT-PCR で Fab 領域を増幅し、抗体ライブラリーを作った。ライブラリーから直接スクリーニングを行うか、あるいはファージディスプレイ法でパニングを経てからスクリーニングを行った。なお、発現ベクターとプライマーは我々が独自に作製したものを使用している。

【結果】HBV 表面抗原 (HBs) に対する抗体価の高いヒトの B 細胞を EBV でトランスフォームし、抗 HBs 抗体産生モノクローン細胞、およびオリゴクローン細胞を樹立した。このうちの 1 株はチンパンジーを使った HBV 感染実験で予防効果が認められた。大量生産を意図し、ヒト抗体用プライマーで抗体遺伝子を増幅後クローニングして、Fab 抗体を大腸菌で発現させた。精製した Fab 抗体は HBs に対して高い親和性を示した。大量培養と精製法も確立し、ヒトへの応用も視野に入れている。

HCMV では、エンヴェロップ蛋白質の gB と gH に中和エпитープが存在するが、抗 gB、抗 gH 抗体の分離も行っている。この試みも紹介する。

臨床応用可能な人工赤血球の創製に関する研究

土田 英俊

早稲田大学 理工学総合研究センター

臨床応用可能な赤血球代替物の研究は、この20年間で具体的対象物についての物性と動的機能の相関が詳しく解明できるようになってきた。型物質や感染源を全く含まない／浸透圧や粘度などの溶液物性が血液と同等に調節可能／毒性が極めて低く、ヒト血液換算で2-3 lit.投与の場合でも安全かつ代謝可能／長期保存(室温, 2年間)と安価供給が可能／前臨床試験に続いて臨床試験の準備中、にあるのが現状である。

高純度濃厚ヒトHbをリン脂質二分子膜被覆のvesicle (HbV, dia. 250 nm ϕ)分散溶液は、容易に諸物性値を血液と相同に調節できる。粒子表面のポリオキシエチレン修飾状態と分散安定度との相関から、安定度高く室温棚置き2年以上が可能。投与試験による体内動態、細網内皮系(肝・脾・骨髄)での代謝過程、血液生化学の諸数値、凝固系への影響を調べる実験の実施が進行中。また、微小循環動態観測では、血管収縮が無く血流維持と組織酸素化が確認されている。

ヘモグロビン蛋白質を利用しない、安全度の高いアルブミン-ヘム(アルブミン-リポドヘム複合体)の利用は、有望視されている。アルブミンオリゴマーの利用は、膠質浸透圧調節が容易、Hbと同様のNO配位特性を有するにも拘らず、等電点が低い(pI: 4.8)ため血管壁への接近度と透過係数が極めて低く(Hbに比較して1/100)、血管収縮や血圧亢進などの現象は生起しない。ヘム誘導体の化学構造を工夫すれば、電子移動を抑制して酸素化錯体の寿命延長が実現する。現在、投与後の体内分布や代謝過程など、安全度の詳細確認の作業を進め、目的物質の絞り込みを行っている。

ヘモグロビン小胞体と血液成分の相互作用

池田久賀

北海道赤十字血液センター

ヒト血液はその血球成分、血漿成分とも、複雑な制御のもと止血、生体機能維持、生体防御などの重要な役割を担っている。人工酸素運搬体、すなわちヘモグロビン小胞体、を人体に安全に投与するためには、それら諸機能に及ぼす影響を把握する必要がある。

出血に際し速やかに血小板系、凝固系が止血に働き始める。まず最初に出血部位への血小板の付着と凝集により止血が行われる。そこで HbV が血小板機能に及ぼす影響を検討した。HbV は、resting 状態での濃染顆粒からのセロトニン放出、 α 顆粒からの RANTES 放出、血小板表面への P-セレクチン発現に影響を及ぼさなかった。またアゴニスト刺激によるそれらの反応を抑制、促進することもなかった。活性化早期の血小板マーカーである PAC-1 発現は、resting 状態では HbV の影響を受けなかったが、ADP 刺激においてコントロールに比べ上昇し、PAC-1 を指標にすると HbV は早期の血小板活性化を増強すると考えられた。血小板付着後には血漿タンパク質の一連の反応により凝固が起こる。外因系および内因系凝固において、HbV 添加によると考えられる凝固時間の短縮、遅延は認められなかった。内因系凝固ではカリクレイン-キニン系も関与する。HbV との反応において高分子キニノーゲンは切断されず、カリクレイン-キニン系の活性化は起こらないと考えられた。

生体防御機構の一つとして補体系は、HbV との反応により活性化され、血清中 SC5b-9 レベルの上昇が観察された。このとき古典経路、第二経路とも関与することが分かった。また血漿においても SC5b-9 レベルの上昇が認められた。しかし、活性化の程度は低く、HbV との反応後も十分な補体価(CH50)と *Yersinia enterocolitica* に対する溶菌活性を保持していることが確認された。

生体防御に働く細胞である白血球と HbV との相互作用については現在検討中であるが、少なくとも好中球に対する活性化作用はみられないようである。

以上のように、in vitro の検討ではヒト血液との相互作用は比較的少なく、HbV は生体適合性に優れていると思われる。

ショック病態における細胞型・非細胞型 Hb 投与による網内系機能変動の解析

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

リポソーム封入型ヘモグロビンに代表される細胞型酸素運搬体の出血性ショック蘇生効果が検討されているが、運搬体の代謝の主要なコンパートメントとなる網内系機能の変動を無細胞型酸素運搬体と *in vivo* で比較した成績は少ない¹⁾。演者らはラット肝臓微小循環のショックモデルにおける生体ビデオ顕微鏡学的解析により、類洞管径、functional capillary density (FCD)、Kupffer 細胞 (KC) 機能の変動を解析した。Wigger's hemorrhagic shock protocol により 15 分間ショック状態 (肝臓を惹起させ、再灌流時に、脱血自己血、生理食塩水、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) のいずれかを投与して各パラメータの変動を 60 分間追跡した。各群の Hb 投与濃度は 10g/dl で一致させた。実験終了後に Nile red-coated latex beads を投与し、傍門脈域における蛍光強度変化を数値化して網内系機能の指標とした。この結果、NO、CO をともに捕捉できる Hb 投与により類洞狭小化、FCD の低下、KC 活性化が認められたが、NO のみを捕捉する metHb 投与ではこれらのいずれの変化も認めなかった。また HbV では投与直後に KC への取り込みと細胞膨化に伴う一過性の類洞狭小化が認められたが、60 分の時点では KC 活性化を認めたものの、FCD の低下や類洞狭小化など Hb で認められたような変化を認めなかった。以上のことから肝臓微小循環の Disse 腔周辺の CO 濃度が低下することによりなんらかの機序により KC の活性化が惹起されること、無細胞型のヘモグロビン修飾体に、細胞型と同等かそれ以上の網内系活性化作用がある可能性が示唆された。

人工酸素運搬体の投与試験による機能と安全度の評価

小林 紘一

慶應義塾大学 医学部 外科

血液型に関係なく使用でき、保存も容易でウィルス感染などのおそれのない、赤血球の酸素運搬機能を代替できる物質系が創製されると、現行医療技術の著しい変革と向上が期待される。人工酸素運搬体の評価には、安全性と効果および副作用の面からの検討が必要となる。

これまでにを行ったラットや犬を用いた交換輸血試験や出血ショックモデル蘇生試験から、ヘモグロビン小胞体などの人工酸素運搬体が赤血球と同等の酸素輸送機能を有することが確認されている。また、微小循環動態の観測、組織病理学的検討、血液生化学検査結果の詳細から、臓器の機能には不可逆な影響を及ぼさないこと、更にヘモグロビン小胞体は最終的に細網内皮系に捕捉された後、速やかに代謝されることから、安全性も高いことが確認できた。従って、人工酸素運搬体の第一の適応である出血性ショック、体外循環の補填液、臓器灌流液などに赤血球代替物として十分に利用できると考えられる。

他方、Oxygen Therapeutics としての利用も期待される。例えば、急性肺傷害において人工酸素運搬体を介して液相-液相間でガス交換を行う液体換気を利用することができる。また、低酸素状態にある腫瘍組織にアルブミンヘムなど粒子径の小さい人工酸素運搬体を到達させて組織酸素分圧を向上させ放射線治療の感受性を高めることにより、腫瘍選択的で効果的な照射を可能とする、など新しい適応が開発されつつある。

臨床応用を目的とした人工赤血球の開発

佐久間一郎¹、仲井邦彦²、福島昭二³、富樫廣子¹
菅原 武¹、藤井 聡¹、並河和彦⁴、小田切優樹⁵
藤堂 省¹、劔物 修¹、吉岡充弘¹、北畠 顕¹
¹北海道大学大学院医学研究科、²東北大学大学院
医学系研究科、³神戸学院大学薬学部、⁴麻布大学
獣医学部、⁵熊本大学薬学部

人工赤血球の中で、ヘモグロビン(Hb)修飾体はヘムが一酸化窒素(NO)を失活させ、血管収縮・血小板凝集を惹起する問題がある。われわれは Hb β 鎖の SH 基に NO を結合させた S-ニトロソ Hb(SNO-Hb)を素材とした人工赤血球の実用化をめざして研究を進め、臨床適合性向上および分子サイズ増加を企図してポリエチレングリコール修飾体(SNO-PEG-Hb)を作製した。SNO-PEG-Hb は脳へ酸素を供与でき、イヌ虚血心モデルでは心筋代謝を著明に改善させ、一方ラットの急性毒性試験で肝腎毒性が低いことを確認した。現在イヌのバベシア感染による寄生虫性急性貧血に対する SNO-PEG-Hb の有効性確認実験を行い、さらに両側総頸動脈 10 分間閉塞による 2VO モデルを用いた脳虚血-再開通障害治療への応用の可能性をラットを用いて検討している。特に後者では、急性投与および亜急性投与においても、LTP 形成不全ならび短期記憶学習障害改善を示す成績が得られている。

また、われわれは新規パーフルオロカーボン(PFC)製剤創製をめざし、最新式乳化機を用いて PFC 用エマルジョンの改良を開始し、粒子として安定でありスゲル性を兼ね備えた新規エマルジョン数種を創製した。現在までその臨床への応用を企図し、小児心臓手術をシミュレートしたイヌ人工心肺モデル実験、ラット移植臓器保護実験、ラットによる急性毒性試験、さらにハムスターを用いた移植心臓保護実験を行っている。また、PFC 製剤を保護液へ添加する際にはアルブミン等の分子の併存が重要と考えられることから、アルブミンおよび α 1 酸性糖タンパクと PFC 製剤との相互作用を検討した。

このように現在開発中の SNO-PEG-Hb および新規 PFC 製剤には、一定の臨床病態において有用な場合があることが示された。今後両剤に対してさらなる毒性試験・前臨床試験が行われ、さらに医療経済学的検討を経て、輸血用途のみに因われず人工赤血球の実用化プロセスが前進するよう期待される。

ナノバイオマシンとしての血液代替物

西谷孝子
富士レバイオ(株)、先端研究部

バイオナノテクノロジーの医療関連分野で、実用化が期待されているナノバイオマシンの一つに“指向性を持つ輸送担体による Drug Delivery System (DDS)”が挙げられている。現在、抗癌剤に対する DDS の開発では、固形癌の組織の血管が高分子などのナノサイズのことを透過させること、さらに、癌組織からの排出を担うリンパ管が欠如しているか著しく減退しているために、ナノサイズの粒子が固形癌に選択的に集積すること(EPR 効果)を利用した研究が進められている。一方、癌細胞の浸潤性に関わる細胞外マトリックス溶解酵素系である uPA (urokinase-type plasminogen activator) や uPAR (uPA Receptor)、癌細胞やその血管内皮細胞に発現するインテグリンなどをターゲットとした癌治療を、従来の抗癌剤による化学療法や放射線治療と併用する試みも検討されている。uPA/uPAR やインテグリンに対して志向性を持つナノマシンの開発研究において、現在我々は、1) レセプター蛋白に対して高い親和性を持つ機能性ペプチドの設計、合成、2) 原子間力顕微鏡などを用いたレセプターと合成ペプチドとの間の分子間力測定によるペプチドのスクリーニング、3) 合成ペプチドのナノ粒子への固定化、を進めている。

私は、過去4年半にわたり、血管障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糖蛋白(rGPIa/IIa, rGPIb α)、又は、フィブリノゲン(Fgn)を固定化したりリポソームを創り、それらの血小板代替物としての機能評価を行ってきた。rGPIa/IIa-Ib α -liposomes は、血小板と同様に、VWF 存在下、高ずり条件下で効率良くコラーゲン表面に粘着し、Fgn-liposomes は、コラーゲン表面上で活性化血小板と相互作用することが明らかとなった。しかし、例えば、用いた Fgn の純度や、リポソームの構造的な問題から、Fgn-liposomes は不安定で、その活性化血小板への親和性は約一週間で消失した。このような問題点を解決することを目的として、現在我々は、上述の、癌細胞をターゲットとするナノ粒子構築のコンセプト、即ち、機能性ペプチドを固定化したナノ粒子の創製を多面的に展開し、研究を継続している。今回は、これらの研究成果の一部を紹介したい。

組換え酵母由来ヒト血清アルブミンの性状解析

中島和幸、岡村宏、中原洋、坂口正浩、足達聡、
宮津嘉信、溝上寛、船津昭信
財団法人 化学及血清療法研究所

【緒言】ヒト血清アルブミン（HSA）は、585 個のアミノ酸残基よりなる 66KDa の単純たん白質であり、生体内では膠質浸透圧の維持や脂肪酸および各種薬剤などの物質輸送などに重要な働きをする。従って、ヒト血漿より精製された HSA 製剤（nHSA）は、循環血漿量維持の目的で使用されてきた。しかし、原料となるヒト血漿の国内自給量の安定的な確保に対する不安が完全に否定できないため、組換え技術を用いた医薬品の開発が望まれていた。我々は、HSA 遺伝子を導入した酵母を大量培養した後、高純度に精製された組換え HSA（rHSA）の製剤化に成功した。今回、rHSA の性状について nHSA と比較して検討を行ったので報告する。rHSA の構造組成は N 末端アミノ酸分析、アミノ酸組成分析、ペプチドマップ法により解析を行った。その結果、確認された構造は塩基配列より予想される構造であり、nHSA と同等であった。また、MALDI-TOF による質量分析で測定された rHSA の分子量は nHSA と差異は認められなかった。立体構造に関して、円偏光二色性スペクトル（CD）分析、熱分析により検討した結果、rHSA の立体構造は nHSA と同様であることが示唆された。更に HSA の生物学的性状として、膠質浸透圧の維持作用および薬物結合能を評価するために、コロイド浸透圧測定、表面プラズモン共鳴法による薬物結合能の測定を行った。その結果、これらの測定値について両者間で差異は確認されず、同様な性状を保持していることが確認された。

急性大量出血モデルラットにおける人工酸素運搬体 (Neo Red Cell; NRC) の酸素代謝への影響

石塚隆伸、小原井佳苗、筒井洋治、鹿糠実香、
本山慎二、西田仁、金田伸一

テルモ株式会社 研究開発センター

【緒言】NRC は、ヒト期限切れ赤血球製剤由来のヘモグロビンをリポソームに包埋した人工酸素運搬体で、待機手術の大量出血時などに赤血球製剤を代替する目的で開発している。今回、急性大量出血モデルラットを用いて NRC の全身および臓器酸素代謝への影響を検討したので報告する。

【方法】実験は SD ラット（300～400g）を 1.5%イソフルラン麻酔、臭化パンクロニウム不動化、45%酸素付加人工呼吸下に脱血および被験物質の投与を行った。すなわち、同種の保存血漿を用いた血液希釈後、20mL/kg 脱血し NRC を 20mL/kg 投与した。投与 3 時間後まで血圧および心拍数ならびに全身酸素代謝の指標として血漿乳酸濃度を測定した。また、臓器酸素代謝の指標として投与 3 時間後に脳および肝臓のアデニンヌクレオチド含量を測定した。なお、対照物質として生理食塩液ならびにヒト洗浄赤血球浮遊液を投与しその効果を比較した。

【結果】NRC は急性大量出血後の血圧、全身酸素代謝ならびに肝臓での酸素代謝をヘモグロビン濃度依存性に改善した。血漿乳酸値を指標とした際のヒト赤血球との効力比は約 1.5 倍であった。

【結論】NRC は急性大量出血後の全身ならびに臓器酸素代謝の改善に有用である。また、酸素親和性をヒト赤血球に比して低くしていることは、酸素付加条件下では全身酸素代謝に対して優位に働くことが明らかとなった。

合成ヘム蛋白質（アルブミン-ヘム）の開発と 酸素輸液への応用

甲斐 俊哉¹、土田 英俊²、小林 紘一³

¹ニプロ株式会社医薬品研究所

²早稲田大学 理工学総合研究センター

³慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科

遺伝子組換えヒト血清アルブミン（r-HSA）が間もなく上市される。我々は r-HSA を単なる血漿増量剤としてではなく、高付加価値を持たせた製剤として提供できる体制の確立を目指しており、その一つの試みとして、アルブミンを利用した酸素輸液（赤血球代替物）の開発を展開している。

現在、進行中のヘモグロビン利用の酸素輸液は、一部で既に臨床応用が進んでいるが、原料ヘモグロビンの安定確保／ウイルスの完全除去／未知病原体への対応 など課題も残している。我々は、HSA 自身の非特異的多分子結合力、血漿増量効果に加え、r-HSA の高純度、高生体適合性、非感染性、量産性 などの特徴に着眼し、r-HSA に酸素配位能を有するヘム誘導体を包接させる方法により、新しい合成ヘム蛋白質（アルブミン-ヘム）を調製、その生産と前臨床評価試験を開始した。

アルブミン-ヘムは、①遺伝子組換え技術と合成化学により創出された完全合成系製剤であり、感染の危険性が全くない、②一切の血液資源を必要としない、③酸素親和性（ P_{50} ：1～60 Torr）の制御が比較的容易であり、赤血球の値に調整できる、④アルブミンが血管内皮を透過しないため、NO 捕捉に伴う血管収縮・血圧亢進は惹起されない、などの優れた特徴を持つ。既に酸素輸液としての酸素結合力、溶液物性、血液適合性 は実証されており、安全性と効果の解明を中心とした評価実験が進行している。また、r-HSA で確立された製造・精製、品質管理方法の基礎技術をもとに、アルブミン-ヘムの量産にも目処が立ってきている。いわゆる赤血球代替物（輸血）としての開発に留まらず、酸素の DDS として、適応拡大を指向した基礎実験も実施しているので、最新の話題をまとめてお話ししたい。

人工赤血球液—その有効性と安全性

高折益彦

東宝塚さとう病院

献血された血液については NAT 検査が施行され、少なくとも過去に重要視されたウイルス感染は回避されるようになった。そのため自己血輸血に匹敵するほどその安全性が認められるようになった。しかしなお解決しなければならない多くの問題が残されている。さらに迫りつつある献血血液の不足の問題もある。これらの問題を解決、あるいは部分的にその解決を支える手段としての人工血液の開発、なかんずく人工赤血球の開発は特に差し迫った問題であろう。それは献血血液の大部分が赤血球製剤として用いられ、赤血球輸血が輸血医療における中心を占めるからである。すでに過去にいくつか代用赤血球の開発が試みられた。しかし実際に臨床で使用する域に達した製品は皆無である。我々は赤血球の代替物は細胞型であるべきであるとの考えに基づき、ヒト・ヘモグロビンを燐脂質（リポソーム）にて包埋した人工赤血球（HbV）について数年間にわたり検討してきた。しかし今後この製品の開発段階においては他の薬物と同様に、その有効性と安全性とを確立しておかなければならない。

人工血液の製品としての有効性はその製品の酸素運搬体としての物性的能力と、実際に生体内に投与したときの生体の活用性とから検討しなければならない。たとえばこのような人工赤血球液は予想せざる出血、とりわけ大量出血の治療に用いられる場合が多い。したがって人工赤血球液には投与後の循環血液量を一定時間保持する能力も要求される。同様にその製品の安全性は製品の化学的安定性、安全性とともに生体内に投与した際の生体の組織、機能に対する無毒性、順応性においても満足されなければならない。現在手元にある HbV に関して、われわれはこれらの点について数年にわたり検討してきた。しかしなお多くの検討点を残している。そしてその中には今後優先して検討しなければならない問題もある。少なくとも現在まで得られた成果をふまえ、今後の検討問題とその検証方法、そして今後の発展性について述べたい。

高酸素親和性を有する人工酸素運搬体の
虚血部位への酸素運搬能

浅川芳和, 木村哲寛, 緒方嘉貴

テルモ株式会社 研究開発センター

【緒言】これまでに、カプセル型人工酸素運搬体である NRC (Neo Red Cell) が虚血性疾患の治療に有効である可能性が提示されてきた。さらに、虚血時の低酸素組織に対しては、赤血球よりも酸素親和性を高め、低酸素組織に対して選択的に酸素を供給し得る高酸素親和性を付与した人工酸素運搬体が有用である可能性が指摘されてきている。本報告では、従来の低酸素親和性 NRC と高酸素親和性を付与した NRC の、虚血状態にある組織に対する酸素需給動態を評価する目的で、スピナーフラスコを用いた実験系において、溶存酸素濃度の変化に伴う人工酸素運搬体からの酸素放出を評価すると共に、ラット肝臓の灌流実験を行い、生体組織における、高酸素親和性を有する NRC の虚血部位への酸素運搬能を評価することを試みた。

【方法】 $K_L=0.12\text{min}^{-1}$ のスピナーフラスコに人工酸素運搬体を 60ml 入れ、気相部に 95%Air/5%CO₂ を通気させ、溶存酸素を飽和状態とした後、通気ガスを 95%N₂/5%CO₂ に切り換えて溶液中の溶存酸素濃度の経時変化を測定した。また、血液を灌流除去したラット肝臓に門脈より人工酸素運搬体を定流速下にて灌流し、肝臓中心部並びに辺縁部の組織酸素濃度及び ADP、ATP 濃度を測定した。

【結果及び考察】スピナーフラスコを用いた *in vitro* の検討では、通常の NRC は溶液中の酸素濃度が 5~7.5% を境に酸素放出量が増大し、高酸素親和性 NRC では、より低溶存酸素領域である、溶液中の酸素濃度が 3% 程度において、より多くの酸素を放出した。この結果は、酸素解離曲線ともよく一致し、高酸素親和性 NRC は、低酸素状態(虚血部位)で効率的に酸素を放出することが示唆された。さらに、虚血状態とした肝臓に親和性の異なる NRC を灌流した際の、肝の異なる部位での組織酸素濃度及び ADP/ATP 比を測定し、虚血組織に対する酸素需給動態を検討した結果も合わせて報告する。

In vitro におけるヘモグロビン小胞体による
補体活性化の検討○阿部英樹¹, 藤原満博¹, 平山順一¹, 若本志乃舞¹,
武岡真司², 土田英俊³, 東 寛¹, 池田久實¹¹北海道赤十字血液センター, ²早稲田大学理工学部,³早稲田大学理工学総合研究センター

【目的】リポソーム包埋型ヘモグロビンであるヘモグロビン小胞体(HbV)は人工酸素運搬体として開発され、出血性ショックの動物モデルにおいて有効性が示されている。生体適合性の観点から HbV の補体活性化について検討した。

【方法】リポソームの負電荷脂質成分が異なる PEG-DPPG-HbV および PEG-DPEA-HbV を用いた。健常人より採取した血清または血漿と各 HbV または PBS (対照) を混和、37℃で 1 時間インキュベーションし、その遠心上清を検体として用いた。補体活性化の指標として SC5b-9、古典経路および第二経路の活性化の指標としてそれぞれ C4d、Bb fragment を EIA にて測定した。ヒト血清補体価 (CH50) は、50%溶血法 (Mayer 法) により測定した。補体依存性の溶菌活性の測定には、*Yersinia enterocolitica* (type O:8) を対象とした。

【結果】(1)血清と 20% PEG-DPEA-HbV または等脂質量となる 28% PEG-DPPG-HbV 処理により、SC5b-9 レベルは対照の 4.0 μg/ml から、15.5 μg/ml、13.6 μg/ml へと、いずれも有意な増加を示した。(2)28%PEG-DPPG-HbV 処理によって C4d ならびに Bb fragment レベルの有意な増加がみられたが、PEG 修飾有無による違いはみられなかった。(3)血漿と 20%、40%PEG-DPEA-HbV 処理により、SC5b-9 レベルは対照の 0.3 μg/ml から、10.0 μg/ml、16.0 μg/ml へ、有意な増加を示したが、これらのレベルは陽性コントロール zymosan A 処理によるレベルのほぼ 1/10 であった。(4)血清と 20%、40%PEG-DPEA-HbV 処理により CH50 は、対照の 69.1%、54.8% と有意な低下がみられた。Zymosan A 処理では測定限界以下であった。(5)血清補体による *Y. enterocolitica* の殺菌は、血清と 20%、40%PEG-DPEA-HbV 処理により、対照の 3.7 Log₁₀ Kill から 2.9 Log₁₀ Kill、2.3 Log₁₀ Kill にそれぞれ減少した。Zymosan A 処理では 0.1 Log₁₀ Kill であった。

【考察】ヒト血清・血漿を用いた *in vitro* 試験において、HbV による補体活性化がみとめられ、その活性化には古典経路と第二経路の両方の関与が示された。補体活性化に伴って、CH50 および *Y. enterocolitica* 殺菌効果の有意な低下が認められたものの、HbV40%処理においても 55%以上の補体価が残存しており、殺菌能も 2.3 Log₁₀ Kill の活性を有していた。加えて *in vivo* では *de novo* の補体産生もあり、今回の結果の生体内での意義については、動物モデルにおいての検討が必要と考えられた。

^{99m}Tc ラベル化ヘモグロビン小胞体の 体内動態評価

宗 慶太郎¹・Robert, Klipper²・Beth, Goins²・
William, T. Phillips²・武岡真司¹・土田英俊¹

¹早稲田大学 理工学総合研究センター

²Univ. Texas Health Science Center at San Antonio

【緒言】濃厚ヘモグロビン(Hb)溶液をリン脂質二分子膜で被覆した Hb 小胞体を末梢組織に酸素輸送できる酸素輸液として検討してきた。本報では、放射化ラベルを利用して、Hb 小胞体の血中半減期、体内分布を投与量や Hb の有無に関連させて評価した。

【方法】 Hb 小胞体分散液 ([Hb]= 10g/dL) と ^{99m}Tc-Hexamethylpropyleneamine oxime 溶液とを混合し ^{99m}Tc-Hb 小胞体を調製した。^{99m}Tc-Hb 小胞体([Hb]=9.5 g/dL)をラットの尾大静脈から 1mL/min で投与し(血液に対し 15 あるいは 25 vol%)、γカメラおよびシンチレーションカウンタで肝臓および脾臓への分布率と血中残存率の経時変化を計測した。投与 45 時間後に臓器を採取し、各臓器への Hb 小胞体の分布率を計測した。また、コントロールとして Hb を内包していない小胞体について同様の計測を行った。

【結果および考察】 投与 Hb 小胞体は肝臓および脾臓に比較的高い割合で取込まれることが確認された。肝臓への取込み率は投与 6 時間後に飽和に達し、25 vol %投与群に比較して 15 vol%投与群の方が高値を示した。また、脾臓への取込み率は投与量に依存せず 12 時間後に飽和に達した。血中からの消失は 15vol%および 25vol%投与群共に 2 相系の挙動を示した。15vol%および 25vol%投与での血中半減期は各々 15 時間および 24 時間と算出された。初期の血中からの消失速度、および投与量依存は主に肝臓への取込み挙動と相関していた。一方、Hb を内包していない小胞体では脾臓への取込み率が著しく高く、15vol%投与での血中半減期は 6 時間であった。投与後 45 時間には、投与量によらず主に肝臓、骨髄、脾臓に分布した。これらの臓器に分布する食食細胞は、老化赤血球などの細胞代謝経路として機能していることから、Hb 小胞体も同様の経路を経て代謝系へ誘導されるものと考えられる。

活性酸素に対するヘモグロビン小胞体の安定性

寺村 裕治、阿閉 友保、武岡 真司、土田 英俊

早稲田大学理工学総合研究センター

【目的】ヘモグロビン(Hb)は、活性酸素種であるスーパーオキサイドアニオン(O₂⁻)や過酸化水素(H₂O₂)と反応して、メト体あるいは細胞毒性を持つフェリル体を生じ、ヘムや Fe³⁺の放出が起こる。本研究では、活性酸素種と Hb との反応系について細胞型の Hb 小胞体(HbV)と非細胞型 Hb を比較し、Hb の安定度や不飽和脂質への過酸化作用から細胞型 Hb の高い安定度について明らかにする。

【方法】 Hb あるいは HbV 分散液(Hb 試料)をヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系にて発生させた O₂⁻あるいは H₂O₂と 37℃で反応させて、UV-vis スペクトル測定、反応後の溶液状態と濁度を測定した。また、H₂O₂と反応後の Hb 試料からフィルター付遠心チューブ(cutoff: 12000 Da)にて分離した遊離鉄イオンを ICP 発光分析にて定量した。フェリル体による卵黄レシチン小胞体の過酸化値は 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 H₂O₂を Hb 試料に反応させると主にメト体が生成し、100 倍モル以上では主にフェリル体が生成され、H₂O₂を分解するカタラーゼ様作用を認めた。Hb 溶液では H₂O₂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、HbV 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。また、Hb 試料と O₂⁻との反応系について、カタラーゼを共存させて不均化反応で発生する H₂O₂による影響を除去したところ、Hb 試料のメト化の促進が認められた。

ヘモグロビン小胞体による交換輸血試験

山本 学¹、堀之内 宏久¹、小林 紘一¹
政田 陽平²、酒井 宏水²、武岡 真司²、
土田 英俊²

¹慶応義塾大学 医学部

²早稲田大学 理工学総合研究センター

【緒言】臨床現場でのヘモグロビン小胞体(HbV)の投与量は、全血量の 20 vol%程度と想定される。その二倍の量(40 vol%)を設定条件として安全性を確認するため、40%血液交換試験を行い、循環動態と血液ガスパラメータ、および血液生化学試験項目の解析を目的とした。

【方法】Wistar 系ラット(体重約 300g, ♂)を自発呼吸を残した吸入麻酔下(Sevoflurane 1.5%)、保温パッド上に仰臥位に固定。頸動・静脈に挿管し、頸動脈から脱血(1mL/min)と同時に頸静脈から試料を同速度で注入した。試料としては、HbV を 5%アルブミン(HSA)に分散させて膠質浸透圧 20 mmHg に調節した HbV/HSA ([Hb 濃度] = 10g/dL) (HbV/HSA 群)、および対照試料として、HSA 単独の溶液 (HSA 群) を用いた。血圧、心拍数、血液ガス組成(PaO₂, PaCO₂, pH, BE)、呼吸数、体温、血球数の変動を血液交換後 6 時間まで追跡した(測定時間: 0, 1, 3, 6 hr)。犠牲死時に採血し、超遠心分離によって血清中に浮遊する HbV を除去して、血液生化学的検査を実施した。

【結果および考察】呼吸数、体温ともに安定した麻酔状態から試験を開始した。交換後 HSA 群は呼吸数が低下する傾向を示した。血圧と心拍数は、HSA 群と HbV/HSA 群ともに正常値を維持し、群間に有意差は無かった。血液ガスも安定した値を推移し、群間に有意差無し。40%程度の血液希釈では、HSA 単独でも十分に代償機能(心拍出量の増大など)が働き、正常値を維持したと考えられる。

血液生化学検査では肝機能を反映するパラメータに僅かに変動が見られたが、CREA, UN, UA には特に異常は認められず、腎機能に強い影響を与えているとは考えられなかった。遊離脂肪酸、遊離コレステロールの上昇は、HbV 粒子の二分子膜成分の代謝に起因すると考えられる。エリスロポエチンの上昇が HbV 群で見られるものの、HSA 群に比較すると有意に低い値であった。

HbV/HSA 群では各測定項目に殆ど変動が無く、安定した値を推移し、HbV の酸素輸液としての安全性は高いと言える。

出血性ショック蘇生液としての
ヘモグロビン小胞体の評価

政田 陽平¹、酒井 宏水¹、武岡 真司¹、
土田 英俊¹、堀之内 宏久²、山本 学²、
池田 栄二²、小林 紘一²

¹早稲田大学 理工学総合研究センター

²慶応義塾大学 医学部

【背景】出血性ショックの治療には現在輸液、輸血を中心とした循環血液量の補正と酸素運搬能の改善を行っている。酸素運搬能を有する輸液が開発されることにより出血性ショックの治療法に変革をもたらす可能性がある。

【目的】ヘモグロビン小胞体(HbV)を用いて出血ショックからの蘇生試験を行い、血圧、血液ガス組成、血液生化学、病理組織学的検討から酸素運搬機能を有する輸液としての効果を評価した。

【方法】Wistar 系ラット(雄, 約 250 g)に対し、Sevoflurane 吸入麻酔自発呼吸下、頸動静脈に挿管、頸動脈より循環血液量の 50%を脱血した。15 分間放置した後、頸静脈より HbV を 5%アルブミン(HSA)に分散させた HbV/HSA、HSA 単独、または脱血液の投与を行い(各群 n = 8)、血圧、血液ガス、血球濃度を観測した。6 時間後、採血液を超遠心分離処理し HbV を除去した血清の血液生化学検査、また主要臓器について組織病理学的検討を行った。

【結果および考察】脱血前約 100 mmHg の血圧は脱血後 30 mmHg に低下、PaO₂ の上昇と PaCO₂、pH、BE の顕著な低下が認められた。HbV/HSA 投与群では血圧が投与直後に 95 mmHg にまで回復し、これは脱血液投与群と同等であり、HSA 投与群(75 mmHg)と比較して有意に高い値を 6 時間まで保持した。血液ガス組成も同様に回復した。HSA 群は 8 匹中 3 匹が蘇生後 6 時間を待たずに死亡したが、HbV/HSA 群は全例生存した。

血液生化学検査では、AST, ALT の上昇が脱血液投与群および HbV/HSA 群で認められた。病理組織学的検討では主要臓器に顕著な障害は認められなかった。

以上より、HbV を HSA に混合し膠質浸透圧を調節した HbV/HSA が、出血ショックの蘇生液として有効であることが確認できた。

ヘモグロビン小胞体による出血ショック蘇生後の全身動態と微小循環動態

酒井 宏水¹、武岡 真司¹、Reto Wettstein²、
Amy G. Tsai²、Marcos Intaglietta²、土田英俊¹

¹ 早稲田大学 理工学総合研究センター

² Dept. Bioeng., Univ. California, San Diego

【緒言】 出血ショック時の蘇生液としてヘモグロビン小胞体(HbV)を利用し、全身動態と微小循環動態観測からその酸素運搬機能を評価することを目的とした。

【方法】 Syrian golden hamster (雄, 約 60 g)の背部皮膚に直径 1cm の硝子窓を取出し、3 日後に頸動静脈に挿管。翌日頸動脈より循環血液量の 50%を脱血、血圧を 40 mmHg に 1 時間維持するために更に脱血した(総脱血量約 65%)。HbV 分散液([Hb] = 10 g/dL)に 25%アルブミン(HSA)と生理食水を少量添加し、Hb 濃度を 3.8 および 7.6 g/dL とした蘇生液を頸静脈より投与した。また比較例として HSA 単独、脱血液の投与も行った。血圧、心拍数、血液ガス組成、Hct、微小循環動態に関しては血管径、血流速度、有効毛細管密度、酸素分圧の測定を行った。

【結果および考察】 ショック状態を 1 時間持続させた後、HbV(3.8)/HSA 或いは HbV(7.6)/HSA 溶液を投与した場合、血圧はそれぞれ 93 ± 14 、 93 ± 10 mmHg にまで回復した。これは脱血液を投与した場合(98 ± 13 mmHg)と同等であり、HSA 単独投与の場合(62 ± 12 mmHg)よりも有意に高い値であった。また、HSA 群のみ、蘇生後も PaO_2 の増大、 PaCO_2 と塩基余剰の低下が持続される傾向があった。

ショックにより皮下の血流量は初期値の約 10~20%に減少するが、これは主に小動脈(抵抗血管: 直径 $143 \pm 29 \mu\text{m}$)の顕著な収縮に起因し、主要臓器への血液の再分配(centralization)の効果と考えられる。脱血液を投与しても抵抗血管は殆ど弛緩せず血流量は 60~80%程度に回復するに留まる。HbV 投与群のうち、特に HbV(3.8)/HSA 群は微小血管の血流の回復が認められ、HSA 群より高い組織酸素分圧を示した。

ショック状態からの優れた回復は、HbV の酸素運搬機能に起因すると考えられた。血圧や血液ガス組成の回復には低濃度 Hb でも十分であることが明らかになった。

ヘモグロビン小胞体投与後の血液生化学的検査

酒井 宏水¹、堀之内 宏久²、政田 陽平¹、
武岡 真司¹、小林 紘一²、土田 英俊¹

¹ 早稲田大学 理工学総合研究センター

² 慶応義塾大学 医学部

【緒言】 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、肝/脾/腎/肺には特に不可逆の異常が生起しないことを組織病理学的に明らかにしてきた(*Am. J. Pathol.* 2001;159:1079-1088)。しかし血液生化学的分析による評価は、HbV の測定阻害作用のために困難であった。本報では、採血液中の HbV を遠心分離後に血液生化学的検査を行う方法によって、単回投与後の HbV の安全性評価を行った。

【方法】 Wistar 系ラット(雄, 約 200 g, 25 匹)に対し、エーテル麻酔下尾静脈より HbV(20 mL/kg)を投与した。投与 8 時間, 1, 2, 3, 7 日後($n = 5$)に麻酔下、頸動脈より採血し、血球成分を遠心分離除去した後、更に血清を超遠心分離操作(50,000g, 20 min)して HbV を除去し、得られた血清の分析を行った(全 30 項目)。また、肝臓と脾臓の重量を測定すると共に、組織病理学的検討を行った。

【結果および考察】 体重に対する脾臓重量比率の推移は、HbV 投与後に増大し、3 日後に初期値の二倍に増大したが、7 日後には低下。HbV 捕捉と代謝消失による変化と考えられた。肝臓は HbV の捕捉代謝が盛んに行われる臓器の一つなので、肝機能を反映する測定項目の変動が懸念されたが、著変は見られず障害は認められなかった。CRE, BUN, UA にも著変は無く、腎機能障害も特に認められなかった。

総コレステロールが 72.6 ± 7.5 mg/dL から 2 日後に 121.2 ± 14.6 mg/dL へ一過性に増大したが、7 日後には 71.8 ± 6.9 mg/dL に戻った。これは HbV の膜成分に由来し、血液中で直接移動したもの、或いは一度貪食されたものが遊離したと考えられる。また β リポ蛋白は初日に増大するが、徐々に低下した。リン脂質濃度も 132 ± 8 mg/dL から 1 日後に 150 ± 9 mg/dL へ増大するが、徐々に低下した。リパーゼの一時的な増大は認めるが、アミラーゼに変化はなく、膵障害は無いと考えられた。

アルブミン-ヘムの血液適合性:in vitro における評価

黄 宇彬、小松 晃之、中川 晶人、土田 英俊
早稲田大学理工学総合研究センター

【緒言】 テトラフェニルポルフィナト鉄(II)誘導体を組換えヒト血清アルブミン(rHSA)に包接させることにより合成したアルブミン-ヘム複合体(rHSA-heme)は、生理条件(pH 7.3, 37°C)下で酸素を可逆的に結合解離することのできる人工酸素運搬体である。演者らはこれまで、この rHSA-heme の生理塩水溶液が、in vitro、in vivo で赤血球代替物(酸素輸液)として機能することを明らかにしてきた。本報では、rHSA-heme を赤血球代替物として利用するにあたり、不可欠である血液適合性を詳細に検証したので報告する。

【実験】 rHSA-heme 溶液([rHSA]: 5wt%, [heme]: 3 mM)を全血と混合し(10, 20, 44%)、37°C で静置、6 時間後までの赤血球数、白血球数、血小板数の変化を多項目自動血球計数装置(KX-21, Sysmex 社製)を用いて計測、血球の形態変化を顕微鏡観察した。さらに、混合液の一部を遠心分離し、上澄み鉄濃度を定量。各混合液のプロトロンビン時間(PT)、活性部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定し、血液凝固系に及ぼす影響も検討した。対象群はアルブミン(5 wt%)と血液を同割合で混合した試料とした。

【結果および考察】 全血と rHSA-heme を混合すると、血球数は混合比に相応した減少を示し、その値は 6 時間後まで変化しなかった。上澄みの鉄濃度は、混合直後に rHSA-heme の添加量に相応した増大を示し、これも 6 時間後まで一定値を保った。また、混合溶液の継時的な顕微鏡観察から、混合比によらず血球の形態に変化がないことがわかった。PT、APTT は対象群と同じ変化を示した。これらの結果から、血液と rHSA-heme を混合しても、溶血、血球数変化、heme の血液成分への取り込みなどは惹起しないことが明らかとなった。rHSA-heme の高い血液適合性が実証された。

アルブミン-ヘムの O₂、CO 配位構造と再結合過程のピコ秒時間分解解析

小松 晃之、中川 晶人、土田 英俊
早稲田大学理工学総合研究センター

【緒言】 組換えヒト血清アルブミン(rHSA)にテトラフェニルポルフィナト鉄(II)誘導体を包接して得たアルブミン-ヘム複合体(rHSA-heme)は、生理条件下(pH 7.3, 37°C)でヘモグロビンやミオグロビンと同じように O₂ 分子を可逆的に結合解離できる合成ヘム蛋白質である。本報では、O₂ 輸送ヘム蛋白質としての特徴をさらに明確にするため、①磁気円二色性(MCD)、赤外吸収(IR)スペクトル測定から O₂ 配位活性中心である heme の軸配位構造を決定、②ピコ秒レーザーフラッシュ照射後の過渡吸収スペクトル変化から、CO 結合過程を詳細に検討した。

【実験】 rHSA-heme 溶液の MCD スペクトルを 1.5 kT の磁場下で、N₂、O₂、CO 雰囲気下にて測定。また、IR スペクトル測定から配位 O₂、CO の伸縮振動(ν_{O-O} , ν_{C-O})を決定した。¹⁸O₂ 錯体の同位体シフト値により ν_{O-O} を同定。また、rHSA-heme (CO) 溶液にピコ秒レーザーフラッシュ(Nd YAG laser SHG: 532 nm 励起)を照射し、瞬時に起こる CO 再結合反応を時間分解スペクトルから追跡した。

【結果および考察】 rHSA-heme の N₂ 雰囲気下における MCD スペクトルは、Fe(II) 5 配位高スピン錯体の形成を示し、そこへ O₂、CO を通気すると、各々 O₂、CO が軸配位した 6 配位低スピン錯体型のパターンへ速やかに移行した。また、配位 ¹⁶O₂、¹⁸O₂、¹²C¹⁶O の伸縮振動は、それぞれ $\nu_{16O-16O}=1158$, $\nu_{18O-18O}=1079$, $\nu_{12C-16O}=1964\text{cm}^{-1}$ に観測され、rHSA-heme の O₂ 配位構造はヘモグロビンやミオグロビンと同様な bent end-on 型であることが実証された。

興味あることに、ピコ秒レーザーフラッシュホトリシス照射後の過渡吸収スペクトル測定から、rHSA-heme の CO 結合過程には、蛋白質内部で CO 再結合が完了する geminate 反応(2 ns 以内)が存在することが明らかとなった。これはアルブミン内部に包接されている各 heme 周辺の分子環境に差があることを示唆している。

アルブミン-プロトヘム複合体の合成とその酸素配位

中川 晶人, 小松 晃之, 土田 英俊
早稲田大学理工学総合研究センター

[緒言] 我々はテトラフェニルヘム誘導体をヒト血清アルブミンの疎水ドメインへ包接させて得たアルブミン-ヘム複合体が、生体内で効率よく酸素運搬できる赤血球代替物(酸素輸液)として機能することを報告してきている。本報では、ヘモグロビンやミオグロビンの酸素配位活性中心と同じプロトヘム IX に軸塩基配位子を導入したヘム誘導体を合成し、それをアルブミンに包接させた新しいアルブミン-プロトヘム複合体を調製、その酸素配位について検討したので報告する。

[方法] プロトポルフィリン IX のプロピオン酸残基に軸塩基配位子としてアミノプロピルイミダゾールを共有結合した後、中心鉄を挿入、プロトヘム誘導体を合成した。得られたプロトヘム誘導体を一酸化炭素雰囲気下、アスコルビン酸により還元、既報に従いアルブミン-プロトヘム複合体を調製した。酸素親和性 ($P_{1/2}$)、酸素錯体半減期 ($\tau_{1/2}$) は紫外可視吸収スペクトル変化から算出した。

[結果および考察] 合成したプロトヘム誘導体は、プロピオン酸残基に近位塩基として機能するアルキルイミダゾリル基を共有結合しているため、それ自身でも酸素を吸脱着することができる。

窒素雰囲気下におけるアルブミン-プロトヘム複合体の紫外可視吸収スペクトル ($\lambda_{\max}$: 423, 535, 560 nm) は、ヘムが鉄 2 価 6 配位型錯体を形成していることを示唆した。第 6 配位座にアルブミンのアミノ酸残基が配位している可能性がある。そこへ酸素を通気すると、スペクトルは速やかに酸化型 ($\lambda_{\max}$: 417, 532, 562 nm) に移行した。また、一酸化炭素を通気すると、安定なカルボニル錯体 ($\lambda_{\max}$: 422, 542, 570 nm) へ変化した。 $P_{1/2}$ は 1 Torr と高い (25°C)。

リコンビナント GPIb α 結合担体としてのアルブミン重合体とリン脂質小胞体の機能比較

岡村 陽介¹, 寺村 裕治¹, 武岡 真司¹, 土田 英俊¹
半田 誠², 池田 康夫²

¹ 早稲田大学理工学総合研究センター

² 慶応義塾大学医学部

【目的】 血小板膜蛋白質の一部のリコンビナント GPIb α をリン脂質二分子膜小胞体あるいはアルブミン重合体(polyAlb)の表面に結合させ、出血部位を認識して集積する血小板としての機能発現を目的としている。本研究では、フォンビルブランド因子(vWf)を固定した基板に対するこれらの担体の認識挙動を比較評価した。

【方法】 pH と温度制御によりリコンビナントヒト血清アルブミン(rHSA, 三菱ウェルファーマ社製)溶液から調製した粒径約 1 μ m の polyAlb あるいはリン脂質小胞体(POPC/DPPE=10/1, POPC/cholesterol/DPPE=5/5/1, DPPC/cholesterol/DPPE=5/5/1 by mol)に rGPIb α (三菱ウェルファーマ社製)を結合させ、流動下(2400s⁻¹)における vWf 固定化基板との相互作用を蛍光顕微鏡にて観察した。

【結果及び考察】 流動下において rGPIb α -polyAlb は vWf 基板へ粘着してそのまま基板上に集積した。また、血小板表面の GPIb α 結合密度とほぼ等しくした rGPIb α -ラテックスビーズ、四酸化オスミウムにて細胞膜を固定した血小板でも同様に vWf 基板へ粘着した。他方、rGPIb α -小胞体は血小板と同様に vWf 基板へ粘着後、流動方向へ沿って転がり脱着する挙動が観察された。小胞体の転がり速度は小胞体構成二分子膜の膜流動性の低下に伴って増大した。また基板上での粘着してから脱着するまでの転がり距離は、小胞体からの rGPIb α 結合脂質脱離率の低下に伴って短くなった。従って、認識部位として rGPIb α を選択すると重合体などの弾性体では vWf 基板上に粘着するが、膜流動性の高い小胞体では転がる傾向を確認し、血小板代替物に関する重要な知見が得られた。

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-ニチャリ

〈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

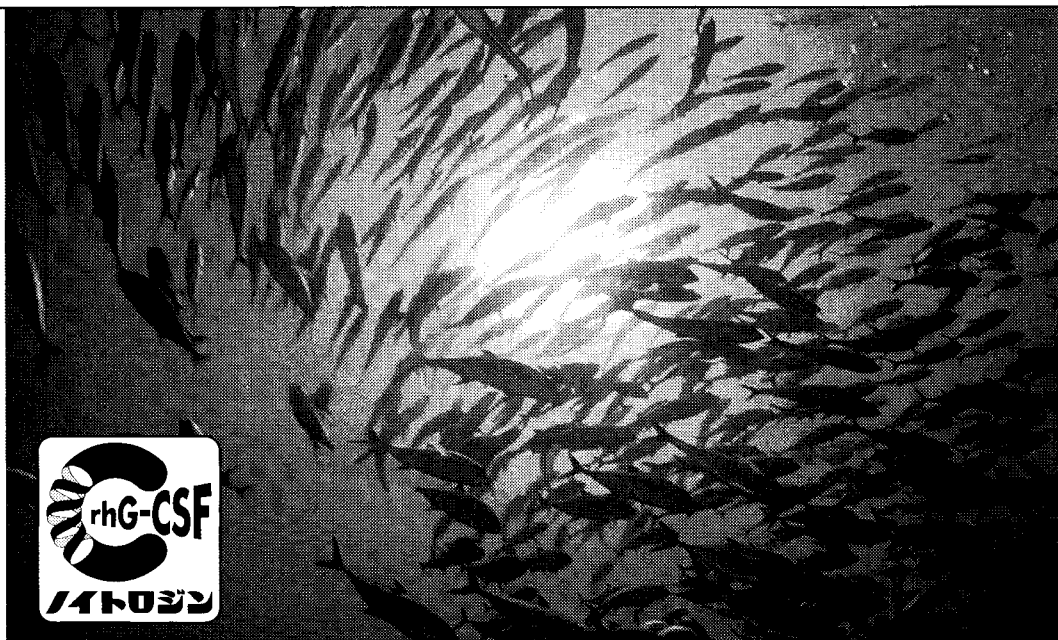
販売



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

2001年11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

イトロジン® 注 50 μ g
100 μ g
250 μ 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

NEUTROGIN® Injection 一般名 レノグラスチム(遺伝子組換え)

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

[illegible]

M E M O

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

M E M O

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

M E M O

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There is no text or other markings on the paper.

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, μ m, L, mL, μ L, mol, g, mg, μ g, ng, pg, fg, N/10などを用いる。
 - 7) FigureとTable: 引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は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²⁾, ³⁻⁵⁾, ¹⁾, ⁴⁻⁶⁾などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名、論文題名、誌名西暦発行年; 巻数: 頁~頁、とし、誌名の省略は医学中央雑誌また

はIndex Medicusに準拠する。単行本の場合は全著者名、題名、編集者名、書名、発行地: 発行書店、年号; 頁~頁、の順とする。

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

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

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

日本血液代替物学会 会誌

■発行 日本血液代替物学会

■編集・制作「人工血液」編集委員会

■印刷 株式会社 研恒社

人工血液 vol.10 (3) 2002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

〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1

早稲田大学理工学部65-208室

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

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

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