

人工血液

第12巻 第4号 2004年12月

会告	98
総説	血液代替物の臨床応用に向けて	川村明夫 100
	ウイルス不活化の現状と課題	阿部英樹 104
	リポソーム製剤のドラッグデリバリーシステムへの 応用展開	前田典之 114
原著	虚血 再開通モデルラットにおける脳機能不全の 多角的評価と人工酸素運搬体の有効性について ...	富樫広子 121
事務局たより	127

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 12 No. 4 December, 2004

<i>Announcement</i>	98
<i>Review: Trial Study of Blood Substitutes for Clinical Application</i>	Akio Kawamura 100
<i>Virus Inactivation: Current Status and Subject</i>	Hideki Abe 104
<i>Application and Development of Liposomal Drug for Drug Delivery System</i>	Noriyuki Maeda 114
<i>Original Article:</i>		
<i>Beneficial Effects of an Artificial Oxygen-carrier, Liposome-Encapsulated Hemoglobin, on Post-Ischemic Cerebral Dysfunction in Rats</i>	Hiroko Togashi 121

会 告

第12回 日本血液代替物学会年次大会

会 期：平成17年6月6日(月)、7日(火)
会 場：早稲田大学国際会議場3階 第1、第2会議室
大会長：武岡真司(早稲田大学 理工学部)

参加登録申込要領

第12回日本血液代替物学会年次大会への参加は、全員参加登録が必要です。本号挿入の参加登録申込書(郵便払込取扱票)を使用し、お申込み下さい。当日の受付は混雑することがありますので、事前にお申込み下さいますようお願い申し上げます。

参加登録料

申込期間	3月1日～5月17日	5月18日～会期中
参加登録料 (消費税込み)	¥9,000	¥10,500

・参加登録料送金に関する注意

- 1) 本号挿入の参加登録申込書を使用して下さい。一人1枚使用のこと。不足の場合はご請求下さい。
- 2) 同参加登録申込書(郵便払込取扱票)を使用しての送金は5月17日(火)までとさせていただきます。その後は、会期中、会場受付にてお支払い下さい。
- 3) 郵便払込取扱票の受領証を領収書にかえさせていただきます。本会から別途領収書の発行はしません。また銀行振込、現金書留での参加登録はご遠慮下さい。
- 4) 見積書、納品書、請求書が必要な方は、所定書類を作成の上、返信用封筒(切手添付)を同封して送付して下さい。記入捺印後、返送します。

会期中の行事

・理 事 会

日 時 6月6日(月) 12:00～
会 場 早稲田大学 国際会議場4階

・評議員会

日 時 6月6日(月) 理事会終了後
会 場 早稲田大学 国際会議場4階

・総 会

日 時 6月7日(火) 11:45～
会 場 早稲田大学 国際会議場3階 第1会議室

・懇 親 会

日 時 6月7日(火) 18:00～20:00
会 場 リーガロイヤルホテル東京(部屋名)ダイヤモンド(2階)
参加費 未定

問合せ先

〒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
第12回 日本血液代替物学会年次大会事務局
担当 岡村陽介、阿閉友保
TEL & FAX 03-5286-3217

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

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

研究発表者への注意

予稿原稿に関すること

予稿原稿電子投稿締切 3月25日(金)15時厳守

学会のホームページ、Information(学会のお知らせ)の電子入稿のサイトより入稿
フォーマットのファイルをダウンロードし、ご投稿下さい。(Windows Word対応)

参加登録

全員参加登録制です。本号挿入の参加登録申込書を使用し、5月17日(火)までに
申し込んで下さい。また、学会ホームページからでも登録が可能です。Information
(学会のお知らせ)の参加登録サイトよりご登録下さい。参加登録料のお支払い用の郵
便払込取扱票をお送りします。

プログラム

年次大会のプログラムは、会誌「人工血液」ならびに学会ホームページに掲載しま
す。また、「人工血液」Vol.13.No2が抄録号となります。発表時間が自分の他の発表
と重なる場合は、至急事務局までお知らせ下さい。

ミニシンポジウム・ワークショップは現在企画中です。

学会ホームページ <http://www.blood-sub.jp/>

“血液代替物の臨床応用にむけて”

Trial Study of Blood Substitutes for Clinical Application

川村明夫

Akio Kawamura, M.D., Ph.D.

和文抄録

昭和50年頃から、フルオロカーボンを用いてUS保存腎のかん流を行った。さらにフルオロカーボンを用いて腎臓の常温かん流保存実験を行った。常温保存中、腎臓は尿を排泄することにより保存腎の機能判定を行うことができた。肝臓でも肝臓血管を遮断し常温かん流保存をしながら安全に肝切除を行うことができた。

実験的にNRCを用いて高度血液交換を行う方法を確立した。これによりNRCが大量失血の治療に有用であることを示すとともに、トータルボディーリンスによる体外免疫調節による異種移植の可能性を示した。

Abstract

We studied effectiveness of perfusion using fluorocarbon in US kidneys from 1975. Further more, we preserved kidneys by perfusion system using fluorocarbon under room temperature. During perfusion, preserved kidneys excreted urine. This observation revealed that perfusion by fluorocarbon under room temperature is very useful to evaluate preserved kidneys function. In hepatic surgery, blood flow of the liver was intercepted and the liver was preserved during operation by the similar perfusion system. As a result, the hepatic resection was well controlled.

We studied about NRC. First, we established the high dose NRC exchange model in a rat. In this study, we certificated that the rat of high dose hemorrhage was rescued by administration of NRC. And, we observed that the high dose NRC replacement rat was induced immunological tolerance. As a result, xenogenic heart transplantation was succeeded by replacement of NRC.

Keywords

blood substitutes, organ preservation, perfusion, NRC, xenogenic transplantation

1. はじめに

私は昭和50年ころから血液代替物、主にフルオロカーボンを用いて移植臓器の灌流保存を行ってきた。その後も臓器の保存を中心に血液代替物の臨床応用を模索してきた。今回、第11回日本血液代替物学会の大会長を仰せつかり、この機会に血液代替物の臨床応用について若干の経験をお話させていただいた。もとより、新しいこと、古いことが混在してご理解の妨げになることも恐れております。しかし、この様な考え方もあったことを報告せよとのご下命もあり、その一端を報告させていただきます。

2. 臓器の保存

フルオロカーボンを臨床に用いたのは移植腎の保存を良好に行うためである。昭和52～53年当時、北米の西海岸から札幌医大出身の岩槻先生のおかげで、いわゆるUS腎が本邦で利用された。この腎臓は摘出後、移植血流再開まで最低でも平均50時間の保存期があった。そこで、この腎臓が生着して機能するかどうか、ということが大きな問題であった。

この様な事情から私はフルオロカーボンによる灌流と保存臓器のコンディショニングを考えた。当時は電解質液にFC-43とヘパリンを加えた簡単なものであった。このとき得た知見はFC-43に加えられている乳化剤が血液灌流に効果をもたらすよ

Table 1. Result of fluorocarbon perfusion under room temperature in kidney.

群	灌流圧50mmHg, 温阻血 0分群	(n=5)
群	灌流圧80mmHg, 温阻血 0分群	(n=6)
群	灌流圧80mmHg, 温阻血 30分群	(n=6)
群	灌流圧80mmHg, 温阻血 35分群	(n=8)
群	灌流圧80mmHg, 温阻血 40分群	(n=6)
群	UV液内24時間冷却(4)保存群	(n=6)

うだということで、酸素運搬体により灌流効果があがったということは証明できなかった。

その後、この研究は動物実験により検討された。

* 摘出腎保存とコンディショニング

この実験は摘出腎を灌流保存することにより移植前に生着後の機能を判定できるか、そして、保存された障害腎の機能をコンディショニング出来るかという点にあった。

実験動物には日本白色種ウサギを用いた。腎臓を摘出し、5群の室温灌流保存と1群の冷却浸漬保存を行った。灌流圧50mmHg, 温阻血0分はコントロールでこの灌流圧では尿の生成は認められず。至適灌流圧は80mmHgであった (Table 1.)。灌流液は基本的に細胞外液である。これにFC-43, ハイドロキシエチル, アミノ酸, デキサメサゾン, インシュリンなど細胞の生存に必要な物質が加えられ, pHは7.40, 浸透圧は320mOsm/Lに調整されている (Table 2.)。灌流保存液の酸化はホロファイバー型人工肺を用い酸素流量は1L/minとした。

Table 2. Composition of perfusate.

Component	/L
NaCl	93mmol
Na-lactate	27mmol
KH ₂ PO ₄	4mmol
MgSO ₄ · 7H ₂ O	3mmol
Glucose	11mmol
Amino-acid	0.75g
HEPES(buffer)	25mmol
Allopurinol	1mmol
PEG-SOD	5mg
Adenosine	5mmol
Dexamethasone	8mg
Insulin	50U
Fosfomycin sodium	0.66mmol
Hydroxyethyl starch(HES)	30g
FC-43	30g

pH : 7.40 Na : 140-150mEq/L
 K : 4mEq/L Cl : 93mEq/L
 Osmolarity : 320mOsm/L

灌流保存の実験シエマをFig. 1.に示した。この装置で尿が生成され、この尿の量、性状を検討した。Fig. 2.は実験回路の全景と灌流中の腎臓である。実験成績では0分から45分の温阻血でも常温灌流中に尿の生成はみられた。すなわち、群では利尿は良好で、尿の組成も正常とかわらない。また、この群では灌流12時間後も組織はよく保存されていた。一方、群、

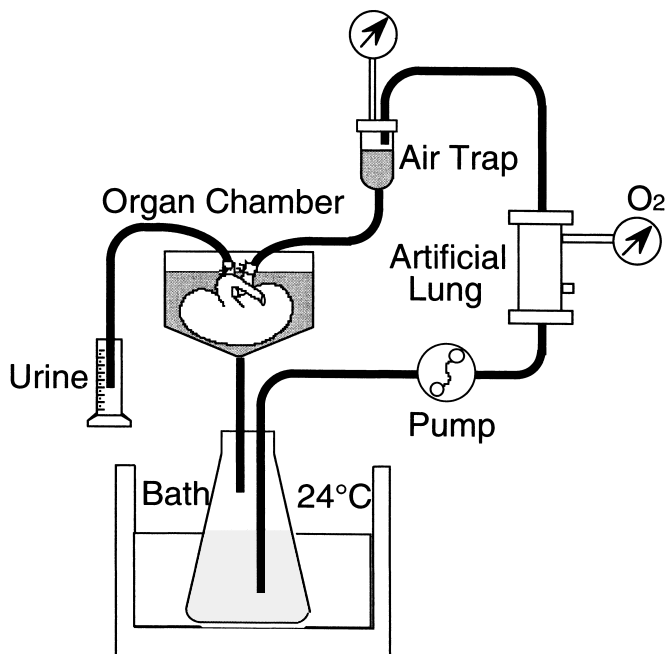
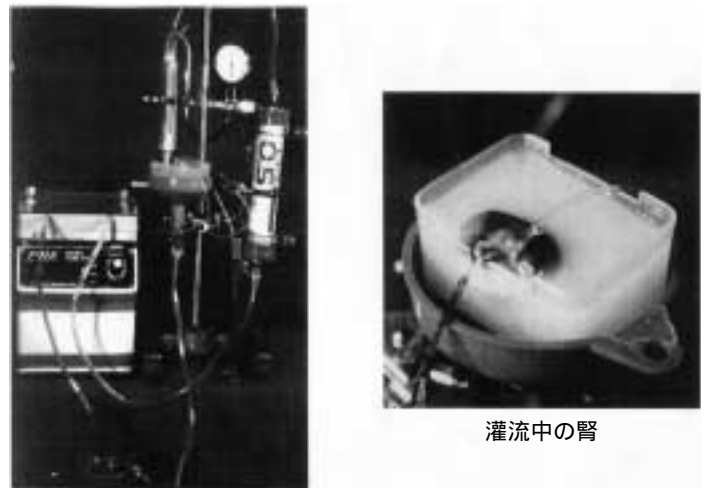


Fig. 1. Preservation of rabbit kidney 1.



回路全景

灌流中の腎

Fig. 2. Preservation of rabbit kidney 2.

すなわち35分温阻血では8例中5例が、群と同様の経過をとったが3例は灌流不全に陥った。さらに、群では5例中2例が脱落し、残り3例の尿組成も不良であった。すなわち、45分の温阻血による障害腎は灌流によってもその機能を回復しない。群は群に比較して、有意に生成尿量は多く、尿中K値は有意に低値であった。この状況は臨床例で冷却保存時間が長い症例での移植後腎機能に酷似している。言い換えれば、酸素運搬体を使用した常温灌流保存は保存臓器の機能をよく再現するといえる。さらに、2～4時間程度の常温灌流保存は障害臓器のコンディショニングにも有用であった¹⁾。

***FC43を用いた室温下灌流保護による血流遮断下肝臓切除の検討**

この実験の目的は肝臓がんなどで大量に肝切除を行う場合、一般的に出血をコントロールするため血行を遮断する。しかし、この遮断によって肝臓の組織は温阻血障害をうける。すなわち、手術後肝不全を招来する危険性が高い。また、肝臓を一度取り出し、テーブルで病巣部を切除するベンチサージェリーという方法もあるが、煩雑で、手術のリスクも高く、手術後肝臓の温度が復温するまで肝臓の機能は不良でサポートに難儀する。そこで、われわれは腎臓で用いたと同じ組成の常温灌流液を用いて、Fig. 3.のようにブタを用いて常温肝灌流を行い、血行を遮断して、右側2葉(50%)切除を行った。その結果、5頭中全頭は3週間目の犠牲死まで正常に生存、酵素は術後1日目に上昇したが、その後正常化、血液凝固系のPT, HPT, AT-も正常で経過した。また、組織所見では再灌流直前に類洞の拡張をみとめたが、30分後には改善された。また、肝細胞の構築は常に正常に保たれた²⁾。

以上のように、血液代替物、酸素運搬体による臓器の常温灌流保存は臨床上有用なことが示され、今後の血液代替物の開発が期待される。

3. NRCによる高度血液交換と免疫調節への応用

***NEO RED CELLによる高度血液交換**

高度血液交換は高度に置換された酸素運搬体が血液代替物と

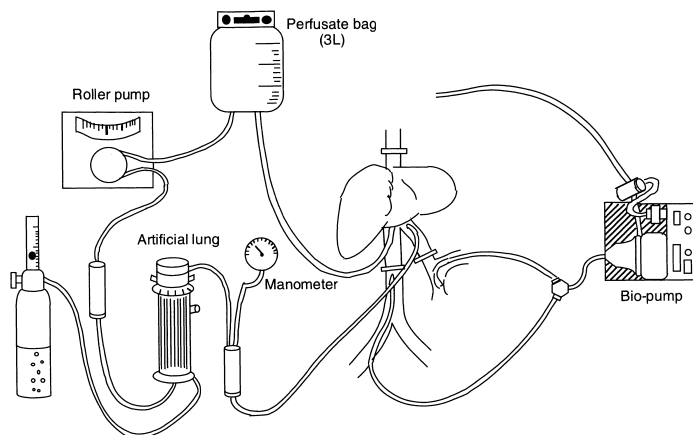


Fig. 3. Preservation of swine liver during hepatic surgery.

しての役割を果たしているのか。臨床的には災害などによる大量失血患者さんに適用して問題がないのかを検討するところにある。また、われわれは、これを一步すすめて、トータルポディーリンス、すなわち薬物中毒や高度免疫異常の治療に適用できないかを検討している。

Fig. 4.に実験方法を示した。血液交換直後Ht値は約7%に減少する。24時間でも10%である。この間動物は少し弱っている。しかし命に別状はない。168時間後にHt値は前値に復する(Fig. 5.)。そこで、血液交換前後の免疫能を検討した。Fig. 6.は補体の変動である。C3, CH50, ACH50のいずれもが交換直後から低下し、これは16時間以上続く。同じようにIgG, IgMも低下するが補体系ほど顕著ではない。

以上から、NRCで85%の高度血液交換が可能で、生体が血液を生産するまで有用な酸素運搬体として機能していることが示された。すなわち、外傷などによる高度失血や薬物中毒などのトータルポディーリンスに有用であることが示された。また、免疫能の検討で、体外免疫調整の可能性が示唆された³⁾。

***モルモット・ラット異種心移植**

高度血液交換モデルでトータルポディーリンスと体外免疫調節の可能性が証明された。そこで、免疫学的に、最も厳しい状況である臓器の異種移植でその有効性を検討した。

実験の概要はTable 3.に示した。カフを用いて頸部に異所移植を行った。対照群の平均生存時間は0.1時間、すなわち6分

1. NRCの調製: NRC濃度 7%
5% bovine serum albuminを加え、膠質浸透圧を調整し、血漿浸透圧を300~310mOsm/Kg・H₂Oとした
2. 実験動物: Brown norway (BN) 雄性ラット 体重 220~290g
3. 手 技: 頸動静脈にカニューレションし、脱血とNRC返血をくり返し、ヘマトクリット値を指標として、75~85%の血液を交換した
4. 測定項目: 一般末梢血、血液ガス分析
5. 高度血液交換モデルの作成
 - (1) 動 物: BN系雄性ラット 体重 190~290 g
 - (2) 麻 酔: 酸素投与下エーテル麻酔
 - (3) 手術手技: 頸動静脈にカニューレション頸動脈から1.5ml脱血、頸静脈からNRC1.7mlを返血この操作を10~13回繰り返して、血液交換施行
 - (4) 交換率: (交換前Hct-交換後Hct)/交換前Hct x100(%)

Fig. 4. Model of high dose blood exchange.

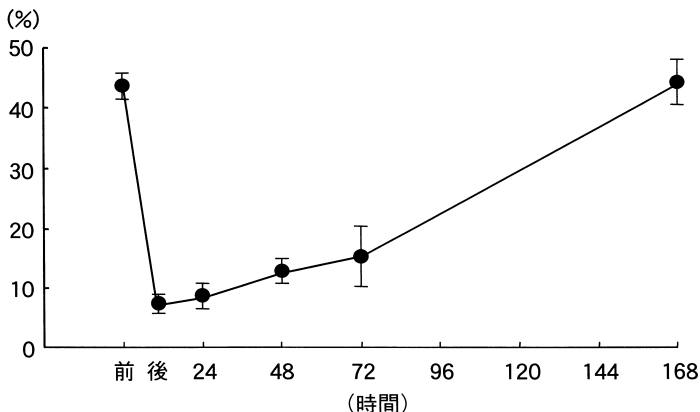


Fig. 5. Change of hematocrit after replasement of NRC.

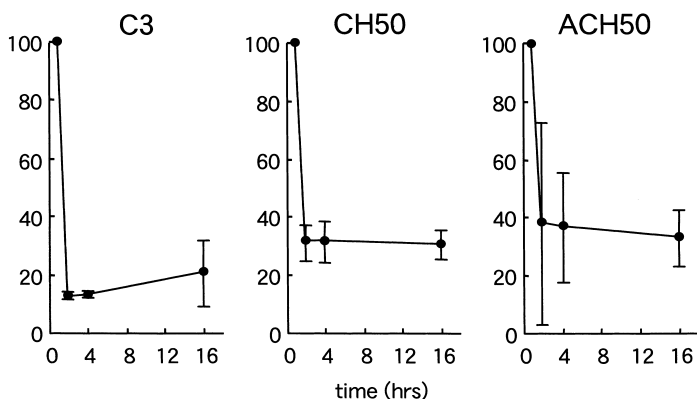


Fig. 6. Change of compliments after replasement of NRC.

前後で移植された心臓は暗赤色となり急性拒絶される。一方、高度血液交換を行った後異種心臓移植を行うと長いものでは16時間前後の生着を得る (Table 4.)。生着時間の6分と16時間は生物学的に大変な差異で血液高度交換がいかに異種移植、免疫不全、薬物中毒などの治療に役立つかを示している。最後に異種移植を行った心臓の組織をFig. 7.に示した。対照群は広範囲の血液凝集、血栓形成を認めるが、高度血液交換群では16時間目にわずかに血栓の形成を認めるのみである⁴⁾。

Table 3. Outline of xenogenic heart transplantation.

- (1) Donor: モルモット(雌性), 体重190-340 g
- (2) Recipient: BN系ラット(雄性), 体重190-290 g
- (3) 手術手技: カフを用いた頸部異所性心移植
- (4) 実験群の設定
 - a) 対照群: 心移植のみ
 - b) 実験群: 血液交換後心移植
- (5) 測定項目
 - a) 血液一般 (白血球, 血液像, ヘマトクリット, 血小板)
 - b) 液性免疫能 (IgG, IgM, C3, ACH50)
 - c) 組織学的検討 (HE染色, C3免疫染色)

4. おわりに

未だ、酸素運搬体は臨床の場に登場していない。しかし、本論文に示したように血液代替物の酸素運搬体の利用は等しく臨床家の待ち望むところである。関係者の方々には一日も早い臨床開発をお願いして、この稿を終わる。

Table 4. Result of survival time in xenogenic heart transplantation.

群	n	生着時間	平均	p value
対照群	3	0.2, 0.2, 0.15	0.1 ± 0.03	
実験群	17	0.40, 2.34, 3.00, 3.15 3.17, 3.50, 4.10, 4.17* 4.18*, 4.30, 5.00, 7.08 8.55*, 10.00, 15.59 16.14, 16.07	6.66 ± 5.16	<0.05

*: 心拍動(+)で死亡

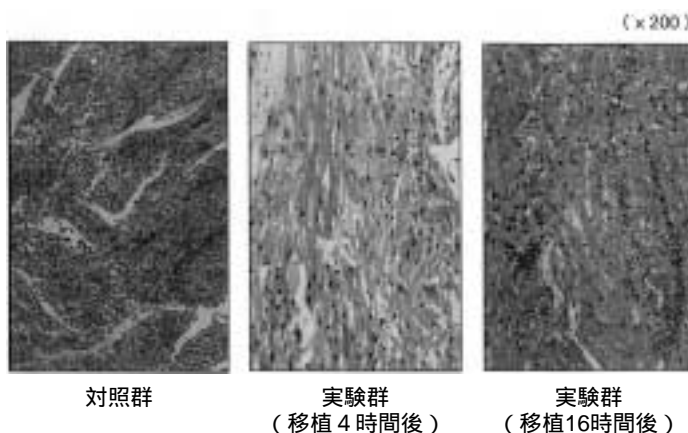


Fig. 7. Histology of xenogenic heart transplantation.

参考文献

- 目黒順一. 室温下灌流法による腎の保存, 及びConditioningと機能判定に関する実験的研究. 日本外科学会誌 1994;95:400-10.
- 高橋昌宏, 柳田尚之, 岡野正裕, 石崎彰, 田中三津子, 目黒順一, 久木田和丘, 玉置透, 米川元樹, 川村明夫. Perfluorochemical乳剤を用いた室温下灌流保護法による血流遮断下肝切除の実験的研究. 人工血液 1995;3:106-11.
- 柳田尚之, 川村明夫, 田中三津子, 玉置透, 米川元樹. NRC (Neo Rec Cell: 血液代替物) による高度血液交換モデルの免疫能. 人工血液 2001;9:42-5.
- 柳田尚之, 玉置透, 川村明夫, 石崎彰, 高橋禎人, 岡野正裕, 高橋昌宏, 田中三津子, 目黒順一, 久木田和丘, 米川元樹, 小島僚太郎. Neo Red Cellによる高度血液交換ラットの免疫学的研究 - 異種免疫反応のメカニズム解明. 日本外科学会雑誌 1997;98(臨時増刊号)172.

ウイルス不活化の現状と課題

Virus Inactivation: Current Status and Subject

阿部英樹，東 寛，平山順一，池田久實

Hideki Abe, Hiroshi Azuma, Junichi Hirayama, Hisami Ikeda

和文抄録

核酸増幅検査の導入など，ウイルススクリーニング検査の向上により輸血用血液製剤によるウイルス感染の危険性はかなり減少したものの，依然として危険性は存在する．その危険性とは，感染直後でウイルスを検出できないウィンドウペリオドの存在や，検査対象となっていないウイルスや原虫，寄生虫の存在，新たにヒトへの感染が広がったウイルスなどに起因する．このように，検査だけでは輸血後感染を防ぐことは困難である．

輸血用血液製剤の安全性を高める一つの方法として，病原体不活化法が開発，実用化されつつある．血漿製剤に対してはメチレンブルー光不活化法，Solvent/Detergent処理法が確立されている．血小板製剤には光増感物質S-59とUVA照射を組み合わせた方法が開発された．その他にも，血漿，血小板，赤血球各製剤に対する不活化法が検討されている．本総説では，それらの不活化機序や不活化効果，導入状況や開発状況について概説する．また，ヘモグロビンを利用した人工酸素運搬体におけるウイルス除去・不活化法についても述べる．

Abstract

Although the risk of virus infection via blood transfusion has been remarkably decreased due to the introduction of a nucleic acid amplification test, the risk of virus transmission still exists. The residual risk is caused by 1) a window period of virus infection, 2) viruses, protozoa and parasites excluded from current screening test and 3) pathogens newly spread in human. Thus, it is difficult to prevent post-transfusion infection only by screening test.

Pathogen inactivation methods have been developing and adopted as one of the way to increase the safety of blood products. Methylene blue photosensitizing and solvent/detergent methods for plasma are already established and in use in some countries. Recently, photochemical compound S-59 plus UVA irradiation method for platelets has been approved in Europe. Other methods are still investigated for plasma, platelets or red cell components. In this review, we outline the mechanisms, effects and status of introduction or development of these methods. In addition, we refer to the method of virus removal and inactivation in hemoglobin solution as a source of artificial oxygen carriers.

Keywords

post-transfusion infection, virus screening test, pathogen inactivation methods, artificial oxygen carriers.

はじめに

輸血によるウイルス感染はスクリーニング検査技術の発展と共に激減してきた．1960年代の売血時代に50%以上あった輸血後肝炎は，献血制度への移行とB型肝炎ウイルス（HBV）の指標となるHBs抗原検査の導入，その後のHBc抗体検査，C型肝炎ウイルス（HCV）抗体検査の導入がなされ激減した．ヒト免疫不全ウイルス（HIV），ヒトリンパ球向性ウイルスI型（HTLV-I）の抗体検査も行われてきた．

これまでの検査は，ウイルスに対する抗体やウイルス抗原を検出する，いわゆる血清学的検査が主体であった．そのため，ウイルスが血液中にあるにも関わらず血清学的検査で陽性と判定されない期間，ウィンドウペリオド（感染直後から抗原又は抗体が検出できるまでの感染の事実を検知できない期間）が存在した．つまり検査で陰性と判定されても血液中にウイルスが存在するため，このウィンドウペリオドが輸血後肝炎の要因の一つと考えられた¹⁾．1999年，ウイルス核酸増幅検査（nucleic

acid amplification test; NAT) が日赤に導入された^{2,3)}。この検査は、血液中で抗体産生が起こる以前の、微量にしか含まれないウイルスの遺伝子を数億倍に増幅し、ウイルスの有無を検出する方法である。欧米各国でも導入されたが、HBVも対象としたのは我が国だけであった^{4,5)}。NATでは500人分の血液をプールし、そのプール検体を用いて検査を行っていたが、検出感度向上を目的として50プールに縮小され、2004年9月には20プールに縮小された。これにより検出感度も向上し、輸血後肝炎と推定される肝炎発症率も減少した。日赤では問診等を含め、複合的な方法で安全な血液の確保に努めているが、現在行われている検査による感染症安全対策をTable 1.に示した。

Table 1. Screening tests regarding infectious agents. (Oct., 2004)

Test issue	Methods
Syphilis	Antibody
HBV	Antigen, Antibody, NAT
HCV	Antibody, NAT
HIV	Antibody, NAT
HTLV-	Antibody
Human parvovirus B19	Antigen, NAT(a part of plasma fractionation)
Liver function(ALT)	Enzyme activity

このように、最新の技術により感染症に関する輸血の安全性は格段に高まってきたが、危険性が全くゼロになったわけではない。NATといえど、感染極初期の微量のウイルスを検出することはできない。つまり、依然としてNATにもウィンドウピリオドは存在する。NATのウィンドウピリオドによると考えられるHIV感染も報告されている⁶⁾。そしてウイルスのみならず、依然として様々な残された危険性 (residual risk) が存在する。それらのうちのいくつかは、動物から人に感染が広がったウイルス、原虫、寄生虫や、ヒトが持つ細菌などである⁷⁾。

米国の血液製剤による細菌感染のリスクは、血液製剤100万単位に対して約10例と報告されている⁸⁾。特に血小板製剤は常温で保存されるため、皮膚常在菌や自覚症状のない菌血症状態の供血者から混入した細菌の増殖が起こり、大きな問題となっている⁹⁾。一方、発展途上国や米国北東部という地域性はあるもののバベシア原虫による血液製剤汚染が深刻な問題となっている¹⁰⁾。バベシア原虫はダニを介して動物から人に感染するが、米国において輸血による感染が報告されている¹¹⁾。我が国では輸入感染症との位置づけであるが、日本においても海外渡航歴も自覚症状も無い供血者からの輸血によりバベシア感染が発生した¹²⁾。また近年、米国ではウエストナイルウイルス (WNV) による鳥の大量死発生に伴い人への感染、および人から人への感染が懸念されたが、輸血による感染が発生した¹³⁾。輸血による感染の証拠は無いが理論的なリスクがあるとして、変異型ク

ロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) の原因因子である異常プリオンが大きな問題となってきたが¹⁴⁾、ついに輸血により感染しうることが報告された¹⁵⁾。国内では、野生獣を食することに起因するE型肝炎ウイルス (HEV) 感染が問題となっているが、輸血を介したHEV感染が確認された¹⁶⁾。現在も改良および開発され、発展しつつあるスクリーニング検査ではあるが、このように検査だけでは、直面している、あるいはこれから遭遇するかも知れない病原体に対する安全性確保には限界があると言わざるを得ない。

現在の病原体不活化法

1990年代に入り、輸血用血液製剤のウイルス不活化法が積極的に研究され始めた。輸血用血液製剤には、細胞成分を含まない血漿製剤 (新鮮凍結血漿) と、細胞成分に治療効果が期待される赤血球製剤および血小板製剤の3種類がある。従って、それぞれの製剤に適切なウイルス不活化法が考案されている。また血液により伝播するウイルスも多種存在するため、より広範囲のウイルスに対して不活化効果を示す方法が要求される。ウイルスはその構造形態から、脂質外被を持つエンベロープウイルスとそれを持たないノンエンベロープウイルスに大別される。輸血により伝播するウイルスにも、両種のウイルスが存在する。ほとんど全てのウイルス不活化法において、ノンエンベロープウイルスは不活化されにくい傾向にある。そして、ウイルスのみならず、細菌、原虫、寄生虫に対しても不活化効果を持つことが示され始めた。これまで様々な化合物および方法が研究されてきたが、研究段階で消滅したものの、臨床試験で副作用が認められ中断したものも数多くある。また病原体不活化効果はあるものの、肝心の血液製剤の品質低下、機能低下を来す方法も報告されてきた。以下に、実際に使用されている方法、あるいは臨床試験に入っているもの、臨床応用を目指して研究がなされているものがあり (Table 2.)、それらについて概説する。また、ヨーロッパにおいて既に導入されている、血漿製剤に対する不活化法や安全性対策 (クアランチン; 検疫保管) をTable 3.にまとめた。

1. Solvent/Detergent (S/D)

100~1,000人分 (各国で異なる) の同一血液型の新鮮凍結血漿を融解後プールし、有機溶剤として1% (w/v) tri(n-butyl)phosphate, 界面活性剤として1% (w/v) Triton X-100を添加し、30~4時間処理する。添加したtri(n-butyl)phosphateとTriton X-100を植物油による抽出とC18逆相カラムにより除去した後、適当な容量に分注し凍結保存する¹⁷⁾。

S/D処理によるウイルス不活化は、多くのエンベロープウイルスで5 log₁₀以上の不活化が可能である。加えて、WNVも容易に不活化できることが示された¹⁸⁾。しかし、ノンエンベロープウイルスであるA型肝炎ウイルス (HAV) やヒトパルボウイルスB19を不活化することはできない。現在、分画原料血漿はヒトパルボウイルスB19のNATが行われており、基準値以上のウイルス陽性血漿は用いられていない。

Table 2. Pathogen inactivation methods and blood components.
(Oct., 2004)

Compound	Developer	Principle	Blood component	Status
Solvent/Detergent	Octapharma	Physicochemical	Plasma	In the market
Methylene blue	Macopharma	Photosensitization	Plasma	In the market
	Baxter			
	Grifols			
S-59	Cerus/Baxter	Photochemical	Platelet Plasma	In the market Phase
Riboflavin	Navigant	Photosensitization	Platelet Plasma Red cell	Phase / Pre-clinical Pre-clinical
Tionine	German Red Cross	Photosensitization	Platelet	Pre-clinical
Inactine	Vitex	Physicochemical	Red cell	Phase
Dimethylmethylene blue	American Red Cross	Photosensitization	Red cell	Pre-clinical

ヨーロッパでは、Octapharma社がS/D血漿の製造ライセンスを取得し、1992年以来、500万単位のS/D血漿が輸血されてきているが、現在までウイルス感染例も含め副作用例の報告はない。

2. メチレンブルー

メチレンブルーによる血漿中ウイルスの不活化法は、ドイツのシュプリング血液センターで開発された¹⁹⁾。S/D処理との大きな違いは、血漿をプールせず、個々の単一血液バッグに対し不活化処理を行う点である。メチレンブルーは可視光照射により励起され、一重項酸素を生成して、ウイルスを不活化する²⁰⁾。主としてウイルスの核酸が標的となり、ウイルス遺伝子に傷害を与えることで感染性を除去する^{21, 22)}。また、ウイルスタンパク質にも影響を及ぼすことも分かっている²³⁾。

メチレンブルーは細胞外ウイルスに対しては不活化効果があるが、細胞内ウイルスに対しては効果がない。そのためシュプリング血液センターで行われていた方法は、血漿の凍結融解を行うことにより白血球を破壊し、その後メチレンブルー光処理を行うことにより細胞内ウイルスの不活化を達成してきた。この方法により、HIV ($>2.7 \log_{10}$)、vesicular stomatitis virus (VSV) ($>5.7 \log_{10}$)、単純ヘルペスウイルス ($>3.0 \log_{10}$)、インフルエンザウイルス ($>5.5 \log_{10}$) の不活化率が得られ、再度融解後の凝固因子活性は第Ⅰ因子等ほぼ80%以上保持されている¹⁹⁾。しかし、脂質エンベロープを持たないウイルス (HAV等) の不活化には効果がない。二次元電気泳動上も血漿タンパク質の変化はみられず²⁴⁾、新たな抗原性の獲得も確認されていない²⁵⁾。この方法では、添加したメチレンブルーを除去することなく、輸血に使用されてきた。メチレンブルーは光増

Table 3. Current measures for plasma safety. (Oct., 2004)

Country	Measures for plasma safety
Austria	S/D
Italy	MB, S/D
United Kingdom	MB, S/D
Netherlands	Quarantine
Greece	MB
Switzerland	S/D, Quarantine
Spain	MB, Quarantine
Denmark	S/D, Quarantine
Germany	S/D, Quarantine
France	S/D, Quarantine
Belgium	MB
Portugal	S/D

Quarantine: Donated plasma is frozen and stored for 6 months. Based on the confirmation that the donor is negative for virus markers on 6 month after first donation, the plasma can be supplied for clinical use.

感作用を示したのち構造変化を来たし、leukomethylene blue, azure A, B, and C, チオニンになる。より安全な製剤とするため、白血球とメチレンブルーを同時に除去するフィルターが開発された²⁶⁾。このフィルターにより、血漿中 $1 \mu\text{M}$ のメチレンブルーは検出限界以下の $0.05 \mu\text{M}$ に低下し、白血球も $3 \log_{10}$ の除去が可能であった。

一方、新鮮血漿からフィルターにより白血球を除去した後、メチレンブルー光処理を行う方法もある。Baxter社により開発された白血球除去フィルターとメチレンブルー溶液を組み込んだシステムでは、細胞外および細胞内HIVの感染性をそれぞれ $6 \log_{10}$ 以上および検出限界以下にまで低下させることができた²⁷⁾。不活化処理後1年間凍結保存した後も、凝固活性は未処理のものほとんど変わらず、第Ⅰ因子活性、フィブリノーゲン活性もそれぞれ76%以上、84%以上、維持されていた。

現在ヨーロッパの多くの国で用いられているメチレンブルー光不活化システムは、Macopharma社により開発されたMACO-TRONIC照射装置にPLASMAFLEX (白血球除去)、BLUEFLEX (メチレンブルー除去) フィルターを組み合わせたものである²⁸⁾。血漿バッグを無菌的チューブ接続装置によりメチレンブルーバッグシステムと連結し、白血球除去フィル

ターを通過させた後、タブレット状のメチレンブルーを溶解しながら光照射バッグに血漿を移送する。血漿量が235-315 mlであれば、メチレンブルー濃度は1 μ M前後になる。一度に4バッグを照射でき、照射時間は20分以内である。これまでの多くの報告と同様、ほぼ全てのエンベロープウイルスを不活化することが可能であり (Table 4.)²⁹⁾、近年米国を震撼させたWNVも不活化できる³⁰⁾。加えて、今まで困難とされてきたヒトパルボウイルスB19の不活化も、可能であることが示された³¹⁾。

Table 4. Effects of methylene blue phototreatment on virus inactivation²⁹⁾.

Lipid enveloped		Non-lipid enveloped	
Virus	Log reduction	Virus	Log reduction
HIV	>5.5	HAV	0.0
Bovine viral diarrhea	>6.2	Encephalomyocarditis	0.0
Duck HBV	3.9	Porcine parvovirus	0.0
Influenza	5.1	Polio	0.0
Pseudorabies	5.4	Simian virus40	4.3
Herpes simplex	>6.5	Adenovirus	4.0
Vesicular stomatitis	>4.9	Human parvovirus B19	>4.0
West Nile	>6.5	Calicivirus	>3.9

ヨーロッパでは3種類のメチレンブルー処理方式があるが、どの方式によっても凝固因子活性、特にフィブリノーゲン、第因子、第因子活性が10-20%低下することが分かっている^{19, 32-34)}。種類の異なる白血球除去フィルターやメチレンブルー除去フィルターによる凝固因子活性への影響は無いが、メチレンブルー処理前の凍結は僅かに低下を引き起こす³⁴⁾。またフィルターによっては血漿タンパク質の活性化など、影響を及ぼすものもあるようである³²⁾。ヨーロッパでは長年に渡り、安全に使用されてきているメチレンブルー血漿であるが、いかに凝固活性を保持させるか、今後の検討が必要かも知れない。

3. S-59 (amotosalen)

ソラレンはある種の高等植物に含まれる化合物で、多くの天然誘導体が存在する。紫外線領域の光を吸収し、その光増感作用により殺菌、殺ウイルス作用を示す。核酸一本鎖あるいは二重鎖に入り込んだ (intercalation) ソラレンは、UV照射により励起される核酸と共有結合し (monoadduct, crosslinking) 、そこでDNAおよびRNAポリメラーゼ反応を遮断することにより、ウイルスの複製、細菌の増殖を阻害する。さらには白血球の機能も阻害する。S-59は血小板製剤および血漿製剤の病原体不活化を行うことができる。血小板製剤は22-24 で保存するため、細菌の混入、増殖が大きな問題となっている。血小板製剤のウイルス不活化法では、ウイルスのみならず殺菌効果も重要となる。

Cerus社は、100種類以上の新たに合成されたソラレン化合物

の中から、易溶性かつ細胞侵入性を持ち、核酸親和性が高く、最もウイルス不活化効果の高い化合物としてS-59を見いだした³⁵⁾。INTERCEPTと呼ばれるこの方法は、血小板を32-47%の血漿を含む血小板保存液PAS3に浮遊し、不活化処理バッグシステムに無菌的に接続してS-59溶液と混合し、終濃度約150 μ Mとする。一度に2バッグを照射できる装置にセットし、UVAを照射する。その後、S-59吸着剤の入ったバッグに血小板を移して4-16時間振盪保存し残留S-59を除去し、輸血に供する。

各種ウイルスの不活化率をTable 5.にまとめた。S-59システムはウイルス以外にも、細菌や原虫の不活化にも有効である³⁵⁻³⁸⁾。血小板製剤に混入する危険性の高いグラム陽性表皮ブドウ球菌は>6.6 log₁₀以上、グラム陰性肺炎桿菌は>5.6 log₁₀以上不活化でき、5日間保存においても血小板製剤中に当該細菌は検出されない。S59/UVA処理血小板製剤の生化学的指標 (pH, グルコース量, 乳酸量など) および機能 (凝集能, 血小板形態変化, 浸透圧抵抗性など) は、7日保存後も未処理の製剤と同等である³⁵⁾。また、Tリンパ球の機能を抑制することから、輸血後GVHDや同種抗原感作の防止、保存中に蓄積するサイトカインが一因ともなる非溶血性副作用の防止にも有効であると考えられる³⁹⁻⁴¹⁾。

Table 5. Effects of S-59/UVA phototreatment on virus inactivation⁴³⁾.

Lipid enveloped		Non-lipid enveloped	
Virus	Log reduction	Virus	Log reduction
HIV (cell-free)	>6.2	Blue tongue	6.1-6.4
HIV (cell-associate)	>6.1	Human parvovirus B19	4.0-4.9
HBV	>5.5		
Duck HBV	>6.2		
HCV	>4.5		
HTLV /	4.7/5.1		
Cytomegalovirus	>5.9		
Bovine viral diarrhea	>6.0		
West Nile	>6.0		

ヨーロッパにおいて103名の血小板減少性患者に対し、第相臨床試験が行われた (euroSPRIT)⁴²⁾。長期的回帰分析の結果、投与1時間および24時間後の血小板数増加補正值に両群間で差はなかったが、輸血血小板数、輸血前の血小板保存期間、輸血前患者血小板数、患者体重により、統計的有意差が見られた。血小板輸血に関連する副作用 (発熱, 悪寒, 発疹等) は見られたが、両群間で有意差は無かった。これらのことから、S-59/UVA処理血小板はこれまでの血小板と同等な臨床効果が得られると結論づけられた。次に治療効果と安全性に関する第相臨床試験が米国で行われた (SPRINT)⁴³⁾。対象患者はWHO基準のgrade 2出血傾向を示す患者645名で、血小板輸血による

維持療法効果を検討した。この検討からも、S-59/UV処理血小板製剤の治療効果は十分であると結論づけられた。ヨーロッパではCE Markを取得し、5カ国（ノルウェー、イタリア、スペイン、ベルギー、ポルトガル）の8血液センターで使用され⁴⁴⁻⁴⁷、既に1500例の輸血例がある（2004年1月時点、FRENCH BLOOD ASSOCIATION-EFS報告）。

また、INTERCEPTシステムS-59/UVAの血漿への応用も進められている。メチレンブルーと同様、個々の血液バッグに不活化処理を行う。安全性、毒性試験もクリアし⁴⁸、第 因子活性の回復能は標準血漿と同等であることが示された⁴⁹。現在、第 相臨床治験が進められている。

4. リボフラビン

リボフラビンはビタミンB₂として生体に必須の栄養素である。平面構造を持つリボフラビンは、ウイルスや細菌、細胞内の核酸にインターカレートし、光増感作用により核酸に傷害を与え、遺伝子の複製や転写を阻害する⁵⁰。リボフラビンの特徴として、血漿、血小板、赤血球の3製剤への適用が検討されていることである。

血漿に浮遊した血小板製剤にリボフラビン溶液を加え（血漿濃度90%）、UVを照射する。リボフラビンは必須栄養素の一つであることから、その毒性は無いに等しい。また光照射により分解産物であるルミクロームが生成するが、新生児黄疸の治療に光線療法が用いられてきた経験からしても、ルミクロームの毒性もほとんど無いといえる。従って、リボフラビン光処理した製剤からは、薬剤を除く必要がないといえる。

血小板製剤に添加した病原体は、cell-free/associate HIVでは5.9 log₁₀、latent HIVでは4.5 log₁₀、porcine parvovirusでは5.0 log₁₀、WNVでは5.2 log₁₀、細菌も、表皮ブドウ球菌では>4.2 log₁₀、大腸菌では>4.4 log₁₀の不活化率が得られた⁵¹。リボフラビン光処理血小板製剤は、保存により血小板数、pHは減少し、乳酸値、グルコース消費量、形態スコア、P-セレクチン発現量（活性化マーカー）が有意に上昇した^{51,52}。しかし、このような変化も臨床使用上には大きな問題にはならないだろうと著者らは考えている。

5. チオニン

チオニンはメチレンブルーと同じフェノチアジン系色素であり、UV領域と可視領域に吸収波長を持つ。光吸収したチオニンは光増感作用を示し、ウイルス、細菌等の遺伝子に傷害を与える。メチレンブルー光処理では血小板の機能を損なうことから、血小板製剤の病原体不活化法としてチオニンが検討され始めている。血小板浮遊液に添加した各種エンペロウイルスは、チオニン1 μMと可視光照射により5-6 log₁₀以上不活化された⁵³。一方、白血球や細菌はチオニン/可視光照射では不活化されず、その処理に引き続いてUVB照射を行うことにより不活化効果が得られたものの、血漿含量が30%になるとその不活化効果は減弱した。

6. Inactine (PEN110)

Inactine (PEN110) はエチレンイミン多量体で、易水溶性、陽性荷電、核酸指向性を高めた、新規に合成された化合物である。陽性荷電であるため陰性荷電の核酸に静電的に結合し、特にグアニン塩基をアルキル化して、塩基の破壊とDNA/RNA鎖の切断を起こし、そこで複製、転写を阻害する。これにより多くの病原体が感染性を失う。他の色素化合物と異なり、光照射を必要としない。

赤血球保存液を含むヘマトクリット60-70%の赤血球製剤にPEN110を終濃度0.1% (vol/vol) で混合し、室温で放置する。それによりエンペロウイルスは早いもので3時間後に感染性が検出限界以下となり、5-7 log₁₀の不活化率 (VSV, Sindbis virus) が得られる。中でも、不活化が困難とされている多くのノンエンペロウイルスも18時間処理することにより、検出限界以下まで不活化することが出来る (>6.2 log₁₀, porcine parvovirus)⁵⁴。またウイルスとして最も問題となるHIVや、米国を震撼させたWNVにも効果がある^{55,56}。赤血球製剤に特徴的な病原体としては、赤血球に寄生するマラリア原虫、赤血球製剤の保存温度である4-6 °Cでも増殖をするエルシニア菌等がある。PEN110はそれら病原体も不活化できることが報告されている^{57,58}。

前臨床および第 相臨床治験においては、PEN110処理後、赤血球を0.2% dextrose/0.9% NaClで洗浄して除去し、実験に供した。洗浄によりPEN110濃度は50 ng/mL以下となる。その結果、bovine viral diarrhea virusは>5.7 log₁₀、porcine parvovirusは>5.9 log₁₀不活化された⁵⁹。42日間保存しても、細胞内、細胞外K濃度、溶血率、ATPレベル、pHについて、対照群との間に臨床的に問題となるような差はみられていない。ヒトへの輸血実験において、両群間で赤血球の生存率に差は無かった。健康人ボランティア12名による第 相臨床治験においても、24時間生存率や生体内半減期に、PEN110処理群と対象群の間に差はみられておらず、副作用の報告もない⁶⁰。

7. ジメチルメチレンブルー

ジメチルメチレンブルーはメチレンブルー誘導体であり、より疎水性が強くなって膜透過性が良好な、赤色光により励起される光増感色素である。ジメチルメチレンブルーのDNAに対する親和性はメチレンブルーの約10倍で、一重項酸素の量子収率（吸収した光子数に対して生成した一重項酸素数の比）は0.76とメチレンブルーの0.5よりも大きい⁶¹。ジメチルメチレンブルーによるウイルス不活化作用の一機序は、一重項酸素による核酸傷害だと考えられる⁶²。

ジメチルメチレンブルーによる赤血球製剤の不活化は、ヘモグロビンの吸収波長と重ならない600 nm以上の光が有効である。通常の赤血球製剤はヘマトクリットが60%であるため、照射光が色素まで効率的に届かないため、病原体不活化効果を得るためには、ヘマトクリットを30%にまで低下させる必要がある。その結果、種々の細胞内、細胞外ウイルスの不活化が可能となり、赤血球に及ぼす影響も、溶血率はコントロール群に比

べ若干上昇するものの臨床上許容範囲内であり、形態スコア、カリウムイオン漏出、ATPおよび2,3-DPGレベルはコントロール群とほぼ同程度であった⁶³⁾。また白血球の不活化も可能であり⁶⁴⁾、色素濃度を高くし、光源をエネルギーの大きい赤色発光ダイオードにすることにより、ヘマトクリット45%においてもウイルス不活化が可能となった⁶⁵⁾、赤血球膜への酸化傷害もより大きくなるため、カリウムイオンの漏出を防ぐことが出来なかった⁶⁶⁾。ジメチルメチレンブルー処理による溶血とカリウムイオン漏出は、赤血球膜タンパク質に特異的に結合するジピリダモールと、ビタミンEの水溶性アナログであるTroloxの添加により、ウイルス不活化能に影響を及ぼすことなく防ぐことができる^{67,68)}。

人工酸素運搬体のウイルス不活化

ヒトあるいはウシのヘモグロビンを基にする人工酸素運搬体では、生物由来のタンパク質を原料とするため、その製造工程には積極的なウイルス除去・不活化工程を組み込まなければならない。

一般的に、ウイルス除去・不活化工程は、溶血後、赤血球膜成分を取り除いたヘモグロビン溶液に対して行われる。タンパク質溶液となるため、加熱処理による不活化、膜による除去が主流である。また有機溶剤と界面活性剤による方法も検討された⁶⁹⁾。近年、テルモ社がこの方法を検討している⁷⁰⁾。赤血球浮遊液に終濃度0.3% tri(n-butyl)phosphateと0.2% Triton X-100を直接加え、8.5 で12時間処理する。添加したウイルスは直ちに不活化され、0.5時間後には $>6 \log_{10}$ 以上の不活化率が得られた。タンパク質への影響も無く、ヘモグロビンのメト化も起こらなかった。

加熱処理ではヘモグロビンがメト化してしまうため、脱酸素状態にしてメト化を防ぐ。ヘモグロビン溶液を60 , 10時間処理により不活化が可能である⁷¹⁾。また、ヘモグロビン溶液を74 , 90分間加熱することにより、 $7 \log_{10}$ 以上の不活化率が得られたと報告されている⁷²⁾。より厳密な脱酸素化には電気化学的方法が用いられ、62 , 10時間の処理によりVSVを検出限界以下まで不活化でき、もともと存在しているメトヘモグロビンを変性させ不溶化させることにより、ヘモグロビンの純度を上げることができる⁷³⁾。一方、ヘモグロビンのヘムをCO化することにより熱安定性を持たせることができ、熱処理により他のタンパク質を変性させ不溶化してヘモグロビンの純度を上げることができる⁷⁴⁾。この方法によってもVSVは $>6 \log_{10}$ 不活化され、メトヘモグロビンの生成も認められなかった⁷⁵⁾。しかし、この報告では耐熱性とされるノンエンベロープウイルスの結果は示されていない。ノンエンベロープウイルスの代表であるヒトパルボウイルスB19は、その感染性アッセイ法が煩雑であったことから、同じパルボウイルス属に属し*in vitro*アッセイが可能なイヌパルボやブタパルボがモデルウイルスとして用いられてきた。そしてその両パルボウイルスが耐熱性を示すことから、ヒトパルボウイルスB19も耐熱性であると考えられてきた。しかし、ヒトパルボウイルスB19感受性細胞株が作成され、そ

れを用いた*in vitro*アッセイの結果、ヒトパルボウイルスB19は加熱処理により感染性を失うことが示された⁷⁶⁾。従って、CO化ヘモグロビン加熱処理により、ヒトパルボウイルスB19も十分不活化されているものと推測される。

膜によるウイルス除去も、効果的である。多くの場合限外濾過膜が用いられるが^{77,78)}、血漿分画製剤のウイルス除去工程に採用されている再生セルロース中空糸モジュールによるナノフィルトレーションにより、ヒトパルボウイルスを $>6 \log_{10}$ 除去することができ、メト化も亢進しない⁷⁹⁾。また濾過速度も大量処理に向いており、ヘモグロビン回収率も90%以上であり、小径ウイルスであるバクテリオファージ X174の除去率も $>7.7 \log_{10}$ であった⁸⁰⁾。

赤血球製剤の病原体不活化に用いられる光増感色素も、ヘモグロビン溶液のウイルス不活化法として検討された。ジメチルメチレンブルーによるVSV不活化では $6.4 \log_{10}$ の不活化率が得られており、メト化も亢進せず、酸素親和性にも影響はなかった⁸¹⁾。ジメチルメチレンブルーは溶液中で単量体と二量体として存在するが、単量体のみを励起させることにより、ヘモグロビンの酸化を来すことなくウイルス不活化効果が得られる。ジメチルメチレンブルーによるウイルス不活化には一重項酸素が関与していると報告されている⁸²⁾。ジメチルメチレンブルーは核酸指向性が強いいため、核酸を持つウイルスを不活化するが、ヘモグロビン溶液中に存在する多くの抗酸化酵素への影響は少ない。スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼの活性は、VSVを $6 \log_{10}$ 不活化する条件においても95%以上維持され、還元型グルタチオン濃度も同様に維持されていた⁸²⁾。

このように、人工酸素運搬体の原料となるヘモグロビン溶液のウイルス不活化法は様々であるが、より安全性の高い原料の製造には、原理の異なる複数の方法で処理することも重要である。

今後の課題

輸血用血液の安全性を確保するためウイルス不活化は必須であるが、現時点で実用化されているのは血漿製剤に対するS/D法及びMB/光照射法であり、血小板製剤に対してはS-59/UVA照射である。しかし、赤血球製剤については臨床治験に入っているものもあるが、多くは未だ前臨床試験段階であり、実用化には今しばらく時間を要すると思われる。ウイルス感染の防止は、全ての輸血用血液製剤に不活化処理が施されなければ成し得ない。また、現行の方法に変わる技術開発も進んでおり、より良い方法が開発される可能性も含んでいる。それ故、いずれの方法が最も優れているのか、あるいは我が国の血液事業に合致しているのか、まだ決断を下すことはできない。いずれの方法も、ウイルスのみならず、細菌、原虫、寄生虫などのほか白血球も不活化の対象としている点が重要である。多くの選択肢の中から、我が国にとって最良な方法を採用していくことが今後の課題となるが、その議論は企業の開発速度に依存せざるを得ない。

現在の輸血によるウイルス感染リスクは数万分の一から数十万分の一であるが、国民意識としては、100%感染の恐れのない安全な血液製剤を求める風潮にある。さらに米国でのWNV感染や本邦でのHEV感染など、今まで考えられなかった事例が起こり始めている。どこまで輸血の安全性を高めるかは種々の見解があるが、対費用効果の分析が重要であることは異論のないところであろう。しかしながら今後輸血後ウイルス感染を完全に防止するためには、血液製剤のウイルス不活化が最も有望な方法であると考えられる。新たな技術導入に伴う、設備投資費用、医療費高騰などの議論も今後の課題となる。加えて、製剤に添加された薬剤は各種毒性試験で安全とされる濃度まで除去されているが、それでも尚、血液製剤中に残存した不活化剤による長期毒性や、妊婦や小児への影響なども、懸念として残る。

病原体不活化法は、NAT、放射線照射、保存前白血球除去などととも、輸血用血液製剤の安全対策の一つである。したがって、他の安全対策との関わりを整理し、効率良い導入を考えていかなければならない。

引用文献

1. Matsumoto C, Tadokoro K, Fujimura K, Hirakawa S, Mitsunaga S, Juji T. Analysis of HBV infection after blood transfusion in Japan through investigation of a comprehensive donor specimen repository. *Transfusion* 2001;41:878-84.
2. Japanese Red Cross NAT Screening Research Group. Nationwide nucleic acid amplification testing of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 for blood transfusion and follow-up study of nucleic acid amplification positive donors(Erratum in: *Jpn J Infect Dis* 2000 Oct;53(5)219) *Jpn J Infect Dis* 2000;53:116-23.
3. Tomono T, Murokawa H, Minegishi K, Yamanaka R, Lizuka HY, Miyamoto M, Satoh S, Nakahira S, Murozuka T, Emura H, Doi Y, Mine H, Yokoyama S, Ohnuma H, Tanaka T, Yoshikawa A, Nishioka K, Japanese Red Cross NAT Screening Research Group. Status of NAT screening for HCV, HIV and HBV: experience in Japan. *Dev Biol (Basel)* 2002;29-39.
4. Tabor E, Epstein JS. NAT screening of blood and plasma donations: evolution of technology and regulatory policy. *Transfusion* 2002;42:1230-7.
5. Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Sally C, Wright DJ, Dodd RY, Busch MP, National Heart Lung and Blood Institute Nucleic Acid Test Study Group. Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. *N Engl J Med* 2004;351:760-8.
6. Phelps R, Robbins K, Liberti T, Machuca A, Leparo G, Chamberland M, Kalish M, Hewlett I, Folks T, Lee LM, McKenna M. Window-period human immunodeficiency virus transmission to two recipients by an adolescent blood donor. *Transfusion* 2004;44:929-33.
7. Dodd RY, Leiby DA. Emerging infectious threats to the blood supply. *Annu Rev Med* 2004;55:191-207.
8. Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR, Gregory KR, Elder KV, Schreiber GB, Arduino MJ, Holt SC, Carson LA, Banerjee SN, Jarvis WR. Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion* 2001;41:1493-9.
9. Dodd RY. Bacterial contamination and transfusion safety: experience in the United States. *Transfus Clin Biol* 2003;10:6-9.
10. Dodd RY. Transmission of parasites and bacteria by blood components. *Vox Sang* 2000;78(suppl 2)239-42.
11. Herwaldt BL, Neitzel DF, Gorlin JB, Jensen KA, Perry EH, Peglow WR, Slemenda SB, Won KY, Nace EK, Pieniazek NJ, Wilson M. Transmission of *Babesia microti* in Minnesota through four blood donations from the same donor over a 6-month period. *Transfusion* 2002;42:1154-8.
12. Wei Q, Tsuji M, Zamoto A, Kohsaki M, Matsui T, Shiota T, Telford 3rd SR, Ishihara C. Human babesiosis in Japan: isolation of *Babesia microti*-like parasites from an asymptomatic transfusion donor and from a rodent from an area where babesiosis is endemic. *J Clin Microbiol* 2001;39:2178-83.
13. Harrington T, Kuehnert MJ, Kamel H, Lanciotti RS, Hand S, Currier M, Chamberland ME, Petersen LR, Marfin AA. West Nile virus infection transmitted by blood transfusion. *Transfusion* 2003;43:1018-22.
14. Budka H. Prions and transfusion medicine. *Vox Sang* 2000;78(suppl 2)231-8.
15. Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 2004;363:417-21.
16. Matsubayashi K, Nagaoka Y, Sakata H, Sato S, Fukai K, Kato T, Takahashi K, Mishiro S, Imai M, Takeda N, Ikeda H. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 2004;44:934-40.
17. Horowitz B, Bonomo R, Prince AM, Chin SN, Brotman B, Shulman RW. Solvent/Detergent-treatment plasma: A virus-inactivated substitute for fresh frozen plasma. *Blood* 1992;79:826-31.
18. Kreil TR, Berting A, Kistner O, Kindermann J. West Nile virus and the safety of plasma derivatives: verification of high safety margins, and the validity of predictions based

- on model virus data. *Transfusion* 2003;43:1023-8.
19. Lambrecht B, Mohr H, Knuver-Hopf J, Schmit H. Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light. *Vox Sang* 1991;60:207-13.
 20. Abe H, Ikebuchi K, Wagner SJ, Kuwabara M, Kamo N, Sekiguchi S. Potential involvement of both Type I and Type II mechanisms in M13 virus inactivation by methylene blue photosensitization. *Photochem Photobiol* 1997;66:204-8.
 21. Abe H, Wagner SJ. Analysis of viral DNA, protein and envelope damage after methylene blue, phthalocyanine derivatives, or merocyanine 540 photosensitization. *Photochem Photobiol* 1995;61:402-9.
 22. Bachmann B, Knuver-Hopf J, Lambrecht B, Mohr H. Target structures for HIV-1 inactivation by methylene blue and light. *J Med Virol* 1995;47:172-8.
 23. Owada T, Yamada Y, Abe H, Hirayama J, Ikeda H, Sekiguchi S, Ikebuchi K. Elucidation of the HIV-1 virucidal mechanism of methylene blue photosensitization and the effect on primary isolates. *J Med Virol* 2000;62:421-5.
 24. Tissot JD, Hochstrasser DF, Schneider B, Morgenthaler JJ, Schneider P. No evidence for protein modifications in fresh frozen plasma after photochemical treatment: an analysis by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *Br J Haematol* 1994;86:143-6.
 25. Mohr H, Knuver-Hopf J, Lambrecht B, Scheidecker H, Schmitt H. No evidence for neoantigens in human plasma after photochemical virus inactivation. *Ann Hematol* 1992;65:224-8.
 26. AuBuchon JP, Pickard C, Herschel L, O'Connor JL, Lee E. Removal of methylene blue from plasma via an adsorbent filter. *Vox Sang* 1998;74:1-6.
 27. Abe H, Yamada-Ohnishi Y, Hirayama J, Owada T, Ikeda H, Ikebuchi K. Elimination of both cell-free and cell-associated HIV infectivity in plasma by a filtration/methylene blue photoinactivation system. *Transfusion* 2000;40:1081-7.
 28. Hornsey VS, Drummond O, Young D, Docherty A, Prowse CV. A potentially improved approach to methylene blue virus inactivation of plasma: the Maco Pharma Maco-Tronic system. *Transfus Med* 2001;11:31-6.
 29. Williamson LM, Cardigan R, Prowse CV. Methylene blue-treated fresh-frozen plasma: what is its contribution to blood safety? *Transfusion* 2003;43:1322-9.
 30. Mohr H, Knuver-Hopf J, Gravemann U, Redecker-Klein A, Muller TH. West Nile virus in plasma is highly sensitive to methylene blue-light treatment. *Transfusion* 2004;44:886-90.
 31. Mohr H, Bachmann B, Klein-Struckmeier A, Lambrecht B. Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light. *Photochem Photobiol* 1997;65:441-5.
 32. Riggert J, Humpe A, Legler TJ, Wolf C, Simson G, Kohler M. Filtration of methylene blue-photooxidized plasma: influence on coagulation and cellular contamination. *Transfusion* 2001;41:82-6.
 33. Suontaka AM, Blomback M, Chapman J. Changes in functional activities of plasma fibrinogen after treatment with methylene blue and red light. *Transfusion* 2003;43:568-75.
 34. Garwood M, Cardigan RA, Drummond O, Hornsey VS, Turner CP, Young D, Williamson LM, Prowse CV. The effect of methylene blue photoinactivation and methylene blue removal on the quality of fresh-frozen plasma. *Transfusion* 2003;43:1238-47.
 35. Lin L, Cook DN, Wieseahn GP, Alfonso R, Behrman B, Cimino GD, Corten L, Damonte PB, Dikeman R, Dupuis K, Fang YM, Hanson CV, Hearst JE, Lin CY, Londe HF, Metchette K, Nerio AT, Pu JT, Reames AA, Rheinschmidt M, Tessman J, Isaacs ST, Wollowitz S, Corash L. Photochemical inactivation of viruses and bacteria in platelet concentrates by use of a novel psoralen and long-wavelength ultraviolet light. *Transfusion* 1997;37:423-35.
 36. Knutson F, Alfonso R, Dupuis K, Mayaudon V, Lin L, Corash L, Hogman CF. Photochemical inactivation of bacteria and HIV in buffy-coat-derived platelet concentrates under conditions that preserve in vitro platelet function. *Vox Sang* 2000;78:209-16.
 37. Lin L, Dikeman R, Molini B, Lukehart SA, Lane R, Dupuis K, Metzel P, Corash L. Photochemical treatment of platelet concentrates with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light inactivates a broad spectrum of pathogenic bacteria. *Transfusion* 2004;44:1496-504.
 38. Jordan CT, Saakadze N, Newman JL, Lezhava LJ, Maiers TT, Hillyer WM, Roback JD, Hillyer CD. Photochemical treatment of platelet concentrates with amotosalen hydrochloride and ultraviolet A light inactivates free and latent cytomegalovirus in a murine transfusion model. *Transfusion* 2004;44:1159-65.
 39. Grass JA, Wafa T, Reames A, Wages D, Corash L, Ferrara JL, Lin L. Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by photochemical treatment. *Blood* 1999;93:3140-7.
 40. Grass JA, Hei DJ, Metchette K, Cimino GD, Wieseahn GP, Corash L, Lin L. Inactivation of leukocytes in platelet concentrates by photochemical treatment with psoralen plus UVA. *Blood* 1998;91:2180-8.
 41. Hei DJ, Grass J, Lin L, Corash L, Cimino G. Elimination of

- cytokine production in stored platelet concentrate aliquots by photochemical treatment with psoralen plus ultraviolet A light. *Transfusion* 1999;39:239-48.
42. van Rhenen D, Gulliksson H, Cazenave JP, Pamphilon D, Ljungman P, Kluter H, Vermeij H, Kappers-Klunne M, de Greef G, Laforet M, Lioure B, Davis K, Marblie S, Mayaudon V, Flament J, Conlan M, Lin L, Metzler P, Buchholz D, Corash L, euroSPRITE trial. Transfusion of pooled buffy coat platelet components prepared with photochemical pathogen inactivation treatment: the euroSPRITE trial. *Blood* 2003;101:2426-33.
 43. McCullough J, Vesole DH, Benjamin RJ, Slichter SJ, Pineda A, Snyder E, Stadtmauer EA, Lopez-Plaza I, Coutre S, Strauss RG, Goodnough LT, Frیده JL, Raife T, Cable R, Murphy S, Howard 4th F, Davis K, Lin JS, Metzler P, Corash L, Koutsoukos A, Lin L, Buchholz DH, Conlan MG. Therapeutic efficacy and safety of platelets treated with a photochemical process for pathogen inactivation: the SPRINT Trial. *Blood* 2004;104:1534-41.
 44. Picker SM, Speer R, Gathof BS. Evaluation of processing characteristics of photochemically treated pooled platelets: target requirements for the INTERCEPT Blood System comply with routine use after process optimization. *Transfus Med* 2004;14:217-23.
 45. Picker SM, Speer R, Gathof BS. Functional characteristics of buffy-coat PLTs photochemically treated with amotosalen-HCl for pathogen inactivation. *Transfusion* 2004;44:320-9.
 46. Jansen GA, van Vliet HH, Vermeij H, Beckers EA, Leebeek FW, Sonneveld P, van Rhenen DJ. Functional characteristics of photochemically treated platelets. *Transfusion* 2004;44:313-9.
 47. Janetzko K, Lin L, Eichler H, Mayaudon V, Flament J, Kluter H. Implementation of the INTERCEPT Blood System for Platelets into routine blood bank manufacturing procedures: evaluation of apheresis platelets. *Vox Sang* 2004;86:239-45.
 48. Ciaravino V, McCullough T, Cimino G, Sullivan T. Preclinical safety profile of plasma prepared using the INTERCEPT Blood System. *Vox Sang* 2003;85:171-82.
 49. Hambleton J, Wages D, Radu-Radulescu L, Adams M, MacKenzie M, Shafer S, Lee M, Smyers J, Wiesehahn G, Corash L. Pharmacokinetic study of FFP photochemically treated with amotosalen(S-59) and UV light compared to FFP in healthy volunteers anticoagulated with warfarin. *Transfusion* 2002;42:1302-7.
 50. Kumar V, Lockerbie O, Keil SD, Ruane PH, Platz MS, Martin CB, Ravanat JL, Cadet J, Goodrich RP. Riboflavin and UV-light based pathogen reduction: extent and consequence of DNA damage at the molecular level. *Photochem Photobiol* 2004;80:15-21.
 51. Ruane PH, Edrich R, Gampp D, Keil SD, Leonard RL, Goodrich RP. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion* 2004;44:877-85.
 52. Li J, de Korte D, Woolum MD, Ruane PH, Keil SD, Lockerbie O, McLean R, Goodrich RP. Pathogen reduction of buffy coat platelet concentrates using riboflavin and light: comparisons with pathogen-reduction technology-treated apheresis platelet products. *Vox Sang* 2004;87:82-90.
 53. Mohr H, Redecker-Klein A. Inactivation of pathogens in platelet concentrates by using a two-step procedure. *Vox Sang* 2003;84:96-104.
 54. Lazo A, Tassello J, Jayarama V, Ohagen A, Gibaja V, Kramer E, Marmorato A, Billia-Shaveet D, Purmal A, Brown F, Chapman J. Broad-spectrum virus reduction in red cell concentrates using INACTINE PEN110 chemistry. *Vox Sang* 2002;83:313-23.
 55. Ohagen A, Gibaja V, Aytay S, Horrigan J, Lunderville D, Lazo A. Inactivation of HIV in blood. *Transfusion* 2002;42:1308-17.
 56. Mather T, Takeda T, Tassello J, Ohagen A, Serebryanik D, Kramer E, Brown F, Tesh R, Alford B, Chapman J, Lazo A. West Nile virus in blood: stability, distribution, and susceptibility to PEN110 inactivation. *Transfusion* 2004;43:1029-37.
 57. Zavizion B, Serebryanik D, Serebryanik I, Chapman J, Purmal A. Prevention of *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Pseudomonas putida* outgrowth in deliberately inoculated blood by a novel pathogen-reduction process. *Transfusion* 2003;43:135-42.
 58. Zavizion B, Pereira M, de Melo Jorge M, Serebryanik D, Mather TN, Chapman J, Miller NJ, Alford B, Bzik DJ, Purmal A. Inactivation of protozoan parasites in red blood cells using INACTINE PEN110 chemistry. *Transfusion* 2004;44:731-8.
 59. Purmal A, Valeri CR, Dzik W, Pivacek L, Ragno G, Lazo A, Chapman J. Process for the preparation of pathogen-inactivated RBC concentrates by using PEN110 chemistry: preclinical studies. *Transfusion* 2002;42:139-45.
 60. AuBuchon JP, Pickard CA, Herschel LH, Roger JC, Tracy JE, Purmal A, Chapman J, Ackerman S, Beach KJ. Production of pathogen-inactivated RBC concentrates using PEN110 chemistry: a Phase I clinical study. *Transfusion* 2002;42:146-52.
 61. Wagner SJ, Skripchenko A, Robinette D, Foley JW, Cincotta L. Factors affecting virus photoinactivation by a

- series of phenothiazine dyes. *Photochem Photobiol* 1998;67:343-9.
62. Hirayama J, Wagner SJ, Abe H, Ikebuchi K, Ikeda H. Involvement of reactive oxygen species in hemoglobin oxidation and virus inactivation by 1,9-dimethylmethylen blue phototreatment. *Biol Pharm Bull* 2001;24:418-21.
 63. Wagner SJ, Skripchenko A, Robinette D, Mallory DA, Cincotta L. Preservation of red cell properties after virucidal phototreatment with dimethylmethylen blue. *Transfusion* 1998;38:729-37.
 64. Skripchenko AA, Wagner SJ. Inactivation of WBCs in RBC suspensions by photoactive phenothiazine dyes: comparison of dimethylmethylen blue and MB. *Transfusion* 2000;40:968-75.
 65. Wagner SJ, Skripchenko A, Pugh JC, Suchmann DB, Ijaz MK. Duck hepatitis B photoinactivation by dimethylmethylen blue in RBC suspensions. *Transfusion* 2001;41:1154-8.
 66. Wagner SJ, Skripchenko A, Thompson-Montgomery D. Use of a flow-cell system to investigate virucidal dimethylmethylen blue phototreatment in two RBC additive solutions. *Transfusion* 2002;42:1200-5.
 67. van Steveninck J, Tranny LL, Besselink GA, Dubbelman TM, Brand A, de Korte D, Verhoeven AJ, Lagerberg JW. Selective protection of RBCs against photodynamic damage by the band 3 ligand dipyridamole. *Transfusion* 2000;40:1330-6.
 68. Besselink GA, van Engelenburg FA, Ebbing IG, Hilarius PM, de Korte D, Verhoeven AJ. Additive effects of dipyridamole and Trolox in protecting human red cells during photodynamic treatment. *Vox Sang* 2003;85:25-30.
 69. Bechtel MK, Bagdasarian A, Olson WP, Estep TN. Virus removal or inactivation in hemoglobin solutions by ultrafiltration or detergent/solvent treatment. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1988;16:123-8.
 70. 小島潤也, 木村哲寛, 後藤博, 上田努, 筒井洋治, 岡本武, 稲葉勝利, 金田伸一, 緒方嘉貴. ヘモグロビン精製工程におけるSD処理を用いたウイルス不活化検討. *人工血液* 2004;12:57.
 71. Estep TN, Bechtel MK, Miller TJ, Bagdasarian A. Virus inactivation in hemoglobin solutions by heat. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1988;16:129-34.
 72. Azari M, Ebeling A, Baker R, Burhop K, Camacho T, Estep T, Guzder S, Marshall T, Rohn K, Sarajari R. Validation of the heat treatment step used in the production of diaspirin crosslinked hemoglobin(DCLHb) for viral inactivation. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1998;25:577-82.
 73. Huang Y, Takeoka S, Sakai H, Abe H, Hirayama J, Ikebuchi K, Ikeda H, Tsuchida E. Complete deoxygenation from a hemoglobin solution by an electrochemical method and heat treatment for virus inactivation. *Biotechnol Prog* 2002;18:101-7.
 74. Sakai H, Takeoka S, Yokohama H, Seino Y, Nishide H, Tsuchida E. Purification of concentrated hemoglobin using organic solvent and heat treatment. *Protein Expr Purif* 1993;4:563-9.
 75. Abe H, Ikebuchi K, Hirayama J, Fujihara M, Takeoka S, Sakai H, Tsuchida E, Ikeda H. Virus inactivation in hemoglobin solution by heat treatment. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2001;29:381-8.
 76. Miyagawa E, Yoshida T, Takahashi H, Yamaguchi K, Nagano T, Kiriya Y, Okochi K, Sato H. Infection of the erythroid cell line, KU812Ep6 with human parvovirus B19 and its application to titration of B19 infectivity. *J Virol Methods* 1999;83:45-54.
 77. Azari M, Boose JA, Burhop KE, Camacho T, Catarello J, Darling A, Ebeling AA, Estep TN, Pearson L, Guzder S, Herren J, Ogle K, Paine J, Rohn K, Sarajari R, Sun CS, Zhang L. Evaluation and validation of virus removal by ultrafiltration during the production of diaspirin crosslinked haemoglobin(DCLHb) Biologicals 2000;28:81-94.
 78. Vandegriff KD, Malavalli A, Wooldridge J, Lohman J, Winslow RM. MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. *Transfusion* 2003;43:509-16.
 79. Abe H, Sugawara H, Hirayama J, Ihara H, Kato K, Ikeda H, Ikebuchi K. Removal of parvovirus B19 from hemoglobin solution by nanofiltration. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2000;28:375-83.
 80. Naito Y, Fukutomi I, Masada Y, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Abe H, Hirayama J, Ikebuchi K, Ikeda H. Virus removal from hemoglobin solution using Planova Membrane. *Journal of Artificial Organs* 2002;5:141-5.
 81. Hirayama J, Wagner SJ, Gomez C, MacDonald VW, Abe H, Ikeda H, Ikebuchi K, Sekiguchi S. Virus photoinactivation in stroma-free hemoglobin with methylene blue or 1,9-dimethylmethylen blue. *Photochem Photobiol* 2000;71:90-3.
 82. Hirayama J, Abe H, Kamo N, Ikebuchi K, Ikeda H. Comparison of the effects of different antiviral treatments on the antioxidant systems of stroma-free hemoglobin. *Photochem Photobiol* 2001;74:461-4.

リポソーム製剤のドラッグデリバリーシステムへの応用展開

Application and Development of Liposomal Drug for Drug Delivery System

前田典之^(1,2), 浅井知浩⁽¹⁾, 奥直人⁽¹⁾, 北沢貞哉⁽²⁾, 難波幸弘⁽³⁾

Noriyuki Maeda^(1,2), Tomohiro Asai⁽¹⁾, Naoto Oku⁽¹⁾, Sadaya Kitazawa⁽²⁾ and Yukihiro Namba⁽³⁾

和文抄録

1965年にイギリスのBanghamらによって最初に発見されたリポソームはこの40年間に急速に発展した。リポソームの実用的利用は、広くバイオサイエンスの基礎・応用の各分野で検討されており、特に薬剤の新しい投与方法、およびドラッグデリバリーシステムの開発に関わるものとして、この十数年もっとも注目を集めており、現在いくつかのリポソーム製剤が上市もしくは臨床試験中である。

リポソームの原料であるリン脂質は、生体由来の生体膜の主要構成成分であり、本質的に生体に親和性をもつ。水中で容易に形成されるリポソームの中には、低分子から高分子まで封入することができ、薬剤のカプセルとしてはきわめて理想的なものといえる。

しかし、いわゆる第一世代の未修飾リポソームは非特異的に異物として認識され、ターゲット部位への集積性が乏しく、肝臓や脾臓などの細網内皮系 (reticuloendothelial system; RES) に圧倒的に分布することが知られている。その欠点を克服するために、表面をpolyethylene glycol (PEG) や糖類で修飾したリポソームが開発された。これらの分子でリポソーム表面を修飾することによりRESへの集積を抑制し、血中滞留性を高めることにより受動的に病変部位に集積する。さらに、特定の組織、細胞に配送するためにリポソーム表面を抗体や低分子で修飾した第三世代のリポソームも盛んに研究されている。本稿ではがん治療をターゲットとした薬剤内封リポソームを中心に最近のリポソーム製剤の研究について述べる。

Abstract

Liposomes, firstly discovered by Bangham et al. in England, have rapidly developed for 40 years. Practical utilities of liposomes are studied widely in any fields of fundamental and applied biosciences, especially are focused as new method of drug administration and application for drug delivery system. Many liposomal drugs are approved or in clinical trials.

Liposomes have high biocompatibilities because phospholipids which are ingredients of liposomes are main components of biomembrane. Liposomes are ideal as capsules of drugs since liposomes can be prepared easily in aqueous phase and encapsulate any molecules including macromolecules.

The first-generation liposomes, however, are known to be trapped in reticuloendothelial systems (RES) such as liver and spleen, and poorly accumulate to the target tissue because they are non-specifically recognized as foreigners in a body. To overcome these defects, liposomes modified with polyethylene glycol or saccharides have been developed. Liposomes modified with these molecules have long-circulating characteristics by avoiding the RES trapping and these liposomes passively accumulate in target lesion. Furthermore, the third-generation liposomes modified with antibodies or low-molecular probes to deliver agents to targeted tissue or cells are studied actively. In this review, we describe the latest liposomal drugs with focus on targeting cancer therapy.

(1) 静岡県立大学大学院薬学研究科医薬生命化学教室 〒422-8526 静岡県静岡市谷田52-1 Department of Medical Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1, Yada, Shizuoka, Shizuoka, 422-8526, Japan

(2) 日本精化株式会社 精密化学品事業本部精密化学品研究室 〒676-0074 兵庫県高砂市梅井5-1-1 Fine Chemicals Laboratory, Fine Chemicals Division, Nippon Fine Chemical Co., Ltd. 5-1-1, Umei, Takasago, Hyogo, 676-0074, Japan

(3) 日本精化株式会社 精密化学品事業本部精密化学品営業部 〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町4-9 Fine Chemicals business department, Fine Chemicals Division, Nippon Fine Chemical Co., Ltd. 4-9, Kodenma-cho, Nihonbashi, Chuo-ku, Tokyo, 103-0001, Japan

論文受付 2004年11月30日 論文受理 2005年1月6日

Keywords

Anti-tumor therapy, Long-circulating liposome, Conjugation with targeting probe, Conjugation methods, Encapsulation methods

緒言

がん細胞は周辺の正常細胞と非常に似た性質であるため、抗がん剤を選択的にがん細胞のみに作用させることは困難であり、がん細胞と同様に正常細胞にも影響を及ぼすため、多くの場合重篤な副作用を引き起こす。このため、患者への最大投与量は制限され、再発や薬剤耐性の獲得といった予後不良を引き起こす。

そこで、医学・薬学界では抗がん剤のもつ選択毒性の改良により、薬効を増強させ、副作用を軽減する抗がん剤を探索してきた。その結果、抗がん剤による治療指数は上昇した。しかし、ほとんどの抗がん剤は静脈内投与後、全身に分布し、血中半減期が短いことが知られている¹⁾。そこで、薬物の動態、分布を改善するためにドラッグキャリアとしてリポソームが用いられるようになった。一般的に、薬を封入したリポソームは全身への分布を抑え、腫瘍組織への集積を高める。

リポソームはドラッグキャリアとして最も発展しており、現在ではドラッグデリバリーシステムの主流となっている。最初のリポソームは1965年にイギリスのBanghamら²⁾により作製されたものであり、両親媒性のリン脂質とコレステロールを水和することで、自己会合により形成される脂質二分子膜として発見された。薬物の封入においては、親水性薬物はリポソームの内水相に内封することができ、疎水性薬物はリポソームの二分子膜中に内封できる。

しかし、これらの古典的な、いわゆる第一世代のリポソームは血清タンパクがリン脂質に吸着すること（オプソニン化）によって細網内皮系に取り込まれやすくなるため、血中半減期が短くなる。そこで、血中滞留性の改善のため、表面をポリエチレングリコール（PEG）誘導体などの親水性ポリマーで被覆したりリポソームが開発された^{3,4)}。第一世代のリポソームは血中半減期が数分であるのに対して、PEGにより修飾されたりリポソームは数時間にも及ぶことが報告されている⁵⁾。

これらのリポソームは受動的な標的化（パッシブターゲティング）により固形がん組織中の抗がん剤の局所濃度を高めている。固形がんの血管は正常組織の血管と異なり透過性が亢進しており、その間隙は100～800 nmであるため、薬剤内封リポソームの直径が60～150 nmの大きさであれば、腫瘍の血管外に漏出し腫瘍間質に集積する⁶⁾。さらに、腫瘍組織においてはリンパ管が未発達なため一旦集積したりリポソーム製剤はクリアランスされにくい。パッシブターゲティングにより、腫瘍組織内に集積したりリポソーム内封薬物は、間質中で徐々に放出され、がん細胞に取り込まれることによって薬効を発揮する。すでに、アントラサイクリン系抗がん剤ドキシソルピシンを内封したDoxil[®]/Caelyx[®]やMyocet[®]が、また、ダウノルピシンを内封したDaunosome[®]が上市されており、他にも多くのリポソーム製剤が臨床試験中である（Table 1.）。

さらに、特定の組織、細胞に配送するためにリポソーム表面

を抗体や部位特異的に発現する分子に特異的に結合する能力を持つ低分子で修飾することで、より集積性を高めるリポソームが注目を浴びている。これらのリポソームは目的部位に選択的に送達できるため能動的な標的化（アクティブターゲティング）を行うことができる⁷⁾。

Table 1. Approved liposomal drugs.

Trade name (Approved)	Encapsulated drugs	Developer	Indication
Doxil [®] /Caelyx [®] ('95, US/'96, EU)	Doxorubicin	ALZA	Kaposi's Sarcoma, breast cancer, ovary cancer
DaunoXome [®] ('97, US)	Daunorubicin	Gilead	Kaposi's Sarcoma
AmBisome [®] ('97, US)	Amphotericin B	Gilead	Anti-fungal
Myocet [®] ('99, EU)	Doxorubicin	Elan	Metastatic breast cancer
Depocyt [®] /Depocyte [®] ('99, US/'01, EU)	Cytarabine	SkyePharma	Lymphomatous meningitis
Visudyne [®] ('00, US)	Verteporfin	QLT	Age-related macular degeneration
DepoDur [®] ('04, US/Filing, EU)	Morphine	SkyePharma	Pain control after surgery
Marqibo [®] (Filing, US)	Vincristine	INEX	Non-Hodgkin's lymphoma

1. リポソーム製剤の特長

リポソームは生体膜成分であるリン脂質やコレステロールにより、水溶液中でつくられる閉鎖小胞であるため薬剤キャリアーとして非常に有用である。薬剤キャリアーとしてリポソームを用いる特色としては次のものが考えられる。(1) 生体成分を主成分としているため毒性が少ない、(2) エンドサイトーシス経路により細胞内に取り込まれ、リソソーム中で分解される、(3) 成分が明確であるため、規格化や大量生成が可能である、(4) 再構成膜であるため、構成脂質分子の種類や構成比、電荷を容易に変えられる。さらに、大きさや封入物質など、条件変更を容易に行うことができる、(5) 脂溶性、親水性どちらの薬物も封入できる、(6) 脂質二分子膜で隔離されているため、酵素など生理活性物質が血液中で不活化するのを防ぐとともに、免疫系により異物として認識されるのを防ぐ、(7) カプセル化することで毒性を軽減できる、(8) リポソーム表面を抗体などで修飾することで組織や細胞に対する指向性を持たせることができる、などである。

このような特色はいずれも臨床的にみて、非常に有利な点である。他の有用なターゲティングである抗体-薬物の結合物は薬剤側の化学修飾を伴うので薬効の再検討が必要となる。抗体-毒素の結合物はin vitroの系では可能であるがin vivoの系への応用は非常に高い危険を伴うなど、臨床実用化に関しては

障害が大きい。これに対してリポソーム製剤は、抗体も内封される薬物もそれぞれ独立しているため、実験的に効果が上がることが判明すれば、直ちに臨床実用化が可能な点で現時点では最も有望なものである⁸⁾。

2. 標的化分子を結合した血中滞留性リポソームの特長

PEGなどの高分子の修飾の有無に関わらず、リポソーム表面にターゲット分子を結合させることは容易である。しかし、PEG未修飾リポソームよりはPEGの修飾をしたリポソームの方が、in vivoへの応用した場合に薬物動態的に有利である⁹⁾。

抗体に薬剤や毒物をコンジュゲートする場合、抗体1分子に対して、薬剤や毒物のコンジュゲートは10分子以下に限られる。一方、リポソームに薬剤を封入する場合はリポソーム1つに対し10~20分子の抗体をコンジュゲートすることでレセプターを介した内在化が起こるため、抗体1分子に対する薬剤の割合は数千分子にもなるため非常に効率がよい^{10,11)}。

さらに、抗体と抗がん剤の併用は一般的に相乗効果がみられるため、抗体修飾リポソームもリポソーム表面の抗体によるシグナル伝達と内封薬剤による相乗効果も期待できる。臨床試験においても、抗HER2抗体 (Herceptin[®]) とタキソールもしくはアントラサイクリン系薬物とシクロホスファミドの併用で相乗効果が認められている¹²⁾。リポソームはモノクローナル抗体により、標的化可能であり、結合されるモノクローナル抗体はDNA複製阻害¹³⁾、細胞周期の停止を導入するもの¹⁴⁾、アポトーシスを誘導するもの¹⁵⁾ など様々であり、抗がん剤との相乗効果により効果を発揮する。

3. リポソームへの標的化分子のカップリング方法

リポソームへの標的化分子のカップリングについては現在まで様々な方法が報告されている¹⁶⁾。一般的に、標的化分子を結合したリポソームを調製する場合、シンプルで、反応が早く、効率的であり、再現性があり、安定した修飾効率を得られ、毒性のない結合であることが必要とされる。標的化分子を結合したリポソームは安定で、しかもターゲット細胞に到達し相互作用するまでの十分な血中半減期を保つ必要があり、さらに、カップリング反応によって薬剤の内封効率や放出速度が変わることは好ましくない。

最初のリポソームへの抗体修飾の試みは、PEG修飾のない古典的なリポソームに対して行われていたが、貪食細胞的作用により血中から速やかに排除され、十分な効果は得られなかった^{17,18)}。しかし、血中滞留性リポソームの発達に伴い免疫リポソームも進化してきた。初期のPEG修飾リポソームへの抗体の結合は、リン脂質 (例えばホスファチジルエタノールアミン) の親水性部分に抗体を結合させるものであったがPEGのバリアのため、十分なカップリング効率を得られなかった¹⁹⁾。この欠点を克服するため、PEG末端への抗体修飾が行われた。この方法を用いることで、PEGの層で抗体をマスクしてしまうことはなく、ターゲット部位への送達も可能となった²⁰⁾。抗体修飾を施すためにPEG末端を活性化する誘導体がいくつも開発され

ているが、最もよく使用されているPEG誘導体はピリジルジチオプロピオニルアミノ (PDP)-PEG¹⁶⁾、ヒドラジド (Hz)-PEG²¹⁾、マレイミド (Mal)-PEG²²⁾ である (Fig. 1)。PDP-PEGとMal-PEGはリポソームとタンパク質のチオエーテル結合を形成するものであり、安定な結合である。PDP-PEGを用いる方法では、succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl) butyrate (SMPB) により抗体にマレイミド基が導入された後、チオール化されたリポソーム中のPDP-PEGと結合する。Mal-PEGを用いる方法では、抗体をTraut試薬によってチオール化した後、PEG末端のマレイミド基とチオエーテル結合を形成する。この方法の欠点は抗体中のフリーのチオール基同士がチオエーテル結合を形成してしまうため、抗体を介したリポソーム同士の凝集が起こり、血中から速やかに排泄されてしまう可能性があるが、PEGにより広範囲の凝集は抑制される。また、無秩序にチオール基に結合するため、抗体のもつ生理活性が弱くなり、レセプターの活性化やエンドサイトーシスを抑制してしまう可能性がある。

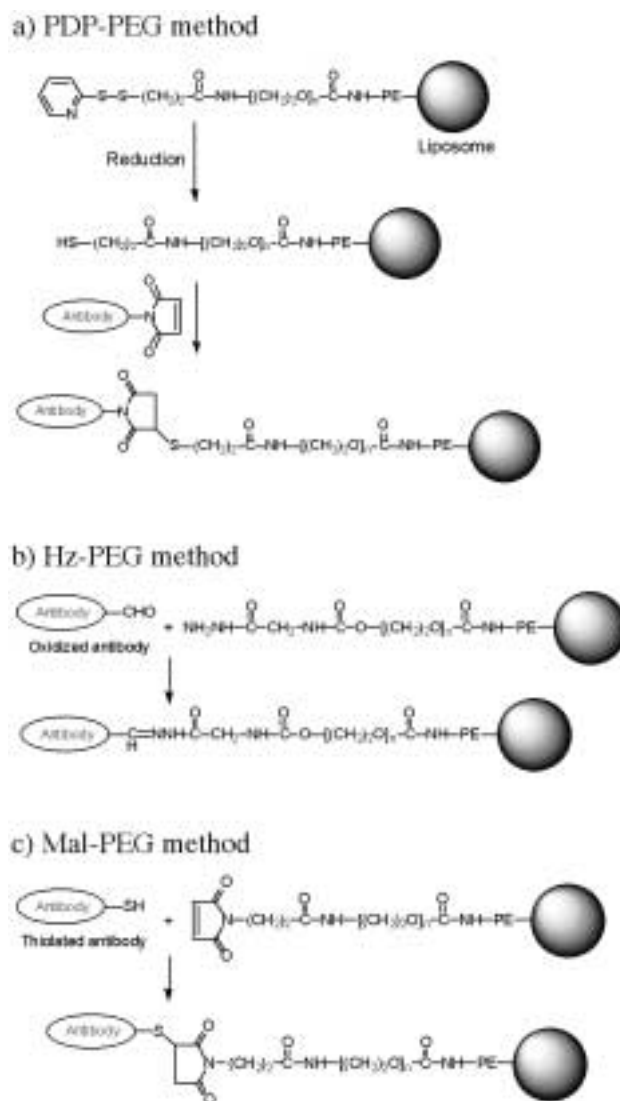


Fig. 1. Methods for antibody coupling to PEG-modified liposome.

抗体とリポソームを多数存在するチオール基により結合させるとき、リポソーム表面の抗体にランダムな配向性をもたせることになり、抗体中のFcドメインがFcレセプターに結合することで血中からの排泄を促進することになってしまう。そこで、Mal-PEG法を用いる場合、抗体フラグメント (Fab') のヒンジ領域のジスルフィド架橋を開裂させたときに生成する唯一のチオール基をリポソームに結合する方法が用いられている。さらに、Mal-PEG法による末端システインでのscFvフラグメントとリポソームの結合も報告されている²³⁾。これによってターゲット分子の認識部位をチオール化することを回避でき、Fab', scFvともにFcドメインを欠落させることができる²⁴⁾。Hz-PEGにおいては、抗体のFcドメイン中の一部が酸化されてアルデヒドとなり、PEG末端のヒドラジド基とヒドラゾン結合を形成する。これらの方法は両者ともにマクロファージのFcレセプターによる認識から回避させ、ターゲットとする分子にリポソーム表面上の結合ドメインをさらすことができたため、抗体のもつ配向性を保持することができる。

これまで述べたリポソームへの抗体修飾の方法は、効果は優れているが反応に多段階を要する。そこで、Torchilinらはp-nitrophenylcarbonyl-PEG-PE (pNP-PEG-PE) という両親媒性のPEG誘導体を構成成分としたリポソームのPEG末端にアミノ基を含むリガンドを一段階で結合させる方法を開発した²⁵⁾ (Fig. 2a)。この方法では、リポソームを形成させた後に、リポソーム表面のpNP基との置換反応によりリガンドのアミノ基と安定なウレタン結合を形成する。

また、Bendasらは誘導体化することなくリポソームのPEG末端に抗体を修飾する方法を開発した²⁶⁾ (Fig. 2b)。PEG-PEを

シアヌル酸クロライドでPEG末端を活性化して、温和な条件下で抗E-セレクチンモノクローナル抗体を結合させた。シアヌル酸クロライドは中性pHで抗体との置換反応を起こす。

4. 薬剤の内封方法

Table 1.に示すように、現在上市されているリポソーム製剤の内封薬剤は、ほとんどがドキソルピシンやダウノルピシンなどのアントラサイクリン系の薬剤である。これらの薬剤はリモートローディングによるpH勾配法²⁷⁾や硫酸アンモニウム法²⁸⁾などでの封入が可能であり、一般的に高い内封率のため、研究段階から臨床試験中の抗体修飾リポソーム製剤の内封薬剤としてもっとも多く用いられている。リモートローディングでの封入が不可能な薬剤を用いる場合の封入法として、エタノール注入法²⁹⁾、エーテル注入法³⁰⁾、界面活性剤法³¹⁾、Ca²⁺融合法³²⁾、逆相蒸発法³³⁾など様々な方法が考えられるが、一般的に薬剤の内封率が低く、内封されない薬剤の除去工程があり、さらに有機溶媒を完全に除去することが困難であったりするため、効率のよい封入法の開発が期待される。

5. ターゲット分子修飾リポソームによる治療への応用

5.1. 抗体または抗体フラグメント修飾リポソームの治療への応用

現在研究段階で有望な抗体修飾リポソームとして、ヒトカルシノーマ細胞を標的とした抗HER2/Neu抗体修飾リポソーム^{23, 34)}、神経芽細胞腫やメラノーマを標的とした抗GD₂修飾リポソーム³⁵⁾、転移性肺がんを標的とした抗 α インテグリン抗体修飾リポソーム³⁶⁾などが開発中である。

Parkらは、ヒト組み換え型モノクローナル抗体のHER2-Fab'もしくはHER2 scFv C6.5で修飾したドキソルピシン内封リポソームによる乳がんの治療効果について報告している²³⁾。HER2は乳がんなどの増殖に関連したHER2プロト遺伝子から産生されるチロシンキナーゼ受容体である。HER2高発現の数のがん細胞を皮下移植後、ドキソルピシン内封 - HER2抗体修飾リポソームを静脈内投与したところ、ドキソルピシン内封 - PEG修飾リポソーム、ドキソルピシンのみ、抗体のみの投与群と比較して優れた治療効果が得られている。対照としておこなわれた実験により、ドキソルピシン内封 - HER2抗体修飾リポソームによる治療効果は抗体やドキソルピシン単独による効果でなく、リポソームの特異的な標的化によるものであることが証明されている。さらに、同様のマウスがん移植モデルを用いて腫瘍内分布を観察したところ、金を内封したPEG修飾リポソームは血管外のがんの間質に留まっていることが観察されたが、HER2抗体修飾リポソームはがん細胞内に取り込まれていることが観察された³⁴⁾。このためParkらは、この治療効果は標的細胞内への特異的なドラッグデリバリーによるものだとしている。さらに、HER2抗体修飾リポソームによる乳がん患者への効果的ながん治療が可能になるとともに、ドキソルピシンのもつ毒性軽減のために投与量の制限も回避できると考えられている。

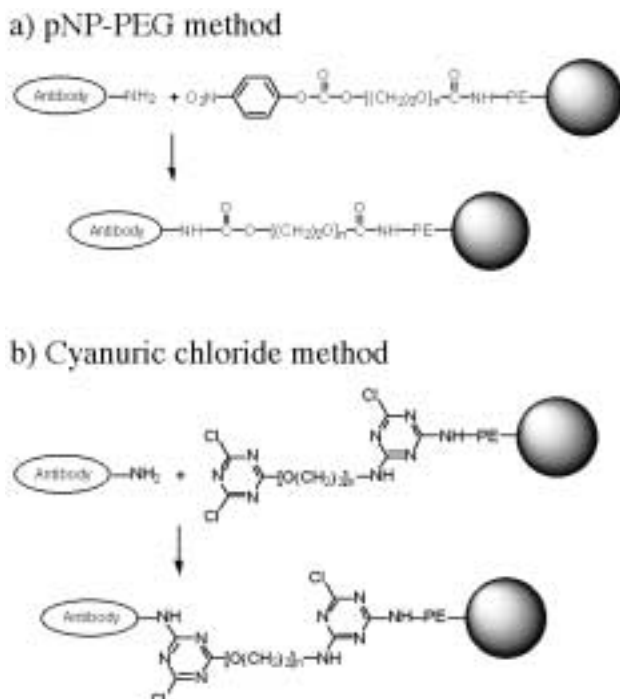


Fig. 2. New methods allowing a single step binding of antibodies containing amino group.

Pastorinoらはヒト神経芽細胞腫であるHTLA-230を移植したマウスモデルにより、ドキシソルピシン内封 - 抗GD₂ Fab'修飾リポソームががんの増殖を完全に抑制することを報告した³⁵⁾。Fab'のみ、ドキシソルピシンのみ、空の抗GD₂ Fab'修飾リポソームいずれの投与群もマウスの延命効果が見られなかったが、ドキシソルピシン内封 - 抗GD₂ Fab'修飾リポソーム治療群のマウスは投与量とスケジュールの調整で100%の長期延命効果が得られている。

5. 2. ペプチド修飾リポソームの治療への応用

タンパク質の中から接着する部分のペプチドシーケンスを分離する技術が発展したため、標的化ペプチドによるリポソームへの修飾が可能となった。Moreiraは、神経伝達物質PのアンタゴニストGであるヘキサペプチドアナログが小細胞肺癌の表面レセプターに結合し、様々なバソプレッシンなどの神経ペプチドをブロックすることを報告した³⁷⁾。

また、最近新たながんの治療法として、腫瘍新生血管を傷害することでがん細胞への酸素や栄養分の供給を絶ち、細胞を死滅させる腫瘍新生血管傷害療法が注目されている³⁸⁾。我々は、ファージペプチドライブラリーによるin vivoバイオパニング法により、腫瘍新生血管特異的なペプチドAPRPGを単離した³⁹⁾。Colon 26 NL-17細胞を移植したマウスを用いて、PEGの先端にAPRPGを修飾したリポソームに、ドキシソルピシンを内封したものの治療効果について検討をおこなったところ、PEGのみの修飾リポソームと比較して体内分布においてそれほど差はみられなかったが、顕著に腫瘍の増殖を抑制することを報告した⁴⁰⁾。これは、がん細胞を直接ターゲットとするよりも、腫瘍新生血管をターゲットとし、間接的にがん細胞を攻撃した方がより高い増殖抑制効果が得られることを示唆している。また、同様にファージペプチドライブラリーからmembrane type-1 matrix metalloproteinase (MT-1 MMP) に対する低分子リガンドであるPLPLペプチドを単離した。このPLPLペプチドで修飾したリポソームに抗がん作用をもつヌクレオシドCNDACを組み込み、腫瘍抑制効果について検討したところ、未修飾のCNDACリポソームよりも有意に腫瘍の増殖を抑えることも報告している⁴¹⁾。

ペプチド修飾リポソームは、修飾しようとするペプチドの配列さえ決定すれば、工業的な製造も可能となるだけでなく、低分子であるため修飾も容易であり、抗体修飾リポソームよりも安価で大量の生産が可能となるため、今後も有望であると考えられる。

6. まとめと展望

ポストゲノム時代となり、我々は患者のテーラーメイド医療に向けての化学療法を視野に入れる必要がある。標的化リポソームはがん患者のレセプターや細胞の薬剤への感受性により、リポソームを修飾する分子や内封薬物を臨機応変に選択することができる。しかし、従来の抗体のカップリング方法によるリポソームの標的化技術は実用的でないため、よりスマートな修

飾方法の確立により、様々な組み合わせのデータが蓄積されることが期待されている。

現在までに、いくつもの免疫毒素複合体や放射免疫療法によるターゲット治療がすでに上市され、現在も200以上もの臨床試験中である。今後も、さらなる治療効果をもち、より副作用の少ない薬の開発が注目されるであろう。その中でも標的化分子修飾リポソームはもっとも期待される場所である。

参考文献

1. Northfelt DW, Martin FJ, Working P, Volberding PA, Russell J, Newman M, Amantea MA, Kaplan LD. Doxorubicin encapsulated in liposomes containing surface-bound polyethylene glycol: pharmacokinetics, tumor localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Pharmacol* 1996;36:55-63.
2. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965;13:238-52.
3. Gabizon A, Papahadjopoulos D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6949-53.
4. Papahadjopoulos D, Gabizon A. *Prog Clin Biol Res* 1990;343:85-93.
5. Allen TM, Hansen CB. *Biochim Biophys Acta* 1991;1068:133-41.
6. Yuan F, Leunig M, Huang SK, Berk DA, Papahadjopoulos D, Jain RK. Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res* 1994;54:3352-6.
7. Hamaguchi T, Matsumura Y, Nakanishi Y, Muro K, Yamada Y, Shimada Y, Shirao K, Niki H, Hosokawa S, Tagawa T, Kakizoe T. Antitumor effect of MCC-465, pegylated liposomal doxorubicin tagged with newly developed monoclonal antibody GAH, in colorectal cancer xenografts. *Cancer Sci* 2004;95:608-13.
8. 保田立二. 医学領域への応用. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三編. リポソーム. 東京: 南江堂, 1988;245-76.
9. Allen TM, Hansen CB, Lopes de Menezes DE. *Adv Drug Del Rev* 1995;16:267-84.
10. Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Meyer O, Papahadjopoulos D, Benz CC. Anti-HER2 immunoliposomes for targeted therapy of human tumors. *Cancer Lett* 1997;118:153-60.
11. Carter P. Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 2001;1:118-29.
12. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human

- breast cancer xenografts. *Cancer Res* 1998;58:2825-31.
13. Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, Pegram MD, Howell SB, Slamon DJ. Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 1994;9:1829-38.
 14. Ghetie MA, Picker LJ, Richardson JA, Tucker K, Uhr JW, Vitetta ES. Anti-CD19 inhibits the growth of human B-cell tumor lines in vitro and of Daudi cells in SCID mice by inducing cell cycle arrest. *Blood* 1994;83:1329-36
 15. Bradbury LB, Kansas GS, Levy S, Evans RL, Tedder TF. The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *J Immunol* 1992;149:2841-50.
 16. Allen TM, Brandeis E, Hansen CB, Kao GY, Zalipsky S. A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1995;1237:99-108.
 17. Debs RJ, Heath TD, Papahadjopoulos D. Targeting of anti-Thy 1.1 monoclonal antibody conjugated liposomes in Thy 1.1 mice after intravenous administration. *Biochim Biophys Acta* 1987;901:183-90.
 18. Derksen JTP, Morselt HWM, Scherphof GL. Uptake and processing of immunoglobulin-coated liposomes by subpopulations of rat liver macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1988;917:127-36.
 19. Klibanov AL, Maruyama K, Beckerleg AM, Torchilin VP, Huang L. Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *Biochim Biophys Acta* 1991;1062:142-8.
 20. Maruyama K, Takizawa T, Yuda T, Kennel SJ, Huang L, Iwatsuru M. Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta* 1995;1234:74-80.
 21. Zalipsky S. Synthesis of an end-group functionalized polyethylene glycol-lipid conjugate for preparation of polymer-grafted liposomes. *Bioconjug Chem* 1993;4:296-9.
 22. Kirpotin D, Park JW, Hong K, Zalipsky S, Li W-L, Carter P, Benz CC, Papahadjopoulos D. Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro *Biochemistry* 1997;36:66-75.
 23. Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Colbern G, Shalaby R, Baselga J, Shao Y, Nielsen UB, Marks JD, Moore D, Papahadjopoulos D, Benz CC. Anti-HER2 immunoliposomes: Enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin Cancer Res* 2002;8:1172-81.
 24. Martin FJ, Papahadjopoulos D. Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting. *J Biol Chem* 1982;257:286-8.
 25. Torchilin VP, Levchenko TS, Lukyanov AN, Khaw BA, Klibanov AL, Rammohan R, Samokhin GP, Whiteman KR. p-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups. *Biochim Biophys Acta* 2001;1511:397-411.
 26. Bendas G, Krause A, Bakowsky U, Vogel J, Rothe U. Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *Int J Pharm* 1999;181:79-93.
 27. Boman NL, Masin D, Mayer LD, Cullis PR, Bally MB. Liposomal vincristine which exhibits increased drug retention and increased circulation longevity cures mice bearing P388 tumors. *Cancer Res* 1994;54:2830-3.
 28. Bolotin EM, Cohen R, Bar LK, Emanuel SN, Lasic DD, Barenholz Y. Ammonium sulfate gradients for efficient and stable remote loading of amphipathic weak bases into liposomes and ligandoliposomes. *J Liposome Res* 1994;4:455-79.
 29. Kremer JMH, Van der Esker MW, Pathmamanoharan C, Wiersema PH. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *Biochemistry* 1977;16:3932-3935.
 30. Deamer D, Bangham AD. Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochim Biophys Acta* 1976;443(3):629-34.
 31. Allen TM, McAllister L, Mausolf S, Gyorffy E. Liposome-cell interactions. A study of the interactions of liposomes containing entrapped anti-cancer drugs with the EMT6, S49 and AE1(transport-deficient) cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1981;643:346-62.
 32. Papahadjopoulos D, Vail WJ, Jacobson K, Poste G. Cochleate lipid cylinders: formation by fusion of unilamellar lipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1975;394:483-91.
 33. Szoka F Jr, Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:4194-8.
 34. Park JW, Kirpotin DB, Hong K, Shalaby R, Shao Y, Nielsen UB, Marks JD, Papahadjopoulos D, Benz CC. Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes. *J Control Release* 2001;74:95-113.
 35. Pastorino F, Brignole C, Marimpietri D, Sapra P, Moase EH, Allen TM, Ponzoni M. Doxorubicin-loaded Fab'

- fragments of anti-disialoganglioside immunoliposomes selectively inhibit the growth and dissemination of human neuroblastoma in nude mice. *Cancer Res* 2003;63:86-92.
36. Sugano M, Egilmez NK, Yokota SJ, Chen FA, Harding J, Huang SK, Bankert RB. Antibody targeting of doxorubicin-loaded liposomes suppresses the growth and metastatic spread of established human lung tumor xenografts in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res* 2000;60:6942-9.
37. Moreira JN, Ishida T, Gaspar R, Allen TM. Use of the post-insertion technique to insert peptide ligands into preformed stealth liposomes with retention of binding activity and cytotoxicity. *Pharm Res* 2002;19:265-9.
38. Shimizu K, Oku N. Cancer anti-angiogenic therapy. *Biol Pharm Bull* 2004;27:599-605.
39. Oku N, Asai T, Watanabe K, Kuromi K, Nagatsuka M, Kurohane K, Kikkawa H, Ogino K, Tanaka M, Ishikawa D, Tsukada H, Momose M, Nakayama J, Taki T. Anti-neovascular therapy using novel peptides homing to angiogenic vessels. *Oncogene* 2002;21:2662-9.
40. Maeda N, Takeuchi Y, Takada M, Sadzuka Y, Namba Y, Oku N. Anti-neovascular therapy by use of tumor neovasculature-targeted long-circulating liposome. *J Control Release* 2004;100:41-52.
41. Kondo M, Asai T, Katanasaka Y, Sadzuka Y, Tsukada H, Ogino K, Taki T, Baba K, Oku N. Anti-neovascular therapy by liposomal drug targeted to membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Int J Cancer* 2004;108:301-6.

虚血 - 再開通モデルラットにおける脳機能不全の多角的評価と人工酸素運搬体の有効性について

Beneficial Effects of an Artificial Oxygen-Carrier, Liposome-Encapsulated Hemoglobin, on Post-Ischemic Cerebral Dysfunction in Rats.

富樫広子⁽¹⁾, 佐久間一郎⁽²⁾, 掛端 仁⁽³⁾, 山口 拓⁽¹⁾, 尾谷 浩⁽¹⁾,
緒方嘉貴⁽⁴⁾, 石塚隆伸⁽⁴⁾, 仲井邦彦⁽⁵⁾, 北畠 顕⁽²⁾, 吉岡充弘⁽¹⁾

**Hiroko Togashi⁽¹⁾, Ichiro Sakuma⁽²⁾, Hitoshi Kakehata⁽³⁾, Taku Yamaguchi⁽¹⁾, Toru Otani⁽¹⁾, Yoshitaka Ogata⁽⁴⁾,
Takanobu Ishizuka⁽⁴⁾, Kunihiko Nakai⁽⁵⁾, Akira Kitabatake⁽²⁾, Mitsuhiro Yoshioka⁽¹⁾**

和文抄録

人工酸素運搬体の臨床応用の可能性を虚血性疾患に対する酸素治療という観点から追究する目的で、リポソーム封入型ヘモグロビンであるナノカプセル型人工酸素運搬体 (Neo Red Cell: NRC) の脳虚血-再開通障害治療への応用の可能性を探った。脳虚血後の脳機能障害評価系として妥当性の高いモデルの構築を図り、それを用いてNRCの効果を検討した。両側総頸動脈を10分間閉塞することにより一過性不完全脳虚血 (2VO) モデルラットを作製し、電気生理学的ならびに行動学的に脳機能変化を評価した。NRC (150 mg/kg) は両側総頸動脈閉塞中に尾静脈内に投与した。2VOラットでは、虚血後、時間とともに海馬歯状回領域における長期増強 (LTP) 形成が障害された。また、虚血後4日目および7日目に施行した行動学的検討から、不安関連行動の増強が観察された。すなわち、2VOラットでは、文脈的条件恐怖に対する不安水準の上昇を表わす“すくみ行動”の増加が認められた。NRC群では虚血後4日目におけるLTP形成障害が改善される傾向が認められた。さらに、NRCは、2VOによって増強した不安関連行動を偽手術群のレベルまで回復させる傾向を示した。これらの結果は、脳循環不全に伴った機能障害に対する治療戦略としての人工酸素運搬体NRCの可能性を示唆するものである。

Abstract

The aim of the present study was to examine whether an artificial oxygen-carrier Neo Red Cell (NRC) liposome-encapsulated hemoglobin, could ameliorate the post-ischemic cerebral dysfunction in rats. Hippocampal long-term potentiation (LTP) and fear-related behavior were evaluated as a measure of cerebral function in an incomplete global ischemic model, 2-vessel occlusion (2VO) rats. 2VO produced a delayed LTP impairment in the perforant path-dentate gyrus synapses 4 days (Day 4) after ischemic insult, accompanied with a concomitant enhancement of fear-related behavior freezing in the contextual fear conditioning test. NRC (150mg/kg, i.v.) treated during a 10-min occlusion tended to restore LTP formation on Day 4. Together, fear-related freezing behavior in NRC-treated 2VO rats was comparable to that in sham-operated rats, suggesting that NRC treatment normalized 2VO-induced anxiogenic property. These findings provide evidence that NRC may have therapeutic potential for reducing the risk of ischemic complications and be a candidate for oxygen therapeutics.

(1) 北海道大学大学院・医学研究科・神経薬理学 〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目 Department of Neuropharmacology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Kita-15, Nishi-7, Kita-ku, Sapporo, 060-8638, Japan

(2) 北海道大学大学院・医学研究科・循環病態内科学 Department of Cardiovascular Internal Medicine, Hokkaido University Graduate School of Medicine

(3) 北海道大学大学院・医学研究科・侵襲制御医学 Department of Anesthesiology, Hokkaido University Graduate School of Medicine

(4) テルモ株式会社 研究開発センター 〒259-0151 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500 Terumo Corporation R&D Center 1500 Inokuchi, Nakai-machi, Ashigarakami-gun, Kanagawa, 259-0151, Japan

(5) 東北大学大学院・医学研究科・環境保健医学 〒980-8575 仙台市青葉区星陵町2-1 Department of Environmental Health Sciences, Tohoku University Graduate School of Medicine Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai, 980-8575, Japan

論文受付 2004年11月15日 論文受理 2004年12月15日

Keywords

artificial oxygen-carrier; liposome-encapsulated hemoglobin; cerebral ischemia; long-term potentiation; post-ischemic anxiety

1. 緒言

医療の高度化に伴い輸血医療の重要性が増す一方、急速な少子化・高齢化を背景とする献血人口の減少により、輸血用血液製剤の需給バランスの悪化が懸念されている。また、輸血時のウイルス感染の回避や、大規模災害時等緊急時の輸血対応を目的として、クロスマッチの必要がなく、長期保存が可能な輸血用血液製剤が求められている。このような社会的要求を背景として、いくつかの人工酸素運搬体の開発が進められてきた¹⁾。なかでも、セルフリーヘモグロビン(Hb)修飾体に関しては、従来、問題とされてきた血管収縮や血小板活性化といった、Hb分子中のヘムによるNOの不活化に起因する副作用を回避するための改良が続けられてきた^{2,6)}。我々は、Hb分子にNO供与能を付与し、さらにポリエチレングリコール(PEG)修飾を加えることにより分子サイズ増加を図ったHb修飾体SNO-PEG-Hbは、血小板凝集抑制や血管拡張作用を有するばかりでなく、イヌ虚血心やラット脳虚血モデルを用いた実験から、虚血改善作用が認められることを報告してきた⁷⁻⁹⁾。このように、人工酸素運搬体の可能性は、単なる輸血代替物にとどまらず、虚血性疾患治療といった新たな臨床応用へと展開されつつある。

脳には海馬CA1領域や大脳皮質の錐体細胞など、虚血に対して脆弱な神経細胞群が存在することが知られている。脳虚血障害やその修復機構に関する多くの研究は、これら海馬CA1領域における遅発性神経細胞死(delayed neuronal cell death: DND)を指標として行われてきた。しかし、血流低下が軽度で神経細胞死がみられない場合でも、神経細胞の電気的活動の障害が認められることが知られている。我々は、脳虚血障害に対する治療効果のendpointを脳機能改善に求めるとの視点に立ち、有用性の高い脳機能評価系を構築するために、遅発性神経細胞死を伴わない脳機能障害モデルとして一過性脳虚血ラットを作製し、その神経生化学的ならびに電気生理学的特性を明らかにしてきた¹⁰⁻¹⁶⁾。

長期増強現象(long-term potentiation: LTP)は、興奮性入力に対するシナプス後ニューロンの反応が短時間の高頻度刺激によって増強し、その後、長時間にわたって持続する現象である。シナプスの可塑的变化を示すこの電気生理学的現象は、海馬において最初に発見され、ある種の記憶と関連することが知られている¹⁷⁾。我々は、一過性脳虚血ラットにおいて虚血再開通後の時間経過に伴ったLTP形成障害が観察されること、それらは既存の脳血管障害後遺症治療薬などの薬理的処置によって改善されることを報告してきた¹³⁻¹⁶⁾。しかしながら、この一過性脳虚血に伴ったLTPの障害が、いかなる生理機能に関連しているのかという点については、依然、不明の点が多い。最近、ストレスによって海馬LTP形成が抑制されること、抗うつ薬や抗不安薬が海馬LTPを変化させることが明らかとなり、その病態生理学的意義が注目されている¹⁸⁻²⁴⁾。海馬は扁桃体とともに

いわゆる情動回路を形成する。したがって、脳循環障害に伴った海馬シナプス伝達機能における変化が、脳血管障害後の周辺症状として知られている不安・焦燥といった情動変化と関連している可能性は充分予想される。

本研究では、ナノカプセル型人工酸素運搬体(Neo Red Cell: NRC)の脳循環障害への応用の可能性を検討するに先立ち、一過性脳虚血モデルにおける行動学的評価系を構築することを目的とした。すなわち、脳虚血再開通後の脳機能障害としての海馬LTPと情動変化との関連性を視野に入れ、基礎的検討を行った。一過性脳虚血モデルとして、行動学的検討には両側総頸動脈閉塞による不完全脳虚血(2-vessel occlusion: 2VO)ラットおよび2VOに両側椎骨動脈閉塞を加えた完全脳虚血(4-vessel occlusion: 4VO)ラットを用いた。NRCの行動学的ならびに電気生理学的評価には、2VOラットを用いた。

2. 方法

実験プロトコールをFig. 1.に模式的に示した。

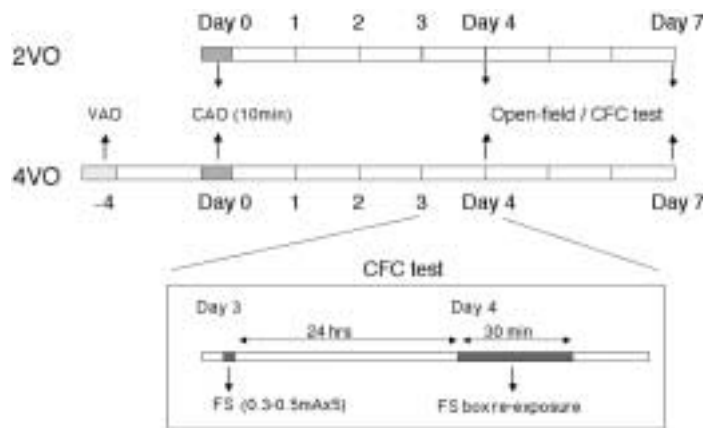


Fig. 1. Experimental protocol.

VAO: vertebral artery occlusion; CAO: carotid artery occlusion; CFC: contextual fear conditioning; FS: footshock.

1) 一過性脳虚血モデルの作製

10~15週齢のWistar系雄性ラットを使用した。ラットは12時間毎の明暗条件下に飼育し、餌および水は自由摂取とした。

4VOモデルはPulsinelliらの方法²⁵⁾に準じて作製した。塩酸ケタミン(100 mg/kg, i.p.)麻酔下に両側椎骨動脈を電氣的に永久焼灼し、4日後に1~1.5%ハロタン吸入麻酔下に両側総頸動脈を10分間閉塞した。2VOモデルには両側総頸動脈10分間閉塞のみを施行した。両側椎骨動脈の永久焼灼に加えて両側総頸動脈に偽手術(sham operation: Sham)を施行したvertebral artery occlusion (VAO)群ならびに偽手術のみを施行したSham群を、4VO群と2VO群それぞれの対照群とした。

2) 薬物投与

リポソーム封入型ヘモグロビン (liposome-encapsulated hemoglobin) であるナノカプセル型人工酸素運搬体NRC (Terumo Co, Ltd.) は, 虚血開始直後に150mg/2.5ml/kgを尾静脈内に単回投与した。対照群には同容量の生理的食塩水を投与した。

3) 海馬長期増強 (LTP) の測定

脳虚血-再開通後4日目にLTPを測定した。1%ハロセン麻酔下, 貫通線維 (perforant path: p.p) に刺激電極を, 歯状回 (dentate gyrus: DG) に記録電極を挿入した。テスト刺激により, population spikeの振幅が最大振幅の50%になる刺激強度で誘発した波形を導出し, 30秒間隔で5回平均加算し, 5分毎に解析した。波形が安定した後, 400Hzのテタヌス刺激を加え, その後60分間連続記録した。テタヌス刺激前値を100%とした時の経時変化を以って評価した。

4) 行動学的基礎検討

脳虚血 - 再灌流後4日目 (2VO-D4) あるいは7日目 (2VO-D7) に, 運動機能および新奇環境ストレスへの行動応答の評価系であるオープンフィールド (open-field: OF) 試験, または環境に関連付けられた記憶に基づく不安の評価系である文脈的恐怖条件付け (contextual fear conditioning: CFC) 試験を施行した。OF試験については, 運動量の指標である水平移動数 (ambulation) と立ち上がり行動量 (rearing) に加えて, 不安水準を反映すると考えられているOF内のarea別滞在パターンを30分間にわたって記録し, CFC試験については, 電気刺激 (footshock: FS, 0.3-0.5mA x 5times) 負荷24時間後にFS-boxへ再曝露 (re-exposure) した際に観察されるすくみ行動 (freezing behavior) を指標とし, それぞれ自動解析装置を用いて解析した。

5) 統計学的解析

得られた結果は, 平均値 ± 標準誤差 (mean ± SEM) で表し, 両側t-検定にて統計学的有意差を検討した。有意水準は危険率5%に設定した。

3. 結果

1) 行動学的基礎検討

OF試験による検討

2VOモデルを用い, 脳虚血 - 再灌流後4日目 (Day4) と7日目 (Day7) に, OF試験を実施した。Fig. 2.に示すように, OF試験における水平運動 (ambulation) と立ち上がり行動 (rearing) いずれについても, 2VO-Day4および2VO-Day7群とそれぞれの対照群 (Sham-Day4およびSham-Day7群) との間には明らかな差を認めなかった。しかしながら, 行動の軌跡についてみると, 2VO群ではSham群に比較して壁に沿って移動する時間が多い傾向が認められた。すなわち, 2VOはOF試験における行動量には影響を与えなかったが, 行動パターンを変

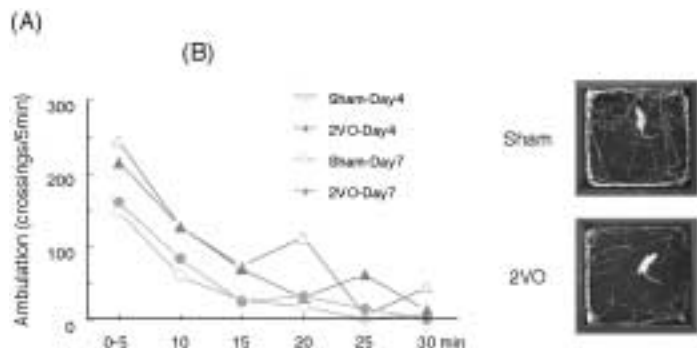


Fig. 2. Changes in the open field performance in 2VO rats.

Open field performance was evaluated for a 30-min period on day 4 or day 7 after transient ischemia (10 min)

(A) Changes in horizontal activity, ambulation, evaluated every 5 min.

Each point indicates the group mean of 3-8 rats.

(B) Specimen tracings showing behavioral patterns in the open field. Upper panel: Sham-operated rat; Lower panel: 2VO rat

化させた。

CFC試験による検討

2VOモデルを用い, 脳虚血 - 再灌流後4日目に, CFC試験を実施した。FS刺激の条件を0.3mAと0.5mAに設定し, 再曝露時に観察されるすくみ行動の刺激強度依存性を検討した。対照群 (Sham-Day4) では, 刺激強度に依存して, すくみ行動発現率の増加が認められた。一方, 2VO群 (2VO-Day4) では, 刺激強度依存性は認められず, いずれの刺激条件に対しても高いすくみ行動発現率 (約80%) を示した。すなわち, 2VO-Day4におけるすくみ行動発現率はSham-Day4に比べて増加する傾向を示した (Fig. 3.)。

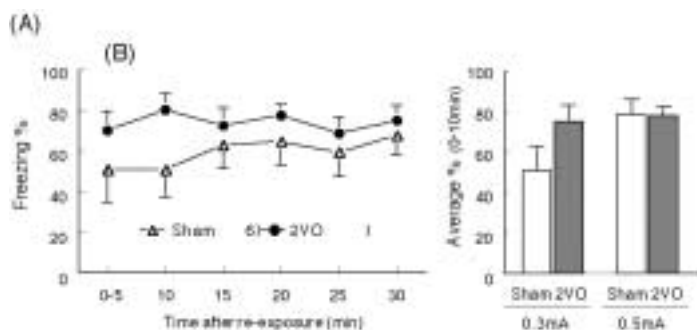


Fig. 3. Footshock intensity dependent freezing behavior in the contextual fear conditioning test and 2VO-induced effects.

(A) Time course changes in freezing behavior evaluated every 5 min in 2VO rats.

Rats were stimulated with 0.3 mA footshock. Each point indicates the group mean ± SEM of 6-8 rats.

(B) Effects of footshock intensity on freezing behavior.

Rats were stimulated with 0.3 mA or 0.5 mA footshock. Each bar indicates the 0-10 min mean of 6-8 rats.

4VO群については、2VO群において対照群との間に差が認められた刺激条件(0.3mA)について実験を行った。両側椎骨動脈のみを焼灼したVAO群では、2VO群と同程度のすくみ行動発現(約80%)が観察された。これに対して、4VO群におけるすくみ行動は、VAO群に比べて低値を示した。このように、2VO群と4VO群はCFCに対して異なった行動応答を示した(Fig. 4.)。

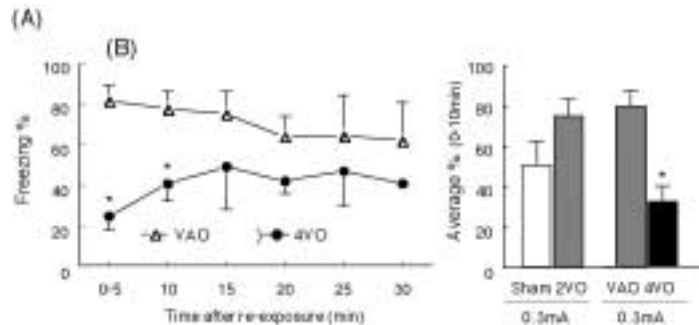


Fig. 4. Effects of 2VO and 4VO on freezing behavior in the contextual fear conditioning test.

(A) Time course changes in freezing behavior evaluated every 5 min in 4VO rats.

Each point indicates the group mean \pm SEM of 3-8 rats. Rats were stimulated with 0.3 mA footshock. Each point indicates the group mean \pm SEM. of 6-8 rats.

(B) Summarized results showing the effects of 2VO and 4VO on freezing behavior.

Each bar indicates the 0-10 min mean of 3-8 rats. Rats were stimulated with 0.3 mA footshock. * $p < 0.05$ vs VAO (vertebral artery occlusion) rats.

2) 不安関連行動に対するNRCの効果

2VOラット認められた不安関連行動に対するNRCの効果を検討した。NRC (150mg/2.5ml/kg) は虚血開始直後に尾静脈内に投与し、虚血4日目のCFC試験におけるすくみ行動を30分間にわたって評価した。

Fig. 5.に示すように、再曝露後15分間のNRC処置2VO群におけるすくみ行動は溶媒投与2VO群を下回り、対照群とほぼ同レベルを推移した。

3) LTP形成障害に対するNRCの効果

2VOラットに認められるLTP形成障害に対するNRCの効果を検討した。NRC (150mg/2.5ml/kg) の投与は虚血開始直後、LTPの計測は虚血4日目に行った。

2VOラットに認められた海馬歯状回シナプスにおけるLTP形成の障害は、NRC処置によって改善する傾向を示した。すなわちNRC投与2VO群では、7例中5例にLTPが形成された。Fig. 6.に5例についての成績を示した。

4. 考察

人工酸素運搬体の虚血性疾患治療へ応用の可能性を追究すべく、治療効果のendpointを脳機能改善作用に求めるとの視点が

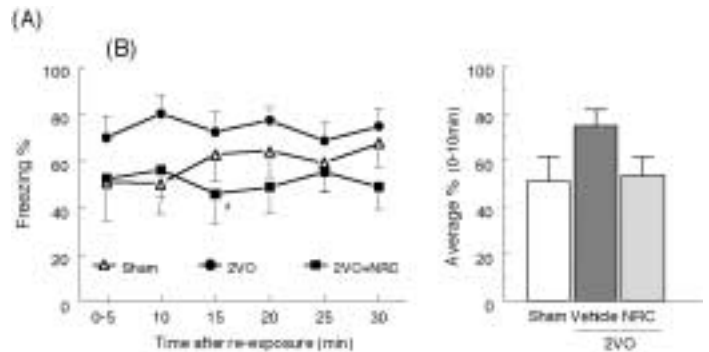


Fig. 5. Effects of NRC on 2VO-induced freezing behavior in the contextual fear conditioning test.

(A) Time course changes and (B) the mean response (0-10 min) in freezing behavior evaluated every 5 min in sham-operated rats and 2VO rats treated with/without NRC.

NRC was injected during sham-operation or ischemia via tail vein at a dose of 150 mg/kg. Rats were stimulated with 0.3 mA footshock. Each value indicates the mean \pm SEM of 3-8 rats. # $p < 0.05$ vs vehicle-treated 2VO rats.

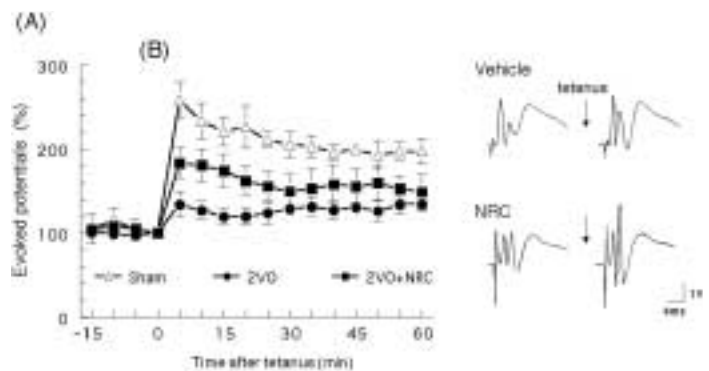


Fig. 6. Effects of NRC on 2VO-induced LTP impairment.

(A) Time course changes in LTP formation evaluated every 5 min in sham-operated rats and 2VO rats treated with/without NRC.

(B) Specimen recordings obtained from vehicle-treated (upper) and NRC-treated (lower) 2VO rats.

LTP was recorded in the perforant path-dentate gyrus synapses of the hippocampus. NRC was injected during a 10-min ischemia via tail vein at a dose of 150 mg/kg. Each value indicates the mean \pm SEM of 6-8 rats.

ら、有用性の高い行動学的評価系の構築を図り、ナノカプセル型人工酸素運搬体NRCの有用性を検討した。

CFC試験は環境に関連付けられた記憶に基づく不安の評価系として広く用いられている。つまり、学習記憶能が障害されたラットでは、嫌悪刺激であるFSと嫌悪刺激を受けた環境との関連付けが障害され、条件付けられた恐怖を背景とする不安関連行動であるすくみ行動の発現が低下する。本研究において、4VOラットはすくみ行動発現率の低下を示した。この事実は、我々の以前の報告と一致するものであり、LTP障害を改善させる薬理的処置によってすくみ行動が対照群のレベルまで回復することから、海馬シナプス可塑性の変化を伴った虚血 - 再灌

流障害による記憶障害に関連した行動学的変化と考えられる¹⁴⁾。一方、2VOラットに関しても、4VOラットと同様に海馬シナプス可塑性の障害という電気生理学的変化が観察される^{11-13,15)}。この2VOラットにおけるLTP形成障害は、ラジカルスカベンジャーを含む薬理的処置によって改善される¹⁶⁾。我々は、人工酸素運搬体についても、NO供与能を有するHb修飾体SNO-PEG-Hbが、2VOラットにおけるLTPを改善することを報告している⁹⁾。しかしながら、2VOラットにおけるLTP障害が具体的にどのような行動学的変化に関連するののかという点については不明であった。我々は、抗うつ薬や抗不安薬が海馬LTPを変化させることを見出し、その治療効果との関連性を報告してきた¹⁸⁻²⁴⁾。これらの実験的事実に基づき、脳循環障害に伴った海馬シナプス伝達における変化が、脳血管障害後の周辺症状として知られている不安・焦燥といった情動変化と関連している可能性を推測するに至った。

今回の行動学的基礎検討によって、2VOラットではすくみ行動発現率の増加という、4VOラットとは一見逆の行動応答を示すことが明らかとなった。OF試験では、2VOラットと対照群との間に運動量の差が認められなかったことから、このすくみ行動の増加が、脳虚血による運動機能の障害に起因するものではないことは明らかである。不安・焦燥は脳血管障害の周辺症状あるいは随伴症状として広く認められる臨床症状である。2VOラットにおける不安水準の上昇（不安の増強）は、脳血管性障害における随伴症状を反映する行動学的変化である可能性がある。このことは、OF試験において、2VOラットがSham群に比較して装置中央部への進入頻度の減少という不安水準の上昇を示す行動パターンを示したことによっても支持される。さらに、4VO群の対照群であるVAO群についても2VO群と同程度のFreezingが観察されたという事実は、VAOが一種の2VO処置であることを考え合わせると、一過性不完全脳虚血に起因した変化とみなすことが可能であり、2VOラットにおける結果と矛盾しない。これらの行動学的知見は、CFC試験の刺激条件や虚血条件を変化させることによってはじめて得られたものである。換言すれば、虚血・再灌流障害の程度に依存した脳機能不全状態を反映している可能性があり、目的に合わせた虚血性障害の評価系となり得るものと期待される。このような不完全脳虚血モデルにおいて、虚血中に処置したNRCは虚血後遅発性に認められるLTP障害と不安行動を改善する傾向を示した。このNRCによる脳機能改善作用の機序に関しては不明であり、不完全脳虚血中（脳血流が約70～80%低下）に投与したことによって得られた効果なのかという点も含め、今後明らかにすべき課題である。

現在、NRCに関しては、ウィルス除去・不活化を図った新しい製剤（TRM 645）の開発が進められている。今後、NRCについて得られた本実験結果をもとに、ナノカプセル型人工酸素運搬体の脳虚血性疾患への臨床応用という観点から、より多角的な評価が期待される。

謝辞

本研究の一部は平成15年度課題設定型産業技術開発費助成事業（新エネルギー・産業技術総合開発機構：NEDO）「ナノカプセル型人工酸素運搬体制剤の製造技術開発プロジェクト」によった。本研究を遂行するにあたりご協力いただいた島原由佳子、岩瀬友幸、外山高朗各氏に感謝する。

参考文献

1. 関口定美．人工酸素運搬体としての人工血液の開発と臨床応用．日本臨床 1997;55:2439-2446.
2. Iwasaki K, Iwashita Y. Preparation and evaluation of hemoglobin-polyethylene glycol conjugate (pyridoxalated polyethylene glycol hemoglobin) as an oxygen-carrying resuscitation fluid. *Int J Artif Organs* 1986;10:411-416.
3. Nakai K, Matsuda N, Ohta T, Amano M, Takahashi TA, Sakuma I, Kitabatake A, Ito S, Nakazato Y, Sekiguchi S. Lysophosphatidylcholine, a component of stromal phospholipids, as a candidate vasoconstrictive factor present in stroma-free hemoglobin. *Int J Artif Organs* 1994;18:198-205.
4. Nakai K, Ohta T, Sakuma I, Akama K, Kobayashi S, Tokuyama S, Kitabatake A, Nakazato Y, Takahashi TA, Sekiguchi S. Inhibition of endothelium-dependent relaxation by hemoglobin in rabbit aortic strips; comparison between acellular hemoglobin derivatives and cellular hemoglobins. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996;28:115-123.
5. Pawlosky JR, Swaminathan RV, Stamler JS. Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation. *Circulation* 1998;97:263-267.
6. Deible CR, Petrosko P, Johnson PC, Beckman EJ, Russell AJ, Wagner WR. Molecular barriers to biomaterial thrombosis by modification of surface proteins with polyethylene glycol. *Biomaterials* 1999;20:101-109.
7. Nakai K, Togashi H, Yasukohchi T, Sakuma I, Fujii S, Yoshioka M, Satoh H, Kitabatake A. Preparation and characterization of SNO-PEG-hemoglobin as a candidate for oxygen transporting material. *Int J Artif Organs* 2001;24:322-328.
8. Nakai K, Sakuma I, Togashi H, Yoshioka M, Sugawara T, Satoh H, Kitabatake A. S-nitrosylated polyethylene glycol-conjugated hemoglobin derivative as a candidate material for oxygen therapeutics. *Adv Exp Med Biol* 2003;519:207-216.
9. Otani T, Jesmin S, Togashi H, Sakuma I, Nakai K, Satoh H, Yoshioka M, Kitabatake A. An S-nitrosylated hemoglobin derivative protects the rat hippocampus from ischemia-induced long-term potentiation impairment with a time window. *J Pharmacol Sci* 2004;96:188-198.

10. 富樫広子, 吉岡充弘. 脳虚血への細胞応答の病態分子薬理 - 一過性脳虚血と海馬長期増強. 日本薬理学会雑誌 1998;14: 55-63.
11. Mori K, Yoshioka M, Suda N, Togashi H, Matsumoto M, Ueno K, Saito H. An incomplete cerebral ischemia produced a delayed dysfunction in the rat hippocampal system. *Brain Res* 1998;795:221-226.
12. Togashi H, Mori K, Ueno K, Matsumoto M, Suda N, Saito H, Yoshioka M. Consecutive evaluation of nitric oxide production after transient cerebral ischemia in the rat hippocampus using in vivo brain microdialysis. *Neurosci Lett* 1998;240:53-57.
13. Mori K, Suda N, Togashi H, Matsumoto M, Saito H, Yoshioka M. Effects of bifemelane on incomplete cerebral ischemia-induced reduction of long-term potentiation in rat hippocampal neurones in vivo. *Pharmacol Toxicol* 1999; 85:98-102.
14. Mori K, Togashi H, Ueno K, Matsumoto M, Yoshioka M. Aminoguanidine prevented the impairment of learning behavior and hippocampal long-term potentiation following transient cerebral ischemia. *Behav Brain Research* 2001;120:159-168.
15. Togashi H, Mori K, Ito Y, Matsumoto M, Ueno K, Ohashi S, Otani H, Yoshioka M. Involvement of interleukin-1 β /nitric oxide pathway in the postischemic impairment of long-term potentiation of the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 2001;313:133-136.
16. Otani H, Togashi H, Jesmin S, Sakuma I, Matsumoto M, Yoshioka M. Edaravone, a free radical scavenger, ameliorates the rat hippocampal long-term potentiation after transient ischemia with time window. *J Pharmacol Sci* 2003;91:Suppl -178P
17. Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory : long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361:31-39.
18. Matsumoto M, Kojima T, Togashi H, Mori K, Ohashi S, Ueno K, Yoshioka M. Differential characteristics of endogenous serotonin-mediated synaptic transmission in the hippocampal CA1 and CA3 fields of anaesthetized rats. *Naunyn-Sch Arch of Pharmacol* 2002;366:570-577.
19. Kojima T, Matsumoto M, Tachibana K, Togashi H, Osamu K Yoshioka M. Fluvoxamine suppresses the long-term potentiation in the hippocampal CA1 field of anesthetized rats : An effect mediated via 5HT_{1A} receptors. *Brain Res* 2003;959:165-168.
20. Ohashi S, Matsumoto M, Togashi H, Ueno K, Yoshioka M. The serotonergic modulation of synaptic plasticity in the rat hippocampo-medial prefrontal cortex pathway. *Neurosci Lett* 2003;342:179-182.
21. Ohashi S, Togashi H, Matsumoto M, Mori K, Ueno K, Yoshioka M. Changes in Synaptic Properties in Cortical-Limbic Communications Induced by Repeated Treatments With fluvoxamine in Rats. *J Pharmacol Sci* 2003;92:100-107.
22. Matsumoto M, Kanno M, Togashi H, Ueno K, Otani H, Mano Y, Yoshioka M. Involvement of GABAA receptors in the regulation of the prefrontal cortex on dopamine release in the rat dorsolateral striatum. *Eur J Pharmacol* 2003;482:177-184.
23. 松本真知子、富樫広子、吉岡充弘 . SSRIと抗不安作用 - 電気生理学の実験に基づいた基礎的研究 . - 臨床精神薬理 2003;6:1293-1302.
24. Tachibana K, Matsumoto M, Togashi H, Kojima T, Morimoto Y, Kemmotsu O, Yoshioka M. Milnacipran, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor, suppresses long-term potentiation in the rat hippocampal CA1 field via 5-HT_{1A} receptors and α -adrenoceptors *Neurosci Lett* 2004;357:91-94.
25. Pulsinelli WA, Brierley JB. *Stroke* 1979;10:267-272.

日本血液代替物学会 総会

1. 日時:

平成16年7月14日(水)

2. 場所:

札幌市北方圏センター

〒060-0003 北海道札幌市中央区北3条西7丁目

道庁別館12階

Tel: 011-221-7840

3. 議題:

報告事項

年次大会の開催状況

会員動向

会誌編集委員会

審議事項

平成15年度事業報告

平成15年度収支決算

平成16年度事業(実績報告)

ホームページ開設について

以下審議内容を略記します。

報告事項

年次大会の開催状況として下記事項が報告された。

- 1) 第11回日本血液代替物学会年次大会
- 2) 平成16年7月3日(火)～4日(水)
- 3) 北海道札幌市中央区北3条西7丁目 道庁別館12階
- 4) 日本血液代替物学会会員、
臨床医学・理工学研究者、
国内の大学および医療機関臨床医、
血液センター関係者

会員状況は以下のとおり。

- 1) 維持会員: 5社
- 2) 賛助会員: 5社
- 3) 正会員: 136名
- 4) 購読会員: 19箇所

会誌編集委員会からの報告は以下のとおり。

会誌「人工血液」の発行。

- ・平成15年度: 第11巻2号(7月)、3号(11月)、4号(平成16年2月)発行。
- ・平成16年度: 第12巻1号(平成16年6月)、2号(7月)発行。
第12巻3号(9月)4号(12月もしくは1月)、第13巻1号(平成17年3月)発行予定。

審議事項

平成15年度事業報告(平成15年4月1日～平成16年3月31日)が行われ各々承認された。

- 1) 定期総会の開催
郵送にて実施。(平成16年2月24日発送、3月30日集計)
- 2) 第10回年次大会(大会長 小林 統一)
第9回血液代替物国際会議

(IX International Symposium on Blood Substitutes) との
合同開催

平成15年3月2日(日)～5日(水)

京王プラザホテル(東京)で行われた。

開催時期は平成14年度になるが、平成15年度事業とすることと理事会で決定された。

平成15年度収支決算報告が行われ承認された。

平成15年度 会計 収支決算表
(自 平成15年4月1日 至 平成16年3月31日)

収 入		支 出	
摘 要	金 額	摘 要	金 額
前期繰越金	7,452,640	会誌出版費	988,270
正会員会費	630,000	集会・委員会費	175,025
賛助会員会費	1,600,000	年会補助金	1,000,000
維持会員会費	8,000,000	ホームページ作成維持費	2,000,000
購読会員会費	66,000	事務人件費	2,197,120
広告代・雑収入	262,000	事務費	749,130
利 息	1,523	基金に繰り入れ	2,000,000
		次期繰越金	8,902,618
計	18,012,163	計	18,012,163

平成16年度事業(実績報告)

1) 定期総会の開催

平成16年7月14日(水) 札幌市北方圏センターにて開催。

2) 第11回年次大会の開催(大会長 川村 明夫)

平成16年7月13日(火)、14日(水)

於 札幌市北方圏センター

3) 「人工血液の発行」の発行

第12巻1号(平成16年6月)、2号(7月)発行。

ホームページの開設について報告があった。

日本血液代替物学会のホームページが下記のアドレスにて公開されることとなった。

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

日本血液代替物学会 役員名簿 (平成16年度)

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

日本血液代替物学会 評議員名簿 (平成16年度)

青木 克憲	浜松医科大学 教授	高久 史磨	自治医科大学 学長
阿岸 鉄三	板橋中央総合病院 血液浄化療法センター ブラッドアクセス治療センター 所長	高橋 晃	テルモ(株) 代表取締役社長
浅野 茂隆	早稲田大学理工学部 教授	高橋 英嗣	山形大学医学部 助教授
阿部喜代司	筑波大学医療技術短期大学部 教授	高橋 恒夫	東京大学医科学研究所 教授
飯塚哲太郎	理化学研究所播磨研究所 所長	武岡 真司	早稲田大学理工学部 助教授
池田 久實	北海道赤十字血液センター 所長	土田 英俊	早稲田大学理工学部 名誉教授
池田 康夫	慶應義塾大学医学部 教授	土屋 喜一	早稲田大学理工学部 名誉教授
池淵 研二	埼玉医科大学 教授	遠山 博	埼玉医科大学総合医療センター 名誉所長
伊藤 俊之	京都府立医科大学 助教授	友田 燁夫	東京医科大学 教授
大島 宣雄	筑波大学基礎医学系 教授	豊田 忠之	東部地域病院 元院長
大塚 節子	岐阜大学医学部 講師	仲井 邦彦	東北大学医学部 助教授
大柳 治正	近畿大学医学部 教授	中井 一士	麻薬覚醒剤乱用防止センター 専務理事
尾形 利郎	東海大学医学部 名誉教授	長澤 俊郎	筑波大学臨床医学系 教授
片岡 一則	東京大学大学院工学系研究科 教授	中島 常隆	三菱ウェルファーマ(株) 生物製剤本部長
川村 明夫	札幌北榆病院 理事長	西 勝英	肥後医育振興会 理事
北畠 顕	北海道大学 名誉教授	西出 宏之	早稲田大学理工学部 教授
黒澤 良和	藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授	西谷 孝子	富士レビオ(株) 先端研究所
小林 紘一	慶應義塾大学医学部 教授	半田 誠	慶應義塾大学医学部 助教授
小室 勝利	国立感染症研究所血液安全性研究部 部長	平澤 博之	千葉大学医学部 教授
斎藤 英彦	国立名古屋病院 院長	福島 昭二	神戸学院大学薬学部製剤学 助教授
酒井 清孝	早稲田大学理工学部 教授	藤井 寿一	東京女子医科大学 教授
佐久間一郎	北海道大学大学院医学研究科 講師	藤島清太郎	慶應義塾大学医学部 講師
桜井 靖久	東京女子医科大学 名誉教授	船津 昭信	(財)化学及血清療法研究所 常務理事
佐藤 誠	ニプロ(株) 医薬品研究所 所長	堀 進悟	慶應義塾大学医学部 助教授
鮫島 達也	青山学院大学理工学部 名誉教授	堀 原一	筑波大学 名誉教授
清水 勝	杏林大学医学部 客員教授	堀之内宏久	慶應義塾大学医学部 講師
清水 慶彦	京都大学再生医科学研究所 教授	宮尾 秀樹	埼玉医科大学総合医療センター 教授
十字 猛夫	日本赤十字血液事業本部 中央血液研究所 所長	宮崎 保	札幌通信病院 名誉院長
末松 誠	慶應義塾大学医学部 教授	村田 満	慶應義塾大学医学部 講師
平 明	鹿児島大学医学部 名誉教授	湯浅 晋治	日本赤十字社血液事業本部
高折 益彦	東宝塚さとう病院 名誉院長	四津 良平	慶應義塾大学医学部 教授
高木 智史	(株)オキシジェニクス 代表取締役社長	米川 元樹	札幌北榆病院 院長

(ア順敬称略)

日本血液代替物学会 会則

第1章 総則

第1条：（名称）本会は日本血液代替物学会（The Society of Blood Substitutes, Japan）と称する。

第2条：（事務局）本会の事務局は当分の間、会長の所属機関内に置く。

2. 事務局には事務局長を置き、会長の統括のもと本会の事業および会計に関する一般事務を司る。

第3条：（目的）本会は、血液代替物およびその関連分野の研究の進歩ならびに普及を計り、会員の研究発表、知識の交換、連絡提携の場となり、血液代替物の評価や今後の指針を提言する活動を通して、学際、国際間に広く貢献することを目的とする。

第4条：（事業）本会は前条の目的達成のため、次の事業を行う。

- 1) 総会、年次大会(一般演題も含める)、研究講演会、シンポジウムなど。
- 2) 会誌“人工血液”の刊行。
- 3) その他本会の目的に沿った事業。

第2章 会員

第5条：（種別）本会会員は次の分類とする。

- 1) 正会員 本会の目的に賛同する個人で所定の手続きを行い、会費を納入した者とする。
- 2) 賛助会員 本会の目的を賛助する団体または個人とする。
- 3) 維持会員 本会の目的を賛助する団体または個人であり、本会の維持に格段の協力をする会員をいう。

第6条：（会費）会員は、つぎの種別に従って会費を納めなければならない。

- 1) 正会員 年額 1万円
- 2) 講読会員 年額 6千円
- 3) 学生会員 年額 5千円
- 4) 賛助会員 年額 1口以上（1口20万円）
- 5) 維持会員 年額 10口以上（1口20万円）

2. 既納の会費はいかなる理由があっても、これを返還しない。

第7条：（入会）本会に入会希望者は、正会員1名の紹介により、所定の入会申込書に入会金5千円と一年分の会費を添え事務局宛に提出し、理事会の承認を経なければならない。

第8条：（退会）退会しようとする会員は、理由とその旨を届け出て、理事会の承認を経なければならない。

第9条：（除名）本会の目的に反する行為あるいは本会の名誉を損なう行為のあった会員は、評議員会の議決によってこれを除名することができる。

第3章 役員、顧問、評議員および職員

第10条：（設置および定数）本会に次の役員を置く。

- 1) 会長 1名
- 2) 副会長 1名以上5名以内
- 3) 理事 7名以上15名以内(会長、副会長を含む)
- 4) 監事 2名
- 5) 顧問 若干名

第11条：（役員を選任）役員は、別に定めるところにより、正会員の内から評議員会で選出し、監事は正会員の中から総会で選出する。

2. 顧問は、会長が委嘱し、その任期は役員の任期に準ずる。

第12条：（任期）役員および監事の任期は2年とし、再任を妨げない。

第13条：（会長）会長は、各事業を司り本会を代表統括する。

第14条：（副会長）会長を補佐し会長に事故があるときはその代理となる。

第15条：（理事）理事は理事会を組織して、この会則に定められた事項のほか、評議員会および総会の権限に属する事項以外の事項を評議し、施行する。

第16条：（監事）監事は、資産の状況および理事の会務執行状況を監査する。

第17条：（顧問）顧問は、理事会および評議員会に出席して、意見を述べることができる。

第18条：（評議員）評議員は正会員の中から総会で選出し、任期は2年とする。ただし再任を妨げない。

2. 評議員は、評議員会を組織し、この会則に定められた事項を決議するほか、会長を補佐して本会の運営を助ける。

第19条：（事務局および職員）本会の事務を処理するため、事務局および職員を置く。

2. 職員人事は会長が任命権者となり、有給とする。

第4章 年次大会長

第20条：（大会長と職務）本会に年次大会を主宰する大会長1名をおく。また、大会長を補佐し、大会長に事故があったとき、または欠けたときには、その職務を代行する副大会長1名をおくことができる。

第21条：（選任）大会長および副大会長は、評議員の中から、理事会の議決によって選任される。
2. 理事会の議決によって、副大会長を次年度の大会長とすることができる。

第22条：（任期）大会長および副大会長の任期は、選任された日に始まり、学会年次大会が終了した日に終わる。

第5章 会議

第23条：（会議）本会の会議は、つぎの3種とする。

- 1) 理事会
- 2) 総会
- 3) 評議員会

第24条：（理事会）理事会は、理事をもって構成する。

2. 理事会は年4回以上会長が召集する。ただし、会長が必要と認めるとき、または、理事の3分の1が会議の目的および事項を示して請求したときは、臨時理事会を召集することができる。
3. 理事会の議長は会長とする。
4. 理事会は、理事会構成現在数の3分の2以上が出席しなければ、議事を開き、議決することができない。ただし、当該議事について文書によってあらかじめ意志を表示した者は、これを出席者とみなす。
5. 監事は、理事会に出席して、本会の運営について意見を述べることができる。

第25条：（総会）総会は、通常総会、臨時総会の2種とし、会長が召集する。

2. 総会は、正会員をもって構成する。
3. 通常総会は、年一回開く。
4. 臨時総会は、次の場合に召集する。
 - 1) 理事会で必要と認められた場合
 - 2) 監事、または会員50名以上から会議の目的を示して請求があった場合

第26条：（総会議長）通常総会の議長は会長とし、臨時総会の議長は、会議の都度会員の互選で定める。

第27条：（総会の通知）総会の召集は、その開会期日1週間前までに、総会に付すべき事項、日時および場所を記録した書面または会誌で、会員に通知しなければならない。

2. 出席会員の3分の2以上の同意があったときは、あら

かじめ通知しなかった事項について審議し、議決することができる。

第28条：（審議事項）次の事項は、通常総会の承認を求めなければならない。

- 1) 事業報告および会員の異動状況書
- 2) 収支決算、財産目録、貸借対照表
- 3) 事業計画および収支予算
- 4) 前記各項のほか、理事会で必要と認めた事項

第29条：（総会の定足数）総会は、正会員現在数の5分の1以上出席しなければ、議事を開き、議決することができない。ただし、当該議事について、あらかじめ書面をもって意志を表示したものは出席者と見なす。

2. 総会に出席できない正会員は、出席正会員を代理人として、その権限を委任することができる。
3. 総会の議決は、出席会員の過半数をもって決し、可否同数のときは議長の決するところによる。

第30条：（総会議事録の通知）総会の議事の要領および議決した事項は、正会員に通知する。

第31条：（評議員会）評議員会は、評議員で組織し、必要がある場合に会長が召集する。

2. 会長は評議員会の議長となる。

第32条：（審議事項）評議員会は、この会則に定めるもののほか、理事会で必要と認めた事項を審議する。

第33条：（評議員会の定足数）評議員会は、評議員現在数の2分の1以上の出席がなければ、議事を開き、議決することができない。ただし、当該議事について、あらかじめ書面をもって意志を表示したものは出席者と見なす。

2. 評議員会の議事は、出席評議員の過半数をもって決し、可否同数のときは、議長の決するところによる。評議員会に出席できない評議員は、出席評議員を代理人として、その権限を委任することができる。
3. 会長は、書面で評議員の意見を求め、評議員会の召集および前項の議決にかえることができる。

第34条：（議事録の保存）全ての会議には議事録を作成し、議長および出席者代表者2名以上が署名押印のうえ、これを保存する。

第6章 資産及び会計

第35条：（資産）本会の資産は次の通りとする。

- 1) 会費
- 2) 寄付金
- 3) 事業にともなう収入

- 4) 資産から生じる果実
- 5) その他の収入

第36条：(資産の管理) 本会の資産は、会長が管理し、現金は理事会の議決によって、確実な有価証券を購入するか、または定額郵便貯金とするか、もしくは確実な信託銀行に信託するか、あるいは定額預金として会長が保管する。

第37条：(寄付の受領) 寄付金品は、理事会の議決を経てこれを受領する。

第38条：(経費) 本会の経費は、会費、刊行物に対する購読料、寄付金、資産から生じる果実などの運用資産をもって支弁する。

第39条：(事業計画および収支予算) 本会の事業計画およびこれにともなう収支予算は、毎年会計年度開始前に会長が編成し、理事会、評議員会の議決を経て、総会の承認を受けなければならない。

第40条：(収支決算) 会計報告は会長が毎年一回、会計報告書を作成し、監事の監査を経て、評議員会および総会の承認を得る。

第41条：(会計年度) 本会の会計年度は4月1日より翌年3月31日までとする。

第7章 会則の変更ならびに解散

第42条：(会則の変更) 本会の会則の変更には理事会の発議と総会の議決を要する。

第43条：(解散) 本会の解散は、理事会、評議員会および総会の各々において出席会員の4分の3以上の同意を得なければならない。

第44条：本会の解散にともなう残余財産は、理事会、評議員会および総会の各々において出席会員の4分の3以上の議決を経て、本会の目的と同種または類似の公益事業に寄付するものとする。

第8章 補 則

第45条：この会則を施行するために必要とされる細則は、理事会および評議員会の議決を経て、別に定める。

付 則 この会則は、平成5年7月21日設立総会において議決され、当日から施行する。

編集後記

本号では、第11回日本血液代替物学会年次大会大会長 川村明夫先生より特別寄稿をお願いし、先生自身の血液代替物に対するご熱意とお考えをお伺いできました。また、血液代替物の開発に重要な、ウイルスの不活化に関する総説やリボソームに関する本格的な総説を掲載することができました。原著論文には、赤血球代替物の適用を広げる研究が報告され、今後、本誌

にこのような論文が盛んに掲載されることを期待しております。

また、血液代替物学会のホームページも本格的に始動しておりますので、年次大会の情報や登録など、併せてご利用ください。本号は遅れましたが、次号は殆んど編集ができておりますので、3月前半にはお届けできると思います。

(武岡 真司)

投稿規定

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

執筆規定

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

- 1) 原稿はワープロを用いて作成し、使用したソフト名を記載してフロッピーにより提出すること。その際、ハードコピー4部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。オリジナルのソフトおよびテキストファイル形式でも保存し提出すること。
- 2) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著者名、全著者所属、英文著者名、英文所属、ついで筆頭著者の住所、英文住所を記入する。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。
- 3) 総説、原著、および報告については、第2頁以降に和文抄録、Keywords(英文で6個程度)を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること。英文抄録は英文ワープロを用いて、別の「ABSTRACT」ファイルとしてハード

- コピーとともに提出しても構わない。
- 4) 句読点はコンマ(、)とピリオド(。)とする。
 - 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbol フォントを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめること。
 - 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μ m, L, mL, μ L, mol, g, mg, μ g, ng, pg, fg, N / 10などを用いる。
 - 7) FigureとTable: 引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は全て英文とすること。本文ハードコピー上に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。
 - 8) 文献: 本文に引用した順序に番号を付け、文中では²⁾, ^{3,5)}, ^{1,4,6)}などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名・論文題名・誌名 西暦発行年; 巻数: 頁~頁. とし、誌名の省略は医学中央雑誌またはIndex Medicus に準拠する。単行本の場合は全著者名・題名・編集者名・書名・発行地: 発行書店, 年号; 頁~頁. の順とする。
 1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
 2. 砂本順三, 岩本 清. リボソームの調製. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編. リボソーム. 東京: 南江堂, 1988;21-40.
 3. Fowler SA, Andracki M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular

- retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22:27-42.
4. Reichert CM, Kelly VL, Macher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985;111-60.
 - 9) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
 - 10) 既発表の図表、その他を引用、転載する場合には、あらかじめ著作権所有者の許可を得ること。また、掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

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

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

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

編集委員会

武岡真司(委員長), 東 寛, 池淵研二, 酒井宏水, 津田良夫, 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.12(4) 2005年2月4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