

人工血液

第 14 卷 第 1 号 2006 年 8 月

目 次

第13回年次大会プログラム	2
---------------------	---

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 14 No. 1 Aug, 2006

Contents

<i>The 13th Annual Meeting Program</i>	<i>2</i>
--	----------

第13回日本血液代替物学会年次大会

The 13th Annual Meeting of
The Society of Blood Substitutes, Japan

大会長：末松 誠（慶應義塾大学医学部教授 医化学教室）

会期：平成18年8月24日(木), 25日(金)

会場：慶應義塾大学医学部 北里講堂（北里記念医学図書館2階）

東京都新宿区信濃町35

大会事務局：〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部医化学教室

第13回 日本血液代替物学会年次大会

事務局長 合田巨人

運営事務局：〒150-0021 東京都渋谷区恵比寿西1-20-4

(株)アロフト 内

第13回 日本血液代替物学会年次大会運営事務局

担当 藤井律子

アドレス blood-sub-2006@aloft-inc.com

TEL 03-5784-3414

FAX 03-5459-3439

年次大会 大会長 挨拶

平素より、日本血液代替物学会に対しまして、趣旨をご理解頂き、ひとかたならぬご協力を頂いておりますことを心より深く感謝申し上げます。

このたび、日本血液代替物学会年次大会を開催するはこびとなりました。第13回目を迎える本会では、産学協同の特性を活かしたプログラムを鋭意企画いたしました。

まず、官共同の第1に実用化が間近に迫った人工酸素運搬体の担体等にも用いられるリポソームをベースにした製剤研究の現況、第2にアルブミンや抗体などの蛋白製剤の開発研究の現況にスポットをあてシンポジウムを企画いたしました。

また低体温療法の先導的研究者である日本大学の林 成之教授に特別講演をいただき、救急蘇生学における輸液管理等のあるべき姿についてのご講演をお願いいたしました。

さらに実用化研究の色彩の濃い本学会ならではの企画として、基礎研究の新たな地平を模索する目的で血球機能や蛋白質機能の基盤研究成果を軸にした演題も広く受け付けさせていただきます。

一般会員のみならず、学会賛助会員各社にもご発表を頂くことで、産学協同の闊達な交流を期待しております。

多数の皆様のご参加を心からお待ちしております。

第13回 日本血液代替物学会年次大会

大会長 末松 誠

(慶應義塾大学医学部教授 医化学教室)

お知らせとお願い

参加者の方へ

開場及び受付開始

開場、及び受付開始時間は8月24日(木)12:30～、8月25日(金)8:45～です。

参加登録

参加費は10,000円(懇親会費を含む)です。

ネームカードをお渡ししますので、所属・氏名を各自でご記入の上、ご着用下さい。

会期中、会場へご入場の際には必ずネームカードをご着用下さい。

参加登録申込要領

第13回日本血液代替物学会年次大会への参加は、事前に参加登録が可能です。学会ホームページから参加登録をした上で、登録料を所定の銀行口座へお振込下さい(下記参照)。当日の受付は混雑することがありますので、事前にご登録ならびに登録料をお振込み下さいますようお願い申し上げます。

事前にお振込みいただいた方は、当日、振込証明書を持参して下さい。

参加登録料振込先

- ・口座名：第13回日本血液代替物学会年次大会事務局
財団法人国際医学情報センター柳下俊江
ダイジュウサンカイニホンケツエキダイタイブツガッカイ
ネンジタイカイジムキョク
ザイダンハウジンコクサイイガクジョウハウセンター
ヤナギシタトシエ

- ・銀行名：三井住友銀行 麹町支店

- ・口座番号：普通預金 8808435

大変恐縮ですが、振込手数料は各自ご負担下さいますようお願い致します。

年会費及び新入会受付

日本血液代替物学会に未入会の方は、総合受付で入会手続きをおとりください。

年会費は正会員10,000円、購読会員6,000円、学生会員5,000円です。

抄録集

抄録集は会員全員に事前送付しています。又当日は受付にて1部1,500円で販売いたします。

懇親会

参加者相互の親睦を図るため、8月25日(金)午後5時40分よりレストラン オアシス(慶應義塾大学病院 新棟11階)において懇親会を開催します。参加費は無料ですので、ぜひご参加下さい。

演題発表される方へ

第13回日本血液代替物学会年次大会では、発表はすべて液晶プロジェクターで行います。ご了承下さい。

1) 事務局にて発表用のパソコン(Windows XP)を用意しておりますが、原則として各自パソコンをお持ち下さい。

パソコン持ち込みの方も発表データ(USBもしくはCD-Rのいずれか)をお持ちの方も、発表の1時間前までに受付へいらっしやって、試写を行ってください。

2) 発表時間はシンポジウムが25分(発表20分、質疑応答5分)、一般演題が15分(発表12分、質疑応答3分)です。

各種会議日程

理事会：8月24日(木) 11:00～12:00

評議員会：8月24日(木) 12:00～13:00

総会：8月24日(木) 19:10～

慶應義塾大学医学部 北里記念医学図書館2階 第1会議室

慶應義塾大学医学部 北里記念医学図書館2階 北里講堂

慶應義塾大学医学部 北里記念医学図書館2階 北里講堂

大会事務局

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部医化学教室

第13回 日本血液代替物学会年次大会

事務局長 合田巨人

運営事務局

〒150-0021 東京都渋谷区恵比寿西1-20-4

(株)アロフト 内

第13回 日本血液代替物学会年次大会運営事務局

担当 藤井律子

アドレス blood-sub-2006@aloft-inc.com

TEL 03-5784-3414

FAX 03-5459-3439

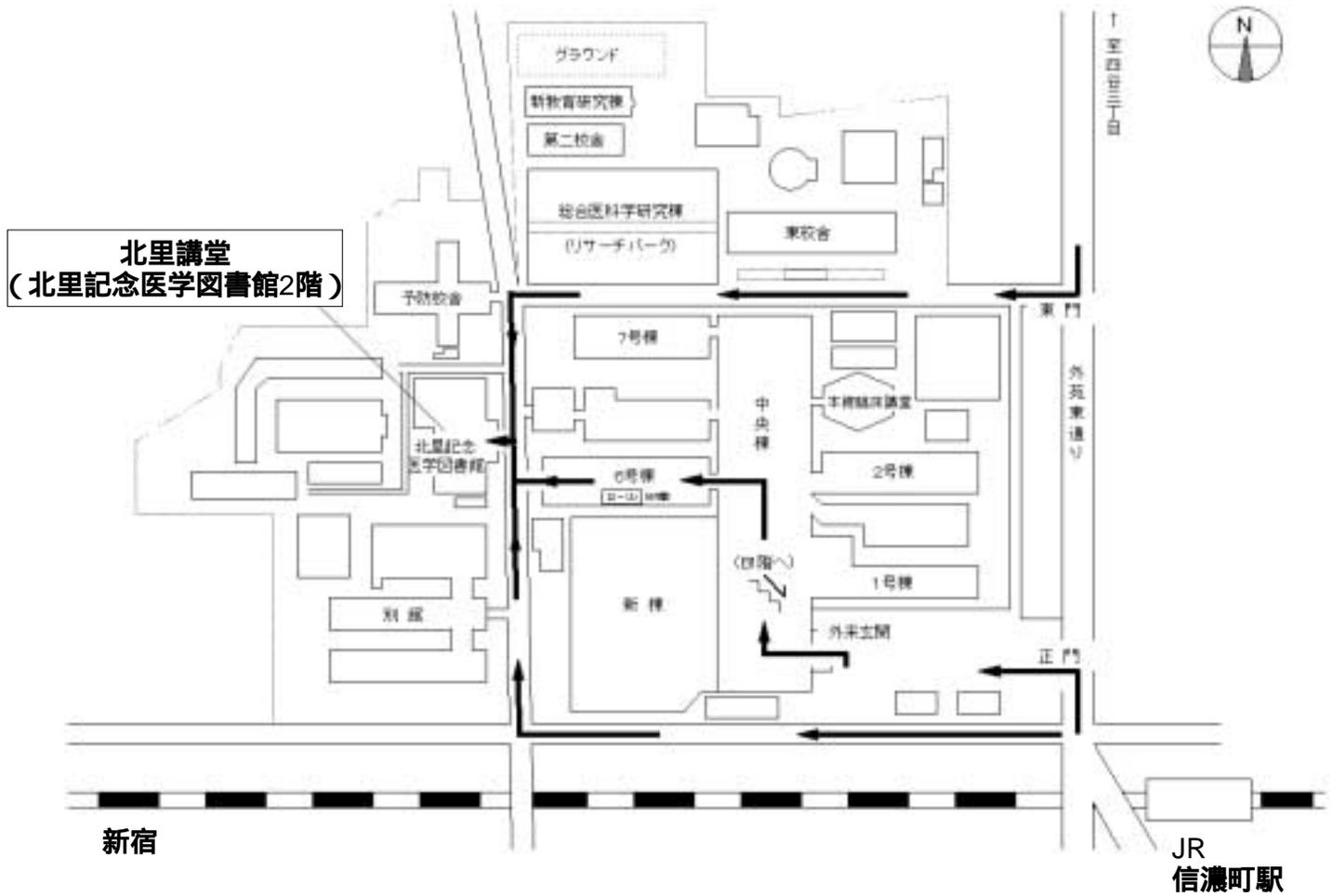
学会のホームページにて、最新のお知らせ、注意事項、プログラムなどを掲載していきます。併せてご確認、ご利用下さい。

学会ホームページ <http://www.blood-sub.jp/>

大会日程表

	平成18年8月24日(木)	平成18年8月25日(金)
8:00		
8:30		
9:00		9:00-11:55 シンポジウムⅡ
9:30		血漿蛋白製剤の現状と展望 座長：半田 誠 堀之内 宏久 演者：川口 敦弘 安楽 誠 小松 晃之 中川 晶人 Amy G. Tsai 武岡 真司 黒澤 良和
10:00		
10:30		
11:00	11:00-12:00 理事会	
11:30		
12:00	12:00-13:00 評議員会	12:05-12:55 ランチョンセミナー 座長：梶村 真弓 演者：Ryon M. Bateman
12:30		
13:00	13:00-13:20 開会の辞	13:00-13:50 大会長講演 座長：武岡 真司 演者：末松 誠
13:30	13:20-15:50 シンポジウムⅠ	13:50-16:05 一般演題Ⅱ 座長：足立 健 塚田 孝祐
14:00	リポソームを基盤とした人工血液製剤開発の 現状	
14:30	座長：高折 益彦 酒井 宏水 演者：川口 章 Amy G. Tsai	
15:00	酒井 宏水 松田 晃彦 堀之内 宏久 中城 圭介	
15:30		
16:00	16:05-18:20 一般演題Ⅰ	16:20-17:20 特別講演 座長：末松 誠 演者：林 成之
16:30	座長：小松 晃之 藤島 清太郎	
17:00		17:20 - 閉会の辞
17:30		17:40 - 学会懇親会 病院11階レストラン「オアシス」
18:00		
18:30	18:20-19:10 会長講演 座長：土田 英俊 演者：小林 紘一	
19:00		
19:30	19:10 - 総会	
20:00	19:40 - 編集会議 (第一会議室)	
20:30		

交通案内図



JR総武線 信濃町駅より 徒歩5分

開会の辞 13:00-13:20

シンポジウム I 13:20 -15:50

リボソームを基盤とした人工血液製剤開発の現状

座長: 高折 益彦
東宝塚さとう病院 名誉院長
酒井 宏水
早稲田大学理工学総合研究センター

1-1
13:20 Liposome-Encapsulated Hemoglobin (Trm645) Protects Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury in Primates: Effects of Oxygen Affinity and Dose-Response Relationship

川口 章
東海大学医学部

1-2
13:45 Optimization of Microvascular Function By Hb-Based Oxygen Carriers: Impact on Hb Concentration in Resuscitation

Amy G. Tsai
University of California, San Diego and La Jolla
Bioengineering Institute

1-3
14:10 ヘモグロビン小胞体の配位子反応

酒井 宏水
早稲田大学理工学総合研究センター酸素輸液プロジェクト

1-4
14:35 ヒトヘモグロビン小胞体 (OXY-0301) の治験薬 GMP 製造への取り組み

松田 晃彦
株式会社オキシジェニクス研究開発本部京都研究所

1-5
15:00 ヘモグロビン小胞体 (HbV) の臨床応用へ向けた開発研究

堀之内 宏久
慶應義塾大学医学部呼吸器外科

1-6
15:25 *Pichia pastoris* による遺伝子組換えヘモグロビンの発現と精製

中城 圭介
ニプロ株式会社医薬品研究所

一般演題 I 16:05 -18:20

座長: 小松 晃之
早稲田大学理工学総合研究センター
藤島 清太郎
慶應義塾大学医学部

1
16:05 ミオグロビンの酸素運搬分子への変換: 新しい酸素運搬物質の創製

根矢 三郎
千葉大学大学院薬学研究院

2
16:20 In Vitroにおけるヘモグロビン小胞体の造血前駆細胞への影響

藤原 満博
北海道赤十字血液センター

3
16:35 ラット摘出灌流心の虚血再灌流障害に対するアルブミン-ヘム rHSA-FcycP の保護効果

鈴木佐緒里
ニプロ株式会社医薬品研究所

4
16:50 ヘモグロビン小胞体 (HbV) が免疫系に及ぼす影響

高橋 大輔
北海道赤十字血液センター

5
17:05 HbV による輸液蘇生: 肺への影響

杖下 隆哉
日本医科大学附属病院麻酔科学教室

6
17:20 ヘモグロビン小胞体の脳梗塞における有効性に関する基礎的検討

小松 弘嗣
株式会社オキシジェニクス研究開発本部

7
17:35 Liposome-Encapsulated Hemoglobin (TRM645) as A Substitute for Transfusion -Retrospective Simulation of Clinical Application-

川口 章
東海大学医学部

8
17:50 Beagle 犬を用いた 50%脱血ショックにおける Hb 小胞体の蘇生効果および酸素運搬能の評価

池田 達彦
慶應義塾大学医学部呼吸器外科

9
18:05 人工赤血球 (ヘモグロビン小胞体) を用いたビーグル犬人工心肺モデルにおける頸動脈血流量、脳酸素代謝量の検討

保土田健太郎
慶應義塾大学医学部心臓血管外科

会長講演 18:20 -19:10

座長: 土田 英俊
早稲田大学理工学部 名誉教授
演者: 小林 紘一
慶應義塾大学医学部 教授

血液代替物の開発ー夢の実現に向けてー

シンポジウム II 9:00 -11:55

血漿蛋白製剤の現状と展望

座長: 半田 誠
慶應義塾大学医学部
堀之内 宏久
慶應義塾大学医学部

2-1

9:00 遺伝子組換え型人血清アルブミン製剤
(GB-1057)と血漿由来人血清アルブミン製剤との生物学
的同等性比較試験

川口 敦弘
三菱ウェルファーマ株式会社開発本部臨床研究部

2-2

9:25 ヒト血清アルブミンの安定性に及ぼす各種
添加剤の影響

安楽 誠
熊本大学大学院医学薬学研究部

2-3

9:50 遺伝子組換えアルブミン-プロトヘム錯体
からなる新しい酸素輸送ヘム蛋白質の創製

小松 晃之
早稲田大学理工学総合研究センター

2-4

10:15 ポリ(エチレングリコール)修飾アルブミン
-ヘムの酸素結合能と新しい特徴

中川 晶人
早稲田大学理工学総合研究センター

2-5

10:40 Beyond The Transfusion Trigger with
PEG-Albumin

Amy G. Tsai
University of California, San Diego and La Jolla
Bioengineering Institute

2-6

11:05 アルブミン重合体を用いた血小板代替物の
展開

武岡 真司
早稲田大学理工学術院応用化学科

2-7

11:30 感染症及び癌治療用ヒト抗体開発

黒澤 良和
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所

ランチオンセミナー 12:05-12:55

座長: 梶村 真弓
慶應義塾大学医学部

演者: Ryon M. Bateman
Department of Medicine, University of British Columbia

Shedding Some Light on the Pathophysiology of Sepsis Using Optical Imaging and Gene Expression

大会長講演 13:00-13:50

座長: 武岡 真司
早稲田大学理工学術院 教授
演者: 末松 誠
慶應義塾大学医学部 教授

ガス分子による生体制御機構の探索と医学応用

一般演題 II 13:50 -16:05

座長: 足立 健
慶應義塾大学医学部
塚田 孝祐
慶應義塾大学医学部

1

13:50 Liposome-Encapsulated Hemoglobin
(Trm645) Does Not Interfere with The Immune
Response to Bacterial Enterotoxins in Mice
Reconstituted with Human Immune System

川口 章
東海大学医学部

2

14:05 マウスにおけるヘモグロビン小胞体構成脂
質の体内動態解析

田口 和明
熊本大学大学院医学薬学研究部

3

14:20 持続性大量出血に対する人工血液輸血後の
サイトカインの推移と臓器障害について

野上 弥志郎
防衛医科大学校外科学第2講座

4

14:35 S-ニトロソ化アルブミンの調製と評価

廣山 秀一

熊本大学大学院医学薬学研究部薬物動態制御学分野

5

14:50 大量出血時のリポソーム内包型人工赤血球
投与が加齢生体に及ぼす影響とその対策について

木下 学

防衛医科大学校防衛医学研究センター外傷研究部門

6

15:05 ラット摘出灌流心臓での虚血-再灌流障害に
対するヘモグロビン小胞体の保護効果-第2報

山岸 正

防衛医科大学校内科1 講座

7

15:20 Liposome-Encapsulated Hemoglobin
(Trm645) Improves Energy Metabolism in Skeletal
Muscle Ischemia and Reperfusion as Shown on
Nuclear Magnetic Resonance

川口 章

東海大学医学部

8

15:35 ドデカペプチド結合リン脂質小胞体の内包
物放出特性と止血能増幅効果

岡村 陽介

早稲田大学大学院理工学研究科

9

15:50 人工酸素運搬体ヘモグロビン小胞体による
固形腫瘍の酸素化

泉 陽太郎

慶應義塾大学医学部呼吸器外科

特別講演

16:20 -17:20

座長: 末松 誠

慶應義塾大学医学部 教授

演者: 林 成之

日本大学大学院総合科学研究科 教授

血液と細胞の遺伝子対話で人間の心と知能を取り
戻す脳低温療法の新展開

閉会の辞

17:20 -

血液代替物の開発 夢の実現に向けて

小林 紘一

日本血液代替物学会会長

慶應義塾大学医学部外科（呼吸器外科）

日本血液代替物学会が発足して以来、末松誠年次大会長のもとで行われる今年の年次大会は13回を数えることになりました、機関誌「人工血液」も第14巻を発行するまでになった。

当初は人工酸素運搬体が主であったがその後は人工血小板や人工抗体も本学会の重要な対象テーマとなり、幅広い議論が行われるようになってきている。

人工酸素運搬体に関しては全世界的研究が行われたが多くの試行錯誤の上、早稲田大学理工学部と慶應義塾大学呼吸器外科との精製ヒトヘモグロビンを脂質二層膜で被覆したヘモグロビン小胞体（hemoglobin vesicle）が安全性と有効性に優れていることが判明し、更にウィルス除去の工夫、脂質膜は可能な限り2分子層に近づけ脂質量を減じて、被覆されるヘモグロビン量を多くする工夫、保存中の安定度を高める工夫など多くのknow howを蓄積してきた。

研究と開発の最終目的は当然のことながら臨床で応用され、人類の健康維持に貢献することは論を俟たない。そのためには医学、工学の今まで以上の連係と企業化できる産業の創製が極めて重要となる。

hemoglobin vesicleに関しては間もなく臨床試験が開始されるところまで来ているが、安全で有効性の高い人工酸素運搬体を開発するという国民の負託に応えるためにも、功をさせることなく着実なデータ蓄積が重要である。そのために当学会では人工酸素運搬体製造に関する策定案を作成し自己規制を行っている。今後も行政からの支援、指導をふまえ臨床応用に向けて邁進する必要がある。

講演では血液代替物の開発の過去に学び、現在を総括し未来に向けてどのように対処すべきかについて述べる所存である。

Gas Biology: ガス分子による生体制御の生物学と医学応用

末松 誠

慶應義塾大学医学部医化学教室

高等動物の代謝経路を俯瞰する時、ガス分子は分子状酸素以外は其の末席をけがすtoxic wasteとして長く生命科学研究の対象としては軽視されてきた。しかし精緻な分光分析と構造生物学的解析の進展により、生体高分子の隙間に浸透・結合しその機能変化をもたらす重要な情報伝達物質としてのガス分子の生物作用のメカニズムが近年明らかにされつつある。これらの分子の多くはもともと宇宙空間に漂う原始的構成成分であり、太古の地球環境を支配し、細菌などを育む有機分子のリソースとして用いられるばかりでなく、多細胞生物の情報分子として用いられ、高等動物でも巧妙に利用され続けていることが解明されつつある。ヒトが利用するもっとも代表的なガス分子は分子状酸素であり、その大部分はミトコンドリアのシトクロム酸化酵素でNADH・電子伝達系から運ばれた4電子により還元され水になる。NADHの酸化に伴い放出される自由エネルギーはミトコンドリア内膜でのプロトンのくみ出しに使われ、最終的にはATP合成酵素におけるプロトンの流入がもたらすエネルギーがATP合成を維持するために必要であることは論を待たない。一方分子状酸素の生体内利用の残り数%も非常に重要な役割をはたしており、アラキドン酸の酸素添加反応により生成されるプロスタグランジンやロイコトリエンなど少量でも強力な生物活性を發揮する化合物の生成に用いられるばかりでなく、酸素原子を含む生理活性ガス分子の合成に用いられる。このような低分子化合物のうち、生体内で利用あるいは生成・受容されて生物作用を發揮するものとして一酸化窒素（NO）や、ヘムの分解により生じる一酸化炭素（CO）など少量でも強力な生物活性を持つメディエータがある。これらの分子は、ストレス時の臓器機能制御に重要な役割を果たしている。NOとCOはヘム蛋白質への結合性を有するものの、結合の結果生じる蛋白質の構造変化とそれに伴う機能変化は極めて対照的であることが、ヘム蛋白質であるヘモグロビン、可溶性グアニル酸シクラーゼ、あるいはシスタチオニン-1-合成酵素などで明らかにされている。これまで方法論的限界から、ガス分子の受容分子の機能解析と生物活性の發揮に必要なメカニズムの包括的理解は極めて遅れていたが、我々は生体内で生成される一酸化炭素（CO）の生物作用に関する研究から、生体内では異なる複数のガス分子と特定の蛋白質=ガスセンサーが比較的シンプルな原理で相互作用し、多彩な生物作用を發揮する例を見出しつつある。本講演では生体高分子の「隙間」を満たして生体機能を制御するこれらのガス分子のうちNO、COの役割について概説し、このようなガス分子とヘモグロビンの相互作用から浮き彫りにされる救急救命に応用可能な付加価値赤血球製剤開発の可能性について論じたい。

血液と細胞の遺伝子対話で人間の心と知能を取り戻す脳低温療法の新展開

林 成之

日本大学大学院・総合科学研究科

脳蘇生の治療は、瞳孔散大や呼吸停止患者の回復は難しく、壊れた脳は治せないのだから二次的に発生する脳浮腫、脳循環障害、脳圧亢進に対する脳保護治療がおこなわれてきた。動物実験に基づく一見科学的な概念と思われてきたこの考え方には実は幾つもの間違いがある事をとらえた。一定の麻酔条件下で研究されている実験動物と違って実際の患者では、脳障害時の脳内ストレス侵襲はカテコラミン・サージから見る限る数十倍強く、その為に、脳温が40～44℃まで上昇する脳内熱貯留現象、インスリン抵抗性高血糖、ヘモグロビンから酸素を切り離す2,3-diphosphoglycerate(DPG)の減少、心臓の拡張機能障害と言ったもっと複雑な病態が発生してくる。つまり、十分な治療をしないで、治らない結果をみて脳の治療は難しいと言っていた事にもなる。

脳低温療法はこれらの背景から生まれたものであるが、低体温そのものも生体にとって侵襲性の高い環境であり、地球と生命誕生の仕組みに組み込まれた細胞誕生期と人類誕生期の二度にわたる氷河期を乗り越えてきた、グルコースから脂質代謝への変換と血液と細胞の遺伝子対話によって生き残ってきた生体の潜在能力を配慮した管理をおこなわないと、十分な治療とならない難しい点もある。

脳の損傷時には、誰も、知能障害や心の障害を残さないで治して欲しいと考える。脳の蘇生治療はこれに答えて、初めて、患者の治療に成功したと言えるのであって、脳低温療法も例外ではない。意識と心はどう違う？意識障害の判定法で推量れない心の障害をどのように治療する？といった基本的な事さえ未だ明確にされていない現状がある。

脳低温療法は、これらの脳蘇生治療の基本とも言える問題について科学的な分析に基づくエビデンスを背景に作り上げてきた病態重視の緻密な治療法であり、その成果は、従来の脳保護治療では考えられない心停止患者の心臓マッサージで反応しない患者でも社会復帰を果たす事がある。人間の心は、本能、本性、理性と外の世界をつなぐ外意識と内意識によって機能している。最近、人類の生存に必要な「生きる仕組みと自己保存の生体メカニズム」はこのうち人間の本能として形を変えている事がとらえられ、その仕組みを配慮しながら、低酸素・低体温時のheme oxygenase(HO)とhypoxia inducible factor(HIF)の血液とニューロンの遺伝子対話メカニズムを活用すると脳低温療法は知能障害や心の障害を最も少なくするエース治療である事には間違いがない。従来の低体温療法と異なる脳低温療法の科学的な背景を紹介しながら脳蘇生治療の新展開について報告する。

Shedding Some Light on the Pathophysiology of Inflammation using Gene Expression and Optical Imaging

Ryon M Bateman, PhD

University of British Columbia

Bacterial infection or trauma leading to a systemic inflammatory response, or sepsis, is the leading cause of death in North American intensive care units. Sepsis causes profound microvascular dysfunction leading to increased capillary stopped flow and altered capillary oxygen transport. Using a functional microvascular imaging system we found that capillary oxygen flux, the amount of oxygen diffusing into tissue, increased during the onset of sepsis. When nitric oxide overproduction was inhibited, tissue oxygen consumption increased indicating that NO was inhibiting tissue oxygen consumption. In the heart, confocal laser scanning microscopy revealed a loss of myocardial capillarity during inflammation. This may have been a factor in decreased tissue oxygenation, tissue hypoxia, stabilization of the HIF1 transcription factor and upregulation of HIF1, VEGF and Glut1 mRNA. A positive correlation between *in vivo* myocardial contractility and Glut1 gene expression suggests that the heart endeavors to respond to increased hypoxia by altering its energy metabolism. Increased VEGF gene expression may provide a partial explanation for increased microvascular permeability and altered calcium dynamics in the heart via fibrinogen/ICAM-1 binding. To non-invasively quantify microvascular permeability *in vivo*, the limbal microvasculature of the mouse eye was imaged using multiphoton microscopy and back scatter second harmonic generation(SHG). Preliminary results indicate a differential permeability with the larger limbal microvessels and corneal loops leaking large molecular weight molecules into the collagen space in the cornea. By integrating information from optical imaging with gene expression, it will soon be possible to elucidate the pathophysiology of systemic inflammation at its most fundamental cellular and functional levels.

LIPOSOME-ENCAPSULATED HEMOGLOBIN
(TRM645) PROTECTS CEREBRAL ISCHEMIA
AND REPERFUSION INJURY IN PRIMATES:
EFFECTS OF OXYGEN AFFINITY AND
DOSE-RESPONSE RELATIONSHIP

Akira T. Kawaguchi, Munetaka Haida,
Yoshitaka Ogata, Hideo Tsukada
Tokai University School of Medicine

Background. We tested a hypothesis that liposome-encapsulated hemoglobin with a high(h-LEH, $P_{50}=10$ mmHg) or low(l-LEH, $P_{50}=40$ mmHg, TRM645) O_2 affinity may limit damages in brain ischemia and reperfusion.

Methods. Cerebral metabolic rate of O_2 ($CMRO_2$) was serially determined using positron emission tomography in primates undergoing middle cerebral artery(MCA) occlusion and reperfusion. After MCA occlusion, 10 ml/kg of h-LEH, l-LEH, empty liposome and saline were infused to compare protection, and 2 ml/kg and 0.4 ml/kg of l-LEH were infused to define dose-response relationship.

Results. Area of mild $CMRO_2$ reduction(71 % - 100 %) decreased and area of mild $CMRO_2$ increase(101 % to 130 %) increased in LEH-treated monkeys in the cortex. Preferential protection of cortex for basal ganglia was also apparent in histologic evaluation. Optimal dosage appeared to be 2 ml/kg with an equivocal protection by h-LEH or l-LEH(TRM645)

Conclusion. LEH as small as 0.4 ml/kg was effective regardless of O_2 affinity in preserving $CMRO_2$ and reducing integrated area of morphologic damage mainly in the cortex after occlusion/reperfusion of MCA in the monkey.

Optimization of microvascular function by Hb-based oxygen carriers: Impact on Hb concentration in resuscitation

Amy G. Tsai, Pedro Cabrales and Marcos Intaglietta
Dept of Bioengineering; University of California,
San Diego

Development of a viable blood substitute began by focusing on recreating the O_2 -carrying capacity of blood, leading to the recognition that hemoglobin(Hb) is presently unequalled for this function. However, as human Hb is the only realistic source of this protein, the production of a blood substitute that solves transfusional blood availability problems and shortages must introduce a multiplying factor between supply of natural blood and blood substitute, while maintaining equivalency of function/efficacy. A unit of blood should produce several units of equivalent blood substitute. Expansion is now because of new understanding of how blood delivers O_2 in the microcirculation and the consequences of reducing O_2 carrying capacity in hemorrhage. This information is used to provide improved resuscitation capacity and maintenance of tissue metabolism by tailoring the properties of a blood substitute to maintaining microvascular function, rather than O_2 carrying capacity. Resuscitation from hemorrhage requires maintenance perfusion, a process directly linked to the sustaining adequate levels of endothelial shear stress induced by either increased blood/plasma viscosity or increased blood flow velocity in the microcirculation. This process must also be intimately coupled with the requirement that no portion of the tissue is anoxic. This disparate set of requirements can be satisfied with high viscosity Hb solutions that have a relatively high affinity for O_2 . Excess O_2 carrying capacity of the circulation is normally required to provide a margin of safety against anoxia. An O_2 carrier with O_2 affinity comparatively higher than blood, when mixed with blood in the circulation targets O_2 delivery to areas of low O_2 , increasing the efficiency of O_2 delivery by the remaining RBCs. Therefore combining increased O_2 affinity of the O_2 carrier and increased blood viscosity causes the microcirculation to remain functional at a lesser concentration of circulating Hb, since the safety margin against anoxia is maintained. This fulfills the requirement of ensuring efficacy and safety, while reducing the quantity of transfused Hb. HbV(hemoglobin vesicles) are viscous, delivery high Hb concentration and can be formulated to have different O_2 affinities.

ヘモグロビン小胞体の配位子反応

酒井 宏水, 土田 英俊

早稲田大学理工学総合研究センター 酸素輸液プロジェクト

ヘモグロビン(Hb)は配位子として酸素を可逆的に結合・解離するだけでなく、CO或はNOを強力に結合する。COは意外と容易に解離する条件もある。臨床試験の開始が間近になったHb小胞体(HbV)の調製、保存、そして輸血代替として投与した後の効能、安全性に至るまで、配位子反応の制御が強く関わっている。また最近、新しい応用も見つかって来た。

HbVの調製工程で重要なのは、先ずヒトHb精製において加熱処理によりウィルス不活化を行うことである。配位子をCOに置換すると安定化され、ヒト血清アルブミンと同様に60℃、10時間の加熱処理が可能となる。また安定なHbCOは濃厚蛋白質溶液としての取扱いを容易とし、HbVに加工する際の変性も無い。酸素気流下、可視光照射でCOは光解離し、代わって酸素が配位する。最終的にHbV分散液から配位酸素を完全除去すればメト化が抑制され、粒子表面のPEG修飾と合わせ長期保存安定度に寄与する。

分子状Hb溶液の投与で観察される血管収縮と血圧亢進は、HbVでは回避されることが、ラット肝類洞血管、ハムスター皮下抵抗血管の観察から明らかにされた。内因性NO或はCOの捕捉の相違が要因と考えられている。ストップフロー法による配位子結合速度の解析では、HbVの見かけのNO結合速度($k_{on}(NO)$)はHb溶液に比較して1/4程度に遅くなり、高濃度Hb溶液をカプセル化した効果である。しかし赤血球と比較するとまだ速く、 $k_{on}(CO)$ はHb溶液とほぼ同等であった。粒子径が大きいHbVが血管壁近傍のNO、CO拡散領域に侵入しないことが血管収縮抑制の一因と考えられる。

現行のHbVの酸素親和度はヒト血液と同等に調節され、輸血代替として十分に機能することが出血性ショック蘇生や血液希釈試験から解っている。他方、Allosteric因子の添加量を調節してヒト血液よりも酸素親和度を高く(P_{50} 値を小さく)すれば配位酸素の放出が調節でき、低酸素領域に酸素を効率良く運搬することが内外の共同研究から解って来た。

内因性NO、COの生理的役割が認知され、最近ではガス吸入やドナー分子投与による外因性COの薬理効果も報告されている。そこで、COが配位したHbVをラットに投与したところ、意外と速やかにCOが解離し、細胞保護効果を示唆する結果が得られた。効果と毒性の両面から詳細検討が必要であるが、新しい応用として期待できる。

ヒトヘモグロビン小胞体(OXY-0301)の治験薬GMP製造への取り組み

松田 晃彦, 堀 伸明, 井上 逸男, 太田 勝次, 松浦 昭宏,
大村 孝男, 高木 智史
株式会社オキシジェニクス

輸血医療は、未だ不適合輸血やウィルス感染の危険性が大きな問題として残されている。また、輸血用血液製剤は短い有効期限故に、災害・事故に備えた備蓄という面でも問題を抱えている。このため、長期保存が可能で、血液型に関係なく、輸血による副作用やウィルス感染のリスクのない人工赤血球(人工酸素運搬体)の開発が強く望まれている。これまで国内外の多くの企業が開発に取り組んできたが、実用化までは至っていない。

1980年代より早稲田大学理工学部の土田、武岡らが始めた人工酸素運搬体(ヒトヘモグロビン小胞体)の開発は、1990年代に慶應義塾大学医学部の小林、末松らも参画し、処方最適化と製剤規格の設定、更には効果・安全性が確認された。そして2002年より両大学からstart-upした株式会社オキシジェニクスが加わり、両大学で蓄積された膨大な技術やデータを基に医薬品としての開発が本格的に動き出した。

ヒトヘモグロビン小胞体(以下、OXY-0301)は、ヒト赤血球から精製したヘモグロビンを直径約250nmの均一球径のリン脂質二分子膜小胞体に内包させた人工酸素運搬体である。OXY-0301は、ウィルスなどを不活化除去処理し、且つ膜成分組成や表面修飾の工夫により物理化学的安定度を確保し、室温での長期保存、血中滞留寿命の延長、そして血液型不適合のない人工酸素運搬体として、医療現場のニーズに十分対応できるよう設計されている。既に霊長類やげっ歯類を用いた安全性の検証は終え、イヌ、ラット等を用いた種々病態を想定した薬理試験においても薬効が確認されている。

原料のヒト赤血球は日本赤十字社から期限切れの「人赤血球濃厚液」の供与を受けており、それを用いたヒトヘモグロビンの精製はローマン工業株式会社にGMP基準下での精製を委託している。また、リポソーム膜の原料となる脂質類は、日本精化株式会社と日本油脂株式会社から供給を受けている。このように、OXY-0301の治験薬GMP製造を支える協力体制は原料についても着実に整ってきた。

昨年、早稲田大学の指導のもと、オキシジェニクス社がOXY-0301の安定製造法を確立したことを受け、今年、月産12Lの治験薬GMP製造施設を同社京都研究所内に設置し製造を開始した。2007年より国内外で第1相臨床試験を開始する計画で、現在準備を進めている。更に、第2~3相臨床試験用の大量製造プラントの設置についてもニプロ株式会社の全面的な協力を仰いで進めており、OXY-0301の開発は実用化に向けた新たなステージに入った。本シンポジウムでは、開発の現状について報告するとともに今後の予定についても紹介する。

ヘモグロビン小胞体 (HbV) の臨床応用へ向けた開発研究

堀之内 宏久

慶應義塾大学医学部呼吸器外科

人工酸素運搬体の臨床応用としての最大の目標は赤血球代替物として安全に使用できることである。われわれは精製ヘモグロビンをリン脂質小胞体 (リボソーム) に内包したヘモグロビン小胞体 (以下 HbV) を 1988 年より開発を進めてきたが、Hb の純化精製と濃縮、効率のよいリボソームへの内包条件の確立、酸素運搬能を最大限に引き出すリボソーム内環境の調節、血球との相互作用を少なくする小胞体膜の改良、長期保存を可能とする技術の開発を行うと同時に、小動物での酸素運搬能、脱血ショックに対する治療効果、代謝過程、血液生化学に及ぼす影響、長期生存などについて検討し、良好な成績を得てきた。しかし、小動物での検討では投与時の右室系の変動や心拍出量の変化などの変化を観察することが困難であった。

現在、企業 (オキシジェニクス) の参画を得て実験室レベルの少量生産から大規模生産を実証する中規模 GLP プラントの確立を経て現在 GMP プラントによる生産が始まろうとしている。

2004 年からは中規模 GLP プラントで製造された安定的に製造された HbV を用いることが可能となり、免疫系への作用、酸素治療薬としての応用の可能性など、多岐にわたる検討が可能となったばかりでなく、中型動物での検討が可能となり、投与時の循環動態の変化を細かく検討することが可能となった。

中型動物として犬を用いた検討では出血性ショックに対する蘇生液として輸血代替に用いることが可能であるかについて詳細な循環動態を含めた検討を行った。

7kg の幼犬を用い、循環血液量の 50% 脱血によるショック蘇生試験、血液のリザーバーとしての役割を持つ脾臓を摘出した上での 50% 脱血ショック蘇生試験を通して、右室系の機能と心拍出量の変化について自己血による蘇生群と比較・検討した。その結果、脾摘、40% 脱血ショックの後に蘇生を行った群では HbV 投与直後に平均肺動脈圧が一時的に上昇することが認められ、右室系に若干の負荷がかかることが示唆されたが、投与 30 分以降は自己血による蘇生群との間に有意差はなく、自己血と同等の影響があったことが明らかとなった。また、一時的な上昇も明らかな異常値を示さなかったこと、自己血蘇生群でも肺動脈圧の一時的に上昇を示す動物を認めたことから、HbV が出血性ショックの蘇生液として使用できる可能性があると考えられた。また、その他の循環動態の指標、血液ガスパラメーターでは自己血と有意差のない変動を呈し、蘇生液として有効であることが明らかとなった。脾臓を温存した 50% 脱血ショック蘇生モデルでも HbV 投与後の肺動脈圧の上昇は認められたが、その程度は脾摘モデルに比し軽度であり、ショック蘇生時の循環動態に脾臓が右心系の変動を緩和する役割を果たしている可能性が考えられた。

現在脱血ショック蘇生後の長期生存試験を遂行中であり、生存に関しては特に大きな問題を示さないことがわかりつつある。

今後は臨床現場での応用を見据えた動物モデルの確立と HbV の効果についての検討が望まれている。

Pichia pastoris による遺伝子組換えヘモグロビンの発現と精製

中城 圭介¹, 帆足 洋平¹, 宇野 公之², 小田切 優樹³, 甲斐 俊哉^{1,3}

1 ニプロ株式会社医薬品研究所

2 大阪大学大学院薬学研究科

3 熊本大学大学院医学薬学研究部

【目的】輸血に代わりうる人工酸素運搬体としてヘモグロビンをリン脂質の二分子膜で被覆したヘモグロビン小胞体 (HbV) が考案され、十分な酸素輸送能を発揮することが証明されてきた。一方、HbV に内包されているヘモグロビンは期限切れヒト赤血球由来であるため、依然として原料供給や未知ウイルス混入の危険性が指摘されている。そこで、カプセル化するヘモグロビンを遺伝子組換え体に置き換えるため、多くの異種蛋白質発現に用いられている *Pichia pastoris* (GS115) を宿主として遺伝子組換えヒトヘモグロビン (rHb) の発現・精製法について検討を行った。

【方法】ヒトヘモグロビン遺伝子をメタノール応答性の AOX1 プロモーター下流に接続し、ヘモグロビン発現ベクター Hb-pAO815 を構築した。発現ベクターは *Sal*I で酵素切断し直線化後、エレクトロポレーション法により *Pichia pastoris* ゲノムの HIS4 遺伝子座へ挿入した。ヘモグロビン高発現株を得るために MD 及び MM プレートを用いてスクリーニングを行ったところ、Mut^s 組換え体が高発現株であることが明らかとなった。rHb の精製は酵母を培養後、ガラスビーズで破碎し、その破碎液から陽イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水相互作用クロマトグラフィー法を用いて行った。精製した rHb の分子量は MALDI-TOF MASS により測定した。また N 末端アミノ酸配列は Edman 分解法により確認した。

【結果】rHb は各種カラムクロマトグラフィー法により最終的に SDS-PAGE 上で単一バンドとして精製された。rHb の分子量及び N 末端アミノ酸配列を解析したところ、大腸菌の発現系で問題であった開始メチオニンはなく、ヒト血液由来ヘモグロビンと同等であった。

【結論】*Pichia pastoris* を宿主として発現させた rHb は、ヒト血液由来ヘモグロビンと同等の性状であり、さらにこの方法は大量製造にも応用可能であることから、組換え製剤としての可能性を十分に有していることが示唆された。

遺伝子組換え型人血清アルブミン製剤 (GB-1057) と血漿由来人血清アルブミン製剤との生物学的同等性比較試験

大西 久仁彦¹, 川口 敦弘², 森 博幸²

1 大西内科

2 三菱ウェルファーマ株式会社

肝硬変に伴う低アルブミン血症や出血性ショックなどに用いられている人血清アルブミン製剤は、各種のウイルス不活化あるいは除去処理が施されているものの、これらによる感染の可能性を完全に否定することはできない。しかし、遺伝子組換え型人血清アルブミン製剤 (GB-1057) は、ビール酵母やパン酵母と近縁のピキア酵母を産生細胞とする組換えDNA技術により生産された人血清アルブミン製剤であり、その製造過程で感染性物質の混入の恐れがある血清等の動物由来材料を用いていない。

また、GB-1057は一次構造解析、高次構造解析、物理化学的性質の検討結果から血漿由来人血清アルブミン (nHSA) と差が認められなかったことから、有効成分として同一であると考えられる。

本研究ではGB-1057とnHSAの体内動態について、肝硬変患者を対象に比較検討した。

【目的】肝硬変患者22例を対象として、GB-1057もしくはnHSAを投与し、血清アルブミン濃度の経時的測定により、GB-1057の生物学的同等性を並行群間比較法を用いて検討した。

【方法】肝硬変患者のうち、腹水及び浮腫が認められない20～75歳の患者を対象とした。1日1回GB-1057もしくはnHSA 25g (2バイアル量) を12.5g/時間 (50 mL/時間) の速度で3日間反復静脈内投与し、投与開始後8日目まで観察・検査を実施した。

【結果】GB-1057投与群 (11例) とnHSA群 (11例) の血清アルブミン濃度の平均値は、それぞれ1日目投与開始直前値が3.21g/dL及び3.15g/dL、3日目投与終了直後値が4.17g/dL及び4.21g/dLと投与に伴って両群とも同様に増加し、その後のアルブミン濃度の減少についても8日目が3.72g/dL及び3.78g/dLであり、両群とも同様の推移を示した。また、血清アルブミン濃度-時間曲線下面積 (AUC) の対数値の平均値の差の90%信頼区間は-0.0321～0.0337と算出され、生物学的に同等であると判定する基準 $\log(0.8) \sim \log(1.25)$ の範囲内であった。有害事象はnHSA群において、「不眠症」が1例1件に、BUN上昇および血清クレアチニン上昇が1例2件に認められたが、いずれも消失または投与前値まで回復した。

以上より、GB-1057はnHSAと生物学的に同等と判定した。また、本試験ではGB-1057及びnHSAに臨床上問題となる所見は認めなかった。

ヒト血清アルブミンの安定性に及ぼす各種添加剤の影響

安楽 誠¹, 甲斐 俊哉^{1,2}, 河野 陽介¹, 山崎 啓之³,

小田切 優樹¹

1 熊本大学大学院医学薬学研究所

2 ニプロ株式会社医薬品研究所

3 崇城大学薬学部

【緒言】

アルブミン製剤は、循環血漿量の是正や浮腫の改善などを目的として種々の疾患で汎用されている。これは血液を原料とするためHIV、肝炎ウイルス及びプリオンをはじめとする未知の有害なウイルスや夾雑蛋白質が混入する可能性が予測される。現在、これらの混入を防ぐため、低温殺菌法 (60℃, 10hr) が用いられている。その際、アルブミンの熱変性を防ぐ目的でアルブミン製剤には、カプリル酸ナトリウム (Cap-Na) とN-アセチル-L-トリプトファン (N-Ac-Trp) の2種の安定化剤が添加されている。我々はこれまでに、これら添加剤、CapI、N-AcTrpにおいて、CapIは安定化剤として、N-AcTrpは酸化防止剤としての役割を果たしていることを明らかにした。そこで今回は、アルブミン製剤の処方最適化を目的とし、N-AcTrpに代わる添加剤としてのN-アセチル-L-メチオニン (N-AcMet) の有用性について評価した。

【方法】

添加剤による構造安定性の評価は、円二色性 (CD) スペクトル及び示差走査熱量測定法 (DSC) により行った。さらに、NATIVE-PAGEにより熱安定性を評価した。また、添加剤の酸化効果の評価のために酸化の指標であるカルボニル含量を測定すると共に、HSA分子種 (Reduced-HSA, Oxi-HSA) の変動挙動を4Me-VPカラムを用いて調べた。

【結果及び考察】

HSAの構造に及ぼす影響について検討したところ、CapIは、HSAの立体構造の安定化を増大させるものの、N-AcTrp及びN-AcMetの効果は認められなかった。低温殺菌処理後CapI共存下ではHSAは殺菌前の構造を維持していたものの、N-AcTrp及びN-AcMet添加時では構造の崩れが観察された。加えて、CapIとN-AcTrp及びN-AcMetの併用は、顕著にHSAの立体構造を安定化させた。HSAに対する酸化反応に及ぼす添加剤の影響をカルボニル含量、NATIVE-PAGE及びメルカプト分率を測定することにより評価した。その結果、CapIはHSAに対する酸化を抑制しなかったものの、CapIとN-AcTrp及びN-AcMetの併用は明らかに酸化を抑制した。特に、その効果はN-AcMet系で顕著であった。以上の結果より、N-AcTrpに代わる添加剤としてN-AcMetの有用性が示唆された。

遺伝子組換えアルブミン - プロトヘム錯体からなる新しい酸素輸送ヘム蛋白質の創製

小松 晃之, 中川 晶人, 土田 英俊
早稲田大学理工学総合研究センター

【緒言】ヒト血清アルブミン (HSA) は血漿蛋白質の約 60 wt% を占める単純蛋白質であり, コロイド浸透圧調整のほか, 疎水性分子を非特異的に包接・運搬する役割を担っている。メトヘモグロビンから解離したプロトヘミンも, 血中では HSA に捕捉される。我々は HSA - プロトヘミン錯体の X 線結晶構造解析に成功し, ヘミンが HSA のサブドメイン IB 内に Tyr-161 との軸配位結合を介して固定されていることを明らかにした。さらに, 部位特異的アミノ酸置換により, ポルフィリン面直下へ近位塩基となる His を変異導入すると, ヘモグロビンやミオグロビンのヘムポケットと同様なナノ分子空間を持つ rHSA (mutant) が得られ, その組換えアルブミン - プロトヘム (rHSA-heme) 錯体が, 水中で酸素を吸脱着できることを初めて見出した。今回はさらに遠位塩基の効果を明らかにするため, Leu-185 の位置に Asn, Gln, His を導入, ヘムポケット構造と酸素結合能の相関について検討した。

【実験】pHIL D2-HSA へ変異を挿入, 酵母 (*Pichia pastoris*) を用いて 3 種の三重変異体 rHSA (I142H/Y161L/L185N), rHSA (I142H/Y161F/L185Q), rHSA (I142H/Y161F/L185H) を発現した。これらの rHSA (mutant) にヘミンを包接させ, rHSA (mutant) heme [1/1 (mol)] 錯体のリン酸緩衝水溶液 (pH 7.0) を調製, アルゴン雰囲気下で亜二チオン酸ナトリウムを加え, 中心鉄を Fe() に還元した (deoxy 体)。酸素親和性 ($P_{1/2}$), O_2 結合解離速度定数 (k_{on} , k_{off}) は, レーザーフラッシュホトリシス法 (Nd:YAG SHG; $\lambda = 532$ nm) を用いて決定した。

【結果・考察】アルゴン雰囲気下における rHSA (I142H/Y161L/L185N) heme 錯体の UV-vis. スペクトルは, Fe() 5 配位高スピン錯体の形成を示し, そこへ酸素を通気するとスペクトルパターンは速やかに酸素錯体型へと移行した。酸素親和性は 185 位置に Asn を持たない変異導入前のもの (rHSA (I142H/Y161L)) に比べ 18 倍増大し, これは k_{off} の減少に起因した。他方, L185 を Gln あるいは His に変換すると, アルゴン雰囲気下では Fe() 6 配位低スピン錯体を形成し, 酸素通気により中心鉄は瞬時に酸化した。磁気円偏光二色性 (MCD) スペクトルの結果もこれを支持した。Gln や His 残基の N は中心鉄の配位圏内に存在するものと推測される。

ポリ (エチレングリコール) 修飾アルブミン-ヘムの酸素結合能と新しい特徴

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

【緒言】

ヒト血清アルブミン (HSA) にテトラフェニルポルフィリン鉄誘導体 (FeP) を包接させたアルブミン-ヘム複合体 (HSA-FeP) は, 生体内で酸素輸送のできる完全合成系人工酸素運搬体である。本報では, ポリ (エチレングリコール) (PEG) 鎖で分子表面を被覆したアルブミン-ヘム [PEG (HSA-FeP)] の溶液物性, 酸素結合能, 血中滞留時間を評価するとともに, PEG (HSA-FeP) をガラス板上にキャストすると, 赤色透明フィルムが作製できたので, その特性についても報告する。

【方法】

酸素結合サイトとして FeP を包接させた HSA-FeP の分子表面を, 片末端にマレイミド基またはスクシンイミド基を有する活性化 PEG (分子量 2 kDa および 5 kDa) で修飾し, PEG (HSA-FeP) を合成した。MALDI-TOF MS から PEG 結合数を決定, 1 分子当りの平均 PEG 結合数が 6 の PEG (HSA-FeP) を実験に用いた。PEG (HSA-FeP) 溶液の粘度, コロイド浸透圧, 酸素親和度 ($P_{1/2}$), 酸素錯体半減期, 血中半減期 (ラット) を測定し, 溶液物性と酸素結合能を評価した。

【結果及び考察】

PEG (HSA-FeP) 水溶液のコロイド浸透圧および粘度は, PEG (5 kDa) で修飾した場合, 同濃度の未修飾体に比べ有為に上昇し, PEG (2 kDa) で修飾した場合は, 大きな変化はなかった。また, PEG の分子量, 結合様式によらず, $P_{1/2}$ 値には修飾による影響は見られなかった。一方, FeP の酸素錯体半減期, 血中半減期は, それぞれ 12 時間, 16 時間に延長した。以上の結果から, HSA-FeP を PEG (2 kDa) で表面修飾すると, 溶液物性, 酸素親和度を変えることなく, 酸素運搬体としての血中有効半減期を延長できることが明らかとなった。

また, ガラス平板上に PEG (HSA-FeP) 水溶液をキャストすると, 赤色透明のフィルム (膜厚約 10 μ m) が得られ, 酸素を可逆的に吸脱着できることを見いだした (酸素錯体半減期: 約 1 週間)。このフィルムを水に再溶解させた後も, 酸素結合能が変化しなかったことから, PEG (HSA-FeP) フィルムは, 人工酸素運搬体の新しい保存形態となると考えられる。

Beyond the transfusion trigger with PEG-albumin

Amy G. Tsai, Pedro Cabrales and Marcos Intaglietta
Department of Bioengineering; University of
California, San Diego and La Jolla Bioengineering
Institute, La Jolla, CA/USA

The transfusion trigger is defined as the clinical point at which a blood transfusion becomes indicated. Depending on the health status of the patient, this critical point can range between 10 and 6 g/dl hemoglobin concentration. Currently the most commonly used plasma expanders in the clinic are those based on hydroxyethyl starch, polysaccharides and gelatins. These colloid based plasma expanders are characterized by: 1) circulating/intravascular time and 2) colloid osmotic pressure. Concepts for extending the transfusion trigger and delaying the use of oxygen carriers have evolved by consideration of the physical characteristics of blood which lead to maintenance of microvascular perfusion. Survival has been directly correlated to microvascular perfusion which is need for the elimination of metabolic byproducts as well as the delivery of oxygen. Use of viscous fluids have supported the concept that oxygen carrying capacity is not the transfusion trigger but rather a minimum level of viscosity is needed to maintain the stimulation of the endothelial cells to permit release of vasodilators to enhance perfusion. In support of this hypothesis, alginates were used to sustain viscosity above 2.5 cp when hematocrit was reduced to 11% (3.6 g/dl) during acute hemodilution. Microvascular flow and capillary perfusion were found to be sustained. High viscosity solutions increased perivascular nitric oxide levels as compared to low viscosity solutions. Polyethylene glycol decorated human serum albumin(PEG-HSA) was also able sustain microvascular perfusion and increase nitric oxide levels. We hypothesize that this molecule, PEG-HSA, represents a different class of resuscitation fluid since it is only moderately viscous. It has a large apparent molecular volume due to the hydration of the PEG chains which may lead to a different interaction with the endothelium and/or transport of vasoactive substances leading to the increase in NO levels. These preclinical studies suggest the use of PEG-HSA at concentrations as low as 2 - 4% extends the transfusion trigger. Deployment of PEG-HSA to clinical use may be more rapid when compared to other experimental materials since its components are already approved for other indications. Even though it is likely that PEG-HSA will be effective in extending the transfusion trigger, ultimately an oxygen carrier will eventually be required that includes its plasma expansion properties. Therefore it may be effective to consider its use in combination with a material such as HbV(hemoglobin vesicles) which have no colloid osmotic pressure per se, and require an appropriate fluid vehicle.

アルブミン重合体を用いた血小板代替物の展開

武岡 真司
早稲田大学理工学術院

我々は、リコンビナントヒト血清アルブミン (rHSA) を単量体とみなして、これを重合させて得られる無定形のアルブミン重合体 (polyAlb) を、止血機能を有する血小板代替物の担体として研究を展開してきた。rHSA 溶液の pH と温度の変化のみで rHSA の分子内ジスルフィド結合を分子間ジスルフィド結合に変換させながら、任意の粒子径の polyAlb (今回は 200nm 程度) を簡便に調製することができる。polyAlb は、血液適合性と生分解性に優れた静注可能な担体であるものの血中滞留性が低い課題 (半減期約 10 分) に対して、PEG 修飾を行うことによって約 3 時間の半減期の延長が可能となっている。そこで、PEG-polyAlb の PEG 末端にフィブリノーゲン鎖 C 末端アミノ酸配列であるドデカペプチド (HHLGGAKQAGDV; H12) を結合させた H12-PEG-polyAlb の止血機能について検討した。多血小板血漿に H12-PEG-polyAlb を添加して、ADP による血小板凝集を試験したところ、添加による凝集促進効果が認められた。この際に効果的な PEG 分子量や PEG の表面密度を設定した。更に血小板減少モデルラットに投与したところ、40mg/kg 投与 3 時間後の出血時間が生食投与のコントロールの半分にまで短縮され、*in vivo* 評価においても H12-PEG-polyAlb の有効性が確認された。また、polyAlb とリン脂質二分子膜小胞体について、表面を H12-PEG 修飾したもので比較すると、polyAlb の方が高い止血機能が得られている。これは内部が rHSA にて充填されている polyAlb の構造が、出血部位を充填するのに適しているものと考察している。

他方、rHSA の利用の一環としてアルブミンシートの展開も試みている。親-疎水性マイクロパターン基板の疎水性領域にチオール基を導入した rHSA を密に単分子吸着させ、酸化触媒にて分子間ジスルフィド架橋を形成させると、アルブミンシートが構築できた。基板上でシートの片面に修飾をしたあと、界面活性剤処理にてシートを基板から剥離させて、その後シート表面を修飾すると、7nm 程度の膜厚のナノシートで表裏の修飾状態が異なるものが構築される。30 μm x 10 μm x 7nm の柔軟なアルブミンシートの研究動向についても報告する。

シンポジウム 2-7

感染症及び癌治療用ヒト抗体開発

黒澤 良和

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所

私の研究室では、臨床教室と協力して感染症及び癌治療用ヒト抗体開発を実施している。感染症に対しては、日頃から治療に携わるにより病原菌やウイルスに暴露される機会が多い3名の小児科医の協力（成分献血）を得て作成した抗体ライブラリーを用いて抗体単離を実施している。本年は、インフルエンザウイルスに対する中和抗体の報告をする。現在流行しているインフルエンザウイルスは、1968年に大流行（pandemic）した香港風邪に始まるH3N2型である。1968年から2004年にわたってワクチン株として用いられた12株（ほぼ3年毎）を抗原として用い、3種類の抗体ライブラリーをスクリーニングすることにより得た多数の抗体の性質について述べる。この結果は、ヒト体内でインフルエンザウイルスに対して作り得る中和抗体の全体像を描くこととなる。更に現在心配されている新型インフルエンザ(H5N1)に対して抗体を準備する戦略にも触れる。

癌については、肝癌、膵癌、腎癌、肺癌、大腸癌、胃癌、乳癌、子宮癌（計8種）を対象として治療用抗体単離を進めている。我々が独自に開発した抗体スクリーニング法（ICOS）を用いて多数の抗体を単離したのち、手術除去した癌組織に対して免疫染色を実施し癌特異的染色像を与える抗体を選別する。そののちそれぞれの抗体が認識する抗原（癌特異抗原）を同定するのが我々の採用している方針である。癌抗原の同定が完了すると、各抗体が癌細胞に及ぼす生物活性を測定して、そののち担癌動物モデルで抗腫瘍効果を示す抗体を選別する。すでに10種類を越える癌特異抗原が同定されているが、臨床試験開始へ向けて、どの段階まで進んでいるかその現状を報告する。

ミオグロビンの酸素運搬分子への変換：新しい酸素運搬物質の創製

根矢 三郎, 畑 晶之, 星野 忠次
千葉大学大学院薬学研究院 薬品物理化学研究室

人工酸素運搬体の開発は近年急速に進展し、多くの実用的な血液代替物質が開発されている。その多くがヘモグロビンHbを利用するものである。一方、ミオグロビンMbはHbサブユニットと同様の分子構造をもつ単量体で、Hbからの酸素を筋肉に貯蔵する機能をもつ。Mbの酸素親和性は高く ($P_{50} = 0.7$ mmHg), Hbのような酸素運搬能はほとんどない。このためMbは酸素運搬物質にならない。Mbの酸素親和性を下げて酸素運搬能をもたせるには、遺伝子工学によるヘム周辺のアミノ酸残基の化学修飾も行われるが経済的に見合わない。また、補欠分子であるヘム(プロトヘム)の化学修飾もされているが、Mbに十分な酸素運搬機能を付与するのは難しい。私たちは新しいヘムを分子設計して、Mbを酸素運搬物質へ変換することを試みた。

近年、ポルフィリン環のテトラピロール配列を変えた異性体が合成できるようになった。その中で、コルフィセンとよばれる分子は4つのピロール環が台形に並んだ特異な構造をもつ。コルフィセンは自然界に類似構造モチーフがない人工物質であるが、ポルフィリンと同様の芳香族性平面分子で化学的にきわめて安定である。大量に合成でき、鉄錯体への変換も容易である。

結果 天然Mbのプロトヘムを鉄コルフィセンで置き換えたMbをつくることができる。鉄コルフィセンで再構成したMbには可逆的な酸素結合能がある。全アルキル型補欠分子Aを含むMbでは $P_{50} = 6.7$ mmHgであり、天然Mbの1/13まで酸素親和性は低下した。カルボン酸エステル置換基がある補欠分子BのMbでは $P_{50} = 37.2$ mmHgとなり、天然Mbに比べて酸素親和性は1/50に低下した。動脈血と静脈血の酸素分圧差を考えると、補欠分子Bの場合、結合酸素の20%以上が末端組織で放出される。これはMbを酸素貯蔵物質から酸素運搬物質に機能変換できたことを意味する。

議論 鉄コルフィセンは鉄ポルフィリンに比べて低い酸素親和性を示す理由は固有の分子構造にある。テトラピロールのN原子は台形に並び、ポルフィリンでの正方形配列とは対照的である。そのためコルフィセン鉄原子は分子平面内に収まりにくく、近位ヒスチジンに引き寄せられやすい。したがって、酸素分子が第6配位座に結合しにくく、酸素親和性が低下すると考えられる。

Mbを酸素運搬体することに利点は多い。(1) Mbは筋肉から大量抽出できる。(2) Hbよりも分子構造が簡単であるため安定である。(3) Hbで使うサブユニット間架橋などの化学修飾操作は不要である。(4) アロステリックエフェクターの影響を受けないので、人工血液物質としての溶液条件設定(pHや塩類濃度など)が容易である。(5) 補欠分子である鉄コルフィセンは容易に合成できる。これらの理由から、鉄コルフィセンを利用すれば、Mbを使う実用的な新規血液代替物が開発できると考えられる。

In vitroにおけるヘモグロビン小胞体の造血前駆細胞への影響

藤原 満博¹, 山口 美樹¹, 若本 志乃舞¹, 東 寛¹,
酒井 宏水², 武岡 真司², 土田 英俊², 池田 久實¹
1 北海道赤十字血液センター
2 早稲田大学理工学総合研究センター

【目的】ヘモグロビン小胞体(HbV)は人工酸素運搬体の一つとして開発され、動物モデルにおいてその有効性が示されている。非臨床試験がおこなわれるうえで、生体適合性の観点からHbVのヒト血球細胞への影響を考慮する必要がある。骨髄は、肝臓、脾臓とともにHbV投与後の組織分布の高い組織の一つである。そこでHbVの造血機能に及ぼす影響を推測する上で、造血前駆細胞の*in vitro*におけるコロニー形成能に対するHbVの影響について検討した。

【方法】(1) ヒト臍帯血よりFicoll-Paqueを用いて単核球分画を分離し、CD34陽性細胞が300個/wellになるように播種した。メチルセルロース培地に、HbV(0, 0.09, 0.187, 0.375, 0.75, 1.5, 3%)を添加し、37℃にて培養した。BFU-E, CFU-GM, CFU-Mix, CFU-Cは2週間後に、HPP-CFCは4週間後にコロニーをカウントした。(2) 造血系サイトカインを添加した血清を含む培地に臍帯由来単核球を浮遊させ、HbVを添加しovernightまたは3日間培養した後、細胞を回収・洗浄してHbVを除去後、メチルセルロース・アッセイをおこなった。(3) 骨髄ストローマ細胞との共培養系: confluentにしたヒトローマ細胞株にCD34陽性細胞を浮遊させ、HbV(0, 0.75, 1.5, 3%)を添加し無血清培地X-VIVO 10(+造血系サイトカイン)にて培養した。1週間後に等量の培地を加え、2週間後に細胞を回収・洗浄し、CD34陽性細胞数が一定になるように調製してコロニーアッセイをおこなった。

【結果】(1) 臍帯血単核球をHbVと混合してコロニーアッセイをした場合には、培養2週間後のBFU-E, CFU-GM, CFU-Mix, CFU-Cの各コロニー形成への明らかな影響はみられなかった。しかし、4週間後でのHPP-CFCの形成は、HbVの濃度に依存して有意な抑制が認められた。(2) 臍帯血単核球をHbVにovernightまたは3日間曝した後、洗浄操作によりHbVを除去後、コロニーアッセイをおこなった場合には、overnightではHPP-CFCを含め、コロニー形成に有意な影響はみられなかった。3日間曝した場合はHPP-CFCの抑制傾向がみられた。(3) CD34陽性細胞とストローマ細胞共培養系において、HbV1.5%以下の濃度では、造血前駆細胞の細胞増幅およびHPP-CFCを含むコロニー形成に影響はみられなかった。HbV 3%では細胞増幅は抑制されたが、コロニー形成には影響はみられなかった。**【結論】**HbVが継続的に存在する系においてはHPP-CFC形成が抑制されるが、HbVに曝される時間が短い場合、または生理的な条件に近いストローマ細胞との共培養系においては、HbVの造血前駆細胞への影響は極めて少ないと考えられる。

ラット摘出灌流心の虚血再灌流障害に対するアルブミン - ヘム rHSA-FecycP の保護効果

鈴木 佐緒里¹, 栗田 有紀子¹, 小林 紘一², 土田 英俊³, 弘津 一郎¹

- 1 ニプロ株式会社医薬品研究所
- 2 慶應義塾大学医学部呼吸器外科
- 3 早稲田大学理工学総合研究センター

【目的】アルブミン - ヘム rHSA-FecycP は、遺伝子組換えヒト血清アルブミン (rHSA) に4つのシクロヘキサニール基を有するテトラフェニルポルフィリン鉄錯体 (FecycP) を包接させた完全合成系人工酸素運搬体である。今回、本剤の虚血組織への酸素供給能を調べるために、ラット摘出心臓灌流標本を用いて虚血再灌流障害に対する保護効果について検討した。

【方法】Wistar 系雄性ラットの摘出心臓を 330 beats/分のペーシング下に Krebs-Henseleit 液 (95% O₂ - 5% CO₂ 通気, pH 7.4, 37 °C) を用いて 20 mL/分 の速度でランゲンドルフ冠灌流を行った。心筋虚血は灌流速度を 2 mL/分に低下させることによって惹起させた。60分間の低速灌流虚血後、20 mL/分 で60分間の再灌流を行った。10% rHSA-FecycP (rHSA 0.5%, FecycP 4.5 g/L) または 0.5% rHSA を虚血中60分間または再灌流と同時に10分間適用した。心機能パラメータとして最大左心室内圧 (LVDP), 左心室内圧最大上昇速度 (LV dp/dt max), 左心室拡張終期圧 (LVEDP), 灌流圧, 心拍数及び冠流量を測定した。対照には虚血再灌流を行った虚血対照群と120分間定速灌流 (20 mL/分) を実施した正常対照群を設けた。

【結果】虚血対照群では正常対照群に比べて低速灌流中に LVDP 及び LV dp/dt max の低下, LVEDP の上昇が認められ、再灌流後には LVDP 及び LV dp/dt max の回復抑制, LVEDP のさらなる上昇並びに一過性の心室細動または心拍動停止などの心機能障害が惹起された。虚血中に適用した rHSA-FecycP は、再灌流後 LVDP 及び LV dp/dt max をほぼ正常対照レベルにまで回復させた。また、LVEDP の虚血中及び再灌流後の上昇を抑制し、虚血対照群に比べて有意な低値を示した。心拍数には変化はみられず、心室細動または心拍動停止は観察されなかった。一方、再灌流後に適用した rHSA-FecycP, 虚血中または再灌流後に適用した rHSA は、いずれも心機能障害を改善させず、虚血対照群とほぼ同様に推移した。

【結論】虚血時に適用したアルブミン - ヘム rHSA-FecycP は心筋保護効果を有し、その効果は虚血組織への酸素運搬を介して発揮されたものと考えられた。本剤の虚血性心疾患治療薬としての応用が期待される。

ヘモグロビン小胞体 (HbV) が免疫系に及ぼす影響

高橋 大輔¹, 阿部 英樹¹, 藤原 満博¹, 東 寛¹, 酒井 宏水², 武岡 真司², 土田 英俊², 池田 久實¹

- 1 北海道赤十字血液センター
- 2 早稲田大学理工学総合研究センター

【目的】ヘモグロビン小胞体 (HbV) は、高純度濃厚ヒトヘモグロビン溶液を脂質二分子膜で被覆し、表面をポリエチレングリコールで修飾した人工酸素運搬体である。我々はこれまで、HbV 投与後のラット脾細胞において、低濃度のコンカナバリン A (ConA, 0.3 μg/mL) 刺激に対する増殖能の抑制を見出してきた。今回は、蛋白抗原である KLH, および Hb を含有しない空の小胞体が、ラット脾細胞の増殖能に与える影響について検討を行った。また、HbV 投与群ラット脾細胞が、生理食塩水投与群の脾細胞増殖に与える影響についても検討した。

【方法】1) WKAH ラットに KLH (100 μg) を皮下注射し、5-7 日後に循環血液量の 20% 相当の HbV (約 3mL) をエーテル麻酔下、尾静脈より輸注した。対照群には生理食塩水を輸注した。HbV および生理食塩水投与 6 時間後、脾臓を摘出し、RPMI/FCS/2-ME で懸濁した後、KLH (3, 10, 30 μg/mL) 刺激し、増殖能を測定した。2) WKAH ラットに空の小胞体、および生理食塩水を輸注し、同様に ConA (0.3, 3.0 μg/mL) 刺激に対する増殖能を測定した。3) HbV および生理食塩水投与群のラット脾細胞を 1:1 で混和し、ConA (0.3, 3.0 μg/mL) 刺激に対する増殖能を測定した。

【結果】1) WKAH ラットにおいて、HbV 投与 6 時間後の脾細胞に、KLH 刺激に対する特異的増殖能の抑制が認められた。このような抑制反応は、いずれの KLH 濃度においても確認された。2) 空の小胞体投与群において、ConA 刺激に対する増殖能の抑制がみられた。3) HbV, および生理食塩水投与ラット脾細胞を混和した系においても、HbV 投与群同様に、ConA 刺激に対する増殖能の抑制がみられた。

【考察】HbV 投与群において、KLH に対する二次免疫応答性低下が認められた。しかしながら、ConA 刺激による増殖能の抑制が、HbV 投与後 7 日以内に回復していることから、KLH による応答性の低下においても、長期間は持続しないものと推測される。また、空の小胞体投与群も、ConA 刺激に対する増殖能の抑制が認められており、これら一過性の増殖能の抑制は、内包されているヒトヘモグロビンではなく、空の小胞体によって惹起されていると推測された。さらに、HbV および生理食塩水投与ラット脾細胞の混合実験から、HbV 投与群ラットの脾細胞由来の、何らかのファクターが、生理食塩水投与群のラット脾細胞の増殖能に影響を及ぼしていることが示唆された。今後、ヒトリンパ球においても、これらの一過性にみられる免疫能 (あるいは増殖能) の抑制が、起こり得るか検討する必要がある。また、これらの現象が、どのような機序で起こるのかを解明することは、HbV の大量投与が生体に及ぼす影響を明らかにする上で重要であると思われる。

HbVによる輸液蘇生：肺への影響

杖下 隆哉，寺嶋 克幸，坂本 篤裕
日本医科大学附属病院麻酔科学教室

近年人工赤血球の開発が進み，全身のもしくは局所臓器における低酸素に基づく悪影響を早期に改善し，生命維持やその後の合併症を防ぐことが期待されている．以前我々はウサギを用いたショックモデルにおいて，Hemoglobin Vesicle (HbV) solutionが末梢の循環不全を改善することを示した．また，HbV solution自体が*in vitro*において，乳酸リンゲルと比較して凝固能に悪影響を及ぼさないことを示した．しかし，分子生物学的な見地からHbVが生体にどのように影響するかを調べた報告はない．人工赤血球の生体への影響を調査することは，人工赤血球の臨床応用以前に明らかとされるべきである．

今回我々はラットを用い，HbV solutionを投与し生体にどのように影響するかを調査した．

(方法) 今回我々はS-Dラットに対する生理食塩水投与をコントロールとしたHbV投与の影響を調べた．また出血性ショック後のFluid resuscitationにおいて乳酸リンゲル液またはHbVを用い，それぞれの影響を調べるためにRT-PCR法を用い，TNF- α ，IL-6，HMOX-1，HIF-1 α ，ICAMのmRNA発現から経時的に評価した．さらに，我々の結果に対し，文献的考察を加える．

ヘモグロビン小胞体の脳梗塞における有効性に関する基礎的検討

小松 弘嗣¹，佐藤 夏枝¹，太田 勝次¹，松浦 昭宏¹，
堀之内 宏久²，小林 紘一²

1 株式会社オキシジェニクス研究開発本部
2 慶應義塾大学医学部呼吸器外科

【目的】ヘモグロビン小胞体 (HbV) の脳梗塞への適応可能性について検討することを目的として，2種類のラット脳梗塞モデルを用いてHbVの有効性を評価した．

【方法】中大脳動脈 (MCA) 閉塞モデル：雄性Wistar系ラット (9週齢) の右側内頸動脈内に18 mmの栓子 (シリコンコートした4-0号ナイロン糸) を挿入することにより右側MCAへの血流を起始部から遮断した．60分後に栓子を約10 mm引き抜き，MCAへの血流を再開させた．再開通23時間後に神経症状をスコア化すると共に常法に従って脳梗塞巣の体積をcortex，sub-cortexおよびそれらのtotalについて求めた．HbV (10 mL/kg) はMCA閉塞直後またはMCA閉塞20分後に2 mL/minの速度で尾静脈より投与した．Vehicleとしては生理食塩液 (10 mL/kg) を使用した．アラキドン酸 (AA) 誘発モデル：雄性Wistar系ラット (9週齢) の左側外頸動脈から内頸動脈の分岐部までカニューレを挿入し，内頸動脈の血流を遮断することなく0.1 mL/secの速度でAA (3 mg/kg) を注入した．AA投与の3および24時間後にラットの生死を確認すると共に生存ラットについて運動機能障害 (横転テスト，姿勢テスト，片麻痺テスト) をスコア化した．HbVおよび生理食塩液 (いずれも10 mL/kg) はAA注入直後に2 mL/minの速度で尾静脈より投与した．

【結果及び考察】 MCA閉塞モデル：神経症状スコアに関しては，MCA閉塞直後投与およびMCA閉塞20分後投与のいずれの条件においても生理食塩液群とHbV群の両群間に有意な差は認められなかった．生理食塩液群と比し，HbVを閉塞直後に投与した群ではcortexおよびcortexとsub-cortexのtotalで有意な脳梗塞巣体積の減少が見られた．また，閉塞20分後投与においてもsub-cortexの脳梗塞巣体積の有意な減少，cortexおよびcortexとsub-cortexのtotalの脳梗塞体積の減少傾向が観察された． AA誘発モデル：AA注入24時間後の生存率に関し，生理食塩液群およびHbV群の間に著明な差は認められなかったが，3時間後の生存率については有意ではないもののHbV群で上昇傾向が認められた．また，死亡を含めた運動機能障害スコアに関しても，24時間後では両群間に顕著な差は認められなかったが，3時間後ではHbV投与により有意な減少が認められた．以上の結果から，HbVは脳梗塞領域の縮小や運動機能障害の軽減等に寄与しうると考えられる．

【結論】HbVが脳梗塞，特に急性期における新たな治療の選択肢となる可能性が示された．今後，更に検討を加える予定である．

Liposome-Encapsulated Hemoglobin(TRM645)
as a Substitute for Transfusion

- Retrospective Simulation of Clinical Application -

Kawaguchi AT¹, Kinoue T, Hyodo O¹, Inokuchi S¹,
Yoshida S¹, Ogata Y²
1 Tokai University
2 Terumo Corporation

Introduction

Liposome-encapsulated hemoglobin(TRM645)has been developed as a novel oxygen carrier primarily as a RBC substitute for transfusion. Since the capsule has(1)no surface antigen, ABO-typing and antibody-screening(T/S) are unnecessary. Viral inactivation/filtration make it(2) extremely safe regarding blood bourn infection. TRM645 has a low O₂ affinity(P₅₀O₂=40 mmHg)to allow(3)a comparable O₂ transport as RBC under room air. TRM645 is (4)stable without refrigeration for 6 months and ideal for ubiquitous storage for emergency use. Under a hypothesis that TRM645 is safe and efficient, we report a retrospective simulation study to explore its clinical utility.

In the Emergency Medicine

The emergency department has been using O(+)Rh(+)-RBC for an emergency transfusion. In our experience with 70 patients over the initial 2 years, those who happened to have the same blood-type(no mismatch, n=33)had a significantly better survival(49 %)than those with a different blood-type or minor mismatch(n=37, 24 %, p<0.05) If TRM645 is available for such an emergency use, the latter majority could have avoided minor mismatch transfusion.

In the Operating Room

Among 2079 surgical cases who ordered T/S in 2003, only 29 % required transfusion, rendering >70 % of T/S unnecessary. Only 154(7.4 %)required 9 units(1170 ml)or more, suggesting that in retrospect more than 92 % of T/S might have been unnecessary if TRM645 is used for the initial 8 units of transfusion.

Conclusion

TRM645 appears to be useful as blood substitute in an emergency medicine especially in areas with a high prevalence of blood borne infections, and in surgical center to reduce technical burden in an underdeveloped and/or underpowered transfusion service environment.

Beagle犬を用いた50%脱血ショックにおける
Hb小胞体の蘇生効果および酸素運搬能の評価

池田 達彦¹, 堀之内 宏久¹, 井澤 菜緒子¹, 泉 陽太郎¹,
河野 光智¹, 渡辺 真純¹, 川村 雅文¹, 酒井 宏水²,
土田 英俊², 小林 統一¹
1 慶應義塾大学医学部呼吸器外科
2 早稲田大学理工学部

<目的> Hb小胞体(HbV)の臨床応用を考えた場合, その安全性の評価は必須である. HbVは静脈内投与されて効率よく酸素運搬を行い, 末梢臓器の隅々まで酸素を効率よく運搬することを主眼におき開発され, これまでにその生体投与に関する有効性と安全性について様々な角度より検討がなされてきた. 中動物での実験は臨床での使用を想定したモデルを作成し, 小動物では検証できなかった, 全身での酸素代謝, 右室系の変化について検討し, 酸素運搬機能, 安全性について検証することを目的とした. 前回脾摘後50%脱血ショックの後に蘇生を行うモデルを用いた検討を行ったが, その際, 投与後数分にわたって肺動脈圧の上昇を認めた. この肺動脈圧上昇の原因を明らかにするため, 今回の検討では脾摘を行わない出血性ショックモデルを作成し, ショック蘇生時の循環動態に与える影響を検討した.

<方法> 月齢6ヶ月のビーグル犬を用い, 全身麻酔下に, 動脈ライン, Swan-Gantz catheterを挿入し循環系諸標を経時的に計測した. 循環血液量の50%相当量を20 ml/minの速度で脱血し, 1時間の間ショック状態(血圧50mmHg以下)が継続するようにし, ショック蘇生を行った. 蘇生液として5%アルブミン生食(リコンビナントヒトアルブミン(rHSA, ニプロ社製)を生理的食塩水に5%濃度となるよう溶解した液体: rHSA群), 脱血血液(Autologus shed blood ASB群), HbV分散液(HbVを5%アルブミン生理食塩水溶液に分散した液体: HbV/rHSA群)を用いた. 蘇生は20 ml/minのスピードで脱血量と同量の蘇生液を上肢の静脈ラインより経静脈的に投与した.

計測は脱血前, 脱血直後, 脱血1時間後, 蘇生液投与直後, 30分後, 60分後, 90分後, 120分後, 180分後, 240分後に血圧, PAP, CVP, PCWP, CO, 動脈血血液ガス, 混合静脈血血液ガス, 腎皮質酸素飽和度, CBC, 血液生化学, ヘマトクリットを測定した.

<結果と考察> HbV/rHSA群はrHSA群, 脱血血液群と同様の蘇生効果を示した. 循環動態に与える影響では, rHSA群では心拍出量が高く推移する傾向があった. その他の指標において3群間に有意差を認めなかった. 酸素運搬は24~27%がHbVで分担されており, 酸素運搬も十分に行われていると考えられた. 蘇生直後にはいずれの群でも肺動脈圧の軽度上昇が認められていたが, 有意差を認めなかったことから脾摘により右心系に影響が出た可能性が示唆された.

<結論> 中動物での脱血ショック蘇生モデルを用いた投与後急性期の実験での安全性を確認することができた.

人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）を用いたビーグル犬人工心肺モデルにおける頸動脈血流量，脳酸素代謝量の検討

保土田 健太郎，饗庭 了，四津 良平
慶應義塾大学医学部外科(心臓血管)

【背景と目的】新生児や乳児の先天性心疾患に対する開心術の成績は近年飛躍的に向上しているが，一般的には人工心肺回路の充填液として輸血が必須である．これは，低体重の患者に対する無輸血充填が高度の血液希釈を生じ，特に酸素需要の大きな脳の不可逆的障害を来す可能性が高いためである．一方で，輸血には感染症，炎症性生体物質活性化による臓器障害等の合併症の危険が伴う．こうした臨床上のジレンマの一解決手段として，我々はヘモグロビン小胞体（HbV）に着目した．すでにラット人工心肺モデルを確立し，HbV 充填群において高次脳機能が維持されることが証明されたが，これはHbVの充填により末梢組織への酸素運搬が保持されたためと考えられる．さらに，体外循環後の脳浮腫や輸血による炎症性生体物質活性化によって脳血管抵抗が上昇し，脳血流低下を来すことが知られている．そこで，幼若ビーグル犬を用いた人工心肺モデルにおいて，HbV 充填が頸動脈血流量，脳酸素代謝に及ぼす影響を検討することを目的とした．

【方法】体重3.0-4.0kgのビーグル犬人工心肺（CPB）モデルを確立した．ローラーポンプと動物実験用膜型肺を用いてCPB回路（充填量100ml）を作成し，回路の充填液を5%リコンビナントアルブミン（アルブミン群），ヘモグロビン小胞体（HbV群），同種血（同種血群）の3群（各n=6）に分けた．HbVは5%リコンビナントアルブミンに分散させ，Hb濃度を8.6 g/dLとした．麻酔導入後，気管内挿管下にセボフルレン，ペントバルビタール，ベクロニウムを用いて全身麻酔，筋弛緩を維持．右第4肋間より心臓に到達，上行大動脈送血，右房脱血にてCPBを確立．CPB運転は常温下，無拍動送血法（ローラーポンプ）により120-140ml/kg/分の流量を維持し，90分間行った．CPB離脱後，120分間全身麻酔下に生存させた．計測項目は，動脈圧，中心静脈圧，心拍数，直腸温，頸動脈血流量，心拍出量とし，動脈血，頸静脈血，混合静脈血について血液ガス分析，lactate濃度，ヘマトクリット（Ht）値測定を行った．頸動脈血流量，心拍出量はドップラー血流計を用いて測定した．CPB運転前，運転中，離脱後計9点を測定時点とした．同種血群では，イヌ赤血球抗体（DEA1.1）陰性のイヌをドナーとした．

【結果】CPB運転前・後，各群において，pH，pO₂，pCO₂，BE，lactate値に有意差を認めなかった．CPB離脱後のHt値は，アルブミン群，HbV群共に21%，同種血群27%と有意差を認めた．頸動脈血流量はCPB離脱後各群で減少したが，HbV群（15.6 ± 4.0ml/kg/min）はアルブミン群（8.5 ± 4.2ml/kg/min）に対し有意に高値，同種血群（12.8 ± 4.2ml/kg/min）に対して高い傾向にあった．動脈血・頸静脈酸素含有量較差は各群で有意差を認めなかった．

【結語】CPB離脱後の頸動脈血流量は，アルブミン群，同種血群に比しHbV充填群で保たれる傾向にあった．HbV充填はCPB離脱後の脳血流量維持に有利である可能性が示唆された．

LIPOSOME-ENCAPSULATED HEMOGLOBIN (TRM645) DOES NOT INTERFERE WITH THE IMMUNE RESPONSE TO BACTERIAL ENTEROTOXINS IN MICE RECONSTITUTED WITH HUMAN IMMUNE SYSTEM

Akira T. Kawaguchi¹, Yoshie Kametani, Akiko Sakai, Mamoru Ito, Norikazu Tamaoki, Sonoko Habu.
1 Tokai University School of Medicine, Central Institute for Experimental Animals

Background. Preclinical evaluation of new regimens in animals with human immune system is desirable. We studied if the presence of TRM645 interferes with the host's immune response to bacterial enterotoxins in mice reconstituted with human immune system by transfusion of the human cord blood stem cells (CB-NOG)

Methods. Plasma level of human IL-2 was monitored 4-hour and 3-day after intraperitoneal administration of Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST) in CB-NOG mice as well as in wild mice immediately after infusion of 10 ml/kg of TRM645 (TRM+TSST, n=4) or 10 ml/kg of saline (PBS+TSST, n=4) Mice receiving these solutions alone without TSST served as controls.

Results. IL-2 level was elevated 4-hour after TSST either in CB-NOG mice (human IL-2, right panel) or in the wild mice (murine IL-2, left panel) in a similar magnitude, both of which returned to baseline in 3-day. IL-2 levels stayed at the baseline in control mice receiving TRM645 or PBS alone.

Conclusions. The results suggest that TRM645 (10 ml/kg) does not largely modify host's immune response to bacterial enterotoxins in murine as well as in human immune system.

マウスにおけるヘモグロビン小胞体構成脂質の体内動態解析

田口 和明¹, 浦田 由紀乃¹, 安楽 誠¹, 甲斐 俊哉^{1,2}, 武岡 真司³, 土田 英俊³, 小林 紘一⁴, 小田切 優樹¹
1 熊本大学大学院医学薬学研究部
2 ニプロ株式会社医薬品研究所
3 早稲田大学理工学総合研究センター
4 慶応義塾大学医学部外科

【緒言】

輸血に代わりうる人工酸素運搬体としてヘモグロビン小胞体 (HbV) の実用化が期待されており, HbV を製剤化する上で体内動態の検討は必要不可欠である. これまでに我々は HbV 内部の Hb を ¹²⁵I 標識した HbV (¹²⁵I-HbV) の体内動態特性を報告してきた. この HbV を投与した場合, ヘモグロビン (Hb) とともに高用量の脂質成分が体内に入ることになり, この脂質成分の体内動態の検討は HbV の有効性及び安全性を把握する上で重要である. しかしながら, HbV 脂質膜の体内動態の検討は未だ行われていない. このような背景の下, 本研究は, HbV の脂質膜を ³H-cholesterol 標識し (³H-HbV), マウスにおける体内動態実験を行い, HbV 脂質膜の体内動態パラメータの検討を行った. また, HbV の脂質膜及び内部 Hb の体内動態を比較検討して, HbV の体内動態特性を考察した.

【方法】

³H-HbV は ³H-cholesterol と HbV をインキュベートし作製した. HbV 投与液を ddY 系雄性マウスに投与後, 経時的に開腹, 採血及び臓器摘出した. 尿・糞は代謝ゲージを用いて回収した. ³H-HbV 投与マウスの血液, 臓器及び尿・糞は可溶化後, 放射活性を測定した. 各パラメータは MULTI を用い算出した.

【結果及び考察】

脂質成分を標識した ³H-HbV をマウスに尾静脈内投与したところ, 血中半減期は 19.2hr, 血中濃度曲線下面積 (AUC) 834hr % of dose/mL, クリアランス 0.12mL/hr, 分布容積 2.8mL であり, 内部 Hb を標識した ¹²⁵I-HbV とほぼ同等の値を示した. またその主要消失臓器は, 肝臓及び脾臓であり, 高い取り込みを受けることが確認された. しかしながら, 分布の経時的推移においては, 内部 Hb は投与後 7 日以内に消失するのに対し, 脂質成分では一時的な蓄積性を示した後 14 日以内に消失した. また, 内部 Hb は投与後 7 日以内に約 80 % が尿中に排泄され, 脂質成分では約 70 % が糞中より排泄された.

以上のことにより, 投与された HbV は intact HbV として血中を循環後, 代謝臓器である肝臓・脾臓の細網内皮系組織に取り込まれ分解されることが明らかとなった. その後, 内部 Hb は速やかに臓器より消失し尿中に排泄されるのに対して, HbV 脂質成分は, 膜構成成分もしくは脂質滴として臓器中に存在した後, 胆汁中より糞中に排泄されることが確認され, 内部 Hb と脂質膜は HbV の分解後で異なる挙動を示す可能性が示唆された.

持続性大量出血に対する人工血液輸血後のサイトカインの推移と臓器障害について

野上 弥志郎¹, 木下 学², 高瀬 凡平³, 庄野 聡⁴,
服部 秀美³, 松谷 哲行¹, 磯田 晋¹, 志水 正史¹,
木村 民蔵¹, 中村 伸吾¹, 石原 美弥⁵, 緒方 嘉貴⁶,
金田 伸一⁶, 松村 光雄⁶, 山田 憲彦⁴, 斉藤 大蔵²,
石原 雅之³, 菊地 眞⁵, 前原 正明¹

1 防衛医科大学校外科学第2, 2 防衛医科大学校防衛
医学研究センター外傷研究部門, 3 医療工学研究部
門, 4 防衛医科大学校防衛医学, 5 医用工学, 6 テル
モ株式会社研究開発センター

【はじめに】出血性ショックでは肺障害や肝障害を併発することが知られている。我々は持続性の大量出血に対するリボソーム内包型人工赤血球 (TRM645 テルモ社製) 投与による救命蘇生が肺や肝臓に及ぼす影響を検討した。

【方法】SDラットの大腿動脈から0.2ml/分で持続脱血し出血モデルを作成した。脱血と同時に大腿静脈より人工赤血球 (TRM645群) や5% Albumin (Alb群), ラット洗浄赤血球 (RBC群; Hb濃度6g/dl) を0.2ml/分で投与し蘇生を試みた。この脱血/蘇生輸液を150分間行い, サイトカインの血中推移と肺や肝臓の障害を検討した。

【結果】実験終了後, TRM645群ではRBC群と同様に全例48時間以上生存したが, Alb群では数時間以内に全例死亡した。実験終了直後の血中乳酸値, pH, base excessはTRM645群ではRBC群と同様, Alb群に比し有意に低かった。AaDO₂, 気管支肺胞洗浄液中蛋白濃度, 肺湿乾重量比はTRM645群でAlb群に比し有意に高く, RBC群でも同様に高かった。脱血/蘇生輸液中のサイトカインの推移は, TRM645群でTNFが30分後より, MCP-1が60分後より上昇し, その後も他群に比し有意に高値で推移した。IL-10もTRM645群で30分後より上昇し高値で推移した。組織学的な肺での好中球集積は, TRM645群で他群に比し顕著であった。組織学的検討でもTRM645群で軽度のうっ血肺水腫や肺胞中隔の肥厚が認められたが, Alb群ではほとんどなかった。RBC群でもTRM645群と同様な軽度のうっ血水腫が認められた。血中ALT値は実験終了時, 3群とも上昇しなかったが, 肝の組織学的検討ではAlb群で著明な中心静脈周囲の肝細胞の空胞変性が認められたのに対し, TRM645群ではRBC群と同様に空胞変性は軽度であった。組織の低酸素状態により誘導されるhypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) の免疫染色では, Alb群で中心静脈周囲の肝細胞核で発現が認められたが, TRM645群, RBC群では染色されなかった。

【結語】持続大量出血に対する人工赤血球投与による蘇生では, 肝臓をはじめとする組織の低酸素状態は回避されたが, 人工赤血球投与によりTNFが誘導され, ケモカインであるMCP-1が分泌されることで肺への好中球集積が惹起され肺障害が増強する危険性が考えられた。また通常の洗浄赤血球輸血でも肺障害が惹起されヘモグロビン投与がこれに何らかの影響を及ぼすことも考えられた。

S-ニトロソ化アルブミンの調製と評価

廣山 秀一¹, 異島 優¹, 赤池 孝章², 小田切 優樹¹

1 熊本大学大学院医学薬学研究部 薬物動態制御学分野

2 熊本大学大学院医学薬学研究部 微生物学分野

【目的】

一酸化窒素 (NO) は生理機能の調節, 病態発現, 治療への応用など多岐にわたり研究されている。中でも, 虚血性疾患や臓器移植時などでは血流減少に伴う基質枯渇に起因する内因性NOの産生低下により様々な障害が引き起こされるため, 外因的なNOの補充が必要不可欠である。これまでにNO補充療法として, NO吸入療法などといったNO補充療法が試みられてきたが, NO自身の反応性の多様さゆえに選択的に有益な効果を示すことは困難であるのが現状である。我々は既に, ヒト血清アルブミン変異体 (HSA R410C) のS-ニトロソ化体が, 虚血・再灌流障害の改善や抗菌活性といった様々な生理活性を有することを報告した。そこで今回, 現在上市されているHSA製剤 (カプリル酸ナトリウム及びN-アセチルトリプトファン含有HSA) を用いて, S-ニトロソ化HSA (S-NO-HSA) を調製し, 虚血性疾患や臓器移植時の付加的適用を目的としたNOトラフィックタンパク質としての有用性を評価した。

【方法】

300 μM カプリル酸含有HSAとNOドナーであるS-nitrosoglutathione (GSNO) を反応させ, HSAのS-ニトロソ化を行った。NOの定量は, Griess試薬を用いたHPLC-flow-reactor systemにて行った。まず, CDスペクトルを用い構造変化の有無, S-NO-HSAの安定性試験を評価した。次に¹¹¹In標識したS-NO-HSAの体内動態解析, 生理活性の評価はラット肝虚血・再灌流障害モデルを用いて行った。S-NO-HSA (0.5mol/kg) の投与は再灌流直後に行った。

【結果及び考察】

HSAのS-ニトロソ化部位である34位の遊離のCysのSH基の反応性を測定したところ, 脱カプリル酸HSAと比較して反応性の上昇が認められた。また, 同様にS-ニトロソ化効率の上昇も認められた。これは, HSA製剤中に含まれているカプリル酸ナトリウムがHSAに結合することによって, ³⁴CysのSH基が分子表面に露出してきたためと解釈された。CDスペクトルによる構造解析では, HSAのS-ニトロソ化前後での構造変化はほとんど見られなかった。また, ラット肝虚血・再灌流障害モデルを用いたS-NO-HSAの臓器保護効果を肝酵素の細胞外逸脱により評価した結果, S-NO-HSAはGSNOよりも有意に肝障害を抑制した。

大量出血時のリポソーム内包型人工赤血球投与が加齢生体に及ぼす影響とその対策について

木下 学¹, 高瀬 凡平², 野上 弥志郎³, 庄野 聡⁴,
緒方 嘉貴⁵, 金田 伸一⁵, 松村 光雄⁵, 小野 聡³,
山田 憲彦⁴, 関 修司⁶, 石原 雅之², 菊地 眞⁷,
齋藤 大蔵¹

1 防衛医科大学校防衛医学研究センター外傷研究部門,
2 同医療工学研究部門, 3 防衛医科大学校外科,
4 同防衛医学, 5 テルモ株式会社研究開発センター,
6 免疫微生物, 7 医用電子工学

大規模災害時には重度多発外傷などが大量発生するが、高齢化社会では災害弱者である高齢者の割合がより増加すると考えられる。また大量出血を伴う患者の救命に際し輸血用血液の極端な不足が深刻な問題になると考えられ、人工赤血球の実用化が期待される。一方、我々は生体防御能、とくに細胞性免疫能が加齢と伴に変化しエンドトキシンショックなどに極めて脆弱になることをマウスやヒトで報告している。そこで出血性ショックに対するリポソーム内包型人工赤血球 (TRM645, テルモ社製) 投与が加齢生体に与える影響についてマウスを用いて検討した。

【方法】1, 若年 (6週) および老齢 (50週) のC57BL/6マウスに循環血液の50%程度に相当する約1ccの血液を大腿静脈より脱血後、同量の人工赤血球 (TRM645群) または5% albumin (Alb群) を投与し蘇生後の予後やTNFの推移、肝障害の程度をみた。2, 若年および老齢マウスのKupffer細胞をTRM645添加で24時間培養しTNF産生をみた。3, 老齢マウスでTRM645投与後のTNF上昇を中和抗体で阻害し予後への影響をみた。

【結果】1, 若年マウスではTRM645群でAlb群より予後が改善したが (3日後80vs50%, $P < 0.05$), 老齢マウスではTRM645の予後改善効果が全くなかった (20vs30%)。若年老齢全ての群で脱血による赤血球数やヘマトクリット値の低下に差はなかった。また若年老齢マウス共にヘモグロビン濃度はTRM645群で脱血直後全く低下しなかった (17g/dl)。しかし1日後は10g/dlと低下しTRM645の代謝分解が示唆された。若年マウスではTRM645投与後血中TNF値は上昇しなかったが、老齢マウスでは12時間後にAlb群に比し著明な上昇を認め、24時間後のALT値も上昇し肝障害が認められた。2, 若年老齢マウス共にTRM645添加培養でKupffer細胞のTNF産生が増加したがとくに老齢マウスでTNF産生が著増した。3, TNF阻害により老齢マウスでのTRM645投与による救命効果が若年マウスと同程度にまで改善し (83%), 肝障害も消失した。

【結語】老齢マウスではTRM645投与による蘇生時に著明なTNFの産生誘導とこれによる肝障害が惹起され、救命効果を減弱させる危険性が考えられた。高齢者の大量出血時のTRM645を用いた蘇生にはTNFの過剰産生を阻害する必要が示唆された。

ラット摘出灌流心臓での虚血-再灌流障害に対するヘモグロビン小胞体の保護効果 - 第2報

山岸 正, 別所 基明, 浜 御幸, 加藤 隆一,
柳田 茂樹, 楠原 正俊, 大鈴 文孝
防衛医科大学校 内科1

【目的】救急・災害医療に利用可能な人工赤血球として、細胞型のヘモグロビン小胞体 (HbV) が有力な候補となっている。HbVを外傷時や出血時に緊急投与する際には、心臓への影響、特に虚血-再灌流時の心筋障害の発生への留意が必要となる。昨年に続いて、ラットの摘出心臓をランゲンドルフ灌流する方法を用いて、HbVが虚血-再灌流時の心機能をどのように回復させるかを測定した。

【方法】9-12週齢のWistar系雄性ラットにヘパリン1000単位を腹腔内投与し、キシラジン10 mg/Kgとケタミン90 mg/Kgを腹腔内投与して麻酔した。心臓を取り出し、Krebs-Henseleit buffer (KH-buffer) を用いて静水圧100 cmH₂O, 38℃でランゲンドルフ灌流した。左心室にラテックスバルーンを挿入し、圧トランスデューサーを介して、左室発生圧 (LVDP), 心拍数 (HR) などを連続的に記録して心機能の指標とした。また、冠灌流液中のLactate濃度を連続して測定した。HbVとHbを含まない空球小胞体 (V) は、Hb濃度が0.10 g/dLおよび0.33 g/dLになるようにそれぞれKH-bufferで希釈し、38℃に加温して95% O₂ + 5% CO₂混合ガスを通気した。約20分間KH-bufferでcontrol灌流を行った後、対照群 (n = 6), Va (Hb 0.10 g/dL) 群 (n = 7), Vb (Hb 0.33 g/dL) 群 (n = 7), HbVa (Hb 0.10 g/dL) 群 (n = 7), HbVb (Hb 0.33g/dL) 群 (n = 6) の5群に分けて以下の実験を行った。対照群では、control灌流の後虚血30分-再灌流30分の処置を施した。V群とHbV群では、虚血30分-再灌流30分処置の前に、それぞれに対応する上記の希釈溶液を10分間灌流した。

【結果】試験したHb濃度と灌流時間の範囲で以下の結果が得られた。HbVもVも、実験を通じて冠灌流量にはほとんど影響を与えなかった。HbVは、再灌流中のHRとLVDPの回復を有意に促進し、左室拡張末期圧 (LVEDP) の上昇を有意に抑制した。HbV群では、灌流開始から5分間の冠灌流液中のLactate濃度が有意に低下し、HbVb群では再灌流開始1分後のLactate濃度も有意に低下した。V群では、HbV群で見られた再灌流中の明確な心機能の回復や冠灌流液中のLactate濃度の低下はほとんど見られなかった。

【考察】今回の実験結果から、HbVは虚血-再灌流によって惹起される心筋傷害に対して何らかの保護作用を持つであろうことが示唆された。また、Hbを含まない空球小胞体 (V) では、HbVで見られた心機能回復効果と冠灌流液中のLactate濃度低下効果がほとんど見られなかったことから、HbV中のヘモグロビン (Hb) がこれらの効果に寄与していると推定された。現在、HbVの作用メカニズムあるいは作用経路を明らかにするための実験を行っている。

LIPOSOME-ENCAPSULATED HEMOGLOBIN
(TRM645)IMPROVES ENERGY METABOLISM IN
SKELETAL MUSCLE ISCHEMIA AND
REPERFUSION AS SHOWN ON NUCLEAR
MAGNETIC RESONANCE

Akira T. Kawaguchi, Kensuke Aso, Daisuke Kurita,
Haruyuki Minamitani, Munetaka Haida
Tokai University School of Medicine

Background. We tested effects of liposome-encapsulated hemoglobin(TRM645)in skeletal muscle ischemia and reperfusion, which simulates muscular necrosis and metabolic syndrome in humans after limb entrapment.

Methods. Intracellular pH and inorganic-phosphate / high energy phosphate ratio(Pi/PCr)were serially monitored using a nuclear magnetic resonance in rodent hind leg muscle undergoing, 1. Ischemia for 70 minutes, 2. Intravenous systemic(10 ml/kg)administration of TRM645, saline, empty liposome or no treatment, 3. Reperfusion for 60 minutes.

Results. Intracellular pH decreased precipitously after ischemia and even following reperfusion regardless of treatment. Pi/PCr increased after ischemia until reperfusion, when the ratio returned toward normal or energy status improved in TRM645-treated rats(right panel, n=6)while Pi/PCr remained elevated in animals without treatment(left panel, n=5)as well as in other animals.

Conclusions. The results suggest that TRM645(10 ml/kg) improves intracellular energy metabolism in the skeletal muscle after ischemia and reperfusion. Return of pH may lag behind due to prevailing anaerobic metabolism due to prolonged ischemia.

ドデカペプチド結合リン脂質小胞体の内包物放出特性と止血能増幅効果

岡村 陽介¹, 前川 一平¹, 半田 誠², 池田 康夫²,
武岡 真司¹

1 早稲田大学大学院理工学研究科
2 慶応義塾大学医学部

【目的】フィブリノーゲン 鎖C末端ドデカペプチド(H12)を表面に結合させたリン脂質小胞体は、活性化血小板間を架橋して血小板凝集を促進させる機能を持ち、血小板減少ラットに静脈投与すると出血時間を短縮させることを既に報告してきた。本報では、血小板凝集惹起剤(adenosine 5-diphosphate(ADP))を内包させたH12結合小胞体を調製し、血小板代替物としての機能の増強を評価した。

【方法】H12(HHLGGAKQAGDV)を、マレイミド基結合ポリエチレングリコール(MALPEG; Mw=3.4 kDa)を介して小胞体に担持させてH12-PEG-小胞体を調製した。CF(10 mM)を内包させたH12-PEG-小胞体(CF)をPRPに分散させ([PLT]= 2.0×10^5 / μ L, [小胞体]= f.c. 0.05 mg/mL), ADP添加([ADP]= f.c. 2 μ M)により血小板凝集を惹起させて、血小板凝集計にて透過度とCF蛍光強度を測定した。血小板減少ラット(Wister系, 8週齢, 250-280 g, [PLT]= 2.0×10^5 / μ L)にH12-PEG-小胞体(ADP, 1 mM)を投与し、尾先端を切傷し(深さ0.5 mm, 長さ1 mm), 止血までの時間を測定した。

【結果及び考察】H12-PEG-小胞体(CF χ 1)とPEG-小胞体(CF (2))との血小板凝集能の比較では, (1)の方が透過度が約10 %増大した。これは, H12-PEG小胞体が活性化血小板とGPIIb/IIIaを介して多点結合し, 血小板凝集が促進されたためと考えられる。この時のCF放出率は, (1)の方が(2)の場合と比較して約15倍も高かった。これは, 小胞体がH12を介して血小板と結合し, 凝集した血小板の形態変化による物理的刺激により小胞体膜バリアー能が低下してCF放出が促進されたと考えられる。次にH12-PEG-小胞体(ADP)を血小板減少ラットに投与したところ(10 mg/kg), 出血時間は 371 ± 54 秒となり, ADP未内包群(573 ± 127 秒)や生食投与群(609 ± 153 秒)と比較して著しく短縮した。これは, H12-PEG-小胞体にて短縮効果の確認できた1/4の投与量で同程度の効果であった。以上より, ADP内包によるH12-PEG-小胞体の止血能の向上が*in vivo*にて確認された。

人工酸素運搬体ヘモグロビン小胞体による固形腫瘍の酸素化

泉 陽太郎¹, 山本 学¹, 竹内 健¹, 渡辺 真純¹,
堀之内 宏久¹, 寺村 裕治², 酒井 宏水², 武岡 真司²,
土田 英俊², 小林 紘一¹

1 慶應義塾大学医学部呼吸器外科

2 早稲田大学理工学総合研究センター

背景：固形腫瘍の発育と転移には血管新生が必須である。固形腫瘍は様々な機構により独自の血管を誘導していると考えられるが、これらの新生血管は形態的および機能的に正常組織に分布する毛細血管とは幾つかの点で異なっている。具体的には血管径が大きく、蛇行が多く、血流速度や方向が不均一かつ不安定である点などが挙げられる。赤血球は正常組織の毛細血管において効率的に酸素を運搬する機能を持っているが、腫瘍組織の血管構築の中ではその酸素運搬能は十分に発揮されていない可能性がある。実際腫瘍組織中の酸素分圧は著しく低いことが知られており、この低酸素状態が腫瘍の悪性度を増し、治療抵抗性をもたらすと考えられている。このような血管構築下では血漿中に分布する酸素運搬体の方が効率的に酸素を運搬する可能性がある。今回我々は人工酸素運搬体として現在開発が進行しているヘモグロビン小胞体(HbV)を用いてこれを検証した。

方法：動物種はC57/BL6マウスを用いた。腫瘍はLewis肺癌を用いた。下肢大腿皮下に腫瘍片を移植し径約8mmに達した段階で実験を行った。組織酸素分圧の測定は蛍光消滅法を応用したOxyspot法にて行った。麻酔下に尾静脈を確保しポルフィリン誘導体を静注した。その後移植腫瘍部分の皮膚を剥離し腫瘍表面を露出し、生食とカバーガラスで被覆した。試料はHbVとその分散液である生食を尾静注して比較した。

結果と考察：腫瘍組織酸素分圧は試料投与後約10分でHbV投与群において生食投与群に比べ一過性に有意に上昇した。今後放射線治療への応用を検討する。

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, 小林 薫, 酒井宏水, 福島昭二, 堀之内宏久, 村田 満, 渡辺真純

日本血液代替物学会 会誌

発行 日本血液代替物学会

編集・制作「人工血液」編集委員会

印刷 株式会社 研恒社

人工血液 vol.14(1) 2006年8月8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