

人工血液

第 14 巻 第 4 号 2007 年 5 月

目 次

会告	106
総説	
Notchリガンドを用いたヒト造血幹細胞増幅法の開発	千葉 滋 108
CD4陽性T細胞の分化とRac1	白井睦訓 113
組織接着剤開発の現状	田口哲志 118
小動物臨床における輸血の現状と人工赤血球の使用例	並河和彦 124
二次投稿論文	
ハムスター皮下の細動脈血流を一過性に遮断するモデルを用いた P ₅₀ 値が異なるHb小胞体の酸素放出挙動	酒井宏水 130
事務局たより	138

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 14 No. 4 May, 2007

Contents

Announcement	106
Review: Development of a Highly Efficient Ex Vivo Expansion System of Human Hematopoietic Stem Cells Using Delta1-Fc Chimeric Protein.	Shigeru Chiba 108
Role of Rac1 in Differentiation of CD4 T Cells	Mutsunori Shirai 113
Development of Tissue Adhesives	Tetsushi Taguchi 118
Circumstances Regarding Blood Transfusion and Cases Using Artificial Erythrocyte in Small Animal Clinics	Kazuhiko Namikawa 124
Secondary Publication:	
Oxygen Release from Low and Normal P ₅₀ Hb-Vesicles in Transiently Occluded Arterioles of the Hamster Window Model.	Hiromi Sakai 130

会 告

第14回日本血液代替物学会年次大会

大会長：慶應義塾大学 輸血・細胞療法部 半田誠

開催日程：平成19年6月14日(木)、15日(金)

開催場所：慶應義塾大学三田キャンパス北館

テーマ：人工血液の未来を語ろう

登録受付：当日（事前受付なし）、参加登録費：10,000円

会員懇親会：無料、6月14日(木) 6時

特別プログラム：

○特別講演：人工血液に期待する

座長：池田康夫（慶大）

- 稲田英一 順天堂大麻酔科（医療者の立場から）
- 有賀友則 エホバの証人の医療機関情報デスク（患者の立場から）
- 清水勝 （血液事業全体から俯瞰して）

○大会長シンポジウム：人工血液の将来展望

座長：堀之内宏久（慶大）、武岡真司（早稲田大）

- 基調講演：小林紘一（慶大）
- 人工酸素運搬体：高折益彦（東宝塚さとう病院）
- 人工（代用）血漿：宮尾秀樹（埼玉医大麻酔）
- 人工免疫グロブリン・人工抗体：鈴木和男（千葉大免疫）
- 人工血小板：半田誠（慶大）

○教育講演

- 1) 赤血球が語る膜機能（女子医大生化学 高桑雄一）
- 2) リコンビナント活性型第VII因子製剤：人工止血剤としての可能性（ノボルディスクファーマ 止血開発企画部 新井盛大）

○シンポジウム

- 1) 人工血液研究の最前線（4題）
- 2) 人工酸素運搬体の適応（6題）
- 3) 人工酸素運搬体の諸問題（8題）：
モデレータ：酒井宏水（早稲田大）、川口章（東海大）
 - 「ナノカプセル型人工酸素運搬体TRM-645の開発状況と今後の展開」、金田伸一（テルモ）
 - 「体外循環における人工酸素運搬体の効果について」、水野敏秀、妙中義之（国立循環器病センター研究部 人工臓器部）
 - 「人工酸素運搬体の常温並びに低体温脳虚血に対する効果に関する研究—胸部大動脈瘤手術への応用を目指して—」、織田貞二（島根大 心臓血管外科）
 - 「人工赤血球OXY-0301の開発状況と今後の展開」、松浦昭宏（オキシジェニクス）
 - 「人工赤血球の血液適合性と免疫系に対する影響」、東寛（北海道赤十字血液センター 研究部）
 - 「臨床検査における人工赤血球の影響とその解決策」、村田満（慶大 中央検査部）
 - 「Higher O₂ Affinity Potentiates Protective Effect of Artificial O₂ Carrier in Brain Ischemia/Reperfusion in a Rat Model」、川口 章（東海大）
 - 「ヘモグロビン小胞体と各種代用血漿剤の併用に関する検討」、酒井宏水（早大 理工学術院）

第14回日本血液代替物学会年次大会プログラム案

6/14 (木)		6/15 (金)	
09:00		09:00	
09:30		09:30	一般演題 (6 題)
10:00	開会	10:00	
10:30	シンポ 1 : 人工血液研究の最前線	10:30	
11:00	(4 題)	11:00	特別講演 : 人工血液に期待する
11:30		11:30	座長 : 池田康夫 (慶大)
12:00	理事会	12:00	
12:30		12:30	昼休み
13:00	評議員会	13:00	
13:30	教育講演 1 : 赤血球が語る膜機能	13:30	総会
14:00	高桑雄一 (女子医大)	14:00	教育講演 2 : リコンビナント活性型第Ⅶ因子製剤
14:30	会長シンポジウム : 人工血液の将来展望	14:30	新井盛大 (ノボ)
15:00	座長 : 堀之内宏久 (慶大)、武岡真司 (早大)	15:00	シンポ 3 : 人工酸素運搬体の諸問題
15:30		15:30	座長 : 酒井宏水 (早大)、川口章 (東海大)
16:00	シンポ 2 : 人工酸素運搬体の適応	16:00	(8 題)
16:30	(6 題)	16:30	
17:00		17:00	閉会
17:30		17:30	
18:00	懇親会	18:00	

Notchリガンドを用いたヒト造血幹細胞増幅法の開発

Development of a Highly Efficient *Ex Vivo* Expansion System of Human Hematopoietic Stem Cells Using Delta1-Fc Chimeric Protein.

鈴木隆浩, 千葉 滋

Takahiro Suzuki, Shigeru Chiba

和文抄録

血液製剤は現在そのほとんどを献血に依存しているが、献血に頼った輸血医療は供給が必ずしも安定せず、感染の危険性を完全には除外できないなど、課題が残されている。課題克服のための取り組みとして代替血液の可能性が模索されており、輸血製剤の体外生産技術を確立することは、代替血液を手にするための選択肢の一つである。造血幹細胞の増幅と分化血球誘導技術とを組み合わせることで、効率的な輸血製剤の体外生産を可能にすることが期待される。我々は、幹細胞維持因子であるNotchシグナルの活性化が造血幹細胞の体外増幅に有効であることを見出し、NotchリガンドであるDelta1を適切なサイトカインと共に加えることで、ヒト臍帯血造血幹細胞（SCID repopulating cell）を約6倍に増幅できることを確認した。本技術は将来の輸血医療・移植医療にとって重要な役割を担うことが期待される。

Abstract

Supply of blood products mainly depends on voluntary donation, but this system bears a potential risk of insecure supply and pathogenic contamination. Therefore, establishment of the technology that enables efficient *ex vivo* production of blood products is expected. Expansion of hematopoietic stem cells (HSCs) *ex vivo* can be a powerful tool for such a demand when combined with a technology to induce differentiation of HSCs into specific blood lineages. We found that activation of the Notch signaling pathway by Delta1, one of the physiological Notch ligands, is effective for HSC expansion, and culture of human cord blood HSCs with Delta1 and other conventional cytokines expanded HSCs (SCID repopulating cells, SRCs) by about 6-fold. Our technique is expected to play an important role for the future blood transfusion medicine as well as the stem cell transplantation medicine.

Keywords

Notch, Delta1, Hematopoietic stem cell, Stem cell expansion, CD133, CD34

はじめに

現在血液製剤はそのほとんどを献血事業に依存しているが、献血に頼った輸血医療は、量的質的な供給の不安定性、感染の危険性などの問題を孕んでおり、改善すべき点も多い。これを解決する手段として、人工材料を用いた代用血球製剤の開発や幹細胞からの血球産生システムの開発等が考えられ、現在盛んに研究が進められている。その中でも幹細胞からの血球産生は、幹細胞に備わった自己複製能と分化増殖能を最大限利用することにより、理論上相当数の分化血球を得ることが可能であり、また代用血球の目処の立っていない血球の産生も可能である。以上のことから、我々は主に臍帯血や骨髄中に存在する体性造

血幹細胞に注目し、体外で幹細胞を増幅させ、さらに赤血球・白血球・血小板等の各種血球細胞を誘導する技術の開発を試みてきた。そして、幹細胞維持因子であるNotchシグナルの活性化が、幹細胞由来血球製剤化にあたり最も基本的な技術となる造血幹細胞の体外増幅に有効であることを見出した¹⁾。

Notchシグナルとは

Notchシグナルは細胞膜表面に存在する受容体（Notchファミリー分子）がリガンド（Delta, Jaggedファミリー分子）からの刺激によって活性化されることで伝えられる情報伝達系である。本シグナルはショウジョウバエから哺乳類に至るまで高

度に保存されており、種々の組織における幹細胞の発生・維持、分化制御に重要な役割を果たすことが明らかになっている^{2,3)}。

特に造血系について述べると、Notch1ノックアウトマウスでは発生過程で造血幹細胞が出現しないことから、Notchシグナルは胎生期の造血幹細胞の発生に必須であることが分かっている⁴⁾。また、Notchは成体造血幹細胞の維持にも重要であることが近年数々の研究によって明らかになってきた。Notchおよびその関連分子をマウス骨髄造血幹細胞で活性化させると、幹細胞の表現型が維持されることから、Notchが造血幹細胞の維持、分化抑制に重要であることが示唆される⁵⁾。さらに、造血幹細胞は骨髄において特殊な解剖学的位置（ニッチと呼ばれる）において自己複製すると考えられてきたが、近年海綿骨の表面にある骨芽細胞がニッチの一つであることが明らかとなった^{6,7)}。そして、骨芽細胞が増生するトランスジェニックマウスでは造血幹細胞の増加も認められるが、このマウスの骨芽細胞ではNotchリガンドの一つであるJagged1が高発現されており、コントロールマウスに較べて造血幹細胞においてNotchシグナルが亢進していることが報告された⁶⁾。以上より、成体内骨髄ニッチでは骨芽細胞上のNotchリガンドにより造血幹細胞のNotchシグナルが活性化することによって、造血幹細胞の分化が抑制され、自己複製に重要な役割を果たしているというモデルが想定されている（Fig. 1）。

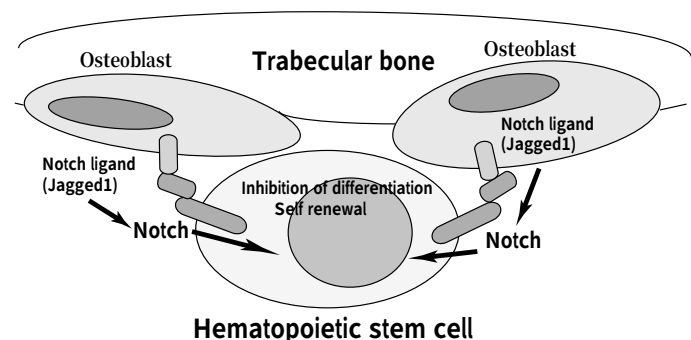


Fig. 1. Hematopoietic stem cell niche and Notch.

Osteoblasts express Jagged1, one of the Notch ligands, while hematopoietic stem cells (HSCs) express Notch receptors. The Notch signaling pathway in HSCs is activated by Jagged1 presented on osteoblasts, and this signal is thought to suppress differentiation and help self-renewal of HSCs.

Notchリガンドを用いた造血幹細胞の体外増幅

最近本シグナルを活性化可能な可溶性精製リガンドが開発され、その再生医療への応用が期待されている。そこで我々は本可溶性リガンド（Delta1-Fc：Delta1とヒトIgG Fc部分を繋いだ人工キメラ蛋白）を用いてヒト臍帯血造血幹細胞濃縮分画（CD133陽性細胞）を培養、これをNOD/SCIDマウスに移植し造血幹細胞の増幅効果を定量的に検討した。その際、将来の製剤化を容易にするため、培養にはフィーダー細胞を用いず、培養液も血清を含まない化学的組成の明らかなものを用いることとした。

■Delta1の添加は未分化造血細胞を増幅するのに効果的である

まず、造血幹細胞増幅のための最適培養条件を探るため、臍帯血CD133陽性細胞を様々なサイトカインおよびDelta1-Fc存在下に培養し、未分化造血コロニー（CFU-Mix）の増幅率を比較した。サイトカインは従来から幹細胞増幅効果が確認されている、Stem cell factor（SCF）、thrombopoietin（TPO）、flt-3 ligand（FL）をベースとし（STF）、これにIL-6、IL-6/可溶性IL-6受容体キメラ蛋白（FP6）、IL-3、Delta1-Fcを様々な組み合わせで添加し、培養を行った。Delta1-Fcはヒトフィブロネクチンと共に培養底にコーティングし、その上で細胞を培養した（Fig. 2）。

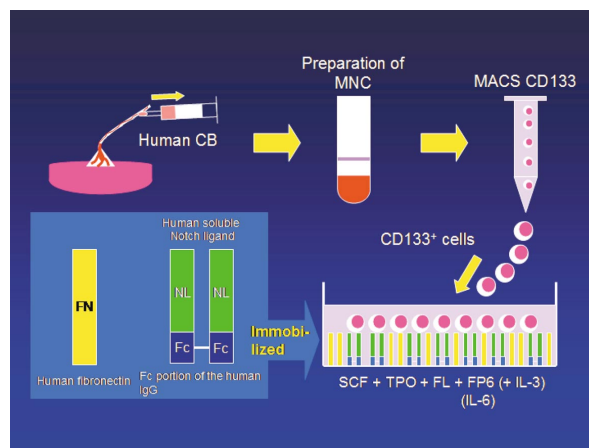


Fig. 2. The outline of our culture system

その結果、CFU-MixはSTF + FP6 + IL-3 + Delta1-Fc（STFF3+D）で3週間培養することにより最も効率よく増幅できることが判明した（Fig. 3）。

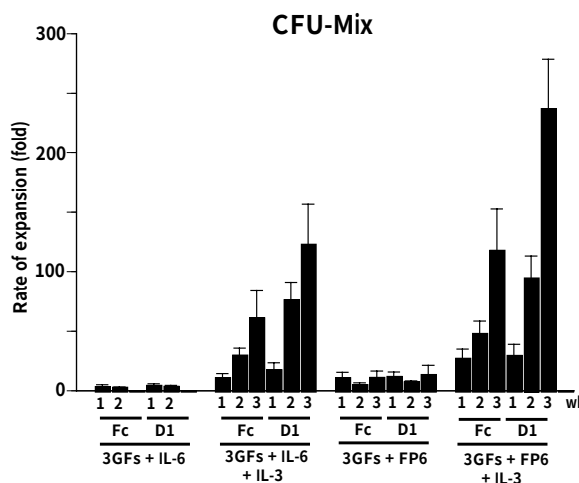


Fig. 3. The expansion rates of CFU-Mix.

CB CD133-sorted cells were cultured in the presence of indicated cytokines and Delta1-Fc for one, two and three weeks. After indicated periods of culture, cells were replated in a semisolid medium and the number of CFU-Mix was evaluated. The expansion rate of the number of CFU-Mix is shown. Fc, IgG-Fc; D1, Delta1-Fc. 3GFs, three growth factors (SCF, TPO, and FL).

■Delta1を含むSTFF3+D条件は造血幹細胞を6倍に増幅し、これは従来の報告より効率的である

ヒト造血幹細胞は、現在のところ表面抗原などを用いたprospectiveな同定は困難であり、免疫不全マウス（NOD/SCIDマウス）へ移植を行った後ヒト細胞による長期造血再建を確認することによってretrospectiveに検出することしかできない。そこで我々はマウスに細胞を移植し、限界希釈法の原理を用いることで含まれる造血幹細胞数（SCID Repopulating Cell: SRC）を定量化した（Fig. 4）。

STFF3+D条件にて最も効率よく未分化造血細胞が増幅されることが示されたため、臍帯血CD133陽性細胞をSTFF3+Dで3週間培養し、含まれているSRC数を培養前（分離直後）のものと比較した。

その結果、分離直後のCD133陽性細胞中のSRCは1,020個中に1個であったのに対し、STFF3+Dで3週間培養を行った細胞集

団中には、175個中に1個（培養開始時細胞数に換算）のSRCが存在していることが判明した。これは培養によってSRC（造血幹細胞）が5.8倍に増幅されたことを示しており、本増幅効率は無血清・無フィーダー条件下での報告では最高効率に属する。

次に本培養条件と従来有効と報告されている培養条件を比較した。これまでに、STF + FP6（STFF）⁸⁾ およびSTF + IL-6 + IL-3 + Delta1（STF63+D）⁹⁾ についても造血幹細胞増幅に関して有効という報告がなされている。しかし、これらの報告は有血清条件での結果、あるいは定量化を行っていないなどの問題があった。そこで、我々はSTFF3+Dとこれらの培養条件を、無血清・無フィーダー条件下で定量化比較した。その結果、培養細胞中に含まれるSRCはSTFFでは640個中に1個（増幅効率1.6倍、 $p=0.001$ （STFF3+Dと比較））、STF63+Dでは266個中に1個（増幅効率3.8倍、 $p>0.05$ （STFF3+Dと比較））となり、我々が検討したSTFF3+D条件はSTF63+Dとは有意差は認

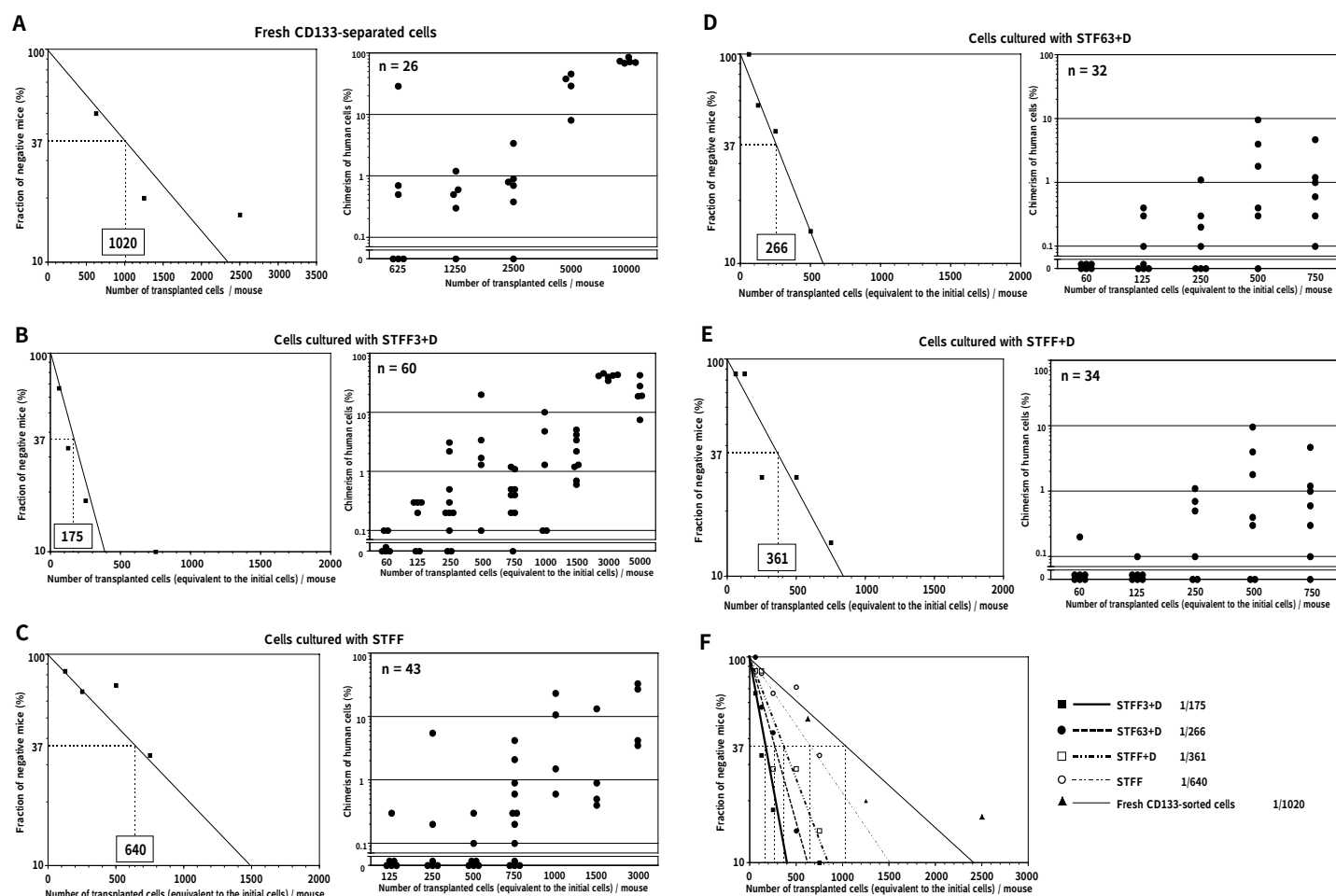


Fig. 4. The repopulating ability of fresh CB CD133-sorted cells and their progenies after the culture with various combinations of cytokines for three weeks.

(A-E) The frequencies of SRCs in fresh CD133-sorted cells (A), cells cultured with SCF + TPO + FL (STF) + FP6 + IL-3 + Delta1-Fc (STFF3+D) (B), STF + FP6 (STFF) (C), STF + IL-6 + IL-3 + Delta1-Fc (STF63+D) (D) and STF + FP6 + Delta1-Fc (STFF+D) (E). They were estimated as 1/1020 (A), 1/175 (B), 1/640 (C), 1/266 (D) and 1/361 (E), respectively, by limiting dilution analyses. The right panels show chimeric proportion of human CD45+ cells in the bone marrow of recipient mice, and the number of transplanted mice is shown in the upper-left margin of the panels. (F) Integrated representation of (A) to (E). Correspondence of the symbols and lines are noted in the right.

められなかったものの、これらの培養条件と同等かそれ以上の増幅効率を示すことが示された。

STFF3+D条件はIL-3を添加サイトカインとして含むが、IL-3は分化を促進するとの報告もあり、その造血幹細胞増幅への影響については評価が定まっていない。そこで、我々はSTF + FP6 + Delta1 (STFF+D) 条件の培養も試み、幹細胞数の比較を行った。その結果、STFF+Dで培養された分画中に含まれるSRCは361個中に1個 (2.8倍) と算定され、STFF3+Dより有意に ($p=0.02$) 増幅効率が低いことが判明した。これはIL-3が少なくともDelta1存在下では造血幹細胞増幅に効果的に作用することを示している。

■増幅された造血幹細胞は正常機能を保持している

増幅された造血幹細胞が正常機能を有することを確認するため、我々はヒト細胞が生着したマウスにおいて血液細胞を回収し、その分化状態を検討した。前述したようにヒト血液細胞の移植にはNOD/SCIDマウスが頻繁に用いられるが、本マウスへの移植系ではヒトT細胞が再構築されないことが知られており、問題点として認識されていた。最近NOD/SCIDマウスをIL-2受容体共通 γ 鎖 (IL-2R γ c) ノックアウトマウスと交配することにより、移植細胞のあらゆる血球系への分化が可能なマ

ウスが樹立された (NOD/SCID/ γ c^{null}マウス (NOGマウス))¹⁰⁾。そこで、我々はSTFF3+D条件で増幅した細胞をNOGマウスに移植し長期間経過後 (24週後)、ヒト血球分化状態を解析した。

移植レシピエントより骨髓、末梢血、脾臓、胸腺を回収し、その中に含まれるヒト血球細胞 (ヒトCD45陽性細胞) の各分化抗原を解析したところ、CD13/33陽性骨髓系細胞、CD19陽性B細胞、CD3陽性T細胞、CD56陽性NK細胞が認められ、T細胞においてはCD4あるいはCD8 single positive細胞も確認できており、移植されたヒト造血幹細胞が正常に骨髓球系細胞、リンパ球系細胞に分化していることが明らかとなった。骨髓においては、CD133⁺CD34⁺未分化造血細胞が認められており移植後も造血幹細胞が骨髓内に存在していることが示唆された (Fig. 5.A)。

そこで、骨髓に存在する未分化細胞中に造血幹細胞が存在していることを確認するため、本マウスより骨髓細胞を回収し、別のNOGマウスへ2次移植を行った。1匹の1次レシピエント骨髓より細胞を回収し、これを3等分して3匹のNOGマウスに移植を行ったところ、2匹にヒト血液細胞の生着を認め、骨髓系・B細胞系への分化が確認された (Fig. 5.B, 5.C)。

以上の結果より、STFF3+D条件で3週間培養した場合でも正常な造血幹細胞活性が保たれていることが明らかとなった。

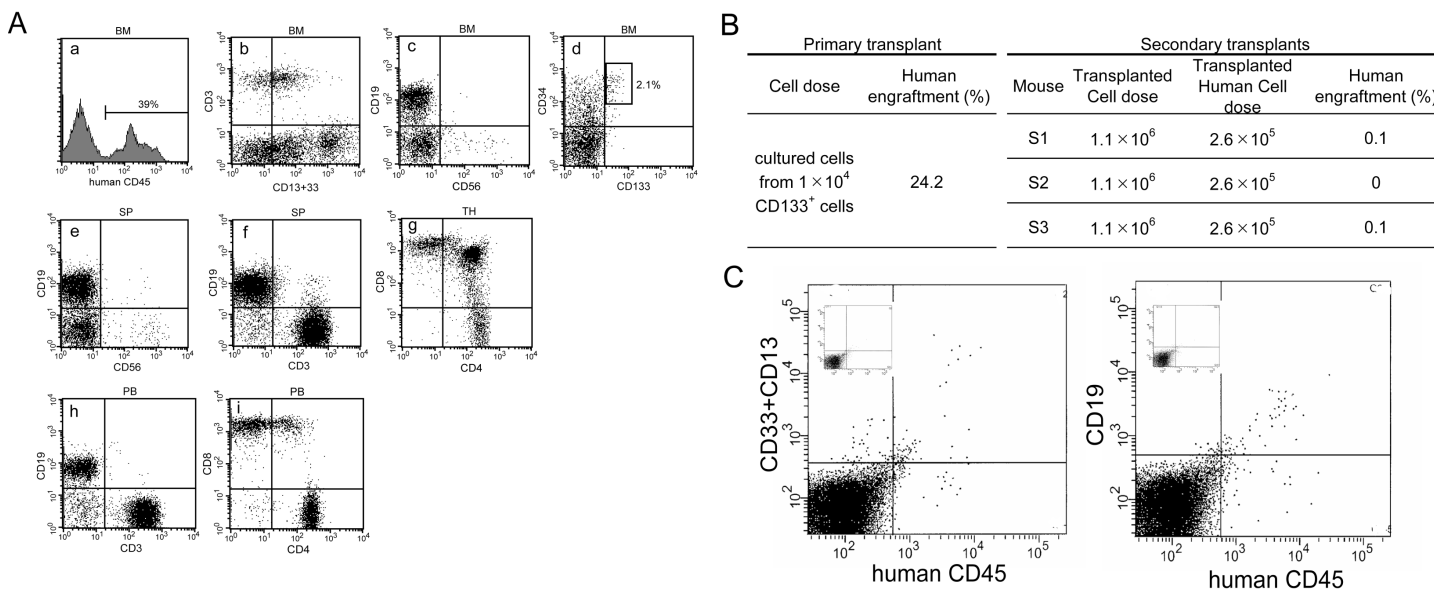


Fig. 5. *In vivo* repopulating and differentiation capacity of the cells cultured with SCF + TPO + FL + FP6 + IL-3 + Delta1-Fc (STFF3+D).

CB CD133-sorted cells were cultured with STFF3+D for three weeks and were transplanted into NOG mice.

(A) The bone marrow (BM), peripheral blood (PB), spleen (SP) and thymus (TH) of recipient mice were collected 24 weeks after transplantation, and contribution of human cells to various hematopoietic lineages were examined by flow-cytometric analyses. A high level of engraftment (panel a; 39%), reconstitution of CD133⁺CD34⁺ immature cells (d; 2.1%) and contribution to myeloid (b), B cell (c, e, f, h), T cell (b, f, g, h, i) and NK cell (c, e) lineages were confirmed in the BM, spleen, thymus and peripheral blood. Panels b to i represent data gated by human CD45⁺ cells.

(B, C) Ten thousand CB CD133-sorted cells were cultured and were transplanted into a primary NOG mouse. Twenty four weeks after transplantation, bone marrow cells were harvested and serially transplanted into three secondary NOG recipients. (B) Ten weeks after secondary transplantation, bone marrow cells of recipient mice were harvested and chimerism of human cells was analyzed. Two of the three secondary recipients showed substantial human engraftment. (C) Representative flow-cytometric data of bone marrow cells in a secondary recipient (mouse S1). Human myeloid (CD13⁺ or CD33⁺) and lymphoid (CD19⁺) cells can be identified. Data with isotype controls are shown as insets in the upper-left margin of the figures.

まとめと考察

今回我々は、SCF, TPO, FL, FP6, IL-3, Delta1-Fcを用いて無血清・無フィーダー条件下で3週間培養することにより、造血幹細胞(SRC)を約6倍に増幅できることを示した。培養は将来の臨床応用を容易にするため、無血清・無フィーダー条件で行ったが、6倍の増幅効率は現在までの報告中最高効率に属するものである。今後は、培養液量、培養環境(酸素濃度など)や培養期間の更なる最適化を行い、より効率的な培養系を確立したい。

造血幹細胞の体外増幅技術は、幹細胞からの各種血球誘導技術と組み合わせることにより、最も効率的な体外培養血液製剤産生を可能にする。現在筆者のグループでは、造血幹細胞から成熟好中球を効果的に誘導する技術開発研究を行っており、今回紹介した幹細胞増幅技術と組み合わせ、将来は臨床に応用できるレベルにまで発展させていきたいと考えている。

造血幹細胞の体外増幅のメリットは人工血液製剤への応用に限らない。本技術を利用すれば、少量の造血幹細胞から移植に利用できる十分量の造血幹細胞を得ることが可能である。これは骨髓、末梢血に次ぐ第3の移植用造血幹細胞ソースとして期待されているものの、含まれる幹細胞数の絶対量が少ないため適応が狭められている臍帯血移植にとって有用である。また、必要採取量が減少するため、骨髓移植ドナーにとってもメリットは大きい。さらに、造血幹細胞の増幅は遺伝子治療分野でも重要であり、効率の良い遺伝子導入を可能にすることが期待される。さらに、将来ヒトES細胞からの造血幹細胞誘導が可能になれば、誘導された造血幹細胞をさらに増やすことも可能である(Fig. 6.)。

今回我々の確立した幹細胞増幅システムは、将来の輸血医療・移植医療にとって重要な技術になることが期待される。

参考文献

1. Suzuki T, Yokoyama Y, Kumano K, et al. Highly efficient ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells using delta1-fc chimeric protein. *Stem Cells*. 2006;24:2456-2465.
2. Chiba S. Notch signaling in stem cell systems. *Stem Cells*. 2006;24:2437-2447.
3. Suzuki T, Chiba S. Notch signaling in hematopoietic stem cells. *Int J Hematol*. 2005;82:285-294.
4. Kumano K, Chiba S, Kunisato A, et al. Notch1 but not Notch2 is essential for generating hematopoietic stem cells from endothelial cells. *Immunity*. 2003;18:699-711.
5. Kunisato A, Chiba S, Nakagami-Yamaguchi E, et al. HES-1 preserves purified hematopoietic stem cells ex vivo and accumulates side population cells in vivo. *Blood*. 2003;101:1777-1783.
6. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425:841-846.
7. Zhang J, Niu C, Ye L, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003;425:836-841.
8. Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, et al. Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest*. 2000;105:1013-1021.
9. Ohishi K, Varnum-Finney B, Bernstein ID. Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34 (+) CD38 (-) cord blood cells. *J Clin Invest*. 2002;110:1165-1174.
10. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 2002;100:3175-3182.

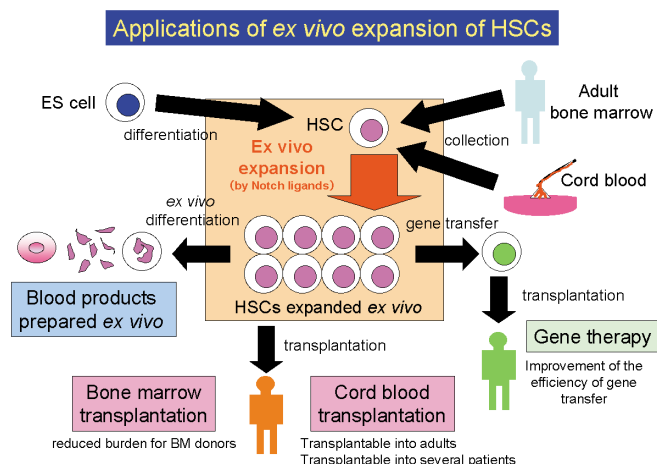


Fig. 6. Applications of ex vivo expansion of HSCs.

CD4陽性T細胞の分化とRac1

Role of Rac1 in Differentiation of CD4 T Cells

小田浩代^(1,2), 鈴木春巳⁽²⁾, 白井睦訓⁽¹⁾Hiroyo Oda^(1,2), Harumi Suzuki⁽²⁾, Mutsunori Shirai⁽¹⁾

和文抄録

血球の分化制御機構の解明は、免疫療法の確立において非常に重要である。血球の重要な成分であるT細胞は胸腺で分化、成熟し、CD4陽性T細胞はヘルパーT細胞として、CD8陽性T細胞はキラーT細胞として末梢組織で機能する。Rac1はアクチン再構成に重要な役割を果たすことで知られるRhoファミリーGTPaseに属するタンパク質であり、T細胞受容体(TCR)シグナル下流で活性化することが知られているが、胸腺内でのCD4陽性T細胞の分化における機能はまだ十分に明らかにされていない。そこでドミナントネガティブ型Rac1 (dnRac1) 分子を未熟胸腺細胞株および造血幹細胞様培養株に強制発現し、その分化における機能を解析した。その結果、Rac1は未熟胸腺細胞においてTCR依存性のアクチン再構成に必須だけでなく、bcl-2を介した生存シグナルを伝達することによりCD4陽性T細胞への分化を促進することが明らかになった。

Abstract

T cells are generated in the thymus and CD4 positive T cells act as helper T cells and CD8 positive cells act as killer T cells in the periphery. Rac1, one of the Rho family small GTPases has been shown to work as a "molecular switch" in various signal transduction pathways and also activated downstream of T cell receptor (TCR). In order to assess the function of Rac1 in the differentiation process of CD4 single positive (CD4-SP) T cells from CD4CD8 double positive (DP) cells, we utilized a DP cell line DPK, which can differentiate into CD4-SP cells upon TCR stimulation in vitro and hematopoietic stem cell like cell line. DPK expressing dnRac1 underwent massive apoptosis upon TCR stimulation and resulted in defective differentiation of CD4-SP cells. We found that TCR-dependent induction of Bcl-2 was greatly suppressed in dnRac1-expressing DPK and this suppression was independent of actin rearrangement. Furthermore, introduction of exogenous Bcl-2 inhibited TCR-dependent induction of apoptosis and restored CD4-SP generation in dnRac1-expressing DPK without restoring TCR-induced actin polymerization. Collectively, these data indicate that Rac1 is critical in differentiation of CD4-SP from the DP cells by preventing TCR-induced apoptosis via Bcl-2 upregulation.

Keywords

T lymphocytes, TCR, CD4, apoptosis, thymus

はじめに

リンパ球は免疫機能の中でも極めて重要な役割を果たしている。リンパ球をはじめ血球は造血幹細胞から分化しており (Fig. 1), その分化制御メカニズムの解明は、人工的に制御可能な血球の開発 (言わば人工血液) において必要不可欠であり、新たな再生医療技術の創出に繋がること期待されている。免疫機能不全に起因する難治性の疾病は極めて多様であり、発癌

の制圧にも免疫機能は深く関与している。リンパ球の増殖や分化などの機能を遺伝子制御により自由に制御できる技術は、これら疾病の多くを治療可能とするもので、我々は造血幹細胞の安定した培養供給技術や、遺伝子制御を施した幹細胞のin vitroでの免疫細胞への分化誘導とvivoへの移植後の生体内組織再構築による免疫機能不全の治療法の開発を検討してきた。免疫機能制御は極めて巧妙にできていて、また個々人でその制御

(1) 山口大学大学院医学系研究科ゲノム・機能分子解析学分野 〒755-8505 山口県宇部市南小串1-1-1 Department of Microbiology, Yamaguchi University School of Medicine, Minamikogushi 1-1-1, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

(2) 国立国際医療センター研究所 臨床病理研究部 Department of Pathology, International Medical Center of Japan

論文受付 2006年12月9日 論文受理 2007年3月13日

は複雑に異なっており、現在の技術では化学的に合成した物質で免疫細胞機能を代替することは不可能で、これまで患者個人の造血幹細胞を採取してex vivoで大量に増やすことが試みられてきたが成功していない。ここでは、リンパ球のなかでも、特にT細胞の分化と制御について概説したい。

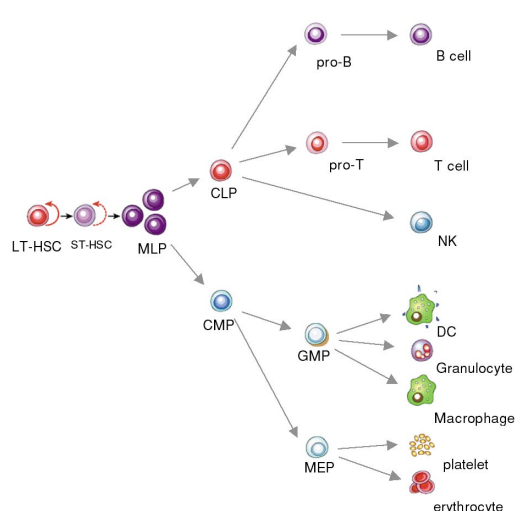


Fig. 1. Differentiation of hematopoietic cells.

T細胞は造血幹細胞から生じるT前駆細胞が胸腺に到達したのち複雑な過程を経て分化する。成熟T細胞はCD8分子を発現して細胞傷害性を有するキラーT細胞と、CD4分子を発現して他の免疫担当細胞の活性を制御するヘルパーT細胞とに大別されるが、いずれのT細胞も病原性微生物の排除や体内に生じたがん細胞の排除などの種々の反応において獲得免疫の要として機能する (Fig. 1.)。

近年T細胞の機能障害をはじめとする重篤な免疫不全を伴うWiskott-Aldrich syndromeの原因遺伝子がアクチン結合タンパク質WASPをコードすることが解明され、T細胞におけるアクチン再構成がその機能に重要な役割を果たすことが明らかになった^{1,2)}。T細胞において、アクチンはT細胞受容体刺激依存性に重合し、抗原提示細胞との相互作用や炎症局所への遊走などのさまざまな動きを制御する³⁻⁵⁾。このアクチン再構成を制御する分子群にはRhoファミリー低分子量Gタンパク質があるが、そのうちでもRacは上流および下流にさまざまな因子が存在し、多岐にわたるシグナル伝達における分子スイッチとして注目されている⁶⁻⁹⁾。

RacにはRac1, 2, 3という相同性の高いアイソフォームが存在し、Rac1は普遍的に発現するのに対してRac2およびRac3はそれぞれ造血系および神経系に局限して発現する。近年Rac2欠損マウスが作成され、このマウスにおける胸腺分化は正常であるが末梢T細胞の活性化およびTh1型ヘルパーT細胞の分化とこれに伴うIFN γ 産生が阻害されていることが示された¹⁰⁻¹²⁾。また、Rac1欠損マウスは胎生致死となるためコンディショナルノックアウトマウスやドミナントネガティブ型変異体を用い

た研究がなされており、造血幹細胞の増殖と生着、Th1細胞の分化に関与することが明らかにされたが¹³⁻¹⁶⁾、胸腺内でのT細胞分化における役割は不明な点が多い。

以下に、我々が最近解明した成果の一端として、未熟胸腺細胞株にドミナントネガティブ型Rac1 (dnRac1) 分子を強制発現したときのCD4陽性T細胞の分化における機能の解析結果¹⁷⁾を紹介するとともに、造血幹細胞様細胞株を用いたT細胞分化機構解析への応用とT細胞増強療法への応用について考察した。

Rac1のCD4陽性T細胞分化における機能

CD4陽性T細胞はその機能からヘルパーT細胞と呼ばれ、細胞性免疫を制御するTh1細胞と液性免疫を制御するTh2細胞とに大別される。最近ではTh1/Th2バランスがアレルギー発症や腫瘍排除などのさまざまな病態に関与することが注目を浴びており¹⁸⁻²⁰⁾、CD4陽性T細胞の分化機構の解明は免疫療法をはじめとする医療への応用に大きく貢献するものと考えられる。

CD4陽性T細胞は、胸腺内でCD4CD8ダブルポジティブ (DP) T細胞のT細胞受容体 (TCR) がMHCクラスII分子と自己ペプチドに弱く結合することにより分化する (正の選択) が、同時に胸腺内では自己ペプチドに強く反応してそれ以上分化することなくアポトーシスに陥るDP細胞も存在する (負の選択)^{21,22)}。TCRというひとつの受容体から正と負の2種類のシグナル、すなわち生存シグナルとアポトーシスシグナルを伝達する分子機構は複雑で、今日までに多くの知見が蓄積しているが未だ明確な伝達経路は明らかになっていない。Rac1はTCR下流で活性化することが知られているGタンパク質であり、B細胞をはじめとする様々な細胞において生存シグナルの伝達に関与することが知られている²³⁻²⁵⁾。

われわれはCD4陽性T細胞の分化におけるRac1の機能を解析する目的で、ダブルポジティブ胸腺細胞株DPKにレトロウイルスベクターを用いてdnRac1遺伝子を導入してその機能を検討した。DPKはANDトランスジェニックマウスに自然発生した胸腺細胞腫由来の細胞株で、in vitroでの抗原刺激によってCD4陽性T細胞へと分化するためCD4陽性T細胞の分化機構の解析に有用なモデルシステムとして活用できる²⁶⁾。dnRac1導入DPK (dnRac1-DPK) およびコントロールベクター導入DPK (Cont-DPK) を抗原刺激して3日間培養したところ、Cont-DPKはその約8割がCD4陽性T細胞へと分化したのに対してdnRac1-DPKのCD4陽性T細胞への分化は著しく阻害されることが明らかになった (Fig. 2.a)。さらにこの時、dnRac1-DPKでは抗原刺激依存性にアポトーシスが亢進していることが明らかになった (Fig. 2.b)。そこでdnRac1-DPKにおいて、抗原刺激に伴い伝達されるアポトーシスシグナル分子及び生存シグナル分子の発現の変化を検索した結果、抗アポトーシス分子bcl-2の誘導が著しく減弱していることが明らかになった (Fig. 3.)。以上の結果からTCRシグナル伝達において、Rac1がbcl-2分子の上流に存在することが推測される。これを検証する目的で、dnRac1導入DPKにさらにbcl-2遺伝子を強制発現させたところ

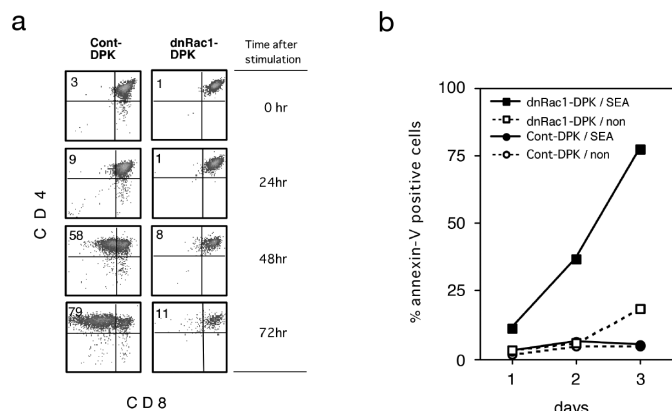


Fig. 2. TCR induced generation of CD4 single positive cells is inhibited by dnRac1.

a) Vector only (cont-DPK) and pMXs-PREP-dnRac1 transduced DPK cells were co-cultured with DC-I (antigen presenting cell) and 100ng/ml SEA (Staphylococcus aureus enterotoxin A). After the indicated culture periods, cells were harvested and expression levels of CD4 and CD8 were analyzed by flow cytometry.

b) Vector control or dnRac1 transduced DPK cells at indicated culture periods were stained with Annexin V and the proportion of Annexin V stained cells in each group was plotted.

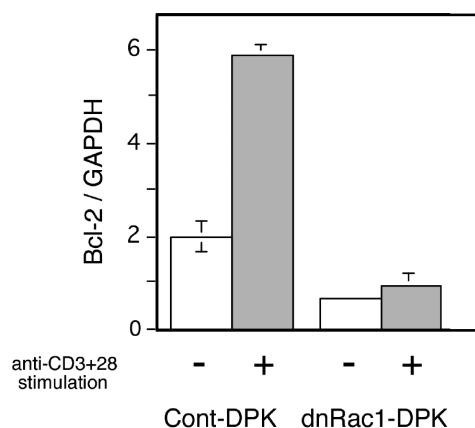


Fig. 3. Effect of dnRac1 on the expression of anti-apoptotic gene.

Changes in expression of Bcl-2 was determined by quantitative real-time RT-PCR in DPK cells activated with plate-bound anti-CD3 and CD28 antibodies for 16 hrs. Results are presented as a ratio of expression of Bcl-2 and the control housekeeping gene GAPDH.

(dnRac1-DPK Bcl-2), in vitroでの抗原刺激に伴うCD4陽性T細胞への分化はコントロールと同程度までに回復した (Fig. 4). これより, Rac1はDP細胞のCD4陽性T細胞への分化において, 抗原刺激依存性にbcl-2の発現を誘導することによって生存シグナルを伝達することが明らかになった. また, dnRac1-DPKにおいてTCR刺激依存性のアクチン再構成の阻害が認められたが, これはbcl-2の強制発現によっては回復しなかった (Fig. 5.) ことから, Rac1下流では細胞骨格へのシグナルと生存シグナルが独立して伝達されると推定される.

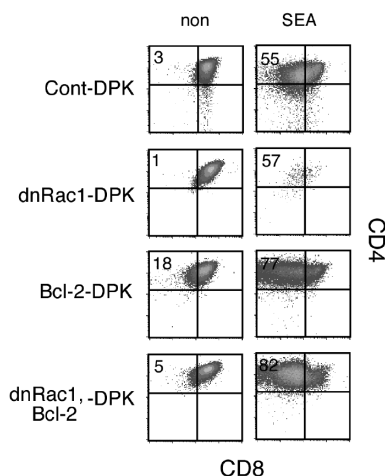


Fig. 4. Overexpression of bcl-2 rescues CD4 single positive cells generation.

Vector only (cont-DPK) and dnRac1, Bcl2 or both dnRac1+ Bcl2 transduced DPK cells were co-cultured with DC-I and 100ng/ml SEA. After the indicated culture periods, cells were harvested and expression levels of CD4 and CD8 were analyzed by flow cytometry.

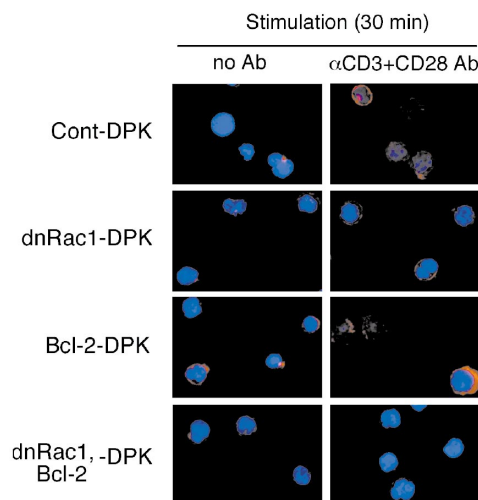


Fig. 5. Rac1 is critical in TCR-induced actin polymerization.

Vector control or dnRac1-transduced DPK cells were cultured on anti-CD3 and CD28 mAb coated coverslips for 30 min and then fixed, permeabilized, and stained with Alexa594 conjugated phalloidin (red) to detect polymerized actin fibers and DAPI (blue) to visualize nucleus.

造血幹細胞様細胞株の利用とT細胞増強療法への応用

Pax5ノックアウトプロB細胞 (Pax5PB) は1999年にオーストリアのBusslingerらによって, プロB細胞でありながらB細胞以外の種々の血球系細胞へと分化することのできる造血幹細胞様の性質を持つ培養細胞として報告された²⁷⁾. この細胞はRAG2ノックアウトマウスに移入後3週間で胸腺を再構築することが可能であり (Fig. 6.), in vitroでレトロウイルスベクターによる遺伝子導入を行えば遺伝子改変マウスを作成するよりも早く簡便に多数の遺伝子の機能を検索することが出来る. われわれ

はDPK細胞を用いたin vitroの分化系において明らかになったCD4陽性T細胞の分化におけるRac1の機能をin vivoで確認する目的で、Pax5PBにレトロウイルスベクターを用いてdnRac1遺伝子を導入して再構築実験を行った。その結果、in vitroで得られた結果と同様に、胸腺においてDP細胞からCD4陽性T細胞への分化が著しく阻害されていることが明らかとなり、in vivoにおいてもRac1が生存シグナルの伝達に寄与していることが示唆された（未報告成績）。

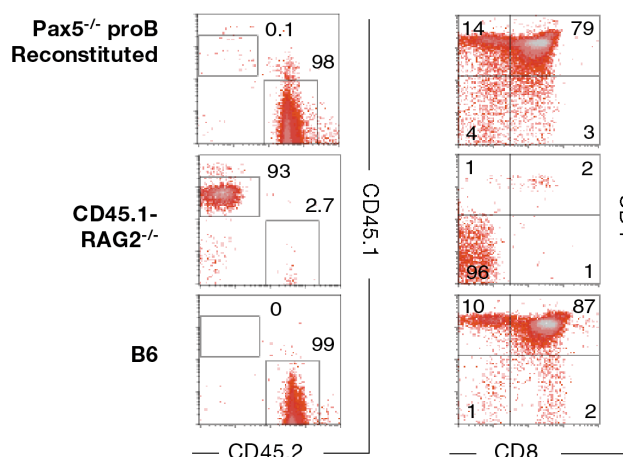


Fig. 6. Thymus was successfully reconstituted from Pax5⁺ proB cells. Pax5 PB cells that express CD45.2 were injected into sublethally irradiated RAG2^{-/-}CD45.1 mice. After 3 weeks, reconstituted thymocytes were analyzed with flow cytometry for the expression of CD45.1 and CD45.2 (left), or CD8 and CD4 (right).

われわれは現在、独自に作成した免疫担当細胞由来cDNAライブラリー中の遺伝子などをDPK細胞に導入し、T細胞の分化を促進する遺伝子の探索を行っている。また、この一次スクリーニングで得られたT細胞分化に関与する遺伝子群をPax5PBへ導入し、in vivoでの作用を解析している。いっぽうPax5PBが造血幹細胞様の性質をもつことを利用して、造血、再生に関与する多数の遺伝子の中からT前駆細胞の増幅に関与する遺伝子の検索を行うと同時に、Pax5PBの培養液中に種々の液性因子を添加することによりT前駆細胞をin vitroで維持する能力をもつ因子やT前駆細胞をin vitroで増幅することのできる因子の検索を行っており、このうちいくつかの因子についてはマウス造血幹細胞への応用も開始している。さらにこの実験によって得られた種々の遺伝子あるいは因子を用い、免疫不全状態やがん状態のヒトから採取した造血幹細胞を処置することによってin vitroでのT前駆細胞の増幅が可能になれば、GVHD（移植片対宿主病）を誘発することなくT細胞を増強することができると考えられる。

今後の課題

現在、免疫不全症の改善、癌の免疫学的排除をはじめとする様々な局面で安全かつ有効なT細胞増強法の確立が待ち望まれ

ている。モデルシステムを用いた網羅的スクリーニングによって、患者自身の造血系細胞を用いたオーダーメイド医療への展開が期待される。

謝辞

本研究は、厚労省科学研究費補助金（H16-医薬-031）の支援により行われた。記して謝意を表する。

文献

1. Derry JM, Ochs HD, Francke U. Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*. 1994; 78: 635-44.
2. Zhang, J., Shi, F., Badour, K., Deng, Y., McGavin, M. K., Siminovitch, K. A. WASp verprolin homology, cofilin homology, and acidic region domain-mediated actin polymerization is required for T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99: 2240-45.
3. Sasahara Y, Rachid R, Byrne MJ, de la Fuente MA, Abraham RT, Ramesh N, Geha RS. Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Mol Cell*. 2002; 10: 1269-81.
4. Barda-Saad M, Braiman A, Titerence R, Bunnell SC, Barr VA, Samelson LE. Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton. *Nat Immunol*. 2005; 6: 80-9.
5. Vicente-Manzanares M, Rey M, Perez-Martinez M, Yanez-Mo M, Sancho D, Cabrero JR, Barreiro O, de la Fuente H, Itoh K, Sanchez-Madrid F. The RhoA effector mDia is induced during T cell activation and regulates actin polymerization and cell migration in T lymphocytes. *J Immunol*. 2003; 171: 1023-34.
6. Tapon, N., Hall, A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol*. 1997; 9: 86-92.
7. Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell*. 2004; 116: 167-79. Review.
8. Arrieumerlou C, Randriamampita C, Bismuth G, Trautmann A. Rac is involved in early TCR signaling. *J Immunol*. 2000; 165: 3182-9.
9. Cantrell DA. GTPases and T cell activation. *Immunol Rev*. 2003; 192: 122-30. Review.
10. Li, B., Yu, H., Zheng, W., Voll, R., Na, S., Roberts, A. W., Williams, D. A., Davis, R. J., Ghosh, S., Flavell, R. A. Role of the guanosine triphosphatase Rac2 in T helper 1 cell differentiation. *Science* 2000; 288: 2219-22.
11. Croker, B. A., Handman, E., Hayball, J. D., Baldwin, T. M., Voigt, V., Cluse, L. A., Yang, F. C., Williams, D. A., Roberts, A. W. Rac2-deficient mice display perturbed T-cell

- distribution and chemotaxis, but only minor abnormalities in T (H) 1 responses. *Immunol. Cell Biol.* 2002; 80: 231-40.
12. Yu, H., Leitenberg, D., Li, B., Flavell, R. A. Deficiency of small GTPase Rac2 affects T cell activation. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 915-26.
 13. Gomez, M., Tybulewicz, V., Cantrell, D. A. Control of pre-T cell proliferation and differentiation by the GTPase Rac-1. *Nat. Immunol.* 2000; 1: 348-52.
 14. Gomez, M., Kioussis, D., Cantrell, D. A. The GTPase Rac-1 controls cell fate in the thymus by diverting thymocytes from positive to negative selection. *Immunity* 2001; 15: 703-13.
 15. Glogauer, M., Marchal, C. C., Zhu, F., Worku, A., Clausen, B. E., Foerster, I., Marks, P., Downey, G. P., Dinanuer, M., Kwiatkowski, D. J. Rac1 deletion in mouse neutrophils has selective effects on neutrophil functions. *J. Immunol.* 2003; 170: 5652-57.
 16. Gu, Y., Filippi, M. D., Cancelas, J. A., Siefiring, J. E., Williams, E. P., Jasti, A. C., Harris, C. E., Lee, A. W., Prabhakar, R., Atkinson, S. J., Kwiatkowski, D. J., Williams, D. A. Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science* 2003; 302: 445-9.
 17. Oda H, Suzuki H, Sakai K, Kitahara S, Patrick MS, Azuma Y, Sugi K, Kitamura T, Kaye J, Shirai M. Rac1-mediated Bcl-2 induction is critical in antigen-induced CD4 single-positive differentiation of a CD4+CD8+ immature thymocyte line. *J Leukoc Biol.* in press
 18. Prioult G, Nagler-Anderson C. Mucosal immunity and allergic responses: lack of regulation and/or lack of microbial stimulation? *Immunol Rev.* 2005; 206: 204-18. Review.
 19. Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med.* 2002; 8: 567-73. Review.
 20. Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2005; 54: 721-8. Review.
 21. Aliahmad P, Kaye J. Commitment issues: linking positive selection signals and lineage diversification in the thymus. *Immunol Rev.* 2006; 209: 253-73. Review.
 22. Palmer E. Negative selection clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3: 383-91. Review.
 23. Zhang B, Zhang Y, Shacter E. Rac1 inhibits apoptosis in human lymphoma cells by stimulating Bad phosphorylation on Ser-75. *Mol Cell Biol.* 2004; 24: 6205-14.
 24. Jiang K, Zhong B, Ritchey C, Gilvary DL, Hong-Geller E, Wei S, Djeu JY. Regulation of Akt-dependent cell survival by Syk and Rac. *Blood.* 2003; 101: 236-44.
 25. Walmsley MJ, Ooi SK, Reynolds LF, Smith SH, Ruf S, Mathiot A, Vanes L, Williams DA, Cancro MP, Tybulewicz VL. Critical roles for Rac1 and Rac2 GTPases in B cell development and signaling. *Science.* 2003; 302: 459-62.
 26. Kaye J, Ellenberger DL. Differentiation of an immature T cell line: a model of thymic positive selection. *Cell.* 1992; 71: 423-35.
 27. Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature.* 1999; 401: 556-62.

組織接着剤開発の現状

Development of Tissue Adhesives

田口哲志, 内田義之, 立石哲也

Tetsushi Taguchi, Yoshiyuki Uchida, Tetsuya Tateishi

和文抄録

組織接着剤は、手術時間を短縮し、患者への負担を軽減する目的のために合成高分子系、生体高分子系、合成／生体高分子複合系の3種類が開発され、臨床で使用されている。しかしながら、現在使用されている組織接着剤は、生体親和性、接着強度等を十分に満たすものではない。そのため、様々な組織接着剤に関する研究が行なわれている。本稿では、現在臨床応用あるいは研究中の組織接着剤と問題点に触れ、我々の行っている組織接着剤についても紹介する。

Abstract

In order to bond tissue-tissue interface, synthetic, semi-synthetic and naturally-derived tissue adhesives have been developed and applied in clinical field. However, these adhesives have several disadvantages on biocompatibility and bonding strength. Possibility of some virus infections of naturally-derived tissue adhesives has been also pointed out for use in this kind of tissue adhesive. Therefore, some researchers have tried to develop tissue adhesives by using various crosslinking reagents in order to bond tissues with both high bonding strength and biocompatibility. In this review, researches on tissue adhesives including our work are introduced.

Keywords

Keywords: tissue adhesive, glue, cyanoacrylate, fibrin, gelatin, citric acid, organic acid

1. はじめに

外科手術では、一般に創傷部を接合するために縫合糸が用いられているが、患部をより簡便・迅速に閉鎖するために接着剤を使用することが考案され、数種類が臨床現場において使用されている。組織接着剤は、外科手術における縫合時の補助的な利用のみならず、シーラント、止血剤、塞栓剤など、その用途は極めて広範囲に及ぶ。これらの用途により要求される特性は若干異なるが、組織接着剤は通常生体内で使用されるため、組織に対する接着性に加え、生体適合性が高く、操作が容易であることなどが必要となる。特に軟部組織用接着剤においては、体液や血液の存在下で用いられるなど、他の用途と比較して厳しい条件下で使用される。そのため、生体組織をより強固に接合し治癒の遅延を惹起しないために、生体組織と馴染み易い流動性のある液体であり、硬化後は適度な弾性を有しており、損傷部位の治癒に伴って速やかに分解・吸収されることも要求される。表1に組織接着剤に要求される特性をまとめた。既に臨床応用されている組織接着剤には、合成材料を素材としている

ものにシアノアクリレート系接着剤、天然由来材料を素材としているものにはフィブリン系接着剤、天然由来材料と合成素材を使用したものに生体高分子-アルデヒド系接着剤が挙げられる。しかしながら、これらの組織接着剤には先述した要求される特性を十分に満たしているとは言えず、新規な組織接着剤の開発が望まれている。本稿では、組織接着剤開発の現状と筆者らが現在行っている研究について紹介する。

表1. 組織接着剤に求められる性質

生体吸収性	生体に吸収され、分解生成物が無害であること
滅菌	消毒・滅菌が可能であること
十分な接着強度	血液の存在下でも生体組織と十分に接着すること
温和な反応性	体温前後で接着し、組織を損傷するような反応熱を出さないこと
迅速な接着速度	数秒・数分以内に接着すること
ハンドリング	簡便な操作で使用できること
細胞進入性	細胞が進入するための足場となること

2. 臨床で使用されている組織接着剤

2. 1 シアノアクリレート系接着剤

シアノアクリレート系接着剤は、水のような弱塩基存在におけるアニオン重合により瞬時に硬化する特性を有する(Fig. 1.)。そのため、外科手術における縫合の代替として応用しようとする試みが積極的に行われている。シアノアクリレート系接着剤に関する研究の起源は1950年代にまでさかのぼり、これまで数多くのシアノアクリレート誘導体が合成されてきたが、現在は、*n*-ブチル-2-シアノアクリレートおよび2-オクチル-シアノアクリレートが臨床応用されている¹⁾。本接着剤は、接着速度が速く、接着強度が強い特長を有するが、硬化物が極めて硬いため軟部組織には馴染みにくく、ポリマーの加水分解物として生成するホルムアルデヒドの毒性により炎症反応が惹起される。そのため、シアノアクリレート系接着剤は、皮膚用などの用途に限定されている。

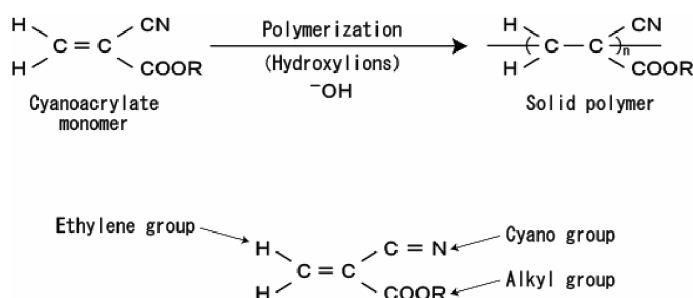


Fig. 1. Polymerization of cyanoacrylate-based monomers.

2. 2 フィブリン系接着剤

フィブリン系接着剤による接着剤の基本コンセプトは、1972年になって条件が確立されている²⁾。フィブリン系接着剤は、Fig. 2のようなフィブリノーゲンのトロンビンによる重合反応を利用した接着剤であり、現在日本で用いられている接着剤、シーラントの8割を占める。現在、2液性やシート状など、さ

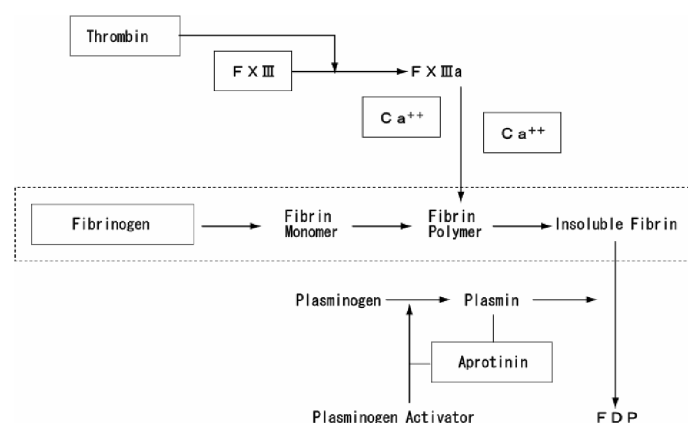


Fig. 2. Coagulation process of thrombin and fibrinogen.

まざまな製品がヨーロッパ、日本、カナダ、アメリカ合衆国などで使用されている。フィブリン系接着剤には、HIV ウイルス等の混入の危険性があるが、より安全性を高める為、患者自身の血液を使用したり、安全性が確認されたドナーのみからの血液を採取したりするなどの方法が取られている。フィブリン系接着剤は、接着強度が弱い為、接着剤としてではなく主にシーラントとして使用されている。

2. 3 生体高分子-アルデヒド系接着剤

代表的な例としてゼラチン-レゾルシン-グルタルアルデヒド (GRF) グルーがある。この接着剤はメチルシアノアクリレート系接着剤よりも毒性が低いものとして、1960年代に開発された。この接着剤は、ゼラチンとレゾルシンの混合溶液にホルムアルデヒドを添加することによって硬化・接着する。GRF グルーは、高い接着強度を示すが、ホルムアルデヒドによる毒性が指摘され、適用範囲が狭まっている。そのため、ホルムアルデヒドに代わり、グルタルアルデヒド (Fig. 3.) やグリオキサールなどの他の架橋剤が検討されている^{3,4)}。

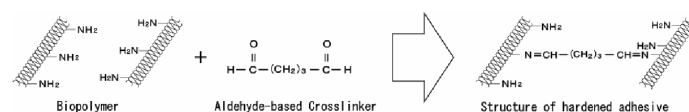


Fig. 3. Crosslinking of biopolymers with aldehyde-based crosslinkers.

3. 研究中の組織接着剤

現在研究中の組織接着剤/シーラントは、接着剤用架橋剤に関する研究と自然界の架橋反応・接着機構を用いた接着剤の研究に分けることができる。

3. 1 接着剤用架橋剤に関する研究

Fig. 4.には、接着剤 (あるいはシーラント) に用いられている架橋剤あるいは縮合剤の構造を示した。まず、新規架橋剤を用いた接着剤には、以下のような研究が挙げられる。接着剤に用いる架橋剤として側鎖のカルボン酸をN-ヒドロキシスクシンイミドで活性エステル化したポリ-L-グルタミン酸誘導体が合成されている⁵⁾。この架橋剤は、ゼラチンとの2成分系接着剤として使用されている。活性エステルは、ゼラチン中のアミノ基と生理的環境下で反応し、アミド結合を形成する。この反応を組織間で行うことによりポリ-L-グルタミン酸誘導体中の活性エステルは、接着剤中のゼラチンと反応するだけでなく生体内の細胞外マトリックス成分とも反応するという仕組みである。調製された接着剤は、「フィブリン系」接着剤と比較して接着性が優位に高いことが示されている。その他、活性エステル体の出発物質として研究されているものには、生体内に存在するジ/トリカルボン酸や末端にカルボキシル基を持つポリエチレングリコール^{6,7)}などが用いられ、これらの架橋剤とアルブミン (球状タンパク質) やコラーゲン (棒状タンパク質) などの生体高分子から構成される接着剤 (あるいはシーラント) も

「フィブリン系」と比較して高い性能を示すことが明らかにされている。これらの活性エステル体とアミノ基との反応は、水との競争反応となるため、加水分解された架橋剤が接着剤中に残存することが考えられる。そのため、接着剤中に残存しても生体に対して毒性を示さない出発物質を選択する必要がある。また、水溶性カルボジイミド（縮合剤）、コラーゲンおよびポリグルタミン酸の3成分を用いた接着剤についても報告されている⁸⁾。また、最近、デキストランを過ヨウ素酸ナトリウムで処理することによりアルデヒド基を導入し、この誘導体とポリ-L-リジンの2成分から構成される自己分解性接着剤についても報告されている⁹⁾。

一方、高分子ミセルを一成分とする接着剤が検討されている¹⁰⁾。この接着剤は、ポリエチレングリコールとポリ乳酸からなるAB型のブロックコポリマーの末端にアルデヒド基を持つミセルを第1成分とし、ポリアリルアミンあるいはポリリジンを第2成分とするものである。この接着剤は、1秒程度でゲル化し「フィブリン系」と同程度の接着力を示すことが示されている。分子量、分子構造等の最適化を進めることにより更なる性能向上が期待される。

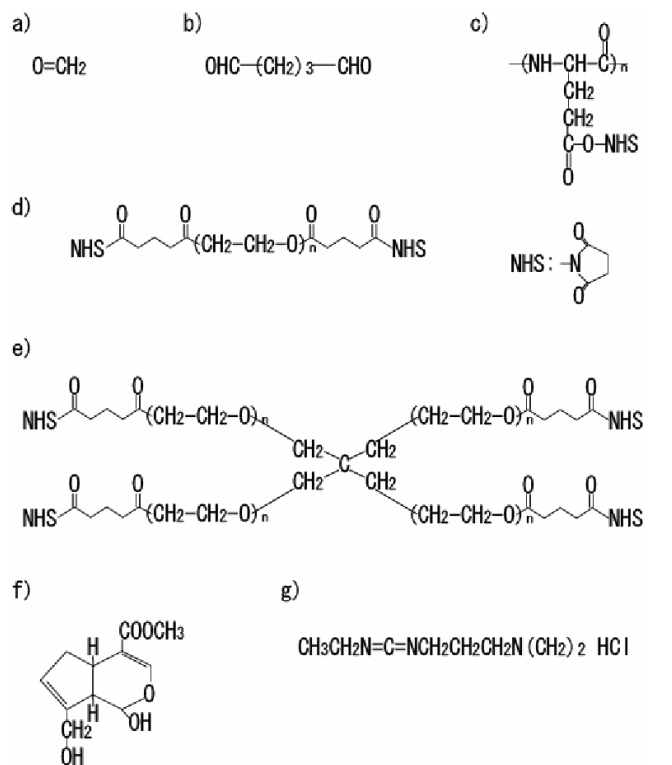


Fig. 4. Structures of crosslinkers used for tissue adhesives:

a) formaldehyde, b) glutaraldehyde, c) poly (L-glutamic acid), d) poly (ethylene glycol) disuccinimidyl disuccinate, e) pentaerythritol poly (ethylene glycol) ether tetrasuccinimidyl glutarate, f) genipin, g) 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride.

3. 2 自然界の架橋反応・接着機構を利用した接着剤の研究 (バイオ接着剤)

一方、植物由来の分子を架橋剤として用いる研究も近年報告されている¹¹⁾。ゲニピンは、アカネ科のクちなシに含まれるイリドイド配糖体で、タンパク質中のリジン残基と反応して架橋形成することが知られている (Fig. 5)。このゲニピンは、細胞毒性がグルタルアルデヒドの1/10000で「生体高分子-アルデヒド系」接着剤の約50%の接着強度を持つことが示されている。

近年、架橋剤を使用しない接着剤の研究が報告されている¹²⁾。ムール貝から抽出した接着性タンパク質は、3価の鉄イオンが作用することにより、接着性を示す¹³⁾。接着強度は、「フィブリン系」接着剤と同等であるが、新しいタイプの接着剤として期待される。

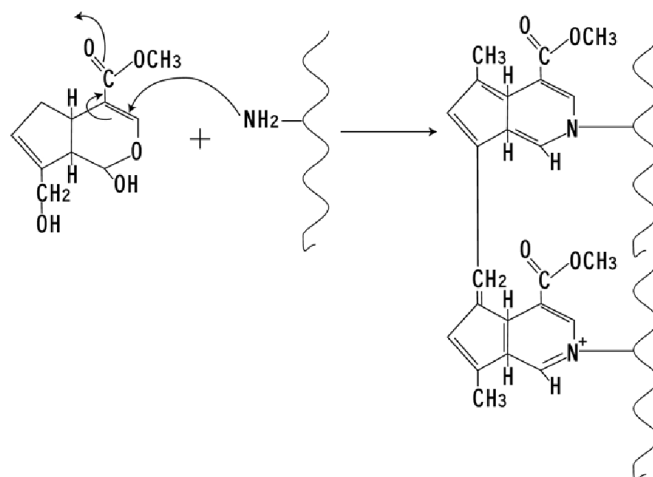


Fig. 5. Crosslinking reaction between genipin and biopolymers.

4. 有機酸誘導体-生体高分子から構成される組織接着剤

4. 1 有機酸を出発物質とする架橋剤

前項で述べたように「生体高分子-アルデヒド系」接着剤は、接着剤強度は強いものの接着剤中に残存するアルデヒド系架橋剤（ホルムアルデヒド・グルタルアルデヒド）が高い毒性を示し、治癒を阻害する。すなわち、アルデヒド系架橋剤に代わる毒性の低い架橋剤を用いることができれば、生体親和性の高い接着剤を合成することが可能になると考えられる。そこで、筆者らは生体内の代謝系回路であるクエン酸回路に着目した。クエン酸回路には、架橋剤の出発物質となりうるジ/トリカルボン酸が複数存在する。これらの分子を架橋剤の出発物質として捉え、カルボン酸をN-ヒドロキシスクシンイミドで修飾することにより活性エステルを導入した架橋剤を合成した。有機酸に導入した活性エステルは、アミノ基と反応することによりアミド結合を形成する。例えば、クエン酸を用いた場合、3個の活性エステルが導入されるため、最大3点で架橋すると考えられる。(Fig. 6) ここでは、クエン酸から合成した架橋剤 (CAD) を用いて得られた結果を紹介する。

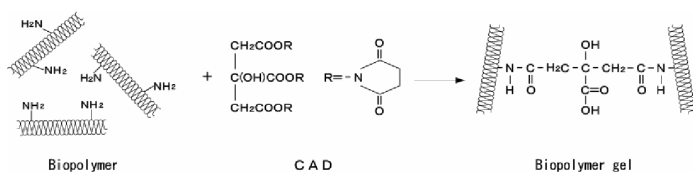


Fig. 6. Crosslinking reaction between citric acid derivative and biopolymers.

4. 2 クエン酸誘導体により得られるゲルの性質¹⁴⁾

Fig. 7.には、CAD によって調製したゼラチンゲルの膨潤度をCAD 濃度に対してプロットした結果を示す。ゼラチンゲルの膨潤度は、CAD 濃度が100mM まで架橋剤濃度依存的に減少し、その後増加した。このことは、ゼラチンゲルの架橋密度は、CAD 濃度が100mM までは高くなり、それ以降では低くなることを示している。ゼラチンゲル中に含まれるアミノ基の残存量は、CAD 濃度依存的に減少していることから、Fig. 8.のような架橋が形成されていると考えられる。すなわち、CAD が100mM までは、グルタルアルデヒドなどの一般的な架橋剤と同様に架橋剤濃度依存的に減少するが、それ以上の濃度になると余剰のカルボン酸がゼラチン分子内に形成され、この電荷反発により架橋密度が低くなると考えられる。この傾向は、ゼラチンの代わりにコラーゲンを用いることによって得られるゲルも同様な挙動を示すことが確認されている。¹⁵⁾

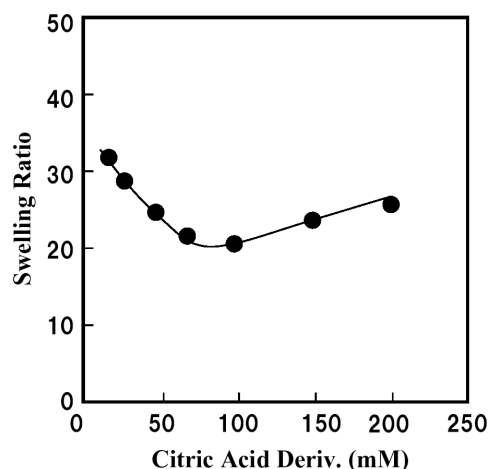


Fig. 7. Crosslinking reaction between citric acid derivative and biopolymers.

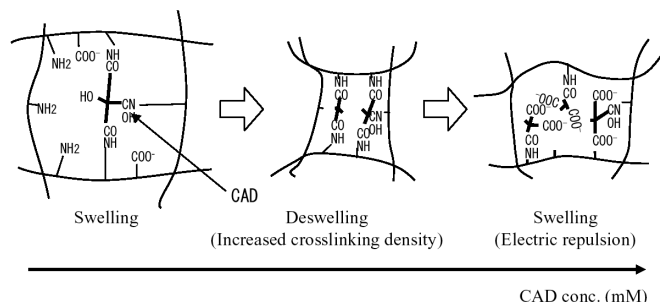


Fig. 8. Swelling and deswelling mechanism of gelatin gels crosslinked with citric acid.

4. 3 クエン酸誘導体を用いた組織接着剤の接着強度¹⁶⁾

CAD によりゲルが得られることが明らかになったことから、CAD を接着剤の硬化成分とし、コラーゲン (Col) を接着成分とする接着剤について検討した。Fig. 9.には、ブタ軟部組織 (筋肉) に接着剤を塗布した後、接着強度を測定した結果を示す。接着強度は、CAD 濃度の増加に伴い増加し、Col濃度を増加させるとさらに増加した。Col 濃度50%, CAD 濃度が100mM では、元の組織の引き裂き強度にほぼ匹敵する高い接着強度を持つことが明らかとなった。この接着剤による高い接着強度の実現は、Fig. 10.のメカニズムによるものと考えられる。すなわち、接着剤を塗布すると、CAD は接着剤中のコラーゲンと反応するだけでなく、接着剤がブタ軟部組織中に浸透し、接着剤中のコラーゲンと軟部組織の細胞外マトリックス成分 (コラーゲン、フィブロネクチン等) がCAD によって橋かけ状態になるため、強固に接着すると考えられる。CAD 及びCol濃度の増加に伴う接着強度の増加は、接着剤中の架橋密度の増加に起因するものと考えられる。この接着剤は、肝臓、軟骨、小腸など様々な臓器に接着することを確認しており、現在用途に応じた条件の最適化を行っている。

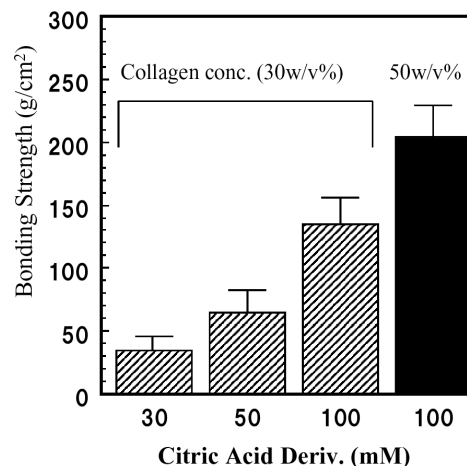


Fig. 9. Dependency of bonding strength on CAD and collagen concentration. Error bars represents standard deviations; n=5.

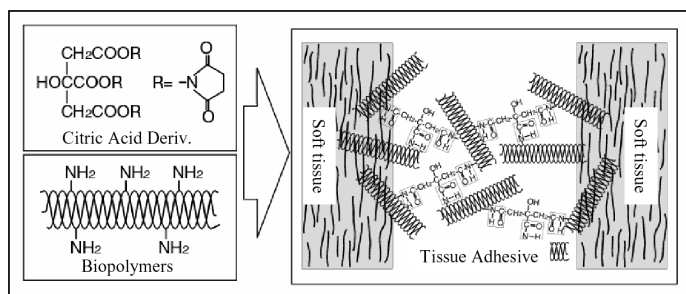


Fig. 10. Proposed bonding mechanism of tissue adhesive to soft tissues.

4. 4 クエン酸誘導体を用いた組織接着剤の生体親和性評価

クエン酸誘導体の細胞に対する毒性を調べるため、マウスの

繊維芽細胞（L929）を用いた細胞培養試験を行った。100ppmという高濃度の硬化成分を添加した場合、アルデヒド系接着剤の硬化成分（ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド）では、細胞が死滅した。一方、CADでは75%の高い生存率を示し、細胞に対する毒性が非常に低いことが明らかとなった。Fig. 11.には、マウス背部皮下に接着剤をインジェクションした後の様子を示している。比較としてフィブリン系、アルデヒド系も同様の実験を行った。フィブリン系は炎症反応もほとんどなく接着剤は分解・吸収している様子が観察された。アルデヒド系をインジェクションすると炎症が徐々に拡大し、組織切片の観察から強い炎症反応が起こっていることが明らかとなった。一方、本接着剤の場合には、強い炎症反応は観察されず、徐々に分解・吸収されている様子が観察された。以上のことから、クエン酸誘導体を用いた組織接着剤は、高い生体親和性を持つことが明らかとなった。

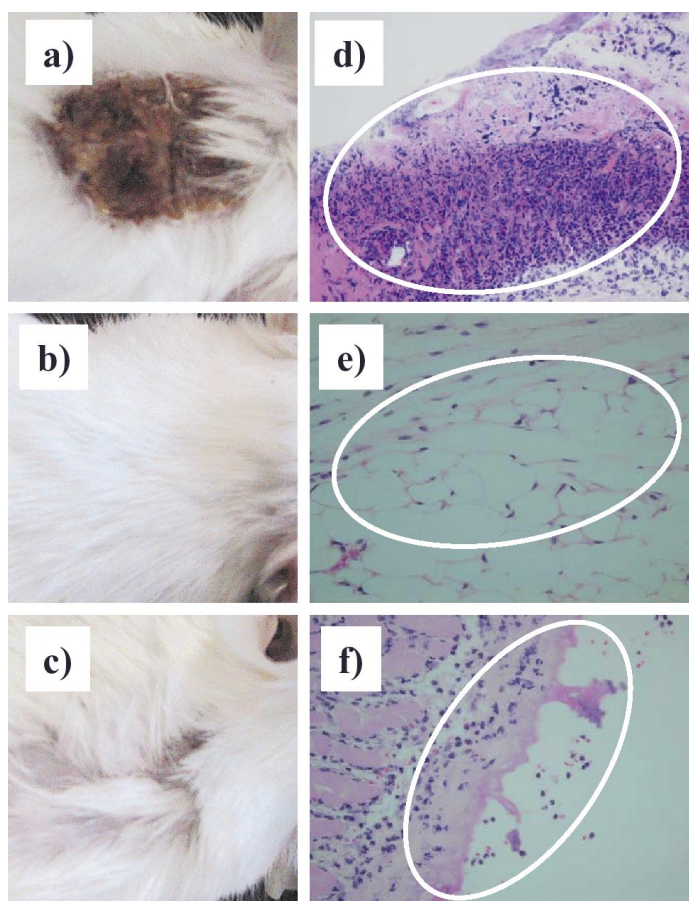


Fig. 11. 11 Implantation of adhesives at the back of mice after 7 days. (a), d) aldehyde-based; b), e) fibrin-based; c), f) developed adhesive (collagen and CAD concentration was 50% and 100 mM, respectively.)

4. 5 クエン酸誘導体を用いた組織接着剤のin vivo における有効性評価¹⁷⁾

マウス皮膚に対する接着剤としての効果を調べるため、切開

した背部に接着剤を塗布し有効性評価の検証を行った。Fig. 12.には、接着剤を塗布して7日後の組織閉鎖の様子を示している。コントロール（接着剤なし）およびフィブリン系は、十分に組織が閉鎖されていない様子が観察された。アルデヒド系では、塗布直後には創部の十分な閉鎖が認められたが、時間がたつにつれ炎症が強くなり、7日目には切開部の判別ができないうほどであった。一方、本接着剤（CAD-アルブミンの組み合わせ）を塗布した場合においては、良好な創部の修復が認められた。この結果から、in vivo においても本接着剤が有効に接着性および生体親和性を示すことが明らかとなった。

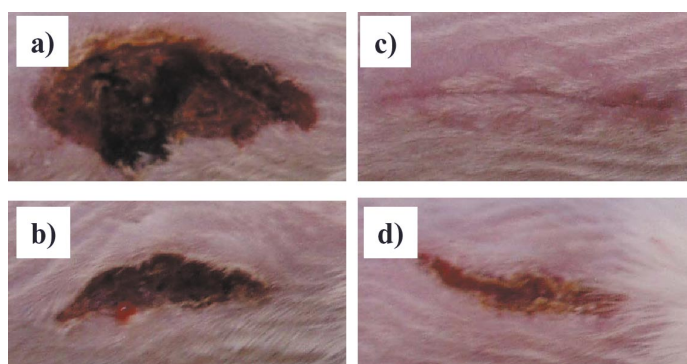


Fig. 12. Macroscopic observation after application of glues 7 days post application. (a) aldehyde-based; b) fibrin-based; c) developed adhesive (collagen and CAD concentration was 50% and 100 mM, respectively); d) control

5. まとめと今後の課題

接着剤は、外科領域と歯科領域で用いられている。外科用と歯科用では、その開発状況が大きく異なるため、本稿では、外科領域についてのみ記載した。現在進められている接着剤の研究は、合成高分子系、生体高分子系、複合系の3種に大きく分けることができるが、生体高分子系では、ウイルス感染や不純物の混入などの問題点は未だ解決されていないのが現状である。また、合成高分子系、複合系の接着剤は、研究開発の過程で接着剤の硬化・分解に関与する低分子の代謝・排泄の過程を追跡することも必要である。さらに、外科医が実際に臨床で使用する場合を想定し、2成分を均一に混合するためのデバイス開発も同時に進めていく必要があると考えられる。

6. 謝辞

本研究の一部は、NEDO 平成16年度産業技術研究助成事業により行われた。

7. 文献

1. Quinn JV "Tissue Adhesives in Clinical Medicine Second Edition", BC Decker Inc., p.27 (2005).
2. Smith DC "Biomaterials Science", B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons, eds., Elsevier Academic Press, California, p.577 (2004).

3. Ennker J, Ennker IC, Schoon D *et al.* The impact of gelatin-resorcinol glue on aortic tissue-A histomorphologic evaluation. *J Vasc Surg* 1994;20:34-43.
4. Ennker J, Ennker IC, Schoon D *et al.* Formaldehyde-free collagen glue in experimental lung gluing. *Ann Thorac Surg* 1994;57:1622-7.
5. Iwata H, Matsuda S, Mitsuhashi K *et al.* A novel surgical glue composed of gelatin and N-hydroxysuccinimide activated poly (L-glutamic acid): Part 1. Synthesis of activated poly (L-glutamic acid) and its gelation with gelatin. *Biomaterials* 1998;19:1869-76.
6. Kobayashi H, Sekine T, Nakamura T *et al.* In vivo evaluation of a new sealant material on a rat lung air leak model. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 2001;58:658-65.
7. Wallace DG, Cruise GM, Rhee WM *et al.* A tissue sealant based on reactive multifunctional polyethylene glycol. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 2001;58:245-55.
8. Sekine T, Nakamura T, Shimizu Y *et al.* A new type of surgical adhesive made from porcine collagen and polyglutamic acid. *J Biomed Mater Res* 2001;54:305-10.
9. Nakajima N, Sugai H, Tsutsumi S *et al.* Self-degradable Adhesive, *Polym Prepr Jpn.* 2006;55:1998-1998.
10. 横山昌幸, 岡野光夫, 西田博他, 高分子ミセルを一成分とする外科用接着剤, 第25 回日本バイオマテリアル学会大会 予稿集2003;25:212-212.
11. Sung HW, Huang DM, Chang WH *et al.* Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: In vitro study. *J Biomed Mater Res* 1999;46:520-30.
12. 山本浩之, 大川浩作, バイオ接着剤, 接着とはく離のための高分子—開発と応用—, シーエムシー出版, 監修松本章一, 2006;122-136.
13. Monahan J and Wilker JJ. Specificity of metal ion cross-linking in marine mussel adhesives. *Chem Commun* 2003;14:1672-3.
14. Saito H, Taguchi T, Kobayashi H *et al.* Physicochemical properties of gelatin gels prepared using citric acid derivative. *Mater Sci Eng C* 2004;24:781-5.
15. Saito H, Taguchi T, Aoki H *et al.* pH-responsive swelling behavior of collagen gels prepared by novel crosslinkers based on naturally-derived di- or tri-carboxylic acids. *Acta Biomater*, in press.
16. Taguchi T, Saito H, Uchida Y *et al.* Bonding of soft tissues using a novel tissue adhesive consisting of a citric acid derivative and collagen. *Mater Sci Eng C* 2004;24:775-80.
17. Taguchi T, Saito H, Iwasashi M *et al.* Development of a novel tissue adhesive consisting of naturally-derived biomolecules: Citric acid and human serum albumin, *J Nanosci Nanotech* 2007;7:742-7.

小動物臨床における輸血の現状と人工赤血球の使用例

Circumstances Regarding Blood Transfusion and Cases Using Artificial Erythrocyte in Small Animal Clinics

並河和彦^(1,2), 仲井邦彦⁽³⁾, 横田 泉⁽²⁾, 市川陽一郎⁽⁴⁾, 須永藤子⁽¹⁾, 土屋 亮⁽⁵⁾, 岸川正剛⁽⁶⁾, 小方宗次⁽²⁾

Kazuhiko Namikawa^(1,2), Kunihiko Nakai⁽³⁾, Izumi Yokota⁽²⁾, Yoichiro Ichikawa⁽⁴⁾, Fujiko Sunaga⁽¹⁾,

Ryo Tuchiya⁽⁵⁾, Seigo Kishikawa⁽⁶⁾, Munetugu Ogata⁽²⁾

和文抄録

小動物臨床で遭遇する疾患の中で、緊急輸血を必要とする犬の貧血性疾患は多い。しかし現在、小動物領域における血液供給システムは整っていないため、獣医師は院内でドナー犬を飼育したり予めボランティアとして募った一般家庭で飼育している犬から血液を採取して用いており、安全で十分量の輸血用血液を集めるためにはかなりの労力と経費を必要とする。

そこで、人工赤血球が緊急時の輸血用血液の代替物と成り得るかを検討するために、米国で市販されているhemoglobin-based oxygen-carrying solution (HBOC)と、筆者らが人工赤血球として作成しているpolyethyleneglycol-conjugated bovine hemoglobin derivative (PEG-HbBv)を、造血障害と溶血性貧血を示す犬の症例に適用し、院内ドナー犬から採血した血液を用いて治療した症例の経過と比較した。その結果、基礎疾患が重篤で化学療法が無効であった1症例を除き、HBOCはきわめて有用で輸血と同等の効果を示した。さらに自己凝集を起して輸血の実施が不可能になった犬の貧血症例に、PEG-HbBvを化学療法剤が効果を示すまでの間の酸素運搬体として投与した結果、貧血は回復し症例は順調に快方に向かった。

これらのことから、小動物臨床において人工赤血球は極めて有用な酸素運搬体であることが証明されたので、今後さらに需要は増すものと思われ更なる開発が望まれる。

Abstract

In Japan, veterinarians in small animal clinics encounter a number of anemic diseases that require blood transfusions. The lack of a system in Japan for supplying blood for transfusions in sufficient amounts means that veterinarians are obliged to keep some donor dogs in their hospitals or ask for voluntary blood donations from dogs kept by member of the general public. The current situation forces Japanese veterinarians to spend a lot of time and money storing blood with adequate safety measures and in sufficient amounts.

Hemoglobin-based oxygen-carrying solution (HBOC) manufactured in the USA and polyethyleneglycol-conjugated bovine hemoglobin derivative (PEG-HbBv) produced on-site as an artificial erythrocyte for dogs with dyserythropoiesis or hemolytic anemia were administered to 7 dogs to compare HBOC and PEG-HbBv with whole blood in terms of convenience and efficacy. Consequently, excluding one case which had from the start presented symptoms of severe disease that did not respond to chemical treatment, HBOC demonstrated its usefulness and was shown to have the same effect as whole blood.

In addition, canine anemic cases that were impossible to treat with a blood transfusion owing to the risk of auto-agglutination,

(1) 麻布大学獣医学部伝染病研究室, 〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71 Laboratory of Infectious Diseases, School of Veterinary School, Azabu University, 1-17-71, Fuchinobe, Sagami-hara-shi, Kanagawa 229-8501

(2) 麻布大学獣医学部附属動物病院, 〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71

(3) 東北大学医学系研究科環境保健医学, 〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町2-1

(4) いちかわ動物病院, 〒270-0011 千葉県松戸市根木内168-1

(5) 麻布大学獣医学部内科学第二研究室, 〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71

(6) 麻布大学環境保健学部病理学研究室, 〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71

論文受付 2006年12月1日 論文受理 2007年3月15日

were injected with PEG-HbBv as an oxygen-carrying solution until the chemical treatment could take effect and facilitate a successful recovery.

The results indicate that further development of the artificial erythrocyte is desirable and increasing demand for this product may be expected, owing to its usefulness as an oxygen-carrying solution for small animal clinics.

Keywords

PEG-HbBv, HBOC, dog, anemia, treatment, blood transfusion

はじめに

近年、小動物臨床における診療技術の向上と、犬猫の病気に対するオーナーの認識が高まってきたことにより、輸血を必要とする貧血症例に遭遇する機会が多くなってきている¹⁾。

犬猫の貧血性疾患はその原因により、赤芽球癆 (pure red cell aplasia ; PRCA)、骨髓異形成症候群 (myelodysplastic syndrome ; MDS)、リンパ腫の骨髓転移や鉄欠乏性貧血などの造血障害によるもの、免疫介在性溶血性貧血 (immune mediated hemolytic anemia ; IMHA) や *Babesia gibsoni* による犬のパベシア症 (Fig. 1.) および *Mycoplasma haemofelis* による猫のヘモプラズマ感染症 (Fig. 2.) などの血管内および血管外溶血によるもの、および鉤虫感染症、犬パルボウイルス感染症や播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation syndrome ; DIC) などの失血によるものがある。これらの疾患時には生命維持のための輸血や、診断過程での骨髓穿刺や生検時の麻酔のリスクを減らすための輸血、あるいは治療薬が効果を示すまでの緊急処置としての輸血が必要となる^{2,3)}。

しかし現在、小動物領域における血液供給システムは整っていない。そのため、獣医師は輸血用血液を確保するために院内でドナー動物を飼育したり、ボランティアを募って一般家庭で飼育されている動物から必要時に血液を提供していただき治療に用いている。ドナー動物を飼育する場合には大型種であること、健康であることと感染症フリーであることを確認しなくてはならず、さらに引退後には里親探しまでしなくてはならないため、人手と経費の面からも個人病院で実施するのは困難な場

合が多い⁴⁾。

さらに輸血実施時における問題点として血液型の適合性の問題がある。犬ではDEA (dog erythrocyte antigen) による分類が一般的で、最も抗原性が強いサブタイプであるDEA1.1の抗原の有無を調べるキット (ラピッドベッド®-H, 共立製薬株式会社) が市販されている。しかし、他のサブタイプのDEA1.2やDEA1.3あるいは他の血液型については調べる事はできないので、輸血を実施する時には、ドナーの赤血球とレシピエントの血清の適合性を調べる主試験と、ドナーの血清とレシピエントの赤血球の適合性を調べる副試験からなる交差適合試験を行う必要がある⁵⁾。

猫についてはABシステムとして知られており、同様にキットでA型、B型とAB型に対する抗原の有無を調べることができるが、他の血液型については知る事ができないので、輸血実施時には交差適合試験を行う必要がある。

以上のように小動物臨床において輸血を実施するためには手間と経費がかかり、さらに実施時には煩雑な操作を必要とする。

そこで今回は、小動物臨床領域において輸血を実施する機会が最も多いと思われる犬の貧血性疾患の中で全血輸血を行った症例、人工赤血球として米国で獣医師向けに市販されている hemoglobin-based oxygen-carrying solution (HBOC) (Oxyglobin®) を投与した症例と、筆者らが作成した polyethyleneglycol-conjugated bovine hemoglobin derivative (PEG-HbBv) を治療に用いた臨症例の使用経験を紹介し、小動物臨床における人工赤血球の今後の展望について考察する。

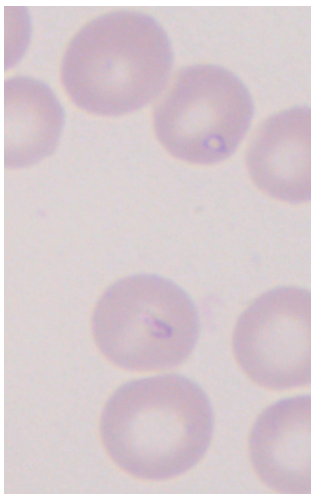


Fig. 1. Peripheral blood from a dog infected with *Babesia gibsoni*. Two parasites are seen in this field.

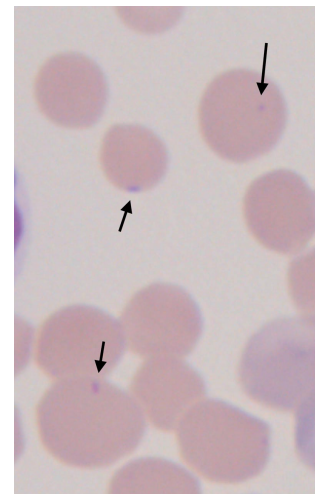


Fig. 2. Peripheral blood from a cat infected with *Mycoplasma haemofelis*. Three organisms are seen in this field (arrows).

1. 輸血適用症例 (Table 1.)

Table 1. Hematological findings of the cases administered with whole blood

	Case 1		Case 2		Case 3	
Diagnosis	PRCA		IMHA		Malignant lymphoma	
Days Following Treatment Initiation	0	63	0	6	0	7
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	96	608	237	511	111	
Hb (g/dl)	2.3	15.6	5.8	12.6	3.3	
Ht (%)	6.8	47.5	17.4	39.8	9.7	
MCV (fl)	70.8	78.1	73.4	77.9	87.1	
MCH (pg)	24.0	25.7	24.5	24.6	30.0	
MCHC (g/dl)	33.8	32.8	33.3	31.5	34.0	
Ret (%)	0	—	9.6	10.4	—	
Blood transfusion	200ml		200ml		160ml	
Outcome	Recovery		Recovery		Death	

供血用のドナー犬を飼育するためには、十分な居住空間を確保し、常時新鮮な水と蛋白質や鉄分に富んだ高品質の食事を与えなくてはならず、健康診断と犬ジステンパーやパルボウイルス感染症などに対するワクチン接種およびバベシア症の検査などを定期的に行わなくてはならないため、かなりの経費と労力を必要とする。筆者が所属している麻布大学獣医学部附属動物病院ではこれらの条件を遵守しドナー犬を管理している。ここではこれらのドナー犬から採取した輸血用血液を用いて治療した3症例について紹介する。

症例1は7歳9ヵ月、体重10kg、雌のウェルシュコーギーで、2週間前から元気消失、食欲減退がみられ、血液検査で貧血を指摘され本病院に来院した。初診時の血液検査で赤血球数 $96 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、Hb量2.3g/dl、Ht値6.8%と重度の貧血を示していたが、網状赤血球がまったく見られなかったため赤血球の低形成を疑い全身麻酔下で骨髓穿刺を行った。その結果、骨髓球および巨核球系には異常は見られなかったが赤血球の低形成が顕著であったことからPRCAと診断され、発症時がすでに成犬に達し急激に見られたことから後天性で特発性と考えられた。そこでプレドニゾン2 mg/kg/dayを投薬するとともに、ドナー犬と

交差適合試験によって得た血液200mlを輸血した。その後赤血球数の増加とともに経過は良好に推移し、63日目には赤血球数 $608 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、Hb量15.6g/dl、Ht値47.5%まで回復し維持している。

症例2は13歳、体重12kg、雄のビーグルで、2週間前から元気食欲が落ち、血液検査によって貧血が確認された。本病院での血液検査所見は赤血球数 $237 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、Hb量5.8g/dl、Ht値17.4%であり、血液塗抹所見では幼若赤血球の出現は微弱であったが、球状赤血球 (Fig. 3.A; 矢印) が多数見られ、クームス試験が陽性を示したのでIMHAと診断された。そこで抗体産生の抑制、補体の活性化阻止とマクロファージによる赤血球の貪食阻止を目的としてプレドニゾンとシクロフォスファミドを処方し、輸血を行った。その結果、6日後には網状赤血球数の増加がみられ (Fig. 3.B; 矢印)、赤血球数は $511 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、Hb量12.6g/dl、Ht値39.8%まで回復していた。

症例3は6歳、体重8kg、避妊済み雌、キャバリアで、約1年前に下顎、浅頸、鼠径、膝下リンパ節など体表リンパ節の腫脹がみられ、リンパ節の針穿刺塗抹標本の所見から多中心型の悪性リンパ腫、ステージ5と診断された症例である。治療は導入薬としてL-アスパラギナーゼとプレドニゾロンを用い、その後シクロフォスファミド、プレドニゾンとビンクリスチンの多剤併用療法によって、約1年間の緩解期間が得られていた。しかし、1年経過した時点で容態が急変したので血液検査を実施した結果、赤血球数 $111 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、Hb量3.3g/dl、Ht値9.7%と重度の貧血を示したことから、腫瘍細胞の骨髓転移が考えられた。そこで化学療法に対する反応がみられたので回復に向かわせることができたが、症例3では基礎疾患が末期状態の悪性リンパ腫であったので、全血輸血による治療効果がみられず回復させることはできなかった。

以上のことから、症例1と症例2では輸血で貧血が改善している間に化学療法に対する反応がみられたので回復に向かわせることができたが、症例3では基礎疾患が末期状態の悪性リンパ腫であったので、全血輸血による治療効果がみられず回復させることはできなかった。

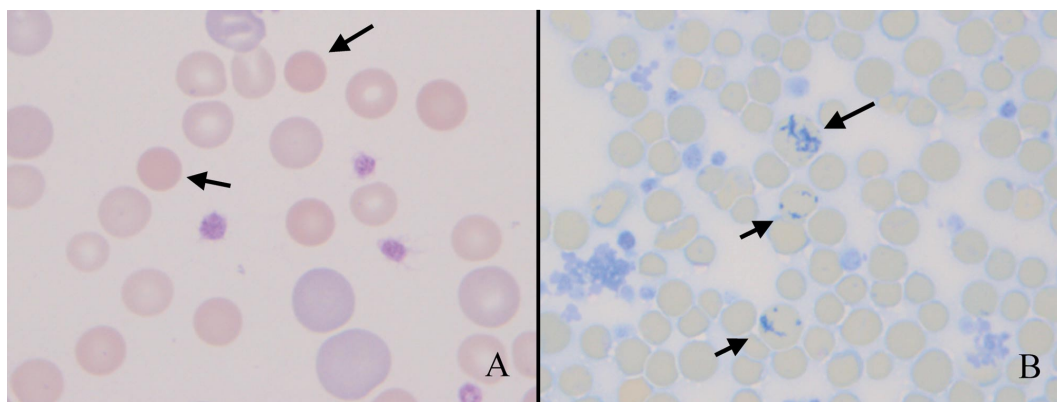


Fig. 3. A blood smear from case 2 with immune-mediated haemolytic anaemia.

A ; Note the marked anisocytosis due to a mixed population of small spherocytes (arrows) and large, immature, and normal RBCs. (Wright-Giemsa stain, original magnification 1,000X)

B ; Three reticulocytes (arrows) are seen in this field. (NMB stain, original magnification 1,000X)

2. わが国におけるHBOCの臨床使用例 (Table 2.)

Table 2. Hematological findings of the cases administered with HBOC

Diagnosis	Case 4		Case 5		Case 6	
	IMHA		IMHA		Renal failure	
Days Following Treatment Initiation	0	2	0	2	0	4
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	120	(27)	205	207	298	
Hb (g/dl)	4.3	6.3	5.3	8.9	6.4	
Ht (%)	10.7	4.3	17.6	19.4	20.5	
MCV (fl)	89.2	(159)	85.9	93.7	68.8	
MCH (pg)	35.8	(233)	25.8	43.0	21.5	
MCHC (g/dl)	40.2	(147)	30.1	45.9	31.2	
HBOC	125ml		125ml		125ml	
Outcome	Recovery		Recovery		Death	

貧血を示している症例の中で、輸血用血液が入手できなかったり、ドナーとの交差適合反応が合わない犬に遭遇した場合、あるいはオーナーが輸血を拒否した場合には輸血ができなくなる。そのような場合に緊急避難的にHBOCを用いる事ができる。

米国ではHBOCとして、牛の赤血球を溶血させて得られたHb分子間をglutaraldehydeで重合しポリマーとしたOxyglobin®が獣医師向けに市販されている。本剤は1パックHb濃度13g/dlで125ml入っているの16.25gのHbを供給することができるが、日本では一般に販売されていないため容易に入手することはできない。今回は個人輸入によって購入した本剤をオーナーの了解を得て適応した症例について紹介する。

症例4. ポメラニアン、雌、4歳、2.1kg、前日よりふらつき、元気消失、食欲低下、下痢がみられ、陰部に血色素尿の付着が見られた。血液検査所見では赤血球数 $120 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、Hb量4.3g/dl、Ht値10.7%と重度の貧血が見られ、血液検査所見で多染性赤血球が見られたが、球状赤血球が散見されたのでIMHAと仮診断した。治療方針としてプレドニゾロンとシクロスポリンを併用するとともに貧血を緩和するための輸血が必要であったが、自己凝集が顕著に起きていたことと、オーナーが輸血の危険性を危惧したことからHBOCを使用した。2日後症例は一時的に赤血球数とHt値が相対的な減少を示していたがHb量は増加し、10日目には赤血球数の増加も見られ21日目には退院できるまでに回復した。HBOCの投与による副作用と思われる所見は見られなかった。

症例5. シーズー、雌、12歳、6.1kg、振戦と赤色尿を主訴とし、血液検査にて重度の貧血が確認された。血液塗抹で大小不同症と球状赤血球を多数認めたのでIMHAと診断し、プレドニゾロンとシクロスポリンの治療を開始し、同時にHBOCを投与した。その後5ヵ月の継続治療により良好に回復し、治療を終了することができた。

症例6. 雑種、避妊済み雌、17歳、10kg、元気消失、食欲廃絶にて来院し、精査したところBUNの上昇(61.7mg/dl)、ALTの上昇(126IU/L)、心雑音聴取、乳腺に多数の腫瘤を認めた。本症例は高齢であること、BUNの上昇と貧血および血液塗抹所見から多染性赤血球などの幼若赤血球が見られなかったことから慢性腎不全による非再生性貧血と診断し全血輸血を

行った。その後一旦貧血は回復したが4ヵ月後再び貧血が顕著になり赤血球数 $298 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、Hb量6.4g/dl、Ht値20.5%と低値を示していたので輸血を行おうとしたがドナーが見つからなかったためHBOCを投与した。しかしBUNは76.8mg/dlとさらに上昇し、一般状態の改善も見られないまま4日後に斃死した。

以上のことから、HBOCは症例6の様に基礎疾患が改善しない場合には無効になるが、化学療法に対する反応がみられる症例に対しては輸血と同様に用いることができる極めて有用な治療薬であると思われる。

3. PEG-HbBvの臨床使用例 (Table 3.)

Table 3. Hematological findings of the case administered with PEG-HbBv

Diagnosis	Case 7					
	PRCA					
Day Following Treatment Initiation	0	3	10	14	28	88
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	104	299	155	245	498	679
Hb (g/dl)	2.7	7.3	5.4	7.6	13.7	16.1
Ht (%)	8.0	21.5	13.6	24.2	41.5	47.3
MCV (fl)	76.9	71.9	87.7	98.8	83.3	69.7
MCH (pg)	26.0	24.4	28.1	31.0	27.5	23.7
MCHC (g/dl)	33.8	34.0	39.7	31.4	33.0	34.0
Ret (%)	0.8	—	14.4	39	24	4.4
Blood transfusion	160ml					
PEG-HbBv	170ml					
Outcome	Recovery					

症例7: ウェルシュコーギー、雄、3歳8ヵ月、体重8.15kg、屋内飼育、来院2ヵ月前から後肢がふらつき、血液検査で貧血を指摘され当院受診となった。平成18年7月25日の初診時の血液検査では赤血球数 $104 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、Hb量2.7g/dl、Ht値8.0%と重度の貧血を示していたが、血液塗抹Wright-Giemsa染色標本では幼若赤血球がみられず成熟赤血球がまばらに塗抹され(Fig. 4.A)、網状赤血球の増加がほとんど見られなかった。そこで状態を改善させるために全血輸血160mlを行った後、全身麻酔下で骨髓穿刺を行った結果、骨髓球および巨核球系には異常は見られなかったが赤血球の低形成が顕著であったことからPRCAと診断され、プレドニゾロン3.75mg/kg/dayとシクロスポリン6.2mg/kg/dayを投与した。その結果3日後には赤血球数 $299 \times 10^4/\mu\text{l}$ と一旦貧血が改善されたが、10日後には再び赤血球数 $155 \times 10^4/\mu\text{l}$ まで減少し、さらに自己凝集が発現して他の犬からの輸血が不可能となった。そこで、オーナーへのインフォームドコンセントを得た後、筆者らが作成したPEG-HbBv (Hb量7.0g/dl) 170mlを、5ml/kg/hrの速さで点滴静注した。投与中症例の様子に異常所見は見られなかった(Fig. 5.)。その後、化学療法の効果が発現し貧血は順調な回復を示して多染性赤血球の増加が見られ(Fig. 4.B)、28日目には赤血球数 $498 \times 10^4/\mu\text{l}$ まで回復し、88日目には赤血球数 $679 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、Hb量16.1g/dl、Ht値47.3%と正常値を示すまでに至った。

以上のことから、PEG-HbBvは化学療法に対する反応がみられるまでの間、輸血の代替物として緊急避難的に用いることができる極めて有用な治療薬であると思われる。

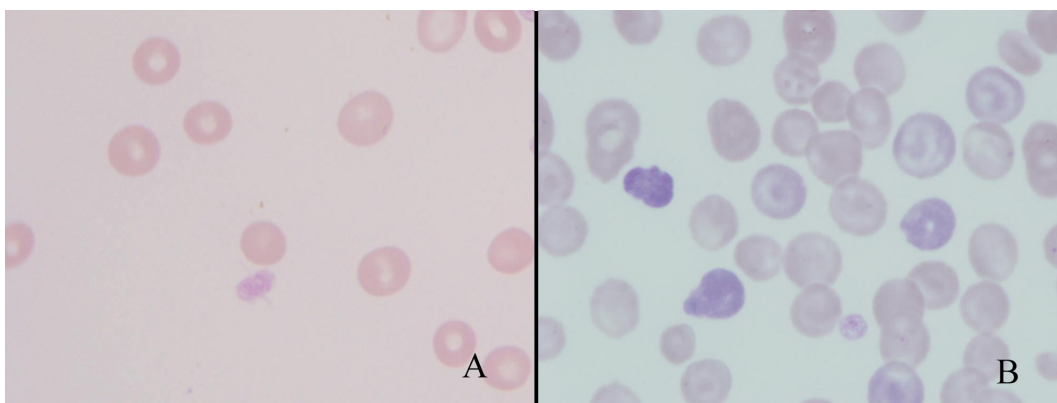


Fig. 4. A blood smear from case 7 with pure red cell aplasia.

A ; Immature RBCs are not seen in this field.

B ; Blood smear of case 7 taken on the 6th day following treatment initiation. Almost all RBCs are enlarged and a few polychromatophils are seen in this field.

(Wright-Giemsa stain, original magnification 1,000X)

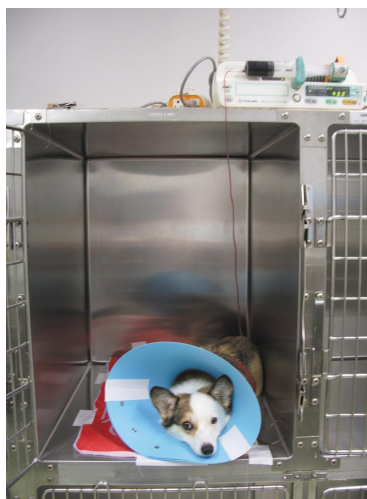


Fig. 5. Dog (case 7) administered with PEG-HbBv

4. まとめ

日常の小動物臨床において、造血障害や溶血による犬の貧血性疾患に遭遇することは多い。これらの疾患では化学療法による治療が行われるが、重度の貧血を示していたり、診断のために全身麻酔をかけるときには輸血が必要になる。しかし小動物臨床における輸血用血液の供給システムは整っていないため、必要時に十分量の輸血用血液を入手することは困難なことが多く、さらに自己凝集が起きて輸血不可能になる場合もある。HBOCはこのような輸血用血液の入手ができない場合に用いることができる人工酸素運搬体であり、米国ではOxyglobin[®]として獣医師向けに市販されている^{6,7)}。HBOCを用いた最初の報告⁸⁾は消化管内寄生虫である鉤虫と外部寄生虫であるノミによって重度の貧血を示した犬4頭に駆虫薬とともに用いたもので、HBOCを用いることにより症例は全て治癒したと述べている。その後本剤の有用性が認識されるようになり治療報告も多くみられるようになったが、いずれも基礎疾患に対する治療の効果

が奏効するまで貧血を一時的に改善させる目的で、全血輸血の代替物として使用している。しかしながらHBOCは赤血球膜を除去しているので交差適合試験をする必要がなく、輸血による感染の危険もない。さらに長期保存ができるので必要時に必要量を用いることができることから有用であると同時に、輸血の危険性を危惧するオーナーに対しても受け入れられる治療薬であると思われる。

このように米国で市販されているOxyglobin[®]は有用なHBOCであるが、ヘモグロビン分子をglutaraldehydeで重合しポリマーとしているので反応系の制御が困難で重合に伴う新たな抗原性の生成の可能性がある、再発の可能性がある貧血性疾患の治療に繰り返し使用するには危険があるのかもしれない⁹⁾。そこで筆者らは、免疫を抑制する作用を有するpolyethyleneglycol¹⁰⁾で牛ヘモグロビンをコンジュゲイトしたPEG-HbBvを作成し¹¹⁾臨床例に用いたところ良好な結果が得られた。このことから、治療が長期にわたったり、再発の危険性がある症例に対しては

PEG-HbBvが有用であると考えている。

以上の事例から、小動物臨床における人工赤血球の需要は今後さらに高まるものと思われるが、わが国では使用経験のある獣医師が少ないため人工赤血球に対する認識が低く、また高価であることも事実であるので、今後基礎実験と臨床治験例でのデータを集積して人工赤血球の利便性と有効性を実証すると同時に、単価を下げる手立てを考えることも人工赤血球の需要に応じるためには必要なことと考える。

謝辞

PEG-HbBvの作成に際し、polyethyleneglycolを提供していただきました日本油脂(株)DDS事業開発部の杉中徳恭氏に深謝致します。

文献

1. Callan MB, Oakley DA, Shofer FS, Giger U. Canine red blood cell transfusion practice. J Am Anim Hosp Assoc 1996;32:303-311.
2. Callan MB, Rentko VT. Clinical application of a hemoglobin-based oxygen-carrying solution. Vet Clin Small Anim 2003;33:1277-1293.
3. Haldane S, Roberts J, Marks SL, Raffe MR. Transfusion medicine. Compend Contin Educ Pract Vet 2004;26:502-518.
4. 佐々木伸雄. 小動物の外科手術と輸血療法. 人工血液 1994;2:74-76.
5. 江島博康. 小動物血液型システムと輸血の現状. 人工血液 1994;2:47-51.
6. Gibson GR, Callan MB, Hoffman V, Giger U. Use of a hemoglobin-based oxygen-carrying solution in cats:72 cases (1998-2000). J Am Vet Med Assoc 2002;221:96-102.
7. Day MJ. Antigen specificity in canine autoimmune haemolytic anaemia. Vet Immunol Immunopathol. 1999;69: 215-224.
8. Giger U, Griot M, Rosenzweig M, Macintire D. Purified hemoglobin as a blood substitute in the treatment of parasite-induced anemia in dogs [abstract]. J Vet Intern Med 1991;5:140.
9. 関口定美, 仲井邦彦. 人工血液の開発と臨床応用. 日本輸血学会雑誌 1995;41:131-138.
10. Levy Y, Hershfield MS, Fernandez-Mejia C, Polmar SH, Scudiero D, Berger M, Sorensen RU. J Pediatrics 1988;113: 312-317.
11. 仲井邦彦, 小林由稀, 高橋恒夫, 関口定美. Polyethyleneglycol 修飾ウシヘモグロビン誘導体の開発. 人工臓器 1996;25:490-493.

ハムスター皮下の細動脈血流を一過性に遮断するモデルを用いた P₅₀値が異なるHb小胞体の酸素放出挙動[†]

Oxygen Release from Low and Normal P₅₀ Hb-Vesicles in Transiently Occluded Arterioles of the Hamster Window Model.

酒井宏水^{(1)*}, ペドロ カブラレス^(2,3), エミ G. ツァイ^(2,3), 土田英俊⁽¹⁾, マルコス インタリエッタ^(2,3)
Hiromi Sakai⁽¹⁾, Pedro Cabrales^(2,3), Amy G. Tsai^(2,3), Eishun Tsuchida^{(1)*}, and Marcos Intaglietta^(2,3)

要 旨

Hb溶液を内包したリン脂質小胞体 (Hb小胞体, HbV) が輸血代替として開発されている。HbVの特徴の一つに、Hbの酸素親和度 (P₅₀値) をアロステリック因子であるピリドキサル 5'-リン酸の内包量によって容易に調節できることがある。本研究では、P₅₀値が異なる二つのHbVを調製し (8, 29 mmHg, それぞれHbV₈, HbV₂₉)、ハムスター皮下微小循環観測モデル (Hamster window chamber model) を用い、細動脈の血流を遮断した直後の酸素放出挙動について観察した。無麻酔条件下、ハムスターにHbV₈またはHbV₂₉を7 mL/kg投与した。顕微鏡観察下に、マニピュレータに固定した硝子製ピペットを用い、細動脈 (内径53.0 ± 6.6 μm) の血流を経皮的に遮断し、100 μm下流の細動脈内酸素分圧 (pO₂) の低下する様子を、予め投与したPd-ポルフィリンの燐光解消から追跡した。ベースラインの細動脈pO₂ (50 - 52 mmHg) は5 mmHgまで低下した。HbV₈投与後の血流遮断では、HbV₂₉に比較して僅か乍らpO₂の低下に遅れがあった。pO₂値と酸素結合解離曲線をもとに細動脈内酸素含量を解析したところ、HbV₂₉に比較してHbV₈が有意に遅い酸素放出を示し、投与量が少ないにも拘らず、pO₂が低下した場合 (例えば 10 mmHg以下) では赤血球を上回る酸素供給源 (全体の55%以上) になることが明らかになった。この結果は、Hbを用いる人工酸素運搬体のP₅₀値を小さく設定することにより、虚血性疾患の治療に利用できる可能性を示している。

キーワード: 血液代替物／人工赤血球／血流遮断／微小循環動態／リポソーム

緒 言

高濃度のヒトヘモグロビン溶液 (Hb) を内包したHb小胞体 (HbV), 或はリポソーム内包Hb (LEH) は、その酸素運搬機能が赤血球と同等に調節でき、輸血代替として利用できる^{1,5,8,16,24,30}。HbV (粒子径約250 nm) の細胞構造は、赤血球 (RBCs) の構造と同様の特徴を有している。Hb溶液が血液成分や血管内皮と直接的に接触することを防止し、Hb分子に起因する様々な酸化細胞障害を抑制する^{4,38}。また、内因性血管弛緩因子であるNOやCOをHbが捕捉することによって生起する血圧亢進は、小胞体にHbを内包することによって防止できる^{12,18,26}。HbVの安全性については、主にげっ歯類を用いた実験により検討され、例えば細網内皮系における速やかな代謝が組織病理学的、血液生化学的解析から明らかにされつつある^{28,29}。

細胞型HbVの特徴の一つに、酸素親和度 (P₅₀値, Hbが酸素で50%飽和するときの酸素分圧) が、HbVに内包するアロステリック因子の量によって調節できることがある。架橋型Hbや重合型Hb など化学修飾したHb溶液では、そのP₅₀値は修飾状態で決定されるのに対し、HbVでは酸素運搬機能の調節が自在にできる利点を有する³⁴。我々はアロステリック因子としてピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) を使用している^{33,45}。PLPをHbに対し2.5倍モル添加すると、P₅₀値は約29 mmHgになる。PLPを添加しないと、P₅₀値は約8 mmHgになる。歴史的にみても人工酸素運搬体のP₅₀値は赤血球の値 25 - 30 mmHgと同等の値に調節され、論理的には微小循環系を流動する際に十分な酸素を放出すると考えられてきた。酸素親和度を下げる (P₅₀値を上げる) と、末梢組織での酸素放出が増大する。例えば、高P₅₀値の赤血

(1) 早稲田大学理工学研究所、(2) カリフォルニア大学サンディエゴ校 生体工学部、(3) ラ ホヤ生体工学研究所

(1) Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University; (2) Department of Bioengineering, University of California, San Diego; and (3) La Jolla Bioengineering Institute.

[†]本論文は、American Physiological Societyの許可のもと、American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology第288巻 H2897頁-H2903頁、2005年に最初に掲載された論文に基づき和文として作製したものである。

0363-6135/05 \$8.00 Copyright © 2005 the American Physiological Society, Am J Physiol Heart Circ Physiol 288 (6)

* 連絡先 酒井 宏水: 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1 早稲田大学 理工学研究所 酸素輸液プロジェクト

論文受付 2006年12月1日 論文受理 2007年3月15日

球を有するミュータントマウスは、酸素放出が促進され、運動機能が高くなることが報告された³⁶⁾。

HbVも含め、Hb利用酸素運搬体 (Hemoglobin-based O₂ carrier : HBOC) の粒子径は、虚血性組織の酸素化に有効であると期待されている^{6, 43)}。粒子径が小さいと、赤血球が通過できないような血管の狭窄部位、或は部分的に遮断された血管も通過できると考えられているからである¹⁹⁾。このような状況の血管や、側副血管などは通常、血流が遅く、血液の通過時間も長くなり^{7, 11)}、結果的に組織酸素分圧 (pO₂) は低く、また赤血球は毛細血管に到達する前に殆どの酸素を放出してしまう。例えば、pO₂が5 mmHg以下の低酸素組織では、赤血球の酸素飽和度は約5%程度となり、低酸素領域に到達する前に95%の酸素を放出してしまう。従って、赤血球と同等の通常のP₅₀値を有するHBOCでは、虚血領域に酸素を効率よく運搬するには効果的では無いと考えられる。

本研究で我々は、P₅₀の高いHbVと低いHbVについて、細動脈を一時的に遮断したときの酸素放出速度について検討を行った。細動脈は内径約50 μmのものを選んだ。それは、この程度の細動脈が組織酸素化に大きく関与しているからである¹³⁾。本研究では、低酸素領域でのHbVの酸素放出、或は酸素保持の効果を明らかにし、虚血組織の酸素化の可能性について検討することを目的とした。

方 法

HbVの調製

P₅₀値の異なる二種類のHbVは無菌的条件下、既報に従って調製した^{32, 34, 37)}。Hb溶液は、日本赤十字社 (東京) から提供を受けた期限切れ非使用赤血球から精製した。HbV₂₉ (P₅₀ = 29 mmHg) は、アロステリック因子として14.7 mMのピリドキサル 5'-リン酸 (PLP, シグマ, St. Louis) を 38 g/dLのHb溶液にモル比でPLP/Hb = 2.5になるように添加して調製した。HbV₈ (P₅₀ = 8 mmHg) は、Hb溶液にアロステリック因子を添加せずに調製した。HbVの脂質成分は、Presome PPG-I [a mixture of 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine, cholesterol, および 1,5-di-*O*-octadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate がモル比で5/5/1の割合で混合されたもの (日本精化, 大阪)] から構成される。HbVの粒径はエクストルージョン法によって調節した。粒子表面は、0.3 mol%の1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-poly (ethylene glycol) (Sunbright DSPE-50H, H-form, NOF Co., Tokyo, Japan) により、ポリエチレングリコールで修飾した。HbVは生理食塩水に分散、フィルター滅菌し (Dismic, 東洋濾紙: 0.45 μm)、窒素通気により酸素を除去して保存した。残存エンドトキシンは、LAL変法により0.2 EU/mL以下であることを確認した²⁷⁾。HbV₂₉およびHbV₈の酸素結合解離曲線は、ヘモックスアナライザー (TCS-Medical Products, Philadelphia) により測定した (Fig. 1)。物理化学的特徴はTable 1.にまとめた。

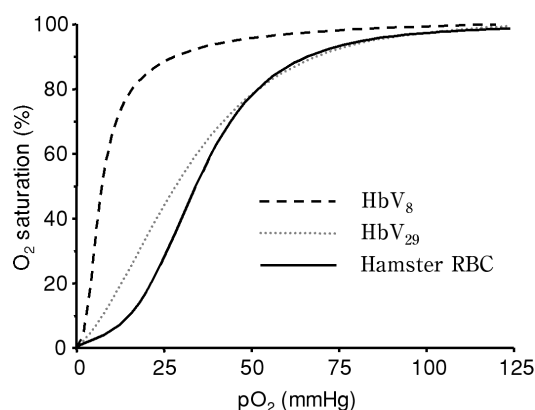


Fig. 1. Oxygen equilibrium curves (OECs) of HbV₈ and HbV₂₉ measured with a Hemox Analyzer (TCS Medical Products) at 37 °C in comparison with hamster blood. (Cited from: Sakai et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;288:H2897-H2903)

Table 1. Physicochemical properties of HbV₈ and HbV₂₉ in comparison with hamster blood (Cited from: Sakai et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;288:H2897-H2903)

parameters	HbV ₈	HbV ₂₉	hamster blood
Hb concentration (g/dL)	10	10	14.8 ± 0.5
particle diameter (nm)	250 ± 64	247 ± 44	5000 - 7000*
P ₅₀ (mmHg)	8	29	28
Molar ratio of PLP to Hb	0	2.5	-
MetHb (%)	< 3	< 1	-
HbCO (%)	< 2	< 2	-

*size of hamster RBC (Ref. 39).

動物実験方法

12匹の雄性シリアンゴールデンハムスター (体重59 ± 12 g, Charles Rivers, Worcester, Mass.) を使用した。ペントバルビツールナトリウムを腹腔内投与 (ca. 50 mg/kg b.w., Abbott Lab., North Chicago, IL) して麻酔状態とした。背中の皮膚の毛を剃り、摘まみ上げて片側の皮膚と筋肉層を約15mm径の円形に切り抜き、12 mm径のカバーガラスの窓枠の付いたチタン製フレームを装着させた。このカバーガラスを通して、皮下微小循環系の顕微鏡観察を行った^{20, 22, 25)}。

ポリエチレン製チューブ (PE-10, Becton Dickinson, Parsippany, NJ, 約1 cm) とPE-50 (約25 cm) をシリコンチューブ (約4 cm, Technical Products, Inc., Decatur, GA) で結合し、頸動脈、頸静脈にカテーテルとして挿入した。これらを内頸から背部皮膚を経由して体外に引出し、チタン製フレームに固定した。カテーテルはヘパリン添加生理食塩水 (40IU/mL) で満たした。外科的侵襲の影響を低減するため窓

枠取付けの操作から5日後に微小循環観測を行った。ハムスターを多孔性プラスチックチューブに入れ、チタン製の窓枠はチューブの外に出るよう固定し、無麻酔ハムスターの呼吸を維持しつつ、体位変化の影響を極力小さくする工夫をした。本動物実験は、カリフォルニア大学サンディエゴ校の動物実験委員会の承認を得た。また、実験動物の管理と使用に関するガイドライン“*Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences, National Research Council-National Academy of Sciences (Washington: National Academy Press, 1996)*”に従った。

HbV₈およびHbV₂₉の投与と、細動脈血流の遮断

無麻酔ハムスターを多孔性プラスチックチューブに入れ、顕微鏡のステージに設置し安定するまで待った。システミックパラメータが基準範囲内のハムスターのみ実験に用いた(心拍数 > 340 bpm, 平均動脈圧 > 80 mmHg, ヘマトクリット > 45%, 動脈血酸素分圧 > 50 mmHg, 顕微鏡視野で微小循環系に浮腫や出血が無いこと)。ベースラインの微小循環系の各パラメータおよびpO₂(後述)の測定は、HbV₈或はHbV₂₉を静脈内投与(7 mL/kg)する前に行った。循環血液量は70 mL/kgと仮定した。我々の以前の論文では、出血性ショック蘇生や血液希釈の際にHbVはアルブミン溶液に分散させて膠質浸透圧を調節した^{30,33)}。しかし本実験では、負荷投与になるので、循環血液量の増大を回避するためアルブミンを併用しなかった。また同様の理由により、投与量は循環血液量の10%に留めた(7 mL/kg)。

ハムスターの状態が安定しシステミックパラメータを測定した後、細動脈径と血流速度を測定した。細動脈としては、Large feeding arterioles 或は small arcading arterioles (53.0 ± 6.6 μm径)を選択した。ガラス製マイクロピペットをpipette pullerで細くし、炎で熱して湾曲させた細管を準備し(Fig. 2), この細管の湾曲した部位で皮膚内の細動脈の血流を遮断させる操作を、反対側から顕微鏡で微小循環系を観察し、位置を確認し乍ら行った。遮断時間は30秒とした。

微小循環動態の計測

微小血管系は、透過型倒立顕微鏡(IMT-2, オリンパス)により観察した。画像の観察、録画には、Cohu 4815-2000 (San Diego), TV-VCR (Sony Trinitron PVM-1271Q monitor, Tokyo), Panasonic AG-7355 recorder (Tokyo)を使用した。既報に従い細動脈を選定し³³⁾, 血流遮断前の血管径と赤血球流速は、on-line観察した^{14,15)}。血管径は、画像剪断法を(Digital Video Image Shearing Monitor 908, I.P.M. Inc., San Diego, CA), また赤血球流速はフォトダイオード相関法を用いた(Velocity Tracker Mod-102 B, I.P.M. Inc.). 血流速度Qは、式(I)により求めた。

$$Q = (\text{赤血球流速}/R_v) \times (\text{血管径}/2)^2 \quad (I)$$

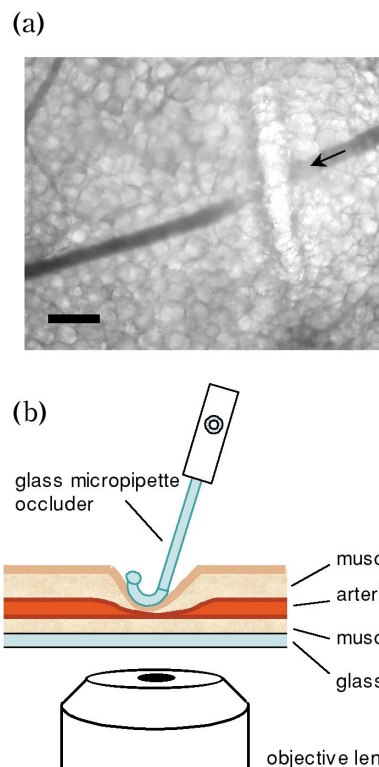


Fig. 2. (a) Microscopic image of an occluded arteriole in the hamster window chamber. The glass fiber lies across the arteriole. Scale bar, 100 μm. (b) Schematic representation of occlusion of (a) showing the different tissue layers of the skin (Not to scale). (Cited from: Sakai et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H2897-H2903)

ここで、既報²⁰⁾に従い、中心流速と平均流速の比R_vに1.6を用いた。

パラジウムポルフィリンが結合した牛アルブミン溶液(7.6 wt%, 0.1 ml)を、HbV投与20分前に投与した。細動脈内pO₂は、パルス光照射でパラジウムポルフィリンから生起する燐光寿命から測定する非侵襲的手法を採用した。この燐光寿命は、局所的な酸素濃度の関数となる^{17,40,44)}。燐光寿命とpO₂の関係は、Stern-Volmer式(II)として表される。

$$\tau_0 / \tau = 1 + k_q \times \tau_0 \times pO_2 \quad (II)$$

ここでτ₀とτはそれぞれ、無酸素状態(pO₂ = 0 mmHg), 測定pO₂値のときの燐光寿命を示す。k_qはpHと温度に依存する定数である。励起光は20 × 5 μmの窓枠を介して血管上に照射した。1秒おきのフラッシュ照射ごとにpO₂を測定した。

血流遮断により観測される酸素分圧の減衰曲線は、先ずHbV投与前に測定し、その20分後HbVを投与して測定した。各pO₂値におけるHbVの酸素飽和度は、酸素結合解離曲線から求め(Fig. 1.), 血液1 dL当たりの総酸素含量(mL O₂)は(III)式によって見積もることができる。

$$\text{酸素含量} = 23.6 \times \frac{[\text{SaO}_2(\text{RBC}) + 0.0667 \times \text{SaO}_2(\text{HbV})]}{100} + 2.42 \times \frac{\text{pO}_2}{713} \quad (\text{III})$$

この式で、平均的な動脈血Hb濃度として15 g/dL とした (14.8 ± 0.5 g/dL, ヘム濃度 9.3 mM, B-Hemoglobin Photometerにより測定, Hemocue, Sweden). 酸素飽和度 (SaO₂) が100% のとき, 100 mLの血液には23.6 mLのO₂がHbに結合 (37 °Cの理想気体) していることがBoyle-Charle's の法則: $PV = nRT$ から計算できる. ここで, P (atm) は大気圧, V (L) はガス容量, n はモル数, R はガス定数 (0.082 atm·L/K/mol), T は絶対温度である [23.6 (mL) = 9.3 × 10⁻⁴ (mol) × 0.082 × (273 + 37) × 1000]. 物理的溶解した酸素含量は, 1 atm O₂ (713 mmHg, 水蒸気圧47 mmHgを差引いた値), 37 °Cのとき2.42 mLとなる. SaO₂ (RBC) およびSaO₂ (HbV) は, それぞれ細動脈内の酸素分圧に対応したRBCとHbVの酸素飽和度である.

HbVは生理食塩水に分散してあり ([Hb] = 10 g/dL), 負荷投与後に血液の膠質浸透圧が低下し, 水分が血管外に漏出することになる. これを考慮し, HbV投与後20分待って計測を行った. この時間によって, 過剰の水分が血管内から組織に移行し, 循環血液量が一定になり, 血中のHb濃度が6.7%上昇するものと仮定した.

数値解析

数値は, 平均±標準偏差として示した. 統計解析は, 群間比較では分散分析 (ANOVA) と Fisher's protected least significant difference (PLSD) を用いた. Student's t-testは各群のベースラインとの比較に用いた. 全ての計算はGraphPad Prism 4.01 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA) を用いた. $p < 0.05$ のとき有意差とみなした.

結 果

細動脈の血行動態

選択した細動脈の血管径, 中心の赤血球流速, 血流速度, および血管内pO₂について, HbV投与前後についての値をTable 2. にまとめた. 群間に有意差は無かった. 各pO₂値におけるハムスター赤血球に結合した酸素と物理的溶解した酸素の総量は, 式 (III) より18.61 ± 1.23 mL O₂ / dLと計算できる. HbV₈或はHbV₂₉の投与後, 酸素含量は, それぞれ, 20.30 ± 1.18および20.17 ± 1.54 mL O₂ /dLに増大する. HbV₈およびHbV₂₉の寄与は, それぞれ1.51 ± 0.01および1.25 ± 0.07 mL O₂/dLである. SaO₂ (HbV₈) は95.9 ± 0.6%であり, SaO₂ (HbV₂₉) の79.6 ± 4.7%に比較して高いため, HbV₈投与群は HbV₂₉投与群に比較して高い酸素含量を示した.

HbV投与後に血流遮断したときの細動脈内pO₂の変化

血流を遮断する前の細動脈内pO₂は, 平均的に50 - 52 mmHgであったが, Fig. 3.に示すように, 血流遮断とともに急激に低下した. 全群において, 遮断開始10秒, 30秒で, pO₂はそれぞ

Table 2. Profiles of arterioles for occlusion before and after infusion of HbVs. Arteriolar pO₂, SaO₂, and O₂ contents were obtained during 6 sec prior to occlusion. Mean ± SD. * $p < 0.05$ vs. RBC and HbV₂₉; * $p < 0.05$ vs. before infusion. (Cited from: Sakai et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;288:H2897-H2903)

parameters	before infusion	After HbV infusion	
		HbV ₈	HbV ₂₉
Arteriolar diameter (μm)	53.0 ± 6.6	56.2 ± 6.8	55.8 ± 6.9
Centerline flow velocity (mm/sec)	3.1 ± 0.5	3.4 ± 0.7	3.5 ± 0.5
Blood flow rate (nL/sec)	6.8 ± 1.6	8.7 ± 3.1	8.5 ± 2.1
Arteriolar pO ₂ (mmHg)	50.7 ± 4.7	51.4 ± 4.8	52.1 ± 5.3
SaO ₂ (RBC) (%)	78.1 ± 5.1	76.0 ± 7.7	77.9 ± 6.5
SaO ₂ (HbV) (%)	—	95.9 ± 0.6 [#]	79.6 ± 4.7
O ₂ content in whole blood (mL O ₂ / dL blood)	18.61 ± 1.23	20.30 ± 1.18 [*]	20.17 ± 1.54 [*]
O ₂ content in HbV (mL O ₂ / dL blood)	—	1.51 ± 0.01	1.25 ± 0.07

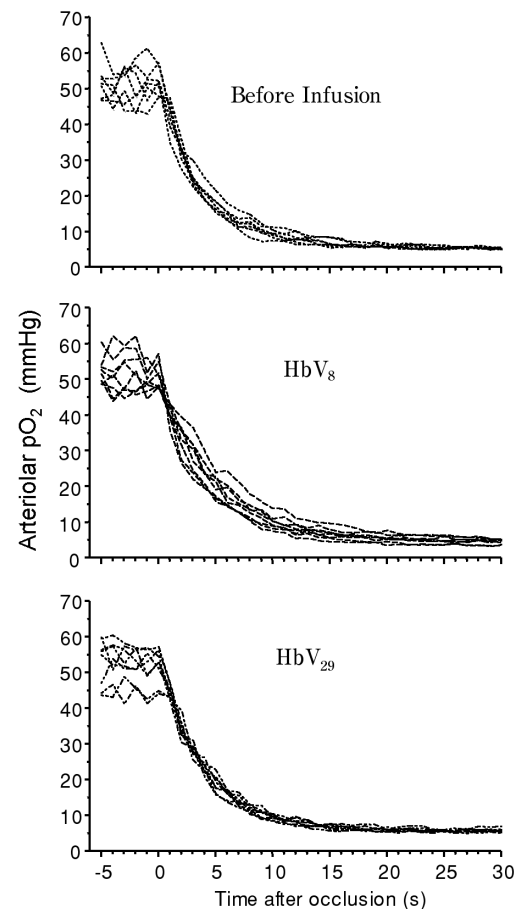


Fig. 3. Time course of the pO₂ in the blood of an occluded arteriole (diameter, 53.0 ± 6.6 μm) before and after infusion of 7 mL/kg HbV₈ or HbV₂₉ into hamsters. Measurements were made in blood at a distance of 50 μm from the point of occlusion. Most vessels equilibrate to intravascular partial pressure in the range of 4-6 mmHg about 15-20 seconds after occlusion. (Cited from: Sakai et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;288:H2897-H2903)

れ10, 5 mmHgにまで低下した。pO₂値の変化をベースライン値（血流遮断前）に対する比として表すと、HbV₂₉の投与或は何も投与せずに血流遮断したときに比較して、HbV₈を投与して血流遮断した方がpO₂値の低下が遅くなる傾向が認められた（Fig. 4）。HbV₈投与群と無投与群では、7秒後のみに有意差が認められた（ $p = 0.035$ ）。

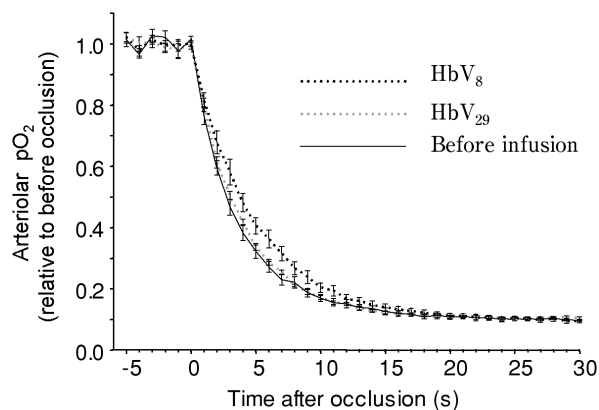


Fig. 4. Changes in pO₂ relative to before occlusion. The data in Figure 3 were averaged. Baseline values before occlusion was obtained as the average of six values before occlusion, and fixed as 1.0. There was a significant difference between the HbV₈ infusion and before infusion groups only at 7 sec ($p = 0.035$). (Cited from: Sakai et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;288:H2897-H2903)

各pO₂値におけるSaO₂ (RBC) およびSaO₂ (HbV) の変化は、細動脈内の温度やpHが通常の状態（37 °C, pH = 7.4）から大きく逸脱しないことを仮定し酸素結合解離曲線（Fig. 1）から算出した。Fig. 5.aに血流を遮断した際の酸素含量の変化を示す。遮断開始直後から酸素含量は急激に低下する。HbV₈投与群は、HbV₂₉投与群および無投与群に比較して低下が遅くなる傾向が得られた。HbVの寄与を明らかにするため、Fig. 5.bにHbV由来の酸素含量のみを示した。HbV₈は非常に緩やかな酸素放出を示した。血流遮断30秒でpO₂値は5.2 ± 0.7 mmHgにまで低下したが、SaO₂ (HbV₈) は26.1 ± 7.3%であり、まだ一定値にはならず、酸素を放出し続けた。HbV₂₉は血流遮断15秒後にはほぼ一定となり、SaO₂ (HbV₂₉) は30秒後には7.4 ± 1.0%となった。Fig. 5.cはFig. 5.bを微分したもので、HbVが酸素を損失する速度を示す。HbV₂₉の場合は、血流遮断開始2秒後に最大値0.18 mL O₂/dL/secを示すが、17秒後以降では酸素を放出しない。他方HbV₈は緩慢に酸素を放出し、10秒後に最大値0.08 mL O₂/dL/secを示し、30秒後も酸素を放出し続けた。

Fig. 6に、血液全体の酸素含量に対するHbV由来の酸素含量の比率を示す。血流遮断前は、HbV₈およびHbV₂₉の寄与は非常に小さいが、これは赤血球の量に比較してHbVの投与量が極めて少ないためである。しかし、血流遮断後HbV₈由来の酸素含量分率は10秒後に0.55に達した。これは、pO₂値が極度に低下した場合には、赤血球ではなくHbV₈が主要な酸素供給源になっていることを示している。

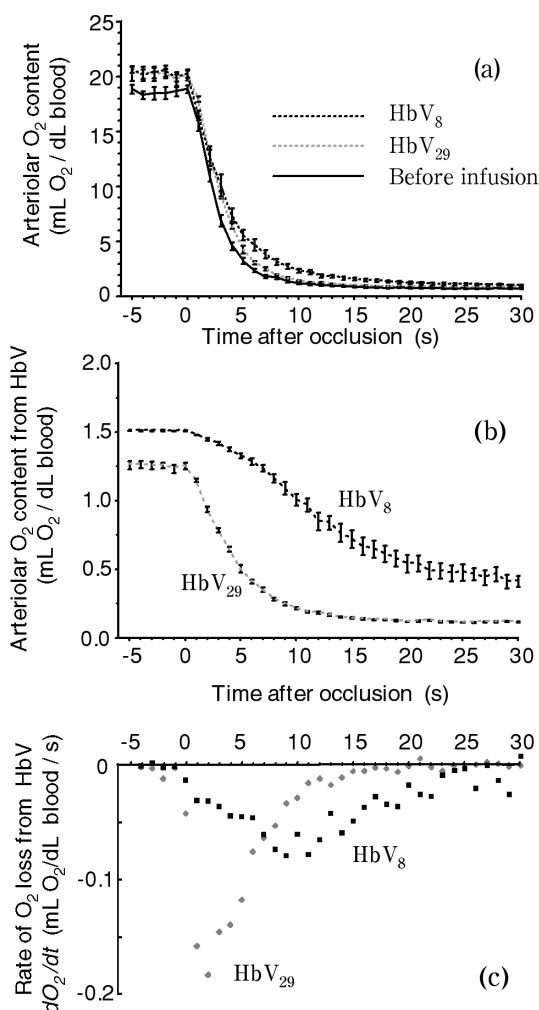


Fig. 5. (a) Time course of the arteriolar O₂ content in the whole blood of an occluded arteriole before and after infusion of 7 mL/kg HbV₈ or HbV₂₉ into hamsters. The O₂ contents are calculated using the equation (II) and the data of OECs (Fig. 1.) and pO₂ changes (Fig. 3.). (b) Time course of the O₂ content derived from HbV in the blood. The contributions of HbV are derived from the data in Fig. 5.(a) and magnified in scale. (c) Rate of O₂ loss from HbV. The graphs in Fig. 5.(b) were differentiated and plotted. (Cited from: Sakai et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;288:H2897-H2903)

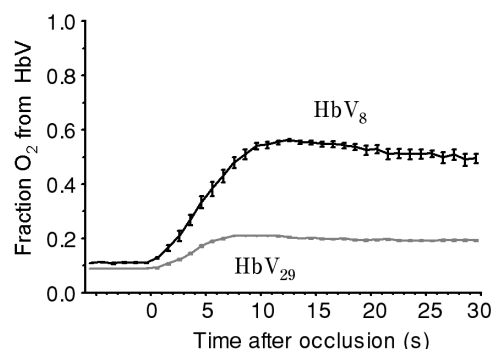


Fig. 6. Time course of the fraction of O₂ content from HbV in the whole blood. The extended time of occlusion induced hypoxic condition and the fraction of O₂ content from HbV₈ increased significantly in comparison with HbV₂₉. (Cited from: Sakai et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;288:H2897-H2903)

考 察

本研究では、酸素親和度を高く (P_{50} 値を小さく) 設定した HbV₈ ($P_{50} = 8$ mmHg) が、HbV₂₉ よりも酸素放出が遅いことがハムスター細動脈遮断モデルで具体的に示すことが出来た。また低酸素状態では HbV₂₉ ではなく HbV₈ が主要な酸素供給源になることも明示できた。

細動脈血流を急激に遮断すると、酸素含量は低下する。同様の現象はRichmondらがラット僧帽筋組織で観測している²³⁾。細動脈管壁で多くの酸素が消失する結果が最近報告されており、通常の組織に比較して血管壁で酸素が多く消費されと考えられ^{9, 35, 42)}、本実験における急激な pO_2 値の低下も、一部は同様の理由と考えられる。本実験では、正常な皮下組織において細動脈1本のみ血流を遮断し、 pO_2 が 5 mmHg まで低下したが、これはラット僧帽筋の臨界 pO_2 値 2.9 ± 0.5 mmHg よりも高い値である²³⁾。血流遮断によって酸素供給は顕著に低下するが、周辺の細動脈、細静脈および毛細血管からの酸素の拡散がある。そのため、組織全体への血流を遮断しているRichmondらの実験に比較して高い pO_2 値で平衡に達したものと考えられる。酸素結合解離曲線 (Fig. 1) より、5 mmHg のとき SO_2 (HbV₈) は 26% と見積もられる。これは HbV₂₉ (6%) および赤血球 (2%) に比較して高い値であり、HbV₈ は血流を遮断した後、長時間に亘って酸素供給源となり、Fig. 6 に示すようにその分率は 0.5 を超え、赤血球をも上回った。

本実験モデルの問題点として、 SO_2 の算出において、細動脈内の環境が酸素結合解離曲線を測定する時の条件と同じと仮定していることである。しかし、Hb の酸素親和度は、温度、pH、電解質、 CO_2 濃度によって変化する。血流遮断によって生じる局所的な虚血は、pH の低下、 CO_2 濃度の増大などをもたらす、酸素親和度の僅かな低下 (P_{50} 値の上昇) が予想される。しかし、僅か 30 秒の短い血流遮断が大きな変化をもたらすとは考えられない。

我々は以前に、人工のプラスチック製の細管 (内径: 28 μ m) 内に Hb 溶液を一定流速で流動させ (1 mm/s)、細管を亜ニチオン酸溶液に浸して管壁を透過した酸素を消費させることにより、Hb の酸素放出速度を測定した。すると、Hb 溶液は赤血球に比べ酸素放出が速くなることが解った。対照的に HbV ではそのような効果は見られず、赤血球と同等の酸素放出を示した³¹⁾。この違いは、酸素が結合した小さい Hb 分子が拡散する事による促進輸送効果に起因する^{21, 31)}。対照的に HbV (粒径 250 nm) は大きいため十分な拡散効果が得られず、促進輸送が見られなかったと考えられる。この条件では、酸素親和度 (P_{50}) が酸素放出速度と血管壁への酸素供給における決定的因子となる。今回の実験結果は、HbV の存在は pO_2 値および酸素含量の低下を促進するのではなく、むしろ低下を遅延させる効果を有することを示している。

本実験は、血流を遮断した微小血管からの酸素放出の特性を明らかにすることを目的としており、臨床的な虚血性疾患とは直接的な関係は無い。なぜならば、僅か 30 秒間の一本の細動脈の血流遮断は、周辺の組織を虚血状態に陥れることは無いからである。しかし、今回の結果は、HbV₈ が虚血性状態のように組織 pO_2 が極度に低下した条件で主要な酸素供給源になりうることを示している。少量の HbV₈ 投与のため (10 mL/kg)、血流遮断後の酸素含量 (5 mL O_2 /dL, 5 秒後) は、ベースライン (20 mL O_2 /dL, 0 秒) に比較して極めて少ない。HbV の寄与を高めるには、投与量を多くすることと、血流の維持が必要になる。Contaldo らは最近、HbV ($P_{50} = 15$ mmHg) をデキストランに分散させた溶液を用いハムスターの 50% 血液希釈を行い、有茎皮弁の虚血領域の酸素分圧が改善する効果を得ている⁷⁾。このことは、低 P_{50} 値の HbV が上流の血管で酸素を放出せずに保持し、血流速度が遅いと予想される側副血管を経由して虚血領域にまで酸素を運搬してから放出した為と考えられる。小粒径の HBOC は赤血球が通過できない収縮血管、狭窄血管を通過できるので、虚血領域の酸素化が期待されている。しかし、Contaldo らの結果も本実験の結果もこれを支持するものではない。それは、細動脈を完全に結紮或は遮断しているからである。重要なのは、HbV も含め粒径の小さい HBOC が血漿層に均一に分散していることである。これによって赤血球に比較して末梢組織により均一に酸素を運搬することができる。疾患のある場合に特に末梢血管内の Hct 値にばらつきがあるからである。このような条件で、酸素親和度の高い HbV がより遅い酸素放出を示し、虚血領域の酸素化に有効であると考えられる。

HbV はその酸素親和度 (P_{50}) を PLP の添加で調節できる特徴を有する^{33, 45)}。最近、低 P_{50} 値 (高い酸素親和度) の HBOC が虚血領域への標的酸素輸送に効果的であることが報告された^{2, 3, 41, 43)}。本実験モデルは人工酸素運搬体の設計と最適化を行うために有用な結果を提供することができる。また本研究により、虚血性疾患の治療法として HbV を使用することの可能性を提示することができた。

謝 辞

ハムスター実験モデルの作製を行った A. Barra 氏、C. Walser 女史 (カリフォルニア大学サンディエゴ校)、試料調製の協力を頂いた武岡真司教授、宗慶太郎博士 (早稲田大学)、また虚血領域の酸素化について議論をして頂いた D. Erni 博士 (ベルン大学附属 Inselspital 病院) に感謝申し上げます。本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・臨床機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)、USPHS NIH Bioengineering Partnership grant R24-HL 64395, grants R01 HL 40696, R01 HL 62354 により推進された。記して謝意を表する。

参考文献

1. Awasthi VD, Garcia D, Klipper R, Goins BA, and Phillips WT. Neutral and anionic liposome-encapsulated

- hemoglobin: effect of postinserted poly (ethylene glycol)-distearoylphosphatidylethanolamine on distribution and circulation kinetics. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;309:241-248.
2. Baines AD, Adamson G, Wojciechowski P, Pliura D, Ho P, and Kluger R. Effect of modifying O₂ diffusivity and delivery on glomerular and tubular function in hypoxic perfused kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 1998;274:744-752.
 3. Baines AD, and Ho P. O₂ affinity of cross-linked hemoglobins modifies O₂ metabolism in proximal tubules. *J Appl Physiol* 2003;95:563-570.
 4. Buehler PW, and Alayash AI. Toxicities of hemoglobin solutions: in search of in-vitro and in-vivo model systems. *Transfusion* 2004;44:1516-1530.
 5. Chang TMS. *Blood substitutes: principles, methods, products, and clinical trials*. Karger, Basel, 1997.
 6. Cabrales P, Sakai H, Tsai AG, Tsuchida E, and Intaglietta M. Oxygen transport by low and normal P₅₀ hemoglobin vesicles in extreme hemodilution. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288: - (in press).
 7. Contaldo C, Schramm S, Wettstein R, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Leunig M, Banic A, and Erni D. Improved oxygenation in ischemic hamster flap tissue is correlated with increasing hemodilution with Hb vesicles and their O₂ affinity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H1140-H1147.
 8. Djordjevich L, Mayoral J, Miller IF, and Ivankovich AD. Cardiorespiratory effects of exchange transfusions with synthetic erythrocytes in rats. *Crit Care Med* 1987;15:318-323.
 9. Duling BR, and Berne RM. Longitudinal gradients in periarteriolar oxygen tension. A possible mechanism for the participation of oxygen in the local regulation of blood flow. *Circ Res* 1970;27:669-678.
 10. Endrich B, K. Asaishi, A. Gotz, and K. Messmer. Technical report: a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)* 1980;177: 125-134.
 11. Erni D, Wettstein R, Schramm S, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Leunig M, and Banic A. Normovolemic hemodilution with hemoglobin-vesicle solution attenuates hypoxia in ischemic hamster flap tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H1702-H1709.
 12. Goda N, Suzuki K, Naito S, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T, and Suematsu M. Distribution of heme oxygenase isoform in rat liver: topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest* 1998;101:604-612.
 13. Intaglietta M, Johnson PC, and Winslow RM. Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res* 1996;32:632-643.
 14. Intaglietta M, Silverman NR, and Tompkins WR. Capillary flow velocity measurements in vivo and in situ by television methods. *Microvasc Res* 1975;10:165-179.
 15. Intaglietta M, and Tompkins WR. Microvascular measurements by video image shearing and splitting. *Microvasc Res* 1973;5:309-312.
 16. Izumi Y, Sakai H, Hamada K, Takeoka S, Yamahata Y, Kato R, Nishide H, Tsuchida E, and Kobayashi K. Physiologic responses to exchange transfusion with hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier in anesthetized rats: changes in mean arterial pressure and renal cortical tissue oxygen tension. *Crit Care Med* 1996;24: 1869-1873.
 17. Kerger H, Torres Filho IP, Rivas M, Winslow RM, and Intaglietta M. Systemic and subcutaneous microvascular oxygen tension in conscious Syrian golden hamsters. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1995;267:H802-H810.
 18. Kyokane T, Norimizu S, Tani H, Yamaguchi T, Takeoka S, Tsuchida E, Naito M, Nimura Y, Ishimura Y, and Suematsu M. Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated rat liver. *Gastroenterology* 2001;120:1227-1240.
 19. Linberg R, Conover CD, Shum KL, and Shorr RGL. Increased tissue oxygenation and enhanced radiation sensitivity of solid tumors in rodents following polyethylene glycol conjugated bovine hemoglobin administration. *In Vivo* 1998;12:167-174.
 20. Lipowsky HH, and Zweifach B. Application of the 'two slit' photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates. *Microvasc Res* 1978;15: 93-101.
 21. McCarthy MR, Vandegriff KD, and Winslow RM. The role of facilitated diffusion in oxygen transport by cell-free hemoglobins: implications for the design of hemoglobin-based oxygen carriers. *Biophys Chem* 2001;92:103-117.
 22. Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, and Treese FA. A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* 1979;18:311-318.
 23. Richmond KN, Shonat RD, Lynch RM, and Johnson PC. Critical Po₂ of skeletal muscle in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999;277:H1831-1840.
 24. Rudolph AS, Klipper RW, Goins B, and Phillips WT. In vivo biodistribution of a radiolabelled blood substitute: ^{99m}Tc-labeled liposome-encapsulated hemoglobin in an anesthetized rabbit. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10976-10980.
 25. Sakai H, Hara H, Tsai AG, Tsuchida E, Johnson PC, and

- Intaglietta M. Changes in resistance vessels during hemorrhagic shock and resuscitation in conscious hamster model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999;276:563-571.
26. Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, and Intaglietta M. Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension in conscious hamster model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:908-915.
 27. Sakai H, Hisamoto S, Fukutomi I, Sou K, Takeoka S, and Tsuchida E. Detection of Lipopolysaccharide in hemoglobin-vesicles by *Limulus* amebocyte lysate test with kinetic-turbidimetric gell clotting analysis and pretreatment with a surfactant. *J Pharm Sci* 2004;93:310-321.
 28. Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, Ikeda E, Takeoka S, Kobayashi K, and Tsuchida E. Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial systems. *Am J Pathol* 2001;159:1079-1088.
 29. Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, Ikeda E, Sou K, Takeoka S, Suematsu M, Kobayashi K, and Tsuchida E. Physiologic capacity of reticuloendothelial system for degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusion for 14 days. *J Pharmacol Exp Therap* 2004;311:874-884.
 30. Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, Yamamoto M, Ikeda E, Takeoka S, Kobayashi K, and Tsuchida E. Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. *Crit Care Med* 2004;32:539-545.
 31. Sakai H, Suzuki Y, Kinoshita M, Takeoka S, Maeda N, and Tsuchida E. O₂-release from Hb-vesicles evaluated using an artificial narrow O₂-permeable tube: comparison with RBC and acellular Hb. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H2543-H2551.
 32. Sakai H, Takeoka S, Yokohama H, Seino Y, Nishide H, and Tsuchida E. Purification of concentrated Hb using organic solvent and heat treatment. *Protein Expression Purif* 1993;4: 563-569.
 33. Sakai H, Tsai AG, Rohlf's RJ, Hara H, Takeoka S, Tsuchida E, and Intaglietta M. Microvascular responses to hemodilution with Hb-vesicles as red cell substitutes: Influences of O₂ affinity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999;276:553-562.
 34. Sakai H, Yuasa M, Onuma H, Takeoka S, and Tsuchida E. Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: objective comparison between cellular and acellular types. *Bioconjugate Chem* 2000;11:56-64.
 35. Shibata M, Ichioka S, Ando J, and Kamiya A. Microvascular and interstitial pO₂ measurements in rat skeletal muscle by phosphorescence quenching. *J Appl Physiol* 2001;91:321-327.
 36. Shirasawa T, Izumizaki M, Suzuki YI, Ishihara A, Shimizu T, Tamaki M, Huang F, Koizumi KI, Iwase M, Sakai H, Tsuchida E, Ueshima U, Inoue H, Koseki H, Senda H, Kuriyama T, and Homma I. Oxygen affinity of hemoglobin regulates O₂ consumption, metabolism, and physical activity. *J Biol Chem* 2003;278:5035-5043.
 37. Sou K, Naito Y, Endo T, Takeoka S, and Tsuchida E. Effective encapsulation of proteins into size-controlled phospholipid vesicles using freeze-thawing and extrusion. *Biotechnol Progr* 2003;19:1547-1552.
 38. Takeoka S, Teramura Y, Atoji T, and Tsuchida E. Effect of Hb-encapsulation with vesicles on H₂O₂ reaction and lipid peroxidation. *Bioconjugate Chem* 2002;13:1302-1308.
 39. Tomson FN and Wardrop KJ. Clinical chemistry and hematology. In: Laboratory Hamsters, edited by van Hoosier GL Jr and McPherson CW. Orlando, FL: Academic, 1987; Chapt. 3
 40. Torres Filho IP, and Intaglietta M. Microvascular Po₂ measurements by phosphorescence decay method. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1993;265:1434-1438.
 41. Tsai AG, Kerger H, and Intaglietta M. Microcirculatory consequences of blood substitution with $\alpha\alpha$ -hemoglobin. In "Blood Substitutes: Physiological Basis of Efficacy" Eds. by Winslow RM, Vandegriff K, Intaglietta M. Birkhauser, Boston, 1995;155-174.
 42. Tsai AG, Friesenecker B, Mazzoni MC, Kerger H, Buerk DG, Johnson PC, and Intaglietta M. Microvascular and tissue oxygen gradients in the rat mesentery. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6590-6595.
 43. Tsai AG, Vandegriff KD, Intaglietta M, and Winslow RM. Targeted O₂ delivery by low-P₅₀ hemoglobin: a new basis for O₂ therapeutics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285: H1411-H1419.
 44. Vanderkooi JM, Maniara G, Green TJ, and Wilson DF. An optical method for measurement of dioxygen concentration based on quenching of phosphorescence. *J Biol Chem* 1987;262:5476-5482.
 45. Wang L, Morizawa K, Tokuyama S, Satoh T, and Tsuchida E. Modulation of oxygen-carrying capacity of artificial red cells (ARC). *Polymer Adv Technol* 1992;4:8-11.

日本血液代替物学会 総会

- | | |
|---|---|
| <p>1. 日 時 :
平成18年 8月24日 (木)</p> <p>2. 場 所 :
慶應義塾大学医学部北里記念図書館 2階 北里講堂
〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35</p> | <p>3. 議 題 :
報告事項 ① 第13回年次大会の報告
② 会員動向
③ 委員会報告
④ 平成17年度事業報告
⑤ 平成17年度収支決算
⑥ 平成18年度事業 (実績報告)</p> |
|---|---|

以下審議内容を略記します。

報告事項

①年次大会の開催状況として下記事項が報告された。

- 1) 第13回日本血液代替物学会年次大会
- 2) 平成18年 8月24日 (木) ~25日 (金)
- 3) 東京都新宿区信濃町 35 慶應義塾大学医学部北里講堂
- 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の参加があった。

②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：144名
- 4) 購読会員：19箇所
- 5) 学生会員：1名

③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17年度：第13巻2号、3号発行。
 - ・平成18年度：第13巻4号、第14巻1号、2号、3号発行。

④平成17年度事業報告 (平成17年4月1日~平成18年3月31日) が行われ各々承認された。

- 1) 定期総会の開催
平成17年 6月7日 (火) 早稲田大学国際会議場にて開催。
- 2) 第12回年次大会 (大会長 武岡 真司)
平成17年 6月6日 (月)、7日 (火)
早稲田大学国際会議場で行われた。

⑤平成17年度収支決算報告が行われ承認された。

平成17年度 会計 収支決算表 (学会事務局)
(自 平成17年 4月1日 至 平成18年 3月31日)

収 入		支 出	
摘 要	金 額	摘 要	金 額
前期繰越金	12,811,533	会誌出版費	1,627,070
正会員会費	620,000	集会・委員会費	661,236
入会金	25,000	年会補助金	1,500,000
賛助会員会費	1,600,000	ホームページ維持費	1,500,000
維持会員会費	6,000,000	事務人件費	2,159,760
購読会員会費	54,000	事務費	414,514
雑収入	70,710	人工血液をつくる(6)開催費助成	522,462
利息	2,275	基金に繰り入れ	2,000,000
		次期繰越金	10,798,476
計	21,183,518	計	21,183,518

⑥平成18年度事業 (実績報告)

- 1) 定期総会の開催
平成18年 8月24日 (木) 慶應義塾大学医学部北里講堂にて開催。
- 2) 第13回年次大会の開催 (大会長 末松 誠)
平成18年8月24日 (木)、25日 (金) 於 慶應義塾大学医学部北里講堂
- 3) 「人工血液」の発行
- 4) 「人工血液をつくる (7)」後援

理事会報告

平成18年 3月23日に理事会が開催された。

- 1) 平成18年度事業/会計経過報告
- 2) 平成19年度事業計画/予算案
- 3) 第14回年次大会準備経過報告
- 4) 委員会報告
- 5) 役員の確認
- 6) 次期会長、大会長について

以上が報告、審議された。

現行役員は下記の通り。

日本血液代替物学会 役員名簿

顧問	尾形利郎	東海大学医学部 名誉教授	監事	西 勝英	肥後医育振興会 理事
	高久史磨	自治医科大学 学長		半田 誠	慶應義塾大学医学部 准教授
	堀 原一	筑波大学 名誉教授		平澤博之	千葉大学 名誉教授
	遠山 博	埼玉医科大学総合医療センター 名誉所長		堀之内宏久	慶應義塾大学医学部 准教授
会長	小林紘一	慶應義塾大学医学部 教授	（事務局）	四津良平	慶應義塾大学医学部 教授
副会長	池田康夫	慶應義塾大学医学部 教授		清水 勝	杏林大学医学部 前客員教授
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
	川村明夫	札幌北楡病院 理事長		堀之内宏久	慶應義塾大学医学部 准教授
	末松 誠	慶應義塾大学医学部 教授	（会誌担当）	武岡真司	早稲田大学理工学部 教授
	高折益彦	東宝塚さとう病院 名誉院長		藤島清太郎	慶應義塾大学医学部 講師
	武岡真司	早稲田大学理工学部 教授	（HP担当）		
	土田英俊	早稲田大学理工学部 名誉教授			

日本血液代替物学会 評議員名簿

青木 克憲	浜松医科大学 教授	高木 智史	(株)オキシジェニクス 会長
	聖マリアンナ医科大学 教授		自治医科大学 学長
	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		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 晃	山形大学医学部 准教授
	北海道赤十字血液センター		東京大学医科学研究所 教授
東 寛	筑波大学 名誉教授	高橋 恒夫	早稲田大学理工学部 教授
阿部喜代司	北海道赤十字血液センター 所長	武岡 真司	日本赤十字社血液事業本部
池田 久實	慶應義塾大学医学部 教授	田所 憲治	早稲田大学理工学部 名誉教授
池田 康夫	埼玉医科大学 教授	土田 英俊	埼玉医科大学総合医療センター 名誉所長
池淵 研二	弘前大学医学部 准教授	遠山 博	東京医科大学 教授
石原 弘規	京都府立医科大学 准教授	友田 燁夫	東部地域病院 元院長
伊藤 俊之	順天堂大学医学部 教授	豊田 忠之	東北大学医学部 准教授
稲田 英一	筑波大学基礎医学系 名誉教授	仲井 邦彦	血液製剤調査機構 元理事
大島 宣雄	岐阜大学医学部 講師	中井 一士	筑波大学臨床医学系 教授
大塚 節子	近畿大学医学部 教授	長澤 俊郎	三菱ウェルファーマ(株) 生物製剤本部長
大柳 治正	東海大学医学部 名誉教授	中島 常隆	肥後医育振興会 理事
尾形 利郎	東京大学大学院工学系研究科 教授	西 勝英	早稲田大学理工学部 教授
片岡 一則	札幌北楡病院 理事長	西出 宏之	ナノキャリア株式会社
川村 明夫	藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授	西谷 孝子	慶應義塾大学医学部 准教授
黒澤 良和	慶應義塾大学医学部 教授	半田 誠	千葉大学 名誉教授
小林 紘一	名古屋セントラル病院 院長	平澤 博之	神戸学院大学薬学部製剤学 准教授
小室 勝利	早稲田大学理工学部 教授	福島 昭二	東京女子医科大学 教授
斎藤 英彦	早稲田大学理工学部 准教授	藤井 寿一	慶應義塾大学医学部 講師
酒井 清孝	早稲田大学理工学部 准教授	藤島清太郎	(財)化学及血清療法研究所 常務理事
酒井 宏水	カレスサッポロ北光記念クリニック 所長	船津 昭信	北里大学医学部 教授
佐久間一郎	東京女子医科大学 名誉教授	外 須美夫	慶應義塾大学医学部 准教授
桜井 靖久	ニプロ(株) 医薬品研究所 所長	堀 進悟	筑波大学 名誉教授
佐藤 誠	青山学院大学理工学部 名誉教授	堀 原一	慶應義塾大学医学部 准教授
鮫島 達也	杏林大学医学部 前客員教授	堀之内宏久	埼玉医科大学総合医療センター 教授
清水 勝	京都大学再生医科学研究所 教授	宮尾 秀樹	札幌通信病院 名誉院長
清水 慶彦	日本赤十字血液事業本部	宮崎 保	慶應義塾大学医学部 教授
十字 猛夫	中央血液研究所 前所長	村田 満	順天堂大学 名誉教授
	慶應義塾大学医学部 教授	湯浅 晋治	慶應義塾大学医学部 教授
	鹿児島大学医学部 名誉教授	四津 良平	札幌北楡病院 院長
末松 誠	東宝塚さとう病院 名誉院長	米川 元樹	
平 明			
高折 益彦			

(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：（役員の選任）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、会長が必要と認めたとき、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、确实な有価証券を購入するか、または定額郵便貯金とするか、もしくは确实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●

会誌“人工血液”が創刊されて既にVol.14まで来ております。多くの専門の先生方から寄稿して頂きました。本号の総説にもあるように、研究では“造血幹細胞による人工的な血球細胞の誘導と増幅”の段階まで進められているものの、酸素運搬体の開発動向を見る限り具体的な製品が上市されるまでの道のりは大変険しい状況で、そのギャップは益々広がる様に思えます。

それは、先端生命科学と生産工学のギャップなのか、産と学のギャップなのか、色々な見方があると思うが、そのギャップを埋める努力をどこかが行い、そして行い続けなければならないのだらうと考えるこの頃です。

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

[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。

二次掲載について

人工血液では、他の言語ですでに掲載された論文を和文で二次掲載することは二重投稿ではなく正当な掲載と認めますが、以下の事項を遵守してください。

- 1) すでに掲載された論文であること。
- 2) 著者は両方の雑誌の編集者より許可を得ていること。二次掲載する編集者に最初に掲載されたもののコピー、別刷、もしくは原稿のいずれかを添付すること。
- 3) 論旨を変えないこと。執筆者は同一（順不同）であること。
- 4) 二次掲載版のタイトル・ページに掲載される脚注には、その論文の全体もしくは一部分がすでに掲載されている旨を明記し、更に初出文献も示すこと。適切な脚注の例を以下に示す。「This article is based on a study first reported in the [...]雑誌タイトル(完全な典拠情報を添えたもの) [...]」(訳：この論文記事は、[...]に最初に報告された研究に基づくものである)。

これらの要件を満たしている場合は、その旨を明記して、総説または論文記事（二次掲載）として投稿してください。

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、寺嶋克幸、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 (4) 2007年5月25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