

人工血液

第 15 卷 第 1 号 2007 年 6 月

目 次

第14回年次大会プログラム	2
---------------------	---

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 15 No. 1 June, 2007

Contents

<i>The 14th Annual Meeting Program</i>	<i>2</i>
----------------------------------------------	----------

第14回日本血液代替物学会年次大会

The 14th Annual Meeting of
The Society of Blood Substitutes, Japan

テーマ：「人工血液の未来を語ろう」

大会長：半田 誠（慶應義塾大学 輸血・細胞療法部）

会期：平成19年6月14日(木), 15日(金)

会場：慶應義塾大学 三田キャンパス 北館

大会事務局：〒160-8582 東京都新宿区信濃町35
慶應義塾大学 輸血・細胞療法部
第14回 日本血液代替物学会年次大会事務局

第14回日本血液代替物学会年次大会のご挨拶

この度は第14回を迎えました日本血液代替物学会の年次大会をお世話することとなりました。

本年次大会では、人工血液という特化したテーマについて、年に一度、専門家や関係者あるいは興味を持たれている方々が一堂に会して議論し、情報交換する絶好の機会とすべき、プログラムが企画されてきました。そして、今回のテーマを“人工血液の未来を語ろう”とさせていただきます。現実には立ちがなかった大きな壁を越える原動力は未来（将来）へ向けた夢や希望です。

まず、特別講演「人工血液に期待する」で、それぞれの立場から三方に応援演説をいただき、大会長シンポジウム「人工血液の将来展望」で、それぞれの個別領域での現状と将来（未来）を語っていただきます。また、教育講演として「赤血球の膜機能」と「人工止血剤の可能性」についてその道の権威から話を賜ります。そして、シンポジウム1「人工血液研究の最前線」では、新たな材料と可能性について夢を語っていただけるかと思えます。

当然の如く、学会の中心テーマは人工酸素運搬体です。その中で、まさに人工赤血球と呼ぶにふさわしく、ヘモグロビンを内包化した脂質小胞体は、我が国が世界をリードし、開発してきた期待の人工血液です。今回、一般演題から6題を集めてシンポジウム2「人工酸素運搬体の適応」を急遽編成するとともに、指定ならびに公募で計9演題から成るシンポジウム3「人工酸素運搬体の諸問題」を企画し、プロジェクトチームによる忌憚のない討論の場を設けました。今回の目玉として十分な時間を設定しましたので、競合関係乗り越えて、ぜひ思う存分意見交換をしていただき、一丸となった夢の実現化を目指していただきたいと存じます。

最後に、当方の怠慢により、プログラムの編成等が大幅に遅れ、その結果、多くの方々に失礼かつ無理なお願いをさせていただくこととなりました。ここに改めて皆様に深謝するとともに、当方の無理難題を快くお引き受けいただいた方々に厚く御礼を申し上げます。できうる限り多くの皆様のご参加を心よりお待ちしております。

第14回日本血液代替物学会年次大会

大会長 半田 誠

お知らせとお願い

会員・参加者の方へ

開場及び受付開始

開場、及び受付開始時間は6月14日(木)8:45~、15日(金)8:15~です。

参加登録

参加登録費は10,000円です。なお、事前受付は行いません。

ネームカードをお渡ししますので、所属・氏名を各自でご記入の上、ご着用ください。会期中は会場内で必ず着用ください。

年会費及び新入会受付

日本血液代替物学会に未入会の方は、学会受付で手続きをとってください。

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

抄録集

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

呼び出し

会場内での呼び出しは行いません。

会員懇親会

初日(6月14日、木)18時より(終了20時)、北館2階ファカルティクラブ(会場内、ホールに隣接)で行います。参加費は無料ですので、多数の参加をお願いいたします。

昼食

北館2階ファカルティクラブ(教職員専用食堂)や1階の学生食堂をご利用いただくと便利です。なお、ホール内での飲食は禁止です。

演題発表される方へ

1. 本学会の発表はPCプロジェクターで行いますのでご了承ください。
2. 事務局で発表用のPCを用意致します。事務局PCはWindows XP/Office2003及びMacintosh OS10/Office2004です。
3. 当日はUSBフラッシュメモリー、CD、PCカード等のバックアップデータを必ず用意ください。当日のデータ及びバックアップとして使用させていただきます。
4. 発表の60分前までに受付にいらっしゃって試写を行ってください。
5. ご自身のPCでの発表を希望される場合は、プロジェクターとミニD-Sub15ピン(オス)のケーブルを用意します。これに合わない形状の出力端子の場合はご自身で「変換アダプター」をご用意ください。
6. なお、事務局より発表形式についてのアンケートを事前にお送りしております。まだ、回答されていない方は至急事務局宛に回答をお寄せください。

各種会議日程

理事会：6月14日(木) 11:30 - 12:30 会場 会議室2

評議員会：6月14日(木) 12:30 - 13:00 会場 会議室2

総会：6月15日(金) 12:00 - 12:15 会場 ホール

大会事務局

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学 輸血・細胞療法部

電話(代表)03-3353-1211、内線 62123

(ダイヤルイン)03-5363-3715

ファックス 03-3353-9706

メール mhanda@sc.itc.keio.ac.jp

学会のホームページにて、最新のお知らせ、注意事項、プログラムなどを掲載しています。あわせてご確認、ご利用ください。

学会ホームページ：<http://www.blood-sub.jp/>

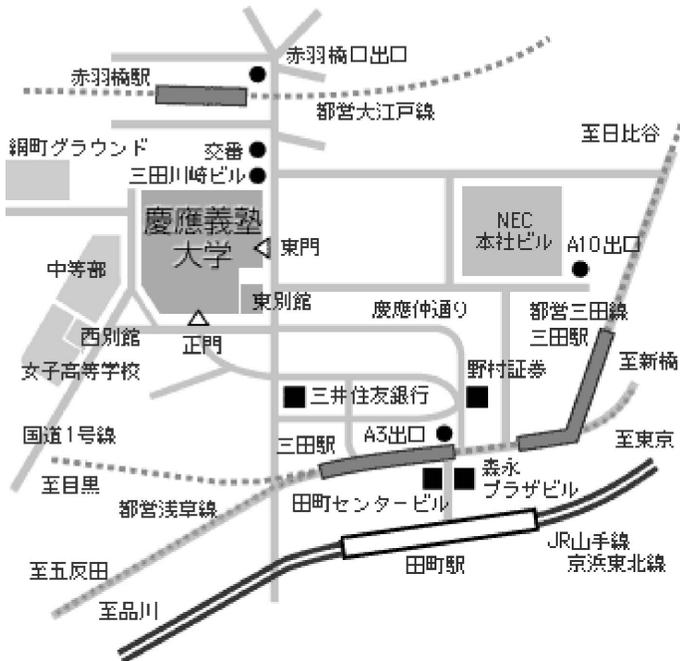
大会日程表

6/14 (木)		6/15 (金)	
09:00	会場：北館2階 ホール	09:00	一般演題 (6題) 座長：谷慶彦 (大阪府赤十字)、 藤原満博 (北海道赤十字)
09:45		09:30	
10:00	開会	10:00	特別講演：人工血液に期待する 座長：池田康夫 (慶大)
10:30	シンポ1：人工血液研究の最前線 座長：小松晃之 (早大)、根矢三郎 (千葉大)	10:30	
11:00	(4題)	11:00	総会 (北館2階 ホール)
11:30	理事会 (北館2階 会議室2)	11:30	
12:00	評議員会 (北館2階 会議室2)	12:00	昼休み
12:30		12:30	
13:00	教育講演1：赤血球が語る膜機能 高桑雄一 (女子医大)	13:00	教育講演2：リコンビナント活性型第 因子製剤 新井盛大 (ノボ)
13:30	13:30		
14:00	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 (早大)	14:00	シンポ3：人工酸素運搬体の諸問題 座長：酒井宏水 (早大)、川口章 (東海大)
14:30	(5題)	14:30	
15:00	シンポ2：人工酸素運搬体の適応 座長：木下学 (防衛医大)、寺嶋克幸 (日本医大)	15:00	(9題)
15:30		15:30	
16:00	(6題)	16:00	閉会
16:30	懇親会 (北館2階 ファカルティクラブ)	16:30	
17:00		17:15	
17:30	17:30	18:00	
18:00			

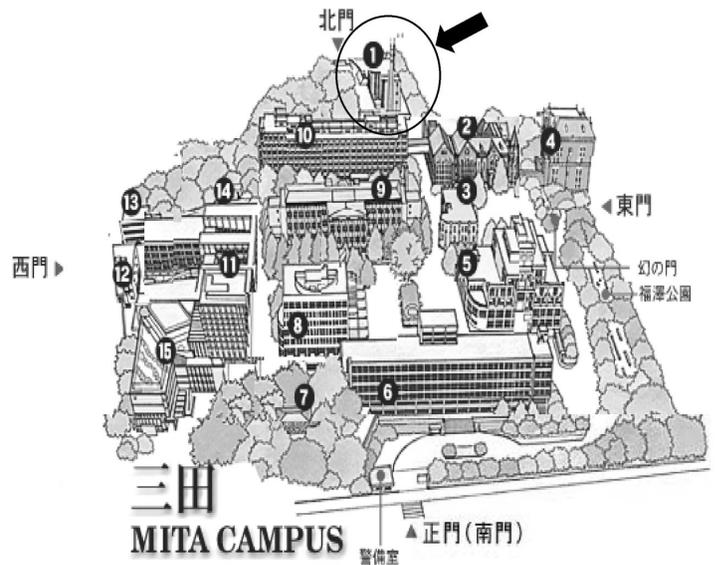
交通案内図

会場案内

慶応義塾大学 三田キャンパス
 北館2階 (ホール、会議室1、2)
 〒108-8345 東京都港区三田2-15-45
 TEL : 03-3453-4511 (代)



三田キャンパス構内図



JR山手線、京浜東北線

田町駅下車 (徒歩約8分): 正門より入る

都営地下鉄浅草線

都営地下鉄三田線

三田駅下車 (徒歩約7分): 正門より入る

都営地下鉄大江戸線

赤羽橋駅下車 (徒歩約8分): 東門より入る

北館

図書館旧館

塾監局

東館

図書館新館

南校舎

三田演説館

大学院校舎

第1校舎

研究室棟

西校舎

購買施設棟

平成19年6月14日(木)

10:00 - 11:30

シンポジウム1：人工血液研究の最前線

座長：小松晃之（早大），根矢三郎（千葉大）

1. 「ミオグロビンの新たな酸素親和性制御因子」，根矢三郎，星野忠次（千葉大学大学院 薬学研究院 薬品物理化学研究室）
2. 「アルブミンを用いた完全合成系人工酸素運搬体の創製」，小松晃之，土田英俊（早稲田大学理工学術院 理工学研究所）
3. 「ヒト血清アルブミンに結合する内因性リガンドによるNO付加・放出制御機構」，丸山徹，異島優，廣山秀一，甲斐俊哉，小田切優樹（熊本大学大学院 医学薬学研究部，ニプロ㈱ 医薬品研究所）
4. 「ヘテロ表裏面を持つ生分解性ナノシートの研究展開」，武岡真司（早稲田大学大学院 先進理工学研究所）

13:00 - 14:00

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）

座長：半田誠（慶大）

14:00 - 16:00

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（早大）

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

16:00 - 18:00

シンポジウム2：人工酸素運搬体の適応

座長：木下学（防衛医大），寺嶋克幸（日本医大）

1. 「出血性ショック時におけるヘモグロビン小胞体の体内動態特性」，田口和明，浦田由紀乃，安楽誠，甲斐俊哉，岩尾康範，土田英俊，小林紘一，小田切優樹（熊本大学大学院 医学薬学研究部，ニプロ㈱ 医薬品研究所，早稲田大学 理工学総合研究センター，慶応義塾大学医学部 外科）
2. 「ラット出血性ショックモデルにおけるHb小胞体の輸液蘇生の主要臓器生体反応」，山梨義高，寺嶋克幸，杖下隆哉，坂本篤裕（日本医科大学 麻酔科学教室）
3. 「ヘモグロビン小胞体（OXY-0301）のラット出血性ショックモデルにおける効果」，古屋利行，森田典子，勢司泰久，小松弘嗣，松浦昭宏，大村孝男，高木智史（株式会社オキシジェニクス）
4. 「大量出血時における人工赤血球の骨髄内投与について」，庄野聡，木下学，高瀬凡平，野上弥志郎，南部正樹，緒方嘉貴，金田伸一，斎藤大藏，石原雅之，山田憲彦，菊地眞（防衛医学講座，防衛医科大学校防衛医学研究センター外傷研究部門，防衛医科大学校防衛医学研究センター医療工学研究部門，防衛医科大学校外科，防衛医科大学校形成外科，テルモ株式会社研究開発センター，防衛医科大学校医用電子工学）
5. 「Beagle犬を用いた40%脱血ショックにおけるHb小胞体の蘇生効果および中長期生存の評価」，池田達彦，堀之内宏久，井澤菜緒子，河野光智，泉陽太郎，渡辺真純，川村雅文，宗慶太郎，酒井宏水，土田英俊，小林紘一（慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科，早稲田大学 理工学部）
6. 「ヘモグロビン小胞体の炎症性腸疾患治療への応用」，河野光智，堀之内宏久，泉陽太郎，酒井宏水，土田英俊，小林紘一（慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科，早稲田大学 理工学術院 理工学研究所）

平成19年6月15日(金)

9:00 - 10:30

一般演題

座長：谷慶彦（大阪府赤十字血液センター）、藤原満博（北海道赤十字血液センター）

1. 「重篤な血小板減少症モデル動物を用いたH12ペプチド結合ポリエチレングリコール修飾アルブミン重合体の止血能評価」藤枝俊宣，岡村陽介，半田誠，池田康夫，武岡真司（早稲田大学大学院 先進理工学研究科，慶應義塾大学医学部）
2. 「ドデカペプチド結合（アデノシン5'-二リン酸）内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果」岡村陽介，前川一平，藤枝俊宣，江藤薫子，池田康夫，半田誠，武岡真司（早稲田大学大学院 先進理工学研究科，慶應義塾大学 医学部）
3. 「Statistically valid structural information on hemoglobin vesicle (HbV) by means of small-angle X-ray scattering (SAXS) and dynamic light scattering (DLS)」Takaaki Sato, Hiromi Sakai, Keitaro Sou, Otto Glatter, and Eishun Tsuchida *Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda Univ., University of Graz.*
4. 「組換えヒト血清アルブミン-プロトヘム錯体におけるヘムポケット構造と酸素結合能の相関」，中川晶人，小松晃之，土田英俊（早稲田大学理工学術院 理工学研究所）
5. 「In vitroにおけるヘモグロビン小胞体のヒトTリンパ球増殖反応に対する影響」藤原満博，高橋大輔，東寛，酒井宏水，宗慶太郎，武岡真司，土田英俊，池田久實（北海道赤十字血液センター，早稲田大学理工学総合研究センター）
6. 「リポソームがラット免疫系に及ぼす影響」高橋大輔，藤原満博，東寛，宗慶太郎，酒井宏水，武岡真司，土田英俊，池田久實（北海道赤十字血液センター，早稲田大学理工学総合研究センター）

10:30 - 12:00

特別講演：人工血液に期待する

座長：池田康夫（慶大）

1. 稲田英一 順天堂大麻酔科（医療者の立場から）
2. 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）
3. 清水勝 西城病院，元日本輸血学会会長（血液事業全体から俯瞰して）

13:30 - 14:30

教育講演2：リコンビナント活性型第 因子製剤：人工止血剤としての可能性（ノボノルディスクファーマ 止血開発企画部 新井盛大）

座長：半田誠（慶大）

14:30 - 17:15

シンポジウム3：人工酸素運搬体の諸問題

モデレータ：酒井宏水（早大），川口章（東海大）

1. 「人工酸素運搬体TRM-645の開発の現状と課題」，金田伸一（テルモ株式会社 研究開発センター）
2. 「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，田中秀幸，片桐伸将，築谷朋典，本間章彦，巽英介，妙中義之（国立循環器病センター研究所 人工臓器部）
3. 「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」，織田禎二（島根大 循環器 呼吸器外科）
4. 「人工酸素運搬体の酸素親和性の影響と効果：脳虚血・再還流モデルによる検討」，川口章（東海大 再生医療科学）
5. 「ヘモグロビン小胞体（OXY-0301）の臨床試験開始へ向けた生物学的評価」，小松弘嗣，古屋利行，森田典子，勢司泰久，松浦昭宏，大村孝男，高木智史，鹿志村剛，平泰彦（株式会社オキシジェニクス，聖マリアンナ医科大学 救急医学教室）
6. 「ヘモグロビン小胞体の血液適合性と免疫系に対する影響」，東寛，藤原満博，池田久實（北海道赤十字血液センター 研究部）
7. 「ヘモグロビン（Hb）小胞体投与における血液検体検査の最適化」，村田満（慶大 医学部 中央臨床検査部）
8. 「ヘモグロビン小胞体に対応できる多波長パルス分光法を用いたパルスオキシメータ」，須崎裕典，酒井宏水，小林直樹，池田達彦，堀之内宏久，小林統一，武田朴，戸川達男，土田英俊（早大 理工学術院，日本光電工業㈱，慶大 医学部）
9. 「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，佐藤敦，宮川賀仁，武岡真司，堀之内宏久，高折益彦，小林統一，土田英俊（早大 理工学術院，慶大 医学部 外科，東宝塚さとう病院）

麻酔科医の立場から

稲田 英一

順天堂大学医学部麻酔科学・ペインクリニック講座

人の体に傷をつければ必ず出血する。外傷や、潰瘍や腫瘍などによる臓器損傷だけでなく、手術でも同様である。輸血は出血量がある程度増加した場合の補充療法として行われる。血漿成分は晶質液や、人工膠質液で補うことも可能である。しかし、酸素を運搬するためのヘモグロビンの補充には、現在のところ赤血球製剤しか存在しない。しかし、赤血球製剤は日本においては献血由来であり、その量が限られているだけでなく、近年献血者は減少傾向にある。特定の血液型の輸血用血液が不足したり、非常に特殊な血液型の血液製剤は常に不足の危険がある。また、赤血球製剤投与に伴う副作用がある。赤血球製剤投与による肝炎やエイズなどの感染症の伝播、輸血関連急性肺傷害 (TRALI)、宿主対移植片反応といった重大な副作用のほか、発熱反応といったマイナーな輸血反応も起こりうる。不適合輸血も重大な問題である。

このような生物製剤に伴う供給の制限や、品質の不均一性といった欠点を補うという点で、人工血液には大きな期待が持たれる。血液型に制限がなければ、不適合輸血の危険や、特定の血液型の輸血用血液の不足といった事態が回避できる。日本麻酔科学会の麻酔関連偶発症例調査によれば、術中の大量出血や急速な出血に関連して死亡している症例が平均すると1例/日程度存在することが明らかになっている。人工血液の備蓄ができれば、輸血が間に合わないことによる出血による予後の悪化は回避できる。期限切れとなる輸血用血液の有効な利用法となる。

もちろん、人工血液に要求される条件もある。人工血液の酸素運搬能とその持続時間も十分に長い必要がある。ヘモグロビンの原料は現在のところ、やはり献血により得られたものである。製品としての安定性や均一性のほか、保存期間が十分に長いこと、保存が容易であることなども必要である。また、人工血液投与による副作用のほか、体内における人工血液の安定性や寿命、体内での代謝、排泄経路も重要である。あまり高価なものであっても困る。大量出血が起きた場合には、ヘモグロビンだけではなく、凝固因子や血小板の補充も必要となる。

血液型を問わず輸血ができ、生物製剤に伴う副作用が減少した人工血液に期待されるところは大きい。

血液代替物 エホバの証人の立場から

有賀 友則

エホバの証人の医療機関情報デスク

エホバの証人は命を大切にしており、命を長らえるために、道理にかなったことは何でも行なう。したがって、良質の医療を求め、ほとんどの医療処置を受け入れる。しかし、聖書に基づく宗教上の理由から、同種血輸血は受け入れず、無輸血で行なわれる代替療法を求める。こうした理由から、エホバの証人は血液代替物の開発にも関心を抱いている。

エホバの証人は宗教信条に基づき輸血を受け入れない。聖書は『血を避けている』ように述べている。(使徒 15:28,29) エホバの証人はその宗教上の理解に基づき、全血とその主要成分、つまり赤血球、白血球、血小板、血漿を受け入れない。これら主要成分のいずれかから取られた分画については、個々の証人が自らの良心に基づいて決定を下す。この原則は血液代替物の使用にも当てはまる。もっとも、血液代替物が遺伝子組み換えあるいは全合成系のもので、血液やその分画と無関係であれば、それを受け入れるかどうかは医学的な問題であり、宗教的に異論はない。

世界中で多数の医師がエホバの証人の患者を治療するという課題に取り組んでいる。安全で効果的な輸血の代替療法を用いることにより、難症例の内科的・外科的治療が無輸血で成功裏に行なわれてきた。

新たに開発される血液代替物の臨床試験においては、被験者のインフォームド・コンセントが保障されることは極めて重要である。その製剤のリスクとベネフィットが説明されなければならない。エホバの証人の場合、その宗教上の信条や個々の良心上の決定が尊重されるべきである。安全で効果的な血液代替物が開発され、臨床使用の承認が得られるなら、供血輸血の使用を最小限に抑えたり回避したりするため現在すでに用いられている戦略に加えられることになるだろう。

血液代替物の開発に加え、エリスロポエチンなどの薬剤や、遺伝子組み換え第 因子などの止血剤の適用拡大を今から考慮するのは有益かもしれない。多くの医学文献は、術前の血球値の増加、また白血病などの血液疾患の治療におけるエリスロポエチンの効果を示している。また、遺伝子組み換え第 因子は、手術時の止血や血小板減少症などの血液疾患、またDICなどに効果的であることが報告されている。

エホバの証人は血液代替物や他の代替療法の開発にかかわる専門家の努力に感謝している。こうした開発は、エホバの証人のみならず、世界中のすべての患者に恩恵をもたらすことになるだろう。

血液事業全体から俯瞰して

清水 勝

西城病院, 元日本輸血学会会長

血液を医療機関へ供給する血液事業の立場から, 人工血液に期待することには, 主に三つの事項があるものと考えられる。すなわち, 赤血球 (RCC) の有効利用上の問題, 緊急配送上の課題, 及び将来の赤血球不足への対策に資することにある。

1) 赤血球の有効利用: 血液事業の使命は, 常時十分な血液量を安定的に供給することにある。その結果, ある程度のRCC量が期限切れになり, 廃棄しなければならないことは止むを得ないことである。しかも, 有効期限が21日と短く, A, B, O, ABの血液型別に血液を確保しなければならないことは, RCCの期限切れを増加させる要因となる。また, 例え需要予測により採血計画に採血をしたとしても, 特定の血液型の血液が大量に供給される事態は, 不測的にしばしば見受けられ, それ故に未使用血が増加することも起こりうる。つまり, 廃棄血には, 血液センター (BC) から供給されない未供給分と供給されたが使用されなかった未使用分とがあり, 両者を合わせた量が廃棄されるRCC量ということになる。このような廃棄せざるをえないRCCを人工血液の原料として活用することが考えられる。

近年, 医療機関側が400ml由来のRCCの使用を望むようになってきていることから, 今後一回採血量が200mlの採血をどうするかが問題となる。その解決策には, いくつかの選択肢が検討されているが, 今後とも200ml全血採血を温存していくとすれば, 余剰となる200ml由来のRCCをどのように活用するかが大きな問題である。その対策の一つとして, 採血当初から余剰となるRCCを人工血液の原料として活用することが考えられる。

2) 血液の緊急供給: 緊急時の血液供給は, BCにとって供給までの時間的な制約があることから, 人的・物的・精神的に多大な負担となっているものと推測される。BCからの地理的・時間的に遠隔な地域, 大都会では交通渋滞や緊急発注の頻発, あるいはBC間の血液の需給調整による供給量の確保などの問題を考慮する必要がある。

人工血液の開発により, 緊急供給への時間的制約が緩和されることになるものと期待されることから, 限りある人的・物的 (緊急車両) さらに血液の需給調整等に融通を持てるようになるであろう。それにより, より合理的な血液事業の運営が可能になるものと考えられる。

3) 将来の血液不足対策: 今後益々本格化する高齢化社会においては, 血液, 特にRCCの需要は高まるものと推測され, RCC不足は深刻な問題となるであろう。このような絶対的な血液不足に対して, RCCの適正使用を基本にしたRCC使用量の抑制がある。そのような観点から, 術中輸血における人工血液の使用促進を期待したいが, その具体的な方法には人工血液のみの投与や自己血との併用 (同種血輸血の回避) により, RCCの使用量を削減できることが期待される。

その他, 人工酸素運搬体には, へき地や発展途上国における緊急輸血時の対応にも活用が期待できるものと考えられる。

人工血液の将来展望

小林 紘一

慶應義塾大学 医学部 外科

生命を維持するために生体にはいろいろな解剖学的構造と機能が具像化されている。血液と血液循環もその一つである。血液は赤血球, 血小板, 白血球などを含む細胞成分と液性成分とに分かれる。人体に加わる侵襲として 事故による出血性ショックを考えた場合, 循環血液量の補充, 酸素運搬体である赤血球の補充, また出血が多量に及ぶ時には止血のために血小板の投与が必要となる。赤血球や血小板は生きた細胞であるので保存期間や保存条件に制約がある。どちらも事故の現場ですぐ使用できるよう人工的に作られた代替物があれば有用である。赤血球の場合には血液型を考慮しなくてもよく, 室温でも保存可能な酸素運搬体を持つ人工酸素運搬体の開発が期待されている。人工酸素運搬体の歴史は本邦では1957年の筑島の研究まで遡るが以後パーフルオロカーボン乳剤, 修飾ヘモグロビンなどが提唱されるも実現には到らず, 現在は早稲田大学の土田英俊教授らの開発によるヒトのヘモグロビンを脂質膜の中に取り入れたhemoglobin vesicle (HbV) が臨床応用可能なところまで来ている。HbVは出血性ショックに対する大量使用を前提としているが局所の低酸素症に対する対応, 例えば心筋虚血や脳虚血あるいは低酸素状態にある固型癌の酸素化による治療も可能になると期待されている。一方ヒトヘモグロビンの代りに遺伝子組換えヒトヘモグロビンを使用する試みや遺伝子組換えヒト血清アルブミン分子中に合成ヘムを包接させた新しい型の完全合成型人工酸素運搬体であるアルブミンヘムの開発も進行中である。

血小板は保存可能期限が72時間と短いこと, ウィルス感染や発熱などの反応を伴うことがあること, 生体内での寿命が短いので頻回投与が必要なが多いなどの理由で, 人工血小板の開発が行われている。人工血小板は出血部位にのみ作用し, 組織の修飾後には血栓は溶解され吸収されなければならない。人工血小板の開発の基本は膜受容体が蛋白とそれらを運ぶ担体にこれを固相化することであり, 現在幾つかのモデルが提唱され動物実験も進んでいる。

循環血液量を維持するための代用血漿剤にはヒドロキシエチルスターチやデキストランなどがある。出血性ショックの際にはこれらの投与により血液粘度を維持し血管の虚脱を防ぎ末梢循環不全が改善され酸素代謝を維持することができる。これらの代用血漿剤は抗炎症作用を持ち血管透過性亢進状態の改善, サイトカインや接着因子の抑制などの機能を持っていることが明らかになり, この方面の研究の進歩も大いに期待される。

組替えDNA技術の進歩によりウィルス感染症に対するウィルス中和抗体, 菌毒素に対する毒素中和抗体などの治療用抗体や癌, 自己免疫疾患や神経変性疾患などに対する抗体も開発されつつありいろいろな疾患への対応ができるようになることが期待されている。このように医学, 工学の進歩により血液の成分のうち幾つかは人工的に製造できるような時代になっている。

長い間の夢であった安全で効率の高い人工血液製剤が臨床応用される日が来ることを期待したい。

人工酸素運搬体

高折 益彦
東宝塚さとう病院

人工酸素運搬体の開発が始められてからすでに半世紀以上になる。この間種々の試みがなされてきたが、現状では、そして将来をふくめて過弗化炭素 (perfluorocarbon : PEC) を基剤とした人工酸素運搬体 (PFCBOC) とヘモグロビン (Hb) を基剤とした人工酸素運搬体 (HbBOC) とがその最先端の候補者として考えられている。この中でPFCBOCは数多くの前臨床試験、いくつかの臨床試験は行われてきたがその副作用の面から血液中の赤血球の代替をする人工酸素運搬体として用いられる可能性は少ないように思われる。しかし臓器保存、薬剤転送などへの利用には大きな期待がかけられている。一方HbBOCについてもその副作用の排除にかなりの進歩はあるものの、非細胞型人工酸素運搬体ではなお血液中への投与後に速やかに細胞内にとりいれられて、そしてHbの中核となるヘム鉄の副作用の問題が残されている。また血液内滞留時間を比較的長くしたHemospan (Sangart社) についても本来の人工酸素運搬体としてではなく、むしろ血漿量増量剤としての応用が考えられている。唯一わが国で開発されつつある細胞型人工酸素運搬体、リポソーム内包HbBOCはすべての点において非細胞型人工酸素運搬体の欠点を排除するものではあるが、メト化をいかに防止するか、あるいはリポソーム内で再び還元型への転換を計るかに焦点が向けられる。また酸素運搬量を大きくするための工夫、そして赤血球のような変形能を有するリポソーム体を構成することも必要となろう。さらに現在日本赤十字社から供給される輸血用赤血球製剤と同価格、あるいはさらに多少とも低価格とする努力が必要であろう。これら諸点をふくめてこのシンポジウムで検討したい。

人工 (代用) 血漿

宮尾 秀樹
埼玉医科大学総合医療センター 麻酔科

代用血漿製剤はヒドロキシエチルスターチ、デキストランなどがあるが、一種の人工血漿と言っても良い。演者の施設では2005年の中央手術室での代用血漿およびアルブミンの使用量はそれぞれ1687L, 143Lであった。現在全世界で使用されている代用血漿製剤はデキストラン (以下DEX), ヒドロキシエチルスターチ (以下HES), ゼラチンである。我が国の代用血漿はHESが主流であるが、DEXもゼラチンもそれなりの特徴を持ち、今後も使用されていくと思われる。HESにも他種類があるが、その性質を規定する因子は分子量、置換度、分散度、C2/C6比、溶媒 (電解質濃度や糖濃度) などである。日本で使用されているHESは分子量7万、置換度0.5で記述は「HES70/0.5」の様に表す。溶媒は生理食塩液 (サリンヘス™) と糖やカルシウムイオンを含んだ電解質液 (ヘスパンダー™) のものがある。一方米国はHES670/0.75のものが主流で溶媒は生理食塩液 (ヘスパン™) と0.1%糖加乳酸リンゲル液 (ヘクステンド™) がある。欧州では中分子量のものが主流でHES130/0.4 (ボルベン™), HES260/0.45 (ペントスパン™) などがある。2000年代に入ってHESの抗炎症作用の論文が相次いで発表されている。腹部手術患者での接着因子、ILファミリーに関するもの、肺毛細血管透過性抑制とNF- κ Bに関するもの、接着因子への相互作用は毛細血管内皮細胞への作用ではなく、好中球へ作用するとしていて、代用血漿製剤の種類は問わないとする報告などである。

正常の血液粘度は4.0-4.7cP (センチポアズ) くらいで、正常血漿粘度は1.7-2.0cPくらいである。市販の代用血漿製剤 (Gelatin, DEX, HES) は2cPくらいのオーダーである。これより高い粘度の代用血漿を使用した血液粘度の研究は、Ht低下による血液粘度の低下を防止し、正常粘度を保つことにより、末梢血管の虚脱を防止し、ischemic hypoxiaを防いでいる。出血に対する単なるポリウム維持薬としての代用血漿製剤の位置づけから酸素代謝維持薬としての道を開くかも知れない。HESは球状コロイドであるが、一般に球状コロイドの粘度はその分子の大きさに比例しない。一方、線形コロイドであるDEXは分子量に比例して粘度が高くなる。また同一分子量なら線形コロイドは球形コロイドに比べて高い粘度を有する。その意味で、線状コロイドの代表であるDEXの存在意義は大きい。粘度に関与せず特徴的な末梢循環改善作用を持つPEG修飾アルブミンは：PEG修飾により分子量が大きくなり、血管外への漏出を防ぎ、半減期も長くなる；毒性、免疫応答、抗原性を抑える (stealth化)；などの利点の他、thiolationによるPEG化によって生じたPEG蛋白がNO輸送機構に関与し、動脈壁でできたNOを低濃度NOの微小循環領域に運んで、末梢循環を改善するとされている。以上、代用血漿の物性、最近のトピック、PEG-albの特異的な性質等につき、文献的な考察を交えて発表する。

人工免疫グロブリン・人工抗体

鈴木 和男

千葉大院医 免疫発生学・炎症制御学
国立感染症研究所科学技術特別研究員

高度高齢社会に入ったわが国においては、加齢によって増加する重症感染症、自己免疫疾患、難治性血管炎などの難治性疾患への初期治療として免疫グロブリン製剤治療の必要性が増している。特に、難病の治療に使用されているステロイドパルス治療は、高齢者には危険性が高いことから、免疫グロブリン製剤大量療法 (IVIg) の有効性が報告されてきている。このような背景によるIVIg治療への関心が高まっている。しかし、IVIgは感染症リスク・安全性確保や高額治療のため、免疫グロブリンの人工化が望まれている。そこで、マウス脾臓細胞のmRNAのライブラリーからマウス型人工Fv抗体を作製する系を構築しプロトタイプとしてマウス型を完成させた。この治療実験には、われわれが開発した二つの血管炎モデルマウス (3種類) を用いて、有効性を確認した。すなわち、天然型IVIgの安全性をカバーする治療法として人工ガンマグロブリンを作製することに成功した。一方で、川崎病と同じプロトコルにより、血管炎・腎炎においてIVIg治療による臨床での好成績が報告された (1)。欧米よりわが国の方が、頻度が高いMPO-ANCA関連血管炎は、自己免疫疾患として高齢者に発症し近年増加している。本症は重篤な急速進行性糸球体腎炎 (RPGN) をきたすことから、しばしば腎死に至り、死因は感染症によっており、免疫能を抑制することのない免疫補助療法が切望されている。これらの状況の中にあって、現在、ヒト型に特化したプロトタイプの人工型ガンマグロブリンの作製に成功し、臨床応用に向けた体外診断法を確立中であり、臨床応用の準備が整ってきている。

一方、感染症は、特定の感染源の抗原に対する抗体が必須であるが、ウイルスなどの中和抗体を作製するには困難が伴っている。HIVやC型肝炎ウイルスに対する抗体をはじめ作製しにくい抗体を人工型で中和活性を持つ薬剤の開発が要望されている。この点についても触れたいと思っている。

1. T. Ito-Ihara, T. Ono, F. Nogaki, K. Suyama, M. Tanaka, S. Yonemoto, A. Fukatsu, T. Kita, K. Suzuki, and E. Muso. Clinical Efficacy of Intravenous Immunoglobulin for Patients with MPO-ANCA-associated Rapidly Progressive Glomerulonephritis. *Nephron Clin Pract.* 102:c35-c42, 2005

人工血小板

半田 誠

慶応義塾大学 輸血・細胞療法部

血小板はわずか直径2 - 3 μ の無核の血液細胞であるが、生体の止血機構の中心をなし、その量的・質的異常により惹起される出血の予防や治療に対し唯一信頼できる手段は血小板輸血である。医療の高度化に伴い輸血に大量の血小板が消費され、近い将来の払底が危惧される。軍事目的から米国で始まった血小板代替物の開発は、現在我が国に引き継がれている。血小板代替物は二つに大別される。第一はヒト血小板そのものを使用したもので、血小板を凍結乾燥処理して得られた膜断片等がある。第二は人工的な担体もしくは付加物を使用したもので、これらが人工血小板である。

人工血小板が具備すべき血小板機能は、1) 止血局所への特異的な集積能力すなわち粘着機能、2) 血小板血栓を形成する能力、3) フィブリン血栓の形成促進能力すなわち凝固活性、のいずれかである。実際、血小板輸血が必要な場合にも患者の血小板がゼロになることはない。生きた血小板と同等の機能を人工的に創出すことは事実上不可能であり、残存した患者血小板を有効に止血局所で働かせるような機能を最小限保有した創製物が合理的かつ実際的である。

我が国では厚生労働科学研究費 (主任研究者: 慶応義塾大学 内科 池田康夫) の補助のもと、平成12年度より人工血小板の研究開発が継続されてきた。生体適合性があり表面修飾が容易であるアルブミン重合体 (polyAlb) やリボソームを微粒子担体として選択し、血小板接着受容体 (GPIbやGPIa/IIa) のリコンビナント産物や血小板の標的となる粘着蛋白 (リガンド: フィブリノゲン) そのものや由来ペプチドを担体表面に付加することで、種々の人工血小板のプロトタイプを創製してきた。そして、ポリエチレングリコールで微粒子表面を修飾することで、生体停留時間を大幅に延長させることが可能となった。

その中で、架橋剤によりS-S結合を介してフィブリノゲン鎖カルボキシ末端由来合成ペプチド (H12) を付加したpolyAlbやリボソームは、活性化血小板に特異的に結合し、*in vitro*, *in vivo* 評価系で血小板の止血機能を補助する効果があり、安全性にも大きな問題がないことが明らかとなった。さらに、生理的な血小板凝集物質であるアデノシン2リン酸 (ADP) を内包させたH12付加リボソームは、血小板濃厚液に匹敵する止血効果を発揮することが、血小板減少動物モデルで確認された。

本講演では、人工血小板開発の最新の成果を紹介し、臨床応用に向けた将来の展望を述べる。

教育講演 1

赤血球が語る膜機能

高桑 雄一

東京女子医科大学・生化学講座

ポストゲノム時代を迎えて生体膜研究は「何のために？どのように？」という構造と機能の相関を明らかにするべき新たな局面を迎えている。構成成分の解析法は確立されれば構造面は明らかにされてきたが、例えば、何のために脂質非対称分布は維持されているのか？raftは本当にあるのか？膜貫通蛋白質は動いているのか？膜骨格構築はどのような調節を受けているのか？など機能面との関連については未だ不明な点が多い。

ヒト成熟赤血球は核や細胞内小器官を全く持たない。従って、膜系は細胞膜（形質膜）のみであり、あるがままの膜の構造と機能の研究に適している。また、膜の裏打ち構造（膜骨格）の研究には赤血球ゴーストや細胞膜を反転した小胞（反転膜小胞）を利用することで他の細胞からは得られない知見が得られる。一方、レーザー回折法等を用いて赤血球膜機能（変形能や膜安定性）の定量的な測定が出来ることは構造と機能の相関を明らかにする上で魅力的である。赤血球以外の細胞にも膜骨格を構成する蛋白質のアイソフォームが存在することから、赤血球膜で得られた知見をそれらの細胞膜の構造と機能の理解のためのモデルと位置づけることも現段階では妥当であると考えている。赤血球に限っていえば、赤血球形態はどのように維持されているか？赤血球はどのように「120日で死ぬ」のか？赤血球がマラリア原虫侵入を許すのは何故か？など膜を介した機能は不明なことが多い。

本講演では、誰もが知ってはいるが、実は不思議に思っている生体膜の機能と構造の関わりを解明に主に赤血球を用いて取り組んでいる演者の生体膜研究に対するアプローチについての経験を披露することにする。

教育講演 2

リコンビナント活性型第 因子製剤： 人工止血剤としての可能性

新井 盛大

ノボノルディスクファーマ株式会社 止血開発企画部

閉鎖血管回路内で血液の循環を維持するために、循環系は漏出（出血）に対する修復機構と閉塞（血栓・塞栓）に対する防御機構を併せもつ。これらの恒常性維持のための機構は、血管壁と血液成分（血小板、血液凝固因子、線溶因子）の複雑な相互反応により成り立つ。局所の血管が傷害され出血が起きると、血管内皮下組織に露呈したコラーゲンに血小板が粘着、引き続き凝集し、一次的な止血栓を形成する。この一次血栓は物理的強度が不十分なためにフィブリン線維による補強が必要となる。三次元の液層中では通常凝固因子同士の反応は起こらないが、血管傷害をきたした一次元に近い固相局面上では反応が惹起、促進する。この際、循環血液中の凝固因子蛋白が液相から固相局面に集中し、反応効率が指数関数的に跳躍する。そこでは酵素・基質反応にリン脂質と補因子が加わった四量体形成による反応の局在化と効率化が大きく寄与する。以上のように、生体の止血機構は、血管傷害部位の局所センシング（血小板および第 因子あるいは第 因子）から始まり、局所集中型の爆発的自己組織化であるといえる。

手術や重症外傷における大量出血の際には、濃厚血小板や新鮮凍結血漿を輸注するが、これらの補充療法では理論的に各々の止血因子が健常者の正常循環濃度（100%）を超えることはなく、止血機能を増強することは期待できない。これらの危機的出血は、しばしば補充療法では制御できず、凝固障害から循環不全やMOFに陥り不幸な転帰をたどる。生理的には、激しい運動の際に血液凝固機能が200%以上に上昇する。また妊娠経過中には凝固機能が高まり、妊娠末期には200%にも上昇する。いずれの場合も、出血の危機的状況に対して生体が高度な止血能を準備すると考えれば極めて合目的な反応である。

活性型凝固因子は、セリンプロテアーゼとして次の凝固因子基質を活性化する。活性型凝固因子は生理的には止血局所の細胞表面に接合しながら働くが、遊離状態で循環することは稀である。その中で活性型第 因子（FVIIa）は特殊で、第 因子の約1%は活性型となり循環している。0.1 nMと極めて低い血漿濃度ながら、F aはセンサー分子として出血局所に表出した組織因子に結合して止血機構を展開する。薬理学的高濃度のF aは、活性化血小板膜表面上で組織因子非依存性に第 因子を直接活性化する。インヒビター保有血友病の止血剤として、遺伝子組換えF a製剤が開発され、現在広く臨床使用されている。本剤の薬理学的濃度の投与は、健常者の潜在的止血能をも高める。近年では、脳出血や重症外傷などの一般人の危機的出血時の止血剤として本剤の適応拡大に向けた臨床開発が進められている。

ミオグロビンの新たな酸素親和性制御因子

根矢 三郎, 星野 忠次

千葉大学大学院 薬学研究院 薬品物理化学研究室

目的 ヘモグロビンやミオグロビン (Mb) のヘムはプロトヘムであり, テトラピロールが正方形に配列した分子構造をもつ。この構造はすべてのヘムタンパク質に共通する。しかし最近, テトラピロールを正方形から台形に並べ替えたポルフィリン異性体分子, コルフィセンが合成された。コルフィセンは台形の分子形状をもち, 鉄錯体をアポミオグロビンに組み込むと酸素親和性を低下させることができる。そのため, Mb を酸素貯蔵物質から酸素運搬物質へと機能変換するために使われている。私たちはコルフィセンの分子周辺にカルボン酸エステル置換基 (-CO₂C₂H₅) を導入した新しい誘導体を合成した。エステル基の導入部位を変えた2種類のコルフィセン鉄錯体をつくり, Mb に再構成してコルフィセンがもつ分子形状の生物学的意味を追求した。

方法 台形分子の上底 (短辺) と下底 (長辺) の各両端にカルボン酸エステル置換基 (-CO₂C₂H₅) を取りつけた2種類のコルフィセンを用いた。これらは, 線形テトラピロール前駆体を銅イオンで環化する鑄型合成法で合成した (収率は約20%)。シグマ社から購入したMb (クジラ) をメチルエチルケトン法でアポ化した後, 鉄コルフィセンを組み込んだ。再構成 Mb は CM セルロースカラムで精製した。

結果 台形コルフィセン分子の短辺 (Mb-1) と長辺 (Mb-2) の各両端ピロールにカルボン酸エステル置換基 (-CO₂C₂H₅) をもつ2種類のコルフィセンはアポ Mb と結合して安定な再構成 Mb を与えることが判明した。しかし, Mb-1 と Mb-2 では酸素平衡能力に大きな差が見られ, それぞれ P₅₀ = 300 および 37 mmHg となった。すなわち, 台形短辺に置換基が付くほうが酸素親和性は大きく低下した。酸化型 Mb でも, シアン, アジドなどの外部配位子結合定数は Mb-1 のほうが Mb-2 よりも10倍あまり増加していた。

議論 鉄コルフィセンの結晶構造を見ると鉄原子は4個のピロール窒素原子がつくる台形の穴の中にあるが, その位置は短辺側に片寄っている。そのため, 鉄 - N (ピロール) 結合には長短2種類がある。そのため台形の短辺側につくエステル置換基の電子吸引効果はヘム鉄により大きく反映すると考えられる。これらの結果は, 正方形分子であるポルフィリンとは対照的である。ポルフィリンでは分子周辺の置換基位置を変えてもその性質が変化しないが, コルフィセンでは置換基位置により性質が明瞭に変わる。言い換えるなら, コルフィセンの台形形状には生物学的な意味が潜む。コルフィセンの分子形状はミオグロビンの新しい酸素親和性制御因子である。

文 献 S. Neya et al; Inorg. Chem. 2006, 45, 4238-4242

アルブミンを用いた完全合成系人工酸素運搬体の創製

小松 晃之, 土田 英俊

早稲田大学 理工学術院 理工学研究所

我々は“ポルフィリンの化学”を基礎として, ヘモグロビンを一切必要としない完全合成系人工酸素運搬体の開発を進めてきている。例えば, ヘムにリン脂質構造を付与すると, そのヘムは水中で自己組織化して粒径約100 nmの小胞体を形成し, 生理条件下で酸素を可逆的に吸脱着できるようになる (1)。また, ヒト血清アルブミンの非特異的多分子結合能を利用して, 疎水性ヘムをアルブミンの内部に包接させると, 赤色のアルブミン-ヘム複合体が得られ, これも酸素をくり返し結合解離できる (2)。包接する合成ヘムの分子構造調節により, 酸素親和性の制御が可能 (3, 4), アルブミン-ヘムの分子表面をポリエチレングリコール (PEG) 鎖で化学修飾することにより, ヘムの血中滞留時間は大幅に延長される (5)。このPEG修飾アルブミン-ヘムはキャストすると, 赤色のフィルムとなり, アルコールなどの有機溶媒に再溶解することができる (6)。

一方, アルブミンに天然のヘム (プロトヘム) が結合したアルブミン-プロトヘム錯体のX線結晶構造解析に成功し, プロトヘムがアルブミンのサブドメインIBに結合していることを明らかにした (7)。ヘム結合部位の空間座標が明確になったので, 今度はヘモグロビンのヘムポケット構造を模倣し, 遺伝子組換え技術により, ヘム鉄の配位圏内に近位塩基・遠位塩基を導入, アルブミン-プロトヘム錯体が酸素錯体を形成できることを初めて実証した (8, 9)。

その他, 我々が進めている完全合成系酸素運搬体に関する最近の話題を紹介したい。

- 1) T. Komatsu et al., Chemistry, Eur. J. 2002, 8, 5469.
- 2) T. Komatsu et al., Bioconjugate Chem. 2002, 13, 397.
- 3) A. Nakagawa et al., Bioconjugate Chem. 2006, 17, 146.
- 4) A. Nakagawa et al., Chem Lett. 2007, 36, 640.
- 5) Y. Huang et al., Bioconjugate Chem. 2006, 17, 393.
- 6) A. Nakagawa et al., Bioconjugate Chem. 2007, 17, in press.
- 7) P. A. Zunszain et al., BMC Struct. Biol. 2003, 3, 6.
- 8) T. Komatsu et al. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 14304.
- 9) T. Komatsu, et al., J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 15933.

ヒト血清アルブミンに結合する内因性リガンド
によるNO付加・放出制御機構

丸山 徹¹, 異島 優¹, 廣山 秀一¹, 甲斐 俊哉^{1,2},
小田切 優樹¹
1 熊本大学大学院 医学薬学研究部
2 ニプロ(株) 医薬品研究所

【緒言】

血中に最も多量に存在するヒト血清アルブミン(HSA)は、S-ニトロソ化反応を介して一酸化窒素(NO)を運搬し、血管拡張作用や抗菌活性など新たな生物活性を有することが知られている。このS-ニトロソ化(SNO)HSAは、健康人では 10^{-7} - 10^{-6} Mの濃度で存在し、多くの病態時においてその濃度が変動するが、その変動メカニズムはあまり明らかにされていない。我々はSNO-HSAの作製を行う過程で、内因性リガンド結合の有無によりHSAのS-ニトロソ化反応効率が変動することを見出した。このことは、内因性リガンドによりSNO-HSA量が制御され、血管拡張をはじめとした多くの作用により血管恒常性の維持を行っている可能性を示唆するものである。そこで今回、HSAの内因性リガンド結合が及ぼすS-ニトロソ化反応への影響に関して検討を行った。

【方法】

細胞由来のNOによるHSAのS-ニトロソ化は、interferon-(100 units/ml)とlipopolysaccharide(10 mg/ml)にて37℃, 6 hr刺激したRAW 264.7細胞にHSAを添加し、37℃, 10 min反応させて行った。肝虚血再灌流障害モデルは、Wistar系ラットを用い、門脈と肝動脈を血流遮断鉗子で閉塞して血流を遮断し、中葉及び左外側区を虚血状態にした。45分後に下大静脈より採血を行い、血流を再開することにより作製した。

【結果及び考察】

リガンド結合HSAのS-ニトロソ化効率を網羅的に解析したところ、生体内に豊富に存在する長鎖脂肪酸であるオレイン酸などでS-ニトロソ化効率の有意な上昇が観察され、それは脂肪酸結合量依存的なものであった。RAW264.7細胞では、NOC7反応時と同様に、Cu²⁺結合にてS-ニトロソ化効率の上昇が観察された。このことは、血中の銅イオンが上昇するとSNO-HSA量が上昇するという報告を支持するものと考えられる。さらに興味深いことに、過剰な脂肪酸の結合はSNO-HSAの分解反応と考えられるS-ニトロソ転位反応を促進させることが確認された。これらの結果から、HSAへのリガンド結合はSNO-HSA量を制御している可能性が推察される。また、肝虚血再灌流障害モデルにおいて、リガンド結合SNO-HSAは高い臓器保護効果を示したことから、量的な制御だけでなく、その生物活性にも影響を与えることが示唆された。現在、このリガンド結合によるSNO-HSA制御機構を活用した新規NOトラフィックタンパク質の創製も検討中であり、併せて報告する。

ヘテロ表裏面を持つ生分解性ナノシートの研究
展開

武岡 真司
早稲田大学大学院 先進理工学研究科

生分解性や血液適合性に優れた高分子をビルディングブロックとし、任意の形状と大きさとナノの厚さを有するシート状高分子構造体(ナノシート)は、その表裏面に異なる認識部位の担持が可能であり、リガンド-レセプター間の結合が弱いペアでも接触面積が大きいことから安定に接着できることが期待できる。特に、出血部位に対する認識能の付与により、血管の内側から出血部位に接着できる新規の血小板代替物(ナノ絆創膏)としての利用が期待できる。

我々は、早稲田大学の先端科学健康医療融合研究機構の支援を受けてリソグラフィーの技術を利用して親水部(SiO₂)と疎水部(オクタデシルトリメトキシシラン; ODS)からなる親疎水マイクロパターン基板(ODS-SiO₂基板)を作製し、疎水性領域(ODS)にのみに、SH基を導入したヒト血清アルブミン(rHSA)を選択的に吸着させ、酸化触媒存在下でジスルフィド架橋させた(1) rHSA ナノシート(膜厚5nm程度)を調製した。更に乳酸/グリコール酸共重合体(PLGA)ナノ粒子でも同様に疎水性領域のみに高密度の吸着可能であり、ガラス転移温度付近に加熱して粒子を融合させることにより、(2) PLGAシート(膜厚100~200nm程度)を調製した。また、ポリカチオンであるキトサンとポリアニオンであるアルギン酸ナトリウムを基板上に交互に積層させる方法(Layer-by-Layer: LbL, 交互積層法)を用いて、(3) 多糖ナノシート(膜厚約30nm, アスペクト比100万超)の調製にも成功した。

(1),(2),(3)のナノシートは、各々タンパク質、生分解性合成高分子、多糖類により構成されており、界面活性剤や水溶性高分子の犠牲膜にて基板から簡便に剥離でき分散状態で使用できるので、新しいバイオマテリアルとして期待できる。さらに、表裏面に異なる認識部位を修飾させることもできる。本シンポジウムでは、ナノシートの研究の現状を共焦点顕微鏡、電子顕微鏡から紹介すると共に、流動状態下での活性化血小板との認識能評価についても併せて報告する。そして、止血能を有するシート、血管損傷部位を保護するナノ絆創膏としての可能性についても言及する。

出血性ショック時におけるヘモグロビン小胞体の体内動態特性

田口 和明¹, 浦田 由紀乃¹, 安楽 誠¹, 甲斐 俊哉^{1,2},
岩尾 康範¹, 土田 英俊³, 小林 紘一⁴, 小田切 優樹¹

1 熊本大学大学院医学薬学研究部

2 ニプロ(株) 医薬品研究所

3 早稲田大学 理工学総合研究センター

4 慶応義塾大学 医学部 外科

【緒言】

輸血に代わりうる人工酸素運搬体としてヘモグロビン小胞体(HbV)の実用化が期待されており、HbVを製剤化する上で体内動態の検討は必要不可欠である。これまでに我々はHbVの内部のHbを¹²⁵I標識したHbV(¹²⁵I-HbV)の健常ラットにおける体内動態実験を行い、その特性の詳細を報告してきた。しかしながら、HbVを臨床で用いる場合、出血性ショック時での投与が想定されており、出血後におけるHbVの体内動態の把握も必要であると考えられる。このような背景の下、本研究は、出血性ショックモデルラットを作製しHbVの体内動態実験を行い、健常ラットの体内動態特性と比較検討した。

【方法】

実験動物はSD系雄性ラット(6週齢, 180~200g)を用いた。出血性ショックモデルラットの作製は血圧を30分間、40mmHgに保ちながら、全血液量の40%を脱血することで出血性ショックモデルを作製した。HbV投与液は、IODO-GENを用い¹²⁵I-HbVを調製した。体内動態の検討は、出血性ショックモデルラットの作成を行い、¹²⁵I-HbVをラットの左大腿動脈より投与後、経時的に開腹、下大静脈より採血し、臓器を摘出した。血液及び各臓器の放射活性はオートウェルガンマーカウンターにより測定した。また、各パラメータはMULTIを用い算出した。

【結果及び考察】

出血性ショックモデルラットに¹²⁵I-HbVを投与したところ、以下の体内動態パラメータを得た：初期血中濃度(C_0)；9.6% of dose/mL, 消失速度定数(k_e)； $1.4 \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$, 分布相血中半減期($t_{1/2}$)；0.90hr, 消失相血中半減期($t_{1/2}$)；18.9hr, 血中濃度曲線下面積(AUC)； $109.7 \text{hr} \cdot \% \text{ of dose/mL}$, クリアランス(CL)；0.91mL/hr, 中枢コンパートメントの分布容積(V_1)；10.4mL, 末梢コンパートメントの分布容積(V_2)；12.8mL。これらの値は健常ラット投与時の値に比べ、 V_1 (10.0mL)及び C_0 (9.9% of dose/mL)はほぼ同等の値を示したが、 $t_{1/2}$ (7.9hr), $t_{1/2}$ (36.5hr)は短くなり、それに伴いAUCの低下($253.7 \text{hr} \cdot \% \text{ of dose/mL}$), k_e ($6.5 \times 10^{-4} \text{min}^{-1}$)及びCL(0.39mL/hr)の増加が確認された。また、投与初期(3.30min)においては各臓器(腎臓・肝臓・肺・心臓)において健常時と比較して高い分布を示したが、時間の経過と共に肝臓・脾臓への分布が高くなった。

以上、本研究では出血性ショック時における体内動態を明らかにし、有効で安全性の高いHbVの開発への有用な基礎データを提示することができた。

ラット出血性ショックモデルにおけるHb小胞体の輸液蘇生の主要臓器生体反応

山梨 義高, 寺嶋 克幸, 杖下 隆哉, 坂本 篤裕
日本医科大学 麻酔科学教室

目的：出血性ショックとそれに引き続き輸液蘇生に伴う各臓器の炎症反応や低酸素反応の違いと輸液蘇生の輸液剤としてのHbV小胞体分散液の影響を調査すること。

方法：週齢10-13週の雄S-Dラット(体重 $308 \pm 43 \text{g}$)48匹を対象とした。sevofluraneによる全身麻酔下に28mL/kgの脱血後、脱血量に対し1)3倍量の乳酸加リンゲル液、または2)等量のHbV小胞体分散液で輸液蘇生し、2, 24, 72, 168時間後に犠牲死させた。摘出した心臓・肺・肝臓・腎臓・脾臓のTNF- α とHIF-1 α のmRNAを測定した。

結果：HbV小胞体分散液は乳酸加リンゲル液と同様の炎症反応を示した。TNF- α のmRNAは肺で強く発現し、研究期間中経時的に増強した。HIF-1 α のmRNA発現は蘇生後24時間でピークを示し、肺で強い発現を示した。出血性ショックにより増加した血漿乳酸値は、HbV小胞体分散液で速やかに低下した。
結語：HbV小胞体分散液は、炎症反応や局所臓器血流低下に伴う低酸素反応を生じないことが明らかとなった。

ヘモグロビン小胞体 (OXY-0301) のラット出血性ショックモデルにおける効果

古屋 利行, 森田 典子, 勢司 泰久, 小松 弘嗣,
松浦 昭宏, 大村 孝男, 高木 智史
株式会社オキシジェニクス

【目的】ラット出血性ショックモデルを用いてヘモグロビン小胞体 (OXY-0301) の有効性について評価した。

【方法】イソフルレン麻酔下, 雄性CD (SD) 系ラット (6~7週齢) の右頸動脈, 左大腿動脈および右大腿静脈へカニューレシオンし, それぞれ脱血経路, 血圧測定部位および投与経路とした。ニードルタイプの酸素電極を左大胸筋へ刺入し, 末梢組織の酸素分圧を測定した。右大腿静脈より採血し, アイスタットを用いて血液ガスおよび血中乳酸値を測定した。循環血液量の70%を人工膠質液ヒドロキシエチルデンプン溶液で交換した後, さらに30%を脱血することで出血性ショック状態を誘導した。脱血から5分後, 20 mL/kgのOXY-0301またはvehicleである生理食塩液を投与し, 循環動態, 血中乳酸値, 血液ガス, 末梢組織の酸素分圧, ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値について両群間で比較検討した。各測定は投与後3時間まで実施した。

【結果及び考察】血液交換前から脱血後までの各測定項目に関し, OXY-0301群と生理食塩液群の間に有意な差は認めなかった。脱血によりヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値は無処置時に比して有意に低下し, 循環動態の悪化, 血中乳酸値の上昇, 過換気状態, 組織酸素分圧の低下を示した。ヘモグロビン濃度は, 臨床の急性貧血において輸血が必須とされる6 g/dLを下回っており, OXY-0301の評価に適切な出血性ショック状態を示していると考えられた。生理食塩液群と比し, OXY-0301を投与した群ではヘモグロビン濃度が有意に上昇し, その上昇の程度は投与前に予測した濃度とほぼ同じであった。OXY-0301は通常のヘマトクリット遠心機では沈殿しないため, OXY-0301投与によるヘマトクリット値の上昇は認められず, 両群間にヘマトクリット値の差は無かった。OXY-0301の投与により循環動態は改善し, その後も維持されたが, 生理食塩液群の循環動態は一時的に改善されたものの維持されなかった。また, OXY-0301は末梢組織の酸素分圧を上昇させると共に血中乳酸値の上昇を抑制し, 代謝性アシドーシスを改善した。その結果, OXY-0301群の生存時間は生理食塩液群と比べて有意に延長した。

【結論】OXY-0301は, 予測値に近いヘモグロビン濃度の上昇をもたらし, その結果, 急性出血や周術期の出血による出血性ショックの諸症状を改善することが示唆された。

大量出血時における人工赤血球の骨髄内投与について

庄野 聡¹, 木下 学², 高瀬 凡平³, 野上 弥志郎⁴,
南部 正樹⁵, 緒方 嘉貴⁶, 金田 伸一⁶, 斎藤 大藏²,
石原 雅之⁴, 山田 憲彦¹, 菊地 眞⁷

1 防衛医学講座, 2 防衛医科大学校防衛医学研究センター外傷研究部門, 3 防衛医科大学校防衛医学研究センター医療工学研究部門, 4 防衛医科大学校外科, 5 防衛医科大学校形成外科, 6 テルモ株式会社研究開発センター, 7 防衛医科大学校医用電子工学

大震災などの大規模災害時には大量出血患者の救命に際し, 輸血用血液の極端な不足が懸念されるが, 人工赤血球の輸血はこのような困難な状況下において極めて有効な対策手段として期待される。一方, プレホスピタルでは大量出血時に虚脱血管からの輸液ルートの確保は困難で, 米国等の救急現場では骨髄内輸液による救命処置が行われている。我々は赤血球の20分の1の大きさであるヘモグロビン封入型人工赤血球 (TRM-645, テルモ製) を用いて致死性大量出血時の骨髄内投与による救命蘇生効果をマウスで検討した。

【方法】C57BL/6マウスで大腿静脈より0.7ccの脱血を行い, 直後に1ccの5% albumin (Alb) の大腿骨髄内投与にて蘇生した。蘇生後さらに0.2cc脱血を行い, TRM-645, 洗浄赤血球, 5% Albを骨髄内投与し, 予後を比較した。

【結果】初回の大量脱血は5% Albの骨髄内投与で全例救命し得た。その後の脱血, 骨髄内投与による生存率 (24時間) はTRM-645群が全例生存し, 明らかな救命蘇生効果が得られたのに対し, 洗浄赤血球群では63%とAlb群64%と同程度で輸血による救命効果はなかった。TRM-645群の赤血球数, ヘマトクリットの推移はAlb群と差がなかったが, 洗浄赤血球群では輸血直後に軽度の上昇が確認された。一方, ヘモグロビン量はTRM-645群で著明に上昇したが, 洗浄赤血球では軽度の上昇に留まり, Alb群では上昇しなかった。

【考察】人工赤血球は赤血球の20分の1と小さく, 骨髄内でtrappingされることなく循環血中への移行が良好で顕著な救命効果が得られ, 大量出血時の人工赤血球の骨髄内投与の有用性が示唆された。また, 大量出血においては迅速な膠質輸液で蘇生できる症例があることからvolume resuscitationが肝要であるが, 一方で低ヘモグロビン血症の改善でしか救命できない症例があることが示唆された。

Beagle犬を用いた40%脱血ショックにおけるHb小胞体の蘇生効果および中長期生存の評価

池田 達彦¹, 堀之内 宏久¹, 井澤 菜緒子¹, 河野 光智¹,
泉 陽太郎¹, 渡辺 真純¹, 川村 雅文¹, 宗慶 太郎²,
酒井 宏水², 土田 英俊², 小林 紘一¹

1 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科
2 早稲田大学 理工学部

<目的> Hb小胞体(HbV)の臨床応用を考えた場合, その安全性の評価は必須である. HbVは静脈内投与されて効率よく酸素運搬を行い, 末梢臓器の隅々まで酸素を効率よく運搬することを主眼におき開発され, これまでにその生体投与に関する有効性と安全性について様々な角度より検討がなされてきた. 以前よりビーグル犬を用いて50%出血ショックモデルを作成し, HbVを用いて蘇生を行い, 蘇生効果, 安全性について検証し, HbVはアルブミン生食, 脱血血液と同様の蘇生効果があることが示された. 今回は中長期の安全性の評価のため, 40%出血モデルを作成し, HbV, 脱血血液を用いて蘇生, その後生存させ, 血液学, 血液生化学また病理組織学的検討を行い評価した.

<方法> 月齢6ヶ月のビーグル犬を用い, ケタラールで基礎麻酔を行い, 気管内挿管を行った後, セボフルレン2%の吸入麻酔により全身麻酔とした. 右大腿動脈に動脈圧モニター用, および脱血用のカテーテルを挿入した. 左前肢に静脈ラインをとり, 蘇生液の投与経路とした. 循環系諸標を測定するために日本光電社製Laboratory Polygraph System D120Hを用いた. 大脳皮質, 腹直筋の組織血流内酸素飽和度をNIRA法(Somanetics製, SPFB)により連続測定, 記録した. 計測のための機器を装着し, 状態が安定化した後に体重から次式(循環血液量(ml) = 86 (ml/kg) × 体重(kg))を用いて求めた循環血液量の40%相当量を20 ml/minの速度で脱血した. 脱血に従い血圧の低下を認め, 50 mmHg以下となるのを確認した後, 60分間にわたり収縮期血圧が50 mmHgを上回らないように維持した. 脱血ショック状態を1時間継続した後, 脱血血液(Autologus shedded blood ASB群), Hb小胞体分散液(Hb小胞体を5%アルブミン生食に分散した液体. Hb濃度は8.6 g/dl: Hb小胞体群)を用いて蘇生を行った. 蘇生は20 ml/minのスピードで上肢の静脈ラインより経静脈的に投与した. 蘇生液投与後4時間, 全身麻酔下に循環動態を確認した後半覚醒の状態とし, 自室へ戻した. 以後1日目, 3日目, 7日目, 14日目, 28日目, 56日目, 84日目, 168日目, 336日目に体重, CBC, 血液生化学を測定した. また28日目, 168日目または336日目に犠牲死させ病理組織学的所見を検討した.

<結果と考察> Hb小胞体群は脱血血液群と同様の蘇生効果を示した. 実験直後より覚醒, 第一病日より摂食行動も良好だった. 現在6ヶ月を経過し理学所見, 体重増加の面でHb小胞体群, 自己血群に明らかな差は認めなかった. Hb小胞体群では蘇生後7日で赤血球由来のHbは術前値に復し, HbV由来のHbは7日後に検出されなくなった. 中長期生存に関しても現在までのところ2群とも同様な経過を示している. <結論> 現在までのところ, 中動物での脱血ショック蘇生モデルを用いた中長期生存の実験での安全性を確認した.

ヘモグロビン小胞体の炎症性腸疾患治療への応用

河野 光智¹, 堀之内 宏久¹, 泉 陽太郎¹, 酒井 宏水²,
土田 英俊², 小林 紘一¹

1 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科,
2 早稲田大学 理工学術院 理工学研究所

【目的】大腸及び小腸の粘膜に慢性の炎症または潰瘍をひきおこす原因不明の疾患の総称を炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease: IBD)といい, 通常, 潰瘍性大腸炎とクローン病のことをさす. IBDの患者では病気の活動期に血便, 下血により貧血が進むため, 現在, 赤血球輸血の対象となることが多い. 一方, Hb小胞体(HbV)は, 動物投与と試験では, 出血ショック蘇生, 高度交換輸血, 体外循環において, 充分な酸素輸送能が発揮できることが実証されている. 将来的にIBD患者がHbVの投与対象となることが予想されるが, 炎症性腸疾患による貧血に対するHbVの安全性及び有効性に関する検討はなされていない. 本研究では, 炎症性腸疾患動物モデルにHbVを投与して, 炎症性腸疾患の治療における安全性と有効性を確認する.

【方法】1. 対象動物: 野生型C57BL/6マウス, 雌性, 8~10週齢を使用する. マウスに1.3% dextran sulfate sodium (DSS)を5日間経口投与すると下痢や血便を生じ, 急性大腸炎を発症する. 2. HbV投与方法: HbVは尾静脈から1回あたり20ml/kg注射する. DSSの投与開始日1日前より1日おきに4回HbVを投与する. 比較対照として生理食塩水投与群(1回あたり20ml/kg)を作成する. 3. 主な観察・検査項目: HbVの投与終了後, 2日目にマウスを犠牲死させる. それぞれ下記の項目を検討し, 生理食塩水投与群(1回あたり20ml/kg)と比較する. 1) 大腸炎活動性指数 Disease Activity Index (DAI); 体重減少や下痢, 血便の程度を評価する. 体重減少は5段階, 便の性状と血便は3段階でスコアをつけ, 合計する. 2) 病理組織学; 大腸の潰瘍, 炎症等の程度を10段階で評価する. 3) 血清アミロイドA (SAA); マウスの炎症マーカーとして有用である.

【結果】1. 体重変化への影響 HbV投与群ではコントロール群と比較して体重減少が抑制される傾向にあった. 体重の減少はDSS投与後3日目から始まり, 生理食塩水投与群では6日目まで減少を続けたが, HbV投与群では4日目以降横ばいとなり体重が減少しなかった. 群間で有意差は認められなかった. 2. 大腸炎活動性指数(DAI)への影響 HbVと群ではコントロール群と比較して改善される傾向にあった. 有意差は認めなかったものの, 5日目以降, 指数はHbV投与群ではコントロール群よりも低い値であった. 3. 病理組織学評価 有意差を認めなかった. 4. 血清アミロイドA濃度 炎症の評価では有意差を認めなかった.

【考察及び結論】DSS投与によるマウス急性大腸炎モデルにおいて, HbV投与群ではコントロール群と比較して大腸炎活動性指数 DAIと体重減少が改善される傾向にあった. 病理組織学評価と血清アミロイドAによる評価では改善を認めなかった. 生理食塩水またはHbVを隔日に経静脈投与することによって飲水量が減り, DSSの摂取量が少なくなり, そのため十分な大腸炎が起こらず, HbVの投与効果が十分得られなかった可能性がある. DSS投与の期間や濃度などを変更して更なる検討を継続する必要があると考えられた.

人工酸素運搬体 TRM-645の開発の現状と課題

金田 伸一

テルモ株式会社研究開発センター

輸血医療の抱える諸問題解決のための手段の一つとして、人工酸素運搬体の医療への応用が待たれて久しいが、未だ実用化に向けた開発の途上にある。また、人工酸素運搬体については、その特性を生かし、酸素治療への応用展開についても検討が為されたが、こちらについても、現段階では、実用化の目処は立っていない。我々は、ヒト赤血球由来のヘモグロビン (Hb) をリポソームと呼ばれるナノサイズの脂質カプセル内に封入したカプセル型人工酸素運搬体の開発を行って来た。カプセル型人工酸素運搬体の開発においては、臨床応用に向け、製造、安全性、有効性、臨床評価の各方面において、夫々以下に示すような点に課題があり、現在、これらの課題への対応を図りつつ開発を継続中である。本発表では、これら課題とそれらへの対応の現状、今後について概説する。

原料となる赤血球製剤から原薬としてのヘモグロビン溶液を調製し、カプセル化、表面修飾に至る製造工程を治験薬 GMP に準拠して製造するには、「原料血液の受入、保管、管理」、「原薬の規格試験」、「製造歩留まり」、「無菌性の保証」、「ウイルス安全性」、「製剤の規格試験」についての整備が必要とされ、現在対応を進めている。さらに品質保証の観点からは、生物由来製品関連の各種規制事項への対応が必要とされるものと考えられるが、当該製剤は従来にない種類の医薬品であることから、薬事法上の位置付けは、厚生労働省、医薬品医療機器総合機構との協議の中で検討すべきと考えている。

現在、治験薬 GMP に対応した製造プラントのプロセスバリデーションを行っており、当該設備では 30L/batch 程度の製造を予定している。

安全性の観点からは、二つの重要な点が挙げられる。ひとつは、他のリポソーム製剤とはけた違いの大量投与が想定される点、もうひとつは、高度の出血状態等、生体の恒常性が大きく損なわれた条件下での投与が想定される点であり、安全性試験に関しては、リポソーム製剤としての特徴と、上記の使用条件の特殊性を考慮した試験設計に留意することが必要となる。

また、有効性では、特に、輸血代替としての使用を考えた場合、動物実験時の評価パラメーターと、臨床応用時の指標が必ずしも一致させられないという課題があり、臨床応用の際の指標の選択が重要な課題となる。一方、虚血性疾患の酸素治療への応用においては、臨床上の評価指標は比較的明確であるが、適応となる病型や症状の選択、動物実験へのフィードバックに課題がある。

さらに、臨床応用に向けては、各種の臨床評価指標に対し、人工酸素運搬体が与える影響について考慮する必要がある。事実、多くの評価項目について影響が確認されており、現在、その対策を検討中である。

以上のように、臨床応用に向けては、多くの課題があるが、開発のステージ毎に必要な対応を行うことで、臨床試験開始に向け進んでいきたいと考えている。

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, 田中 秀幸, 片桐 伸将, 築谷 朋典,
本間 章彦, 巽 英介, 妙中 義之
国立循環器病センター研究所 人工臓器部

本研究は、ナノカプセル型人工酸素運搬体併用時における小児体外循環施行時の全身組織酸素代謝の変化についてヤギを用いた動物実験により検討することを目的とした。実験動物にはオス仔ヤギを使用し、対照群 4 頭 (BW 21.5 ± 2.6 kg), 人工酸素運搬体使用群 (T 群) 4 頭 (BW 19.8 ± 0.8 kg) とした。実験は、両群共に右房脱血、頸動脈送血で常温体外循環 (バイパス流量 100-120 ml/kg/min, 深部体温 37-38 °C, V/Q = 0.5, FiO₂ 100%) を行い、T 群には 40% TRM645 加回路充填液 1000 mL を使用した。体外循環は心停止下で 120 分間施行し、経時的に全身酸素運搬量・全身酸素消費量・混合静脈血酸素飽和度の測定と血液生化学検査を行った。更に犠死後の組織学的変化の検討を行った。体外循環による血液稀釈により、血中ヘモグロビン濃度は、術前値において対照群と T 群がそれぞれ 10.5 ± 1.4 g/dL と 10.4 ± 2.0 g/dL であったのに対して、体外循環中はそれぞれ 5.9-6.2 g/dL と 6.1-6.4 g/dL と半減した。体外循環中に全身に送られる酸素の運搬量は体外循環中を通して両群とも一定範囲内で推移しており、対照群が 10.7-11.0 mL/kg/min, T 群が 9.9-11.3 mL/kg/min と群間の差は認められなかった。一方、全身で消費される酸素量も体外循環中を通して両群とも一定範囲内で推移していたが、対照群では 2.4-2.5 mL/kg/min で推移したのに対して、T 群では 2.5-2.7 mL/kg/min と T 群でやや高い傾向を認めた。同様に混合静脈血酸素飽和度についても T 群の方が低い傾向が認められ、対照群で 86-89%, T 群では 82-85% と、T 群でより末梢組織で酸素を多く使用していることが示された。生化学的に、乳酸/ピルビン酸比は対照群で 16.0 ± 5.4, T 群で 13.0 ± 1.4 mg/dL (2 時間後値) と、対照群に比べて T 群で低く、TRM645 を添加することにより、体外循環中の末梢組織での好気性代謝が促進されていると考えられた。従って、ナノカプセル型人工酸素運搬体を回路充填剤に添加することによって、小児体外循環施行時の全身組織酸素代謝が促進される傾向にあることが示された。

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ー

織田 禎二

島根大学医学部 循環器 呼吸器外科

【目的】弓部大動脈瘤手術では、弓部分枝の一時的血流遮断が不可避であるため、種々の補助手段を用いて脳虚血の軽減を図る必要がある。超低体温（20 前後）循環停止法（心臓・体外循環とも停止、低体温のみで虚血軽減を図る方法、HCA）、さらにHCA法に併用して逆行性脳灌流法（RCP）や選択的脳灌流法（SCP）がともに広く臨床で用いられてきた。しかし、超低体温ではヘモグロビン（Hb）の酸素親和性が非常に強くなり、 P_{50} は26.8mmHg（37）から、約7mmHg（18）まで低下し、実際20 前後の低体温での頸静脈酸素飽和度は90%以上となる。また、RCP法はSCP法に比べてシンプルな方法ではあるが、十分な脳組織血流が得られない欠点を有していた。このような特殊条件下での低酸素親和性リポソーム型人工酸素運搬体（LipoHb、テルモ社製）の有用性を検討した。

【方法及び結果】常温及び低体温（22）不完全脳虚血モデル：前処置（交換輸血）後に不完全・全脳虚血を両側頸動脈一時遮断及び脱血による低血圧にて作成し、虚血・再灌流中の脳エネルギー代謝を ^{31}P -magnetic resonance spectroscopy（MRS）法にて検討した。常温では、LipoHb液（ P_{50} = 40-50 mmHg、粒子径=220 nm、Hb= 6 g/dl）投与群は同じHb濃度のラット赤血球液投与群に比べて特に再灌流後の細胞内pHを有意に早く回復させた。低体温では、LipoHb投与群は無処置群に比し、その有効性を認めることはできなかった。なお、常温で認められたLipoHb液投与後の血圧上昇が低体温では認められなかった。

逆行性脳灌流法：HCAに、RCP併用の有無とその灌流液の違いによりラットを4群に分けた（RCP併用なし = HCA；生理食塩水ベース灌流液 = RCP-saline；ラット赤血球ベース灌流液 = RCP-RBC；LipoHbベース灌流液 = RCP-LipoHb）。ラットを表面冷却にて20 oCまで冷却しKCL注入にて心停止とし、逆行性脳灌流群では、直ちに右頸静脈より逆行性灌流を開始（灌流圧25-30mmHg）、大動脈を切開してドレナージした。20分間の循環停止および逆行性脳灌流の後、直ちに脳組織を採取して脳組織内高エネルギーリン酸を測定し、Energy charge（EC）を計算した。RCP-LipoHb群は、RCP-saline群や灌流なしのHCA群に比べ、有意に高いECを示し、また有意ではないもののRCP-RBC群よりも高いECを示した。

【結論】三つの実験より、低酸素親和性リポソーム型人工酸素運搬体は、ラット常温脳虚血を軽減する可能性が、また超低体温循環停止下逆行性脳灌流法において脳組織高エネルギーリン酸の減少を抑える可能性が示唆された。今後脳血流に対する影響なども含め、さらに検討が必要である。また低体温脳虚血モデルでは常温と違った血行動態が示され今後より詳細な検討が必要と思われた。

Higher O₂ Affinity Potentiates Protective Effect of Artificial O₂ Carrier in Brain Ischemia/Reperfusion in a Rat ModelKawaguchi AT^{1*}, Fukumoto D², Haida M¹, Ogata Y³, and Tsukada H²

1 Tokai University School of Medicine

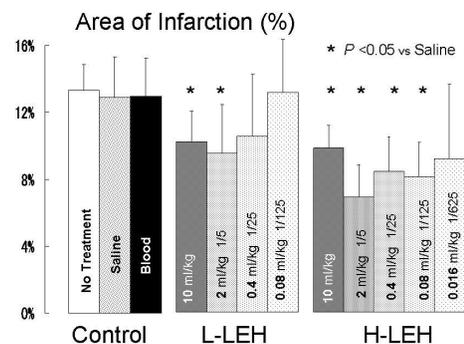
2 Hamamatsu Photonics, Hamamatsu

3 Terumo Corporation

Background. To increase O₂ delivery to hypoxic tissues, liposome-encapsulated hemoglobin (Terumo Co, Ltd) with a high O₂ affinity (h-LEH, P_{50} =10 mmHg) has been developed and compared to LEH with a low O₂ affinity (l-LEH, P_{50} =45 mmHg) which was proved to be effective in reducing the area of infarction after brain ischemia/reperfusion in the rat. Methods. l-LEH or h-LEH was intravenously infused immediately after photo-induced thrombotic occlusion of the right middle cerebral artery in SD rats (PIT model). Area of infarction was assessed by TTC staining 24-hour later in the cortex in rats receiving LEHs with successive 5-time dilution so as to receive the same aliquot (10 mL/kg) of infusate in each animal.

Results. While 10 mL/kg of l-LEH or h-LEH were both effective in a similar degree, successive 5-time dilution revealed that h-LEH remained effective as small as 0.08 mL/kg (1/125) while l-LEH lost protective effect over that of saline at 0.4 mL/kg (Figure)

Conclusion. LEH with a high O₂ affinity (P_{50} =10 mmHg) was effective in reducing size of cortical infarction in a dose 1/25 of l-LEH, suggesting that the protective effect mainly derive from O₂ delivery to the ischemic cortex.



ヘモグロビン小胞体 (OXY-0301) の臨床試験
開始へ向けた生物学的評価

小松 弘嗣¹, 古屋 利行¹, 森田 典子¹, 勢司 泰久¹,
松浦 昭宏¹, 大村 孝男¹, 高木 智史¹, 鹿志村 剛²,
平 泰彦²

1 株式会社オキシジェニクス

2 聖マリアンナ医科大学 救急医学教室

我々は昨年の本学会において、ヒトヘモグロビン小胞体 (OXY-0301) の治験薬GMP製造への取り組みについて報告したが、それと併行して自社での各種生物学的評価も取り進めてきた。今回はその評価状況の一部を紹介する。

昨年の本学会において報告したように、OXY-0301は中大脳動脈閉塞モデルおよびアラキドン酸誘発モデルという二つのラット脳梗塞モデルにおいて優れた効果を示したことから、脳梗塞の特に急性期における新たな治療の選択肢となる可能性が示されている。また、今年の本学会の一般演題にて報告されるように、OXY-0301はヒドロキシエチルデンプン溶液での血液交換と脱血を組み合わせたラット出血性ショックモデルにおいて、ショック症状の改善作用を示した。本モデルは、米国麻酔科学会が提唱している周術期輸血のガイドライン、すなわち、ヘモグロビン値が6 g/dL以下になった場合には赤血球製剤の輸血が必須であり、それまでは人工膠質液などで循環血液量や血圧を維持するという考え方に沿って確立された評価系であり、このモデルでOXY-0301が有効性を示したことは、周術期の出血に対するOXY-0301の有用性を強く示唆するものであると考える。さらに本評価系において、OXY-0301が通常の赤血球製剤と同様に、循環血液量から算出した予測値に近い値までヘモグロビン値を上昇させたことは、本製剤の救急医療の現場における有用性を示唆していると考えられる。上記以外の薬理学的評価として、ラット一酸化炭素中毒モデルにおける有効性についても検討を行っている。未だ予備的な検討段階ではあるが、OXY-0301が一酸化炭素中毒による血中乳酸値の上昇を抑制するという成績が得られており、一酸化炭素中毒においてもOXY-0301が何らかの薬理学的作用を示すと考えられる。今後は、臨床で特に問題となっている間歇型中毒における中枢性の障害を改善し得るか否かという点に着目して検討を加えたい。

OXY-0301とほぼ同様の製剤学的処方をするヘモグロビン小胞体の安全性については、すでに多くの研究者によって種々の観点から検討がなされ、臨床移行を妨げるような毒性学的所見は認められていないが、安全性薬理の観点から中枢神経系に対する影響について検討された例はない。そこで、常法 (FOB法) に従って検討した結果、OXY-0301は高用量 (50 mL/kg) においてもラットの中枢神経系に影響を及ぼさないことが示唆された。

以上のような薬理学的および毒性学的な評価に加え、薬物動態学的な評価も実施し、臨床試験へ向けた生物学的プロファイルのパッケージングを行う予定である。

ヘモグロビン小胞体の血液適合性と免疫系に対する影響

東 寛, 藤原 満博, 池田 久實
北海道赤十字血液センター

我々は、ポリエチレングリコール修飾ヘモグロビン小胞体 (HbV) の血液適合性の検討を、in vitroおよびin vivoの両面で行ってきた。まず、ヒトの好中球、血小板、凝固系、キニン-カリクレイン系、そして補体系に与える影響に関してin vitroで検討した。すなわち 血小板: アゴニスト刺激によるPAC-1の発現および生理活性物質の放出反応に及ぼす影響、凝固因子活性: PTおよびAPTTへの影響、カリクレイン-キニン系: 高分子キニノーゲン生成への影響、好中球: アゴニスト刺激による活性化マーカー (Mac-1) の発現、遊走および脱顆粒反応に及ぼす影響、補体系: 補体系の活性化作用、が検討項目である。これらの一連の検査結果から、HbVはヒト血液のコンポーネントと接触することによりそれらを積極的に活性化状態に導くことはないこと、またアゴニストによる活性化に大きな影響を与えることはないであろうと結論された。

またin vivoでは、アナフィラキシー反応誘発の可能性および血中補体価の変動の可能性について検討した。我々の行った実験条件下ではラットにアナフィラキシー反応は誘発されなかった。また血中の補体価は投与後に一過性の低下傾向を認めたが、連続投与でも低下し続ける事はなかった。この結果はin vitroでは補体を活性化しないという結果と矛盾するものではなかった。

以上より、HbVは非常に優れた血液適合性を有していると結論付けられた。このことは、実際の動物への投与でも血液適合性に関する問題が発生していないとの報告からも支持される。さらに、HbVの投与による造血機能への影響についての検討では、少なくとも末梢血レベルでは特段の影響をうけないことが示されているが、in vitroにおいてもHbVへの一過性の暴露では造血幹細胞の増殖・分化に大きな影響は認めなかった。

HbVは、投与後速やかに網内系細胞に取り込まれることが明らかとなっており、HbVの投与により脾臓の体積、重量が明らかに増大 (増加) する。脾臓は巨大なリンパ組織であることから、HbVが脾臓の網内系細胞へ蓄積することが免疫応答に何らかの影響を与える可能性が考えられた。この点に関して、ラットの脾細胞を用いて検討した。その結果、HbV投与後には、非特異的刺戟 (Con A) および蛋白抗原 (KLH) に対する脾臓由来T細胞の応答性が一過性に低下するが、HbV投与後1週間で回復すること、HbVを内包しないリポソームを投与した場合にも同様の現象が観察されること、免疫応答の抑制機序としてHbV投与後の脾臓細胞中に脾細胞 (T細胞) の増殖を抑制する細胞 (抑制性細胞) が出現していること、が示唆されている。このことから、ヒトにおいてもラットと同様にHbVによる一過性の免疫応答抑制が起こる可能性があると考えられる。しかしながら、この免疫応答の抑制は一過性のものであることから、投与を受けた動物に重大な免疫学的脆弱性を誘発するものではないかも知れない。むしろ、この一過性の免疫抑制を、HbVの有するあらゆる薬理作用と捉え、その機序等の詳細な検討を計画している。

ヘモグロビン (Hb) 小胞体投与における血液検体検査の最適化

村田 満

慶應義塾大学 医学部 中央臨床検査部

Hb小胞体の粒子径は250nmと非常に小さいため、ヒト血液中にHb小胞体が存在している場合、通常臨床検査で行われている遠心分離条件で得られる血清または血漿中にはHb小胞体が浮遊している。血清または血漿中のHb小胞体は検査測定系への干渉作用がある。我々はHb小胞体混合血液における検査の最適化を目的としてHb小胞体が各種検査の測定系に与える影響について検討してきた。ここでは血液中のHb小胞体を高分子凝集剤(デキストラン)を用いて除去する方法について報告する。

宗らの方法に準じてHb小胞体をデキストランを用いて除去した。すなわちヒト血液8.5に対しHb小胞体を1.5の割合で混合し各種採血管に分注した。あらかじめデキストラン(分子量400~500kDa, SIGMA)を20g/dlになるよう生理食塩水に溶解した溶液を終濃度2.6g/dlで添加混合した。10分室温放置後3000rpm, 10分遠心分離し血清または血漿を得た。得られた血清は生化学検査, 免疫学検査を, 血漿は凝固線溶検査, 糖尿病関連検査(HbA1Cは血液検体で測定)をそれぞれ実施。対照としてHb小胞体添加血液に生理食塩水を添加し得られた血清または血漿と, 生理食塩水添加血液にデキストランまたは生理食塩水を添加し得られた血清または血漿を用いた。また血清採取用真空採血管は凝固促進剤, 血清分離剤が収容されているものなど幾つか種類があるので, 採血管の違いによる影響も調べた。

<外観> Hb小胞体添加血液に生食を加えて遠心分離した血清, 血漿はHb小胞体が浮遊しているため赤色であった。しかしデキストラン添加しHb小胞体を除去した血清, 血漿はほぼ黄色であった。Hb小胞体の除去効果は血清, 血漿の外観から肉眼で確認可能であった。

<検査結果から見たデキストランによるHb小胞体除去効果> Hb小胞体浮遊血清, 血漿は以下のような干渉作用を示した。生化学検査においては総タンパク, アルブミン, LDH, CK, クレアチニン, CRP, ハプトグロビンの上昇が見られた。また, TC, リン脂質ではHb小胞体の脂質膜が影響し上昇した。低下傾向を示した項目はChE, 尿素窒素, IgMであった。総ビリルビン, AST, ALT, GTにおいては検査不能と判断された。HBs抗原・抗体, HCV抗体いずれもHb小胞体による影響は認められなかった。凝固線溶検査ではATで上昇傾向, トータルPAI-1で低下傾向を示し, その他FDP, D-ダイマーを除くすべての検査で測定不能と判断された。グルコース, HbA1CともにHb小胞体の影響を受けずに測定可能であった。一方, Hb小胞体浮遊血液にデキストランを添加し遠心分離で除去した血清, 血漿はHb小胞体の干渉作用は見られず生食添加条件とほぼ同様な検査値となった。しかし, デキストランの影響により生化学検査ではリポプロテイン(A)の低下, 凝固検査ではvWF活性の低下, トータルPAI-1の上昇が見られた。リポプロテイン(A)の低下はデキストランの凝集作用によるものと考えられる。異常値を来す項目は今後, 再考が必要と思われる。

ヘモグロビン小胞体に対応できる多波長パルス分光法を用いたパルスオキシメータ

須崎 裕典^{1,2}, 酒井 宏水¹, 小林 直樹², 池田 達彦³,
堀之内 宏久³, 小林 紘一³, 武田 朴^{1,2}, 戸川 達男¹,
土田 英俊¹

1 早稲田大学 理工学術院, 2 日本光電工業㈱,
3 慶應義塾大学 医学部 外科

ヘモグロビン小胞体について輸血代替としての酸素運搬機能と安全性が明らかにされてきた。今後の課題の一つとして、臨床現場で緊急投与をした場合に、患者の呼吸管理、各種検査、Hb小胞体の機能変化の観察が継続して支障なくできることが挙げられる。パルスオキシメータ(POM)は、経皮的・非侵襲的に動脈血の酸素飽和度と心拍数を計測でき、救急医療、集中医療の現場で日常的に利用され、その有用性も十分に認知されているので、Hb小胞体を投与した場合も、支障なく使用できることが望まれる。しかし、Hb小胞体は赤血球と同じ色素Hbを有しているものの粒子径が小さく光学的特性が異なること、また、Hb小胞体は次第にHbが酸化しメトヘモグロビン(metHb)が増大するが、POMはdeoxyHbとHbO₂の二成分系の測定を前提としているので、正確な測定が出来ないことは想像がつく。そこで本研究では、現行のPOMを使用した場合のHb小胞体の干渉作用の程度を確認するとともに、Hb小胞体を投与した後も酸素飽和度およびmetHb含量を正確に測定できる新しいPOMの開発を試みた。

In vitro試験として血液循環シミュレータを構築しブタ血液を循環させ、Hb小胞体で段階的に置換したところ、現行のPOM(DDG-3300, 日本光電)が表示する酸素飽和度(SpO₂)は低下する傾向にあり、血液置換60%のとき、SpO₂は約70%にまで低下し、Hb小胞体の干渉作用の存在が明らかになった。

現行POMシステムの測定波長(660, 940 nm)に対し、更に2波長(620, 730 nm)を加え、計4波長の発光ダイオードを測定プローブ(TL-301P)に組み込んだ。ビーム5匹を用いたHb小胞体の投与試験(循環血液量の40%置換)に際し、FiO₂を100, 20, 10%に設定して酸素飽和度を変化させ、採血液の酸素飽和度とmetHb含量の変化を4時間実測するとともに、測定プローブを舌に装着し減光度を計測した。各波長の減光度比から、酸素飽和度(SpO₂)、およびmetHb濃度を求める計算式を重回帰分析により構築し、DDG-3300の内部ソフトウェアに導入し改良型を試作した。現行型と改良型POMを比較検討したところ、Hb小胞体の投与により、現行POMのSpO₂計測精度は7.2 ± 3.3%であったが、改良型POMのSpO₂計測精度は1.1 ± 1.9%に改善され、また、MetHb計測精度は0.7 ± 1.3%であった。

今後更に最適波長の検討と投与実験を重ねることにより、精度の向上が期待できる。

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¹, 佐藤 敦¹, 宮川 賀仁¹, 武岡 真司¹,
堀之内 宏久², 高折 益彦³, 小林 紘一², 土田 英俊¹
1 早稲田大学 理工学術院, 2 慶應義塾大学 医学部 外科,
3 東宝塚さとう病院

Hb小胞体は、高濃度・高純度Hb溶液を内包した微粒子分散系なので、コロイド浸透圧が殆どゼロである。従って、大量投与に際しては循環血液量の維持のため代用血漿剤(水溶性高分子)の併用が必要な場合もありうる。これまでに、認可間近とされる遺伝子組換えヒトアルブミン(rHSA)にHb小胞体を分散させ、輸血代替としての効能と安全性を確認して来た(文献参照)。しかし国内外の臨床現場では代用血漿剤として、デキストラン(DEX)、ヒドロキシエチルスターチ(HES)、修正ゼラチン(MFG)が使用されているし、また最近、欧米の高分子量HES(Mw. 130 kDa, 670 kDa)も注目されている。水溶性高分子は微粒子と何らかの相互作用をしてflocculation(綿状の凝集体)を形成する場合があることが知られている。本学会が策定した“人工酸素運搬体製造に関する基本的留意事項(高折益彦, 人工血液 2005;13:104-111)”には「一般的な人工膠質との接触により結合・凝集を生じないこと」の記載もあり、Hb小胞体の臨床応用の前にこれらの代用血漿剤併用の影響について知る事は意味がある。そこで次のin vitro, in vivo試験を行った。

Hb小胞体を各種代用血漿剤に分散させ([Hb] = 10 g/dL), 粘弾性挙動を検討したところ, rHSA分散系はほぼNewton性を呈し, rHSAおよびHES₇₀(Mw 70 kDa)分散系が血液に最も近い粘度を示した。他の代用血漿剤に分散させた場合は, flocculationにより粘度の上昇が顕著であったが, 剪断速度の増大につれ粘度が低下する典型的なShear-thinningがみられた。高分子量HESでは粘度が顕著に増大した。しかし剪断速度の急激な変化に呼応して粘度も瞬時に変化し, flocculationの形成と解離は可逆的であった。また微小流路(4.5 × 7 μm, 20 cmH₂O)の流動では塞栓形成は一切無かった。

術中出血を想定した動物試験(ラット)として, 先ず代用血漿剤を投与して循環血液量を維持し(60%血液希釈), 次いでHb小胞体を投与(20 mL/kg)する実験を実施した。いずれの代用血漿剤を用いた場合もHb小胞体投与による血圧亢進は無く, また血液ガス組成は安定に推移した。採血液の粘度は正常血と同等或は低下していた。代用血漿剤によってはヘマトクリット値の上昇, 血圧の低下が見られたが, これは代用血漿剤の血中滞留性が低いことに起因すると考えられ, 対照的にrHSAを併用した場合は安定した値を推移した。

以上の結果について詳細を報告し, 議論をしたい。

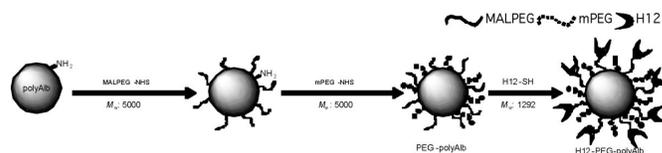
(文献) Sakai et al., Crit Care Med. 2004;32:539-45, Transfusion. 2006;46:339-47.

重篤な血小板減少症モデル動物を用いたH12ペ
プチド結合ポリエチレングリコール修飾アルブ
ミン重合体の止血能評価

藤枝 俊宣¹, 岡村 陽介¹, 半田 誠², 池田 康夫²,
武岡 真司¹
1 早稲田大学大学院 先進理工学研究科
2 慶應義塾大学 医学部

【緒言】フィブリノーゲン鎖C末端アミノ酸配列であるドデカペプチド(HHLGGAKQAGDV; H12)を担持させたポリエチレングリコール(PEG)修飾アルブミン重合体(H12-PEG-polyAlb)は, 静脈投与にて血小板減少症モデルラットの出血時間の短縮効果が確認されている¹⁾。本報では, 抗がん剤投与にて作製した血小板減少症モデルラットにH12-PEG-polyAlbを投与し, その止血能および安全性を評価した。

【実験】H12-PEG-polyAlbを以下のスキームにて調製し, リン酸緩衝液(PBS)に分散させて試料とした。



抗がん剤(buslphan)(投与量: 30 mg/kg)にて血小板減少症モデルウサギを作製し, H12-PEG-polyAlb投与30分後に耳をメスにて6 mm穿刺し, 生理食塩水中における出血時間(投与量: polyAlb 40, 80, 120 mg/kg)を測定した。さらに, 試料投与後ウサギの血液凝固系検査から安全性を評価した。

【結果・考察】New Zealand White Rabbitにブスルファンを0, 3日目に下腹部皮下投与したところ(全投与量: 30 mg/kg), ヘマトクリット値および白血球数の減少は確認されず, 15日目の血小板数が正常値の約1/15(2.6±0.8 × 10⁴ / μL)となった。そこで, この血小板減少症モデルウサギにH12-PEG-polyAlbを投与(投与量: 80 mg/kg)して出血時間を測定したところ, 生理食塩水群(1695±197 s), PEG-polyAlb群(1592±286 s)に対して, 有意に出血時間を短縮させ(834±266 s), 止血能を有することが判明した。さらに, 投与後ウサギの血液凝固系検査において, H12-PEG-polyAlb投与時と生理食塩水群間のAPTT, フィブリノーゲン, PT値に, 有意差は確認されなかったことより, H12-PEG-polyAlbは血小板減少症モデルウサギにおいても止血能を有し, さらに安全性を有する微粒子であることが明らかになった。

1) Okamura, Y., Fujie, T. et al. Transfusion.(in press)

一般演題-2

ドデカペプチド結合 (アデノシン5'-二リン酸) 内包リン脂質小胞体の血小板代替物としての止血能増幅効果

岡村 陽介¹, 前川 一平¹, 藤枝 俊宣¹, 江藤 薫子¹,
池田 康夫², 半田 誠², 武岡 真司¹

1 早稲田大学大学院 先進理工学研究所

2 慶応義塾大学 医学部

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

【実験】H12 (HHLGGAKQAGDV) を、マレイミド基結合ポリエチレングリコール (MALPEG; Mw=3.4 kDa) を介して小胞体に担持させてH12-小胞体を調製した。CF (10 mM) あるいはADP (1 mM) を内包させたH12-小胞体をPRPに分散させ ([PLT] = $2.0 \times 10^5 / \mu\text{L}$, [小胞体] = f.c. 0.05 mg/mL), ADP添加 ([ADP] = f.c. 2 μM) により血小板凝集を惹起させて、血小板凝集計にて透過度とCF蛍光強度を測定した。血小板減少症ウサギ (11週齢, 2.5 kg) にH12-(ADP) 小胞体を投与し、出血時間を測定した。

【結果・考察】CF内包H12-小胞体 (1) と小胞体 (2) との血小板凝集能の比較では、(1) の方が透過度が約10%増大した。これは、H12-PEG小胞体が活性化血小板とGPIIb/IIIaを介して多点結合し、血小板凝集が促進されたためと考えられる。この時のCF放出率は、(1) の方が(2) の場合と比較して約15倍も増大した。これは、小胞体がH12を介して血小板と結合し、凝集した血小板の形態変化による物理的刺激により小胞体膜バリアー能が低下してCF放出が促進されたと考えられる。血小板減少症ウサギにH12-(ADP) 小胞体をそれぞれ10, 20 mg/kgで投与したところ、出血時間はそれぞれ 881 ± 303 , 442 ± 45 秒であり、生理食塩水群 (1696 ± 197 秒) あるいは(ADP) 小胞体群 (10, 20 mg/kg で 1503 ± 481 , 1375 ± 663 秒) と比較して、投与量依存的に有意に出血時間を短縮させ、血小板輸血群のそれに匹敵した。従って、ADP内包によるH12-小胞体の止血能の向上が明らかとなり、血小板減少症ウサギの出血時間を効率よく短縮させる微粒子が構築された。

1) Okamura, Y. et al. Bioconjugate Chem. 16, 1589-1596 (2005).

一般演題-3

Statistically valid structural information on hemoglobin vesicle (HbV) by means of small-angle X-ray scattering (SAXS) and dynamic light scattering (DLS)

Takaaki Sato, Hiromi Sakai, Keitaro Sou, Otto Glatter, and Eishun Tsuchida

Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda Univ.

Institute of Chemistry, University of Graz

Using the latest experimental and analytical techniques of small-angle X-ray scattering (SAXS) and dynamic light scattering (DLS) we investigated the static and dynamic structures of hemoglobin vesicle (HbV) and its related systems, e.g., highly pure concentrated haemoglobin (Hb) and a solution of uni-lamellar vesicle designed for Hb encapsulation. Statistically valid information about HbV like size, size distribution, internal structure (state of Hb inside the particle) and the detailed structure of uni-lamellar vesicle are obtained quantitatively.

The structure factor $S(q)$ analysis based on GIFT technique with SAXS data on highly pure concentrated hemoglobin revealed that Hb under physiological condition still preserves the nature of a charged colloid, showing slightly lower $S(0)$ value (lower isothermal compressibility) than that predicted for the hard-sphere interaction. Owing to weak but elaborately optimized electrostatic repulsion, Hb shows faster collective diffusion, efficiently reducing the intermolecular frictional force at the nearest neighbour distance.

The forward SAXS intensity of HbV dispersion represents a feature of a globular particle having a radius of 130nm, while high q -part well reflects that of encapsulated highly concentrated Hb solutions. In the actual presentation, we will provide a more detailed structure analysis of HbV (total and internal structure, and interparticle interactions) obtained using SAXS, which is well supported by the results of DLS. All the results demonstrate structural biological relevance of HbV.

References

- 1) T. Sato, H. Sakai, K. Sou, R. Buchner, and E. Tsuchida 'Poly(ethylene glycol)-conjugated Phospholipids in Aqueous Micellar Solutions: Hydration, Static Structure, and Interparticle Interactions' J. Phys. Chem. B, 111, 1393-1401 (2007)
- 2) T. Sato, T. Komatsu, A. Nakagawa, and E. Tsuchida 'Induced long-range attractive potentials of human serum albumin by ligand-binding' Phys.Rev.Lett., in press (2007)
- 3) H. Sakai, M. Yuasa, H. Onuma, S. Takeoka, and E. Tsuchida Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: Objective comparison between cellular and acellular types Bioconj. Chem. 11, 56-64 (2000)

組換えヒト血清アルブミン-プロトヘム錯体におけるヘムポケット構造と酸素結合能の相関

中川 晶人, 小松 晃之, 土田 英俊
早稲田大学 理工学術院 理工学研究所

In vitroにおけるヘモグロビン小胞体のヒトTリンパ球増殖反応に対する影響

藤原 満博¹, 高橋 大輔¹, 東 寛¹, 酒井 宏水²,
宗 慶太郎², 武岡 真司², 土田 英俊², 池田 久實¹
1 北海道赤十字血液センター
2 早稲田大学 理工学総合研究センター

[緒言]

ヒト血清アルブミン(HSA)は、血漿蛋白質の約60%を占める補欠分子族を持たない単純蛋白質(Mw: 66.5 kDa)であり、血中では、内因性・外因性物質を運搬・貯蔵している。我々は、HSAのサブドメインIB内に遺伝子組換え技術を用いてヒスチジンを導入すると、得られた組換えアルブミン-プロトヘム(rHSA-heme)錯体が、ヘモグロビンと同じように酸素を吸脱着できることを明らかにした¹⁾。今回は、酸素配位座近傍空間に所望のアミノ酸を変異導入したrHSAを合成、rHSA-heme錯体の酸素結合パラメーターの観測から、ヘムポケット構造と酸素結合能の相関について検討した。

[方法]

pHIL D2-HSAへ変異を挿入、*Pichia pastoris*を用いて4種の三重変異体rHSA(I142H/Y161L/L185N)、rHSA(I142H/Y161F/L185N)、rHSA(I142H/Y161L/R186L)、rHSA(I142H/Y161L/R186F)を発現した。既報¹⁾に従い、各rHSA(mutant)にヘミンを包接させ、rHSA(mutant)-hemin[1/1(mol)]錯体のリン酸緩衝水溶液(pH 7.0)を調製、アルゴン雰囲気下で中心鉄を還元しdeoxy体を得た。軸配位構造は、可視吸収、磁気円偏光二色性スペクトル測定により解析、酸素親和性(P1/2)、酸素結合解離速度定数(k_{on} , k_{off})は、レーザーフラッシュホトリシス法を用いて決定した。

[結果及び考察]

Y161Lの場合、Leu-185をAsnに変換すると、酸素親和性が18倍に増大する。これは k_{off} の低下に起因し、配位酸素とAsnアミド基間の相互作用が示唆された。一方、Y161Fの場合、Asn導入による酸素親和性の変化は見られなかった。かさ高いPhe-161が、Asn-185の接近を妨げていると推測される。また、ヘムポケット入り口にあるArg-186をHisに変換すると、典型的なビスヒスチジン6配位鉄()低スピン錯体が得られた。186位置はヘム鉄の第6配位座最近傍にある重要アミノ酸であることがわかる。そこで、186位置へ疎水性のLeu, Pheを挿入すると、 k_{off} が増大し、酸素親和性は約1/3に低下した。これはヘムポケットの疎水性が増し、 k_{off} が上昇したためである。P1/2値は9~10 Torrであり、ヒト赤血球の値(8 Torr)と同等となった。

[文献]

1) T. Komatsu, et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 14304; *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 15933.

【目的】ヘモグロビン小胞体(HbV)は、人工酸素運搬体の一つとして開発され、動物モデルにおいてその有効性が示されている。HbVの非臨床試験に向けて、HbVの生体適合性の評価は重要と考えられる。我々はこれまで、HbVの免疫系へ及ぼす影響について検討し、HbVを投与したラットの脾細胞では、非特異的なマイトジェンであるコンカナバリンA(ConA)刺激に対し、一過性の反応抑制がみられることを報告している。そこで今回は、この現象が、ヒトのリンパ球においてもみられるかどうかについて、空のリポソームを含め、in vitroの評価系で検討を試みた。

【方法】ヒト末梢血より分離した単核球をRPMI/FCS/2MEに浮遊し、10%相当のHbV、空リポソーム、dipalmitoyl phosphatidyl choline(DPPC)のみから調整したリポソーム、およびトリグリセリドを主成分とするイントラリピッドを添加した。ConA 1, 3, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ にて3日間刺激し、増殖能を3H-thymidineの取り込みにて評価した。Tリンパ球の活性化の指標として、CD25(高親和性IL-2R)およびCD69の細胞表面への発現増加をフローサイトメトリーにて測定した。また、HbVへの暴露時間の影響を調べるためHbV存在下で1日~3日間培養し、その後細胞を洗浄した後、同様にConA刺激に対する増殖能を測定した。

【結果】(1) HbVは、ConA濃度1, 3, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ によるTリンパ球の増殖反応を有意に抑制した。空リポソームおよびDPPCのみのリポソームでは、ConA濃度1, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において増殖抑制がみられたが、イントラリピッドではどの濃度においても有意な増殖抑制はみられなかった。(2) ConA刺激によるTリンパ球のCD25およびCD69の発現増強は、HbV存在下でのみ有意に抑制された。(3) ヒト単核球のHbVへの暴露時間が1日の場合は、その後のConA刺激に対する反応の抑制はみられなかったが、暴露時間が2~3日間では、その後のConA刺激に対する増殖反応が明らかに低下した。

【考察】ヒト単核球を用いたin vitroの系において、ラット脾細胞を用いたin vivoの系と同様に、HbVによる増殖抑制が認められた。この増殖抑制は、ConA刺激前のHbVに曝される時間が影響すること、さらに、Tリンパ球の活性化の初期段階での抑制が一因と考えられた。HbV以外の空のリポソームおよびDPPCのみのリポソームにおいても、増殖反応の抑制がみられたことから、増殖反応の抑制は、リポソーム自体の関与が示唆された。

一般演題-6

リポソームがラット免疫系に及ぼす影響

高橋 大輔¹, 藤原 満博¹, 東 寛¹, 宗 慶太郎²
酒井 宏水², 武岡 真司², 土田 英俊², 池田 久實¹

1 北海道赤十字血液センター

2 早稲田大学 理工学総合研究センター

【目的】ヘモグロビン小胞体 (HbV) は, 高純度濃厚ヒトヘモグロビン溶液を脂質二分子膜で被覆し, 表面をポリエチレングリコールで修飾した人工酸素運搬体である. 昨年, 本学会において HbV 投与による脾細胞での増殖能の低下には, 内包されている Hb ではなく, 空リポソームが関与していることを報告した. 今回は, リポソームのどの成分が増殖能に影響を与えているのかを明らかにするため, 脂質の大量投与による増殖能への影響, およびリポソームの構成成分を単純化した試料を用い検討を行った.

【方法】WKAH ラットに循環血液量の 20% 相当の HbV, 空リポソーム, PEG 修飾を取り除いた空リポソーム, dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) からなるリポソーム, 脂肪乳剤であるイントラリピッドをエーテル麻酔下で, 尾静脈より輸注した. 対照群には同量の生理食塩水を輸注した. 投与 24 時間後, 脾臓を摘出し, RPMI/FCS/2-ME で懸濁した後, ConA (0.3, 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 刺激に対する増殖能を ^3H -thymidine の取り込みにより評価を行った.

【結果】HbV, 空リポソーム投与したラットの脾臓の肥大が観察され, その脾細胞において, 低濃度 ConA 刺激 (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に対する増殖能の抑制が認められた. PEG 修飾を取り除いた空リポソーム, および DPPC からなるリポソームでも HbV あるいは空リポソーム同様に ConA 刺激に対する脾細胞の増殖抑制と脾臓の肥大がみられた. 一方トリグリセリドを主成分とするイントラリピッド投与群においては, 増殖抑制と脾臓の肥大を認めなかった.

【考察】空リポソームだけでなく PEG 修飾を取り除いた空リポソーム, さらに最も単純化した DPPC からなるリポソームでも増殖抑制が惹起されることから, HbV の投与に伴って認められるリンパ球の増殖抑制は, あらゆるリポソームに共通に認められる不可避な現象の可能性が示唆される. また, リポソーム化していない脂質であるイントラリピッドを大量輸注しても増殖抑制, 脾臓の肥大を認めないことから脂質そのものは増殖抑制には関与せず, リポソーム化したリン脂質が脾臓内に一過性に集積することによって増殖抑制が惹起されると推測される.

投稿規定

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

執筆規定

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

- 1) 原稿はワープロを用いて作成し、使用したソフト名を記載してフロッピーにより提出すること。その際、ハードコピー4部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。オリジナルのソフトおよびテキストファイル形式でも保存し提出すること。
- 2) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著者名、全著者所属、英文著者名、英文所属、ついで筆頭著者の住所、英文住所を記入する。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。
- 3) 総説、原著、および報告については、第2頁以降に和文抄録、Keywords(英文で6個程度)を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること。英文抄録は英文ワープロを用いて、別の「ABSTRACT」ファイルとしてハードコピーとともに提出しても構わない。
- 4) 句読点はコンマ(、)とピリオド(。)とする。
- 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbol フォントを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめること。
- 6) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μ m, L, mL, μ L,

mol, g, mg, μ g, ng, pg, fg, N/10などを用いる。

- 7) FigureとTable: 引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は全て英文とすること。本文ハードコピー上に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。
- 8) 文献: 本文に引用した順序に番号を付け、文中では²⁾, ³⁻⁵⁾, ^{1,4-6)}などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名・論文題名・誌名・西暦発行年; 巻数: 頁~頁. とし、誌名の省略は医学中央雑誌またはIndex Medicus に準拠する。単行本の場合は全著者名・題名・編集者名・書名・発行地: 発行書店, 年号; 頁~頁. の順とする。
 1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
 2. 砂本順三, 岩本 清. リポソームの調製. 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 [雑誌タイトル] 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.15(1) 2007年6月7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