

人工血液

第 16 巻 第 4 号 2009 年 2 月

目 次

会告	186
総説	巨大ヘモグロビンの構造と機能三木 邦夫 他 188
原著	多波長パルス分光法を用いたHb小胞体用 パルスオキシメータに関する研究須崎 裕典 他 198
総説	体外循環時におけるリポソーム型人工酸素運搬体 (TRM645) の有用性と安全性に関する研究 ...水野 敏秀 他 205
	ヘモグロビン小胞体のin vitroにおけるヒト血液細胞および 血漿タンパクへの適合性藤原 満博 他 212
事務局たより	222

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 16 No. 4 February, 2009

Contents

<i>Announcement</i>	186
<i>Review: Structure and Function of Giant Hemoglobins</i>Kunio Miki, et al.	188
<i>Original Article:</i> <i>Study on Multiwavelength Pulse Spectrophotometry</i> <i>Applicable for Hemoglobin-vesicles</i>Hironori Suzaki, et al.	198
<i>Review: Evaluation of a Novel Combined Therapy of a Extracorporeal</i> <i>Cardiopulmonary Bypass Using Liposome-encapsulated</i> <i>Hemoglobin (TRM645)</i>Toshihide Mizuno, et al.	205
<i>Biocompatibility of Hemoglobin Vesicles, a Cellular-type</i> <i>Artificial Oxygen Carrier, on Human Blood Cells and</i> <i>Plasma Proteins in Vitro</i>Mitsuhiro Fujihara, et al.	212

会 告

第16回日本血液代替物学会年次大会

期 日：平成21年10月16日(金)，17日(土)

会 場：慶應義塾大学 信濃町キャンパス医学情報センター 北里講堂 (予定)

テーマ：「世界をリードする血液代替物」

・シ ン ポ ジ ウ ム “細胞型人工酸素運搬体を作る”

・特 別 講 演 “人工血小板の過去，現在，未来”

“微小血管内での微粒子の不思議な流れ”

“獣医学と血液代替物研究”

・ランチョンセミナー “代用血漿剤 Hydroxyethyl Starch”

※一般演題・・・広く血液代替物研究に関係ある演題を募集

演題申込締め切り 平成21年7月21日 (火)

詳細は日本血液代替物学会ホームページ，あるいは次号参照

第16回日本血液代替物学会年次学術総会会長

東宝塚さとう病院 名誉院長

川崎医科大学 名誉教授

高折 益彦

会 告

平成20年度厚生労働省科学研究費補助金
政策創薬総合研究推進事業 研究成果等普及啓発事業
平成20年度 研究成果発表会

人工血液をつくる（9）

平成21年2月11日（水）

時 間：9：00～17：10

慶應義塾大学信濃町キャンパス医学情報センター 北里講堂

定 員：250名

主 催：財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

後 援：日本血液代替物学会

プログラム

総合司会	慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 准教授	堀之内 宏久
10：10～10：20	「御挨拶」 厚生労働省 医政局 研究開発振興課	
10：20～10：30	「御挨拶」 日本赤十字社 輸血事業本部 経営会議委員、中央血液研究所所長	田所 憲治
	座 長 川崎医科大学 名誉教授、東宝塚さとう病院 名誉院長	高折 益彦
10：30～10：50	「人工血液開発の将来展望」 （演者）慶應義塾大学 医学部 名誉教授	小林 紘一
10：50～11：20	「人工赤血球の出血性ショックへの応用」 （演者）慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科	堀之内 宏久
11：20～11：50	「重症呼吸器疾患における人工血液の役割」 （演者）慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科	泉 陽太郎
11：50～12：50	昼休み	
	座 長 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科 准教授	堀之内 宏久
12：50～13：20	「赤血球構造の生理的意義とヘモグロビン小胞体」 （演者）早稲田大学 理工学術院 理工学研究所	酒井 宏水
13：20～13：50	「虚血性脳血管疾患あるいは出血性ショック時の人工酸素運搬体投与の効果について」 （演者）慶應義塾大学 医学部 神経内科	富田 裕
	座 長 慶應義塾大学 医学部 名誉教授	小林 紘一
13：50～14：20	「人工赤血球の体内動態について」 （演者）熊本大学大学院 医学薬学研究部 薬物動態学	小田切 優樹
14：20～14：50	「人工血液使用時の免疫の変調について」 （演者）北海道赤十字血液センター 研究部	東 寛
14：50～15：00	休憩	
	座 長 早稲田大学 理工学術院 理工学研究所 准教授	酒井 宏水
15：00～15：30	「遺伝子組換え人血清アルブミン製剤の誕生から承認まで」 （演者）田辺三菱製薬株式会社 研究本部 先端医療研究所 先端医療研究部 精製工学グループ	大谷 渡
15：30～16：00	「人工血小板の開発現状」 （演者）慶應義塾大学 医学部 輸血・細胞療法部	半田 誠
16：00～16：10	「閉会のご挨拶」 慶應義塾大学 医学部 血液内科 教授	池田 康夫

巨大ヘモグロビンの構造と機能

Structure and Function of Giant Hemoglobins

沼本 修孝^(1,2), 中川 太郎^(2,3), 福森 義宏⁽²⁾, 三木 邦夫⁽¹⁾Nobutaka Numoto^(1,2), Taro Nakagawa^(2,3), Yoshihiro Fukumori⁽²⁾, Kunio Miki⁽¹⁾

和文抄録

無脊椎動物のヘモグロビン (Hb) は、よく知られている脊椎動物のHb四量体とは異なり、多様なオリゴマー状態と会合様式を示す。なかでも環形動物の巨大Hbの構造解析は難航していたが、近年になりようやく高分解能の結晶構造が得られるようになってきた。環形動物マシコヒゲムシの巨大Hbは分子量約40万の24量体構造であり、他の無脊椎動物にもみられる2量体構造が規則正しく会合している。他の環形動物の異なる巨大Hb間においても、共通の構造がみられた。マシコヒゲムシの巨大Hbは酸素と同時に硫化水素も運搬することができると考えられ、結晶構造からその分子機構が推察された。また、巨大Hbとしては初めて、一部のサブユニットがリガンド非結合型となっている結晶構造の解析もなされた。これまでの酸素結合型と比較して構造の変化が認められ、巨大Hbの協同性機構の解明へ向けて重要な知見が得られた。巨大Hbは一般に酸素親和性が高く、また自動酸化されにくい、その理由が結晶構造からも確認できた。

Abstract

Invertebrate hemoglobins (Hbs) show remarkably different oligomeric structure and quaternary assemblage from well-known mammalian tetrameric Hb. Recent crystallographic studies reveal structures of some giant Hbs of annelids. The structure of giant Hb from *Oligobranchia mashikoi* has been determined. *Oligobranchia* Hb shows 24meric hollow-spherical structure. It is constructed from the common dimeric units, which occurs in some invertebrates. The same dodecameric subassembly is observed in the structures of other annelids. *Oligobranchia* Hb has ability to bind sulfide as well as oxygen, and the structure also provides insights into the mechanisms of sulfide-binding. In addition, the structure of partially unliganded met form is solved. Compared to the structure of oxy form, the remarkable structural changes are observed. These findings provide insights into the cooperative mechanisms. Structural bases for the high oxygen affinity and autoxidation resistance of giant Hbs have also been elucidated.

Keywords

crystal structure, giant hemoglobin, polychaete, assembly, cooperative, sulfide

はじめに

ヒトやウシ、ウマなどの脊椎動物のヘモグロビン (Hb) は、古くから各分野において非常によく研究されているタンパク質である。また、原子レベルでの立体構造がX線結晶構造解析の手法を用いて初めて決定されたタンパク質としても、ひろく知られている。その後、酸素結合型 (oxy型)、酸素非結合型 (deoxy型) の結晶構造も相次いで決定され、Hbの酸素平衡曲線がシグモイド状のカーブを示す (協同性) 機構がその立体構造のちがいから説明され、構造と機能の関係が明確にされた代

表的な例となった¹⁾。

Hbの構造解析の成功によって、タンパク質のような巨大分子についても、その原子ひとつひとつに至るまでの立体構造を精度よく決定する手法が実証され、タンパク質をはじめとする生体高分子が働く機構を、その立体構造から解明しようとする構造生物学の原点ともなった。この十数年間には技術的な進展もあいまって、立体構造が解明されたタンパク質等は年々指数関数的に増加し、現在までに5万以上のタンパク質の原子座標がPDB (Protein Data Bank, <http://www.pdb.org/>) にデータ

(1) 京都大学大学院理学研究科 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町 Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Kitashirakawa oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

(2) 金沢大学大学院自然科学研究科 Department of Life Science, Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University

(3) 現所属：法政大学マイクロ・ナノテクノロジー研究センター Research Center for Micro-Nano Technology, Hosei University

論文受付 2008年8月30日 論文受理 2008年10月1日

ベース化されるまでになった。今日では、タンパク質の機能を深く議論するために、その詳細な立体構造の情報は欠かせないという認識は、多くの研究者に広く受け入れられるようになった。

脊椎動物Hbの構造解析以後、無脊椎動物のHbの解析もいくつかなされてきた。無脊椎動物は、脊椎動物のものとは異なったHbを有しているが、そのなかでも、単量体や二量体、四量体の比較的小さなHb（脊椎動物Hbは四量体）で立体構造が決定されている。一方、ミミズやゴカイなどの環形動物には、数十ないし百以上のサブユニットからなる多量体構造のHbが存在し、その分子量は数十万から数百万にも及ぶ。しかしながらこのような環形動物の巨大Hbについては、その巨大な分子量ゆえに長い間解析が困難であった。本稿では、近年ようやく詳細な立体構造が解明されつつあるこれらの巨大Hbについて、構造解析から明らかになったことを概説する。

X線結晶構造解析法

現在、タンパク質などの生体高分子の立体構造を決定する主な手法としては、前述のX線結晶構造解析の他、NMRによるもの、また電子顕微鏡による解析がひろく行われている。ところが、NMRによる解析では、溶液状態で測定ができるというメリットがある一方、適用できる分子量がおおよそ数万までに限られ、比較的小さなタンパク質にしか適用できない。また、電子顕微鏡による解析については、ごく一部の例外を除き、個々の原子位置を決定できるほどの分解能を得ることが困難である。X線結晶構造解析法は、良質なタンパク質の単結晶が得られれば、解析可能な分子量にはほぼ限界はなく、また十分な分解能（目安として、3 Å以上）があれば個々の原子座標を決定することから、今日の構造生物学において構造決定法の主流となっており（Fig. 1）、PDBに登録されている構造数の実に約85%がこのX線結晶構造解析法によるものである。

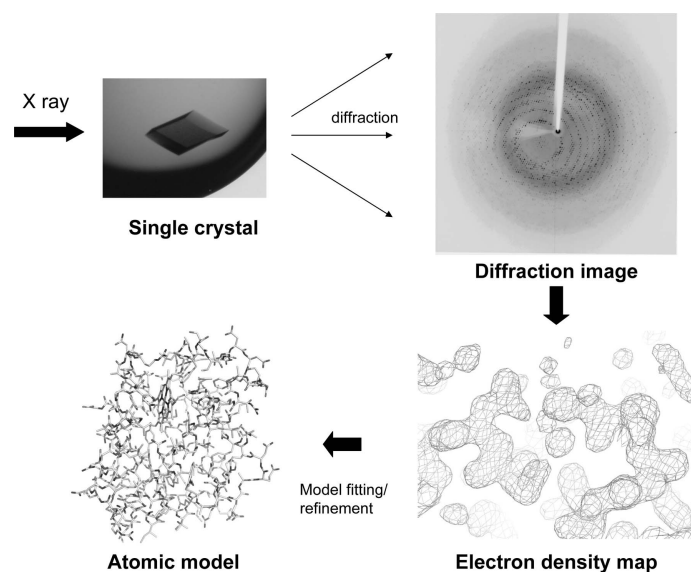


Fig. 1. Overview of X-ray crystal structure analysis.

また、近年の放射光施設の整備は、構造解析の成功の飛躍的な上昇に大きく貢献している。放射光施設で利用できるX線の強度は非常に強く、通常実験室で用いる回折実験用X線発生装置から得られるX線（タンパク質では多くの場合Cu K α 線を利用する）と比べて最大で3-4桁程度も大きい。これにより、実験室のX線発生装置を用いた解析をはるかに上回る精度、分解能での解析が可能となったほか、そもそもこれまで解析が困難であった回折能の弱い結晶や、サイズの小さな結晶からでも迅速に構造解析を行うことが可能となった。現在もX線ビームの高輝度化やタンパク質X線結晶構造解析用ビームラインの高度化などが精力的に進められており、これに伴って、これまで結晶化が困難でよりサイズの小さな微結晶しか得ることができなかったような場合でも構造解析が可能になるなど、今後もこれまで解析が困難とされたタンパク質、特に巨大なタンパク質複合体や膜タンパク質などについても結晶構造が決定されることが期待されている。

無脊椎動物のHb

無脊椎動物においては、酸素を結合・運搬する役割を果たすものとして、Hbやヘモシアニンがよく知られている。無脊椎動物のHbは、脊椎動物と基本的に同一の構造のグロビン鎖から構成されているが、多量体を形成する際の会合の様式が大きく異なる（Fig. 2）。さらに脊椎動物のHbが α 鎖、 β 鎖ふたつずつからなる四量体であるのに対し、無脊椎動物のHbには、単

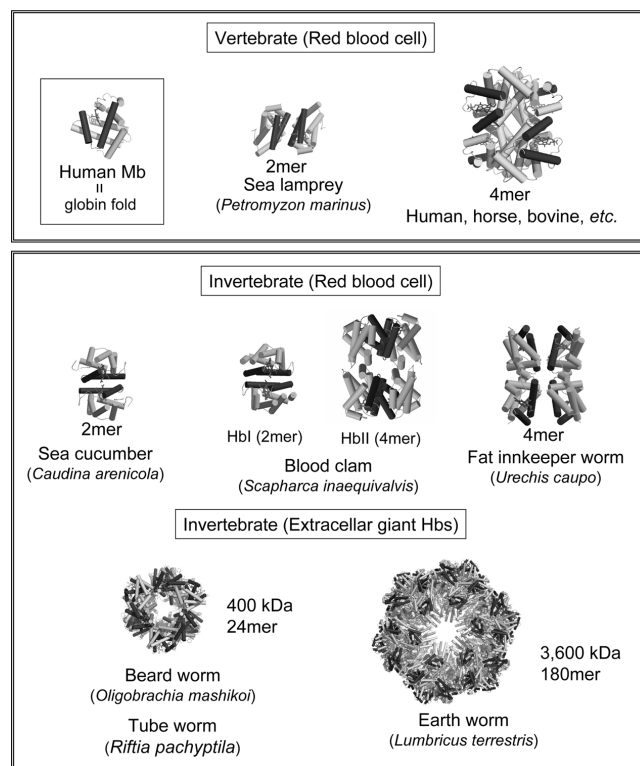


Fig. 2. Oligomeric Hbs whose crystal structures have been determined. Cylindrical representations of known structure of vertebrate and invertebrate Hbs are shown. Human Mb is included. The E and F helices accommodating the heme are highlighted.

量体から、ときには非グロビン鎖を含む100以上のサブユニットから構成される巨大なHbを持つものも存在する²⁾。それらの酸素親和性、協同性などの性質はそれぞれで全く異なっており、特に協同性を発揮する機構については、脊椎動物のHb四量体とは分子の会合状態が異なることから、まったく別個のメカニズムで実現していると思われる。このような無脊椎動物のHbの立体構造が解明された例はあまり多くなく^{3,4)}、とくに酸素（一酸化炭素）結合型と非結合型の双方の構造に基づいた詳細な協同性機構の研究例は、わずかにアカガイ（*Scapharca inaequivalvis*）のHbI⁵⁾にあるのみである。

ミズズゴカイなどの環形動物の一部に、分子量が数十万、あるいは数百万にも及ぶ巨大なHb（erythrocrucorinとも呼ばれている）が存在していることは古くから知られており、超遠心分析法や電子顕微鏡の開発の黎明期にすでに研究対象として用いられている。しかしながら、原子レベルでの構造は決定されておらず、多数のグロビン鎖がどのように構成されて機能しているのか、詳細は不明であった。

マシコヒゲムシ巨大Hbの結晶構造

われわれは環形動物の一種である有鬚動物マシコヒゲムシ（*Oligobranchia mashikoi*）の巨大Hb（分子量約40万）の構造を、シンクロトロン放射光を用いたX線結晶構造解析により2.85 Å分解能で解明した⁶⁾。この巨大Hbは4種類のグロビン鎖（A1, A2, B1, B2）がそれぞれ6つずつ会合し、球状の24量体を形成していた（Fig. 3a）。分子の直径は約120 Å（12 nm）であり、内部には直径およそ50 Å（5 nm）の空洞を有している（Fig. 3b）。

4種類のグロビン鎖から24量体が形成される様子は、規則正しい階層的なものであった（Fig. 3c）。まず、A1鎖とB1鎖が会合して2量体を形成する。同様にA2鎖とB2鎖も全く同様な2量体を形成する。さらにこの2種類の2量体が会合し、4量体

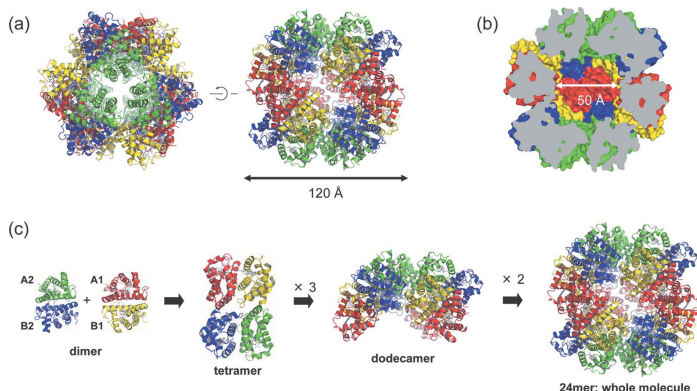


Fig. 3. Overall structure and structural hierarchy of *Oligobranchia* Hb. A1, A2, B1, and B2 subunits are shown in red, green, blue, and yellow, respectively. (a) Overall structure of *Oligobranchia* Hb. The views along the three-fold axis (left) and the two-fold axis (right) perpendicular with the three-fold axis. (b) Sliced surface model of *Oligobranchia* Hb reveals hollow-spherical structure. (c) Hierarchical subassemblies of *Oligobranchia* Hb.

を形成する。またさらにこの4量体が3つ会合し、12量体となる。最後に12量体が2つ会合して、24量体となっていた。

また、この巨大Hbの構造中には多くのdisulfide結合がみられた。まず4種のグロビン鎖にはすべて、分子内に1箇所のdisulfide結合が存在する。さらに4量体内のA1鎖とB2鎖間にもdisulfide結合が形成されており、また4量体同士を結びつけるようにもdisulfide結合が存在していた（Fig. 4）。これらの分子間disulfide結合は、12量体構造のいわば外縁部をつなぎ止めるような形で存在しており、12量体構造を安定に保つために寄与していると考えられる。12量体同士の会合に関しては特にdisulfide結合の形成はない。これは接触面積が十分に確保されているためであろう。

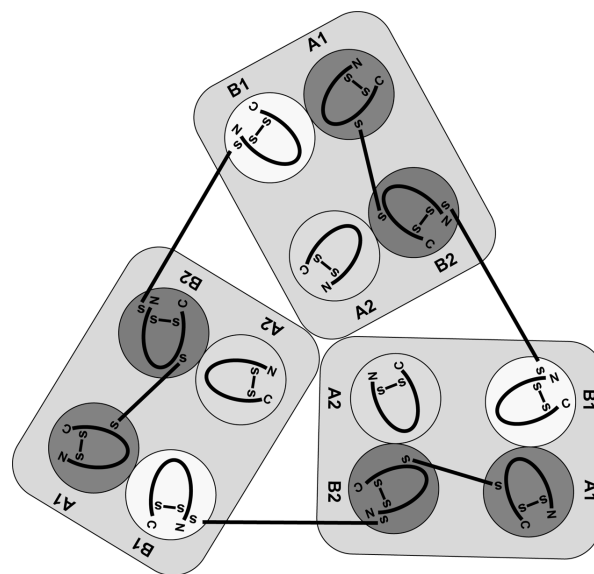


Fig. 4. Schematic diagram of disulfide bonds in the dodecamer subassembly of *Oligobranchia* Hb. Each globin is shown as a circle, and tetramer subassembly is shown as a rounded square. Disulfide bonds are indicated as bold lines.

12量体構造の共通性

私たちのマシコヒゲムシ巨大Hbの構造解析にわずかに先だって、同じ環形動物であるツリミミズ（*Lumbricus terrestris*）の巨大Hb（erythrocrucorin）の部分構造についてのX線結晶構造解析が報告された⁷⁾。ツリミミズの巨大Hbは分子量およそ360万にもおよぶ巨大なHbであり、グロビン鎖144個と、リンカー鎖と呼ばれる分子量25,000前後の非グロビンサブユニット36個の、計180個のサブユニットより構成されている。それまでの電子顕微鏡や低分解能のX線結晶構造解析⁸⁾により、グロビン鎖12量体と、リンカー鎖3量体がひとつのユニットを形成し、それが12ユニット会合していることがわかっていった。このうちグロビン鎖12量体だけの結晶構造がまず報告されたのだが、直後にわれわれが解析したマシコヒゲムシ巨大Hb内の12量体構造と、disulfide結合の位置も含めて全く同一の会合様式

であった (Fig. 5). すなわち、有鬚動物の24量体巨大Hbと、環形動物の180量体巨大Hbは、どちらも4種類のグロビン鎖からなる共通の12量体構造を構成要素としていることが明らかとなった。

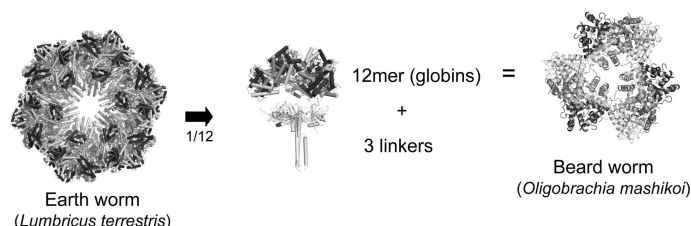


Fig. 5. Structural components of giant Hbs.

Both *Lumbricus* Hb (3,600 kDa) and *Oligobranchia* Hb (400 kDa) have common globin-dodecamer subassembly.

ツリミミズの巨大Hbに関してはその後、すべてのサブユニットを含んだ全体の結晶構造が、3.5 Å分解能で報告されている⁹⁾。

2量体構造の共通性

マシコヒゲムシと、ツリミミズの巨大Hbに共通してみられる12量体部分構造のうち、さらにこれを構成する2量体の会合様式について、同様のものがいくつかの無脊椎動物のHbに見られる。Fig. 2.には、これまでに解明された無脊椎動物Hbの立体構造のうち、2量体以上のものを示した。これ以外にも、単独のグロビン鎖で働いているHbも多く、それらの立体構造も多数報告されているが、ここではすべて省略してある。

マシコヒゲムシやツリミミズの巨大Hbの構成単位となっている2量体構造は、軟体動物のアカガイ^{5,10)}や、棘皮動物のナマコ (*Caudina arenicola*) のHb¹¹⁾における2量体構造と基本的に同一の会合様式である。すなわち、ヘムを挟み込むように配位しているEヘリックスとFヘリックスを、各々向かい合わせるようにして2量体を形成している。このような会合様式のため、これらはEFダイマーと呼ばれている。

EFダイマー構造では互いのヘムのプロピオン酸の距離は最も近いところで3-6 Åほどしかなく、またヘム周辺の環境に大きく寄与しているEヘリックス、Fヘリックスの残基が互いのサブユニットの残基と接触していることから、いかにも協同性の機構に直接影響していると考えられる。無脊椎動物Hbのなかで唯一、アカガイのHbIで協同性の機構が詳細に議論されているが^{5,12-16)}、はたして、2量体接触面に位置するE10 (Thr), F3 (Lys), F4 (Phe) が協同性の機構に大きく関わっていることが明らかにされている。興味深いことに、アカガイHbIはCO結合型とdeoxy型で、その会合状態はほとんど変わらない。上記のE10, F3, F4を含む、2量体接触面付近の残基とヘム分子のわずかな動きによって、一方のサブユニットにおけるligand分子の結合・解離の情報を伝えているものと考えられる。これは、oxy型とdeoxy型でその四量体の会合状態を大きく変えて協同性を発揮する脊椎動物のHbとはまったく異なった機構である。

アカガイ、ナマコ、環形動物のEFダイマー構造を基準に、これまでに明らかになっているHbの構造を2量体に注目して比較したものがFig. 6である。マシコヒゲムシ、ツリミミズの巨大HbはEFダイマーとして分類した。アカガイはHbIとHbIIの2種類のHbを持っているが、HbIIはHbIと同様のEFダイマー構造がさらにふたつ会合した4量体である¹⁰⁾。これは、巨大Hbの4量体構造とよく似た会合状態でもあり、やはりEFダイマーとして分類できる。ユムシ (*Urechis caupo*) のHb¹⁷⁾は4量体であるが、これも2量体構造がさらに会合したものとみなせる。原始的な脊椎動物であるヤツメウナギ (*Petromyzon marinus*) のHbは (進化上の前後は無視すると)、EFダイマーから少し変化したものであるとみなせ、依然互いのEヘリックスとFヘリックスは比較的近い位置に配置している。ユムシHbの2量体構造ではこれがさらに離れ、ヒトなどの脊椎動物Hbの2量体 ($\alpha\beta$) に至っては、もはや互いのEヘリックスとFヘリックスは完全に逆方向に配置されるかのような会合状態となっている。このように、脊椎動物のHbと無脊椎動物のHbが極めて異なった機構で協同性を実現していることが、そのグロビン鎖会合状態の違いからも明らかであろう。

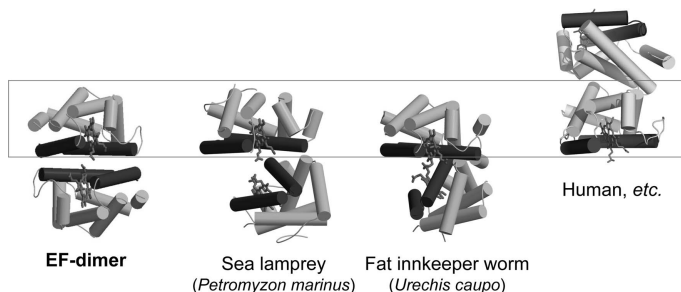


Fig. 6. Dimeric Hbs or dimer subassemblies of the oligomeric Hbs.

The orientation of each dimer structure is aligned with that of an upper subunit of EF-dimer, indicated in the box. Note that *Urechis* Hb has no cooperativity.

ところで、マシコヒゲムシ、ツリミミズ巨大Hbの2量体構造、およびナマコHbは、アカガイHbIと基本的に同様のEFダイマー構造を持つのだが、鍵となる2量体接触面の残基は特に保存されておらず、前述のE10, F3, F4の残基もおおの異なる。後述するように、同様のEFダイマー構造を持つにもかかわらず、その協同性の詳細な機構はそれぞれ異なっている。

有鬚動物巨大Hbの特殊な機能

われわれが研究に用いているヒゲムシ (beard worm) と呼ばれる有鬚動物は、海底に生息している動物であるが、口や消化管を退化させており^{18,19)}、栄養源の多くは体内の特殊な組織 (trophosome) に共生する化学合成細菌に依存している²⁰⁻²³⁾。この共生細菌は、おもに硫化水素を利用する硫黄酸化細菌の一種と考えられており、実際、有鬚動物の生息する海底は硫化水素が豊富な環境となっている^{24,25)}。われわれが対象にしている

マシコヒゲムシ (*Oligobranchia mashikoi*) は、石川県能登半島の九十九湾海底およそ25 m付近に生息しており (Fig. 7a), 体長10数cm, 体の直径は1 mmにも満たない細長い生き物である¹⁸⁾。これが棲管と呼ばれるキチン質の鞘におさまり、さらに棲管ごと体をなかば海底の泥に埋め込むようにして生活しているものと考えられている²⁵⁾。この付近に体積している泥の表面近くで硫化水素 (硫化物) が検出されており²⁵⁾, マシコヒゲムシの共生細菌はこの硫化水素を利用しているものと考えられる。マシコヒゲムシを含む比較的小型のヒゲムシ類のほかにも、ハオリムシ (tube worm) 類と呼ばれるやや大型の有鬚動物も存在する。体長が数mにも及ぶことがあるハオリムシ²⁶⁾ は、深海底の熱水噴出口近くなどの硫化水素が高濃度で存在する環境に生息しており、やはり消化管をもたずに共生細菌に栄養源を依存している²⁷⁻²⁹⁾。このハオリムシ類もまた、血液中に巨大Hbをもっており、分子量約40万、および分子量約360万の巨大Hbの両方が存在している³⁰⁾。これらはそれぞれ、マシコヒゲムシの巨大Hb、ツリミミズの巨大Hbと相同なものである (Fig. 7c)。

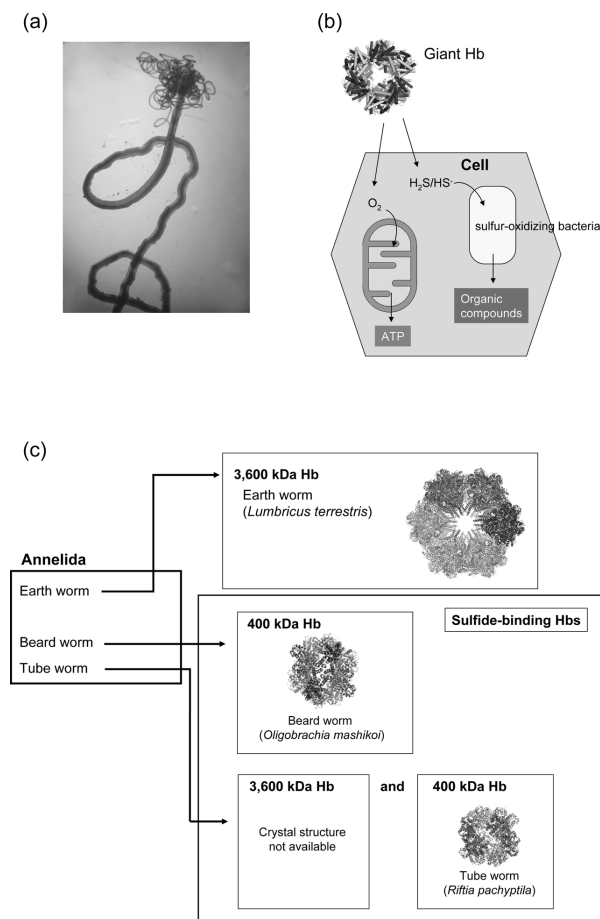


Fig. 7. Sulfide-binding Hbs of beard worms and tube worms. (a) Collected beard worm, *Oligobranchia mashikoi*. (b) Giant Hbs of beard worms and tube worms have the ability to bind and transport sulfide as well as oxygen. The giant Hb provides the endosymbionts with sulfide. (c) Tube worms have both 3,600 kDa and 400 kDa Hbs. These Hbs have essentially the same structural features as that of *Lumbricus* Hb and *Oligobranchia* Hb, respectively.

有鬚動物の共生細菌は、trophosomeと呼ばれる特定の組織内に存在しているため、外部環境から取り込んだ硫化水素を共生細菌まで供給するシステムが必要であるが、これを担っているのは巨大Hbであると考えられている³¹⁻³³⁾。すなわち、有鬚動物の巨大Hbは、通常のHbと同様に酸素を結合・運搬するほか、共生細菌が利用する硫化水素も同時に結合・運搬している (Fig. 7b)。酸素の結合と、硫化水素の結合は独立していることから、硫化水素は酸素と競合してヘムに配位するのではないと考えられ³¹⁻³³⁾、ヘムとは別の硫化水素結合部位があるものと考えられている。このように有鬚動物の巨大Hbは他のHbには見られない非常に特徴的な機能を有しており、この硫化水素結合の分子機構の解明も、われわれの大きな目的である。

硫化水素結合の機構を直接証明する、硫化水素結合型の立体構造はまだ明らかになっていないが、他の実験結果から、巨大Hb内に存在するdisulfide結合を形成していないCys残基が関わっているとの予想がされていた^{34, 35)}。そして、これらのシステイン残基は硫化水素結合の機能をしめす巨大Hbにのみ共通に保存されており、一方ほとんど同様の構造を持つにもかかわらず、硫化水素結合の機能を示さないツリミミズの巨大Hbでは他のアミノ酸に置き換えられている。われわれが解析したマシコヒゲムシの巨大HbにおいてもこれらのCys残基は保存されており (Fig. 8a), さらに結晶構造中でその周囲はPheや, Leu, Ileなどの疎水性のアミノ酸残基に取り囲まれていた (Fig. 8b)。硫化水素はこれらのCys残基がpersulfideを形成するかたちで結合・運搬するものと考えられている。非常に反応性の高いpersulfideを溶媒領域に不必要にさらすことなく、共生細菌に硫化水素を引き渡すまで、周囲の疎水性のアミノ酸残基により、安定的に保持していると考えられる。

われわれの構造解析とほぼ同時期に、ガラパゴスハオリムシ (*Riftia pachyptila*) のもつ巨大Hbの結晶構造も報告された³⁶⁾。この巨大Hbは血液中に存在しているHbではなく、体腔内に存

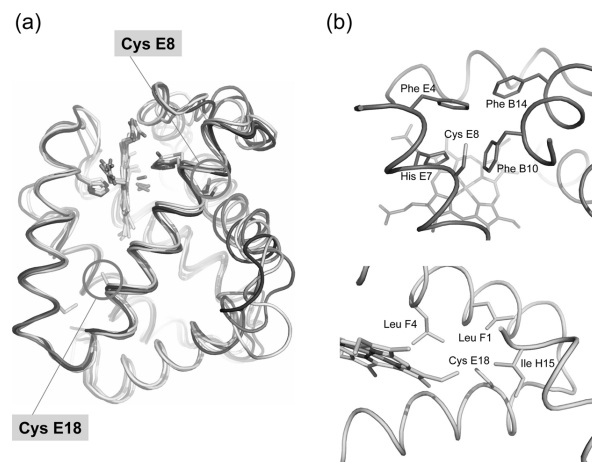


Fig. 8. Putative sulfide-binding sites of *Oligobranchia* Hb. (a) Four subunits of *Oligobranchia* Hb are superimposed. The conserved Cys residues at E8 and E18 positions occur in sulfide-binding Hbs. (b) The environments of putative sulfide-binding Cys residues are highly hydrophobic.

在しているHbであるが、その構造はわれわれが解析したマシコヒゲムシの巨大Hbと全く同様の24量体であった。このガラパゴスハオリムシの体腔Hbには強固に結合している亜鉛イオンが見つかり、さらにはこの亜鉛イオンをキレート剤で除去すると硫化水素結合活性が低下することが観測されたことから^{36,37}、Cys残基が全く関わらない、別個の硫化水素結合機構の存在も提唱されている。ただしこの亜鉛イオンの保持に関わっている残基（多くはHis）は一部の巨大Hbでしか保存されておらず、他の巨大Hbも同様の機構を有するかは不明である。

一部リガンド非結合型の構造

これまでに解析された巨大Hbの構造は、すべてoxy型あるいはCO結合型であり、リガンドの結合していない構造は明らかになっておらず、協同性の機構も不明なままであった。われわれは最近、マシコヒゲムシ巨大Hbについて、4種類のグロビン鎖のうち3種類がリガンドを結合していない状態（全体の24量体のうち、18のグロビン鎖がリガンド非結合型）での構造解析に成功した³⁸。構造解析の結果得られた電子密度図で、A1鎖以外のヘムポケットにはまったく電子密度が観測されず（Fig. 9）、リガンドが何も配位していないことが明らかである。A1鎖にのみ、はっきりとリガンド由来の電子密度が観測され、これは酸素分子として解釈が可能であった。

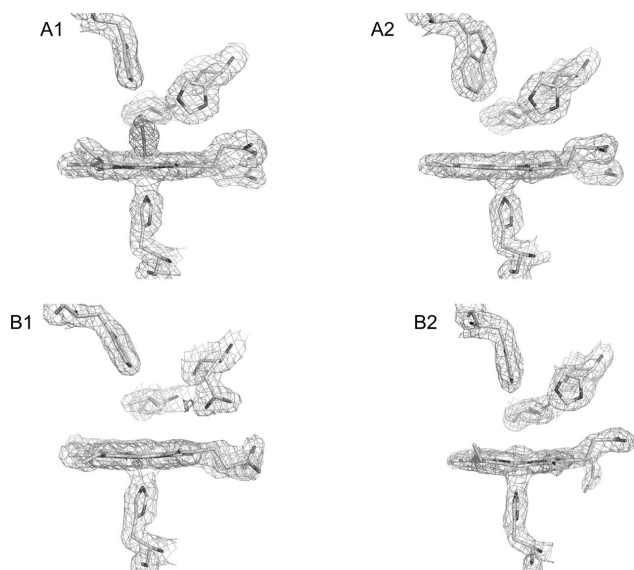


Fig. 9. Electron density maps around the hemes of each subunit. $2F_o - F_c$ and $F_o - F_c$ maps calculated from the oxygen omitted model are drawn in cyan and magenta, respectively.

このときに用いた結晶は茶色がかった典型的なメト型の色を呈しており、この結晶を再度溶解させて可視光スペクトルを計測すると、630 nm付近の吸収が観測された。これらのことからこの結晶構造は、A1鎖のみ酸素が結合したまま他のグロビン鎖ではヘム鉄が酸化されてメト型となった状態（met(A1-oxy)型）であると結論した。通常多くのHbでは、メト型のヘ

ムには水分子が配位しているが、われわれが解析したマシコヒゲムシ巨大Hbでは、水分子に相当する電子密度がまったく観測されなかった。これはリガンド分子が配位するヘムポケットの上方に位置するバリン残基（E11）が大きく関わっていると思われる。先に解析したoxy型の構造と比較してみると、met(A1-oxy)型ではVal E11の側鎖がヘムポケットへ向かって大きく張りだしており、これによる立体障害によって水分子の配位が妨げられているものと考えられる。さらに遠位His（E7）が逆に遠ざかることにより、リガンド分子との水素結合が形成できにくくなっていることも原因のひとつと思われる（Fig. 10a）。

met(A1-oxy)型ではこのほかにも、oxy型と較べて構造の変化が認められた。EFダイマー構造を両者で比較してみると、互いのグロビン鎖のAヘリックスとBヘリックスをつなぐループ領域（ABループ）で構造の変化が見られ、結果としてmet(A1-oxy)型のほうが若干コンパクトな2量体構造をとっていることがわかった。2量体構造がそれぞれ構造変化を起こすことにより、それらが組み合わさって形成される12量体構造においても、met(A1-oxy)型のほうがわずかにコンパクトな構造となっていることも明らかになった。リガンド非結合型のほうがよりコンパクトな構造をとるのは、脊椎動物のHbも含めてこれまでに構造が知られているHbに共通する特徴である³⁹。

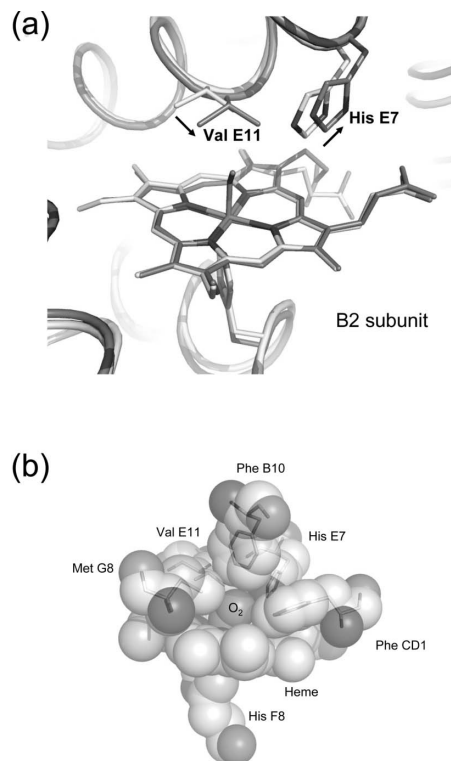


Fig. 10. The ligand binding site of *Oligobranchia* Hb. (a) Structural changes around the distal site in *Oligobranchia* Hb. The B2 subunits of oxy and met(A1-oxy) form are represented in yellow and blue, respectively. (b) The space-filling model reveals the narrow space of distal site of the A1 subunit of *Oligobranchia* Hb.

巨大Hbの酸素親和性、自動酸化

met(A1-oxy)型において、A1鎖のみ酸素が結合したままであったことは、A1鎖におけるヘムポケット周辺の残基が結合した酸素分子を安定的に保つために最適な環境となっているためと考えられる (Fig. 10b). 特に、ヘムポケット上方に位置するPhe残基 (B10) の芳香環によって、ヘムに配位した酸素分子が安定化されており³⁸⁾、A1鎖においては芳香環平面と、酸素分子との角度や距離がほぼ理想的な値³⁹⁾となっている。他のグロビン鎖においてもB10の残基は芳香性のPheまたはTrpとなっているが、芳香環平面と酸素分子との立体的な位置関係がA1鎖ほど理想的な値ではなく、A1鎖において最も酸素分子が安定的に保持されていることから、メト型化を逃れたものと考えられる。

B10のPhe残基の効果はMbでの変異解析からも確認されており、酸素親和性の上昇と、自動酸化の抑制が報告されている⁴⁰⁾。マシコヒゲムシ巨大Hbをはじめ、ミミズやハオリムシの巨大HbにおいてもB10はPheまたはTrpがよく保存されており、ヘムポケット周辺はヒトHbと比べて空間的な余裕が非常に少ない^{7,38)}。これら巨大Hbでは酸素親和性が高く、自動酸化は起こりにくいことが、これにはヘム周辺におけるこのような環境が大きく寄与しているものと考えられる。またこれらの巨大Hbは血液中に直接溶解して存在している細胞外Hbであり、自動酸化が起こりにくいことは、機能を安定的に維持するため極めて重要であると思われる。

通常では自動酸化がほとんどみられないにもかかわらず、マシコヒゲムシ巨大Hbでmet(A1-oxy)型の結晶が得られたことについては、結晶化する際に用いたポリエチレングリコール (PEG) 試薬にわずかに含まれる不純物などによって、徐々に酸化を受けたものと考えられる。

巨大Hbの協同性機構

脊椎動物の四量体Hbでは、酸素結合の協同性を促進する分子として、BPG, IHP, ATP, あるいは塩化物イオンなどがひろく知られている。一方、環形動物の巨大Hbでは Ca^{2+} や Mg^{2+} などの二価金属イオンの存在下で協同性が顕著に上昇することが報告されており^{41,42)}、これら金属イオンによる巨大Hbの協同性への影響に関して、立体構造からその機構を明らかにするため、 Ca^{2+} および Mg^{2+} が結合した状態でマシコヒゲムシ巨大Hbの構造解析を行った⁴³⁾。その結果、いずれの構造もoxy型で、 Ca^{2+} や Mg^{2+} は各グロビン鎖の間を結びつけるように結合していることが明らかになった (Fig. 11)。特筆すべきは、これらの金属イオンは分子間disulfide結合の存在しないグロビン鎖間に配置されていることであり、これによって巨大Hbの24量体構造をより安定に保っているものと考えられる。これらの金属結合型oxy構造は、先に Ca^{2+} や Mg^{2+} が存在しない状態で構造解析が行われたoxy型構造と比較して、その全体的な構造はほとんど変化しておらず、このことから Ca^{2+} や Mg^{2+} の存在は、oxy型 (R型) 構造をより安定的に保つことに寄与しているものと思われる。マシコヒゲムシ巨大Hbの酸素親和性実験の結果⁴¹⁾か

ら、 Ca^{2+} や Mg^{2+} の存在下ではR型の酸素親和性が増加することが示されており、巨大Hbの協同性上昇はこれら金属イオンによるR型構造の安定化によって実現されていることが明らかになった。

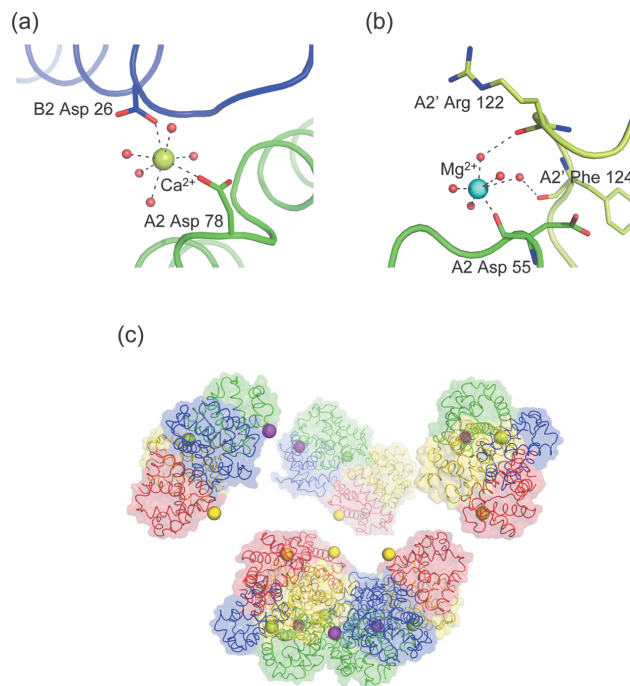


Fig. 11. Metal binding sites of *Oligobranchia* Hb.

(a) The Ca^{2+} binding site. Only one out of four sites is shown. (b) The Mg^{2+} binding site. This site is shared between Ca^{2+} and Mg^{2+} bound forms. (c) The positions of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions located at interfaces of subunits are presented with a split model of whole molecule.

また、oxy型構造と一部リガンド非結合型構造との詳細な比較により、環形動物巨大Hbにおいても、特にヘムを含めたEFダイマー間の接触部位での構造変化が協同性の機構に重要な役割を果たしていることが明らかになった。脊椎動物Hbと同様に巨大Hbにおいても、ヘム平面はリガンド非結合時に折れ曲がっており、酸素結合時にはよりきれいな平面状になっている。このヘムの構造変化が、EFダイマーの隣のF3' (His/Arg), F7' (Gln) 残基を介して隣のF'ヘリックスに伝えられ (ここでは、「'」は隣のサブユニットであることを示す)、このヘリックスに配位しているヘムのdistal pocketの環境に影響を与えている (Fig. 12)。すなわちF'ヘリックスの動きにより、先述したヘムとVal E11'およびHis E7'との位置関係の変化を引き起こし、リガンド分子の結合に影響を与える機構が解明された。マシコヒゲムシ以外の環形動物の巨大Hbにおいては、これらの残基は大変よく保存されており、このEFダイマー間での協同性の機構は環形動物の巨大Hb間で共通しているものと考えられる。

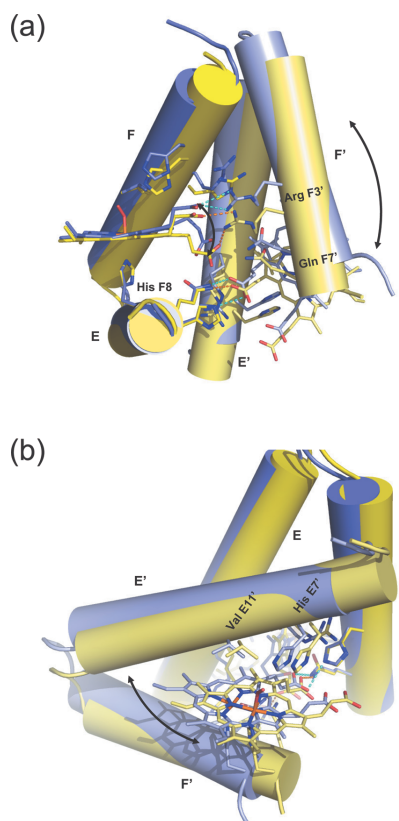


Fig. 12. Close up views of the interface of the EF-dimer of *Oligobranchia* Hb.

The A2B2 dimer of the oxygenated Ca^{2+} -bound form and that of met(A1-oxy) form are superimposed. (a) Conformational movement of the propionate group of the heme causes a sliding of neighboring F' helix, due to movement of the propionate group together with neighboring residues, Arg F3' and Gln F7'. (b) The sliding of the F' helix includes sliding of the coordinated heme and result in the tertiary rearrangement of the relative positions between the heme and Val E11' to control open or closed form for the ligand binding.

先にも述べたように、同じEFダイマー構造をもつアカガイ HbIにおける協同性機構とは全く異なり、ダイマー構造の変化を伴いながら異なった残基によって構造変化を伝えているところが興味深い。巨大HbではこのEFダイマー同士がさらに disulfide結合で結ばれている。4量体や12量体での協同性機構を解明することが今後の課題である。

おわりに

マシコヒゲムシの巨大Hbは酸素親和性が最大で0.19 mmHgと高いため⁴¹⁾、中性付近の緩衝液中で精製、保存する限り安定してoxy型を保ち、また特別な処理をすることがなくとも自動酸化は数ヶ月にわたってほとんど観測されない。また、その24量体構造も安定的に保持しており、極端な条件でない限りサブユニットの解離なども起こりにくい。脊椎動物のHbと共通のグロビン鎖構造から構成されているにもかかわらず、アミノ酸残基の違いやグロビン鎖同士の会合状態を変えることなどによ

って、脊椎動物Hbとは大きく異なった性質を実現し、さらには硫化水素結合のような機能まで付加していることは驚きである。巨大Hbに限らず、まだ不明なものの多い無脊椎動物のHbからは今後も様々な発見が期待される。それらの知見により既存のHbの機能と構造を人工的に改変できるようなことがあれば、大変興味深い研究に発展していくのではないかと期待している。

引用文献

1. Perutz MF. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature* 1970;228:726-39.
2. Weber RE, Vinogradov S. Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. *Physiol Rev* 2001;81:569-628.
3. Royer WE Jr., Knapp JE, Strand K, Heaslet HA. Cooperative hemoglobins: conserved fold, diverse quaternary assemblies and allosteric mechanisms. *Trends Biochem Sci* 2001;26:297-304.
4. Royer WE Jr., Zhu H, Gorr TA, Flores JF, Knapp JE. Allosteric hemoglobin assembly: diversity and similarity. *J Biol Chem* 2005;280:27477-80.
5. Royer WE Jr. High-resolution crystallographic analysis of a co-operative dimeric hemoglobin. *J Mol Biol* 1994;235:657-81.
6. Numoto N, Nakagawa T, Kita A, Sasayama Y, Fukumori Y, Miki K. Structure of an extracellular giant hemoglobin of the gutless beard worm *Oligobranchia mashikoi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:14521-6.
7. Strand K, Knapp JE, Bhyravbhatla B, Royer WE Jr. Crystal structure of the hemoglobin dodecamer from *Lumbricus erythrocrurin*: allosteric core of giant annelid respiratory complexes. *J Mol Biol* 2004;344:119-34.
8. Royer WE Jr., Strand K, Heel M, Hendrickson WA. Structural hierarchy in erythrocrurin, the giant respiratory assemblage of annelids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7107-11.
9. Royer WE Jr., Sharma H, Strand K, Knapp JE, Bhyravbhatla B. *Lumbricus erythrocrurin* at 3.5 Å resolution: architecture of a megadalton respiratory complex. *Structure* 2006;14:1167-77.
10. Royer WE Jr., Heard KS, Harrington DJ, Chiancone E. The 2.0 Å crystal structure of *Scapharca* tetrameric hemoglobin: cooperative dimers within an allosteric tetramer. *J Mol Biol* 1995;253:168-86.
11. Mitchell DT, Kitto GB, Hackert ML. Structural analysis of monomeric hemichrome and dimeric cyanomet hemoglobins from *Caudina arenicola*. *J Mol Biol* 1995;251: 421-31.
12. Knapp JE, Bonham MA, Gibson QH, Nichols JC, Royer

- WE Jr. Residue F4 plays a key role in modulating oxygen affinity and cooperativity in *Scapharca* dimeric hemoglobin. *Biochemistry* 2005;44:14419-30.
13. Knapp JE, Gibson QH, Cushing L, Royer WE Jr. Restricting the ligand-linked heme movement in *Scapharca* dimeric hemoglobin reveals tight coupling between distal and proximal contributions to cooperativity. *Biochemistry* 2001;40:14795-805.
 14. Knapp JE, Pahl R, Srajer V, Royer WE Jr. Allosteric action in real time: time-resolved crystallographic studies of a cooperative dimeric hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:7649-54.
 15. Pardanani A, Gibson QH, Colotti G, Royer WE Jr. Mutation of residue Phe97 to Leu disrupts the central allosteric pathway in *Scapharca* dimeric hemoglobin. *J Biol Chem* 1997;272:13171-9.
 16. Royer WE Jr., Pardanani A, Gibson QH, Peterson ES, Friedman JM. Ordered water molecules as key allosteric mediators in a cooperative dimeric hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14526-31.
 17. Kolatkar PR, Hackert ML, Riggs AF. Structural analysis of *Urechis caupo* hemoglobin. *J Mol Biol* 1994;237:87-97.
 18. Sasayama Y, Matada M, Fukumori Y, Umebayashi M, Matsuno A, Nakagawa T, Imajima M. External morphology of the posterior end, the "opisthosoma", of the beard worm *Oligobranchia mashikoi* (Pogonophora). *Zoolog Sci* 2003;20:1411-6.
 19. Southward EC. Recent researches on the Pogonophora. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev* 1971;9:193-220.
 20. Aida M, Kanemori M, Kubota N, Matada M, Sasayama Y, Fukumori Y. Distribution and population of free-living cells related to endosymbiont harbored in *Oligobranchia mashikoi* (a Siboglinid Polychaete) inhabiting Tsukumo Bay. *Microbes Environments* 2008;23:81-8.
 21. Deguchi M, Kubota N, Matsuno A, Kanemori M, Fukumori Y, Sasayama Y. Actual distribution of bacteriocytes in the trophosome of a beard worm (*Oligobranchia mashikoi*, Siboglinidae, Annelida): clarification using whole-mount in situ hybridization. *Acta Zoologica* 2007;88:129-35.
 22. Southward AJ, Southward EC, Dando PR, Rau GH, Felbeck H, Flugel H. Bacterial symbionts and low $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in tissues of Pogonophora indicate unusual nutrition and metabolism. *Nature* 1981;293:616-20.
 23. Southward EC. Bacterial symbionts in Pogonophora. *J Mar Biol Ass UK* 1982;62:889-906.
 24. Kubota N, Kanemori M, Sasayama Y, Aida M, Fukumori Y. Identification of endosymbionts in *Oligobranchia mashikoi* (Siboglinidae, Annelida). *Microbes and Environments* 2007;22:136-44.
 25. Sasayama Y, Higashide Y, Sakai M, Matada M, Fukumori Y. Relationship Between the Lifestyle of a Siboglinid (Pogonophoran) Polychaete, *Oligobranchia mashikoi*, and the Total Sulfide and Nitrogen Levels in its Habitat. *Zoolog Sci* 2007;24:131-6.
 26. Jones ML. *Riftia pachyptila* Jones: Observations on the vestimentiferan worm from the Galapagos Rift. *Science* 1981;213:333-6.
 27. Cavanaugh CM, Gardiner SL, Jones ML, Jannasch HM, Waterbury J. B. Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* Jones: Possible chemoautotrophic symbionts. *Science* 1981; 213:340-2.
 28. Felbeck H. Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera). *Science* 1981;213:336-8.
 29. Felbeck H, Childress JJ, Somero GN. Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats. *Nature* 1981;293:291-3.
 30. Zal F, Lallier FH, Green BN, Vinogradov SN, Toulmond A. The multi-hemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. II. Complete polypeptide chain composition investigated by maximum entropy analysis of mass spectra. *J Biol Chem* 1996;271:8875-81.
 31. Arp AJ, Childress JJ, Vetter RD. The sulphide-binding protein in the blood of the vestimentiferan tube-worm, *Riftia pachyptila*, is the extracellular haemoglobin. *J Exp Biol* 1987;128:139-58.
 32. Nakagawa T, Onoda S, Kanemori M, Sasayama Y, Fukumori Y. Purification, characterization and sequence analyses of the extracellular giant hemoglobin from *Oligobranchia mashikoi*. *Zoolog Sci* 2005;22:283-91.
 33. Yuasa HJ, Green BN, Takagi T, Suzuki N, Vinogradov SN, Suzuki T. Electrospray ionization mass spectrometric composition of the 400 kDa hemoglobin from the pogonophoran *Oligobranchia mashikoi* and the primary structures of three major globin chains. *Biochim Biophys Acta* 1996;1296:235-44.
 34. Suzuki T, Takagi T, Ohta S. Primary structure of a constituent polypeptide chain (AIII) of the giant haemoglobin from the deep-sea tube worm *Lamellibrachia*. A possible H_2S -binding site. *Biochem J* 1990;266:221-5.
 35. Zal F, Leize E, Lallier FH, Toulmond A, Van Dorsselaer A, Childress J. J. S-Sulfohemoglobin and disulfide exchange: the mechanisms of sulfide binding by *Riftia pachyptila* hemoglobins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8997-9002.
 36. Flores JF, Fisher CR, Carney SL, Green BN, Freytag JK, Schaeffer SW, Royer WE Jr. Sulfide binding is mediated by zinc ions discovered in the crystal structure of a

- hydrothermal vent tubeworm hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:2713-8.
37. Flores JF, Hourdez SM. The zinc-mediated sulfide-binding mechanism of hydrothermal vent tubeworm 400-kDa hemoglobin. *Cahiers De Biologie Marine* 2006;47:371-7.
 38. Numoto N, Nakagawa T, Kita A, Sasayama Y, Fukumori Y, Miki K. Structure of the partially unliganded met state of 400 kDa hemoglobin: Insights into ligand-induced structural changes of giant hemoglobins. *Proteins* 2008;73:113-25.
 39. Thomas KA, Smith GM, Thomas TB, Feldmann RJ. Electronic distributions within protein phenylalanine aromatic rings are reflected by the three-dimensional oxygen atom environments. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1982;79:4843-7.
 40. Carver TE, Brantley RE Jr., Singleton EW, Arduini RM, Quillin ML, Phillips GN Jr., Olson JS. A novel site-directed mutant of myoglobin with an unusually high O₂ affinity and low autooxidation rate. *J Biol Chem* 1992;267:14443-50.
 41. Aki Y, Nakagawa T, Nagai M, Sasayama Y, Fukumori Y, Imai K. Oxygenation properties of extracellular giant hemoglobin from *Oligobranchia mashikoi*. *Biochem. Biophys. Res Commun* 2007;360:673-8.
 42. Fushitani K, Imai K, Riggs AF. Oxygenation properties of hemoglobin from the earthworm, *Lumbricus terrestris*. Effects of pH, salts, and temperature. *J Biol Chem* 1986;261:8414-23.
 43. Numoto N, Nakagawa T, Kita A, Sasayama Y, Fukumori Y, Miki K. Structural basis for the heterotropic and homotropic interactions of invertebrate giant hemoglobin. *Biochemistry* 2008;47:11231-8.

多波長パルス分光法を用いた Hb小胞体用パルスオキシメータに関する研究

Study on Multiwavelength Pulse Spectrophotometry Applicable for Hemoglobin-vesicles

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⁾

Hironori Suzaki^(1,2), Hiromi Sakai⁽¹⁾, Naoki Kobayashi⁽²⁾, Tatsuhiko Ikeda⁽³⁾, Hirohisa Horinouchi⁽³⁾,

Koichi Kobayashi⁽³⁾, Shinji Takeda^(1,2), Tatsuo Togawa⁽¹⁾, Eishun Tsuchida⁽¹⁾

和文抄録

ヘモグロビン小胞体 (HbV) は、高純度高濃度ヘモグロビン溶液をリン脂質二分子膜で被覆した形状の人工酸素運搬体である。これまでに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想定した場合に、患者の呼吸管理、各種検査、HbV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、HbV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、HbV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、HbV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O₂Hb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可能性がある。そこで本研究では、現行のPOMを使用した場合のHbVの干渉作用の程度を確認するとともに、HbV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、HbV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、HbV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。ビーグル犬7匹を用いたHbVの投与試験 (循環血液量の40%置換) に際し、FiO₂を1.0, 0.2, 0.15 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、HbV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。

Abstract

A pulse oxymeter (POM) is indispensable in a clinical setting to monitor arterial blood O₂-saturation (SpO₂) of a patient non-invasively. POM is designed to analyze spectrum of Hb on the arterial pulse with two wavelengths under the assumption that there are only two components of Hb, namely, deoxy- and oxy-Hb. Hb-vesicles (HbV, 250 nm) are artificial O₂ carriers, and the safety and efficacy as a transfusion alternative have been clarified. HbV encapsulates human Hb, however, the particle dispersion induces a strong light scattering in comparison with RBC, and gradual MetHb formation is inevitable because of the

(1) 早稲田大学理工学術院 〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1 Research Institute for Science and Engineering, Waseda University 3-4-1 Okubo Shinjuku-ku Tokyo 169-8555

(2) 日本光電工業(株)荻野記念研究所 Ogino Memorial Laboratory, Nihon Kohden Co.

(3) 慶應義塾大学 医学部呼吸器外科 Department of General Thoracic Surgery, School of Medicine, Keio University

論文受付 2008年10月7日 論文受理 2008年10月20日

lack of the MetHb-reducing system in HbV. It is speculated that such peculiar characteristics of HbV would interfere with SpO₂-monitoring. Under such background, we aimed to clarify the interference effect of HbV on the commercially available POM, and to establish a method to avoid such effect using a multiwavelength system. Using the *in vitro* blood circulation system comprised of a pulsatory pump, an artificial lung, and the POM (Nihon Kodan, DDG-3300; detection wavelengths: 660, 940 nm), we clarified that the stepwise addition of 60 vol% HbV to a pig blood tended to decrease the SpO₂ to 70%, and interference effect of HbV was evident. We introduced two detection wavelengths (620, 730 nm) in addition to 660 and 940 nm to a probe (TL-301), and tested its effectiveness in the 40%-blood exchange experiments using 7 beagles. FiO₂ was set 1.0, 0.2, and 0.15, and the accurate SaO₂ and MetHb content were monitored for 4 hrs. Equations to calculate SpO₂ and MetHb content was established by a multiple regression analysis. Using the modified POM with 4 wavelengths, the deviation of SpO₂ is minimized from -7.2±3.3% to 1.1±1.9%, and MetHb level can be measured with in the deviation 0.7±1.3%. Optimization of wavelengths and more experiments will improve the accuracy of POM for HbV.

Keywords

pulse oxymeter, blood substitutes, interference effect, light scattering

はじめに

人工酸素運搬体であるHb小胞体（HbV）について、動物投与試験から優れた酸素運搬機能と安全性が実証されてきた¹⁾。臨床現場で使用することを想定した場合に、人工酸素運搬体投与前後の生体モニターの継続とモニタリング精度の保障、投与された人工酸素運搬体の機能のモニタリングを確保することが、Medical Engineering（ME）に関連する課題の一つとして重要である。人工酸素運搬体の光学的特性が血液とは異なるため、検査項目によっては従来法では測定が困難となる場合がある。事実、血液生化学検査においても、修飾Hb溶液、HbV、パールフオロカーボン乳剤の投与後、採血液から血球を分離した血清・血漿中にこれら人工酸素運搬体が残存するため、比色法や比濁法による測定において干渉作用を示す²⁾。しかし、HbVの場合は、比重が大きいので、超遠心分離、或は高分子量デキストランを添加して遠心分離することで透明な血清・血漿が得られ、干渉作用を回避できることが確認されている^{3,4)}。また、自動輸血検査器による血液型検査でも、HbVによる干渉作用の存在が確認され⁵⁾、注意を要する。

青柳ら（日本光電工業）が1974年に世界に先駆けて開発したパルスオキシメータ（POM）は、経皮的・非侵襲的に動脈血液のみの酸素飽和度（deoxy-oxy二成分系）と心拍数を計測でき、救急医療、集中医療の現場で呼吸管理に利用され、その有用性も十分に認知されており^{6,7)}、現在では各社製品が世界中で使用されている。人工酸素運搬体の臨床試験が行われている米国では既に、修飾Hb溶液を投与した場合のPOMに対する影響が検討され、POMが正確な酸素飽和度を示さない場合があることが報告されており、その対処法が求められている^{8,9)}。従ってHbVを投与した場合も、その影響を明らかにする事と、影響がある場合の対処策を考える必要がある。HbVはメトヘモグロビン（MetHb）還元酵素系を有しないため、次第にHbが酸化し、比較的早い時間にMetHbが増大するが¹⁰⁾、POMは二成分系の測定を前提としているので、血中にMetHbが存在すると実際の酸素飽和度よりも高く表示されることになる¹¹⁾。また、

HbVは粒子径250 nmであり、赤血球に比較して極めて小さい。その微粒子分散系は血管内、毛細血管内において血漿層中に均一に分散することが微小循環動態の観察から明らかになっているので¹²⁾、光散乱により生体組織の吸光度測定においても干渉作用を呈する可能性がある。そこで本研究では、現行のPOMを使用した場合のHbVの干渉作用の程度を確認するとともに、HbV投与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の開発を目的とした。

方 法

1. 計測装置に用いる検出波長の決定法

POMの原理であるパルス分光法は、分光分析の基本理論であるLambert-Beerの法則を生体に応用したものである。生体組織を透過しやすい近赤外光を用い、入射光に対する透過光の低下分を、吸光度として測定する。組織には静脈血の吸収、組織による吸収、光散乱もある。しかし、動脈血は常に拍動しているため、心臓の拡張期と収縮期では動脈血の量が変化するので、心臓の拡張期と収縮期では動脈血の吸収を見ていることになる。これが動脈血酸素分圧のみを見る原理となる。

まず、Hb諸成分の可視光-近赤外スペクトル（既知、Fig. 1）をもとに、Lambert-Beerの法則を利用し、式（1）から波長 i, j における減光度比 Φ を計算し、濃度の変化に対して相関の高い減光度比 Φ を理論的に検討した^{11,13)}。

$$\Phi_{i/j} = \frac{\Delta A_i}{\Delta A_j} = \frac{E_{O_2Hb}^i \cdot C_{O_2Hb} + E_{RHb}^i \cdot C_{RHb} + E_{COHb}^i \cdot C_{COHb} + E_{MetHb}^i \cdot C_{MetHb}}{E_{O_2Hb}^j \cdot C_{O_2Hb} + E_{RHb}^j \cdot C_{RHb} + E_{COHb}^j \cdot C_{COHb} + E_{MetHb}^j \cdot C_{MetHb}} \quad (1)$$

ここで、E：吸光係数（dl/g/cm）、C：濃度（g/dl）（添字：O₂Hb＝酸素化ヘモグロビン、RHb＝還元ヘモグロビン、COHb＝一酸化炭素ヘモグロビン、MetHb＝メトヘモグロビン）、 i, j ：測定波長（nm, 610, 620, 660, 730, 805, 940）を意味する。式（1）において、O₂Hbの濃度は60～100%、MetHbは1～40%、COHbは1%、RHbは1～40%とした。総

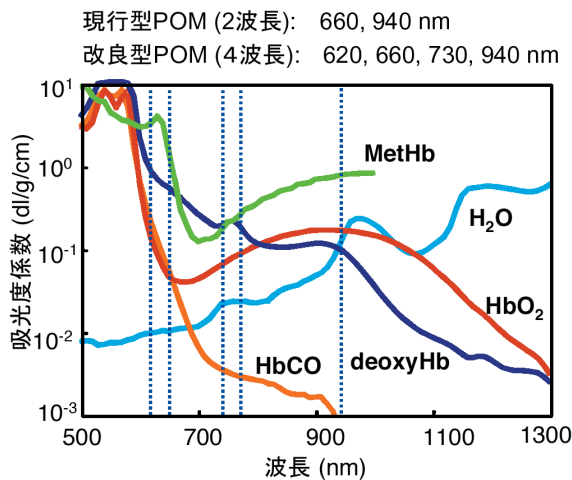


Fig. 1. Hb諸成分の可視-近赤外領域の吸収スペクトルと、既存POMと改良型POMの測定波長の位置。

Table 1. 改良型POMの測定波長を選択するための重回帰分析の結果. 最も標準誤差が小さかった組合せは③であったが、660 nmと940 nmの2波長を含むと従来のPOMとの比較ができるので、②の4波長を選択した。

番号	組合せ4波長 (nm)				標準誤差 (%)	
	$\lambda 1$	$\lambda 2$	$\lambda 3$	$\lambda 4$	MetHb	SpO ₂
①	610	940	620	730	0.225	0.132
②	660	940	620	730	0.337	0.135
③	805	940	620	730	0.109	0.147
④	660	940	620	805	0.659	0.982

ヘモグロビン濃度tHb=16 g/dlとし、各血液成分濃度をg/dlに変換してから式(1)に代入し、重回帰分析を行った(Table 1)。その結果、最も標準誤差が小さかった組合せは620, 730, 805, 940 nmであったが、他の組合せも十分に精度が良く、660 nmと940 nmの2波長が含まれていれば従来のPOMとの比較ができるため、620, 660, 730, 940 nmの4波長を選択した。

2. 改良型4波長光学システム

測定プローブ(TL-301P)に4波長LED(620, 660, 730, 940nm, 株式会社光波)を組み込み、DDGアナライザ(DDG-3300, 日本光電社, 東京)の内部ソフトウェアを改良して人工赤血球用のPOMを開発した。Fig. 2にその概要を示す。また4波長LEDの特性をTable 2に示す。

3. in vitro実験

HbVの光学特性に起因する干渉作用について検討することを目的としたin vitro実験を行った。HbVの粒子径(250 nm)は赤血球(8 μ m)に比べて小さく、更にPOMに使用される光源の波長よりも小さい。従って波長600~1300 nmの光の散乱特性が異なると予想され、HbV投与後にHbVの光学特性がPOMに干渉作用を与えると予想される。しかし、動物にHbVを投与する

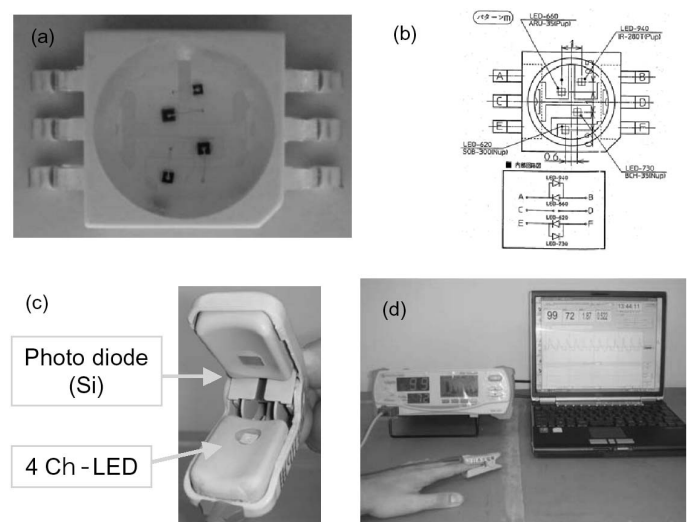


Fig. 2. 開発したPOMプローブの概要. (a) 4波長LED(株式会社光波)の概観、および (b) 基板図面、(c) 開発したプローブ、(d) 人工赤血球用POMの概観

Table 2. 4波長LED特性 (W.L.: Wavelength, Po: Total Output Power, Vf: Forward Voltage, λp : Peak Wavelength, $\Delta \lambda$: スペクトル半値幅)

W.L. (nm)	940	660	620	730
Po(mW)	3.24	5.12	1.86	3.49
Vf (V)	1.2	1.8	1.9	1.6
λp	944.0	657.6	621.6	732.9
$\Delta \lambda$	45.8	24.4	20.2	28.8

場合、干渉作用の原因を生理的な現象なのか、光学特性であるか特定できない。そこで、血液循環シミュレータを用いてHbVを血液に混合する実験を行い、生理的な条件を排除し、血液の光学特性のみに着目した。

使用した血液循環シミュレータ(Fig. 3)は、拍動ポンプ(Centrimag Blood Pumping System, Levitronix, Massachusetts, USA)、脈動フローセル、人工肺(泉工医科工業株式会社)から構築した(循環容量: 約120 ml)。血液循環シミュレータは水に浸し、多用途加熱&保温ヒーター(SCH-901, クマガイ電工株式会社)、熱電対(TR-1101-100, 株式会社アドバンテスト)、Thermal Arraycorder(WR7800, グラフテック株式会社)を用い37°Cに維持した¹¹⁾。血液循環シミュレータに豚血液(tHb=6.1 g/dl)を充填し、拍動流で循環させた。ポンプ出口の圧力は収縮期で100~130 mmHg、拡張期で70~100 mmHgとし、流量は470~500 ml/minとした。

5%アルブミン溶液に分散させたHbVを、リン酸緩衝生理食塩水で希釈し、200 ml (4.9 g/dl)として使用した。後述の動物実験ではビーグル犬の総Hb濃度 約10 g/dlに対し、投与HbV濃度が8.6 g/dlなので、これと混合比を同じにするため、豚血液のHb濃度 6.1 g/dlに対しHbVのHb濃度を4.9 g/dlとした。

循環している豚血液をHbVで段階的に置換し、POMの酸素飽和度表示の変化を調べた。置換量は内容量の0%, 20%, 40%, 60%とした。人工肺では純酸素をガス交換させ、酸素飽和度を理論上ほぼ100%に維持した。

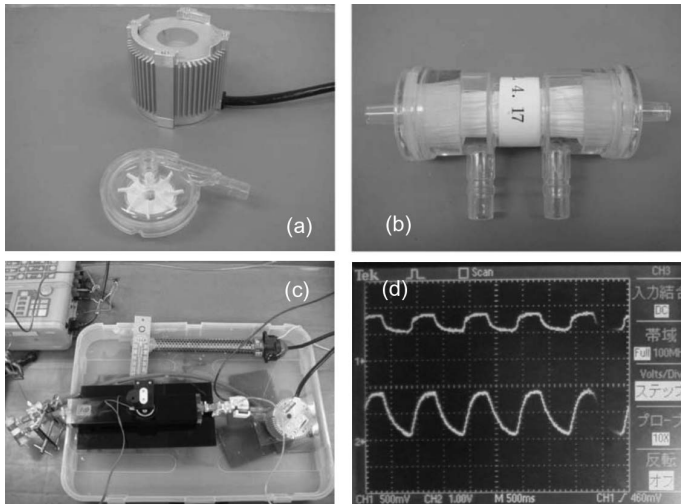


Fig. 3. 血液循環シミュレータの構築. (a) 拍動ポンプ (Centrimag Blood Pumping System, Levitronix, Massachusetts, USA), (b) 動物実験用の小型人工肺 (泉工医科工業㈱), (c) 血液循環シミュレータの外観, (d) 血液循環シミュレータにより得られた圧力および流量波形の一例.

4. 動物実験

慶應義塾大学呼吸器外科にて、ビーグル犬 (雄, 7頭, 体重 $7.2 \pm 0.3 \text{ kg}$) を用いて HbV 投与実験を行った¹⁴⁾. ビーグルは人工呼吸器 (MODEL SN-480-3, ㈱シナノ製作所) を用いてセボフルレン 2~3% 麻酔下で安静状態に維持し, 一回換気量は約 140ml, 換気回数は 20回/分程度とした. ビーグル犬の循環血液量の 40% を脱血し, 1時間経過してから 5% リコンビナントアルブミンに分散させた HbV 溶液 (8.6 g/dL) を同量投与した. 脱血前, HbV 投与直後, 投与 2 時間後, 投与 4 時間後のそれぞれについて, 吸気酸素濃度 FiO_2 を 0.2, 1.0, 0.15 と調整することにより SaO_2 を変化させた. ビーグル犬の舌に 4 波長光学システムのプローブを取り付け, SaO_2 および MetHb の変化に対する各波長の減光度を連続的に測定した.

採血液を基にした酸素飽和度の測定には, 血液ガス測定装置 (CO-Oximeter, ABL555, Radiometer) より測定した動脈血酸素分圧 PaO_2 もとに, 赤血球と HbV の既存の酸素解離曲線 (Fig. 4, ヘモックスアナライザーにより測定) に照らし合わせ, 赤血球と HbV それぞれの酸素飽和度を得た. そして赤血球と HbV の混合比率の実測値から, 動脈血の酸素飽和度を算出した.

混合比率の算出方法は, 先ず, 採血液を小型遠心機 (チビタン-R, 2,000G, 6,200 rpm, コスモ・バイオ㈱) を用いて遠心分離し, 赤血球と HbV を含有する血漿層に分けた. 全血の Hb 濃度と血漿層の HbV 由来の Hb 濃度をシアノメトヘモグロビン法により得た. ヘマトクリット値をもとに, 血液中の赤血球由来 Hb 濃度と HbV 由来の Hb 濃度を求め, 混合率を算出した.

採血液中の HbV 由来 MetHb 濃度は, 紫外可視分光光度計を用い, 脱酸素条件で測定した波長 405, 430 nm における吸光度の比から算出した¹⁰⁾.

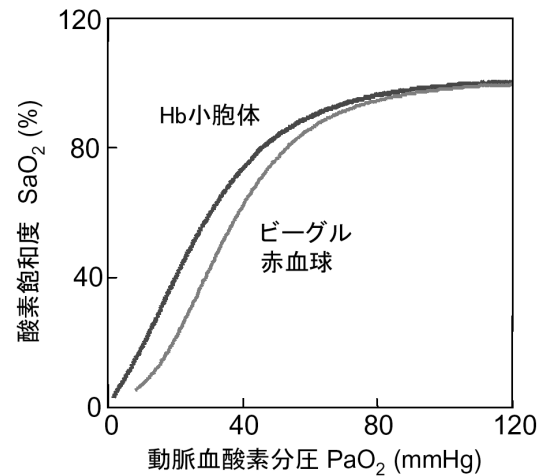


Fig. 4. HbV とビーグル犬の赤血球の酸素結合解離曲線. ヘモックスアナライザーにより測定 (37 °C).

5. 解析法

4 波長光学システムで計測した各波長の減光度比から酸素飽和度, および MetHb 濃度を求める計算式の構築には重回帰分析を用いた. 重回帰式から求めた血液成分濃度を本法の測定値とした. 本法の測定値と採血による測定値を比較し, 本法の精度を検証した.

4 波長光学システムで計測した減光度比から酸素飽和度および MetHb を求める計算式を構築するために, 動物実験に用いたビーグル犬 7 頭のうち, ビーグル犬 4 頭のデータを用いて重回帰分析を行った. 計算式構築に用いたビーグル犬 4 頭のデータ (28 データ) を Training set と呼ぶ. 独立変数は最大で 6 個とし, 偏相関係数が最も小さい独立変数を計算式から除外し, 独立変数の個数を 1 個ずつ減少させた. 独立変数の個数が 1~6 個それぞれの計算式における相関係数, AIC (Akaike's Information Criterion: 統計的モデルを観測値と理論値の差 (残差) を用いて評価する統計量. 値が小さいほど当てはまりが良い), 自由度調整済み寄与率 (大きい方がよい) を求め, 最適な計算式決定の指標とした. 決定した計算式の再現性を確認するために, 残りのビーグル犬 3 頭のデータ (27 データ) に構築した計算式を適用した. 再現性を確認したビーグル犬 3 頭のデータを Validation set と呼ぶ.

結果および考察

1. HbV のパルスオキシメータに対する光学的干渉作用の解明

in vitro 実験における HbV 置換比と現行型 POM 表示の関係を Fig. 5 に示す. 血液を HbV で段階的に置換すると, POM が表示する酸素飽和度は低下する傾向を示した. つまり, HbV の光学的な干渉作用により, 現行型 POM は酸素飽和度を過小評価する. 各測定波長における減光度変化を追加したところ, HbV の混合割合の増加に伴い, 各波長の減光度が増加した. 特に波長 620 nm の減光度の増加が顕著であり, 次いで波長 660 nm の増加が大きかった. 物質に光が照射されると反射・透過・回折が同時に起こる (まとめて光散乱と呼ぶ). 透過光には多重屈折

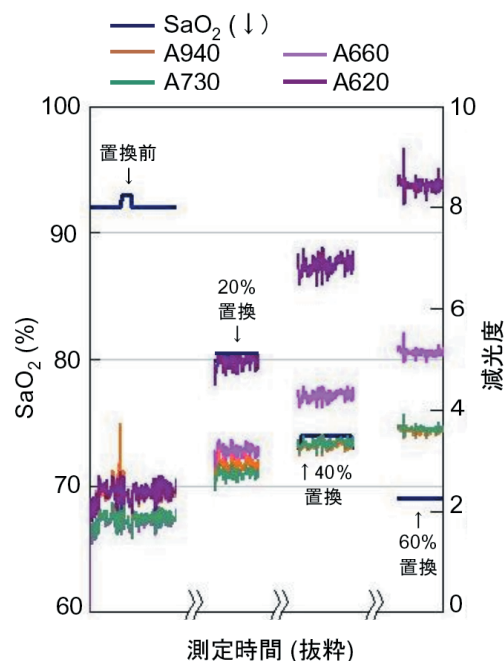


Fig. 5. 血液循環シミュレータ (*in vitro*実験) におけるHbV置換量に対するPOMの酸素飽和度表示, および4波長の減光度変化.

によるものも含まれる。大粒子による散乱光は前方に集中し、小粒子の場合はランダムに散乱する。従って、HbVにより血液中には小さい粒子が増加し、前方散乱光が減少する。その結果、各波長で減光度が増加したと考えられる。つまり、現行型POMが酸素飽和度を過小評価した要因は、HbVの混合による減光度の変化が要因と言える。Fig. 5において、波長660 nmは940 nmに比べてHbV投与による減光度の増加率が大きい。現行型POMは波長660 nmと940 nmの減光度比φから酸素飽和度を求めている。従って、波長660 nmの減光度が940 nmの減光度よりも増加すれば、減光度比φは増加する。既報のPOMにおける酸素飽和度と減光度比φとの関係より¹⁵⁾、減光度比φが増加すれば、酸素飽和度は減少する。

2. パルスオキシメータの精度と4波長光学システムの有効性

HbV投与前後における、現行型POMによる酸素飽和度SpO₂と採血による酸素飽和度SaO₂の関係、および誤差をFig. 6に示す。動物実験でも*in vitro*実験と同様に、HbV投与後に現行型

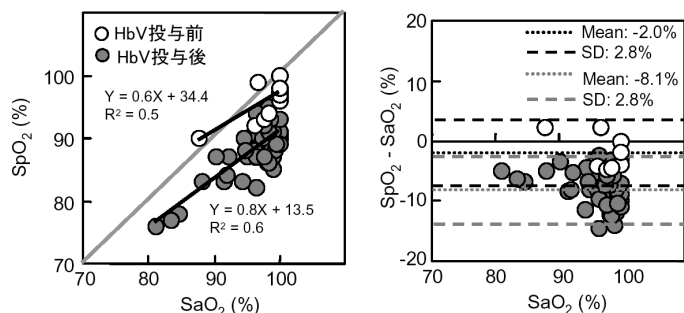


Fig. 6. HbV投与前後における、(a)POMによる酸素飽和度SpO₂と採血による酸素飽和度SaO₂の関係、および (b)誤差

Table 3. 酸素飽和度の各計算式における統計量

	φ 660/940	-0.32	-0.62	-0.72	-0.67	-0.63	-0.60
	φ 660/730	0.25	0.69	0.65	0.59	×	×
各独立変数の 偏相関係数	φ 620/660	0.14	0.32	×	×	×	×
	φ 730/940	0.74	0.75	0.72	0.67	0.44	×
	φ 620/940	-0.16	-0.39	-0.34	×	×	×
	φ 620/730	-0.01	×	×	×	×	×
偏差平方和S _E		113.57	113.60	126.13	142.41	219.94	273.18
サンプル数N		28	28	28	28	28	28
独立変数の数n		6	5	4	3	2	1
相関係数		0.73	0.73	0.704	0.665	0.483	0.358
AIC		134.67	132.67	133.60	135.00	145.17	149.24
自由度調整済みの寄与率		0.657	0.673	0.652	0.624	0.442	0.334

POMは酸素飽和度を過小評価することが分かった。

酸素飽和度の各計算式における統計量をTable 3に示す。酸素飽和度の最適な計算式として、φ 660/940, φ 660/730, φ 620/660, φ 730/940, φ 620/940の5つの独立変数が選択された。5つの独立変数による計算式を式(2)に示す。

$$SpO_2 = -90.0 - 150.1 \times \phi_{660/940} + 144.2 \times \phi_{660/730} + 25.2 \times \phi_{620/660} + 225.6 \times \phi_{730/940} - 42.0 \times \phi_{620/940} \quad (2)$$

Training setにおける採血による酸素飽和度SaO₂と改良型4波長POMによる酸素飽和度SpO₂の関係および誤差をFig. 7 (上)に示す。Training setでは0.0±2.1%の精度で酸素飽和度を計測できた。Validation setにおける採血による酸素飽和度SaO₂と改良型4波長POMによる酸素飽和度SpO₂の関係および誤差をFig. 7 (下)に示す。Validation setでは1.1±1.9%の精度で酸素飽和度を計測できた。

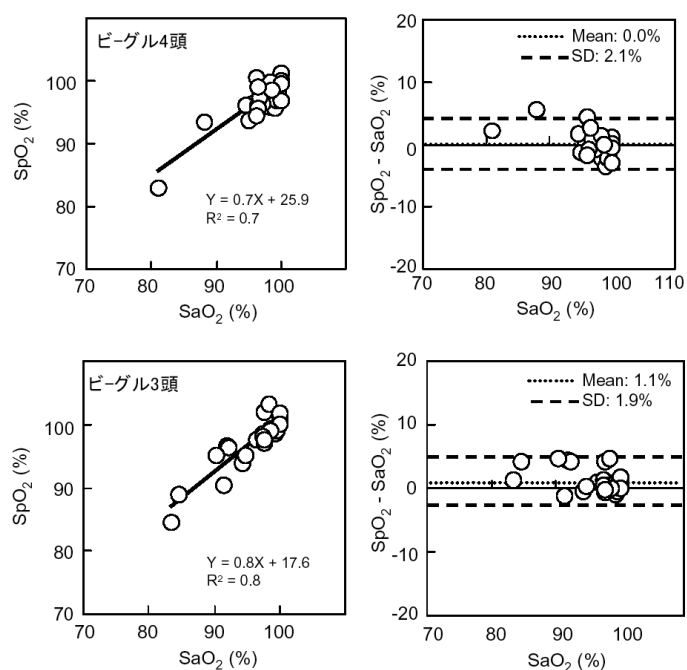


Fig. 7. 採血液から測定・算出した酸素飽和度SaO₂と、改良型4波長POMによる酸素飽和度SpO₂の関係および誤差 (上) Training set, (下) Validation set.

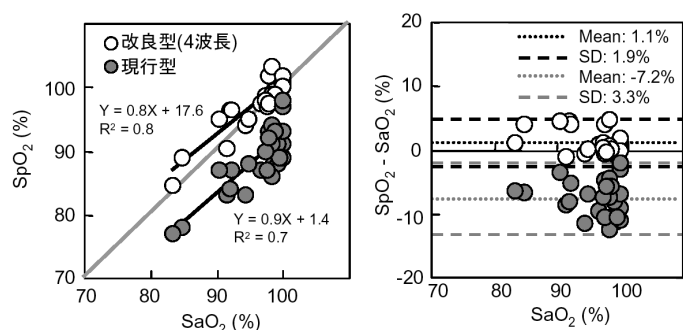


Fig. 8. 現行型POMおよび改良型4波長POMにおける、採血による酸素飽和度SaO₂とパルス分光法による酸素飽和度SpO₂の関係および誤差.

Table 4. MetHbの各計算式における統計量

各独立変数の 偏相関係数	φ660/940	0.11	0.10	0.08	×	×	×
	φ660/730	-0.17	-0.17	-0.19	-0.19	×	×
	φ620/660	-0.21	-0.21	-0.20	-0.19	-0.03	×
	φ730/940	-0.05	×	×	×	×	×
	φ620/940	-0.10	-0.09	×	×	×	×
	φ620/730	0.19	0.18	0.25	0.24	0.56	0.61
偏差平方和S _E		46.70	46.83	47.232	47.51	49.21	49.25
サンプル数N		28	28	28	28	28	28
独立変数の数n		6	5	4	3	2	1
相関係数		0.41	0.41	0.403	0.4	0.378	0.378
AIC		109.78	107.86	106.10	104.27	103.25	101.27
自由度調整済みの寄与率		0.242	0.274	0.300	0.325	0.329	0.354

現行型POMと改良型4波長POMの酸素飽和度計測の精度を同じデータで比較した。それぞれの採血による酸素飽和度SaO₂とパルス分光法による酸素飽和度SpO₂の関係および誤差をFig. 8に示す。POMによる酸素飽和度の計測精度が7.2±3.3%であったのに対し、改良型4波長POMの酸素飽和度の計測精度は1.1±1.9%であった。4波長にすることによって、HbVの干渉作用を緩和できたと言える。

MetHbの各計算式における統計量をTable 4に示す。メトヘモグロビンの最適な計算式として、φ620/730の1つの独立変数が選択された。1つの独立変数による計算式を式(3)に示す。

$$\text{MetHb}_p = -5.9 + 4.1 \times \phi_{620/730} \quad (3)$$

Training setにおける採血によるMetHb_sと改良型4波長POMによるMetHb_pの関係および誤差をFig. 9(上)に示す。Training setでは0.0±1.4%の精度でMetHbを計測できた。Validation setにおける採血によるMetHb_sと改良型4波長POMによるMetHb_pの関係および誤差をFig. 9(下)に示す。Validation setでは-0.1±1.1%の精度でメトヘモグロビンを計測できた。

現行型POMのHbV投与量に対する酸素飽和度計測の精度に対し、4波長光学システムの導入により、HbVの干渉作用に対する補正効果が得られた。HbV投与に対するPOMの精度をFig. 10(a)、現行型POMと改良型4波長POMの精度比較をFig. 10(b)に示す。血液交換率40%で酸素飽和度の平均値は約6%異

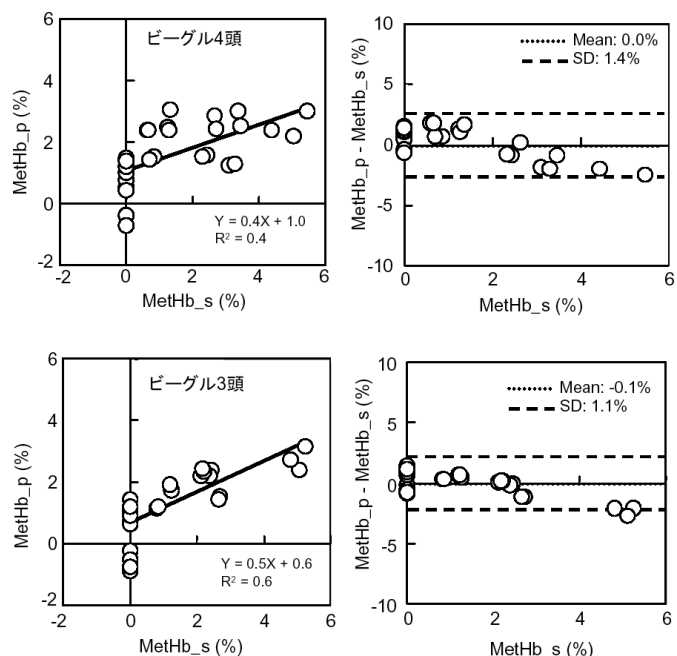


Fig. 9. 採血液から測定・算出したMetHb_sと、改良型4波長POMによるMetHb_pの関係および誤差 (上)Training set, (下)Validation set.

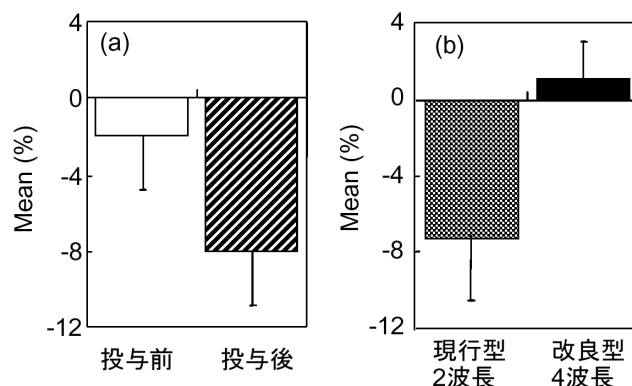


Fig. 10. (a) HbV投与に対する現行型POMの酸素飽和度計測の精度, (b) 現行型POMと改良型4波長POMの酸素飽和度計測の精度比較.

なるのに対し、分散は同程度の変化である。投与量によって平均値だけが変化するのであれば、投与量によって現行型POMの酸素飽和度表示を読み変える方法も考えられる。しかし、MetHb計測には式(3)より波長620, 730 nmが必要である。MetHbによる現行型POMへの干渉作用もあることから、HbV投与時の呼吸管理には4波長が必要と思われる。またHbV投与によるPOMへの干渉作用を緩和するために、4波長パルス分光法は有効であったと言える。

結 論

HbVは、現行の日本光電社製のPOM (DDG-3300) に対し光学的な干渉作用を示し、酸素飽和度を過小評価することが解り、臨床応用に際しての新たな問題の提起となった。今後、他社製のPOMについても干渉作用の有無を確認する必要がある。し

かし、その原因は極めて明らかであり、対応策は今から検討する必要がある。今回開発した4波長光学システムは、酸素飽和度とMetHbを計測でき、HbVによるPOMへの干渉作用の緩和、およびMetHb濃度の計測に有効であった。但し、今回得られた計算式は経験式であり、測定部位やHbVの投与量によって変化する可能性があるため、今後更なる検討が必要である。

謝 辞

動物実験の補助をしていただいた大竹 俊男 氏（慶應義塾大学医学部 動物実験センター）に感謝致します。本研究は、厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサンエンス総合研究事業）により推進された。

引用文献

1. Sakai H, Sou K, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Haemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers: present situation and future visions. *J Intern Med* 2008;263:4-15.
2. Ma Z, Monk TG, Goodnough LT, McClellan A, Gawryl M, Clark T, Moreira P, Keipert PE, Scott MG. Effect of hemoglobin- and Perflubron-based oxygen carriers on common clinical laboratory tests. *Clin Chem* 1997;43:1732-7.
3. Sakai H, Tomiyama K, Masada Y, Takeoka S, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Pretreatment of serum containing hemoglobin vesicles (oxygen carriers) to prevent their interference in laboratory tests. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:222-31.
4. 酒井宏水, 富山賢一, 政田陽平, 武岡真司, 堀之内宏久, 小林紘一, 土田英俊. 酸素輸液（ヘモグロビン小胞体）を含有する血液の生化学検査. *人工血液* 2002;10:47-53.
5. 三宅誠司, 大橋康広, 高折益彦. ヘモグロビン基剤人工酸素運搬体混入血液での血液型判定 とくに自動輸血検査器について. *人工血液* 2007;15:85-89
6. Aoyagi T, Kishi M, Yamaguchi K, Watanabe S. Improvement of the ear piece oximeter. 13th Meeting of the Japanese Society for Medical Electronics and Biological Engineering, Abstract, 1974;90-91.
7. Teng X, Zhang Y. Blood oxygen saturation measurement. In: *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*. M. Akay (Ed.), pp. 605-612, 2006, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ.
8. Hughes GS, Francom SF, Antal EJ, Adams WJ, Locker PK, Yancey EP, Jacobs EE. Effects of a novel hemoglobin-based oxygen carrier on percent oxygen saturation as determined with arterial blood gas analysis and pulse oximetry. *Ann Emerg Med* 1996;27:164-9.
9. Lurie F, Driessen B, Jahr JS, Reynoso R, Gunther RA. Validity of arterial and mixed venous oxygen saturation measurements in a canine hemorrhage model after resuscitation with varying concentrations of hemoglobin-based oxygen carrier. *Anesth Analg* 2003;96:46-50.
10. Atoji T, Aihara M, Sakai H, Tsuchida E, Takeoka S. Hemoglobin vesicles containing methemoglobin and L-tyrosine to suppress methemoglobin formation in vitro and in vivo. *Bioconjug Chem* 2006;17:1241-5.
11. Suzaki H, Kobayashi N, Nagaoka T, Iwasaki K, Umezu M, Takeda S, Togawa T. Noninvasive measurement of total hemoglobin and hemoglobin derivatives using multiwavelength pulse spectrophotometry -In vitro study with a mock circulatory system. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2006;1:799-802.
12. Sakai H, Tsai AG, Kerger H, Park SI, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E, Intaglietta M. Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with a red cell substitute consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J Biomed Mater Res* 1998;40:66-78.
13. Noiri E, Kobayashi N, Takamura Y, Iijima T, Takagi T, Doi K, Nakao A, Yamamoto T, Takeda S, Fujita T. Pulse total-hemoglobinometer provides accurate noninvasive monitoring. *Crit Care Med* 2005;33:2831-5.
14. 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. 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. *人工血液* 2007;15:18 (abstract)
15. 鶴川貞二. POM, 検査法の基礎. *検査と技術* 1994;22:11-16.

体外循環時におけるリポソーム型人工酸素運搬体 (TRM645) の有用性と安全性に関する研究

Evaluation of a Novel Combined Therapy of a Extracorporeal Cardiopulmonary Bypass Using Liposome-encapsulated Hemoglobin (TRM645)

水野 敏秀⁽¹⁾, 石塚 隆伸⁽²⁾, 金田 伸一⁽²⁾, 巽 英介⁽¹⁾, 妙中 義之⁽¹⁾

Toshihide Mizuno⁽¹⁾, Takano Ishizuka⁽²⁾, Shinichi Kaneda⁽²⁾, Eisuke Tatsumi⁽¹⁾, Yoshiyuki Taenaka⁽¹⁾

和文抄録

本研究では、体外循環時および心肺停止蘇生時の心肺補助装置の回路充填剤として、テルモ社製人工酸素運搬体 (TRM645) を使用し、その予後侵襲の軽減化などに対する有用性および安全性について検討を行った。実験動物にはヤギを使用し、希釈体外循環実験では、右房脱血、頸動脈送血で常温体外循環を行った。TRM645投与群には40% TRM645加回路充填液を使用した。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。結果、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、希釈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。また、新規心肺蘇生法の有用性の検討を目的とした実験では、実験的心停止後に経皮的な心肺補助装置 (PCPS) を用いて20分間の右房脱血、右頸動脈送血による呼吸循環補助を行った。実験では、心肺補助中の酸素運搬量が同等にもかかわらず、TRM645投与群で酸素代謝量が維持され、組織への酸素到達状態が良好であることが示された。また、血液生化学的にも、TRM645の使用により蘇生後の臓器傷害が軽減されていたと考えられた。以上より、体外循環による心肺補助とTRM645の併用は、循環補助中の全身酸素代謝の維持や蘇生後の多臓器不全を防止する効果が期待できると考えられた。

Abstract

We have developed novel circulatory support methods combined with artificial oxygen carrier in cardiopulmonary bypass (CPB) for cardiac surgery and cardiopulmonary resuscitation therapy using a percutaneous cardiopulmonary support (PCPS). We used newly developed liposome-encapsulated hemoglobin (TRM645) which has some preferable features for the clinical use, and it is expected to improve the oxygen metabolism to work as oxygen carrier. Our two studies were purposed to evaluate the combined therapy with TRM645 in large animal experiments focusing on systemic oxygen metabolism during diluted CPB and low flow PCPS. These results suggested that the application of TRM645 in the priming solution was able to maintain systemic oxygen consumption under the diluted CPB and low flow PCPS. In the method we have proposed, we determined the feasibility to deliver oxygen to the peripheral tissues at which red blood cells could not transport oxygen.

Our new method with TRM645 showed potential to maintain the oxygen metabolism, and to prevent hypoxic organ injury during the diluted CPB and low flow PCPS.

Keywords

liposome-encapsulated hemoglobin, cardiopulmonary bypass, percutaneous cardiopulmonary support, oxygen metabolism

(1) 国立循環器病センター研究所 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1 国立循環器病センター研究所, 人工臓器部 Dept. Artificial Organs, National Cardiovascular Center Research Institute, Fujishirodai 5-7-1, Suita, Osaka

(2) テルモ株式会社研究開発センター R&D center, TERUMO CORPORATION

論文受付 2008年9月8日 論文受理 2008年12月17日

はじめに

Cardiopulmonary Bypass (CPB) や Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) など人工心肺装置を用いた体外循環法は、今日の心臓外科の最も基本的な技術の一つであり、この体外循環技術の開発と安全性の向上は、心臓外科の成績向上に直接関連している¹⁾。現在の一般的な体外循環法は、体外循環中の非生理的な循環動態の安全性を保証するために、低体温状態での希釈体外循環法が基本の一つとして普及している。しかし、この体外循環時における低体温や血液希釈などの状態は、循環生理学的に必ずしも適切な環境とはいえない^{2,3)}。一方で、常温での希釈体外循環については、低体温の副作用の回避、冷却と加温に必要な体外循環時間の短縮、出血の減少などが利点とされるが、体外循環中の酸素運搬量を高値に設定する必要がある、低体温循環と比較し、高いヘマトクリット値やポンプ流量に維持しなければならない⁴⁾。また、特発的な低循環状態に対する安全時間が短くなることも大きな問題点としてあげられている。更に大量のプライミング液により血液を希釈した状態は、低ヘモグロビン血症を伴う危険性が常にあり、術後合併症の発生や回復に大きな影響を及ぼすことが考えられる⁵⁻⁷⁾。特に、小児に対する本法の適用時には、かかる血液希釈による障害が術予後に大きく影響する危険性が高いとされている。現段階では、その対応として自己ないし他家輸血療法を併用しているが、輸血療法には免疫的な不適応性や、感染症の発生など、輸血自体が新たな合併症を招く可能性を有する。このため、現在でも無輸血でより安全で高効率な体外循環法の開発は、心臓外科の発展に大きく貢献できる課題である。

また、経皮的挿入が可能な送脱血カテーテルと膜型人工肺および遠心ポンプを組み合わせた経皮的な心肺補助 (Percutaneous cardiopulmonary support; PCPS) システムは、大学病院救急部や救命救急センターなどの三次救急施設を中心に行われている有効な心肺蘇生法であるが、平成15年度に救急搬送された病院外心肺停止患者約95,000例において自己心拍が再開し1ヵ月後の生存を得た症例は約500例、3%程度であり、PCPSなど新しい蘇生法の適用により自己心拍の再開は可能ながらも、その後の蘇生後脳症、多臓器不全などの合併症のため社会復帰に至るまでの回復を望むことは困難な場合が多い⁸⁾。この原因としては、PCPS手技が末梢血管からのアプローチに限られるため全身の循環維持に必要な至適流量を得ることが困難なことが挙げられる。またショック状態にある心肺停止患者は末梢循環不全が顕著であるため、PCPS施行後においても脳、心臓の低酸素状態が遷延し、社会復帰の点で劇的な成績向上はなく、標準的治療とは言い難いのが現状である。

換言すれば、これら呼吸循環に関する機械的補助法においても、低ヘモグロビン血漿や低流量循環によって血液の酸素運搬能力が低下している場合は、各臓器への十分な酸素供給をおこなうことができず、生命の維持が困難であるといえる。臨床的に、これら諸事象への対策としては、酸素運搬量を増加させる手法（おもに血中ヘモグロビンの増加、血流量の増加）を講じる場合が多いが、上述したように臨床現場で効果的に行えることは

少ない。

我々は、かかる問題に対し、テルモ社と共同研究を行っているナノカプセル型人工酸素運搬体を体外循環回路の充填剤として使用し、希釈体外循環の血液希釈時や低流量循環時における血液の酸素運搬能力を向上させ、術中の末梢組織における低酸素状態を改善し、より安全な体外循環が期待可能な手法の開発を行った。我々が使用したナノカプセル型人工酸素運搬体はヘモグロビンをリポソームで包埋していたナノ粒子で、生体赤血球に比較し非常に高効率に酸素を運搬することが可能であり、他の人工酸素運搬体と比較して血中半減期が長く、生体に対する影響が少ないことを特徴としている^{9,10)}。

従来の研究より、機械的循環法への人工酸素運搬体併用法の効果については、動物実験にて検討が行われ¹¹⁾、高次脳機能の保存効果¹²⁾、心筋保護効果が認められているが^{13,14)}、人工酸素運搬体を添加した場合の体内を循環する血液全体の酸素運搬能力および酸素代謝能力を直接的に評価した研究は少ない。

本論文では、新エネルギー・産業技術総合開発機構による課題設定型産業技術開発費助成事業「ナノカプセル型人工酸素運搬体製造プロジェクト（平成15年度～平成17年度実施）」の一環として行われた「体外循環時におけるテルモ社製人工酸素運搬体TRM645の有用性と安全性に関する研究」に関する2つの研究を紹介する。これらの研究は、機械式呼吸循環補助と人工酸素運搬体の投与を併用することにより、低ヘモグロビン血症、低流量ながら全身の酸素供給を維持し、人工酸素運搬体を用いて末梢組織への酸素供給を確保するという、双方の短所を補完する新しい強力な呼吸循環補助法を確立するものである。

1. 小児希釈体外循環時におけるナノカプセル型人工酸素運搬体添加回路充填材使用による全身組織酸素代謝の変化に関する研究

本研究では、小児希釈体外循環に対しナノカプセル型人工酸素運搬体添加回路充填材を使用し、その体外循環時の全身酸素代謝の変化について、仔ヤギを用いた動物実験モデルを作成し、検討を行った¹⁵⁾。

(1) 方法

本実験には、実験動物としてオス仔ヤギを使用し、対照群4頭 (BW 21.5±2.6 kg)、テルモ社製人工酸素運搬体使用群 (TRM群) 4頭 (BW 19.8±0.8 kg) とし、実験を行った。

i) 人工酸素運搬体

本実験で使用された人工酸素運搬体は、テルモ株式会社研究開発センターで作成された人工酸素運搬体 (TRM645) を使用した。TRM645は、精製したヒトヘモグロビンにinositol hexaphosphate を添加して、脂質を混合したのち高速攪拌器で処理してリポソーム化したものを、ポリエチレングリコールで修飾し、生理食塩水に懸濁したコロイド状溶液である。ヘモグロビンを内包したリポソームは、平均粒子径が約230 nm、P50を45-55 mmHg、懸濁溶液中のヘモグロビン濃度が6 g/dL

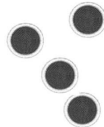
		
	赤血球	TRM645
・大きさ	7~9 μm	200 nm (赤血球1/40)
・血液型	8種類以上	なし
・酸素運搬力	2.5~4.5 mL/dL	4.5 mL/dL
・血液寿命	14~1440 時間	24 時間
・保存	21日	180日

Fig. 1. ナノカプセル型人工酸素運搬体と生体赤血球の比較

に調整した (Fig. 1).

ii) 体外循環実験

動物実験では、検体は常法を用い麻酔導入が行われ、イソフルレン吸入による全身麻酔下で行われた。次に、血行動態として、心電図、平均大動脈圧、中心静脈圧の計測ラインを装着し、体温は直腸温を計測した。

体外循環は、開胸下に左頸動脈送血・右房後大静脈脱血方式で行われ、回路内の充填剤には、TRM群にTRM645 400 mLを添加した回路充填材 (ヒドロキシエチルデンプン520 mL, 7 %炭酸水素ナトリウム溶液30 mL, マンニトール50 mL, ヘパリン2,000 IU) を使用し、総充填量 1,000 mLとした。なお、対照群にはTRM645 の代替として、同量の酢酸リンゲル液を添加したものを使用した。体外循環回路は、ハードシェルリザーバー付ホローファイバー型膜型人工肺 (キャピオックス SX10X, テルモ), 遠心ポンプ (キャピオックス CX-SP4538, テルモ), および動脈血フィルタ (キャピオックス CX-AF02, テルモ) を選択した (Fig. 3)。本実験における体外循環条件は、深部体温を 36-37 °Cとし、バイパス流量を 100-120 ml/kg/min, $V/Q = 0.5$, FiO_2 100 % とした。体外循環開始後には、検体を電気的細動器により心室細動状態とし、完全体外循環を確立した (Fig. 2)。

iii) 測定方法および測定項目

本実験において、血行動態の計測にはデータ記録解析システム (MacLab/16s, AD Instruments, Castle Hill, Australia) を用いて測定を行い、体外循環回路のバイパス流量の測定には超音波流量計 (T106, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) を用いた。体外循環開始前の酸素消費量は呼気ガスモニタ (S/5 コンパクトモニター, Detax Ohmeda, Helsinki, Finland) を用いて計測した。血液ガス性状 (酸素分圧 (PO_2) と血中乳酸値, 血中ヘモグロビン濃度 (Hb) と酸素飽和度 (SvO_2 , SaO_2)) の測定には、血液ガスシステム (ABLTMシステム, ラジオメーター, コペンハーゲン, デンマーク) とヘモオキシメータ (OSMTM3, ラジオメーター, コペンハーゲン, デンマーク) を用いた。なおこの実験に先立って、血液検体に

実験動物: 仔ヤギ (TRM645使用群: オス4頭, 対照群: オス4頭)
体重 TRM群 vs 対照群: 19.8 ± 0.8 vs 21.5 ± 2.6 (kg)

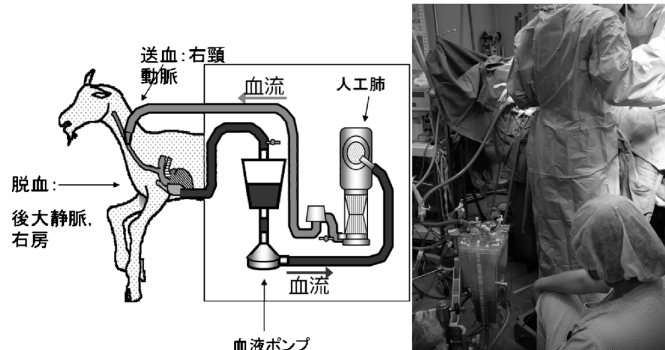


Fig. 2. 小児希釈対外循環の模式図および実験風景

- 膜型人工肺
 - 血液ポンプ
 - 術野回路
- テルモ社製 SX-10
テルモ社製 CX SP 45
国循人工臓器式

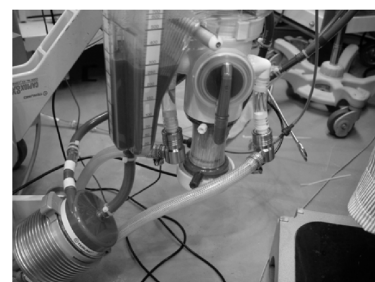


Fig. 3. 体外循環回路

TRM645が含まれる場合に、各計測値に関して血液ガスシステムとヘモオキシメータが適正な値を示すことを確認した。各項目の計測について、体外循環開始前および開始後 5, 10, 15, 30, 60, 90および120分後に経時的に行った。

全身酸素運搬量 (DO_2), 全身酸素消費量 (VO_2), 心拍出量 (CO), 動静脈血酸素較差 ($AVDO_2$), 動脈血酸素含有量 (CaO_2), 静脈血酸素含有量 (CvO_2) については、実験により測定された各値に基づき、以下の式より計算を行った。

$$DO_2 = CaO_2 \times CO \text{ [ml O}_2 \text{ /kg/min]} \text{ (体外循環前)}$$

$$DO_2 = CaO_2 \times BF \text{ [ml O}_2 \text{ /kg/min]} \text{ (体外循環中)}$$

$$CO = VO_2 / AVDO_2 \text{ [dL/kg/min]} \text{ (体外循環前)}$$

$$VO_2 = AVDO_2 \times BF \text{ [ml O}_2 \text{ /kg/min]} \text{ (体外循環中)}$$

$$AVDO_2 = (CaO_2 \times CvO_2) \text{ [mL/dL]}$$

$$CaO_2 = 1.34 \times Hb \times SaO_2 + 0.003 \times PaO_2 \text{ [mL/dL]}$$

$$CvO_2 = 1.34 \times Hb \times SvO_2 + 0.003 \times PvO_2 \text{ [mL/dL]}$$

実験中のヘマトクリット値および、TRM645加血液におけるTRM645の血中容積比の計測については、採取された全血 1 mLにそれと同量の 8 %デキストラン溶液 (D4876, SIGMA-ALDRICH, Inc., MO, USA) を加え、12,000 rpm, 10分間の遠心分離を行いTRM645と血球とを血漿から分離し、その容積比

を算出した。また、血液性化学検査用に採取された血液は、全血を3,000 rpm で10分間遠心分離した上清を1 mL使用し、同量の35 %デキストラン溶液を加えてから再度3,000 rpmで30分間遠心分離を行い、TRM645 を分離後、被検血清として使用した。病理学的検索のために、120分間の体外循環の後、安楽殺処置を行い、速やかに脳、心、肺、肝、脾、腎を採取し、10 %中性緩衝ホルマリン固定を行った。検体は常法を用い、ヘマトキシレン・エオジン染色による組織標本を作製した。

(2) 結果

本実験における体外循環の平均大動脈圧は、TRM群が47-61 mmHg、対照群が41-50 mmHgの範囲であり、実験条件内で維持が可能であった。また、バイパス流量は、対照群 (109-116 mL/kg/h)、TRM群 (103-118 mL/kg/min) とも、予定の流量で実験を行った。一方で、全身の末梢血管抵抗においては、TRM群で顕著に高い傾向にあった (Table 1)。実験中におけるヘマトクリット値は、体外循環による血液希釈により、TRM群では術前値の34±6 %から体外循環中は15±4 %に低下し、またTRM645の添加によるTRM群のTRM645の血中容積比は、体外循環中約5 %で維持されていた。

Table 1. 希釈体外循環中の血行動態

Table 1: Hemodynamics

		Pre CPB	30 min	120min
Control	mAP [mmHg]	80 ± 18	41 ± 3	47 ± 18
	CVP [mmHg]	14 ± 1	13 ± 6	12 ± 6
	Bypass flow [mL/kg/min]		111 ± 17	115 ± 10
	SVR [dyne*sec/cm ⁵]		995 ± 335	1135 ± 508
TRM	mAP [mmHg]	82 ± 18	53 ± 4	61 ± 14
	CVP [mmHg]	11 ± 6	10 ± 5	11 ± 6
	Bypass flow [mL/kg/min]		103 ± 34	116 ± 4
	SVR [dyne*sec/cm ⁵]		1851 ± 1154	1617 ± 709

体外循環中のTRM645を含む総ヘモグロビン値は 6.3±1.5 g/dLであり、同様に対照群においても体外循環中のヘマトクリット値が16±3 %に低下し、ヘモグロビン値は6.2±1.3 g/dL) で、両群において差は認められなかった。このため、ヘモグロ

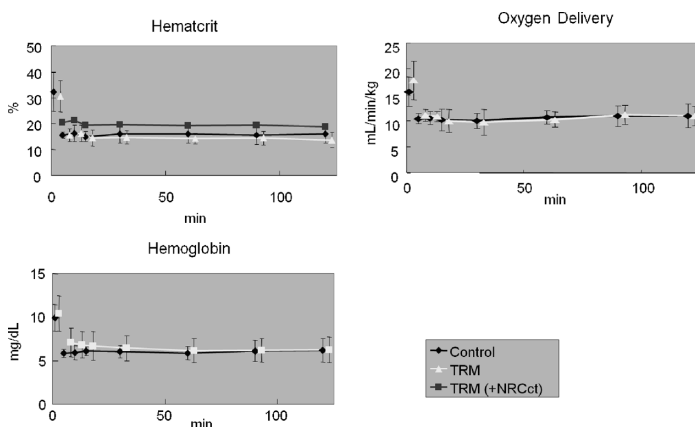


Fig. 4. 希釈体外循環中の血液性状および酸素運搬量

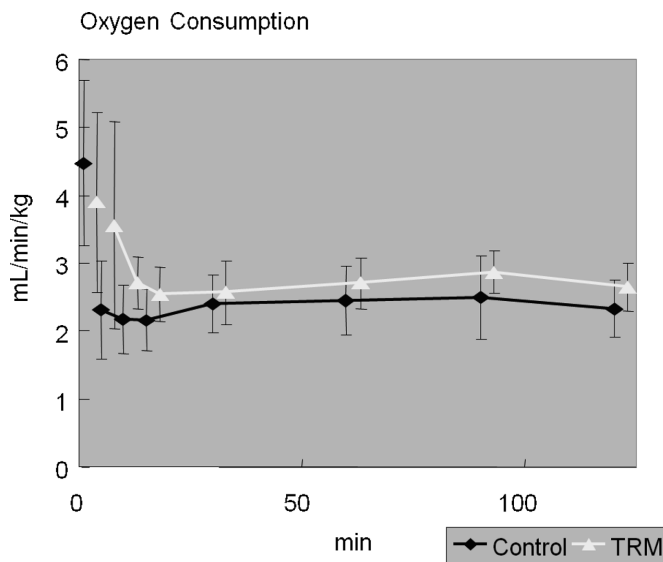


Fig. 5. 希釈体外循環中の酸素消費量

ビン値、血中酸素飽和度およびバイパス流量から算出されるDO₂に関してもTRM群で11.0±2.0 mL/kg/min、対照群で20.9±4.8 mL/kg/minから11.0±2.3 mL/kg/minとなり、術前値の約半分量に低下していた (Fig. 4)。

一方、体外循環中のSvO₂は、TRM群で低く推移する傾向が認められ (対照群 86-89 %, TRM群 82-85 %), 結果、全身のVO₂に関しては、実験中を通じTRM群が高値を示す傾向 (対照群2.4-2.5 mL/kg/min, TRM群 2.5-2.7 mL/kg/min) が認められた (Fig. 5)。生化学的に、乳酸値はTRM群でやや高値を示す傾向にあったが、対照群との間に差異は認められず、体外循環開始30分後に最高値となり (対照群 23.8±11.1 mg/dL, TRM群 25.0±2.9 mg/dL), 以降徐々に低下した。

体外循環中の血液生化学的にピルビン酸値は、対照群では体外循環開始30分後に最高値 (1.0±0.5mg/dL) となり、以降2時間後 (1.0±0.4mg/dL) まで一定の値で推移したが、TRM群では30分後 (1.0±0.1 mg/dL) 以降2時間後 (1.4±0.4 mg/dL) まで上昇傾向にあった。また、末梢組織での酸素代謝の指標となる乳酸/ピルビン酸比では、両群ともに体外循環後一時的に上昇し、末梢組織での無酸素呼吸が優位になり、体外循環30分後以降徐々に低下する傾向が認められるが、同期において、TRM群が明らかに低値で推移し、早期に回復する傾向を示した。病理組織学的検索により、両群ともに主要臓器に対する著大な病理的变化は認められず、TRM群では、TRM645投与による毒性的所見や、各臓器内の細網内皮系組織内へのヘモジデリン沈着は認められなかった。

(3) 考察

一般に体外循環時における末梢組織での酸素消費量は、経時的に低下してゆく傾向にある。本現象は、全身に送り出される動脈血の酸素運搬量が十分であっても、体外循環下の特殊な血流状態下によって、血流分布の不均衡などが併発し、局所的に十分

な酸素が到達していない末梢循環不全部位が存在するためと考えられている。本研究においても、実験的体外循環中には血液希釈に起因する酸素運搬量および酸素消費量の低下が認められ、特に対照群においては、混合静脈血酸素飽和度が著しく高値で推移し、末梢組織で酸素消費が行われていない状態が観察された。しかしながら、人工酸素運搬体の添加により、体外循環中のヘモグロビン濃度に変化は認められないものの、体外循環中の末梢組織酸素消費量は、対照群に比較し、高値で推移する傾向が認められ、特に体外循環開始直後の酸素消費量の低下は緩やかで、従来の生体赤血球では酸素が到達しにくかった末梢組織へ酸素が到達していることが想起された。さらに、乳酸・ピルビン酸比の結果からも、人工酸素運搬体の使用により比較的早期に末梢組織での好氣的代謝が回復し、組織での酸素消費が良好に行われていることが示されている。また、体外循環中の酸素運搬量に対する酸素消費量の変化は、体外循環中の酸素運搬量が通常の1/2程度と低下するに従い、同範囲の酸素運搬量の変化に対し、全身の酸素消費量が急激に変動しているが、一方でTRM群においては、酸素運搬量が少ない体外循環中においても、全身酸素消費量の変動が少ないことが認められた (Fig. 6)。かかる結果は、TRM645の投与が体外循環中の低酸素運搬時においても、全身での酸素代謝が比較的安定して行われていることを示し、常温体外循環の欠点である特発的な低流量状態の危険性を軽減できる可能性があると考えられる。従って、人工酸素運搬体の添加は、体外循環時の強度血液希釈による酸素消費量の経時的な低下を抑制するための有用な手法になり得ると考えられる。

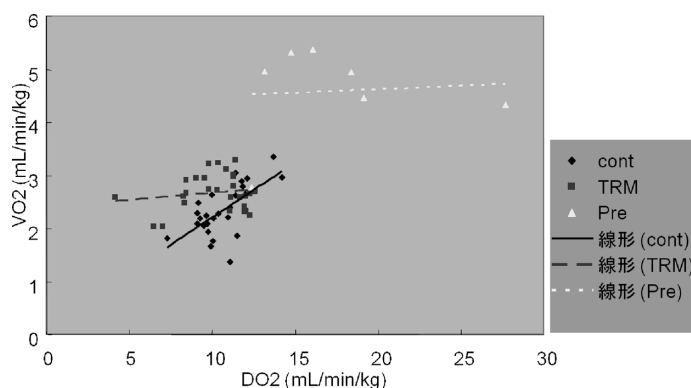


Fig. 6. 希釈体外循環中における酸素運搬量に対する酸素消費量の変化

2. PCPSと人工酸素運搬体併用による新規心肺蘇生法の実験的検討

本研究ではPCPSを用いた病院外心肺停止に対する蘇生後の社会復帰率を向上させる目的で、心肺停止時のPCPS使用と同時に、赤血球より末梢組織への酸素運搬性に優れた人工酸素運搬体を併用し、低流量補助下における末梢組織での酸素代謝を確保することにより、脳および心臓の低酸素状態を改善する手法の検討を行った¹⁶⁾。

実験動物: 成ヤギ (TRM645使用群: メス5頭, 対照群: メス3頭)
 体重 TRM群 vs 対照群: 56.9 ± 9.3 vs 58.0 ± 3.5 (kg)
 回路充填液 TRM645 300 mL
 (対照群 酢酸リンゲル 300 mL)

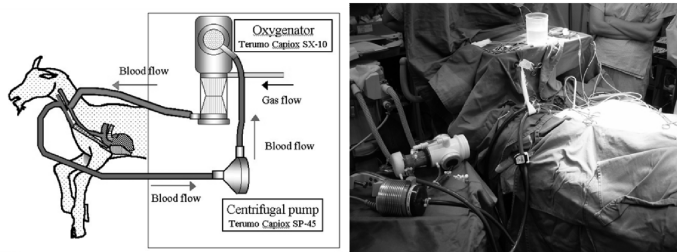


Fig. 7. PCPSによる心肺蘇生実験風景

(1) 方法

実験では、成ヤギ10頭 (体重 59 ± 6.5 kg) を使用し、常法を用いてイソフルレンによる全身麻酔下に行われた。検体は、心電図、大動脈圧、中心静脈圧計測ラインが装着された後、開胸下に心臓を露出し、直流細動器を用いて、10分間の心肺停止状態にさせた。次にPCPS装置 (Capiox EBS, テルモ) を用いて右房脱血、右頸動脈送血方式による呼吸循環補助 (30 mL/kg/min , $V/Q=1.0$) を20分間行った。20分間の補助循環後、体外式除細動器にて自己心拍を再開させ、その後120分間の観察を行った。動物実験には、回路内にテルモ社製人工酸素運搬体 (TRM645, テルモ) を充填した回路 (TRM群, 5頭), および同量の生理食塩水を充填した回路 (対照群, 5頭) を準備し (回路充填量300 mL, 回路内充填材への人工酸素運搬体添加による全身酸素代謝の変化について検討を行った (Fig. 7)。各項目の計測については、心停止前の値を術前値とし、PCPS駆動直後より、経時的に血行動態の計測を行い (PCPS駆動後5, 10, 15, 20分, 心拍再開後30, 60, 90, 120分後), また同時に酸素運搬量 (DO_2), 全身組織酸素摂取量 (VO_2) を算出し、全身末梢組織での酸素代謝の指標とした。血液生化学的検査項目としては、GOT, LDHの測定を行った。

(2) 結果

実験では、全例において自己心拍の再開が可能であった。PCPS駆動後における両実験群のヘマトクリット値およびヘモグロビン値には、ほぼ変化は認められず、TRM群においては、人工酸素運搬体の血中容積比は実験中約1%であった。しかしながら、心肺停止後PCPSのみによる低流量の呼吸循環補助中には、 DO_2 および VO_2 は、術前値と比較し、著しく低下し、全身への酸素の運搬量は術前値の半分量ほどであることが示された。PCPS駆動中の DO_2 については、対照群とTRM群ともにほぼ一定で推移していた。しかしながら、対照群の VO_2 は、PCPS駆動5, 10, 15分後と暫時減少し ($143, 103$ および 94 mL/min), 経時的に全身の酸素代謝が低下する所見が認められたが、TRM群においては、 VO_2 の減少はPCPS駆動5, 10, 15分後 ($154, 126$ および 131 mL/min) においてほぼ軽微であった (Fig. 8)。また、血液生化学的には、自己心拍再開120分

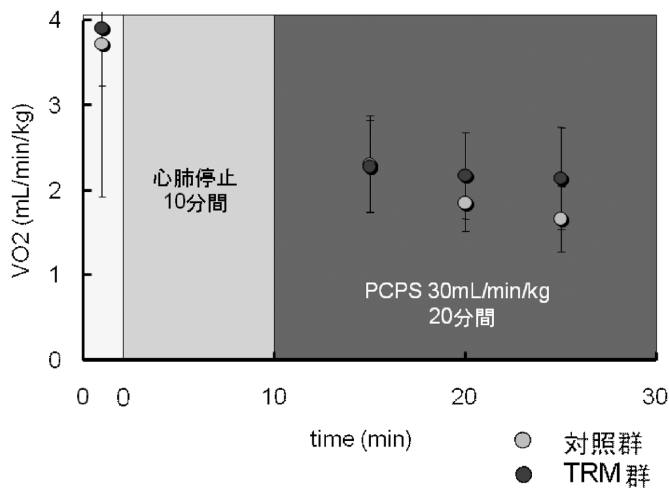


Fig. 8. 循環再開後の全身酸素消費量

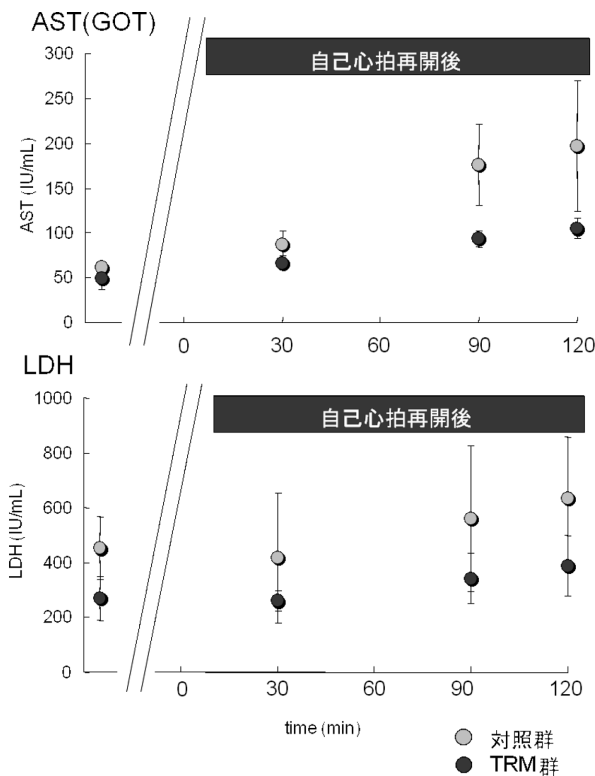


Fig. 9. 自己心拍再開後の血液生化学値 (ASTおよびGOT)

後におけるGOT (TRM群104 vs. 対照群181 IU/L) およびLDH (TRM群342 vs. 対照群761 IU/L) がTRM群で明らかに低値を示していた (Fig. 9)。

(3) 考察

本研究では、実験的心肺停止下のPCPS補助循環中に、低流量循環に起因するDO₂の半減が認められ、この結果、初期的に維持可能であったVO₂が、PCPS駆動下においても経時的に減少していくことが示された。かかる現象は、心肺停止状態に対

するPCPS補助や心拍再開後においても、低流量循環によって末梢組織での酸素不足が遷延し、二次的な臓器障害を併発する原因の一つであると考えられた。しかし、我々の提案する本法により、低循環PCPS補助下においても、人工酸素運搬体が、従来生体赤血球では酸素を運搬することが困難であった末梢組織へも酸素を到達させることが可能であり、全身酸素代謝の維持に貢献していることが示され、心拍再開後における臓器への二次的な障害を軽減していると推察された。

まとめ

本プロジェクトで行われた2つの研究の特徴は、人工酸素運搬体を用いることにより、低ヘモグロビン血症や低循環など全身的な酸素運搬量の低下時において、血液の“いわゆる”酸素運搬量を変化させずに、全身の酸素消費量を増加させることが可能であることを示した点にある。本実験のような中大動物を用いた新規医療部材の検討については、実験数を多く設定することが困難であり、本研究においても、n=4の群間比較となった。このため現段階での人工酸素運搬体の効果については、実測値からの直接的に解釈を行っており、各群間の傾向を示すのみにとどまった。しかしながら、本検討においても人工酸素運搬体を使用した群では、希釈体外循環時の酸素代謝経過に特徴的な傾向が指摘されるなど、人工酸素運搬体の投与が対象の体内酸素代謝動態に影響を及ぼしている事は、十分に想起される。従って、体外循環時における回路充填剤への人工酸素運搬体添加の併用療法は、生体赤血球の到達しにくい末梢組織での酸素代謝を増加させ、安全域の広い常温希釈体外循環法や、新しい強力な呼吸循環補助法に応用可能な新規手法になりえると期待されるが、今後の研究として、我々は、実験数を増やし、統計手技の適用による有意差検定の実施や、人工酸素運搬体の酸素代謝動態の特徴を解析する必要があると考えている。

また一方で、別の課題として、ナノ粒子である人工酸素運搬体を血管内に投与することによる生体や医療計測機器への様々な影響を詳細に検討しなければならないことが、現在の問題点として挙げられている。たとえば希釈体外循環の研究で述べた体外循環中の酸素消費量の増加は、実験中には混合静脈血の酸素飽和度および酸素ガス分圧の低下として記録され、さらに乳酸値も従来法に比較し高くなる傾向にある。このため、従来の体外循環の概念のまま各測定値に対対応を行うと、対象とする患者の状態を見誤る可能性もあり、臨床現場で実際に使用する場合には、人工酸素運搬体を使用した場合の血液性状の特殊性を体外循環士などが熟知しなければならない。また、人工酸素運搬体混合血については、その血液性状を測定する際に様々な臨床検査機器への影響が懸念され、人工酸素運搬体の血中濃度による測定値校正の分析や精度の再評価が必要である。これからの研究では、その実用化に向け、人工酸素運搬体の治療効果を示す事と共に、本治療法を使用した場合の体内動態や血液検査値の特殊性を明らかにする必要もあると考える。

引用文献

1. Gravlee GP, Davis RF, Kurusz M, et al. eds. Cardiopulmonary bypass: principles and practice, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000
2. Slater JM, Orszulak TA, Cook DJ. Distribution and hierarchy of regional oxygen delivery during hypothermic cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2001;72:542-47
3. Boston US, Slater JM, Orszulak TA, Cook DJ. Hierarchy of regional oxygen delivery during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2001;71:260-64
4. Cook DJ. Changing temperature management for cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 1999;88:1254-71
5. 山本善護. 血液希釈体外循環のガス動態に関する研究. 日胸外会誌 1968;16:1014
6. Habib RH, Zacharias A, Schwann TA, Riordan CJ, Durham SJ, Shah A. Adverse effects of low hematocrit during cardiopulmonary bypass in the adult: should current practice be changed? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125(6):1438-50
7. Duebener LF, Sakamoto T, Hatsuoka S, Stamm C, Zurakowski D, Vollmar B, Menger MD, Schafers HJ, Jonas RA. Effects of hematocrit on cerebral microcirculation and tissue oxygenation during deep hypothermic bypass. *Circulation* 2001;104(12 Suppl 1):I260-4
8. Fire and Disaster Management Agency of the Ministry of International Affairs and Communications: 2005 Current state of ambulance and rescue service, Fire and Disaster Management Agency of the Ministry of International Affairs and Communications, 2006;47(in Japanese)
9. Ogata Y. Evaluation of human hemoglobin vesicle as an oxygen carrier: Recovery from hemorrhagic shock in rabbits. *Polym Adv Technol* 2000;11:1-6
10. Ogata Y. Characteristics and function of human hemoglobin vesicles as an oxygen carrier. *Polym Adv Technol* 2000;11:205-9
11. Isaka M, Sakuma I, Imamura M, Makino Y, Fukushima S, Nakai K, Shiiya N, Kenmotsu O, Kitabatake A, Yasuda K. Experimental Studies on Artificial Blood Usage for Hemodilution during Cardiopulmonary Bypass. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2005;11:238-244
12. Oda T, Nakajima Y, Kimura T, Ogata Y, Fujise Y. *J Artif Organs*; 2004;101-106.
13. 山崎真敬, 饗庭了, 四津良平, 小林鉦一. ヘモグロビン小胞体を用いた人工心肺充填液による高次脳機能保護効果. *人工血液* 2006;14:62-65
14. Bessho M, Hama M, Katoh R, Yanagida S, Kusuhara M, Ohsuzu F. Hemoglobin Vesicle Aids Recovery of Cardiac Function during Ischemia-Reperfusion in Langendorff Perfused Rat Hearts. *人工血液* 2007;14:92-97
15. Kansaku R, Mizuno T, Tatsumi E, Ogata Y, Ishizuka T, Taenaka Y. Oxygen metabolism during cardiopulmonary bypass with hemodilution using liposome-encapsulated hemoglobin in kid goats, *J Artifi Org* 2008;11:24-8
16. Ota K, Mizuno T, Tatsumi E, Katagiri N, Taenaka Y, Ishizuka T, Ogata Y, Ujike Y. Experimental Study of a Novel Method of Cardiopulmonary Resuscitation Using a Combination of Percutaneous Cardiopulmonary Support and Liposome-encapsulated Hemoglobin (TRM645). *Acta Medica Okayama* 2008;62: in press

ヘモグロビン小胞体の in vitro におけるヒト血液細胞および血漿タンパクへの適合性

Biocompatibility of Hemoglobin Vesicles, a Cellular-type Artificial Oxygen Carrier, on Human Blood Cells and Plasma Proteins in Vitro

藤原 満博, 東 寛, 池田 久實

Mitsuhiro Fujihara, Hiroshi Azuma, Hisami Ikeda

和文抄録

ヘモグロビン小胞体 (hemoglobin vesicles; HbV) は、脂質二重膜からなるリポソームの中にヘモグロビンを内包させたセル型の人工酸素運搬体である。HbV はいわゆる「人工赤血球」として血管内に輸注されるため、その臨床応用に向けた安全性の評価には、生体適合性、とくに血液構成成分に対する適合性をみることが重要である。そこで我々はヒト血液細胞およびヒト血漿タンパク系を用いた in vitro の評価に焦点をあてた検討をおこなってきた。止血や炎症反応に関与する血小板に対し、HbV 自体には活性化作用はみられず、またアゴニストによる活性化への影響もみられなかった。自然免疫に重要な働きをする好中球の機能（走化能、脱顆粒、活性酸素産生）の活性化に対しても、HbV は影響を与えなかった。造血機能に対しては、HbV は in vitro での共存が 3 日間までの短期間であれば造血前駆細胞活性を損なうことはないことが示された。またリポソームの特性から補体の活性化が懸念されたが、現行の HbV では活性化はみられず、さらに凝固系、カリクレイン・キニン系にも影響はみられなかった。以上のことから、HbV はヒト血液細胞ならびに血漿タンパクに対し高い適合性を持つことが示唆される。

Abstract

Hemoglobin vesicles (HbV), a cellular-type artificial oxygen carrier, are composed of human hemoglobin encapsulated within a phospholipid bilayer membrane. As HbV are injected intravenously, biocompatibility of the HbV with blood components is very important to ensure safety of this material for clinical use. We have evaluated this biocompatibility by focusing on the influence of HbV on human blood cells as well as plasma proteins in vitro. 1) As to the influences to platelets which are involved not only in the hemostasis but also in inflammation, HbV themselves did not activate platelets, and had no aberrant effect on agonist-induced platelet activation. 2) HbV did not affect on agonist-induced activation of neutrophil functions (chemotaxis, degranulation, and production of superoxide) which play important roles on innate immunity. 3) HbV had no effect on the hematopoietic progenitor activity, if the exposure period is brief. 4) The present HbV (containing DHSG) did not activate complement system, although the old-type HbV (containing DPPG, no PEG modification) did markedly. 5) The coagulation as well as kallikrein-kinin cascades were not affected by the present HbV. Thus, our in vitro studies show that HbV are highly biocompatible with human blood cells and human plasma proteins.

Keywords

artificial oxygen carrier, biocompatibility, platelets, neutrophils, hematopoietic progenitor cells, complement, coagulation, kallikrein-kinin

はじめに

赤血球製剤の人工代替物として人工酸素運搬体の開発が進められてきている。人工酸素運搬体の臨床応用における利点は、

輸血時の血液型判定の必要がないこと、製剤の長期保存が可能となること、同種抗原感作や細菌感染およびウイルス感染の伝播を回避できること等があげられる¹⁾。これらの利点から、災

北海道赤十字血液センター 研究部 〒063-0002 札幌市西区山の手2条2丁目 Hokkaido Red Cross Blood Center, Yamanote 2-2, Nishi-ku, Sapporo 063-0002, Japan
論文受付 2008年11月12日 論文受理 2008年12月3日

害時の緊急事態において大量の血液製剤が必要とされる時、また血液型検査および適合した血液製剤の供給を待機する間、人工酸素運搬体を応急措置として用いることが想定される。現行の同種血輸血や自己血輸血との組み合わせにより、人工酸素運搬体は合理的な輸血システムを構築することに寄与することが期待される。

ヘモグロビン小胞体 (hemoglobin vesicles; HbV) は、粒子径約 250nm のリポソーム包埋型ヘモグロビンで¹⁾、細胞膜を模擬し人工的に作成したリン脂質／コレステロール／陰性荷電脂質／PEG 脂質からなる脂質二重膜のリポソームの中にヘモグロビンを内包させたセル型の人工酸素運搬体である。HbV の人工赤血球としての酸素運搬能に関する有効性、組織分布、代謝等についてはこれまで詳細に検討されている¹⁾。一方、HbV の臨床応用を進めていく上では、その生体適合性を評価することが重要である。生体適合性を評価すべき項目は多岐にわたる²⁾。その中で我々は、HbV が輸注された際に相互作用を起しうる血液構成成分、即ち、血液細胞および血漿タンパクに対し HbV がどのような影響をあたえるかについて焦点をあてた検討をおこなってきた。本稿においてはヒト血液細胞として血小板、好中球、造血前駆細胞を、ヒト血漿タンパクとして補体系、血液凝固系、カリクレイン-キニン系をとりあげ、HbV の in vitro におけるそれぞれへの影響について我々の検討結果を概説し、HbV の生体適合性について言及したい。

1. ヘモグロビン小胞体の血小板活性化に対する影響

げっ歯類の動物モデルにおいては、リポソーム包埋型ヘモグロビン投与による副作用が知られ、その症状の一つとして一過性の急性血小板減少が報告されている³⁻⁵⁾。同様な一過性の急性血小板減少は、陰性荷電のリポソームの投与においてもみられている^{6,7)}。この急性血小板減少の発生原因を解明するため、in vitro においてリポソームとげっ歯類の血小板との結合に関して研究がなされた結果⁸⁾、リポソームの構成成分が負電荷の脂質である場合、ラット多血小板血漿とのインキュベーションによりリポソームは血漿中の補体成分 C3b に覆われ、C3b を介したリポソーム - C3b - 血小板上 CR1 receptor の結合による凝集塊が形成されることが示された。そして in vivo においては、この凝集塊が速やかに網内系によって処理されることが急性血小板減少の原因と考えられている⁸⁾。これに対しヒト血小板上には CR1 receptor が存在しないため、リポソームと血小板との凝集塊は観察されない⁸⁾。従ってヒトにおいてはリポソームの構成成分が負電荷の脂質であったとしても、動物モデルで観察されるリポソーム輸注後の急性血小板減少は発症しないと推測される。

一方、血小板はその顆粒中に種々の炎症性生理活性物質を含有していることや、膜表面の接着分子を介して白血球と結合することから、止血血栓の形成のみならず炎症反応にも関与していると考えられている^{9,10)}。HbV の投与により急性の血小板減少症が起こらないとしても、HbV が生体内で血小板を活性化したり、あるいはアゴニストによる反応を助長させたりするよ

うな影響を及ぼし、血小板由来生理活性物質の放出が起こるといふ事態は、生体にとって好ましいことではない。

このような背景のもと、われわれはリポソームの構成成分として DPPG (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidyl glycerol) を含有する HbV の血小板活性化への影響について、RANTES の放出反応を指標として検討した¹¹⁾。RANTES は血小板の α 顆粒に存在する炎症性ケモカインで、好塩基球、好酸球、単球およびリンパ球に対する強力な走化作用を有する^{9,12)}。そこでヒト多血小板血漿と最大 20% (vol/vol) までの濃度の HbV を予めインキュベーション後、アゴニストであるコラーゲンで刺激した反応上清中の RANTES の濃度の増加を測定した。その結果、コラーゲンの濃度に依存した RANTES の放出がみとめられたが、20% HbV と予めインキュベーションさせた場合においては、RANTES の放出への影響はみられなかった (Table 1)。またアゴニスト刺激なしの場合においても、RANTES の放出に関して血小板と HbV を予めインキュベーションした影響はなんらみとめられないことから、HbV が血小板を活性化する作用もないと考えられた。

次に、リポソームの構成成分として DPPG をカルボン酸脂質 DHSG (1,5-O-dihexadecyl-N-succinyl-L-glutamate) に置き換えた現行の HbV の血小板への影響について、HbV 濃度最大 40% まで検討した¹³⁾。血小板活性化の評価は、RANTES に加え同じく α 顆粒に存在する炎症性ケモカイン β -thromboglobulin (β -TG)、濃染顆粒に存在するセロトニンの放出反応、ポジティブフィードバックによって血小板活性化を増幅する Thromboxane A_2 (TXA₂) の産生、さらに α 顆粒由来の CD62P の膜表面への発現、および血小板膜糖タンパク α Ib β 3 の構造変化を認識する抗体 PAC-1 の結合を指標とした。なお、TXA₂ は半減期が短いためその代謝産物の Thromboxane B₂ (TXB₂) を測定した (Table 1)。

Table 1. Effect of HbV on human platelets .

Index	Stimulant	Type of HbV	Conc. of HbV	Effect
RANTES release	Collagen (+) (-)	DPPG-HbV	≤ 20%	No effect
		DPPG-HbV	≤ 20%	No effect
RANTES release	Collagen (+) (-)	DHSG-HbV	≤ 40%	No effect
		DHSG-HbV	≤ 40%	Marginal reduction
β -TG release	Collagen (+) (-)	DHSG-HbV	≤ 40%	No effect
		DHSG-HbV	≤ 40%	No effect
Serotonin release	Collagen (+) (-)	DHSG-HbV	≤ 40%	No effect
		DHSG-HbV	≤ 40%	No effect
TXB ₂ production	Collagen (+) (-)	DHSG-HbV	≤ 40%	No effect
		DHSG-HbV	≤ 40%	No effect
CD62 expression	ADP (+) (-)	DHSG-HbV	≤ 40%	No effect
		DHSG-HbV	≤ 40%	No effect
PAC-1 binding	ADP (+) (-)	DHSG-HbV	≤ 40%	Slight potentiation
		DHSG-HbV	≤ 40%	No effect

セロトニンは血小板の濃染顆粒に存在する生理活性アミンで、血管収縮作用をはじめ繊維芽細胞増殖作用、マクロファージの活性酸素産生促進作用、NK 細胞活性化促進作用を有する⁹⁾。CD62P はセレクチンファミリーに属する接着分子で⁹⁾、血小板

活性化に伴って α 顆粒から膜表面に分布するため、血小板活性化マーカーとして汎用されている¹⁴⁾。PAC-1は血小板上の α IIb β 3 (GPIIb-IIIa) が血小板活性化にともなって構造変化を起こした時に発現するエピトープを認識するモノクローナル抗体である^{14,15)}。低濃度のADP刺激によっても発現の増加がみられることから、高感度でかつ特異的な血小板活性化マーカーとして有用であるとされている。 α IIb β 3はインテグリンファミリーに属する接着分子であり、血小板においてフィブリノーゲンやvon Willbrand因子のレセプターとして機能し、血小板凝集や粘着の重要な分子である¹⁶⁾。

ヒト多血小板血漿に20%および40%の濃度のHbVを1時間予めインキュベーション後、アゴニスト刺激の無い場合は、血小板反応上清中のRANTES, セロトニン, β -TG, TXB₂および血小板表面CD62Pのレベルの上昇はみられないことから、HbVに血小板活性化作用は無いと考えられた。この際、RANTESレベルはむしろ減少したが、この程度の変化での臨床的意義は少ないと推察された。アゴニスト刺激により血小板の脱顆粒を惹起させると、いずれの濃度のHbV処理においてもRANTES, セロトニン, β -TGの放出, TXB₂の産生, およびCD62P発現が引き起こされ、そのレベルはHbV未処理のものとは有意差はみられなかった (Table 1)。一方、PAC-1の発現はHbV未処理では影響がないものの、HbV処理により低濃度のADP刺激血小板において僅かな亢進がみられた。PAC-1の発現の亢進は空の小胞体処理においても観察されたため、ヘモグロビンの有無にはよらず、小胞体それ自体または小胞体の構成成分に起因する可能性が考えられた。以上のことから、HbVは低濃度のアゴニスト存在下で α IIb β 3の構造変化を僅かに促進するものの、CD62Pの膜への発現, RANTES, セロトニン, β -TGの放出, TXB₂の産生にはアゴニスト刺激の有無にかかわらず影響を与えないことから、ヒト血小板に対し高い生体適合性があると結論された (Table 1)。

2. ヘモグロビン小胞体の好中球活性化に対する影響

HbVがヒトに投与される状況として大量出血が想定される。その際に、生体防御のファーストラインを担う好中球の機能に対し、HbVが抑制的に働くならば、感染症などを合併する危険性が懸念される。循環血中の好中球は活性化を受け、炎症部位に遊走し、生体を脅かす細菌を効率的に殺菌する必要がある。好中球は、ザイモザンや細菌由来のペプチド (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)) によって活性化を受け、多岐にわたる機能を発揮することが知られているが、PEG-distearoylphosphatidylethanolamine (PEG-DSPE) 修飾を受けたある種のリポソームは、これらの刺激に対する好中球の反応を阻害することが報告されている¹⁷⁾。逆に、フォスファチジルコリンやフォスファチジルセリンからなるリポソームが、マウスのアレルギーモデルにおいて、好中球の肺への集積を促進させたという報告がなされている¹⁸⁾。そこで、HbV自体がPEG-DSPE修飾をうけていることもあり、fMLP刺激によって好中球が発揮する機能に対し、どのような影響を及ぼすかに

Table 2. Effect of DPPG-HbV on fMLP-induced neutrophil functions.

Function	Conc. of HbV	Effect
Chemotaxis	$\leq 0.6\%$	No effect
Upregulation of CD11b expression	$\leq 0.6\%$	No effect
Degranulation of Gelatinase B	$\leq 6\%$	No effect
Superoxide production	$\leq 6\%$	No effect

ついて検討を加えた¹⁹⁾。

この検討においては、リポソームの構成成分としてDPPGを含有するHbVを用いた。fMLP刺激による好中球の機能評価として、(1) 好中球の走化能、(2) β_2 インテグリンであるCD11bの膜発現、(3) 脱顆粒にともなうgelatinase B (matrix metalloproteinase-9) の放出、(4) 活性酸素の産生をとりあげた。Table 2にこれらの結果を示した。

走化性 (ケモタキシス) は、細胞が化学物質の濃度勾配に従い、一定の方向に運動性を示すことであり、ヒト単離好中球を異なる濃度 (最大0.6%) のHbVと37℃にて30分間予めインキュベーション (プレインキュベーション) 後、ケモタキシス・チャンパー法によって評価をおこなった。fMLP (1 μ M) 刺激によって好中球の走化能が活性化されたが、これに対するHbVの影響はみとめられなかった。CD11bはCD18と二量体を形成して好中球の遊走能における接着因子Mac-1として機能する分子であるが、HbVとプレインキュベーションさせた好中球において、fMLP刺激によるCD11bの発現亢進は、HbVを作用させなかった好中球の場合と同等であった。gelatinase Bは、好中球の組織浸潤に関与する酵素であるが、fMLP刺激による好中球からの放出の経時変化をHbVとのプレインキュベーションの有無で比較したが、両者には違いはみとめられなかった。また好中球の殺菌能に関与する活性酸素産生についても、HbVとプレインキュベーションした好中球からのfMLPによる産生量は、HbVを作用させなかった好中球の場合と同等であった。以上の結果より、fMLP刺激によって発揮される好中球の少なくとも4つの機能において、用いたHbVの濃度ではなんら影響はみられず、HbVの好中球への高い適合性が示唆された。

PEG-DSPE修飾したリポソームがfMLP刺激による好中球の走化能活性化を阻害するという報告¹⁷⁾を上述したが、リン脂質濃度にして大過剰の濃度を用いたにもかかわらず、HbVでは阻害がみられないことの原因は不明である。リポソームの構成成分であるリン脂質の種類、脂肪酸の飽和度の程度、脂肪酸の側鎖の数が、fMLPやザイモザンによる好中球の走化能に影響することが報告されている²⁰⁾。前述のPEG-DSPE修飾したリポソームとHbVとの間では、これらのパラメーターを始め、PEG-DSPEとリポソームのモル比が異なっており、これらの違いが異なる結果を得た理由となっている可能性が考えられる。

以上, HbV の好中球への高い適合性が示されたが, より高濃度即ち臨床で用いられる 20 % および 40 % での検討をみる必要性は残されている。

3. ヘモグロビン小胞体の造血前駆細胞に対する影響

血管内投与したりポソーム製剤は, 漸次, 肝臓のクーパー細胞, 脾臓および骨髄のマクロファージなどの細網内皮系において捕捉される²¹⁾。HbV においても, アイソトープラベルを用いた追跡によって組織分布が詳細に検討され, 肝臓, 脾臓, 骨髄に主として分布していることが示されている²²⁾。他の組織学的検討においても, HbV は細網内皮系において捕捉されることが報告されている²³⁾。骨髄に HbV が移行することから, 骨髄を主たる場とする造血に対し少なからず影響するのではないかと考えられた。40 % 脱血し HbV を輸血したラットさらにビーグル犬の場合, 脱血による赤血球造血の亢進によってヘマトクリットは 1 週間以内には回復し, 特に造血系への影響は認められていない^{24, 25)}。さらに, 20 % の HbV を toload させたラットの場合においても, 末梢血の血球数は投与後 1 週間観察しても一定に保たれていた²⁶⁾。とはいえヒトへの投与を考えた場合, その造血前駆細胞の増殖・分化への影響について, *in vitro* の系において検討する必要があると考えられ検討をおこなった²⁷⁾。

造血の *in vitro* のアッセイ系としては, コロニー形成細胞の数を評価するコロニーアッセイと造血前駆細胞の増殖の度合いを評価する液体培養系を用いた。そして臍帯血から分離した CD34 陽性細胞を含む単核球を, 造血を支持する各種サイトカインを添加したメチルセルロースからなる半固形培地に播種し, 一定期間培養後に形成したコロニーの数をカウントした。赤芽球バーストとよばれる BFU-E (Burst forming unit of erythrocyte), 顆粒球・マクロファージ系コロニーとよばれる CFU-GM (Colony forming unit of granulocyte and macrophage), 両者が混在した CFU-mix, これらのコロニーの総数である Colony-forming cells (CFC) は培養 2 週間後に, 増殖能が高くコロニーのサイズが 1 mm 以上になったものを HPP-CFC (High proliferative potential-colony forming cell) と定義し, 培養 4 週間後にそれぞれカウントした。用いた HbV は PEG 修飾された DHSg を構成成分とする HbV で, その濃度は最大 3 % と設定した²⁷⁾。

コロニーアッセイの培地に HbV を添加し, 14 日間共存させると, それぞれのコロニーの数およびサイズが HbV の濃度に依存して減少する傾向がみられた。さらに 14 日間 HbV と共存後にコロニー数を測定する HPP-CFC の数は著しく減少した (Fig. 1A)。一方, HbV に CD34 陽性細胞を含む単核球を 20 時間だけ曝してコロニーアッセイした場合は, HPP-CFC の数に影響はなく, 3 日間曝した場合でも, HPP-CFC の数の減少の程度は少なかった (Fig. 1B)。次に液体培地に血清と造血支持サイトカインを添加して, 赤芽球系または顆粒球系の細胞へと増殖させる系に HbV を添加させ影響を評価した。10 日間の培養期間, HbV が継続して存在する場合には赤芽球系または顆粒球系への細胞の増殖が抑制された。これに対し, コロニーア

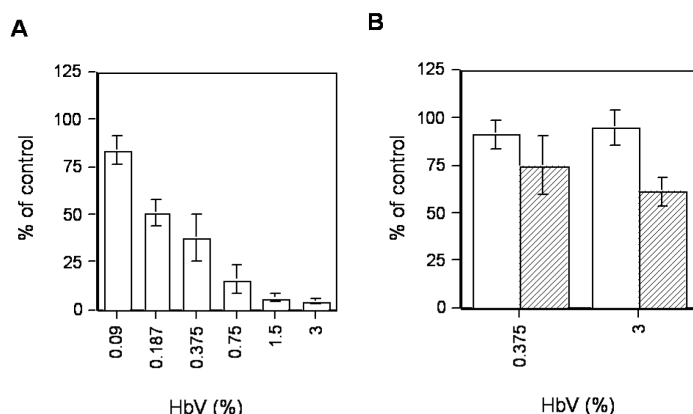


Fig. 1. Effects of HbVs on the formation of high proliferative potential colony forming cells (HPP-CFC) in the clonogenic assay of cord blood-derived hematopoietic cells. Cord blood-derived mononuclear cells were seeded at 300 at CD34⁺ cells per dish in complete methylcellulose medium for human clonal culture assays. HPP-CFC was scored after 28 days incubation. (A) HbVs (0 to 3%) were added to the cells until the end of culture. (B) Cord blood-derived mononuclear cells were incubated for 20 h (open column) or for 3 days (slashed column) with different concentrations of HbVs in IMDM containing FCS, BSA, and cytokines. Subsequently, they were recovered, washed to remove the HbVs, and subjected to the clonal assay. Data are expressed as the mean $\pm$ SD of the percentage of control (HbV 0%) performed on three separate cord blood donors in (A) and (B).

ッセイの場合と同様に, HbV に 20 時間または 3 日間曝しただけの場合は, 赤芽球系または顆粒球系への細胞の増殖は影響されなかった (Table 3)。

以上 HbV は, *in vitro* の閉鎖系において, 長期間にわたり共存することにより造血前駆細胞の活性を阻害するという結果が, 2 つの評価系から明らかとなった。しかしながら, 動物モデルで HbV を投与した場合, 骨髄において 1-3 日に HbV の蓄積が認められ, 以後 1 週間では激減することが報告されている²⁴⁾。

Table 3. Effect of DHSg-HbV on the proliferation of erythroid and myeloid lineage cells in liquid culture.

Exposure period to HbV	CD235a ⁺ cells			CD15 ⁺ cells		
	0.75	HbV conc.(%) 1.5	3.0	0.75	HbV conc.(%) 1.5	3.0
20h	93.7 $\pm$ 10.0	94.9 $\pm$ 1.2	92.2 $\pm$ 8.8	100.8 $\pm$ 14.3	96.3 $\pm$ 7.9	96.6 $\pm$ 13.3
3 days	85.2 $\pm$ 22.3	92.6 $\pm$ 11.5	89.0 $\pm$ 14.5	92.9 $\pm$ 6.1	95.8 $\pm$ 5.4	91.7 $\pm$ 4.7
10 days	47.5 $\pm$ 16.6**	46.6 $\pm$ 18.2**	27.3 $\pm$ 23.4**	65.2 $\pm$ 20.3*	55.2 $\pm$ 18.6*	37.2 $\pm$ 22.8*

Various concentrations of HbVs were added to the medium containing the cord blood-derived CD34⁺ cells. After 10 days' incubation, CD235a⁺ cells for erythroid lineage and CD15⁺ cells for myeloid lineage, respectively, were analyzed by flow cytometry. The number of CD235a⁺ cells or CD15⁺ cells at each concentration of DHSg-HbV is expressed as a percentage of the number in the control (HbV 0%). Data are represented as the mean $\pm$ SD from three experiments performed on three separate cord blood donors. *p < 0.05, **p < 0.01 versus HbV (0%).

よって、2週間連続してHbVに造血幹・前駆細胞が曝されるという状況はヒトの臨床例では想定できないし、むしろ1-3日間曝されるというのが想定できる期間である。さらにin vivoでは、HbVはマクロファージ内に蓄積しており、in vitroのようにHbVと造血幹・前駆細胞が直接相互作用をすることは極めて少ないと考えられる。従って造血幹・前駆細胞が直接1-3日間HbVに暴露される場合において、造血前駆細胞の活性に大きな影響がなかったという結果は、HbVをヒトに投与した場合、造血に大きな悪影響を及ぼす可能性が極めて少ないことを支持するものと捉えることができる。

国外では、ヘモグロビンを基盤とし化学修飾させたセルフリー型の人工酸素運搬体の開発が進められている。これらの修飾ヘモグロビンや分子内架橋を行ったヘモグロビンは、我々と同じようにヒト臍帯血から調製したCD34陽性細胞を用いた液体培養系において、赤芽球前駆細胞の増殖の亢進を促すと報告されている²⁸⁾。また、AIDSの治療に用いられる薬剤3'-azido-2'-deoxythymidine (AZT)による造血抑制を、ヘモグロビンおよび化学修飾ヘモグロビンがin vitro, in vivoの両方で回復させる(但し赤血球造血に特異的)ことが示され^{29,30)}、これらの赤血球造血作用は酸素運搬能以外の付加価値と位置付けられている。修飾ヘモグロビンのこれらのin vitroでの作用は、赤芽球系前駆細胞が修飾ヘモグロビンを取り込み、赤血球造血作用のあるhemeに分解するためと推測されている²⁹⁾。HbVの場合は、赤芽球系前駆細胞を含めて造血前駆細胞の増殖亢進作用はみられず、逆に長期間では抑制する結果となったが、その機序は現時点では明らかでない。少なくとも赤芽球系前駆細胞は、HbVを修飾ヘモグロビンのようには容易には取り込まないと考えられる。

4. ヘモグロビン小胞体の補体系、凝固系、カリクレイン-キニン系に対する影響

リポソームは細胞膜と同様リン脂質を構成成分としているが、生体にとっては異物であり、血液細胞のみならず血漿タンパク質と相互作用する³¹⁾。この作用は、リポソームの大きさ、荷電、構成脂質、さらにリポソーム自体への化学修飾により異なってくる。リポソームの中で陰性荷電のものは、ラット、モルモット、そしてヒトの補体を活性化することが広く知られている³²⁻³⁴⁾。その結果、オプソニン化したリポソームは、細網内皮系により循環血液中から速やかに排除される。また陰性荷電リポソームは凝固系第7因子を活性化させ、内因系の凝固カスケードならびにカリクレイン・キニン系活性のトリガーとなる^{35,36)}。リポソームの構成成分のコレステロール含量も補体の活性化に影響することが知られ、この活性化は血液中の自然抗体によると考えられている^{34,37,38)}。これまで述べてきたリポソーム包埋型ヘモグロビンにおいても、ヒトの血液中の脂質に対する自然抗体によって、古典経路と第二経路の両方を介して補体の活性化が惹起される³⁹⁾。さらに、ブタモデル実験においては、ある種のリポソームによって偽アレルギー反応が起こり、補体活性化との関連が考えられている⁴⁰⁻⁴²⁾。一方、リポソーム

をPEG修飾することで、これらの反応を防ぐことができることが報告されている⁴³⁻⁴⁵⁾。しかしながら、リポソーム包埋型ヘモグロビンのみならず抗ガン剤doxorubicinを封入したPEG修飾リポソームDoxil/Caelyxにおいても、顔面紅潮、呼吸困難、紅斑、胸痛、背面痛、血圧低下または血圧上昇が報告されている⁴⁶⁻⁴⁸⁾。またこれらの症状はdoxorubicin自体では起こらないため、リポソームによるものと考えられている⁴⁹⁾。したがってHbVの生体適合性を評価するうえで、ヒトの補体系、凝固系、カリクレイン-キニン系に対する影響を検討することの意義は大きいと考えられた。

この検討においては、DHSGをそのリポソーム構成成分としPEG修飾された現行のHbV (DHSG-HbV)、DPPGを構成成分としPEG修飾されたHbV (DPPG-HbV)、DPPGを構成成分とするがPEG未修飾のHbV (DPPG-HbV (no PEG))、強陰性荷電PEG未修飾リポソーム (EL-A)を用いた⁵⁰⁾。なお、EL-Aの脂質構成はDPPC:CHOL:DPPG (30:40:30) (mol%)からなり、その生理食塩水でのゼータ電位は-47.2mVであった⁵⁰⁾。

HbVを健常人ヒト血清と20%あるいは40%で混合し、37℃にて24時間インキュベーション後、遠心により各種HbVを除去し、その上清の補体価 (CH50)を測定した。Table 4に示すように、DHSG-HbVを混合することによって血清が希釈されるためCH50は低下した。強陰性荷電PEG未修飾リポソーム (EL-A)を添加した群では著しいCH50の低下がみられるのに対し、DHSG-HbVを20%あるいは40%で添加した群では、それぞれ生食を添加した場合のCH50より減少することにはなかった。さらに3種のHbVで比較してみると (Table 5)、DHSG-HbVとDPPG-HbVは、補体消費を起こさなかったのに対し、DPPG-HbV (no PEG)は40%の添加によってほぼ完全に補体が消費された。以上の結果から、現行のDHSG-HbVおよびPEG修飾されたDPPG-HbVは、ヒト血清補体系を活性化しないと考えられた。

Table 4. Consumption of complement by HbV and Liposome.

Additive	CH50 (U/mL)	
	(additive:serum)	
	20:80	40:60
Saline	33.4 ± 2.8	21.4 ± 1.7
DHSG-HbV	33.5 ± 2.9	22.9 ± 2.4
EL-A	25.1 ± 2.7*	5.9 ± 0.7*

The complement titer (CH50) was measured using a 50% hemolysis assay with a commercial kit. DHSG-HbV, saline or Coatsome EL-A (a negative-charged liposome) were mixed with serum as indicated ratio (v/v) at 37°C for 24 hr. The lipid composition (mol%) of Coatsome EL-A was DPPC:CHOL:DPPG=30:40:30. Data are represented as the mean ± SD using serum from five individuals. The CH50 of 100% serum was 38 ± 3.2 U/mL. *p < 0.05 vs. saline.

Table 5. Consumption of complement by various types of HbV.

Additive	CH50 (U/mL)	
	(additive:serum)	
	20:80	40:60
Saline	36.4	27.9
DHSG-HbV	37.6	31.4
DPPG-HbV	35.9	28.4
DPPG-HbV(no PEG)	29.9	Under detection limit

The complement titer (CH50) was measured using a 50% hemolysis assay with a commercial kit. DHSG-HbV, DPPG-HbV, DPPG-HbV (no PEGylation) or saline were mixed with serum as indicated ratio (V/V) at 37°C for 24 hr. The CH50 of 100% serum was 45.1 U/mL.

次に凝固系に及ぼす影響をこれら3種のリポソーム構成成分の異なるHbVを用い、プロトロンビン時間(PT)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)について比較した。PTは健常人ヒト血漿との混合比率が上昇するにつれて凝固時間が遅延した。血漿に対し生食の比が20%および60%においては、これら3種のHbVはいずれも生食添加の場合のPT時間を有意に短縮させたが、その差は1秒以内であった。APTT時間に対し、DPPG-HbVとDPPG-HbV (no PEG)は、生食添加の場合のAPPT時間を2秒以内ではあるが有意に短縮させたのに対し、DHSG-HbVはどの血漿比率の場合においても生食の場合と差はみられなかった。

カリクレイン-キニン系に対する影響は、血漿にそれぞれこれら3種のHbVまたは生食を添加し、37°Cにて24時間インキュベーション後、血漿中高分子キノーゲンの分解による低分子化された高分子キノーゲンの出現をイムノブロッティング法にて検出した。血漿に対し40%あるいは60%にてDPPG-HbVまたはDPPG-HbV (no PEG)を添加させた場合、intactな高分子キノーゲンが減少し、低分子化された高分子キノーゲンの増加が顕著に観察される。これに対して、DHSG-HbVではいずれの血漿比率の場合においても生食の場合と差はみられず、DHSG-HbVは血漿中高分子キノーゲンの分解を引き起こさないことが示された (Fig. 2)。

以上の検討から、陰性荷電のDPPGを構成成分とするHbVではPEG修飾がなければ補体の活性化が惹起されるのに対し、PEG修飾することで補体の活性化が抑えられることが明らかとなった。生理食塩水中でゼータ電位を測定するとDPPG-HbV (no PEG)が-14.5 mV、DPPG-HbVが-3.4 mVであり⁵⁰⁾、表面荷電の影響を裏付けていた。しかしながら、ここに示したごとくDPPG-HbVでは、わずかではあるが、凝固時間、特にAPTT時間の短縮およびカリクレイン-キニン系の活性化を引き起こした。これに対し、DHSG-HbVは、補体系、APPT時間、カリクレイン-キニン系のいずれに対しても影響が無いことが示された。DHSG-HbVのゼータ電位は-2.6 mVでDPPG-

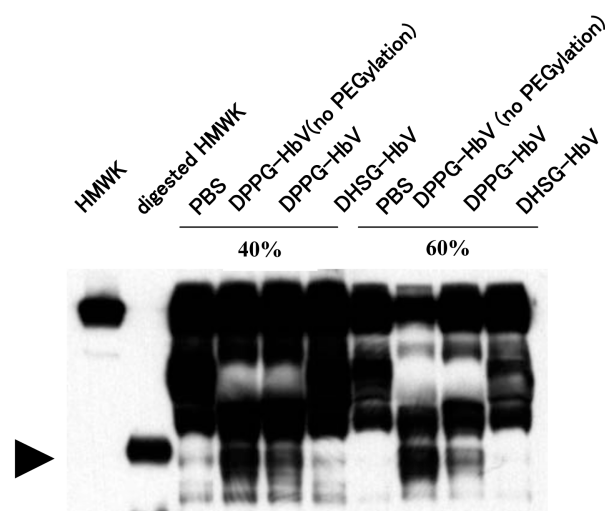


Fig. 2. Activation of kallikrein-kinin cascade by HbVs. HbVs or saline were mixed with plasma at 40% or 60% at 37°C for 24 h. Appearance of digested S-HMWK was detected using western blot analysis as a result of kallikrein activation. Arrowhead (▶) indicates digested S-HMWK.

HbVのそれとほとんど変わらないことから、単に表面荷電だけでなく、構成脂質の親水性頭部 (hydrophilic head group) が作用の有無に影響を及ぼすものと考えられる。

いずれにしても、今後の臨床試験に用いられる現行のHbVは、血漿中の補体系に影響を及ぼさないということから、“補体活性化関連偽アレルギー反応”と呼ばれるリポソーム投与直後の心血管系の急性副作用⁵¹⁾に対する懸念はほとんど無いと推測される。加えて、凝固系やカリクレイン-キニン系への影響も無いことは、ヒト血漿タンパクへの高い適合性を示している。

第1章の血小板に対するHbVの影響に関して、げっ歯類においては血小板上に補体成分C3bが結合するCR1レセプターを有しているが、ヒトを含む霊長類では有さないことを上述した。これに対し、ヒトを含む霊長類では赤血球がCR1レセプターを有しているため、補体活性化に伴って免疫複合体の赤血球への結合が報告されている⁵²⁾。そのため、補体活性化を惹起する化合物および医薬品のヒト血液を対象としたin vitroにおける適合試験や臨床試験においては、赤血球も相互作用する可能性のある血液構成成分の一つとして重要であり、そのため、赤血球をモニターする意義や結果の解釈にも影響する可能性を考慮しておく必要がある。しかしながら、少なくとも今後の臨床試験に用いられる現行のHbVは、in vitroの評価試験において血漿中の補体系に影響を及ぼさないため、補体成分を介してHbVが赤血球と結合する可能性は少ないと推測される。

おわりに

HbVが臨床応用に向けて、前臨床試験でその有効性、安全性について検討しなければならない事項の中に、免疫系および血液構成成分に対する影響があげられている。ヒト血液細胞およびヒト血漿タンパク系を用いた評価により、止血また炎症反

応にも関与する血小板に対し、HbV 自体による活性化作用はみられないこと、またアゴニストによる活性化を亢進するような作用はないことが示された。自然免疫に重要な働きをする好中球の機能（走化能、脱顆粒、活性酸素産生）にも影響を与えなかった。造血機能への影響としては、短期間であれば造血前駆細胞活性を損なうことはないことが示された。またリポソームの特性から補体の活性化が懸念されたが、現行のHbVでは活性化はみられず、また、凝固系、カリクレイン・キニン系にも影響はみられなかった。しかしながらin vitroでは評価できない抗体産生、投与後の補体価の変動、リンパ球の抗原刺激による増殖反応等については現在ラットを用いて検討をおこなっている。本稿にては詳細は割愛したが、それらの影響は、投与直後に一過性の抑制がみられるものの1週間では回復することをみだしている^{26,53)}。以上のことから、免疫系、および血液構成成分に対してHbVが高い適合性を持つことを示すことができた。

最近、Natansonら⁵⁴⁾は、ヘモグロビンを基盤とする非セル型の人工酸素運搬体を対象とした無作為化された前臨床試験および臨床試験の中から、一定の基準を満たした16トライアルにおいて、死亡のリスクが30%増、心筋梗塞のリスクが2.7倍増加しているというメタ解析の結果を報告した。この報告に伴って、ヘモグロビンを基盤とする非セル型の人工酸素運搬体の安全性を見直し、リスクの増加の原因を明らかにすべきとの指摘がなされている⁵⁵⁾。このような状況下にあって、我が国だけが開発を進めているセル型の人工酸素運搬体の一つであるHbVに、大きな期待がよせられる。

謝辞

本研究は、厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）「酸素運搬能を有する人工赤血球の創製とその評価に関する研究（平成9年～11年）」「臨床応用可能な人工赤血球の創製に関する研究（平成12年～14年）」、厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）「人工赤血球の安全性向上に関する研究（平成15年～17年）」、「人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究（平成18年～20年）」によって行われた。記して謝意を表する。

参考文献

1. Sakai H, Sou K, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Haemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers: present situation and future visions. *J Intern Med* 2008;263:4-15.
2. 高折益彦: 人工血液としての条件. *人工血液* 2002;10:28-35.
3. Rabinovici R, Rudolph AS, Feuerstein G: Characterization of hemodynamic, hematologic, and biochemical responses to administration of liposome-encapsulated hemoglobin in the conscious, freely moving rat. *Circ Shock* 1989;29:115-32.
4. Rabinovici R, Rudolph AS, Yue T, Feuerstein G: Biological responses to administration of liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) are improved by a PAF antagonist.

- Circ Shock* 1990;31:431-5.
5. Phillips WT, Klipper R, Fresne D, Rudolph AS, Javors M, Goins B: Platelet reactivity with liposome-encapsulated hemoglobin in the rat. *Exp Hematol* 1997;25:1347-56.
6. Reinish LW, Bally MB, Loughrey HC, Cullis PR: Interactions of liposomes and platelets. *Thromb Haemost* 1988;60:518-523.
7. Doerschuk CM, Gie RP, Bally MB, Cullis PR, Reinish L: Platelet distribution in rabbits following infusion of liposomes. *Thromb Haemost* 1989;61:392-6.
8. Loughrey HC, Bally MB, Reinish LW, Cullis PR: The binding of phosphatidylglycerol (PG) liposomes to rat platelets is mediated by complement. *Thromb Haemost* 1990;64:172-6.
9. Klinger MHF: Platelets and inflammation. *Anat Embryol* 1997;196:1-11.
10. Gawaz M, Langer H, May AE: Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 2005;115:3378-84.
11. Wakamoto S, Fujihara M, Abe H, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Ikeda H, Ikebuchi K: Effects of poly (ethyleneglycol)-modified hemoglobin vesicles on agonist-induced platelet aggregation and RANTES release in vitro. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2001;29:191-201.
12. Baggiolini M, Dahinden CA: CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol Today* 1994;15:127-33.
13. Wakamoto S, Fujihara M, Abe H, Yamaguchi M, Azuma H, Ikeda H, Takeoka S, Tsuchida E: Effects of hemoglobin vesicles on resting and agonist-stimulated human platelets in vitro. *Artif Cells Blood Substit Biotechnol* 2005;33:101-11.
14. Hagberg IA, Lyberg T: Evaluation of circulating platelet-leukocyte conjugates: a sensitive flow cytometric assay well suited for clinical studies. *Platelets* 2000;11:151-60.
15. 幸村 近, 林 由紀子, 池田久實: フローサイトメトリーを用いた活性化血小板の検出法. *臨床病理* 1999;47:447-52.
16. Hynes RO: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25.
17. Hatipoglu U, Gao XP, Verral S, Sejourne F, Pitrak D, Alkan-Onyuksel H, Rubinstein I: Sterically stabilized phospholipids attenuate human neutrophils chemotaxis in vitro. *Life Sci* 1998; 63:693-9.
18. Bellemare F, Israel-Assayag E, Cormier Y: PC:PS liposomes induce a recruitment of neutrophils and the release of TNF alpha in the lungs of mice sensitized with *Saccaropolyspora rectivirgula*. *Eur J Clin Invest* 1995;25:340-5.
19. Ito T, Fujihara M, Abe H, Yamaguchi M, Wakamoto S, Takeoka S, Sakai H, Tsuchida E, Ikeda H, Ikebuchi K: Effects of poly (ethyleneglycol)-modified hemoglobin

- vesicles on N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced responses of polymorphonuclear neutrophils in vitro. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2001;29:427-37.
20. Galdiero F, Carratelli CR, Bentivoglio C, Capasso C, Cioffi S, Folgore A, Gorga F, Ianniello R, Mattera S, Nuzzo I, Rizzo A, Tufano MA: Correlation between modification of membrane phospholipids and some biological activity of lymphocytes, neutrophils and macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1991;13:623-42.
 21. Torchilin VP: Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:145-60.
 22. Sou K, Klipper R, Goins B, Tsuchida E, Phillips WT: Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:702-9.
 23. Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, Ikeda E, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E: Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: Influence on phagocytic and histopathological changes in reticuloendothelial system. *Am J Pathol* 2001;159:1079-88.
 24. Sakai H, Horinouchi H, Yamamoto M, Ikeda E, Takeoka S, Takaori M, Tsuchida E, Kobayashi K: Acute 40 percent exchange-transfusion with hemoglobin-vesicles (HbV) suspended in recombinant human serum albumin solution: degradation of HbV and erythropoiesis in a rat spleen for 2 weeks. *Transfusion* 2006;46:339-47.
 25. Ikeda T, Horinouchi H, Kohno M, Izumi Y, Watanabe M, Sakai H, Sou K, Tsuchida E, Kobayashi K: Resuscitation effect and long term effect of Hb vesicles on organ function in beagle dog. *Artif Cells Blood Substitutes Biotechnol* 2008;36:214.
 26. Abe H, Azuma H, Yamaguchi M, Fujihara M, Ikeda H, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E: Effects of hemoglobin vesicles, a liposomal artificial oxygen carrier, on hematological responses, complement and anaphylactic reactions in rats. *Artif Cells Blood Substit Biotechnol* 2007;35:157-72.
 27. Yamaguchi M, Fujihara M, Wakamoto S, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Azuma H, Ikeda H: Influence of hemoglobin vesicles, cellular-type artificial oxygen carriers, on human umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells in vitro. *J Biomed Mater Res A* 2008. (in press)
 28. Bell D, Mueller SG: Enhanced stimulation of erythropoiesis. Patent EP099644, 2004.
 29. Fowler DA, Rosenthal GJ, Sommadossi JP: Effect of recombinant human hemoglobin on human bone marrow progenitor cells: protection and reversal of 3'-azido-3'-deoxythymidine-induced toxicity. *Toxicology Letters* 1996;85:55-62.
 30. Moqattash S, Lutton JD, Rosenthal G, Abu-Hijleh MF, Abraham NG: Effect of blood substitute, recombinant hematology, on in vivo hematopoietic recovery from AZT toxicity. *Acta Haematol* 1997;98:76-82.
 31. 阿部秀樹, 藤原満博, 東 寛, 池田久實. リポソームと補体. *人工血液* 2003;11:151-9.
 32. Chonn A, Cullis PR, Devine DV: The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *J Immunol* 1991;146:4234-41.
 33. Cunningham CM, Kingzette M, Richards RL, Alving CR, Lint TF, Gewurz H: Activation of human complement by liposomes: a model for membrane activation of the alternative pathway. *J Immunol* 1979;122:1237-42.
 34. Devine DV, Wong K, Serrano K, Chonn A, Cullis PR: Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. *Biochim Biophys Acta* 1994;1191:43-51.
 35. Griep MA, Fujikawa K, Nelsestuen GL: Binding and activation properties of human factor XII, prekallikrein, and derived peptides with acidic lipid vesicles. *Biochemistry* 1985;24:4124-30.
 36. Mitropoulos KA, Martin JC, Reeves BE, Esnouf MP: The activation of the contact phase of coagulation by physiologic surfaces in plasma: the effect of large negatively charged liposomal vesicles. *Blood* 1989;73:1525-33.
 37. Alving CR, Richards RL, Guirguis AA: Cholesterol-dependent human complement activation resulting in damage to liposomal model membranes. *J Immunol* 1977;118:342-7.
 38. Alving CR: Natural antibodies against phospholipids and liposomes in humans. *Biochem Soc Trans* 1984;12:342-4.
 39. Szebeni J, Wassef NM, Rudolph AS, Alving CR: Complement activation in human serum by liposome-encapsulated hemoglobin: the role of natural anti-phospholipid antibodies. *Biochim Biophys Acta* 1996;1285:127-30.
 40. Bradley AJ, Devine DV, Ansell SM, Janzen J, Brooks DE: Inhibition of liposome-induced complement activation by incorporated poly (ethylene glycol)-lipids. *Arch Biochem Biophys* 1998;357:185-94.
 41. Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L: Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* 1990;268:235-7.
 42. Woodle MC, Matthey KK, Newman MS, Hidayat JE,

- Collins LR, Redemann C, Martin FJ, Papahadjopoulos D: Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1992;1105:193-200.
43. Laverman P, Boerman OC, Oyen WJG, Corstens FHM, Storm G: In vivo applications of PEG liposomes: unexpected observations. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2001;18:551-66.
 44. Szebeni J, Baranyi L, Savay S, Bodo M, Morse DS, Basta M, Stahl GL, Bünger R, Alving CR. Liposome-induced pulmonary hypertension: properties and mechanism of a complement-mediated pseudoallergic reaction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H1319-28.
 45. Wassef NM, Johnson SH, Graeber GM, Swartz GM Jr, Schultz CL, Hailey JR, Johnson AJ, Taylor DG, Ridgway RL, Alving CR: Anaphylactoid reactions mediated by autoantibodies to cholesterol in miniature pigs. *J Immunol* 1989;143:2990-5.
 46. Uziely B, Jeffers S, Isacson R, Kutsch K, Wei-Tsao D, Yehoshua Z, Libson E, Muggia FM, Gabizon A. Liposomal doxorubicin: antitumor activity and unique toxicities during two complementary phase I studies. *J Clin Oncol* 1995;13:1777-85.
 47. Koukourakis MI, Koukouraki S, Giatromanolaki A, Archimandritis SC, Skarlatos J, Beroukas K, Bizakis JG, Retalis G, Karkavitsas N, Helidonis ES. Liposomal doxorubicin and conventionally fractionated radiotherapy in the treatment of locally advanced non-small-cell lung cancer and head and neck cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:3512-21.
 48. Lyass O, Uziely B, Ben-Yosef R, Tzemach D, Heshing NI, Lotem M, Brufman G, Gabizon A. Correlation of toxicity with pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in metastatic breast carcinoma. *Cancer* 2000;89:1037-47.
 49. Chanan-Khan A, Szebeni J, Savay S, Liebes L, Rafique NM, Alving CR, Muggia FM. Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions. *Ann Oncology* 2003; 14:1430-7.
 50. Abe H, Fujihara M, Azuma H, Ikeda H, Ikebuchi K, Takeoka S, Tsuchida E, Harashima H: Interaction of hemoglobin vesicles, a cellular-type artificial oxygen carrier, with human plasma: effects on coagulation, kallikrein-kinin, and complement systems. *Artif Cells Blood Substit Biotechnol* 2006;34:1-10.
 51. Szebeni J, Fontana JL, Wassef NM, Mongan PD, Morse DS, Dobbins DE, Stahl GL, Bünger R, Alving CR. Hemodynamic changes induced by liposomes and liposome-encapsulated hemoglobin in pigs. A model for pseudoallergic cardiopulmonary reactions to liposomes: role of complement and inhibition by soluble CR1 and anti-C5a antibody. *Circulation* 1999;99:2302-2309.
 52. Cornacoff JB, Hebert LA, Smead WL, VanAman ME, Birmingham DJ, Waxman FJ : Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. *J Clin Invest* 1983;71:236-47.
 53. 阿部秀樹, 山口美樹, 藤原満博, 酒井宏水, 武岡真司, 土田英俊, 東 寛, 池田久實 : ヘモグロビン小胞体 (HbV) 投与がラット免疫系に及ぼす影響. *人工血液* 2004;12:55.
 54. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe AM: Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *JAMA* 2008; 299:304-12.
 55. Fergusson DA, McIntyre L: The future of clinical trials evaluating blood substitutes. *JAMA* 2008;99:2324-6.

日本血液代替物学会 総会

1. 日 時 : 平成20年10月23日 (木) 16:30~17:00
2. 場 所 : 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂
〒108-8582 東京都新宿区信濃町35
3. 議 題 :
報告事項 ① 第15回年次大会の報告
② 会員動向
③ 委員会報告
④ 平成19年度事業報告
⑤ 平成19年度収支決算
⑥ 平成20年度事業 (実績報告)

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15回日本血液代替物学会年次大会
- 2) 平成20年10月23日 (木)
- 3) 東京都新宿区信濃町35慶應義塾大学信濃町キャンパス 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：4社
- 2) 賛助会員：4社
- 3) 正会員：141名
- 4) 購読会員：20箇所
- 5) 学生会員：1名

③各種委員会からの報告は以下のとおり。

＊編集委員会
会誌「人工血液」の発行。
・平成19年度：第14巻4号、第15巻1号、2号発行。
・平成20年度：第15巻3-4号、第16巻1号、2号発行。第16巻3号、4号発行予定。
＊ホームページ委員会
学会ホームページURL： <http://www.blood-sub.jp/>
会員向け論文データベースの稼働開始。

④平成19年度事業報告 (平成19年4月1日～平成20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19年6月15日 (金) 慶應義塾大学三田キャンパス 北館にて開催。

- 2) 第14回年次大会 (大会長 半田 誠)
平成19年6月14日 (木)、15日 (金)
慶應義塾大学三田キャンパス北館で行われた。
- 3) 「人工血液をつくる (8)」後援

⑤平成19年度収支決算報告が行われ承認された。

平成19年度 会計 収支決算表
(自 平成19年4月1日 至 平成20年3月31日)

収 入		支 出	
摘 要	金 額	摘 要	金 額
前 期 繰 越 金	18,302,866	会 誌 出 版 費	1,642,085
正 会 員 会 費	530,000	集会・委員会費	603,945
入 会 金	20,000	年 会 補 助 金	2,000,420
賛 助 会 員 会 費	800,000	ホームページ維持費	2,000,460
維持会員会費	8,000,000	事 務 人 件 費	5,830,460
購読会員会費	36,000	事 務 費	363,085
雑 収 入	105,240	人工血液をつくる(8)開催費助成	252,410
利 息	47,191	基金に繰り入れ	2,500,000
		次 期 繰 越 金	12,648,432
計	27,841,297	計	27,841,297

⑥平成20年度事業 (実績報告)

- 1) 定期総会の開催
平成20年10月23日 (木) 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂。
- 2) 第15回年次大会の開催 (大会長 堀之内 宏久)
平成20年10月23日 (木)
於 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂
- 3) 「人工血液」の発行
- 4) 「人工血液をつくる (9)」後援予定

現行役員は次頁の通り。

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	土田英俊	早稲田大学理工学術院 名誉教授
	高久史磨	自治医科大学 学長	西 勝英	肥後医育振興会 理事
	堀 原一	筑波大学 名誉教授	半田 誠	慶應義塾大学医学部 教授
	遠山 博	埼玉医科大学総合医療センター 名誉所長	平澤博之	千葉大学 名誉教授
会長	小林紘一	慶應義塾大学 名誉教授	堀之内宏久	慶應義塾大学医学部 准教授
副会長	池田康夫	慶應義塾大学医学部 教授	四津良平	慶應義塾大学医学部 教授
理事	池田久實	北海道赤十字血液センター 所長	監 事	清水 勝
	川村明夫	札幌北楡病院 会長		阿岸鉄三
	酒井宏水	早稲田大学理工学術院 准教授		西城病院 理事
	末松 誠	慶應義塾大学医学部 教授		板橋中央総合病院 血液浄化療法センター
	高折益彦	東宝塚さとう病院 名誉院長		ブラッドアクセス治療センター 所長
	武岡真司	早稲田大学理工学術院 教授	(事務局)	堀之内宏久
			(会誌担当)	酒井宏水
			(HP担当)	藤島清太郎
				慶應義塾大学医学部 講師

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	高久 史磨	自治医科大学 学長
阿岸 鉄三	ふれあい町田ホスピタル	高橋 晃	テルモ(株) 代表取締役社長
	血液浄化センター センター長	高橋 英嗣	山形大学医学部 准教授
浅野 茂隆	早稲田大学理工学部 教授	高橋 恒夫	東京大学医科学研究所 客員教授
東 寛	北海道赤十字血液センター	武岡 真司	早稲田大学理工学術院 教授
阿部喜代司	筑波大学 名誉教授	田所 憲治	日本赤十字社血液事業本部
池田 久實	北海道赤十字血液センター 所長	土田 英俊	早稲田大学理工学術院 名誉教授
池田 康夫	慶應義塾大学医学部 教授	遠山 博	埼玉医科大学総合医療センター 名誉所長
池淵 研二	埼玉医科大学 教授	友田 燐夫	東京医科大学 教授
石原 弘規	弘前大学医学部 准教授	豊田 忠之	東部地域病院 元院長
伊藤 俊之	京都赤十字血液センター	仲井 邦彦	東北大学医学部 准教授
稲田 英一	順天堂大学医学部 教授	中井 一士	血液製剤調査機構 元理事
大島 宣雄	筑波大学基礎医学系 名誉教授	長澤 俊郎	筑波大学臨床医学系 教授
大塚 節子	岐阜大学医学部 講師	中島 常隆	(株)ベネシス 経営戦略部 担当部長
大柳 治正	近畿大学医学部 教授	西 勝英	肥後医育振興会 理事
尾形 利郎	東海大学医学部 名誉教授	西出 宏之	早稲田大学理工学術院 教授
片岡 一則	東京大学大学院工学系研究科 教授	西谷 孝子	ナノキャリア株式会社
川村 明夫	北楡会札幌北楡病院 会長	半田 誠	慶應義塾大学医学部 教授
黒澤 良和	藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授	平澤 博之	千葉大学 名誉教授
小林 紘一	慶應義塾大学 名誉教授	福島 昭二	神戸学院大学薬学部製剤学 准教授
小室 勝利		藤井 寿一	東京女子医科大学 教授
斎藤 英彦	名古屋セントラル病院 院長	藤島清太郎	慶應義塾大学医学部 講師
酒井 清孝	早稲田大学理工学術院 教授	船津 昭信	(財)化学及血清療法研究所 理事長
酒井 宏水	早稲田大学理工学術院 准教授	外 須美夫	北里大学医学部 教授
佐久間一郎	カレスサッポロ北光記念クリニック 所長	堀 進悟	慶應義塾大学医学部 准教授
佐藤 誠	ニプロ(株) 医薬品研究所 所長	堀 原一	筑波大学 名誉教授
鮫島 達也	青山学院大学理工学部 名誉教授	堀之内宏久	慶應義塾大学医学部 准教授
清水 勝	西城病院 理事	宮尾 秀樹	埼玉医科大学総合医療センター 教授
清水 慶彦		宮崎 保	札幌通信病院 名誉院長
十字 猛夫	日本赤十字血液事業本部	村田 満	慶應義塾大学医学部 教授
	中央血液研究所 前所長	湯浅 晋治	順天堂大学 名誉教授
末松 誠	慶應義塾大学医学部 教授	四津 良平	慶應義塾大学医学部 教授
平 明	鹿児島大学医学部 名誉教授	米川 元樹	北楡会札幌北楡病院 理事長
高折 益彦	東宝塚さとう病院 名誉院長		

(ア順敬称略)

日本血液代替物学会 会則

第1章 総則

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

第2条：（事務局）本会の事務局は当分の間、会長の所属機関内に置く。

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

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

第4条：（事業）本会は前条の目的達成のため、次の事業を行う。

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

第2章 会員

第5条：（種別）本会会員は次の分類とする。

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

第6条：（会費）会員は、つぎの種別に従って会費を納めなければならない。

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

2. 既納の会費はいかなる理由があっても、これを返還しない。

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

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

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

第3章 役員、顧問、評議員および職員

第10条：（設置および定数）本会に次の役員を置く。

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

第11条：（役員の選任）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、確実な有価証券を購入するか、または定額郵便貯金とするか、もしくは確実な信託銀行に信託するか、あるいは定額預金として会長が保管する。

第37条：(寄付の受領) 寄付金品は、理事会の議決を経てこれを受領する。

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

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

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

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

第7章 会則の変更ならびに解散

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

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

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

第8章 補 則

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

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

●編集後記●

欧米で臨床試験が進んでいる修飾ヘモグロビンについては、様々な副作用が明らかになり、難しい局面を迎えていることは、第16巻1号でも紹介した。粒子径あるいは細胞型構造が重要であることを示唆していると考えられる。ところで、ミミズなどの無脊椎動物は赤血球を持っていないが、代わりにヘモグロビン自体が非常に大きく、メガダルトン級の分子量をもつ。サイズを大きくすることで血管外漏出を防いでいるのかもしれない。実は欧米には、ミミズやゴカイなど環形動物に分類される生物から抽出・精製した巨大ヘモグロビンをそのまま人工酸素運搬体として利用することを本気で考え、臨床試験を目指しているグループがある。米国のミミズは日本のミミズよりも大きいので、血液が沢山取れるらしい。一体どのように抽出しているのか疑問だが、知らない方が良いのかもしれない。さて、本号では三木先生ほかのマシコヒゲムシの巨大ヘモグロビンのX線結晶構造解析について話題提供を頂いた。三木先生はこれを人工酸素運搬体とするようなお考えは無いようである。しかし、人工酸素運搬体の研究者から見ると、とても興味深い物質である。巨大ヘモグロビンをそのまま用いないにしても、ヘム近傍の環境がヒトヘモグロビンと微妙に異なるので、新規な機能を有する変異ヘモグロビン設計のヒントになるかもしれない。

本号ではいわゆる細胞型の、ヘモグロビン小胞体、カプセル型ヘモグロビンに関する話題を三つ掲載することができた。須崎先生ほかのパルスオキシメータに関する原著論文では、ヘモグロビン小胞体の臨床応用における問題提起をしている。微粒子の投与によって、汎用臨床検査機器による計測が正確に行う事ができなくなる。因果関係がはっきりとしているので、技術的に克服はできると考えられる。あらゆる測定装置について、ヘモグロビン小胞体の干渉作用の有無を事前に知る必要があることを示唆している。水野先生ほかの体外循環時における充填液としての利用は、大動物モデル（ヤギ）を用い有用性が再確認出来た内容といえる。体外循環を要する胸部外科手術の間だけ酸素運搬機能があればよいので、血中滞留時間が短くても人工酸素運搬体の利点を最大限活かせる利用法と考えられる。藤原先生ほかの血液適合性に関する報告で重要なメッセージは、カプセル型としてヘモグロビンの副作用を低減させたとしても、カプセル基材の副作用の有無を十分に検討しなければならないことである。同じリポソームでも表面の状態によって生体反応が異なり、重要な知見である。日本発の物質系の臨床試験の開始が待たれる。

（酒井 宏水）

Call for Papers

***Artificial Blood*, the official bilingual journal of The Society of Blood Substitutes, Japan, welcomes papers and other articles contributing to the research and development of blood substitutes.**

If you wish to submit an article for publication, please email it to the following address after first confirming the instructions for authors.

kita@kenkousya.jp



Instructions for Authors (last revised Sept. 30, 2008)

The Journal's purpose is to publish research and related articles contributing to research on the development of blood substitutes, information on Society proceedings, regulations, and other matters of interest to the Society members, and it welcomes original articles from a range of contributors regardless of format. Although contributors should ideally be members of the Society, this is not a requirement. Decisions on acceptance of manuscripts are made by the Editorial Board based on the results of peer review. Original articles will not be accepted if they have been previously published or are being considered for publication in another journal.

If an article is coauthored, the consent of all coauthors is required before submission. As copyright to articles must be transferred to the Society, the representative of the author(s) must sign and seal a copy of the Copyright Transfer Agreement found in the Journal or downloadable from the Society's website (<http://www.blood-sub.jp/home/index.html>), and submit it to the Editorial Board by post, fax, or by email as a PDF file attachment.

Manuscripts should, as a rule, be prepared by word-processor. However, handwritten manuscripts may be accepted.

1) Articles should be categorized into one of the followings: original articles, review articles, conference reports, topical pieces, and opinion pieces. The category into which a manuscript falls should be clearly indicated at the top right-hand corner of the first page. Manuscripts that do not fall into any of these categories may also be accepted, and manuscripts may also be re-categorized depending on the opinion of the

reviewers. Submit your manuscripts to the Editor-in-Chief by either of the following methods with a covering letter (of any format):

i) Submission by email of electronic files of the text and figures (indicate the software used). Text and tables should be in DOC or TXT formats, and figures should be in PPT, JPG, or TIFF formats.

ii) Submission by post of four sets of hardcopies.

2) Manuscripts are reviewed by researchers in the field of artificial blood selected by the Editor-in-Chief, and revisions may be required depending on the opinion of the reviewers. Revised manuscripts should be submitted with a "Response to Reviewers" to the covering letter that responds to each of the points made by the reviewers, indicating any revisions made to the manuscript.

3) Once informed of the decision to accept for publication, the author should send by post files containing the text and figures of the accepted paper saved in electronic media to the address specified (indicate the software used). Text and tables should be in DOC or TXT format, and figures should be in PPT, JPG, or TIFF format.

4) Manuscripts should be typed on A4 or letter size paper. The title page should include the title, names of authors, institutions to which all the authors belong, and the address of the corresponding author. Handwritten manuscript should be written consisting of 20 lines to 1 page.

5) Original articles, review articles, topical pieces, and opinion pieces should include an abstract and about 6 keywords on the second or subsequent pages.

6) Research conducted with the aid of an official grant must be acknowledged, and any conflict of interests (for example, if the author has an interest in a company distributing the drug described in the manuscript: being an employee or consultant to that company, receiving research funding, owning shares or patents, and so on) must be described in a footnote on the first page or in acknowledgment section.

7) If a manuscript describes the results of research on humans or animals, it should be indicated that such research was performed in accordance with the guidelines of the institute concerned in the methods or other appropriate sections of the manuscript.

8) Abbreviations should be spelled out on their first appearance. The names of drugs, medical drugs, laboratory equipment, and so on should be given. The type, distributor (manufacturer) and the address should also be indicated.

Example: Rhodamine B (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) Polygraph system (LEG-1000; Nihon Kohden Corporation, Tokyo).

9) The English fonts should be Times, Helvetica, Courier, or Symbol. Text should be typed in lower-case one byte characters. However, sentences and proper nouns should begin with an upper-case letter.

10) Figures should be expressed in Arabic numerals. Weights and measurements should be expressed in units such as the followings: m, cm, mm, μ m, L, mL, μ L, mol, g, mg, μ g, ng, pg, fg, N/10.

11) Figures and tables should be numbered in order of citation, and it should be clearly indicated where they are to appear in the main text. The title, legends and description in tables and figures should be written in English. Figures will be printed by direct offset printing. Tables will be inputted by the Editorials as originals.

12) References should be cited numerically in order of appearance in the text using superscript letters as follows: ²⁾, ^{3,5)}, ^{1,4,6)}, etc. References should be listed using the Vancouver style as follows: Names of all authors. Title of paper. Title of journal. Year of publication; volume number: inclusive page numbers. Abbreviations of journal names should be in accordance with *Index Medicus*. References to books should be given as follows: Names of all authors. Title of paper. Name of editor(s). Book title. Place of publication: Publisher, year; inclusive page numbers.

References to electronic sources should be given as follows: Name of website.

Address on new line (month and year of last access).

Examples:

1. Wong NS, Chang TM. Polyhemoglobin-fibrinogen: a novel oxygen carrier with platelet-like properties in a hemodiluted setting. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007;35:481-489.
2. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *J Am Med Assoc* 2008;299:2304-2312.
3. Sakai H, Sou K, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin vesicles as a Molecular Assembly. Characteristics of Preparation Process and Performances of Artificial Oxygen Carriers. In: Winslow RM, ed. *Blood Substitutes*. London: Academic Press (Elsevier), 2006;514-522.
4. Oxygen Infusion Project, Waseda University, Japan.
<http://www.waseda.jp/prj-artifblood/index-ja.html> (last accessed Sept 2008)

13) In the case of citation or reproduction of previously published figures or tables and other content, the permission of the copyright holder(s) must first be obtained. Copyright in the published papers shall belong to the Society.

14) Regarding secondary use and copyright in works published in the Journal, secondary use may be made of the Journal, in whole or in part, via media such as CD-ROM or the Internet. Reproduction rights, translation rights, film rights, dominion, and public transmission rights (including the right to make the works transmittable) are transferred to the Society by the author's submission of the aforementioned Copyright Transfer Agreement. This clause shall not restrict reuse by the author himself/herself, but the Editor-in-Chief must be informed in the event of reuse.

15) No publication fee is charged for publication in the Journal, and the author(s) shall receive as a gift 30 offprints of their contributions. Authors will be charged for copies in excess of this number (approximately 100 yen per copy). Authors wanting prints of color photos or on art paper, etc. must pay the actual cost of such prints.

16) Address for manuscripts to be sent:
Attn: Hiromi Sakai (Editor-in-Chief)
Artificial Blood Editorial Office
The Society of Blood Substitutes, Japan
Oxygen Infusion Project
Bldg. #55S, Rm. 703
Research Institute for Science and Engineering
Waseda University
3-4-1 Okubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan

Tel: +81-3-5286-3122 Fax: +81-3-3205-4740
E-mail: kita@kenkousya.jp

投稿規定（平成20年9月30日改訂）

本誌は、血液を構成するあらゆる成分について、その代替物を開発する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、査読結果に従って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。

共著者がいる場合には、共著者全員の承諾を得てから投稿する。論文の著作権は本学会に譲渡しなければならない。このため、著者の代表者は、本誌に添付の著作権譲渡同意書（Copyright Transfer Agreement）或は、本会のホームページサイト（<http://www.blood-sub.jp/home/index.html>）からダウンロードしたものに署名捺印の上、郵送、Fax、またはpdfファイルとしてE-mailにて編集委員会宛に提出する。

ワープロを用いて作製した原稿の投稿を原則とする。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) 原稿の種類は、「原著論文」、「総説」、「学会報告」、「トピックス」、「オピニオン」、「海外文献紹介」から選び、これを第1頁の右肩上に明記すること。これらに該当しない原稿も受け付ける。査読意見によっては種類が変更される場合がある。次のいずれかの方法により、送付状（任意のフォーマット）を添えて編集委員長宛に投稿する。

i) 文章と図表の電子ファイルをEメールで送付する（使用したソフトを明記すること）。文章・表のファイル形式は、doc, txtが好ましい。図は、ppt, jpg, tiffが好ましい。

ii) ハードコピー4部を郵送する。

2) 投稿論文の査読は、編集委員長が選んだ人工血液分野の研究者に依頼する。査読意見によっては、原稿の修正を求める場合がある。修正論文（Revised Manuscript）の投稿に際しては、送付状に「査読意見に対する回答」を添え、意見に対して一つ一つ回答をするとともに、修正箇所がある場合にはこれを明記する。

3) 掲載決定通知の後、著者は採択論文の文章・図表のファイルを電子媒体として、指定する宛先に送付すること（使用したソフトを明記すること）。文章・表のファイル形式は、doc, txtが好ましい。図は、ppt, jpg, tiffが好ましい。

4) 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、英文著者所属、続いて連絡の取れる著者（corresponding author）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。

5) 「原著論文」、「総説」、「トピックス」、「オピニオン」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。

6) 投稿論文に記載の研究が公的助成を受けて実施された場合には、謝辞にその旨を記載すること。また、Conflict of Interests（例えば、論文に記載された薬品を販売する企業と著者との利害関係：雇用、コンサルタント、研究助成、株式、特許など）があれば、これを第1頁の脚注、謝辞などに記載すること。

7) ヒトを対象とした研究結果、および動物実験の結果を掲載する場合には、各研究機関のガイドラインに従って実施したことを方法等に明記すること。

8) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。薬品、医薬品、測定装置等は、外国語名の場合は言語のまま用い、日本語化しているものはカタカナとする。型式、販売（製造）元とその所在地も記入すること。

（例）Rhodamine B (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), ポリグラフシステム (LEG-1000; 日本光電工業, 東京)

9) 句読点はコンマ（,）ピリオド（.）とする。

10) 文中の英語に使用するフォントは、Times, Helvetica, Courier, Symbol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。

11) 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。

12) 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が好ましい。本文中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。

13) 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。電子文献の場合は、ホームページ名。改行してアドレス（引用した西暦年月）とする。

(例)

1. 高折益彦. 人工酸素運搬体: その将来への期待. 人工血液 2007;15:90-98.
2. 橋本正晴. 単回投与毒性試験. 野村 護, 堀井郁夫, 吉田武美 編. 非臨床試験マニュアル. 東京: エルアイシー, 2001;37-48.
3. Wong NS, Chang TM. Polyhemoglobin-fibrinogen: a novel oxygen carrier with platelet-like properties in a hemodiluted setting. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2007;35:481-489.
4. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. J Am Med Assoc 2008;299:2304-2312.
4. Sakai H, Sou K, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin vesicles as a Molecular Assembly. Characteristics of Preparation Process and Performances or Artificial Oxygen Carriers. In: Winslow RM, ed. Blood Substitutes. London: Academic Press (Elsevier), 2006;514-522.
5. 早稲田大学酸素輸液プロジェクト.
<http://www.waseda.jp/prj-artifblood/index-ja.html>
(2008年9月現在)

14) 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.

15) 二次掲載について. 本誌は, 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るが, 著者は以下の事項を遵守する.

- a) すでに掲載された論文であること.
- b) 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.

- c) 論旨を変えないこと. 執筆者は同一(順不同)であること.
- d) 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)として投稿する.

16) 本誌掲載著作物の二次利用および著作権について. 本誌の一部, もしくは全部をCD-ROM, インターネットなどのメディアに二次利用する場合がある. 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, 著者が上述の著作権譲渡同意書を提出することにより, 本学会に譲渡される. 本項は, 著作者自身の再利用を拘束するものではないが, 再利用する場合は, 編集委員長に通知すること.

17) 掲載料. 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.

18) 原稿の送付先

〒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 55号館S棟703室
酸素輸液プロジェクト内
日本血液代替物学会 会誌「人工血液」
編集部
酒井 宏水 宛

電話: 03-5286-3122, FAX: 03-3205-4740
E-mail: kita@kenkousya.jp

人工血液

日本血液代替物学会会誌

Artificial Blood

The Official Journal of The Society of Blood Substitutes, Japan

日本血液代替物学会

会長 小林 紘一 殿

To: Dr. Koichi Kobayashi

President

The Society of Blood Substitutes, Japan

日本血液代替物学会 会誌「人工血液」に投稿した論文

表題

Manuscript Title:

につきまして、倫理規定に準拠した内容であること、また、共著者の全員が内容を確認していることを誓約いたします。なお、掲載された論文の著作権は、貴学会に帰属することを認めます。

I attest that the content of the above manuscript, submitted for publication in *Artificial Blood*, the journal of the Society of Blood Substitutes, Japan, conforms to ethical standards and has been confirmed by all coauthors. We acknowledge that copyright will be held by the Society.

平成 年 月 日

Date:

代表著者（署名）

Corresponding Author (Signature) _____

連絡先

Contact Address:

（本用紙はコピーしたものを使用されても結構です。）

This form may be photocopied for use.

日本血液代替物学会 会誌「人工血液」編集部

〒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

55号館S棟703室 酸素輸液プロジェクト内

TEL : 03-5286-3122 FAX : 03-3205-4740 E-mail : hiromi@waseda.jp

Artificial Blood Editorial Office

The Society of Blood Substitutes, Japan

Oxygen Infusion Project Bldg. #55S-Rm. 703 Research Institute for Science and Engineering

Waseda University 3-4-1 Okubo, Shinjuku-ku, Tokyo 169-8555, Japan

Tel: +81-3-5286-3122 Fax: +81-3-3205-4740 E-mail: hiromi@waseda.jp

編集委員会

●酒井 宏水(委員長), 東 寛, 大谷 渡, 武岡 真司, 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.16 (4) 2009年2月5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 55号館S棟703号室

早稲田大学 理工学研究所 酸素輸液プロジェクト

TEL (03) 5286-3122 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