

人工血液

第 17 卷 第 2 号 2009 年 8 月

目次

会告	54
総説	Translational Advances in Second and Third Generation Hemoglobin Based Oxygen Carriers: One Research Team's PerspectiveJonathan S. Jahr 他	56
	Semibiology(半生物学)と哺乳動物の臓器保存・蘇生・移植の最前線関邦博 他	63
	高分子型ベシクルを用いた新しい生体材料の創製：リポソーム代替材料としてのポリマーソームと革新的ナノ・マイクロカプセル“ピクソーム(PICsome)”岸村 顕広 他	73
	ヒト血清アルブミンを用いた機能分子・材料の創製小松 晃之 他	82

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 17 No. 2 Aug, 2009

Contents

<i>Announcement from the Society</i>	54
<i>Review: Translational Advances in Second and Third Generation Hemoglobin Based Oxygen Carriers: One Research Team's Perspective</i>Jonathan S. Jahr, et al.	56
<i>Recent Topics on Semibiology for Organ Preservation, Resuscitation, and Transplantation in Mammals.</i>Kunihiro Seki, et al.	63
<i>PICsome Technology: Polymeric Vesicles toward Biomedical Applications</i>Akihiro Kishimura, et al.	73
<i>Synthesis of Functional Molecules and Materials Based on Human Serum Albumin</i>Teruyuki Komatsu, et al.	82

会 告

第16回日本血液代替物学会年次大会

テーマ：世界をリードする血液代替物

会 期：平成21年10月16日(金), 17日(土) 午前9時 - 午後17時

会 場：慶應義塾大学医学部 信濃町キャンパス内医学情報センター 北里講堂

参加費：¥8,000 (懇親会費を含む)

シンポジウム：細胞型人工酸素運搬体をつくる 平成21年10月16日

早稲田大学理工学部 酒井宏水先生 Hb溶液から包埋粒子まで

ニプロ株式会社研究部 横江淳一先生 創薬領域でのペグ化と将来への展望

ベネシス株式会社研究部 柚木幹弘先生 生物製剤の安全性確保と製品の無菌化

テルモ株式会社開発部 金田伸一先生 LEHの工業生産への道 - その障害を乗り越えて

特別発言：東京大学生産技術研究所 酒井康行先生

防衛医科大学 石原雅之先生

特別講演：人工血小板の過去，現在，未来 平成21年10月17日

慶應義塾大学医学部 半田 誠 先生

：微小循環系でのナノ粒子の不思議な流れ 平成21年10月17日

横浜国立大学大学院工学研究院 百武 徹 先生

特別発言：慶應義塾大学神経内科 富田 裕 先生

：獣医医療における血液代替物の意義 平成21年10月16日

酪農大学獣医学部 萩原克郎先生

特別発言：麻布大学獣医学 並河和彦先生

：将来の細胞型酸素運搬体とGiant Liposome 平成21年10月17日

三重大学工学部 湊元幹太先生

以上，シンポジウム，特別講演の演題名は現在なお仮題です．正式演題名は“人工血液”第17巻3号，または8月下旬に更新されますホームページをご覧ください．

一般演題の発表予定

平成21年10月16日(午前，午後)，10月17日(午前)

評 議 員 会：平成21年10月16日 正午頃

総 会：平成21年10月17日 ランチョンセミナー終了後

ランチョンセミナー：平成21年10月17日 正午頃

代用血漿剤HES 埼玉医科大学医療センター 宮尾秀樹 先生
(主催：フレゼニウス・カービ・ジャパン株式会社)

懇 親 会：平成21年10月16日 17：30 - 20：00

慶應義塾大学病院新館11階 パレスホテル・オアシス
会費は参加費に含まれております。

会員の方々，いまだ入会されておられない方，本学会の研究テーマにご興味をお持ちの方，ならびに関係分野でご研究の方々のご参加，ご発言を心からお待ちいたしております．なお未入会の方は学会当日以前にご入会願います．詳細は下記ホームページを御参照下さい．プログラムは“人工血液”第17巻3号(平成21年9月末に発刊予定)に掲載されます．ただし大体の時間割などは8月下旬に更新されます日本血液代替物学会ホームページ

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

にも掲載いたしますのでこれをご参照下さい．

平成21年8月18日
第16回日本血液代替物学会年次大会
会長 高折益彦 東宝塚さとう病院
〒665 0873 兵庫県宝塚市長尾町2番地1号
Tel：0797 88 2200 Fax：0797 88 5782

Translational Advances in Second and Third Generation Hemoglobin Based Oxygen Carriers: One Research Team's Perspective

Jonathan S. Jahr ⁽¹⁾, Bernd Driessen ⁽²⁾, Robert A. Gunther ⁽³⁾, Fedor Lurie ⁽⁴⁾,
Jennifer C. Lim ⁽⁵⁾, Anthony T.W. Cheung ⁽⁶⁾

Keywords

Hemoglobin Based Oxygen Carriers, Oxyglobin, Hemopure, Hemolink, Oxyvita, Hemorrhage, Hypovolemia, Shock, Resuscitation, Circulating Blood Volume, Methemoglobinemia, Intravital Microscopy

Introduction

In our translational laboratories, large and small animal experiments have been important to delineate product efficacy of oxygen delivery and safety in four Hb-based oxygen carriers (HBOCs) from three manufacturers independently.

This review will highlight four main areas of research: hemorrhagic shock or hypovolemia and resuscitation using different strategies and resuscitants, validation of all laboratory equipment used in the above experiments to capture hemodynamic, hemotologic, and chemistry values against a gold standard whose values will have no interference from solubilized hemoglobin, and various other laboratory models and the various associated models to test theories regarding calculations of circulating blood volume and understanding issues with methemoglobinemia.

Original abstracts from each of the studies have been reproduced here with full references.

1 . HBOC and Perfusion

The objective of this investigation was to study the effects of the first marketed hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC) Hemoglobin glutamer-200 (bovine) (HB-200) (Oxyglobin®) on splanchnic perfusion and oxygenation in a canine model of acute hypovolaemia. Twelve anaesthetized dogs (30.8 ± 1.4 kg body weight) were instrumented for

recordings of heart rate (HR) mean arterial pressure (MAP) central venous pressure (CVP) cardiac output and cranial mesenteric arterial (CMA) and venous blood flows (CMV) Total and plasma hemoglobin (Hb) oxygen content and saturation, lactate concentration, pH and blood gases were analysed in arterial, mixed venous and mesenteric venous blood samples. Measurements were made before (baseline) and after 1 h of hemorrhage, after which animals were resuscitated with either shed blood (controls) or HB-200 until HR, MAP and CVP returned to prehemorrhage levels. Recordings were repeated immediately and 3 h after termination of fluid resuscitation, after which organ specimens were obtained for microscopic examination. Hemorrhage (average 32 mL/kg) reduced MAP to 50 mm Hg, increased HR and systemic vascular resistance (SVR) and was accompanied in both the systemic and the splanchnic circulation by significant decreases in blood flow, Hb content and oxygen delivery (DO₂) and lactic acidosis. In controls, all variables recovered to baseline after isovolaemic resuscitation with shed blood. In dogs resuscitated with a small volume of HB-200 (10 mL/kg) HR, MAP, CVP and CMA and CMV blood flows returned to baseline. However, cardiac output, total Hb, oxygen content and systemic and mesenteric DO₂ remained depressed while SVR increased further. Mesenteric and systemic acid-base status recovered in both groups, and there was no difference in microscopic tissue damage

(1) Department of Anesthesiology, David Geffen School of Medicine at University of California Los Angeles, CHS 56-122, 757 Westwood Plaza, Suite 3325, Los Angeles, CA 90095-7403

(2) Department of Clinical Sciences, New Bolton Center, University of Pennsylvania, College of Veterinary Medicine, Kennett Square, PA

(3) Department of Surgery, University of California Davis School of Medicine, Davis, CA

(4) Department of Surgery, John Burns School of Medicine, University of Hawaii, Honolulu, HI

(5) College of Letters and Science, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA

(6) Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of California Davis School of Medicine, Sacramento, CA

論文受付 2009年1月7日 論文受理 2009年1月24日

between groups. Thus, HB-200 reconstituted splanchnic perfusion and oxidative metabolism in spite of pronounced systemic vasoconstriction and insufficient restoration of CO and DO₂; it may improve diffusive oxygen transport in the microvasculature by virtue of hemodilution and its high efficiency in the uptake and release of oxygen¹.

2 . HBOC and Microcirculation

We sought to correlate *in vivo* microvascular, systemic function, hemodynamic, and oxygenation changes in autologous shed blood ($n = 4$) and HB-200 ($n = 4$) resuscitations in hypovolemic dogs. Hemorrhage (~ 40 % blood loss) reduced mean arterial pressure to ~ 50 mm Hg and caused significant ($P < 0.01$) decreases in hematocrit, total Hb, mean pulmonary arterial pressure, cardiac output, and oxygen delivery and significant ($P < 0.01$) increases in heart rate, systemic vascular resistance, and lactic acidosis. Significant ($P < 0.01$) changes in conjunctival microvascular variables also occurred, including a 19 % decrease in venular diameter and 79 % increase in average blood flow velocity. Shed blood resuscitation returned microvascular, systemic function, hemodynamic, and oxygenation variables to prehemorrhagic baseline values. In contrast, HB-200 failed to restore hematocrit, total Hb, cardiac output, oxygen delivery index, and systemic venous resistance to baseline, but it restored other systemic functions and all hemodynamic and microvascular changes. In addition, HB-200 resuscitation in hypovolemic dogs (~ 40 % blood loss) did not cause extreme hemodilution or fatal outcome. This study confirms that real-time (*in vivo*) microvascular studies, which were conducted only in small rodent models in the past, can be performed simultaneously with systemic function, hemodynamic, and oxygenation studies in a large animal model for relevant data correlation².

3 . HBOC and Oxygen Delivery

The object of this study was to compare effects of 6 % hetastarch (Hextend) and HB-200 on hemodynamics, arterial oxygen content, and systemic oxygen delivery in a canine hemorrhagic shock model.

Twenty-four anesthetized healthy, adult, mongrel dogs (28 ± 1 kg; 7 female, 17 male) were instrumented for determinations of heart rate, arterial, central venous, pulmonary arterial, and pulmonary arterial occlusion pressures, and cardiac index. Total solids, colloid oncotic pressure, arterial oxygen content, Hb, lactate, pH, and blood gases were analyzed in blood samples. Recordings were made before, after 1 hr of hemorrhagic shock, and immediately and 3 hrs after infusion of either 30 mL/kg hetastarch (group 1) 10

mL/kg Hb-200 + 20 mL/kg hetastarch (group 2) 20 mL/kg HB-200 + 10 mL/kg hetastarch (group 3) or 30 mL/kg HB-200 (group 4)

Hemorrhage (35 ± 1 mL/kg) reduced mean arterial pressure to 50 mm Hg and caused significant decreases in total Hb, mean pulmonary arterial pressure, cardiac index and systemic oxygen delivery, increases in heart rate and systemic vascular resistance, and lactic acidosis. In group 1, hetastarch infusion was accompanied by increases of pulmonary arterial pressure, cardiac index, and blood oxygen extraction above baseline, and decreases of systemic vascular resistance, total Hb, total solids, arterial oxygen content, and systemic oxygen delivery below baseline ($P < 0.05$). Other data returned to baseline. In groups 2 to 4, hemodynamic functions (except pulmonary arterial pressure) recovered, yet neither total Hb (i.e., plasma and red blood cell Hb) nor arterial oxygen content increased despite increases in plasma Hb of 2 to 5 g/dL and proportionate increases in total solids. Systemic oxygen delivery improved dose-dependently with HB-200 but did not return to baseline ($P < 0.05$) reaching values comparable to hetastarch group only at 30 mL/kg Hb-200. In all groups, oxygen extraction remained above baseline. Metabolic acidosis and lactatemia resolved significantly faster in groups 2 to 4, and colloid oncotic pressure after resuscitation was greater in groups 2 to 4 than in controls ($P < 0.05$).

Thus, HB-200 infusion may not improve oxygen delivery more than hetastarch, likely due to hemodilution caused by its high colloid oncotic pressure, but may facilitate diffusive oxygen transport to tissues.

HBOCs are solutions of cell-free Hb that have been developed for replacement or augmentation of blood transfusion. They combine plasma expanding with oxygen carrying properties, thus may prove superior to traditional plasma expanders (e.g., hydroxyethyl starch solutions) for treatment of hemorrhagic shock.

HB-200 is an ultrapure solution of highly polymerized bovine Hb approved for treatment of anemia in dogs. It shares most properties with Hb glutamer-250 (bovine; Hemopure [formerly HBOC-201] Biopure) which is currently in phase III clinical trials and approved for use in humans in South Africa. Previous studies with low doses of Hb-200 and HBOC-201 revealed an improvement of hemodynamic functions, yet a significantly smaller increase in arterial oxygen content and oxygen delivery after HBOC infusion than expected based on the amount of Hb administered. Therefore, in the present study, our primary goal was to analyze whether infusion of HB-200 will dose-dependently and to a greater extent than conventional plasma expanders

increase systemic oxygen delivery and tissue oxygenation in dogs subject to isovolemic resuscitation after acute blood loss³).

4 . HBOC and Resuscitation

To test the hypothesis that low-volume resuscitation with HB-200 improves hemodynamic function and tissue oxygenation, whereas arginine vasopressin resuscitation improves blood pressures more than low-volume saline or hemoglobin glutamer infusion but compromises systemic and muscle blood flow and oxygenation.

Dogs were instrumented to determine heart rate; arterial, central venous, pulmonary arterial, and pulmonary arterial occlusion pressures; cardiac output; and quadriceps muscle blood flow and oxygen tension (P_{mO_2}). Total and plasma Hb, oxygen content, lactate, pH, standard base excess, and arginine vasopressin levels were determined, and systemic oxygen delivery (Do_2I) and extraction ratio were calculated.

Measurements were made before and 30 mins following hemorrhage. Dogs were resuscitated over 60 mins with saline (8.5 mL/kg) arginine vasopressin (0.4 IU/kg bolus plus 0.08 IU/kg/min) or 1:1 diluted hemoglobin glutamer-200. Recordings were then repeated. Subsequently, animals received 30 mL/kg shed blood (60 mL/kg/hr) and recordings were repeated immediately and 1 hr later.

Hemorrhage (~ 52 mL/kg) caused characteristic changes in hemodynamic, hematologic, systemic P_{mO_2} , and acid-base variables. Saline resuscitation increased both Do_2I and muscle perfusion by 42 % and 51 %, while arginine vasopressin treatment reduced heart rate by 31 % and increased mean arterial pressure by 22 % but not cardiac output, Do_2I , or muscle blood flow, resulting in a further decrease of P_{mO_2} by 68 % and worse metabolic acidosis. Hemoglobin glutamer-200 infusion caused systemic and pulmonary vasoconstriction, however, without deterioration of cardiac output, Do_2I , muscle blood flow, or P_{mO_2} despite lack of oxygen content increase. Blood transfusion restored most variables.

Including use of vasopressin, we concluded that low-volume crystalloid or HB-200 resuscitation posthemorrhage may improve (but not restore) macro- and microvascular functions and tissue oxygenation, while arginine vasopressin infusion may only improve blood pressures and result in lower overall systemic perfusion compared with low-volume saline or HB-200 treatment and worsening of anaerobic conditions in skeletal muscle⁴).

5 . HBOCs and Circulating Blood Volume

HBOC may be ideal for monitoring circulating plasma volume (CV-P) and circulating blood volume (CV-B). We used

an HBOC (Hemoglobin glutamer-200 [bovine] Oxyglobin[®]; Biopure, Cambridge, MA) as an indicator for relative CV-B in the rabbit model. Accuracy of the technique was determined by comparison with the Evans blue dye (EBD) dilution technique in 19 anesthetized female New Zealand rabbits weighing 2.0 to 10.6 kg. The measurements were performed at baseline, after hemorrhage (1/3 of CV-B) normovolemic hemodilution (replacement of 1/3 CV-B by Hextend[®]; Abbot Laboratories, North Chicago, IL), and hypervolemic hemodilution (additional infusion of Hextend[®] in a volume equal to 1/3 of CV-B). Hb concentration was measured by using a HemoCue[®] photometer (HemoCue AB, Angelholm, Sweden). EBD concentration was analyzed by using linear regression to estimate Time 0 concentration; Time 0 was defined as EBD injection time. The difference between CV-P values determined by EBD and HBOC dilution was independent from the magnitude of the CV-P value. The relative bias was 1.29 mL, and the precision (one SD) was 2.82 mL. The difference did not reach statistical significance.

In an attempt to use HBOCs to estimate circulating blood volumes, we concluded that circulating plasma volume and circulating blood volume may be accurately estimated by using plasma hemoglobin concentration measurements after HBOC infusion⁵).

6 . Verification of Circulating Blood Volume Measurements Using HBOC

Direct determination of the CV-B is clinically desirable, especially when hemodynamic parameters such as blood pressure and heart rate are pharmacologically altered and may not be used with confidence for monitoring of CV-B. In a rabbit model, we demonstrated that small volumes of HBOCs may be used for measuring of CV-B with the indicator-dilution technique. This study aimed to verify the technique in a canine hypovolemia model with varying concentrations of infused HBOC.

Twenty-four healthy mongrel dogs were anesthetized and anesthesia maintained with isoflurane in 21 % oxygen and sufentanil infusion. All animals were mechanically ventilated. After splenectomy and insertion of arterial, venous, and balloon-tipped pulmonary arterial catheters and recording of baseline values of total and plasma hemoglobin (Hb) hematocrit, and major hemodynamic parameters, dogs were bled (average 36.6 ± 5.8 mL/kg) to a mean arterial pressure of 50 mm Hg and maintained hypovolemic for 1 hour. Thereafter, measurements were repeated, and dogs were resuscitated. Animals in group 1 were resuscitated with 30 mL/kg of 6 % hetastarch solution (HES). Animals in other groups received either 10 mL/kg of Hb glutamer-200 (Hb-200;

Oxyglobin)plus 20 mL/kg HES(group 2) 20 mL/kg Hb-200 plus 10 mL/kg HES(group 3) or 30 mL/kg Hb-200(group 4) Solutions were infused at 30 mL/kg/hr. Measurements were repeated immediately after volume resuscitation. Plasma Hb concentration was determined after centrifugation using the HemoCue. Lactated Ringer's solution was infused in all subjects at 5 mL/kg/hr for maintenance. CV-B at baseline was estimated as 85 mL/kg. CV-B values immediately posthemorrhage were calculated by subtracting the volume of withdrawn blood from the baseline value. On the basis of the assumption that hemorrhage and subsequent volume resuscitation would not cause any hemolysis(as confirmed in group 1) all plasma Hb was considered to represent infused HBOC. The calculation of CV-B using HBOC as an indicator was performed as previously published by Kasuya et al. CV-B values derived from measured HBOC concentrations in plasma were compared with calculated(based on an original CV-B of 85 mL/kg and withdrawn blood volume)values of CV-B using the Bland-Altman analysis and by linear correlation. Agreement between the methods was analyzed by calculating the bias estimated by the mean difference and the standard deviation of the difference.

Calculated and measured CV-B values were highly correlated($r = 0.97$) The difference between indicator dilution-derived and calculated values of CV-B did not exceed 4% of calculated CV-B in 97% of the measurements. The mean difference between measured and calculated values of CV-B was 72 ± 16 mL and did not vary significantly among groups 2, 3, and 4(at varying concentrations of HBOC infused)

In a canine hypovolemia model, knowing both the HBOC volume infused and the HBOC concentration measured in plasma allows for reliably determining the CV-B. Our data verify the indicator-dilution technique with HBOC as an appropriate and clinically valuable method for monitoring CV-B in treatment of hypovolemia⁶.

7 . HBOC and Magnetic Resonance Oximetry

The authors tested whether noninvasive magnetic resonance(MR)oximetry is accurate in the in vivo measurement of oxygen saturation in a stroma-free HBOC.

A central venous catheter was placed in the inferior vena cava(IVC)of 10 New Zealand white rabbits(weight range, 2.5 - 3.2 kg) Each rabbit underwent removal of 20 % of blood volume followed by resuscitation with 10 mL/kg of bovine HB-200. Oxygen saturation of the blood mixture was measured in vivo at the IVC with MR oximetry, with separate in vitro calibration for each animal. Blood drawn from the IVC was measured with ex vivo oximetry, which

was used as the standard of reference. The in vivo and ex vivo measurements were compared.

There was no significant difference($p > 0.1$)between measurements obtained with MR oximetry and ex vivo oximetry. The results with in vivo MR oximetry demonstrated excellent correlation with those from ex vivo oximetry($r = 0.99$)over a wide range of physiologic oxygen saturation values(16.7 - 74.9 %)in venous blood.

Noninvasive in vivo magnetic resonance measurement of oxygen saturation is valid for whole blood mixed with stroma-free Hb. Therefore, magnetic resonance oximetry may be clinically useful for assessing oxygenation status in patients resuscitated with an HBOC⁷.

8 . HBOCs and Coagulation

Because hetastarches have deleterious effects on coagulation that increase with molecular weight(MWt) risk of coagulopathy associated with a high MWt HBOC was studied.

Experiments simulated hemodilution during clinical resuscitation of hemorrhagic shock with varying doses of HBOCs. Coagulopathy related to 1:11, 1:5, 1:2, or 1:1 dilution of whole blood with normal saline, 6% hetastarch(670 KDa) Hb-200, or OxyVita(OXYVITA Inc, New Windsor, NY) a new-generation, zero-link polymerized bovine hemoglobin-based oxygen carrier, 33 megadaltons)were analyzed.

At 2 lower levels of hemodilution, hetastarch, HB-200, and OxyVita produced equivalent reductions in maximum clot strength(TEG-MA and TEG-G)that reached statistical significance compared with whole blood and normal saline. At 2 higher dilutions, OxyVita and Hb-200 impaired maximum clot strength compared with whole blood, normal saline, and hetastarch. Dilution with hetastarch had a greater effect on clot propagation(K and)than either HBOC.

OxyVita and Hb-200, HBOCs with different MWt, had similar effects on coagulation as measured by TEG. The impairment of coagulation by HBOCs and hetastarch occurred at doses corresponding to 12 mL/kg or a blood volume replacement of 17%. The use of HBOCs at doses corresponding to 23 mL/kg or a blood volume replacement of 33% significantly decreased coagulation to levels associated with increased clinical bleeding in this preliminary study. Minimal coagulopathic effects are expected with use of OxyVita at the manufacturer's anticipated effective dose of 10 g or 2 to 3 mL/kg⁸.

9 . HBOC and Coagulation

Polymerized bovine hemoglobin is currently under investigation as an alternative to blood-banked human red

blood cells. Because of the dark red hemolyzed appearance of hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC)-201, we sought to describe the effects of HBOC-201 on coagulation analyzers that perform prothrombin times, activated partial thromboplastin times, fibrinogen, and antithrombin. Pooled normal plasma was combined with HBOC-201 to achieve plasma hemoglobin levels of 1.4, 2.6, 3.8, 4.8, and 6.2 g/dL. Results for each test using HBOC-201-prepared plasma were compared with results using saline-matched controls. Two consecutive absolute result differences of >10% between saline controls and HBOC-201 samples were used for determining interference in test accuracy by the concentration of HBOC-201. Mechanical detection methods (fibrometer, STA, CS-190) and the MDA-180 method were less affected by increasing levels of HBOC-201 than optical detection devices for all test parameters⁹.

10 . HBOC and Hemoglobin

The accuracy of the HemoCue[®] Plasma/Low Hemoglobin System was validated in vitro with low levels of HBOCs. Repeated measurements were performed on 50 samples of canine plasma, each mixed with three different HBOCs at varying small concentrations (a total of 150 samples) by using plasma samples without HBOCs as controls. Two technicians performed the measurements and randomly tested each sample 10 times. The results were analyzed for correlation, and analysis of variance was used to evaluate statistical significance, with a P value of ≤ 0.05 considered significant. Hb concentrations determined with the bedside photometer were not significantly different from known values of Hb concentration in the samples. There was no significant difference between values obtained by two independent observers for the same samples. This was true for all three tested HBOCs and for all tested concentrations. The mean bias of the measurement expressed as a percentage of sample concentration was 0.1% for HB-200 (bovine) 0.58% for hemoglobin glutamer-250 (bovine) and 0.19% for hemoglobin-raffimer. The mean error was <8% for all three HBOCs. Both intraobserver and interobserver reliabilities were high and statistically significant. The HemoCue[®] Plasma/Low Hemoglobin System is a reliable instrument for detecting and measuring small concentrations of three different HBOCs in plasma.

This study evaluated a new bedside blood-measuring device for low levels and found that it rapidly measured low levels accurately for three blood substitutes¹⁰.

11 . HBOC and Oximetry

The validity of arterial and mixed venous oxygen

saturation measurements in a canine hemorrhage model after resuscitation with varying concentrations of HBOC was determined. We concluded that the administration of this oxygen therapeutic may interfere with the values of some monitors.

In this study, we evaluated the validity of saturation measurements in mixed venous and arterial blood during posthemorrhagic anemia and resuscitation with varying levels of HB-200. Nineteen anesthetized, splenectomized, mixed-breed dogs were anesthetized (two were excluded from the data because they did not survive the exsanguination, supporting the validity of the model) Their pulmonary arteries were cannulated with the Abbott QVUE Oximetrix 3 catheter. An 18-gauge catheter was placed in the femoral artery, and a reusable Nellcor probe was applied to the tongue. Mixed venous and arterial samples were drawn at baseline, after 40% hemorrhage (to keep arterial pressure at 50 mm Hg) and postresuscitation with 30 mL/kg of 6% hetastarch in lactated Ringer's solution ($n = 4$) 10 mL/kg of Hb-200, 20 mL/kg of hetastarch ($n = 6$) 20 mL/kg of Hb-200, and 10 mL/kg of hetastarch ($n = 7$) Samples were compared with oxygen content from the LEXO2CON-K oxygen analyzer, and oxygen content was calculated for all values from the monitors. Results were compared by using analysis of variance. There was good correlation ($0.97 \geq r \geq 0.92$) for the measured versus calculated Hb oxygen saturation values at baseline. After resuscitation, the correlation between calculated and measured values of oxygen content was significantly smaller for all tested instruments. The values of oxygen content calculated from the oxygen saturation monitor and from the oximetric pulmonary artery can deviate by as much as 20% from directly measured values. We conclude that the administration of this oxygen therapeutic may interfere with the values of some monitors.

This study evaluated oxygen saturation monitors in a canine model of acute blood loss and resuscitation with a blood substitute and found that these may interfere with the monitors' results in a dose-dependent way¹¹.

12 . HBOC and Lactate

Lactate measurements with three HBOCs were evaluated, and based on the samples tested in this study, results indicate true lactate levels in the presence of HB-200 may be consistently underestimated when measured in a spectrophotometry-based lactate analyzer, especially at higher lactate concentrations. The clinical implications of this study are that with increasing levels of an HBOC in human plasma, lactate interpretation may become inaccurate when measured by a spectrophotometric lactate analyzer, causing

underestimation of "true" lactate values and possible under-treatment of the patient. Therefore, caution must be exercised when interpreting lactate results from the Synchron LX[®] 20 when a HBOC is present in plasma.

We sought to determine whether HBOCs, HB-200, and hemoglobin raffimer (Hemolink[™]) interfere with the accuracy of lactate measurements. Combinations of concentrated L-lactate solution, HBOC, and blood or plasma with added PlasmaLyte-A[™] were added to sample tubes to make a linear and constant increase in lactate concentration in consecutive samples. Sample lactate concentrations ranged from 5-110 mg/dL (0.6-12 mmol physiological reference range: 5-20 mg/dL [0.56-2.2 mmol]) Comparisons were made between machine measured lactate concentrations and calculated lactate concentrations. For Hb glutamer-250, the average difference between measured and calculated lactate concentrations was -5.1 mg/dL (-0.57 mmol LX-20[®]) with greater underestimation at larger lactate concentrations. For Hb raffimer, the average difference was -2.2 mg/dL (-0.24 mmol) (LX-20[®]) The veterinary product, Hb glutamer-200, was tested on 3 analyzers (LX-20[®], YSI 1500, and YSI 2300) The YSI 1500 was the most accurate instrument with the mean difference between measured minus calculated lactate being +1.3 mg/dL versus -2.6 mg/dL (YSI 2300) and -8.4 mg/dL (LX-20[®]) The clinical implications of this study are that with increasing levels of an HBOC in plasma, lactate interpretation may become inaccurate, especially at larger lactate concentrations, causing underestimation of measured lactate values and possible under-treatment of the patient. Therefore, caution must be exercised when interpreting lactate results when a HBOC is present in plasma¹².

13 . Methemoglobin and Lactate

In this study, we validated the accuracy of lactate measurements (YSI 2700 SELECT[™] glucose/lactate analyzer) in the presence of methemoglobin from an oxidized bag of hemoglobin-based oxygen carrier (Met-HBOC) hemoglobin glutamer-200 (Oxyglobin[®]; Biopure Corp)

Different combinations of concentrated L-lactate solution, pooled canine plasma, and PlasmaLyte A[™] were added to 4 sample groups (1%, 10%, 20%, and 40% Met-HBOC [1.3 g/dL]) to yield linear increases in lactate concentration in consecutive samples. The mean difference between measured and calculated lactate was -5.1 mg/dL (1% Met-HBOC) -5.8 mg/dL (10% Met-HBOC) -4.6 mg (20% Met-HBOC) and -8.5 mg/dL (40% Met-HBOC) The root mean square error was 6.5 mg/dL, 7.4 mg/dL, 6.8 mg/dL, and 10.3 mg/dL, respectively. The Bland-Altman correlation (r) was $r = -0.94$ ($P = 0.01$) $r = -0.91$ ($P < 0.001$) $r = -0.90$ ($P < 0.001$) and $r =$

-0.94 ($P < 0.001$) respectively, where $r = 0$ for perfect agreement between measured and calculated values. Results indicate that true lactate levels in the presence of Met-HBOC are underestimated when measured by an YSI 2700 analyzer independent of the amount of Met-HBOC present¹³.

Methemoglobin concentration increases in patients receiving HBOCs. When interpreting lactate concentrations from a patient with an HBOC present in plasma, underestimation of true lactate levels may occur unrelated to methemoglobin concentrations.

14 . Methemoglobin and TEG

The thrombelastogram (TEG) is a point of care coagulation monitor evaluating qualitative platelet function; this may be affected by oxidation. HBOCs oxidize Hb, increasing methemoglobin (MetHb) levels. We hypothesize that HBOCs, if they create methemoglobinemia, may cause coagulopathy. This *ex vivo* model studies dose response coagulation changes with TEG to increasing levels of MetHb from oxidized HB-200.

After IRB approval for laboratory study of donated blood and patient consent, the effects on coagulation of increasing concentrations of HBOCs in whole blood of two donors were quantified using a TEG[®] 5000 (Haemoscope Corp., Niles, IL) (1) Blood samples simulated hemodilution during clinical resuscitation of hemorrhagic shock with varying doses of HB-200. Coagulopathy related to 1:11 (Low) 1:5 (Med) 1:2 (High) and 1:1 (Very High) dilution of whole blood with HB-200 high MetHb (65%) concentrations and HB-200 low MetHb (1%) concentrations were analyzed. For each sample R, K, MA and G were quantified (ANOVA, $P \leq 0.05$ considered significant)

Progressive dilution of HB-200 (Low Met) and HB-200 (High Met) produced increases in R [$P = 0.04$] and K [$P < 0.0001$] and decreases in [$P = 0.003$] MA [$P < 0.0001$] and G [$P < 0.0001$] Analysis effects of treatment on coagulation showed that K [$P = 0.01$] [$P = 0.0004$] MA [$P = 0.005$] and G [$P = 0.0009$] are changed in HB-200 (High Met) compared to HB-200 (Low Met) Very High dilutions of both HB-200 (Low Met) and HB-200 (High Met) increased R [Low Met $P = 0.04$] and [High Met $P = 0.04$] compared to Low dilutions.

High methemoglobin concentrations in Oxyglobin cause additive coagulation impairment that likely results from the effects of oxidative substances on platelet function and coagulation proteins. Oxidative products adversely react with coagulation factors and modify redox-sensitive sites in the platelets. Therefore, if methemoglobinemia occurs as a result of HBOC administration and if the levels are significantly elevated (greater than 10%) impairment of coagulation is possible¹⁴.

Summary

Work on HBOCs is presented, providing independent validation of safety and efficacy, crucial for FDA and other regulatory registration for any product, and increased acceptance. Independent investigation, regardless of outcome, is critical for good science to prevail.

References

1. Driessen B, Jahr JS, Lurie F, Griffey SM, Gunther RA. Effects of hemoglobin-based oxygen carrier Hemoglobin glutamer-200(bovine)on intestinal perfusion and oxygenation in a canine hypovolemia model. *Brit J Anaesth* 2001;86:683-692.
2. Cheung ATW, Jahr JS, Driessen B, Duong PL, Chew JT, Chan MS, Lurie F, Golkaryeh MS, Kullar RK, Gunther RA. The effects hemoglobin glutamer-200(bovine)on the microcirculation in a canine hypovolemia model: a non-invasive, computer-assisted intravital microscopy study. *Anesth Analg* 2001;93:832-838.
3. Driessen B, Jahr JS, Lurie F, Golkaryeh M, Gunther RA. Arterial oxygenation and oxygen delivery after hemoglobin-based oxygen carrier infusion in canine hypovolemic shock: A dose-response study. *Crit Care Med* 2003;31:1771-1779.
4. Driessen B, Zarucco L, Gunther RA, Burns PM, Lamb SV, Vincent S, Boston RA, Jahr JS, Cheung ATW. Effects of low volume Hemoglobin glutamer-200(bovine)versus normal saline and arginine vasopressin resuscitation on systemic and skeletal muscle blood flow and oxygenation in a canine hemorrhagic shock model. *Crit Care Med* 2007;35:2101-2109.
5. Jahr JS, Lurie F, Xi S, Golkaryeh MS, Kuznetsova OA, Kullar RK, Driessen B. A novel approach to measuring circulating blood volume: use of a hemoglobin-based oxygen carrier(HBOC)in a rabbit model. *Anesth Analg* 2001;92:609-614.
6. Jahr JS, Lurie F, Bezdikian V, Driessen B, Gunther RA. Measuring circulating blood volume using infused hemoglobin-based oxygen carrier(Oxyglobin)as an indicator: verification in a canine hypovolemia model. *Am J Ther* 2008;15:98-101.
7. Chan FP, Jahr JS, Driessen B, Daunt D, Li KCP. Validation of MR in vivo measurement of oxygen saturation after resuscitation with a polymerized hemoglobin-based oxygen carrier in a rabbit model. *Acad Radiol* 2001;8:583-590.
8. Jahr JS, Weeks DL, Desai P, Lim JC, Butch AW, Gunther R, Driessen B. Does OxyVita, a new generation hemoglobin-based oxygen carrier, or oxyglobin acutely interfere with coagulation compared with normal saline or 6% hetastarch? An ex vivo thrombelastography study. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2008;22:34-39.
9. Jahr JS, Lurie F, Gosselin R, Lin JS, Wong L, Larkin E. Effects of a Hemoglobin-based oxygen carrier(HBOC-201) on coagulation testing. *Am J Ther* 2002;9:431-436.
10. Lurie F, Jahr JS, Driessen B. The novel HemoCue® Plasma/Low Hemoglobin System accurately measures low concentrations of three different hemoglobin-based oxygen carriers(HBOC)in plasma: Hemoglobin glutamer-200 (bovine)(Oxyglobin®) Hemoglobin glutamer-250 (bovine),(Hemopure®) and Hemoglobin-raffimer (Hemolink™) *Anesth Analg* 2002;95:870-873.
11. 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.
12. Jahr JS, Osgood S, Rothenberg SJ, Li Q-L, Butch AW, Gunther RA, Cheung AT, Driessen B. Lactate interference by hemoglobin-based oxygen carriers (Oxyglobin®, Hemopure® and Hemolink™) *Anesth Analg* 2005;100:431-6.
13. Osgood SL, Jahr JS, Desai P, Tsukamoto J, Driessen B. Does methemoglobin from oxidized HBOC(Hemoglobin glutamer-200)interfere with lactate measurement(YSI 2700 Biochemistry Analyzer)? *Anesth Analg* 2005; 100:437-9.
14. Moallempour M, Jahr JS, Lim JC, Weeks D, Butch A, Driessen B. Methemoglobin effects on coagulation: a dose response study with HB-200(Oxyglobin®)in an ex vivo thrombelastogram model. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2009;23:41-7.

Semibiology(半生物学)と哺乳動物の臓器保存・蘇生・移植の最前線

Recent Topics on Semibiology for Organ Preservation, Resuscitation, and Transplantation in Mammals.

関 邦博, 小嶋 智弘, 吉田 優, 畑山 直之

Kunihiro Seki, Tomohiro Kojima, Yu Yoshida, Naoyuki Hatayama

和文抄録

生物の世界では、乾燥保存は自然に営まれている現象である。これらの細胞内は乾燥状態になっているため、翌春には動植物は蘇ることは毎年恒例の自然現象である。例えば、シベリアのツンドラ地帯では真冬は -60 以下まで低下し動植物は冷凍状態となる。我々は、この自然現象のメカニズムが哺乳類の臓器の保存と蘇生法を適用することができるのではないかと考え臓器の乾燥保存法の研究を行ってきた。自動車が故障し修理して再び乗れるようになるのは、設計図と部品と修理技術があるからである。ヒトの場合、自動車のように設計図(解剖図)、修理技術(外科手術)は既に完成している。ただし、部品(臓器)がない。現在、部品はヒトの脳死者からの供給に頼っている状態であるが、臓器の最大保存期間は24時間である。私たちの炭酸ガスを使用した臓器保存蘇生技術は、部品(臓器)の保存時間を24時間から72時間に伸ばすことに成功した。臓器の保存期間が1年間以上になると、半導体のようにヒトの寿命も半永久的になる。本研究の著者の一人である Seki *et al.* (1998) は体内の水分量を減少させた状態のクマムシが perfluorocarbon (PFC) の中で6000気圧の超高圧下におかれても蘇生しうることを示した。生命体がこのように体内の水分量を減少させて代謝を低下させ、乾燥、低温などの極限環境に適応することは cryptobiosis とよばれているが、北極圏の植物の乾燥休眠や、多くのバクテリアが、相対湿度が60%以下になると休眠状態になる現象など自然界で広範囲に見られる現象で、細菌の場合は乾燥保存法として実用化もされている。この現象の一つの特徴は細胞内の水の一部が失われるのであるが、生体高分子表面を保護する結合水は残り、自由水が減少し、それに伴って細胞内の代謝が蘇生可能な限界内で低下することと考えられる。ラットの摘出臓器保存にも PFC 液を用いながら水分量を減少させ蘇生させる実験を行い、時には良い結果を得たが再現性には乏しかった。その後、CO₂ ガスが生体に対して麻酔作用、代謝抑制作用を持つことに着目し水分量減少と高分圧(200hPa)の環境下で心臓保存の実験を行い再現性が見られる結果を得たが、再現性が見られた最大保存時間は72時間であった。我々は、乾燥保存蘇生法を用いてラットの摘出臓器内の自由水をガス乾燥法により除去し長期間の保存が可能であることを示した。二酸化炭素や一酸化炭素は、無極性のガスで水を構造化することが知られ、穀物の長期間保存に使用されている。炭酸ガスや一酸化炭素ガスを用いることによりラットの摘出臓器を乾燥させ半永久的に保存させることが可能であると推察し、ラットの摘出心臓を高分圧の炭酸ガス、一酸化炭素ガス、ヘリウムガスの環境下に曝露し最大120時間まで保存後、レシピエントのラットの右頸部への異所性心移植を行い蘇生させた研究成果について報告する。

Abstract

When automobiles break down, they can be repaired and driven again, because there are blueprints and specifications, spare parts and repair techniques. In the case of humans, like automobiles there are blueprints(anatomical charts) repair techniques (surgical operations) but spare parts(organs) are not easily available. They are provided by brain dead donors, but they can be preserved for only 24 hr at the maximum. The technique of organ preservation and resuscitation with the use of CO₂ gas extended this preservation time from 24 hr to 72 hr. With the development of the semibiology techniques, it may some day be possible to preserve human organs for more than 1 year, and therefore human life could in the future become semi-permanent in a manner similar to that of automobiles. We succeeded in an experiment in which tardigrades were desiccated using perfluorocarbon(PFC) an inert fluid that has been used in liquid breathing and as artificial blood for mammals since about the

神奈川大学理学部 〒259-1293 神奈川県平塚市土浦2946 神奈川大学 理学部 Kanagawa University Faculty of Science, 2946, Tsuchiya, Hiratsukashi, 259-1293 Japan

論文受付 2009年3月14日 論文受理 2009年5月7日

1960s, and then they were exposed to high pressure at 600MPa for resuscitation. We decided to work on an experiment to preserve an isolated mammal organ by immersing it in this desiccated PFC. It was thus demonstrated that after an isolated rat heart was dry-preserved for 24 hours in an environment with 400 hPa of partially compressed CO₂ within a hyperbaric environment compressed at 2000 hPa and then was resuscitated, it could be heterotopically transplanted into a recipient rat, and the reproducibility thereof was verified. When the isolated rat heart was aeration-dried at 100 hPa of partial pressure CO₂ after being immersed in PFC, the preservation time could be extended to 72 hours. To the gas mixture of CO, O₂ and He, CO₂ was added to provide its preservative properties. Diverse levels of partial pressure for each constituent gas were tested and a good result with 120 hr preservation and resuscitation was obtained with a mixture of CO, CO₂, O₂, and He(PCO₂=400 hPa, P CO₂=100 hPa, PO₂=900 hPa, PHe=5600 hPa) On going experiments are presently investigating a diversity of partial pressures for each component gas. In the scientific world of physics and chemistry, CO is used daily, but in the field of biology CO is known as poisonous and has not been used. The present experiments proved that CO could be used profitably for the preservation and resuscitation of organs.

Keywords

semibiology, CO, CO₂, Isolated rat heart, perfluorocarbon(PFC) desiccation, preservation, resuscitation, heterotrophic transplantation.

はじめに

ヒトの肺，心臓，肝臓，腎臓，膵臓などの臨床移植治療は，既に実用化され日常化している¹⁾．年々増加する移植待機患者に対して提供される臓器の不足の問題が深刻化している．現在ヒトの移植用臓器の保存は低温保存が主流であり，4 から 24 時間が保存限界である²⁾．臓器が長時間保存できない理由としては，摂氏4度の低温や虚血により細胞膜が傷害をうける等の問題点が指摘されている³⁻⁵⁾が，何らかの方法で，臓器を赤血球や微生物のように長時間保存することができれば，臓器の供給体制を相当改善させることができるだろうと考えられ，長時間の臓器保存のための技術の確立が要望されている²⁾．現在までの試みを概観すると，まず臨床的に汎用されている保存液への単純浸漬法では University of Wisconsin Solution (UWS) が使用されているが，保存時間は，ラット，ウサギ，ヒヒ，ヒトの摘出心臓の低温保存・蘇生において4 から 18時間が限界である⁶⁻⁷⁾．摂氏0度近くの低温下でも生体組織はわずかに代謝しており，それによる老廃物を除去する観点から組織を灌流する方法も試みられており，単純浸漬法に比べて保存時間の延長が報告されているが，装置が大掛りとなり一般化に至っていない．また灌流により血管内皮が傷害されるという指摘もある⁵⁾．同様に低温下での組織代謝に着目してこれを改善させるため保存液や灌流液に酸素を供給する試みもあり保存時間の延長が報告されている⁹⁾．このような試みの中で Kuroda et al (1995) らは心腔内に UWS 液をみだし酸素を多量に溶かすことのできる不活性液体の perfluorocarbon(PFC) 液に混合ガス(PCO₂=50hPa と PO₂=950hPa) を供給しながら浸漬保存し，24時間 (100%) から 48時間 (5 匹中 4 匹) とする結果を得ている⁹⁾．

Seki et al. (1998) は，生命体が体内の水分量を減少させて代謝を低下させ，乾燥，低温などの極限環境に適應する cryptobiosis に着目し，このような状態にあるクマムシが超高压下におかれても蘇生しうることを示した¹⁰⁾．Seki et al. (1998) は，ラットの摘出臓器保存にも PFC 液を用いながら水分量を減少させ蘇

生させる実験を行い，時には良い結果を得たが再現性には乏しかった．その後 CO₂ ガスが生体に対して麻酔作用，代謝抑制作用を持つことに着目し水分量減少と高分圧 (200hPa) の環境下で心臓保存の実験を行い再現性が見られる結果を得たが，再現性が見られた最大保存時間は72時間であった¹¹⁾．

ラットから摘出した心臓を高分圧の炭酸ガスや一酸化炭素ガスと酸素とともに7気圧に曝露し，摂氏4度の冷蔵庫に72時間保存後，レシピエントラットの頸部に異所性心移植を行い蘇生させ，12週間後も異所移植した心臓が機能し続けていることを心電図を記録することにより実証した研究成果について報告する．

生物の乾燥保存

Seki et al. (1998) は，クマムシが600MPaの極限の高静水圧環境に暴露後も蘇生し生存していることを実証し，多細胞生物の保存に応用できることを示した．クマムシは約40,000個の細胞で構成されており神経細胞も持っている多細胞生物である．クマムシの保存・蘇生の生理的メカニズムを哺乳動物の臓器保存に応用することを考えた．哺乳動物の構成する細胞の中でも，血液，精子，卵子のような単細胞のみが長期間の保存・蘇生についての技術は開発され実用化されている．細胞の集まりである組織や幾つかの組織からなる器官 (臓器) の保存技術が実用化されている時間は最大24時間以内である²⁾．哺乳動物の臓器保存で問題となるのは，臓器の保存後，組織が生存しているかどうか検証しなければならない．その手法として，組織解剖学的手法か，実際に移植して検証する移植法か，電気生理学的手法などがある．本実験室では，ラット摘出心臓の蘇生の検証方法としてラット頸部異所性心移植法を用いて実証した．異所性心移植は心臓から血を送り出す働きはしないが，大きなメリットとして，他の臓器と違って心臓が生着していることを外部や心電図の記録を通して客観的に判断できるところにある．二酸化炭素ガスや一酸化炭素ガスが生体に対して麻酔作用，代謝抑制作用を持つことに着目し，水分量減少と PCO₂ =

400hPaの環境下において心臓保存蘇生の実験を行い再現性が見られる結果を得た¹⁾。この臓器保存蘇生技術は、生命活動を停止させ再び蘇生させる semibiology (半生物学) という新分野を誕生させた。

自動車が故障し修理して再び乗れるようになるのは、設計図と部品と修理技術があるからである。ヒトの場合、自動車のように設計図(解剖図)、修理技術(外科手術)は既に完成している。ただし、部品(臓器)がない。現在、部品はヒトの脳死者からの供給に頼っている状態であるが、臓器の最大保存期間は24時間である。私たちの炭酸ガスを使用した臓器保存蘇生技術は、部品(臓器)の保存時間を24時間から72時間に伸ばすことに成功した。臓器の保存期間が1年間以上になると、半導体のようにヒトの寿命も半永久的になる。自然界の植物や動物が毎年のように自ら乾燥休眠し、翌年の春に覚醒している自然現象は、既に植物や動物の細胞、組織に応用され実用化が図られている。我々は、この自然界で毎年のように繰り返されている現象を、哺乳動物の摘出臓器に応用できることを実験で示すことを目標に掲げ日々研究に取り組んできた。ラットの摘出心臓は、0.2MPaの高圧環境下に曝露しておくことと徐々に摘出心臓の水分が喪失し乾燥状態に至る。この時、乾燥に使用するガスにより蘇生率も変化することが分かった。二酸化炭素は、本実験結果から乾燥保存蘇生に適したガスの一つであることが判った。本実験成果は、今後、二酸化炭素ガスが他の哺乳動物やヒトの臓器保存蘇生に応用できる可能性を示唆するものであった。現在、この保存方法を用い保存蘇生が可能な保存時間の更なる延長を目指し研究中である。

臓器保存と二酸化炭素ガス (CO₂)

本実験で使用したラットは、日本SLC株式会社で拒絶反応を発生させないように移植用に開発されたWistar Lewisラット、近交系のLEW/SsN Slc(、6週齢)を使用した。

最初にドナー操作において説明する。ラットにジエチルエーテル吸入麻酔を行った後、ヘパリンナトリウム100単位を添加した生理食塩水1.0 mlを静脈投与した。術部を剃毛し、75%エタノールで術部を消毒後、正中切開にて開胸、左右肋骨部を背側に切開し、胸壁を頭側へ反転させ、心臓部を露出させた。心臓を摘出後、ヘパリン添加生理食塩水(4度)で満たしたシャーレに移した。上行大動脈、肺動脈を、できる限り長めに切離後、ヘパリン添加生理食塩水(4度)を用いて、上行大動脈断端より心臓を脱血灌流した。その後、上大静脈、下大静脈を結紮切離した。肺静脈と気管支を一塊として結紮後、肺を除去した。その後、混合ガス(PCO₂=150hPaとPO₂=850hPa)で曝気させた4度のKH液(Krebs-Henseleit)にて脱血、さらに保存液として注入した。KH液には抗生物質、ワーファリンを加え、グルコースは通常の4倍溶解させたものを用いた。あらかじめ混合ガス(PCO₂=150hPaとPO₂=850hPa)で曝気し、4度に冷やしたPFC液に摘出心臓を浸漬させた。保存中の摘出心臓に混合ガス(PCO₂=150hPaとPO₂=850hPa)を毎分80mlで曝気し続けた(Fig. 1)。この方法で48、72時間保存を行った。

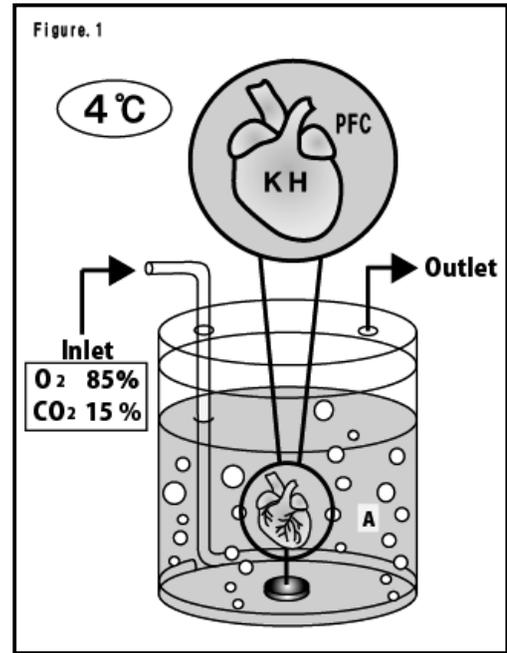


Fig. 1. The isolated hearts were exposed to mixed gas(PCO₂ = 150 hPa and PO₂ = 850 hPa) and the blood was removed from them in Krebs-Henseleit(KH)solution cooled to 4 , which was then infused as a preservative. The hearts were then exposed to mixed gas (PCO₂ = 150 hPa and PO₂ = 850 hPa) , and immersed in PFC cooled to 4 . During the preservation period, the hearts were continuously exposed to CO₂ at 35 ml/min (A, glass)

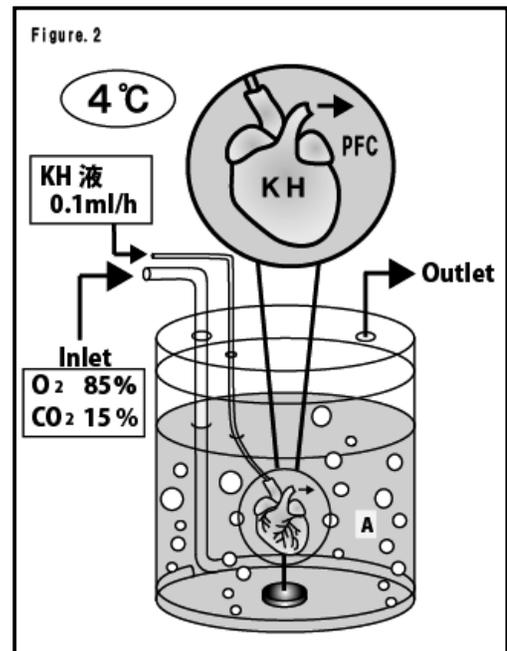


Fig. 2. The isolated hearts were exposed to mixed gas(PCO₂ = 150 hPa and PO₂ = 850 hPa) and the blood was removed from them in Krebs-Henseleit(KH)solution cooled to 4 , which was then infused as a preservative. The inside continued doing perfusion of KH liquid at speed of 0.1ml/h from the aorta of the extraction heart of the donor rat for a during the preservation period, and the hearts were then exposed to mixed gas PCO₂=150hPa and PO₂=850hPa with 80ml/min and immersed in PFC cooled to 4 (A, glass)

また96, 120時間の保存においては上記の方法に, 保存中, 灌流法を加えた. PFC液に浸漬させた摘出心臓へKH液(改良型)を毎時0.1mlの速度で大動脈から灌流し続けた. それぞれ96, 120時間保存した(Fig. 2).

次にレシピエント操作について説明する. ラットにジエチルエーテル吸入麻酔を行った後, 右頸部を広く剃毛, 75%エタノールで術部を消毒後, 約3 cm縦切開した. 皮下の結合組織を電気メスで焼落し, 外頸静脈, 総頸動脈を長く露出させた. 外頸静脈の中枢側をマイクロクリップで遮断後, 外頸静脈の末梢側を結紮切離した. 続いて, 総頸動脈の中枢側をマイクロクリップで遮断後, 総頸動脈の中枢側を結紮切離した. 外頸静脈, 総頸動脈のサイズに合ったcuffをそれぞれ装着後, ヘパリン添加生理食塩水で血管内腔をフラッシュした. 保存してあるドナー心臓をPFC液から取り出し, 生理食塩水に一時的に浸漬した後, レシピエントラットの総頸動脈と外頸静脈, ドナー心臓の大動脈と肺動脈をそれぞれ端々吻合した. 外頸静脈, 総頸動脈のマイクロクリップを外して血液を通し, 移植心臓への血流を再開させ, ドナー心臓が活動を開始するかどうか確認した. その後, 頸部の切開皮膚を縫合した. レシピエントラットに抗生物質を溶解させた飲用水を与え, 飼育室にて事後観察を行った. その後, レシピエントラットとドナーラットの心臓の拍動を心電図で記録した.

炭酸ガス(150hPa)を曝気させ続けた4のPFC液にて48から120時間保存後, 20例の異所性心移植を実施し蘇生させた.

48時間保存では5例異所性心移植を行い蘇生させ, 5例は心拍動を確認した. また移植してから10週間後, 心電図にて移植心臓の拍動を記録できた.

72時間保存では5例異所性心移植を行い蘇生させ, 5例は心拍動を確認した. また移植してから10週間後も心電図にて移植心臓の拍動を記録できた.

96時間保存では5例異所性心移植を行い蘇生させ, 5例は心拍動を確認した. また移植してから24時間後, 移植心臓の拍動は確認できなかった.

120時間保存では5例異所性心移植を行い蘇生させ, 4例は心拍動を確認した. また移植してから24時間後, 移植心臓の拍動は確認できなかった.

それぞれ対照実験として供給するガスに純酸素, 純ヘリウム, 標準空気をを用い, 他は同一条件として保存蘇生実験を実施した. 純酸素, 不活性ガスである純ヘリウム, 標準空気をそれぞれ個別に毎分80mlを曝気した後, 異所性心移植を実施したが, 各5例の全てのドナー心臓の拍動は見られなかった(Table 1). 摘出心臓移植後のレシピエントラットの心電図をFig. 3に示した.

Kuroda et al. (1995)は, ラットの心腔内にUW液を満たし摘出した心臓全体をPFC液に浸漬し, PFC液を通じて酸素を供給することにより, 摘出心臓を最大48時間保存後, 蘇生させ異所性心移植を行い6週間生存(4/5 = 80%)させたことを報告した¹²⁾. 今回, 我々は上記の方法を改良し, ラットの摘出心臓をPFC液に浸漬し, 酸素に加えて炭酸ガスを分圧100hPa

Table 1. Hearts exposed to CO₂ gas in PFC solution are indicated by 1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 3, 4, 5, and 6 in the table.

Hearts exposed to pure O₂, pure He, and standard air in PFC solution are indicated by 3, 4, 5, and 6, respectively.

The resuscitation rate following heterotopic transplant after preservation of the heart and the 10-week survival rate are shown for each heart.

Tests of significance using one-way analysis of variance (ANOVA) were conducted for the control experiments

1A, 1B, 2A, 2B, and 3, 4, 5, and 6 with preservation by CO₂ exposure, respectively. (= P<0.05)

Group	Preservation method	Perfusion speed	Preservation time	n	Resuscitation rate(%)	Ten-weeks survival rate(%)
1A	KH/PFC+CO ₂ (150hPa)		48	5	5/5(100)	5/5(100)
1B	KH/PFC+CO ₂ (150hPa)		72	5	5/5(100)	5/5(100)
1C	KH/PFC+CO ₂ (150hPa)		96	5	0/5(0)	0/5(0)
2A	KH/PFC+CO ₂ (150hPa)	0.1ml/h	96	5	5/5(100)	0/5(0)
2B	KH/PFC+CO ₂ (150hPa)	0.1ml/h	120	5	4/5(80)	0/5(0)
3	KH/PFC+O ₂		48	5	0/5(0)	0/5(0)
4	KH/PFC+He		48	5	0/5(0)	0/5(0)
5	KH/PFC+Air		48	5	0/5(0)	0/5(0)
6	control		0	5	5/5(100)	5/5(100)

Figure 3.

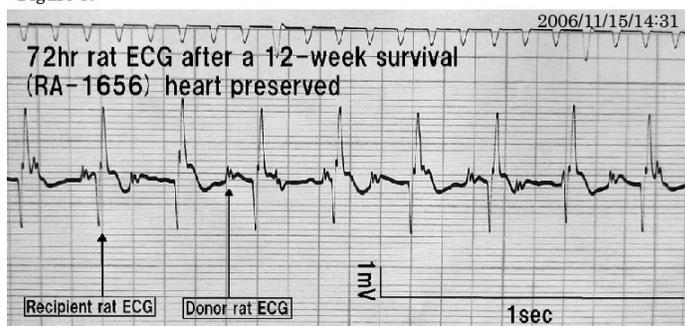


Fig. 3. An isolated heart of a donor rat(RA-1656)was preserved for 72 hr, after which it was heterotopically transplanted to the recipient rat and resuscitated. An ECG was recorded after 12 weeks. Preservation was started on August 18, 2006, the heart was heterotopically transplanted on August 21, 2006, and the ECG was recorded on November 15, 2006. Heading above figure:ECG after 12 weeks survival of a heart preserved for 72 hr; donor rat(RA-1656)

で曝気供給しながら摘出心臓を保存した. この結果72時間以上保存した心臓を, レシピエントラットの右頸部に異所性心移植を実施し, 24週間以上生存させることができた. CO₂濃度以外の変更点として本実験では, UW液の代わりにKH液を用いた. UW液を用いて72時間以上の保存を試みたが, 蘇生において心房の一部の細動しか見られなかった. 一方, KH液においては良い結果が得られた. KH液が最善とする理由はなく, 最適の保存液については今後とも探求していくが, UW液の高粘性が長時間の保存には適さないように思われる. また, 摘出した心臓がPFC液から浮き上がらないように心臓に付着する血管を長めに採取しそれを容器にひもでくくりつけた. 心臓を上からネットで押さえつけると組織の一部が多少とも傷害される可能性があるが, 我々の方法ではあたかも風船のように摘出心

がPFC液の中に浮かんでいて機械的な組織傷害の可能性はない。また、心臓が生着していることが外から判断できる異所移植法として頸部異所性心移植を用いた。

本研究の最も重要な点は、摘出心臓をPFC液を通じてやや高い濃度の環境下で保存した点である。CO₂は容易に組織に拡散するため摘出心臓の組織全体が高い濃度のCO₂環境下にあると考えられる。CO₂は多くの生物学的実験ではO₂を混合して、bufferとの併用下でO₂/CO₂ = 95 % / 5 % (大気圧下5 %のCO₂は、ほぼ生体内のCO₂濃度35mmHgと同等)として使用される。一方、高濃度のCO₂ = 15 ~ 20 %以上では麻酔作用、代謝抑制作用をもち¹³⁻¹⁴⁾、実験動物の麻酔¹⁵⁾、穀物の保存、魚の輸送保存にも商業的に使われている¹⁶⁻¹⁷⁾。このようなCO₂の効果の機序については蛋白質の生体高分子の表面に吸着して保護するという説¹⁸⁾、CO₂同様に麻酔作用¹⁹⁾、代謝抑制作用²⁰⁾、植物の保存²¹⁾に使われるXe等の不活性ガスと同様に生体内の水分子の集合体をなんらかの意味で構造化する²¹⁾ことが効果の主因ではないかとする説もある。しかし、CO₂溶解に伴って起こるpHの低下の影響も関与していると考えられ、詳細はいまだに不明である。

本研究の著者の一人であるSeki *et al.* (1998) は体内の水分量を減少させた状態のクマムシがperfluorocarbon (PFC) の中で6000気圧の超高压下におかれても蘇生しうることを示した¹⁰⁾。

生命体がこのように体内の水分量を減少させて代謝を低下させ、乾燥、低温などの極限環境に適応することはcryptobiosisとよばれているが、北極圏の植物の乾燥休眠や、多くのバクテリアが、相対湿度が60 %以下になると休眠状態になる現象など自然界で広範囲に見られる現象で、細菌の場合は乾燥保存法として実用化もされている。この現象の一つの特徴は細胞内の水の一部が失われるのであるが、生体高分子表面を保護する結合水は残り、自由水が減少し、それに伴って細胞内の代謝が再生可能な限界内で低下することと考えられる。このことから組織または細胞内の構造化された水を残し、自由水を組織や細胞に傷害を与えず再生可能な方法で取り除けば、代謝の低下が起こり組織の長期間保存ができる可能性があると考え、哺乳動物の摘出臓器を保存する実験に取り組んだ。1998年から現在までPFC液を用いながら水分量を減少させ蘇生させる実験をラットとブタで多数行い、時には良い結果を得たが再現性には乏しかった。その後CO₂ガスが上記のごとく生体に対して麻酔作用、代謝抑制作用を持つことに着目し水分量減少と高濃度(20 %)の環境下で心臓保存の実験を行い一定の結果を得た。2005年には2気圧の高圧下でCO₂分圧が400hPaの環境下でラット摘出心臓を、24時間水分を減少させながら保存した後、蘇生させ、レシピエントラットに異所性心移植できることを再現性をもって示した¹¹⁾。生体内の結合水を保持し自由水の水分量を減少させるのと同様にCO₂ガスは自由水を構造化させることを示唆したが、生物物理学的にそのことを立証するのは今後の課題である。

このように、我々の研究は、臓器を乾燥させ水分量を減少させたり、CO₂ガスにより組織の代謝を抑制させたりすることを

主眼としていた。今回、組織へのO₂の供給に着目したKurodaの実験にCO₂濃度の変更を試み、より良い結果を得ることができた。CO₂の効果に着目した組織保存の実験としては、我々のもの以前にはOhta *et al.*^{13, 22)}のものがあり、Modified Euro-Collins液にCO₂を付加して犬の血管の保存について良い結果を得ているが、同様の実験をラット心臓について行ったところ、48時間以内でも蘇生は見られなかった。これは心筋がより多くのO₂供給を必要とするためと考えられ、PFC液使用下ではO₂の供給が改善して保存時間が延長できたと考えている。また、組織内の自由水の濃度の測定は困難であるが、PFC液浸漬下でのO₂、CO₂ガス曝露は組織水分量を減少の方向に傾けることが考えられ、自由水の減少と組織保存効果の関係も今後の検討課題である。

我々の研究は水分量の減少やCO₂ガスにより組織の代謝を抑制し保存時間を延長しようとするものであった。あたかも人工的に組織を冬眠に導くことと考えられる。一方で電子伝達系の酵素の阻害²²⁾や低温暴露²³⁾をして生命活動そのものを、その後蘇生できるような形で一時的に停止させる方法で臓器保存を行おうとする考え方もありsuspended animationといわれている。いずれも生命あるものと物質のごとき状態を自由に行き来できることを目指す技術的試みであり、これらを総合してsemibiologyと呼ぶことを提案したい。

我々は、さらなる保存時間の延長を目指して研究中であり、心筋細胞の休眠状態を維持するための最適の炭酸ガス分圧と浸漬液、保存液の選択または作成、特にCO₂に伴うpHの低下を防ぐためのModified Euro-Collins液²²⁾に準じた緩衝液を用いた実験を施行中である。また実用段階を目指して、より大型の動物の心臓に応用できるように灌流法の併用も試みている。またCO₂の効果に関する基礎的な研究とともに、保存組織のATP濃度や顕微鏡的組織像からの研究も検討している。

酸素と炭酸ガスの混合ガス環境下やPFC液下で臓器を保存すると乾燥が進行する。時間の経過と共に摘出臓器の重量が実験前と比較し、-30 %以上乾燥させるとほとんど蘇生できなかった。この原因は、摘出心臓を4の低温下で保存しても、非常に代謝が減少するにも関わらず、心臓自体が酸素代謝を行っていたためであると考えられる。

臓器保存と一酸化炭素ガス(CO)

本実験では、日本SLC株式会社で臓器移植用に開発された近交系のラットLEW/Slc (、6週齢)をドナーとレシピエントとして使用した。CO₂ガスによる乾燥保存時利用したドナー操作を使用した。7ATAの高圧チェンバー内にラットの摘出心臓をCO (400hPa)とCO₂ (100hPa)とO₂ (900hPa)とHe (5600hPa)による高圧チェンバー内に保存後、冷蔵庫(4)内に置いた。KH液には抗生物質、ワーファリンを加え溶解させたものを用いた (Fig. 4)。

高圧チェンバー内は蒸留水を満たしたピーカーを置き、チェンバー内湿度を90 %以上に保持した (Fig 1)。24時間後、CO₂による保存蘇生法時に用いた異所性心移植法により心臓への血

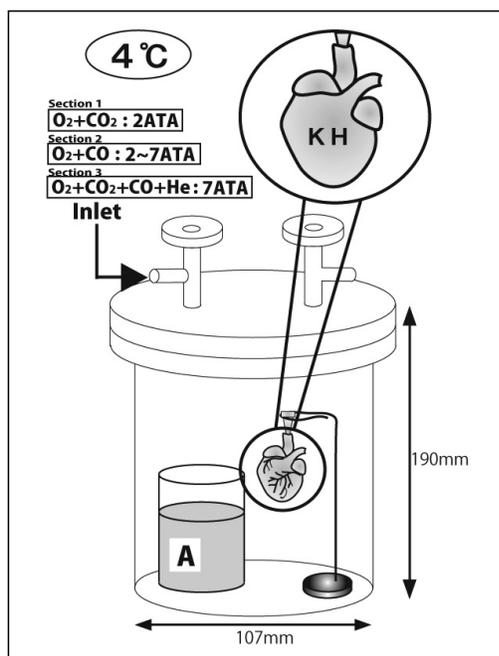


Fig. 4. A hyperbaric chamber was used for the preservation of isolated heart. A beaker filled with distilled water was placed inside the chamber to maintain the humidity at over 90%. The heart was filled with KH solution into which antibiotics and warfarin sodium were dissolved and it was hung as shown in the illustration.

[Section 1] The mixture of CO and O₂ was pressurized from 2 ATA to 7 ATA and the chamber was put in a refrigerator and stored at 4 °C for 48 hr.

[Section 2] The mixture of O₂, CO₂, CO and He was pressurized up to 7 ATA and the chamber was put in a refrigerator and stored at 4 °C for 72 hr.

流を再開させ、ドナー心臓が活動を開始するかどうかを確認した。その後、頸部の切開皮膚を縫合した。手術後、レシピエントラットにヘパリンナトリウム 100 単位を添加した生理食塩水 1.0 ml を静脈投与し、移植心臓における血栓予防を行った。その後、1 週間ごとに移植心臓の心電図を記録した。レシピエントラットに抗生物質を溶解させた飲用水を与え、飼育室にて事後観察を行った。10 週間後、レシピエントラットとドナーラットの心臓の拍動を心電図で記録した。

2ATA の高圧チェンバー内に酸素と一酸化炭素の混合ガスで加圧した 24 時間保存後蘇生させたラット摘出心臓をレシピエントラットの総頸動脈と大動脈、外頸静脈と肺動脈をそれぞれ端々吻合し、33 例の異所性心移植を行い、移植直後に拍動を心電図で記録できたものは 14 例であった。その内、心室・心房まで蘇生が見られたのは 11 例、心房のみの蘇生が見られたのは 3 例であった (Table 2)。8 週間後に拍動を確認し、心電図を記録できたものは 11 例であった (Fig. 5)。対照実験として純酸素、純ヘリウム、標準空気、He と CO の混合ガス、(PHe = 1400hPa, PCO=600hPa), CO₂ と CO の混合ガス (PCO₂=1400hPa, PCO=600hPa) を用いて同一条件で保存蘇生実験を実施した。He と CO の混合ガス (PHe = 1400hPa+PCO=600hPa) で保存したもののみわずかな蘇生 (心房の拍動: 4 体 / 5 体) が見ら

Table 2. An isolated rat heart was preserved in a hyperbaric chamber of 2 ATA of a mixture of CO and O₂, with predetermined level of CO partial pressure. After 24 hr preservation, it was heterotopically transplanted. This table indicates the rate of resuscitation immediately after the transplantation and the rate of survival 10 weeks later.

Group	Preservation method	Preservation time (hr)	The number of hearts	Resuscitation rate (%)	Ten weeks survival rate (%)
1A	O ₂ 1800hPa +CO 200hPa	24	5	3/5 (60)	3/5 (60)
1B	O ₂ 1600hPa +CO 400hPa	24	5	5/5 (100)	5/5 (100)
1C	O ₂ 1400hPa +CO 600hPa	24	5	5/5 (100)	3/5 (60)
1D	O ₂ 1200hPa +CO 800hPa	24	5	1/5 (20)	1/5 (20)
1E	O ₂ 1000hPa +CO 1000hPa	24	5	1/5 (20)	0/5 (0)
2	control	0	10	10/10 (100)	10/10 (100)

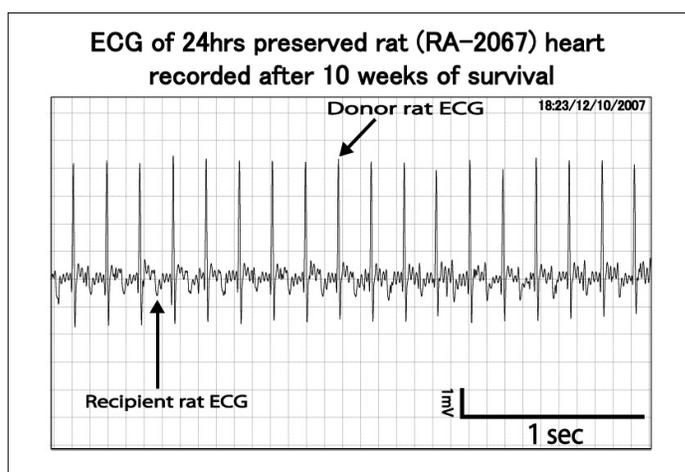


Fig. 5. An isolated rat heart was put into a hyperbaric chamber which was pressurized to 2 ATA with PO₂=1600 hPa+PCO=400 hPa. After 24 hr of preservation, the preserved heart was heterotopically transplanted to the neck of a recipient rat and was resuscitated. Ten weeks later on October 12, 2007 this ECG was recorded for the donor rat heart and the recipient rat heart.

れたが、残りの対照実験の各 5 例の全てのドナー心臓の拍動は見られなかった。

7ATA にラットの摘出心臓を CO (400hPa), CO₂ (100hPa), O₂ (900hPa), He (5600hPa) にて 72 時間曝露保存後、レシピエントラットの右頸部に異所性心移植をし、3 ヶ月間以上生存させることができた。72 時間保存し異所性心移植後 10 週間後に拍動を確認し、心電図を記録できたものは 8 例であった (Fig. 6-7, Table 3-4)。対照実験として使用した加圧ガスとして純酸素、純ヘリウム、標準空気を、他は同一条件として保存蘇生実験を実施し、異所性心移植を実施したが、各 5 例の全てのドナー心臓の拍動は見られなかった。

Anthony (1961) は、9 から 10cm の金魚の水槽に CO を溶解 (0.3ml/L) させて生存時間を観察する実験を行った²⁴⁾。摂氏 5, 15, 30 の環境に FCO=80, FO₂=20 の混合ガスで毎分

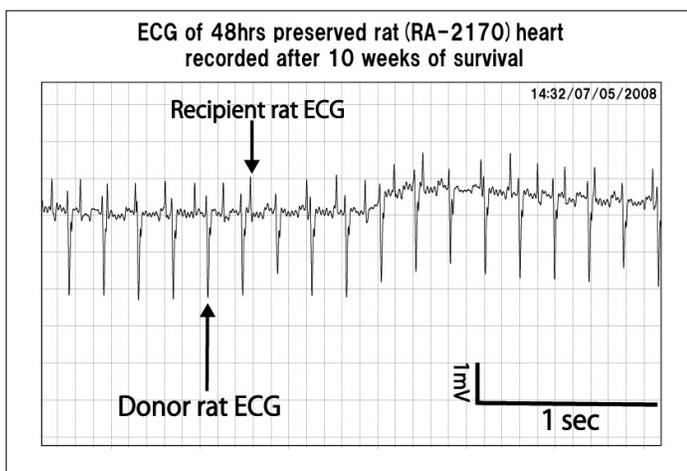


Fig. 6. Isolated rat heart was put in a hyperbaric chamber and kept there for 48 hr at 7 ATA ($PO_2=3000$ hPa + $PCO_2=4000$ hPa) and then was transplanted heterotopically to the neck of a recipient rat and was resuscitated. This ECG was recorded on May 7, 2008 from the donor heart and recipient heart.

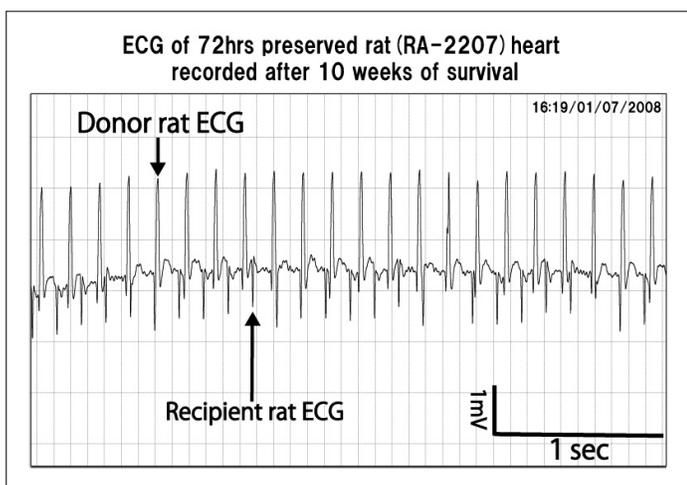


Fig. 7. Isolated rat heart was placed in a hyperbaric chamber and was compressed with $PCO=400$ hPa+ $PCO_2=100$ hPa+ $PO_2=900$ hPa+ $PHe=5600$ hPa. After 72 hr of preservation, the heart was transplanted heterotopically to the neck of the recipient rat and was resuscitated. Ten weeks after resuscitation, on July 1, 2008, this ECG was recorded from the donor rat heart and the recipient rat heart.

100ml/min曝気して金魚は48時間生存することを観察している。COによりHbを不活化した金魚で観察したところ30で24時間以内に死んだのに対して、より低温では長時間生存したことを観察した。Anthonyによれば、COHb化が進行すれば哺乳動物や鳥類は急速に死を招く。多くの変温動物は一酸化炭素の中毒から生き延びることができる。その理由として多くの変温動物は酸素代謝から他の代謝に切り替えが可能なためと推測している²⁴⁾。FennとCobb(1932)は、 $FCO=79, FO_2=21$ の混合ガスにカエルを曝露すると筋肉が1.5から3倍の濃いローズ色に変化する事を報告している。また呼吸商の変化からCOが

Table 3. Isolated rat heart was preserved 48 hr in a hyperbaric chamber of 7 ATA pressurized by CO and O₂ with their respective level of partial pressure. The resuscitation rate immediately after transplantation and the survival rate 10 weeks after the operation are indicated here.

Group	Preservation method	Preservation time(hr)	The number of hearts	Resuscitation rate(%)	Ten weeks survival rate(%)
1A	O ₂ (3000hPa)+CO(4000hPa)	48	5	5/5(100)	4/5(80)
1B	O ₂ (2500hPa)+CO(4500hPa)	48	4	4/4(100)	3/4(75)
2	control	0	10	10/10(100)	10/10(100)

Table 4. Record of an Experiment, After 72 hr of preservation, the heart was transplanted heterotopically to the neck of the recipient rat and was resuscitated.

Preserved 72 hours by carbon monoxide mixed gas.
 Experimental Rat: No. RA-2238 LEW/SsN Slc (σ⁷) 6 weeks old
 Date: May 20 2008 (Tuesday) temperature: 24 °C, humidity: 51%
 17:15 Body weight: 246g
 17:22 1.0 mg dose of heparin sodium
 17:26 KH solution
 17:28 Removal of the heart preserved in KH solution.
 17:47 Isolated heart weight: 1.430g
 17:55 Isolated rat heart was placed in a hyperbaric chamber where it was exposed to 4 different gases; $PCO=400$ hPa, $PCO_2=100$ hPa, $PO_2=900$ hPa, $PHe= 5,600$ hPa, and the chamber was kept in a refrigerator at 4 °C.
 After preservation of 72 hours, heterotopic transplantation.
 May 23 2008 (Friday) temperature: 24 °C, humidity: 61%
 16:30 Hyperbaric chamber was opened to take out donor heart.
 16:31 Isolated heart weight: 1.423g (-1%)
 16:32 Starting a donor heart transplant to recipient rat.
 16:36 Donor heart transplant ended.
 16:37 Starting reperfusion.
 16:46 Donor rat heart started to pulsate sharply and clearly.
 16:50 Surgical suture of the recipient rat skin over the donor heart.
 17:00 Observation of postoperative recovery in animal room.

CO₂に置換すると推察したが、その後、C₁₄やC₁₁の炭素同位体を用いた研究を行いCOが生体内でCO₂に酸化することは現在否定されている²⁵⁾。

一酸化炭酸ガスは、シトクロム酸化酵素のFe²⁺と結びついて、この酵素の活性を抑制する作用がある。この酵素はブドウ糖からエネルギーを産出させるために不可欠な酵素であり、生体はこの酵素なしでは生きていくことはできない。一酸化炭素は、ラットの摘出心臓の細胞内の代謝を低下させ壊死を防止する効果があり、移植用のドナー心臓の長時間の保存が可能になったものと示唆された。異所性心移植後も心拍動が見られたことからこのことが裏付けられた。結論として我々はラットの摘出心臓を一酸化炭素分圧400hPaに24時間曝露し保存後蘇生させ、移植後も移植心臓が活動し再現性がある新しい保存技術を開発することに成功した。なおPCOを1000hPaから2000hPaまでの高分圧の一酸化炭素環境下に24時間以上曝露する40例以上の実験を実施したがいずれも蘇生はみられなかった。

大気中に存在する一酸化窒素(NO: nitrogen monoxide)は、酸素と同じようにラジカルである。NOは大気を汚染して

いる窒素酸化物の一つであり、今まで悪玉分子として扱われてきた。しかし、FurehgottとZawadzki(1980)は、体内でNOが血管を拡張したり筋肉を弛緩させたりする物質として最初に報告後、飛躍的に研究が進みNOは生命活動に必須の善玉分子であることを示す実験結果が示されてきた²⁶⁾。NOは生体内で作られるが呼吸器を通して血液のHbやMbと親和性を示しNOHbやNOMbになるが、NOHbはHbを守る機構によりすぐ元のHbに戻ることが確かめられている。血液中のHbと親和性を示すCOもNOと同様に生体内で作られ、神経伝達、血管拡張に役立っている報告もされるようになってきた²⁷⁻²⁸⁾。

COは、Bernard(1857)の研究以来CO中毒として悪玉分子にとして位置づけられている²⁹⁾。COの生体への作用のメカニズムは未だ不明であるが精力的に基礎や応用研究されている³⁰⁻³²⁾。COは生体内のヘム蛋白質との親和性が大変高く、ヘム蛋白質の機能を阻害する。ヘム蛋白質には血中ヘモグロビン、筋ミオグロビン、シトクロム、カタラーゼ、ペルオキシダーゼなどであり、これらは酸素運搬、電子伝達、酵素作用により酸素代謝に関係している。このうち一酸化炭素とヘモグロビンが結合したものを、一酸化炭素ヘモグロビン(カルボニルヘモグロビン、COHb)という。一酸化炭素に対するヘモグロビンの親和力は、酸素のそれに比べて250~300倍と大きく、血液中に一酸化炭素が侵入すると、ヘモグロビンは酸素と結合していても一酸化炭素によって置換され、酸素運搬能力が失われてしまう。COHbは一酸化炭素と結合していないヘモグロビンの酸素親和性を高める作用があり、末梢組織において酸素がヘモグロビンから遊離しなくなる。また、他のヘム蛋白質も一酸化炭素との親和性が高く、一酸化炭素と結合して酸素代謝が阻害される。このように一酸化炭素の作用により、生体内において酸素運搬能力が障害を受け、細胞組織が貧血性低酸素症となった状態を一酸化炭素中毒という。一酸化炭素の毒性は大変に強く、ヒトでは一酸化炭素の大気中濃度が0.01%(100ppm)であっても中毒症状が発現する。0.08~0.12%になると、昏睡、呼吸不全、心不全になることがある。濃度が0.08%(800ppm)の時には、血中ヘモグロビンの50%はCOHbとなる。一酸化炭素濃度がさらに上昇して0.15%になると死亡する可能性が出てくる。さらに0.19%(1900ppm)になると、短時間に死亡する³¹⁾。

ラットの摘出心臓を長期間保存するために、一酸化炭素ガスを使用したのは以下のような理由があるからである。今回、このO₂との混合ガス中のCO₂に変わり、動的平行(dynamic equilibrium)の関係にあるCOを加えてみた。一酸化炭素分圧600hPaで24時間曝露し保存したラットの摘出心臓をレシピエントラットの右頸部に異所性心移植蘇生後、蘇生した移植心臓を約3ヶ月以上生存させることができた。蘇生した原因として、一酸化炭素ガスはブドウ糖からエネルギーを産出させるために生体にとって不可欠な酵素であるシトクロム酸化酵素のFe²⁺と結びついて、この酵素の活性を抑制する作用があることで知られている³³⁾。また、この酵素は、一酸化炭素ガスが細胞内代謝を抑制し壊死を防止したのではないかと考えられる。エントロピー増大の法則により、崩壊する構成成分をあえて先回りして

分解し、このような乱雑さが蓄積するよりも早く、常に再構築を行うことができ、すべての分子が高速で入れ替わっているという動的平衡論が知られているが、この仕組みが高圧内における保存心臓内の細胞・組織において、酸素と一酸化炭素の動的平衡が成り立ち、シトクロム酸化酵素のFe²⁺と結びつくことによりこの酵素の活性を抑制していることにより細胞内代謝を抑制し壊死を防止したのではないかと考える³⁴⁻³⁵⁾。0.2MPaの高圧環境下の一酸化炭素と酸素の混合ガス中の一酸化炭素分圧を400hPaで保存すると最も蘇生率が高いことがわかり、100%濃度の一酸化炭素で摘出心臓を乾燥保存させると移植直後、拍動は見られたが、生着まで至るものはなかった。また不活性ガスのヘリウムや二酸化炭素と、一酸化炭素ガス(600hPa)を混合し、摘出心臓を保存したが、移植蘇生直後の拍動は見られたが生着まで至るものはなかった。

まとめ

ラットの摘出心臓をCOガス(PCO=2000hPa、ヒトの致死量の2500倍の分圧)に曝露する実験を行ったところ、24時間以上経過しても水分の喪失は起こらなかったことで明らかとなった。反対にCO₂ガス(PO₂=2000hPa)に摘出心臓を24時間曝露すると、-30%の水分喪失が生じることが明らかとなった。高分圧のCOは、酸素代謝を完全に抑制する効果があり水分喪失が生じないことが示唆された。高分圧の二酸化炭素は、嫌気性バクテリアを増殖させ、高分圧酸素は好気性バクテリアを増殖させることが知られている。今回のPCO=400hPaという高分圧の一酸化炭素は、好気性バクテリアと嫌気性バクテリアの自己複製を抑制する作用があり、72時間という長時間の保存が可能になったものと思われた。物理学や化学の世界では、COは使用されていたが、生物学の世界ではCOは使用されていなかった。本実験の成果は、今後、一酸化炭素や二酸化炭素が他の哺乳動物やヒトの臓器の保存蘇生が応用できる可能性を示唆するものであった。哺乳動物の摘出臓器を長期間保存蘇生できるパラメーターは、保存ガス分圧、圧力自体、温度、湿度、酸素分圧などをうまくコントロールすれば長期間の臓器保存が可能になることが示唆された。我々の開発した摘出臓器を乾燥させる保存蘇生技術は、生命活動を停止させ再び蘇えらせるsemibiology(半生物学)という新分野を誕生させた。自動車が故障し修理して再び乗れるようになるのは、設計図と部品と修理技術があるからである。ヒトの場合、自動車のように設計図(解剖図)、修理技術(外科手術)は既に完成している。しかし、部品(臓器)がない状態である。部品は、ヒトの脳死者からの供給に頼っているが、臓器の最大保存期間は24時間である。私たちの臓器保存蘇生技術は、部品(臓器)を24時間から72時間に伸ばしたことである。20世紀は導体の世界から半導体の世界に入った。Semibiologyの技術が発展し、臓器の保存期間を1年間以上に延長させることができた場合、半導体のようにヒトの寿命も半永久的になるものと思われる。自然界の植物や動物が毎年のように自ら乾燥休眠し、翌年の春に覚醒している自然現象は、既に植物や動物の細胞・組織に応用され

保存方法としての実用化が図られている。我々は、この自然界で毎年のように繰り返し替えられている生物の覚醒休眠現象を、哺乳動物の摘出臓器に応用できることを本実験で示すことができ、しかも再現性があることを示すことができた。

参考文献

1. Kalayoglu M, Sollinger HW, Stratta RJ, D Alessandro AM, Hoffmann RM, Pirsch JD, Belzer FO. Extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Lancet* 1988;2:617-619.
2. Cooper JD, Patterson GA, Trulock EP. Results of single and bilateral lung transplantation in 131 consecutive recipients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107:460-471.
3. Heffner JE, Pepine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defence. *Am Rev Respir* 1989;140:531-554.
4. Oz MC, Pinsky DJ, Koga S, Liao H, Marboe CC, Han D, Kline R, Jeevanandam V, Williams M, Morales A, et al. Novel preservation solution permits 24-hours preservation in rat and baboon cardiac transplant model. *Circulation* 1993;88:291-297.
5. Pegg DE. Organ preservation. *Surg Clin North Am* 1986;66:617-632.
6. Makowka L, Zerbe TR, Chapman F, Qian SG, Sun H, Murase N, Kormos R, Snyder J, Starzl TE. Prolonged rat cardiac preservation with UW lactobionate solution. *Transplant Proc* 1989;21:1350-1352.
7. Yeh T Jr, Hanan SA, Johnson DE, Rebeyka IM, Abd-Elfattah AS, Lee KF, Wechsler AS. Superior myocardial preservation with modified UW solution after prolonged ischemia in the rat heart. *Ann Thorac Surg* 1990;49:932-939.
8. Tsutsumi H, Oshima K, Mohara J. Successful orthotopic cardiac transplantation following 24-hr preservation using a hypothermic perfusion apparatus in canine hearts. *J Heart Lung Transplant* 2000;19:60-61.
9. Yoshino T, Sotome I, Ohtani T, Isobe S, Oshita S, Maekawa T. Observations of xenon gas-treated barley cells in solution by atomic force microscopy. *Electron Microscopy* 2000;3:483-486.
10. Seki K, Toyoshima M. Preserving tardigrades under pressure. *Nature* 1998;395:853-854.
11. Seki K, Yoshida Y, Mizushima Y, Usui T, Usui M. Preservation of rat heart under hypercapnic and hyperbaric condition (in Japanese) *Jpn J Hyperbaric Med* 2005;40,26(P183)
12. Kuroda Y, Kawamura T, Tanioka Y, Morita A, Hiraoka K, Matsumoto S, Kim Y, Fujino Y, Suzuki Y, Ku Y, et al. Heart preservation using a cavitory two-layer (University of Wisconsin Solution/Perfluorochemical) cold storage method. *Transplantation* 1995;59:699-701.
13. Ohta T, Yasuda A, Mitsuda H. Effect of carbon dioxide on conservation of physiological activities of animal tissue. *Proc Jpn Acad* 1987;63B:340-343.
14. Schaefer KE, Messier AA, Morgan C, Baker GT. Effect of chronic hypercapnia on body temperature regulation. *J Appl Physiol* 1975;38:900-906.
15. Danneman P J Stein S. Walshaw S O Humane and practical implications of using carbon dioxide mixed with oxygen for anesthesia or euthanasia of rats. *Lab Anim Sci* 1997;47:376-385.
16. Mitsuda H, Nakajima K, Mizuno H, Kawai F, Yamamoto A. Effects of carbon dioxide on carp. *J Nutr Sci Vitaminol* 1980;26:99-102.
17. Mitsuda H, Ueno S, Mizuno H, Ueda T, Fujikawa H, Nohara T, Fukada, C. Effects of carbon dioxide on serum biochemical patterns and on histopathological changes of organ in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 1982;28:105-115.
18. Mitsuda H, Kawai F, Yamamoto A, Nakajima K. Carbon dioxide-protein interaction in a gas-solid phase. *J Nutr Sci Vitaminol* 21:151-162;1975.
19. Goto T, Nakata Y, Morita S. How does xenon perspective from electrophysiological studies. *International Anesthesiol Clin* 2001;39:85-94.
20. Bruemmer JH, Brunetti BB, Schreiner HR. Effects of helium group gases and nitrous oxide on HeLa cells. *J Cell Physiol* 1967;69:385-92.
21. Tanaka H, Nakanishi K. Hydrophobic hydration of inert gases. Thermodynamic properties, inherent structures, and normal-mode analysis. *J Chem Phys* 1991;95:3717-3727.
22. Ohta T, Yasuda A, Mitsuda H. Effect of carbon dioxide on conservation of vasoactivity of canine mesenteric arteries. *Transplantation* 1989;47:740-742.
23. Behringer W, Safar P, Wu X, Kentner R, Radovsky A, Kochanek PM, Dixon CE, Tisherman SA. Survival without brain damage after clinical death of 60-120 min in dogs using suspended animation by profound hypothermia. *Crit Care Med* 2003;31:1523-1531.
24. Anthony E H. Survival of goldfish in presence of carbon monoxide. *J Exp Biol* 1961;38:109-125.
25. Root W S. Carbon monoxide. *Handbook of physiology. Respiration* 1965;11:1087-1098.
26. Furehgott R F, Zawadzki J V. The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
27. King G M. Molecular and culture-based analysis of aerobic carbon monoxide oxidizer diversity. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:7257-7265.
28. Mendelman A, Zarchin N, Meilin S, Guggenheimer-

- Furman E, Thom SR, Mayevsky A. Blood flow and ionic responses in the awake brain due to carbon monoxide. *Neurol Res*;2002;24:765-72.
29. Bernard C. *Lecons sur les effets des substances toxiques et medicamenteus*. Paris: barillere. 1857
30. Maulik N, Engelman DT, Watanabe M, Engelman RM, Rousou JA, Flack JE 3rd, Deaton DW, Gorbunov NV, Elsayed NM, Kagan VE, Das DK. Nitric oxide/carbon monoxide. A molecular switch for myocardial preservation during ischemia. *Circulation* 1996;94(9 Suppl)II1398-406.
31. Nakao A, Kimizuka K, Stolz DB, Seda Neto J, Kaizu T, Choi AM, Uchiyama T, Zuckerbraun BS, Bauer AJ, Nalesnik MA, Otterbein LE, Geller DA, Murase N. Protective effect of carbon monoxide inhalation for cold-preserved small intestinal grafts. *Surgery* 2003;134:285-92.
32. Kohmoto J, Nakao A, Kaizu T, Tsung A, Ikeda A, Tomiyama K, Billiar TR, Choi AM, Murase N, McCurry KR. Low-dose carbon monoxide inhalation prevents ischemia/reperfusion injury of transplanted rat lung grafts. *Surgery* 2006;140:179-85.
33. White SR. *Treatment of carbon monoxide poisoning*. Carbon Monoxide Poisoning CRC Press, Taylor & Francis Group, NY 2007;341-374.
34. Gorman D, Drewry A, Huang YL, Sames C. The clinical toxicology of carbon monoxide. *Toxicology* 2003;187:25-38.
35. Guggenheim KY. Rudolf Schoenheimer and the concept of the dynamic state of body constituents. *J Nutr* 1991; 121:1701-1704.
36. Prockop LD, Chichkova RI. Carbon monoxide intoxication, an updated review. *J Neurol Sci* 2007;262:122-130.

高分子型ベシクルを用いた新しい生体材料の創製： リポソーム代替材料としてのポリマーソームと 革新的ナノ・マイクロカプセル“ピクソーム (PICsome)”

PICsome Technology: Polymeric Vesicles toward Biomedical Applications

岸村 顕広⁽¹⁾, 片岡 一則^(1,2,3)

Akihiro Kishimura⁽¹⁾, Kazunori Kataoka^(1,2,3)

和文抄録

人工赤血球やドラッグキャリアに用いるカプセル基剤として開発が進むリポソームに代わる材料として、最近、合成高分子化合物を基盤とするベシクル“ポリマーソーム”の開発が進んでいる。これらの大部分は両親媒性のブロック共重合体からなるリポソーム類似の分子集合体であるが、ポリマーならではの堅牢性、およびポリマーの分子設計に基づく生体適合性や生体吸収性をうまく組合せることでリポソームを越える機能を持つに至っている。一方で、両親媒性高分子の利用とは全く異なるコンセプトの下に開発されたのがピクソームである。ピクソームは、ポリイオンコンプレックス形成を利用したベシクルであり、正・負の反対荷電を有するポリマーの水溶液を用いて極めて簡便な手法で得ることができる。得られたピクソームは、特有の物質透過性、及びpH応答能を示した他、水溶性高分子を簡便に封入可能であった。その他、既存の両親媒性ポリマーを用いるシステムでは考えられない特異な挙動を示し、既存の手法とは異なるサイズや構造を制御したベシクル形成法を見出すに至った。本稿では、一般のポリマーソームの基本的性質とその応用、及びピクソームの基本原則とその可能性について概観する。

Abstract

Polymersomes (polymeric vesicles) have attracted great attentions considering potential utilities for biomedical and pharmaceutical applications. Most of polymersomes are composed of amphiphilic block copolymers, like a 'scaled-up lipid'. Compared with liposomes, polymersomes show better mechanical and physical properties and much more useful properties for biomedical applications using biocompatible or biodegradable polymers. On the other hand, PICsomes, one of new families of polymeric vesicles, have been developed utilizing a pair of oppositely charged block copolymers. PICsomes can be obtained directly in an aqueous media in a very simple manner and show quite unique and important characters, such as encapsulation of proteins, semipermeability, pH-sensitivity, and so on. Very recently, exclusive methods to control sizes and structures of PICsomes have been established. In this article, recent advances of polymersomes and PICsomes have been reviewed especially from the viewpoint of biomedical applications.

Keywords

Polymeric Vesicles; Supramolecular Chemistry; Self-assembly; Bottom-up Technology; Drug Delivery System; Artificial Organelle; Artificial Cells.

(1) 東京大学大学院 工学系研究科 マテリアル工学専攻 生体機能材料学講座 〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1 Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656 Japan

(2) 東京大学大学院 医学系研究科 疾患生命工学センター 臨床医工学部門 Division of Clinical Biotechnology, Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

(3) 東京大学 ナノバイオインテグレーション研究拠点 Center for NanoBio Integration, The University of Tokyo

論文受付 2009年5月13日 論文受理 2009年6月23日

1. はじめに

ボトムアップテクノロジーとの関連から、自己組織化を利用したものづくりが注目を浴びているが、分子集合体の制御技術はその中核を成すものと言える。古くは、生体膜の構成成分である脂質や界面活性剤が中心であったが、いわゆる超分子化学が定着して以降、種々のタンパク質構造体や核酸などを模倣・応用した分子設計がなされ、材料応用が検討されている。1995年、A. Eisenbergらが高分子型ベシクル(自己組織化中空粒子)を最初に報告してからは¹⁾、合成ポリマーの集合体の研究が飛躍的に発展した。中でも、生体適合性で知られるポリマーを用いた集合体は、ドラッグデリバリーシステム(DDS)のキャリアやバイオマテリアルのスキャホールドとして様々な応用が検討されはじめ、いつしか『ポリマーソーム(Polymersome)』という名で定着した(最初に用いられたのは1999年のScience誌掲載の論文と思われる²⁾)。本稿では、人工赤血球をはじめとする医療応用を見据えたりポソーム代替材料としての高分子型ベシクルについて最近の動向を紹介する。特に後半では、筆者らが最近開発した新型の高分子ベシクル『ピクソーム(PICsome)』について、その詳細を解説する。

2. 自己組織化型高分子ベシクル：ポリマーソーム

リポソームを構成する脂質分子からの簡単な類推ではあるが、疎水的な部分と親水的な部分を併せ持つ両親媒性のポリマーを作ることができれば、ポリマーでもベシクルを作ることが可能だと考えられる。この目的に合致したのが、いわゆるブロック共重合体であった。典型的な両親媒性ブロック共重合体は、一つないしは二つの親水性ブロックと一つの疎水性ブロックを有する(Fig. 1)。これらの分子を水中などの極性の高い環境で

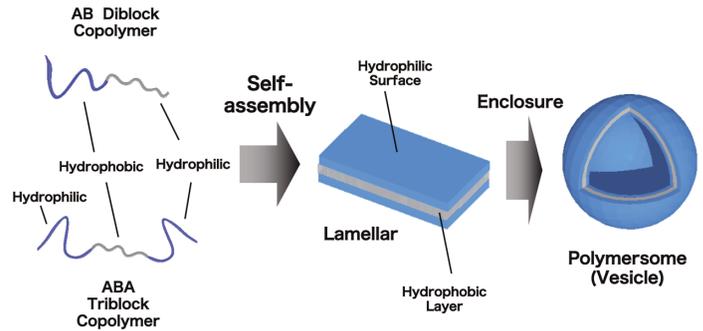
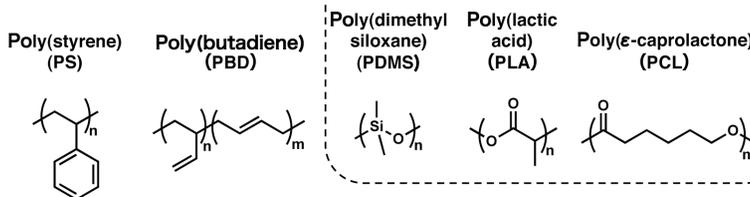


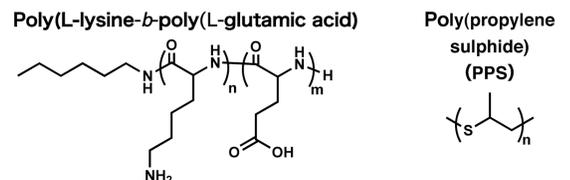
Fig. 1. Schematic representation of the formation of a polymersome through the self-assembly of amphiphilic block copolymers.

集合化させることで、ポリマーソームを作ることができる^{3,4,5)}。実際には、疎水性ブロックが集まって膜構造を形成し、さらに閉じることで小胞を与えるが、この時重要になるのが、親水部と疎水部のポリウム(分子量)のバランスである。あまりに親水部が大きいとミセル(コアのある微粒子)形成が支配的になり、ベシクルを得ることができない。Fig. 2にポリマーソームを作るのに用いられた構成成分の例を示す。これら構成成分の種類や組成(つまり分子量)を変えることで、膜の厚みや物質透過性をコントロールすることができる。例えば、PEG(ポリエチレングリコール)とPBD(ポリブタジエン)の組み合わせのジブロック共重合体について、分子量をコントロールすることで、膜の厚みを約10-21 nmの範囲で制御できる⁶⁾。また、疎水性ブロックの極性や厚みを変えることで、水の浸透性のある程度制御できる⁷⁾。これらは、リポソームでは実現が難しい技術であり、ポリマーを用いる大きな動機づけとなる。また、ポリマーソームは巨大分子を用いて作るため概して疎水層の厚

Hydrophobic Blocks



Environment-responsive Blocks



Hydrophilic & Biocompatible Blocks

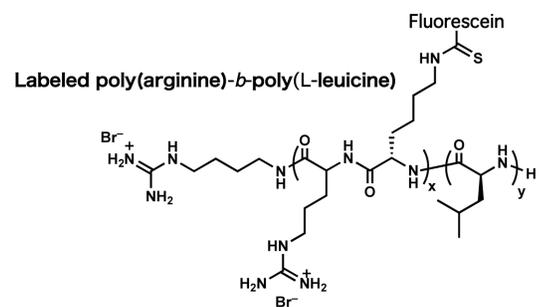
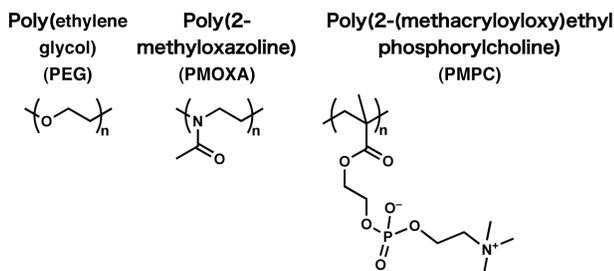


Fig. 2. Representative chemical structures of the polymers which are used as a building block of polymersomes.

みが増しており、脂質膜に比べて堅牢な膜を形成し、機械的な強度や安定性も上昇している^{2,3)}。一方で、これら両親媒性ポリマーは所詮巨大な脂質類縁体に過ぎない部分もあり、特に調製法に関してはリポソーム同様の手法が使える反面、その弱点もそのまま受け継いでしまっていると言える。この点に関しては後述するが、ここでは調製法の類似点のみ指摘しておく。即ち、ポリマー薄膜に水和させた後に、あるいは、ポリマーの有機溶媒溶液の溶媒置換を行った後に、超音波処理やエクストルーダー処理を施すことで、ポリマーソームに物質を充填し成形加工する（サイズを制御し膜数を一枚に揃える）ことができる。興味深い例として、純粋な水系ではなくてしまうところに難があるが、有機溶剤を用いて溶媒の組成をコントロールすることで、得られる一枚膜ベシクルの粒径を制御することができる^{9,9)}。

細かい物性のチューニングが可能な点も魅力ではあるが、バイオマテリアルへの応用を考えた場合、さらに大きな利点がある。それは、生体適合性や生分解性・生体吸収性が知られているポリマーを用いてベシクルを設計できる点である。実際、Fig. 2にも示したコンポーネントなどを用いて、種々のポリマーソームが調製されている。特に、PEGを用いたものは報告例が多い。最も重要な点は、安定性を犠牲にすることなく十分なPEG化が可能な点である。一般のPEG化リポソームは約5mol%の脂質のみがPEG化されているが、これは主にリポソームが不安定化されることなどにより、上限が決まってしまうのが実情である。これに対してPEG含有ポリマーソームは、全てのポリマーがおおのPEG鎖を有しているため、PEG化率は100%となる（この時のPEGの重量分率はおよそ30%程度）。実際、PEG-PBDブロック共重合体を用いたポリマーソームについて、一般的なPEG化リポソームに比べて表面PEG密度が約10倍になっており、ラットにおける血中半減期がおよそ2倍の28時間に上昇したという報告がある¹⁰⁾。この長期血中循環性を応用した例として、人工赤血球、つまり、ヘモグロビンを内包したポリマーソームの報告がある。Palmerらは、以前よりPEG化リポソームを用いた研究をしていたが、PEG-PBD薄膜形成後にヘモグロビン水溶液を水和させることでポリマーソームにヘモグロビンを封入することに成功した。また、ポリマーソームを構成する膜は脂質二重膜に比べて厚いものの、 P_{50} , cooperative coefficient, methemoglobin levelなどを評価した結果、既存のPEG化リポソームやヒト赤血球と比べて遜色のない酸素運搬能を示すことも明らかにした¹¹⁾。その後、彼らは、肝臓や脾臓など細網内皮系に捉えられた後に効率的に分解されるように、PEG-PCL及びPEG-PLAを用いた人工赤血球を作ること成功し、その一方でポリマー濃度を高めることで封入効率を改善する手法も開発した¹²⁾。

ところで、先のPLAやPCLなどのポリエステル類の生分解性を応用したポリマーソームの研究は、Discherのグループにより先駆的な研究がなされている。彼らは、ブロック共重合体としてPEG-PLA（ポリ乳酸）やPEG-PCL（ポリカプロラクトン）を用いてポリマーソームを調製し、制がん剤や遺伝子・核酸のキャリアへ展開している。一般的にポリエステル類の加水

分解は、酸性条件下で加速されるが、細胞内消化器官であるエンドソームが酸性環境（pH 5.0 ~ 6.5）であるため、治療用ナノデバイスに適した素材であると言える。即ち、エンドサイトーシス経路を細胞内取り込み経路と想定した場合、細胞内にこれらナノキャリアが侵入した時のみ薬剤放出が起こる、という仕掛けである。実際には、既存のリポソームに比べて、これらのポリマーソームはより安定なベシクル壁を有するため、疎水的な薬剤をより安定にベシクル壁に充填することができる。このままでは運ぶだけで適切に徐放できず、むしろ弱点になってしまうが、この場合には壁が生分解性であるため、生態環境下で徐放を開始することができる。さらに面白いことに、これらの構成ポリマーはエンドソーム内の局所ポリマー濃度に対応する濃度において脂質膜を破壊する活性を示し、実際、エンドソームから脱出して細胞質に分布する能力にも優れていた¹³⁾。また、ドキシソルピシンを内水相に、タキソールを殻に充填したベシクルを構築し、二つの薬剤を同時デリバリーした結果、マウスを用いたin vivo実験において相乗的な抗腫瘍効果が得られたことを示している¹⁴⁾。彼らは最近、生分解性ポリマーソームのこれらの特性を活かしたオリゴ核酸・siRNAデリバリーの成果も挙げている¹⁵⁾。一方で、生分解性ポリマーを素材に用いると、その保存安定性が懸念される場所であるが、4ヶ月後であっても封入物は95%以上保持される、即ちベシクルが安定に保存可能なことが同じくDischerらにより報告されている¹³⁾。

一方、ポリアミノ酸を用いてpHに応答するポリマーソームを作ることができる。Lecommandouxらの研究グループは、ポリグルタミン酸-ポリリシンのブロック共重合体を用いて、酸性条件下（pH<4）、あるいは塩基性条件下（pH>10）それぞれでベシクルを作り上げることに成功している（Fig. 2）⁶⁾。グルタミン側鎖の低pH領域でのプロトン化、ポリリシンの高pH領域での脱プロトン化により、片方のブロックに疎水的なヘリックスの形成が誘起され、最終的にベシクルが形成される。従って、この系においては中間領域のpHでベシクルは形成されない。一方、Demingらは、ポリリシン誘導体からなる非荷電性親水ブロックとポリロイシンとポリリシンのランダム共重合体からなるブロックのブロック共重合体を用いてポリマーソームを作り、pH応答的に内部に封入した水溶性物質をリリースできる機能があることを見出している¹⁷⁾。また、ポリリシンの代わりにポリアルギニンを用いた場合（Fig. 2；ラベル化ポリアルギニン-*b*-ポリ（L-ロイシン））、ポリマーソームが毒性を示さずに細胞へ効率的に取り込まれることも報告している¹⁸⁾。

この他、生体内の酸化・還元環境を利用するのも面白い。Hubbelらは、PEGとポリプロピレンスルフィド（PPS:酸化しうるポリマー）からなるブロック共重合体を用いて、酸化されることで不安定化するポリマーソームを開発している^{19,20)}。これらは、生体内のH₂O₂や酸化剤発生酵素であるグルコースオキシダーゼの存在を考慮に入れると、非常に有用な材料であると言える。さらに、PEGブロックとPPSブロックの連結部位にジスルフィド結合を導入したPEG-SS-PPSを開発し、細胞質

の還元環境（多くはグルタチオンによる）に反応するシステムを構築している²¹⁾。このように種々の生体内環境に反応するスマートポリマーソームが開発されているが、さらに最近、外部からのコントロールを狙って、光に反応する系の開発も目立ってきている⁵⁾。今後のさらなる展開に興味を持たれる分野である。

ポリマーソームの最後の話題として、人工オルガネラやナノリアクターとしての応用例を紹介したい。親水的なポリメチルオキサゾリン (PMOXA) あるいはポリエチルオキサゾリン (PEOXA) と疎水的なPDMSからなるABA型トリブロック共重合体を用いたポリマーソームのポリマー壁に種々のタンパク質を埋め込み、人工オルガネラやナノリアクターを構築することができる。Montemagnoらは、PEOXA-PDMS-PEOXAを用い、自己組織化後に生じるPDMS層にATPシンターゼ（合成酵素）とバクテリオロドプシン (BR) を埋め込み、光を当てることでATPを生産することができるシステムを開発した (Fig. 3a)²²⁾。Meierらの研究グループはPMOXA-PDMS-PMOXAを用い、PDMS層内でチャンネルタンパク質を再構成し、内水相に酵素を封入することに成功している (Fig. 3b)^{23, 24, 25)}。その結果、チャンネルタンパク質を介した基質分子の透過が可能となり、内部でプロドラッグを活性のあるドラッグに変換したり、基質を化学構造の変換の後に光らせることができるナノリアクターを構築することに成功した。これらの成果は、単に薬剤をデリバリーするだけのカプセルを越えた、新しい治療法や診断手法を提供するバイオナノデバイスとして大きく期待できる。

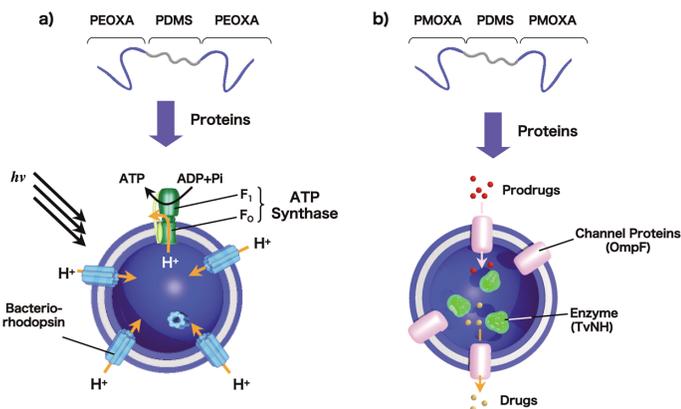


Fig. 3. Examples of nanoreactors based on polymersomes integrated with proteins. a) An artificial organelle consisting of ABA-triblock copolymer, ATP synthase, and bacteriorhodopsin (BR). ATP synthase utilizes an electrochemical proton gradient generated by BR to synthesize ATP. b) A nanoreactor composed of a polymersome, channel protein OmpF that is integrated into a vesicle wall, and enzymes encapsulated inside the vesicle. Inactive prodrugs can be converted to an active form in this nanoreactor.

3. 静電相互作用利用型高分子ベシクル “ピクソーム” (PICsome)

これまで見てきたように、両親媒性高分子型ポリマーソームは、リボソームで培われた様々な手法をそのまま応用できるだけでなく、構造的な安定性、血中安定性などがリボソームに比

べて著しく改善されている点、生分解性などの環境応答性を組み込める点で非常に魅力的な材料である。しかしながら、リボソームのポリマー版でしかない点では発展性の無さを露呈しているとも言える。例えば、これらのベシクルは調製時に有害な有機溶媒を必要としたり、加温や超音波処理などを必要とするなど調製に煩雑な操作が必要となる。また、粒子サイズを揃えるのに繰り返しフィルタを通す操作（エクストルーダー法）も必要となってくる。従って、作製時に施設やコストの面で種々の制限が発生することが予想される。また、これら一連の操作は、非常に繊細な立体構造を有するタンパク質の封入を考えた場合などには失活などが懸念され、特に大きな障害となると考えられる。さらに、高度に疎水的なことで特徴づけられるベシクル壁が、水溶性物質はおろか、水やイオンすらほとんど通さないことは、安定なキャリアにはなりえても、治療に向けて内部に詰めた物質を放出したり、環境応答的に診断を行うのには難があることを示している。一部の弱点は、既に上で述べたような手法により改善されているが、もっと単純で抜本的な解決法はないだろうか。そこで筆者らが生み出したのが『ピクソーム (PICsome)』である。

PICsomeは、両親媒性ポリマーからなるポリマーソームとは一線を画するコンセプトで作られたベシクルである。即ち、静電相互作用を自己組織化の駆動力とするポリイオンコンプレックス形成を利用したポリマー型ベシクルなのである²⁶⁻³²⁾。高分子鎖上に水溶液中でイオン化する多数の官能基を有しているものを高分子電解質というが、特に、プラス電荷、マイナス電荷それぞれ一方の電荷を有している高分子電解質は、反対符号の電荷を有する高分子と遭遇すると直ちに多点の静電相互作用を生じ、エントロピー的な有利さとあいまって速やかに複合体を形成する。これがポリイオンコンプレックス (PIC) である。PICsomeは、生体適合性のPEG鎖とポリアミノ酸由来のカチオン性連鎖、あるいはアニオン性連鎖からなるブロック共重合体をそれぞれ別の水溶液として準備し、各々の荷電数が釣り合うように混合し、たった2分間ボルテックスミキサーで搅拌するという非常に簡便な手法で得ることができる (Fig. 4)。Fig. 4に示したポリマーのうち、PEG-PAspとPEG-P(Asp-AP)を用いたものが最初に見出された第一世代型の1st-G PICsomeである。1st-G PICsomeは、生理条件 (10 mM Tris-HCl; pH 7.4; 150 mM NaCl) で得ることができ、直径2 μmを中心とする粒度分布を示すマイクロカプセルだが、室温で3ヶ月後でも存在し、かつ血清存在下でも安定であった²⁶⁾。一方、PEG-PAspとPEG鎖を有さないホモ型ポリカチオン homo-P(Asp-AP)を用いたものが第2世代型のNano-PICsomeであり、サブミクロンの領域でサイズと構造が制御できる^{31, 32)}。これまでの検討から、PICsomeを得るには、PEG鎖とポリイオン連鎖の長さのバランス²⁶⁾、さらに、PEG含有率や添加塩濃度が重要であることが分かってきている^{27, 28)}。このようなPICsomeには、非常に単純な手法により水溶性の溶質を内部に封入することができる。あらかじめ目的とする被封入物質をどちらか一方の荷電性ポリマー溶液に溶かしておき、前述と同じ要領で混合するだけで終わ

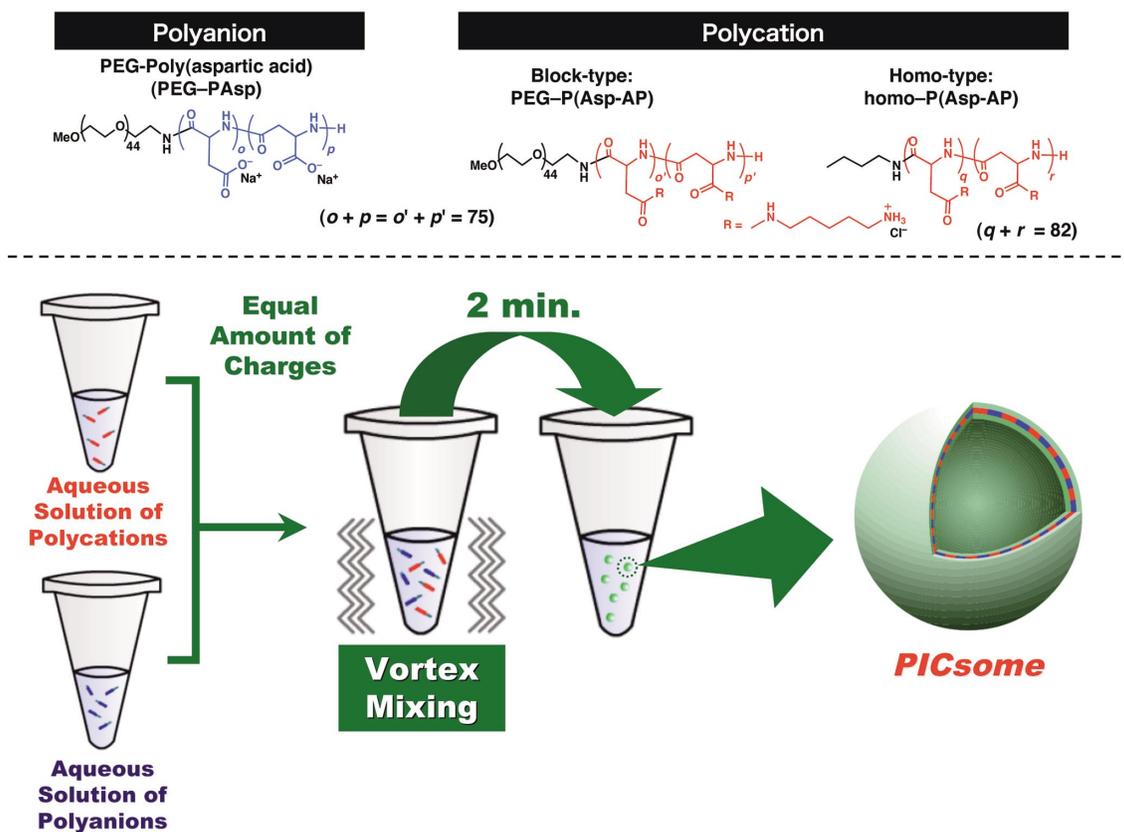


Fig. 4. Chemical structures of charged polymers for PICsome(top) and schematic representation of the formation of PICsome(bottom)

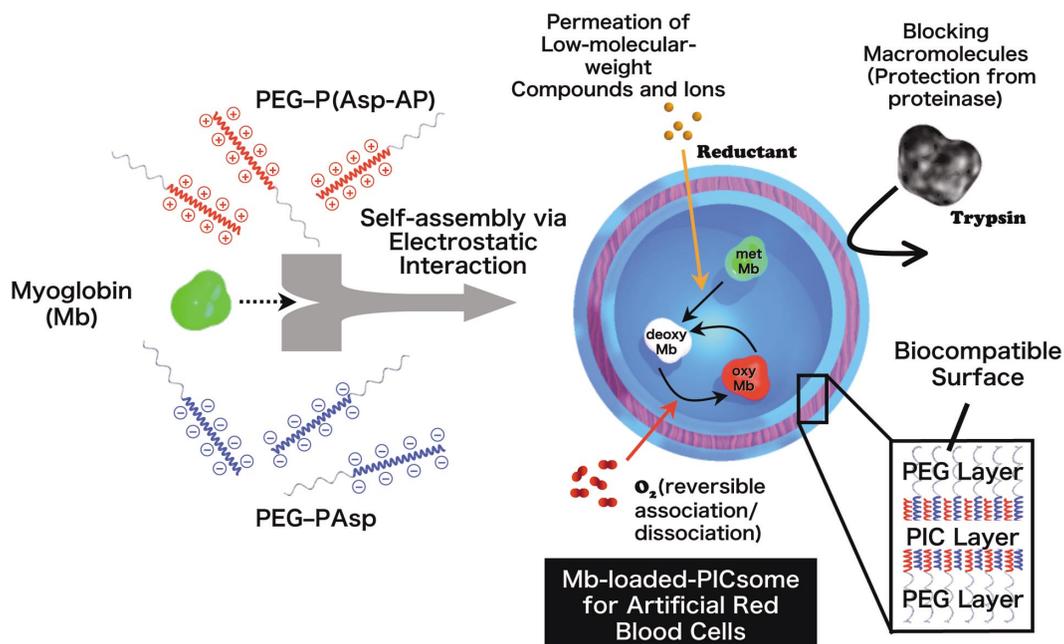


Fig. 5. Schematic drawing of the preparation of a Myoglobin-loaded-PICsome and its characteristic property.

りである。この手法により、既に多糖やタンパク質の封入に成功している^{26, 29)}(Fig. 5)。しかしながら、PICsome内への物質封入は確率的にしか起こらないため、封入効率の向上が今後の課題である。

物性面で、最もPICsomeに特徴的であるのは、ポリイオン

コンプレックス膜に由来する半透性であろう。1st-G PICsomeに関して言えば、分子量4～7万程度の分子は安定に内部に保持されるが、数百程度の低分子は、内外を容易に出入りすることが可能である²⁶⁾。この性質を活かした例として、人工赤血球の構築を視野に入れた酸素運搬タンパク質であるミオグロビン

を封入した 1st-G PICsome がある。ミオグロビン封入後、PICsome 外部に還元剤ジチオナイト ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) を加えると、直ちに活性中心の鉄イオンを還元することができる。これは PIC 膜が高いイオン透過性を持つことに起因する。次に、この溶液に酸素ガスを通じると、ミオグロビンは酸素を結合する。さらに溶存酸素を取り除くために Ar ガスを通気すると酸素は脱離し、吸脱着を繰り返すことができた (Fig. 5)²⁹⁾。この時、ミオグロビンは PICsome の内部に安定に保持されており、たとえ外部にタンパク質消化酵素であるトリプシンを加えても失活せず、カプセルとして保護機能を示すことも実証した。これは巨大分子を通さない PIC 膜の性質をうまく利用した例といえる。また、この 1st-G PICsome のサイズは細胞に近い μm スケールであるが、非常に柔軟性の高い構造体のため、殻がかたいポリマーソームやリポソームに比べて人工赤血球の素材として有利になる可能性がある。

先にも少し述べたが、生体内の特定の環境、例えば、胃をはじめとする消化管、細胞内消化器官であるエンドソーム、多くのがん組織などは程度の差こそあれ低 pH 環境であるため、この環境変化に反応するベシクルはドラッグデリバリーのキャリアとして非常に有望である。最近、我々は、1st-G PICsome 自身が pH 応答性を示すことを見出した³⁰⁾。1st-G PICsome は、構成材料の一部であるポリアスパラギン酸のカルボキシレート側鎖が低 pH 環境になると徐々にプロトン化されるため、PICsome 形成のドライビングフォースである静電相互作用に変化が生じる。pH が 6 付近まで下がると前述の物質透過性に変化が生じ、分子量 1 万 ~ 7 万のデキストラン分子が外側から内側へと浸透できるようになった。さらに低い pH では PICsome の形態自身に変化が起き、細かな粒子に分裂する様子が観察さ

れた (Fig. 6)。この変化は可逆的であり、再度 pH を上げると直径数 μm のサイズの PICsome が再生した。環境応答性キャリアとしての応用の他、この再生能を利用して細胞内の情報取得するデバイスへの応用などが期待される。

これら 1st-G PICsome の研究と関連して、最近、新しいセルサイズ PICsome の調製法を発見した (Fig. 7)²⁸⁾。ポリカチオンである PEG-P(Asp-AP) と homo-P(Asp-AP) を、バッファーを 10 mM Tris-HCl (pH 7.4, 150 mM NaCl) とし、カチオン荷電数が同じになるように混合して用い、その後同一荷電数を含むポリアニオン溶液と混合し、直径数ミクロン程度の PIC 粒子 (コアセルベート; ポリマー濃縮相) を得た。この PIC 粒子に集束した赤外線レーザーを照射して捕捉し (光ピンセット効果)、粒子内の直径 1 μm 程度の領域を局所加熱したところ、水膨れ様構造が粒子表面にでき (Fig. 7a-c)、みるみるうちに粒子が膨らんで、最終的に薄膜殻 (ユニラメラ; 一枚膜) を有するセルサイズベシクルが生成した (Fig. 7 右下)。興味深いことに、生じるベシクルのサイズは膨らむ前の初期体積に 1 対 1 に対応しており、この結果からも得られたセルサイズ PICsome がユニラメラでできあがっていることが分かる。膨らむ原因は外部からの水の流入であるが、これは局所加熱により粒子内部に水が汲み入れられた効果によるものと考えている (Fig. 7a-c)。実際、レーザー照射を中断して加熱を中止すると、10 分以内に元と同一サイズのコアセルベートに収縮した。今後は、これらの性質を利用した物質の内包、あるいは、コアセルベートの濃縮力を利用した物質の封入などへの展開と合わせ、サイズ・構造の制御された新しいマイクロ粒子の製造法として工学的方向から、あるいは人工細胞モデルとして基礎科学的な方向からも研究を進める予定である。

ものづくりの視点からみて、これら PICsome のサイズを幅広い領域に渡って制御するのは重要な課題である。一方で、ナノバイオテクノロジーの観点から、サブミクロンスケール領域でのサイズ制御は、デリバリーキャリアの性能のチューニング、あるいは、人工オルガネラへの応用を考える上で非常に重要である。しかしながら、フィルタを通して制御する既存の“エクストルーダー法”などの煩雑な手法ではなく、既に述べてきた『混ぜるだけ』のような単純な手法での制御が望ましい。我々は既に、PEG-PAsp と homo-P(Asp-AP) の組み合わせを用いて PEG 含有率を減らし、さらにできる限り添加塩濃度を低めた条件下で PIC 形成を行うことで直径約 100 nm で粒径分布の狭い PICsome を得ることに成功している (Nano-PICsome)³¹⁾。この Nano-PICsome は 4 週間は 2 週間以上にわたり安定に保存できる。また、ポリマーの仕込み濃度を変えるだけで同様の構造を有するがサイズの大きな PICsome を単分散な粒子として得る手法も確立した。さらに最近、この PICsome を安定化する手法も開発し、添加塩濃度の高い生理条件下で安定に使えることを見出した³²⁾。また予備的な実験からマウスに投与可能なことも確かめている。今後の医療応用が強く期待される素材である。

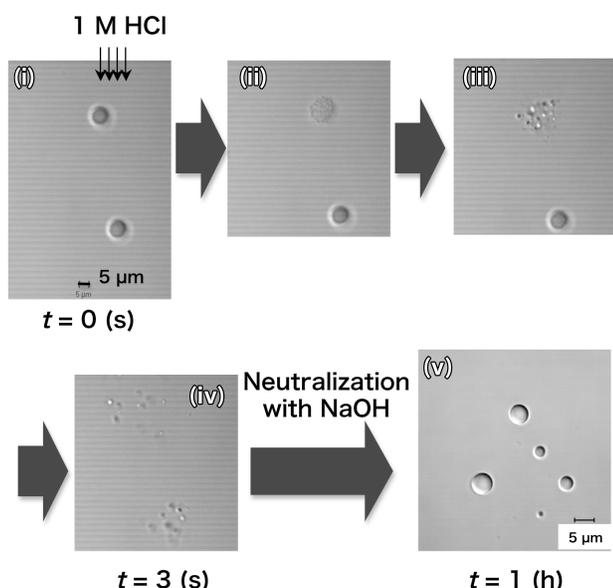


Fig. 6. pH-sensitive behaviors of 1st-G PICsomes. Immediately after the addition of HCl solution, micron-sized PICsomes underwent fragmentation. Subsequent neutralization resulted in the reformation of micron-sized PICsomes.

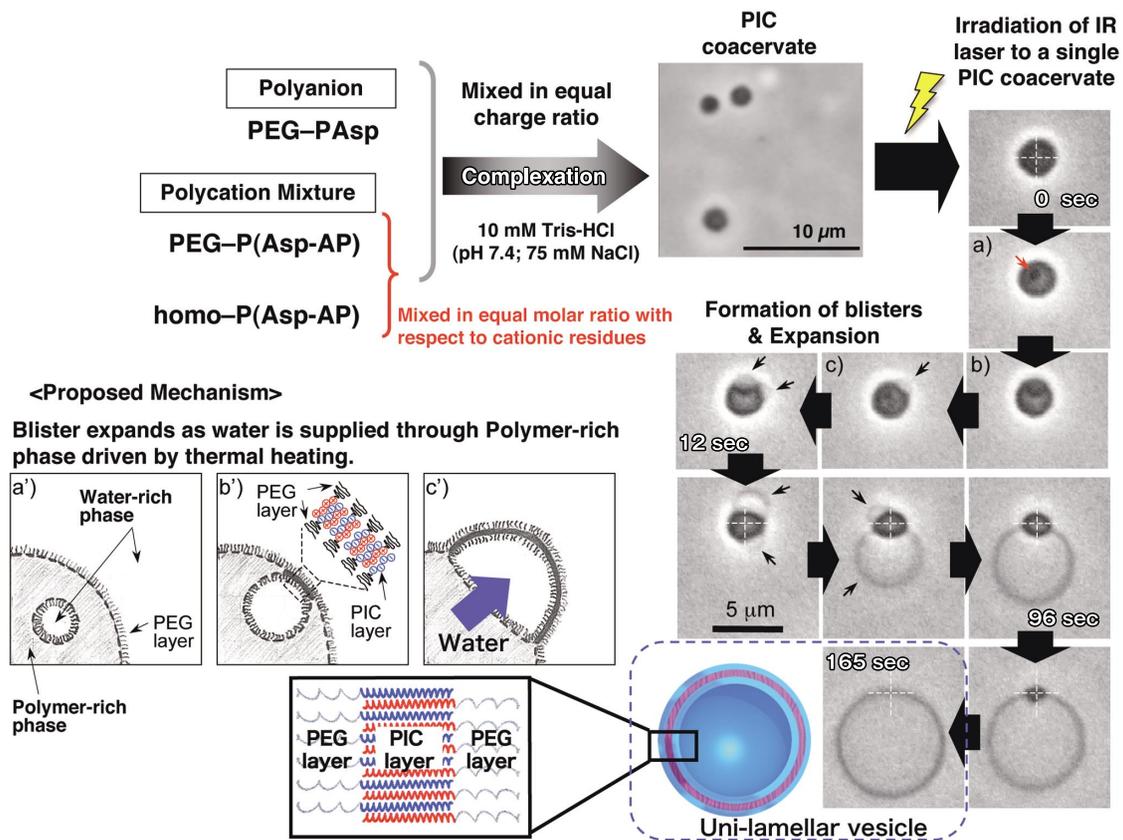


Fig. 7. Formation of a cell-size vesicle from a PIC coacervate triggered by local heating with focused IR laser. Phase separation (red arrow) took place at the laser focus (intersection of white dashed lines) and resulted in the blister (black arrow X a-c). Finally, the blister expanded to a uni-lamellar vesicle. Laser irradiation can force the polymer-rich phase (P-phase) to move to the surface of PIC coacervate (a', b'). Then, local heating may drive transfer of water from outside to inside to maintain polymer concentration in the P-phase (c'). The formation of a unilamellar vesicle is completed when all the polymers in the P-phase are consumed. All the micrographs were obtained using a phase contrast microscope.

4. おわりに

ここまで、ブロック共重合体を用いて種々のベシクル構造を作製する手法について述べてきた。リポソームに比べて様々なメリットを有する点で、今後の医療応用が大いに期待される。その一方で、ここ数年、より複雑な構造体を、さらに精密に設計された高分子を用いて作製する手法が発展してきている³⁾。微粒子のサイズや形状、表面構造や堅さなどが、ナノデバイスの生体内での機能の点でどのように意義づけられるか、について評価する科学も急速に進んでいることから³³⁻³⁸⁾、今後、新しいポリマー構造体が思わぬところでブレイクすることもあるかもしれない。読者諸兄には、これらのボトムアップ的“ナノ造形”の発展を温かく見守っていただくことを願ってやまない。

参考文献

1. Zhang L, Eisenberg A. Multiple Morphologies of "Crew-Cut" Aggregates of Polystyrene-*b*-poly(acrylic acid) Block Copolymers. *Science* 1995;268:1728-31.
2. Discher BM, Won Y-Y, Ege DS, Lee JC-M, Bates FS, Discher DE, Hammer DA. Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers. *Science* 1999;284:1143-6.
3. Blanazs A, Armes SP, Ryan AJ. Self-Assembled Block Copolymer Aggregates: From Micelles to Vesicles and their Biological Applications. *Macromol Rapid Commun* 2009;30:267-77.
4. Christian DA, Cai S, Bowen DM, Kim Y, Pajerowski JD, Discher DE. Polymersome carriers: From self-assembly to siRNA and protein therapeutics. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;71:463-74.
5. Meng F, Zhong Z, Feijen J. Stimuli-Responsive Polymersomes for Programmed Drug Delivery. *Biomacromolecules* 2009;10:197-209.
6. Bermudez H, Brannan AK, Hammer DA, Bates FS, Discher DE. Molecular Weight Dependence of Polymersome Membrane Structure, Elasticity, and Stability. *Macromolecules* 2002;35:8203-8.
7. Leson A, Filiz V, Forster S, Mayer C. Water permeation

- through block-copolymer vesicle membranes. *Chem Phys Lett* 2007;444:268-72.
8. Luo L, Eisenberg A. Thermodynamic Size Control of Block Copolymer Vesicles in Solution. *Langmuir* 2001;17:6804-11.
 9. Azzam T, Eisenberg A. Control of Vesicular Morphologies through Hydrophobic Block Length. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006;45:7443-7.
 10. Photos PJ, Bakakova L, Discher B, Bates FS, Discher DE. Polymer vesicles in vivo: correlations with PEG molecular weight. *J Controlled Release* 2003;90:323-34.
 11. Arifin DR, Palmer AF. Polymersome Encapsulated Hemoglobin: A Novel Type of Oxygen Carrier. *Biomacromolecules* 2005;6:2172-81.
 12. Rameez S, Alostta H, Palmer AF. Biocompatible and Biodegradable Polymersome Encapsulated Hemoglobin: A Potential Oxygen Carrier. *Bioconjugate Chem* 2008; 19:1025-32.
 13. Ahmed F, Pakunlu RI, Srinivas G, Brannan A, Bates F, Klein ML, Minko T, Discher DE. Shrinkage of a Rapidly Growing Tumor by Drug-Loaded Polymersomes: pH-Triggered Release through Copolymer Degradation. *Mol Pharmaceutics* 2006;3:340-50.
 14. Ahmed F, Pakunlu RI, Brannan A, Bates F, Minko T, Discher DE. Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug. *J Controlled Release* 2006;116:150-8.
 15. Kim Y, Tewari M, Pajeroski JD, Cai S, Sen S, Williams J, Sirsi S, Lutz G, Discher DE. Polymersome Delivery of siRNA and Antisense Oligonucleotides. *J Controlled Release* 2009;134:132-40.
 16. Juan RH, Lecommandoux S. Reversible Inside-Out Micellization of pH-responsive and Water-Soluble Vesicles Based on Polypeptide Diblock Copolymers. *J Am Chem Soc* 2005;127:2026-7.
 17. Bellomo EG, Wyrsta MD, Pakstis L, Pochan DJ, Deming T. Stimuli-responsive polypeptide vesicles by conformation-specific assembly. *Nat Mater* 2004;3:244-8.
 18. Holowka EP, Sun VZ, Kamei DT, Deming TJ. Polyarginine segments in block copolypeptides drive both vesicular assembly and intracellular delivery. *Nat Mater* 2007;6:52-7.
 19. Napoli A, Valentini M, Tirelli N, Müller M, Hubbell JA. Oxidation-responsive polymeric vesicles. *Nat Mater* 2004;3:183-189.
 20. Napoli A, Boerakker MJ, Tirelli N, Nolte RJM, Sommerdijk NAJM, Hubbell JA. Glucose-oxidase Based Self-Destructing Polymeric Vesicles. *Langmuir* 2004;20:3487-91.
 21. Cerritelli S, Velluto D, Hubbell JA. PEG-SS-PPS: Reduction-Sensitive Disulfide Block Copolymer Vesicles for Intracellular Drug Delivery. *Biomacromolecules* 2007;8:1966-72.
 22. Choi HJ, Montemagno C. Artificial Organelle: ATP Synthesis from Cellular Mimetic Polymersome. *Nano Lett* 2005;5:2538-42.
 23. Ranquin A, Versee W, Miere W, Steyaert J, Gelder PV. Therapeutic Nanoreactors: Combining Chemistry and Biology in a Novel Triblock Copolymer Drug Delivery System. *Nano Lett* 2005;5:2220-4.
 24. Broz P, Driamov S, Ziegler J, Ben-Haim N, Marsch S, Meier W, Hunziker P. Toward Intelligent Nanosize Bioreactors: A pH-Switchable, Channel-Equipped, Functional Polymer Nanocontainer. *Nano Lett* 2006;6:2349-53.
 25. Ben-Haim N, Broz P, Marsch S, Meier W, Hunziker P. Cell-Specific Integration of Artificial Organelles Based on Functionalized Polymer Vesicles. *Nano Lett* 2008;8:1368-73.
 26. Koide A, Kishimura A, Osada K, Jang W-D, Yamasaki Y, Kataoka K. Semipermeable Polymer Vesicle (PICsome) Self-Assembled in Aqueous Medium from a Pair of Oppositely Charged Block Copolymers: Physiologically Stable Micro-/Nanocontainers of Water-Soluble Macromolecules. *J Am Chem Soc* 2006;128:5988-9.
 27. Dong W-F, Kishimura A, Anraku Y, Chuano S, Kataoka K. Monodispersed Polymeric Nanocapsules: Spontaneous Evolution and Morphology Transition from Reducible Hetero-PEG PICmicelles by Controlled Degradation. *J Am Chem Soc* 2009;131:3804-5.
 28. Oana H, Kishimura A, Yonehara K, Yamasaki Y, Washizu M, Kataoka K. Spontaneous Formation of Giant Unilamellar Vesicles from Microdroplets of a Polyion Complex by Thermally Induced Phase Separation. *Angew Chem Int Ed* 2009;48:4613-4616.
 29. Kishimura A, Koide A, Osada K, Yamasaki Y, Kataoka K. Encapsulation of Myoglobin in PEGylated Polyion Complex Vesicles Made from a Pair of Oppositely Charged Block Ionomers: A Physiologically Available Oxygen Carrier. *Angew Chem Int Ed* 2007;46:6085-8.
 30. Kishimura A, Liamsuwan S, Matsuda H, Dong W-F, Osada K, Yamasaki Y, Kataoka K. pH-dependent permeability change and reversible structural transition of PEGylated polyion complex vesicles (PICsomes) in aqueous media. *Soft Matter* 2009;5:529-32.
 31. Anraku Y, Kishimura A, Yamasaki Y, Kataoka K. Development and Physicochemical Evaluation of Nano-PICsomes. *Polymer Prepr Jpn* 2008;57:2842-3.
 32. Anraku Y, Kishimura A, Yamasaki Y, Kataoka K. submitted for publication.

33. Wang H, Wang S, Su H, Chen K-J, Armijo AL, Lin W-Y, Wang Y, Sun J, Kamei K, Czernin J, Radu CG, Tseng H-R. A Supramolecular Approach for Preparation of Size-Controlled Nanoparticles. *Angew Chem Int Ed* 2009;48:4344-4348.
34. Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, CHAN WCW. Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotech* 2008;3:145-150.
35. Reddy ST, van der Vlies AJ, Simeoni E, Angeli V, Randolph GJ, O'Neil CP, Lee LK, Swartz MA, Hubbell JA. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nat Biotech* 2007;25:1159-64.
36. Choi HS, Binil Itty Ipe, Preeti Misra, Jeong Heon Lee, Mounji G, Bawendi, John V. Frangioni. Tissue- and Organ-Selective Biodistribution of NIR Fluorescent Quantum Dots. *Nano Lett* 2009;9:2354-2359.
37. Geng Y, Dalhaimer P, Cai S, Tsai R, Tewar M, Minko T, Discher DE. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat Nanotech* 2007;2:249-55.
38. Gratton SEA, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, DeSimone JM. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;33:11613-8.

ヒト血清アルブミンを用いた機能分子・材料の創製

Synthesis of Functional Molecules and Materials Based on Human Serum Albumin

小松 晃之^(1,2), 屈 雪⁽¹⁾, 土田 英俊⁽¹⁾, 中川 晶人⁽¹⁾

Teruyuki Komatsu^(1,2), Xue Qu⁽¹⁾, Eishun Tsuchida⁽¹⁾, Akito Nakagawa⁽¹⁾

和文抄録

筆者らはヒト血清アルブミン(HSA)の多分子結合能を利用して、その内部に機能性分子を包接させる方法や、さらにはHSAと高分子電解質の交互積層膜を多孔性膜の細孔内で作成する方法により、自然界には見ることのできないユニークな機能分子・材料を創製してきている。HSAに鉄テトラフェニルポルフィリン誘導体(FeP)を包接させたHSA-FeP複合体は生理条件下で酸素を可逆的に結合解離できる人工酸素運搬体となり、遺伝子組換えアルブミン(rHSA)にヘモグロビンの活性中心である鉄プロトポルフィリン(heme)を結合させたrHSA-heme錯体も酸素吸脱着のできる人工ヘム蛋白質となる。一方、HSA-亜鉛プロトポルフィリン錯体は水の光還元による水素発生反応の増感剤として作用し、HSA-カルボキシフラーレン複合体は一重項酸素生成の光増感剤として腫瘍光線力学療法への応用が期待されている。さらに、多孔性ポリカーボネート膜をテンプレートとした鑄型内交互積層法により、HSAからなる中空シリンダー構造のナノチューブが合成できる。これらの新機能分子・材料の特徴と応用展開について、最近の話題を紹介する。

Abstract

We have synthesized unique functional molecules and materials based on human serum albumin(HSA) which have never seen in nature, by means of incorporation of functional ligands into the protein or fabrication of layer-by-layer assembly in the nanoporous membrane. HSA incorporating iron(II)tetraphenylporphyrin derivative(FeP) HSA-FeP is an artificial O₂ carrier which can reversibly binds and release O₂ under physiological conditions. Recombinant HSA complexed with a natural iron(II)protoporphyrin IX(heme) rHSA-heme also acts as O₂ transport hemoprotein. On the other hand, HSA complexed with a zinc(II)protoporphyrin IX functions as a photosensitizer for H₂ evolution from water, and HSA-carboxy fullerene hybrid produces singlet O₂ by visible light irradiation; it may be used as a sensitizer in photodynamic cancer therapy. Furthermore, HSA nanotubes are prepared by layer-by-layer deposition technique using porous polycarbonate membrane template. We highlight recent development and applications of these functional molecules and materials.

Keywords

Human serum albumin, albumin-heme, oxygen carrier, red blood cell substitute, photosensitizer, nanotubes

1. はじめに

ヒト血清アルブミン(HSA)は血清蛋白質の約60%を占める補欠分子族を持たない単純蛋白質(分子量:66,500)であり、血流中ではコロイド浸透圧維持のほか、各種内因性・外因性物質(脂肪酸、ヘミン、ビリルビン、金属イオン、ホルモン、NO、薬物)の運搬・貯蔵、pH緩衝作用、エステラーゼ活性な

どの役割を担っている¹⁻³⁾。1992年、米国国立航空宇宙局(NASA)のCarterらはHSAの高分解能X線結晶構造解析(分解能:2.8 Å)に成功し、その三次元構造の全容を明らかにした⁴⁾。585個のアミノ酸からなる一本鎖ポリペプチドは17個のジスルフィド結合を介してハート形に折りたたまれ(長径:約8 nm, 厚み:約3 nm)、相同性の高い3つのドメインI~III

(1) 早稲田大学 理工学術院 総合研究所(理工学研究所) 〒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, Japan

(2) 科学技術振興機構さきがけ 〒332-0012 埼玉県川口市本町4-1-8 PRESTO, Japan Science and Technology Agency(JST) 4-1-8 Honcho, Kawaguchi-shi, Saitama 332-0012, Japan

論文受付 2009年5月7日 論文受理 2009年5月22日

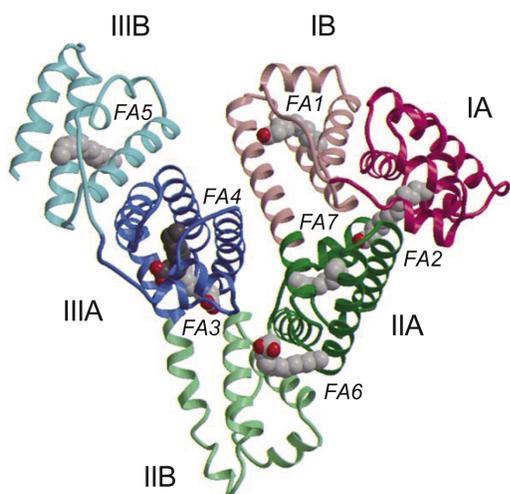


Fig. 1. Structure of HSA with seven myristic acids(PDB 1e7g) The protein secondary structure is shown schematically and the domains are colored(I; red, II; green, III; blue) The A and B subdomains are depicted in dark and light shades, respectively. The fatty acid binding sites are represented from FA1 to FA7 in italics.

を構成している(各ドメインはさらに2つのサブドメインA, Bに分けられる。Fig. 1)。Sudlowらが提唱した古典的なHSAの薬物結合サイトI(ワルファリン, インドメタシンなど)はサブドメインIIA, 薬物結合サイトII(ジアゼパム, イブプロフェンなど)はサブドメインIIIAに相当する⁵⁾。

一方, HSAは遺伝子組換え技術により大量発現が可能な蛋白質である⁶⁾。近年, その多分子結合能と高い生産性に注目が集まり, HSAに金属錯体を包接させた人工蛋白質の構築が盛んになってきている。例えば, GrossらはHSAにマンガンコロールを結合させた複合体を調製し, スルフィドの立体選択的酸化触媒として利用した⁷⁾。また, ReetzらはHSAに銅フタロシアンを結合させた複合体が, Diels-Alder反応に有用であることを明らかにした⁸⁾。

本稿では, 酸素運搬体, 光増感剤から, 蛋白質ナノチューブまで, 著者らが進めているHSAを利用した新しい機能分子・材料の創製と応用について最近の話題を紹介したい。

2. アルブミン - 脂肪酸複合体の結晶構造解析

HSAの最もよく知られたリガンドに脂肪酸がある。1998年, CurryらはHSA - 脂肪酸複合体のX線結晶構造解析に初めて成功し, 中・長鎖脂肪酸の結合サイト(FAサイト)を特定した^{9,10)}。HSAには全ての脂肪酸に共通する7個のサイトがあり(Fig. 1), FAサイト1, 4, 5, 7は各サブドメインの中央に, FAサイト2, 3は二つのドメインの境界面に, そしてFAサイト6は二つのサブドメインの境界面に位置する。FAサイト1 - 5では, 脂肪酸の末端カルボキシル基が塩基性または極性アミノ酸残基と相互作用することによりしっかりと固定されている。これら5つのうちどこが最も親和性の強い部位なのか,

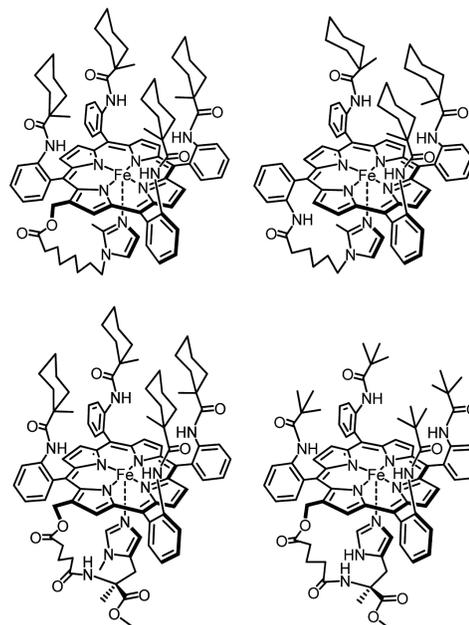


Fig. 2. Chemical formula of typical FeP molecules that can be incorporated into HSA to form HSA-FeP hybrid.

結晶構造からは判定できない。組換えHSAの詳細な¹³C-NMRスペクトル測定から, FAサイト2, 4, 5が親和力の強いサイトであることが明らかにされた¹¹⁾。7つのFAサイト全てに脂肪酸が結合すると, HSA全体の分子形態はダイナミックに変化する。特にドメイン間に存在するFAサイト2, 3への結合は, ドメインIIを軸として大きな形態変化を誘起した。HSAの二次構造は α -ヘリックスが67%, β -シート構造が0%である。古くから脂肪酸などのリガンド結合によりHSAの二次構造が変化するという報告があるが, リガンド結合後も二次構造に変化はないことが結晶学的に示された。Curryらはその後も各種HSA - リガンド複合体の結晶構造解析を系統的に進め, 多くの複合体について構造を解明している¹²⁻¹⁴⁾。現在Protein Data Bank (PDB)に登録済みのHSA - リガンド複合体のデータ47件のうち, 37件はCurryらによるものである。

3. アルブミン - 合成ヘム複合体(人工酸素運搬体)

我々は独自の分子設計により合成した鉄テトラフェニルポルフィリン誘導体(合成ヘム: FeP)をHSAに包接させたアルブミン - ヘム(HSA-FeP)複合体が, 生理条件下でヘモグロビン(Hb)と同じように酸素を吸脱着できることを見出した¹⁵⁻¹⁸⁾。これまでに約30種類以上のFeP(Fig. 2)を合成し, その酸素結合能とヘム構造の相関を整理してきている¹⁹⁻²²⁾。酸素錯体の安定度は天然のミオグロビン(Mb)を上回り, 酸素親和性(P_{50})は0.1 Torrから230 Torrまで所望の値に揃えることができる。つまり, 適用に応じた製剤の選択が可能となっている。HSA-FeP溶液の血液適合性は高く, 血液凝固系, 補体系, 血小板の活性化に対しても影響を及ぼさない²³⁾。室温で2年以上の棚置保存が可能で, その間酸素結合パラメーターに変

化はない²⁴⁾。脱血交換試験(ラット, ビーグル犬)から出血ショック状態からの蘇生効果, 生体内における酸素輸送能が証明されている^{25, 26)}。体内投与後も修飾Hb製剤に見られるような血管内皮細胞からの漏出, 一酸化窒素捕捉に伴う血管収縮, 血圧亢進は全く観測されない²⁷⁾。これはHSAの表面電荷が負に帯電しているため血管から漏れ出しにくいことに起因すると考えられており, 本製剤の最大の利点となっている。

一般に悪性腫瘍は放射線療法や化学療法に抵抗性を示し, その原因の一つとして腫瘍組織内低酸素細胞(hypoxic cell)の存在があげられる。細胞の異常な増殖により新生血管の生成が追いつかない湿潤性腫瘍細胞では, 十分な血流および酸素化が得られず, それが治療の妨げとなっている。HSA-FeP溶液を腫瘍組織の患部近傍へ投与し, 腫瘍組織内低酸素細胞の酸素化を試みたところ, 患部の酸素分圧は投与前の2.5倍に増大した²⁸⁾。これは, 従来報告されている修飾Hb製剤を用いた処置に比べて格段に高く²⁹⁾, 粒子径の小さいHSA-FePが腫瘍内部へ容易に到達できるためと考えられる。実際に放射線療法と併用した結果, HSA-FeP投与による抗癌作用の顕著な増強効果が認められた³⁰⁾。また, HSA-FePの分子表面をポリ(エチレングリコール)で被覆すると, 血中滞留時間が大幅に延長されることも明らかにされている^{31, 32)}。

4. 遺伝子組換えアルブミン-プロトヘム錯体(人工酸素運搬体)

アルブミン-合成ヘム複合体の酸素結合部位は, 精密に分子設計された鉄テトラフェニルポルフィリン誘導体(FeP)であり, 得られたHSA-FeP複合体が酸素を可逆的に結合解離できることは, 錯体化学的に見れば設計通りの機能発現といえる。HSAを用いた人工酸素運搬体開発における究極の挑戦は, やはりHbの酸素結合部位であるヘム鉄[鉄プロトポルフィリンIX(プロトヘム, heme)](Fig. 3a)を用いた製剤の確立であろう。2004年, 我々は遺伝子組換え技術を用いてアミノ酸の一部を改変した組換えHSA(rHSA)にhemeを包接させたrHSA-heme錯体が, 水中で酸素を吸脱着できることを見出した³³⁾。

溶血により血中に放出されたメトHbから解離した鉄(III)

プロトポルフィリンIX(heme)は, 通常ヘモペキシンと呼ばれる糖蛋白質に捕捉されるが³⁴⁾, ヘモペキシンの血中濃度は約17 μ Mと低いため, 遊離heminの多くは一旦HSAに結合し肝臓へと運ばれる。HeminがHSAに捕捉されることは昔から知られていた。1938年, Fairelyはheminと相互作用する血清蛋白質がHSAであることを発見し, その複合体をhemalbuminと名付けた³⁵⁾。それ以来, このHSA-hemin錯体は, 何らかの生理作用があるのではないかと研究者達の関心の的となってきた。1975年, Muller-EberhardらによりHSA-hemin錯体の吸収スペクトルが報告され, heminの中心鉄にアミノ酸残基が軸配位した高スピンヘム錯体構造が推定された³⁶⁾。また, 1980年にはBermanらがHSAとheminの結合定数($K: 1.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$)を決定³⁷⁾, この値は脂肪酸に比べて約100倍高く, heminがHSAに強く結合することが明確となった。

2002年, Carterと我々のグループは独立にHSA-hemin錯体のX線結晶構造解析に成功し, heminがHSAのサブドメインIB内の疎水ポケットに結合していることを明らかにした^{38, 39)}。この部位は, 脂肪酸のFAサイト1に相当する。heminの中心鉄にはチロシン(Tyr)161のフェノレート酸素が軸配位し, 二つのプロピオン酸残基は, 三つの塩基性アミノ酸残基(リシン, ヒスチジン, アルギニン)と相互作用していることがわかった(Fig. 3b)。よく知られているようにMbのヘムポケット内では, ヘム中心鉄にヒスチジン(His)93が軸配位し, そのトランス側(第6配位座)に酸素分子が結合する(Fig. 3c)。さらに, 配位酸素側にはもう一つのHis-64が遠位塩基として存在し, 酸素錯体を安定化している。ここで両者を見比べてみると, 誰もがその構造類似性に気づくであろう。しかし, 残念ながらHSA-hemin錯体の中心鉄を鉄(II)に還元して酸素を吹き込んでみても, 酸素錯体は得られない³³⁾。それは軸配位子がHisではないためである。HSA-hemin錯体が血中で何らかの役割をはたしているのではないかという期待とは裏腹に, むしろHSAはhemin分子の活性を巧みに抑え込んでいたのである。しかしながら, hemeが疎水的な分子空間に配置された構造はMbのヘムポケットと共通しているのだから, HSAの場合でもヘム鉄の配位圏内(サブドメインIB)にHisが存在すれば, 酸素錯体ができるのではないかと考えた。そこで遺伝子組

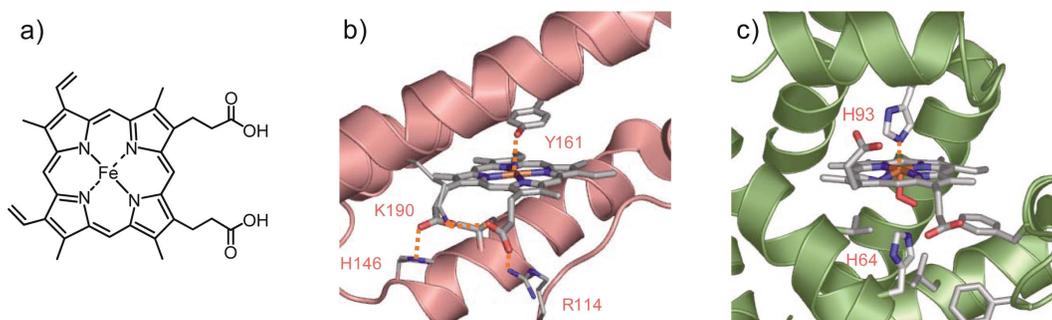


Fig. 3. (a) Chemical formula of iron(II) protoporphyrin IX (heme) Heme pocket structures of (b) HSA-hemin complex (PDB 1o9x) and (c) oxy-Mb (pdb 1mbo)

換え技術を用いて、イソロイシン (Ile)142位置へ近位塩基として働く His を変異導入し、さらに中心鉄に軸配位している Tyr-161 を疎水性アミノ酸 (ロイシン (Leu)) に変換したところ、その組換え HSA-heme [rHSA (I142H/Y161L)heme] 錯体は、室温で酸素を吸脱着することができた^{33,40)}。rHSA と heme から構成される酸素輸送人工ヘム蛋白質の初めての例である。そこで、酸素結合パラメーターを詳細に解析した。rHSA (I142H/Y161L)heme 錯体の $P_{1/2}$ は 18 Torr (22) であり、Hb, Mb, ヒト赤血球の値に比べて高い (酸素親和性は低い)。rHSA (I142H/Y161L)heme 錯体の低い酸素親和性は、速度論的には大きな解離速度定数 (k_{off}) に起因した^{33,40)}。rHSA の中では heme を取り巻く分子環境が疎水的であるために k_{off} が高く、酸素親和性が低く抑えられているのである。

このように酸素錯体は得られたものの、実際に rHSA (I142H/Y161L)heme 錯体を人工酸素運搬体として利用するためには、その酸素親和性を Hb や赤血球の値に近づけなければならない。そこで、第三の変異を導入することにより、酸素親和性を上げる工夫を行った。前述したように、Hb や Mb のヘムポケット内には酸素配位座側に His-64 が遠位塩基として存在し、酸素親和性の増大に寄与している^{41,42)}。我々は rHSA の場合も、酸素配位座側の適当な位置に遠位塩基を導入すれば、酸素親和性が上昇するのではないかと考えた。分子シミュレーションの結果から配位酸素直上の Leu-185 を選定し、そこへ遠位塩基としてのアスパラギン (Asn) を導入した [rHSA (I142H/Y161L/L185N)]⁴³⁾。rHSA (I142H/Y161L/L185N)heme 錯体 (Fig. 4) の可視吸収スペクトルは、窒素雰囲気下では鉄 (II) 5 配位高スピン錯体の形成を示し、そこへ酸素を通気すると速やかに酸素錯体型へと移行した。 $P_{1/2}$ は 1 Torr (22) となり、酸素親和性はもとの二重変異体に比べて 18 倍も上昇した。Asn の導入によりヘムポケットの極性が増大し k_{off} が減少した結果、酸素親和性が上がったものと考えられる。rHSA (I142H/Y161L/L185N)heme 錯体は、Hb と同等の酸素親和性を有する人工ヘム蛋白質となった。つまり我々は、本来補欠分子族すらもたない単純蛋白質の HSA に、酸素結合能を

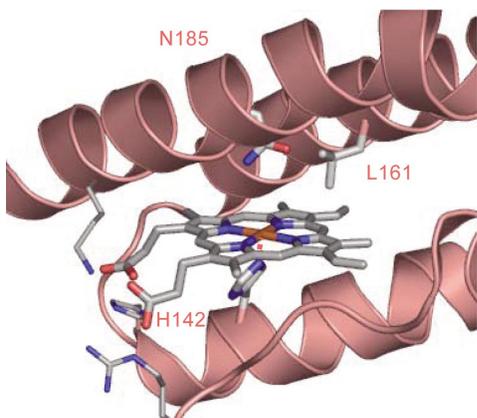


Fig. 4. Structural model of the heme pocket in rHSA (I142H/Y161L/L185N)heme complex.

付与することに成功したばかりでなく、ヘムポケットの微小空間を部位特異的アミノ酸置換により最適化することで、酸素親和性のコントロールを実現したのである。

ごく最近、酸素配位座側にあるアルギニン (Arg)186 を疎水性アミノ酸に変換すると、酸素親和性がヒト赤血球と同等値に調整できることを見出した⁴³⁾。rHSA-heme 錯体は天然のプロトヘムを活性中心とする、いわば“酸素輸送のできる赤色の血清蛋白質”である。臨床利用可能な赤血球代替物として、現在実用化に向けた努力が進められている。

5. アルブミン - 亜鉛プロトポルフィリン錯体 (水素発生 の光増感剤)

ポルフィリン化合物の最大の魅力は、その中心金属を変えることにより多彩な機能を発揮できる点にある。特に可視光領域に大きな吸収帯を持つ特徴を生かして、光反応の増感剤として広く利用されている。しかし、鉄ポルフィリン錯体は光励起状態の寿命がきわめて短いため、一般的には光反応の増感剤には適さず、励起寿命の長い亜鉛錯体がいられる。

水素 (H_2) は二酸化炭素排出のない近未来のクリーンエネルギーである。Gratzel らは亜鉛テトラメチルピリジニウムポルフィリンをメチルビオロゲン (MV^{2+}) / 白金コロイド / EDTA 水溶液に加え可視光照射すると、水の光還元反応が進行し水素が得られることを見出した⁴⁴⁾。もしプロトポルフィリン IX (PP) が水の光還元を利用できれば、天然物質を増感剤とした水素発生システムが確立できることになる。しかし、亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnPP) は水に不溶で、そのまま使用することは難しい。そこで、ZnPP を HSA に包接させることにより HSA-ZnPP 錯体とし、水の光還元反応への応用を試みた。HSA-ZnPP 錯体水溶液に MV^{2+} を加え、アルゴン雰囲気下でレーザーフラッシュ (532 nm) を照射すると、ZnP の励起三重項状態から MV^{2+} への電子移動反応が観測された⁴⁵⁾。続いて、白金コロイド、犠牲試薬としてのトリエタノールアミンを加え可視光照射してみると、速やかに水の還元が起こり溶液中から水素が発生した (Fig. 5)。水素発生効率は亜鉛テトラメチルピリジニウムポルフィリンを用いた場合よりも高い。つまり、HSA-ZnPP 錯体は水の光還元反応における有効な増感剤として機能する。

この結果は、アルブミン - ポルフィリン錯体においてポルフィリンの中心金属を変えることにより、様々な機能を持った人工蛋白質が創製できることを示唆している。

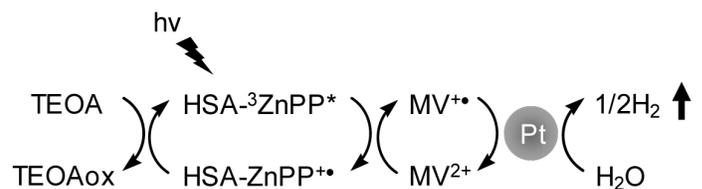


Fig. 5. Reaction scheme of photoreduction of water to hydrogen using HSA-ZnPP complex.

6. アルブミン-フラレン複合体(光線力学療法の増感剤)

金属ポルフィリン以外の機能的分子でもHSAに包接させれば、新しい人工蛋白質が合成できるはずである。そこで、HSAにフラレン誘導体を包接させたアルブミン-フラレン複合体を調製し、その構造、光物性、光線力学療法 (photodynamic therapy: PDT) における増感剤としての可能性について検討した。現在、よく知られているPDTの光増感剤には、ヘマトポルフィリンの誘導体であるフォトリン^{46,47)}、プロトポルフィリンの前駆体である5-アミノレブリン酸⁴⁸⁾、またクロリン誘導体であるピスダイン⁴⁹⁾などがある。これらのポルフィリン誘導体に比べ、フラレンC₆₀は高い光安定性を持ち、一重項酸素生成の量子収率が高いことから、PDTの新しい増感剤として期待されている⁵⁰⁻⁵²⁾。

HSAにカルボキシフラレン(CF, Fig. 6a)を包接させたHSA-CF複合体はきわめて安定で、その水溶液は調製2年後でも沈殿・凝集など全く認められなかった (Fig. 6b)⁵³⁾。可視吸収スペクトル、HPLC、質量分析の結果から、HSAとCFが1:1で結合していること、さらに小角X線散乱測定から、CF結合後もHSAの分子径、表面電荷に変化はないことがわかった⁵³⁾。

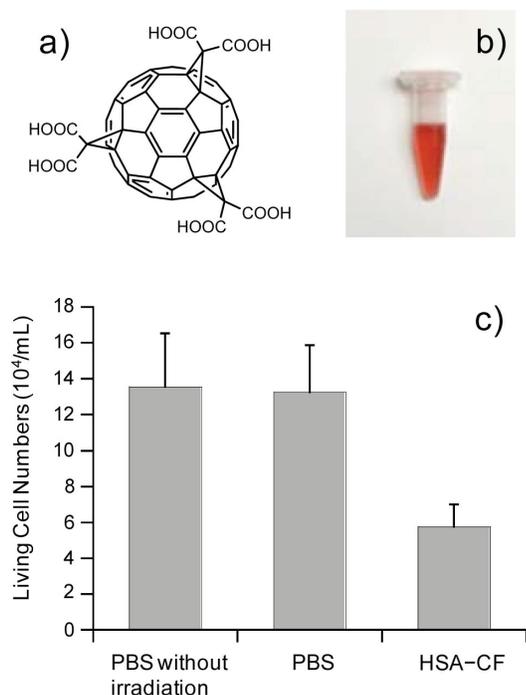


Fig. 6. (a) Chemical formula of carboxy-C₆₀-fullerene, (b) red colored solution of aqueous HSA-CF, and (c) living cell numbers of LY80 with HSA-CF and PBS after visible light irradiation (20 mW cm⁻², 2 h, 36 ± 1) Each value represents the mean ± SD (n = 4)

一般に色素分子を光励起すると、まず励起一重項状態を形成し、そこから項間交差により励起三重項状態へと遷移する。一重項酸素生成の有効な光増感剤となるためには、この励起三重項状態が安定でなければならない。HSA-CF複合体の励起三重

項寿命は46 μsと長く、それはCFが蛋白質内部に固定されているため、励起種どうしによる消光が抑えられることによる。系内に酸素を共存させると、励起三重項状態から酸素分子へのエネルギー移動が観測された。生成する一重項酸素は1270 nmに蛍光を示すので、その強度から一重項酸素生成の量子収率が算出できる。HSA-CF複合体の量子収率は0.46であり、HSA-PP複合体やメチレンブルーと同程度であったことから⁵⁴⁾、本化合物が一重項酸素生成の有効な光増感剤として作用することがわかった。

続いてこの製剤の細胞毒性について検証した。腫瘍細胞 (LY80) にHSA-CF水溶液を加え、まず暗所下でそれ自身に細胞毒性がないことを確認。その後ハロゲンランプを用いて光照射 (2 hr) すると、細胞数は43%にまで減少した (Fig. 6c)⁵³⁾。この結果はHSA-CF複合体がPDTの光増感剤として有効であることを示している。

7. アルブミンナノチューブ (分子捕捉剤, 薬物運搬体, ナノリアクター)

ピキア酵母を用いた遺伝子組み換え体の量産体制が確立して以来、HSAは臨床利用はもちろんバイオマテリアルの有用な素材としても注目を集めている⁶⁾。我々は最近、鋳型内交互積層法によりHSAからなる中空シリンダー構造のナノチューブを合成することに成功した⁵⁵⁻⁵⁷⁾。HSAの等電点は4.8と低く、生理条件下では分子表面が負に帯電している。上述したようにHSAがHbに比べて血管外へ逸脱し難いのは、血管内皮細胞の外側にある基底膜との静電反発による。そこでまず正電荷を有する高分子電解質 (例えば、ポリ-L-アルギニン (PLA) などのポリアミノ酸やポリエチレンジアミンなど) を多孔性ポリカーボネート (PC) 膜の細孔内に通過させ、続いてHSA水溶液を通過させる。この操作を繰り返しながら、細孔内壁にHSAの多重積層膜を作成し、最後にPC膜を溶解除去すると、HSAからなる均一で柔軟なナノチューブが得られる。孔径400 nmのPC膜にPLAとHSAを各3回ずつ通過させて作成した計6層構造からなるナノチューブの外径は約400 nm、内径は約300 nm、管壁厚は約50 nmとなる (Fig. 7)。鋳型内交互積層法 (テンプレート合成) の利点は、

電荷を有する水溶性分子 (蛋白質, 生体分子, 高分子電解質など) であれば、ナノチューブの素材になり得る (分子設計の自由度が高く、構成分子の選択範囲が広い) 鋳型となる多孔性膜の孔径および厚みの調節により、チューブの外径および長さを均一に制御することができる 積層膜数の調節により、チューブの内径をナノメートルスケールで制御することができる 複数の機能的分子を任意の順序で積層することにより、管壁構造を自由に分子設計できる 他のナノチューブ合成法に比べ、調製が簡便、再現性が高く、低コスト、大型化が容易

などである。

得られたナノチューブの最大の特徴は、同重量の球状構造体

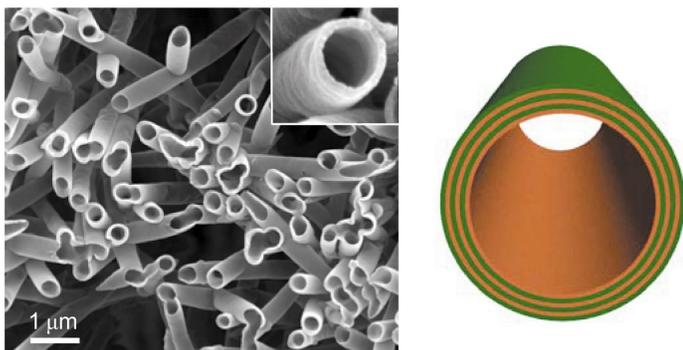


Fig. 7. SEM images of protein nanotubes comprised of (PLA/HSA). Schematic illustration of the protein nanotubes prepared by template synthesis using layer-by-layer deposition technique.

に比べて比表面積が大きいことにある。HSA ナノチューブの水分散液にHSA のリガンド（薬物など）を添加すると、ナノチューブ管壁に効率よく結合し、水中から速やかに除去される。HSA に結合しない分子は全く取り込まれないので、いつまでも水中に存在する。Hb や Mb を構成成分としてナノチューブを作成することもできる⁵⁷⁾、HSA-FeP からなるナノチューブは酸素を可逆的に吸脱着する⁵⁵⁾。また、最終層成分の選定だけで内孔に合目的な特性を付与することができるので、例えば最内層に加水分解酵素を配置したHSA ナノチューブでは、内孔壁表面で基質の加水分解が進行する。逆に酵素合成により新物質を創り出すこともできる。まさにナノサイズのリアクターである。この場合、内孔以外の管壁を構成する蛋白質がHSA であることが肝要である。他にも鉄イオンの捕捉・貯蔵を担う球殻状蛋白質フェリチンからなるナノチューブも合成され、バイオナノデバイスとして磁化特性、半導体特性が検討されている。

管壁のみならず、チューブの一次元内孔空間にウイルスやリポソームなどの大きな生体超分子をサイズ選択的に捕捉することも可能である。中空シリンダーの両端開口部が自由に開閉できれば、従来のミセルやリポソームとは全く違う新しいドラッグキャリアの誕生にもつながるであろう。

8. おわりに

筆者らはヒト血清アルブミンの多分子結合能に着目し、その内部に機能性分子を取り込ませる方法により、数々の人工蛋白質を創製してきている。当初は酸素運搬体に焦点を絞った展開であったが、合成へみならず他の機能性分子も効率よく包接できることがわかり、水の還元による水素発生や一重項酸素生成の光増感剤となるアルブミンを開発した。実は多分子結合能のみならず、きわめて高い水溶性や光・熱に対する安定性といった血清蛋白質アルブミンならではの特徴が、これらの新物質系において重要な役割を果たしている。さらに、遺伝子組換え技術を駆使してアルブミンのアミノ酸配置を少しだけ変えてやると、機能制御が可能になることも明らかにした。X線結晶構造解析（生物物理学）にもとづいた部位特異的アミノ酸置換

（分子生物学）を機能性アルブミン開発の分子設計に取り入れ、新しい方法論として定着させた。最近ではアルブミンからなる中空シリンダー構造のナノチューブを合成し、その機能展開に力を入れているが、ここでもアルブミンの高い構造安定性が大きく貢献している。ウイルス捕捉、標的薬物の結合・放出、ナノリアクター、ナノバイオデバイスなど、多くの応用展開が期待される。

謝 辞

本総説は、日本学術振興会科学研究費補助金、科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業“さきがけ”、厚生労働省科学研究費補助金の支援により推進された研究の成果である。遺伝子組換え蛋白質の合成、X線結晶構造解析はProf. Stephen Curry (Imperial College London) の協力のもと行われた。動物実験は小林絏一教授（慶大医）、堀之内宏久准教授（慶大医）の協力を得て実施された。また、試料調製・生化学実験は小林直（早大理工研）、寺田裕美（早大理工研）が担当した。ここに記して謝意を表する。

引用文献

1. Peters T. All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications. San Diego: Academic Press, 1996; and references therein.
2. Kragh-Hansen U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacol Rev* 1981;33:17-53.
3. Kragh-Hansen U. Structure and ligand-binding properties of human serum-albumin. *Danish Med Bull* 1990;37:57-84.
4. He XM, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 1992;358:209-215.
5. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol* 1975;11:824-832.
6. Kobayashi K. Summary of recombinant human serum albumin development. *Biologicals* 2006;34:55-59.
7. Mahammed A, Gross Z. Albumin-conjugated corrole metal complexes: extremely simple yet very efficient biomimetic oxidation Systems. *J Am Chem Soc* 2005;127:2883-2887.
8. Reetz MT, Jiao N. Copper-phthalocyanine conjugates of serum albumins as enantioselective catalysts in Diels-Alder reactions. *Angew Chem Int Ed* 2006;45:2416-2419.
9. Curry S, Madelkow H, Brick P, Franks N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat Struct Biol* 1998;5:827-835.
10. Curry S, Brick P, Franks N. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim Biophys Acta* 1999;1441:131-140.
11. Simard JR, Zunszain PA, Hamilton JA, Curry S. Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human

- serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis. *J Mol Biol* 2006;361:336-351.
12. Petitpas I, Petersen CE, Ha CE, Bhattacharya AA, Zunszain PA, Ghuman J, Bhagavan NV, Curry S. Structural basis of albumin-thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:6440-6445.
 13. Ghuman J, Zunszain PA, Petotpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol* 2005;353:38-52.
 14. Zunszain PA, Ghuman J, McDonagh AF, Curry S. Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IX. *J Mol Biol* 2008;381:394-406.
 15. Komatsu T, Hamamatsu K, Wu J, Tsuchida E. Physicochemical properties and O₂-coordination structure of human serum albumin incorporating tetrakis(o-pivalamido)phenylporphinoiron(II)derivatives. *Bioconjugate Chem* 1999;10:82-86.
 16. Tsuchida E, Komatsu T, Mastukawa Y, Hamamatsu K, Wu J. Human serum albumin incorporating tetrakis(o-pivalamido)phenylporphinoiron(II)derivative as a totally synthetic O₂-carrying hemoprotein. *Bioconjugate Chem* 1999;10:797-802.
 17. Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E. Kinetics of CO and O₂ binding to human serum albumin-heme hybrid. *Bioconjugate Chem* 2000;11:772-776.
 18. Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E. Reaction of nitric oxide with synthetic hemoprotein, human serum albumin incorporating tetraphenylporphinoiron(II)derivatives. *Bioconjugate Chem*. 2001;12:71-75.
 19. Komatsu T, Okada T, Moritake M, Tsuchida E. O₂-binding properties of double-sided porphinoiron(II)s with polar substituents and their human serum albumin hybrids. *Bull Chem Soc Jpn* 2001;74:1695-1702.
 20. Komatsu T, Matsukawa Y, Tsuchida E. Effect of heme structure on O₂-binding properties of human serum albumin-heme hybrids: intramolecular histidine coordination provides a stable O₂-adduct complex. *Bioconjugate Chem* 2002;13:397-402.
 21. Nakagawa A, Komatsu T, Iizuka M, Tsuchida E. Human serum albumin hybrid incorporating tailed porphyrinoiron(II)in the , , , -conformer as an O₂-binding site. *Bioconjugate Chem* 2006;17:146-151.
 22. Nakagawa A, Komatsu T, Iizuka M, Tsuchida E. O₂ binding to human serum albumin incorporating iron porphyrin with a covalently linked methyl-L-histidine isomer. *Bioconjugate Chem* 2008;19:581-584.
 23. Komatsu T, Huang Y, Wakamoto S, Abe H, Fujihara M, Azuma H, Ikeda H, Yamamoto H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Influence of O₂-carrying plasma hemoprotein "albumin-heme" on complement system and platelet activation in vitro and physiological responses to exchange transfusion. *J Biomed Mater Res* 2007;81A:821-826.
 24. Tsuchida E, Komatsu T, Yanagimoto T, Sakai H. Preservation stability and in vivo administration of albumin-heme hybrid solution as an entirely synthetic O₂-carrier. *Polym Adv Technol* 2002;13:845-850.
 25. Tsuchida E, Komatsu T, Hamamatsu K, Matsukawa Y, Tajima A, Yoshizu A, Izumi Y, Kobayashi K. Exchange transfusion of albumin-heme as an artificial O₂-infusion into anesthetized rats: physiological responses, O₂-delivery and reduction of the oxidized heme sites by red blood cells. *Bioconjugate Chem* 2000;11:46-50.
 26. Komatsu T, Yamamoto H, Huang Y, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Exchange transfusion with synthetic oxygen-carrying plasma protein "albumin-heme" into an acute anemia rat model after seventy-percent hemodilution. *J Biomed Mater Res* 2004;71A:644-651.
 27. Tsuchida E, Komatsu T, Matsukawa Y, Nakagawa Y, Sakai H, Kobayashi K, Suematsu M. Human serum albumin incorporating synthetic heme: red blood cell substitute without hypertension by nitric oxide scavenging. *J Biomed Mater Res* 2003;64A:257-261.
 28. Kobayashi K, Komatsu T, Iwamaru A, Matsukawa Y, Watanabe M, Horinouchi H, Tsuchida E. Oxygenation of hypoxia region in solid tumor by administration of human serum albumin incorporating synthetic hemes. *J Biomed Mater Res* 2003;64A:48-51.
 29. Linberg R, Conover CD, Shum KL, Shorr RGL. Increased tissue oxygenation and enhanced radiation sensitivity of solid tumors in rodents following polyethylene glycol conjugated bovine hemoglobin administration. *In Vivo* 1998;12:167-174.
 30. Horinouchi H, Yamamoto H, Komatsu T, Huang Y, Tsuchida E, Kobayashi K. Enhanced radiation response of a solid tumor with the artificial oxygen carrier 'albumin-heme'. *Cancer Sci* 2008;99:1274-1278.
 31. Huang Y, Komatsu T, Wang RM, Nakagawa A, Tsuchida E. Poly(ethylene glycol)conjugated human serum albumin including iron porphyrins: surface modification improves the O₂-transporting ability. *Bioconjugate Chem* 2006;17:393-398.
 32. Huang Y, Komatsu T, Yamamoto H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. PEGylated albumin-heme as an oxygen-carrying plasma expander: exchange transfusion

- into acute anemia rat model. *Biomaterials* 2006;27:4477-4483.
33. Komatsu T, Ohmichi N, Zunszain PA, Curry S, Tsuchida E. Dioxygenation of human serum albumin having a prosthetic heme group in a tailor-made heme pocket. *J Am Chem Soc* 2004;126:14304-14305.
 34. Paoli M, Anderson BF, Baker HM, Morgan WT, Smith A, Baker EN. Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two α -propella domains. *Nat Struct Biol* 1999;6:926-931.
 35. Fairley NH. Methemalbumin (pseudo-methemoglobin). *Nature* 1938;142:1156-1157.
 36. Muller-Eberhard U, Morgan WT. Porphyrin-binding proteins in serum. *Ann NY Acad Sci* 1975;244:624-650.
 37. Adams PA, Berman MC. Kinetics and mechanism of the interaction between human serum albumin and monomeric haemin. *Biochem J* 1980;191:95-102.
 38. Wardell M, Wang Z, Ho JX, Robert J, Ruker F, Rubel J, Carter DC. The atomic structure of human serum methemalbumin at 1.9 Å. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:813-819.
 39. Zunszain PA, Ghuman J, Komatsu T, Tsuchida E, Curry S. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC Struct Biol* 2003;3:6.
 40. Komatsu T, Ohmichi N, Nakagawa A, Zunszain PA, Curry S, Tsuchida E. O₂ and CO binding properties of artificial hemoproteins formed by complexing iron protoporphyrin IX with human serum albumin mutants. *J Am Chem Soc* 2005;127:15933-15942.
 41. Phillips SEV, Schoenborn BP. Neutron diffraction reveals oxygen-histidine hydrogen bond in oxymyoglobin. *Nature* 1981;292:81-82.
 42. Shaanan B. Structure of human oxyhemoglobin at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* 1983;171:31-59.
 43. Komatsu T, Nakagawa A, Zunszain PA, Curry S, Tsuchida E. Genetic engineering of the heme pocket in human serum albumin: modulation of O₂ binding of iron protoporphyrin IX by variation of distal amino acids. *J Am Chem Soc* 2007;129:11286-11295.
 44. Kalyanasundaram K, Gratzel M. Light induced redox reactions of water soluble porphyrins, sensitization of hydrogen generation from water by zincporphyrin derivatives. *Helv Chim Acta* 1980;63:478-485.
 45. Komatsu T, Wang RM, Zunszain PA, Curry S, Tsuchida E. Photosensitized reduction of water to hydrogen using human serum albumin complexed with zinc-protoporphyrin IX. *J Am Chem Soc* 2006;128:16297-16301.
 46. Dougherty TJ. Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin-II. *Photochem Photobiol* 1987;46:569-573.
 47. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korblik M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:889-905.
 48. Lopez RFV, Lange N, Guy R, Bentley MVLB. Photodynamic therapy of skin cancer: controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. *Drug Deliver Rev* 2004;56:77-94.
 49. Aveline B, Hasen T, Redmond RW. Photophysical and photosensitizing properties of benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD-MA). *Photochem Photobiol* 1994;59:328-335.
 50. Guldi DM, Prato M. Excited-state properties of C₆₀ fullerene derivatives. *Acc Chem Res* 2000;33:695-703.
 51. Arbogast JW, Darmanyan AP, Foote CS, Rubin Y, Diederich FN, Alvarez MM, Anz SJ, Whetten RL. Photophysical properties of C₆₀. *J Phys Chem* 1991;95:11-12.
 52. Anderson JL, An YZ, Rubin Y, Foote CS. Photophysical characterization and single oxygen yield of a dihydrofullerene. *J Am Chem Soc* 1994;116:9763-9764.
 53. Qu X, Komatsu T, Sato T, Glatter O, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Structure, photophysical property, and cytotoxicity of human serum albumin complexed with tris(dicarboxymethylene) C₆₀ fullerene. *Bioconjugate Chem* 2008;19:1556-1560.
 54. Wilkinson F, Helman WP, Rossa AB. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet-state of molecular-oxygen in solution. *J Phys Chem Ref Data* 1993;22:113-262.
 55. Lu G, Komatsu T, Tsuchida E. Artificial hemoprotein nanotubes. *Chem Commun* 2007;2980-2982.
 56. Lu G, Tsuchida E, Komatsu T. Human serum albumin nanotubes comprising layer-by-layer assembly with polycation. *Chem Lett* 2008;37:972-973.
 57. Qu X, Lu G, Tsuchida E, Komatsu T. Protein nanotubes comprised of an alternate layer-by-layer assembly using a polycation as an electrostatic glue. *Chem Eur J* 2008;14:10303-10308.

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 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: Kenkou-sya Corp. Artificial Blood Publishing office.

2F Casa-kudan, 1-1-7 Kudan-kita, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0073, 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、原稿の修正を求められる場合がある。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) ポリグラフィシステム (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

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

カーサ九段2階

(株)研恒社「人工血液」編集係 宛

電話: 03-5286-3122, FAX: 03-3205-4740

E-mail: kita@kenkousya.jp

編集後記

私ごとであるが、実はここ数年間、献血が出来ない状態になってしまった…。理由は、今から20年前、学生の時に語学研修と銘打ってイギリスに二週間程度滞在した、ただそれだけである。ヨーロッパでクロイツフェルトヤコブ病の感染が拡大したので、当時狂牛病に感染した牛の肉を食べた可能性が否定できない?のである。これに配慮をして日赤がある一定期間に渡航歴のある人の献血規制をしているのである。しかし、最近になって、この措置を緩和することの是非について検討を開始したという。H1N1インフルエンザウイルス感染の拡大のため、献血者数の減少に拍車がかかっているらしく、献血者数を確保するための措置とのこと。新興伝染病の蔓延は、かくも献血事業に多大の影響を与える厄介なものである。人工血液が実現すれば、このような煩わしさは解消されるのだろう。

さて本号ではまず、昨年慶大で開催された国際会議Current Issue on Blood Substitutes Researchに招聘したUCLAのDr. Jahrが総説を寄稿して下さった。Dr. Jahrらは学界でNeutralな立場を堅持し、幾つかの企業のHBOCsの投与実験を行い客観的評価をしている。各社の製品の性質について非常に詳しい。神奈川大学の関邦博先生からは、"Semibiology"という分野につ

いて、総説をご寄稿いただいた。極限状態においても細胞、あるいは摘出臓器が生命活動を維持できる現象を見出し、これを臓器保存、臓器移植に応用しようとお考えである。ガスバイオロジーに繋がる多くの知見をお持ちであり、人工血液の新しい利用法開拓のヒントになりそうである。東京大学の岸村顕広先生からは、ピクソームという新しいカプセル素材についての話題提供である。合成高分子電解質を積層して形成したりポソームに代わる素材として期待される。ミオグロビンを内包した粒子を作成し、人工赤血球としての物理化学的評価までを実施している。今後の動物投与実験の結果が期待される。早稲田大学の小松晃之先生からは、アルブミンを用いた人工酸素運搬体、ならびにこれを応用したナノチューブなど様々な新材料についてご寄稿頂いた。遺伝子組換えアルブミンが認可され大量に生産されるようになったので、今後新しい機能材料の素材として世の中に出てくるのではないかと思われる。

本誌は、Bilingual Journalです。和文、英文どちらの原稿も受け付けます。皆様からの話題提供を期待しております。

(酒井 宏水)

編集委員会

酒井 宏水(委員長), 東 寛, 大谷 渡, 武岡 真司, 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.17(2) 2009年8月18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