

目次

人工血液

第 17 卷 第 3 号 2009 年 9 月

第16回年次大会プログラム	98
---------------------	----

Contents

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 17 No. 3 September, 2009

<i>The 16th Annual Meeting Program</i>	<i>98</i>
--	-----------

第16回日本血液代替物学会年次大会

The 16th Annual Meeting of the Society of Blood Substitutes, Japan

大会長：高折益彦（東宝塚さとう病院 名誉院長）

『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）

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

東京都新宿区信濃町35番地

ランチョンセミナー：“代用血漿剤HES” 平成21年10月17日
（主催：フレゼニウス・カービ・ジャパン株式会社）

年次大会事務局
〒665-0873 兵庫県宝塚市長尾町2番地1号
東宝塚さとう病院
Tel：0797-88-2200
Fax：0797-88-5782
r-kobayashi@mail.hts-hsp.com

巻頭言 年次大会会長挨拶

昨年10月に第16回日本血液代替物学会年次大会長を拝命いたしました。実のところこの大役が果たせるか躊躇いたしました。しかし一会員として努力しなければいけないとの思いでこの老骨の身でありながら努力してまいりました。さらに財政的な問題、また一私立病院の職員としての立場などがあり、とても満足すべき会運営ができるとは思えないままこの秋を迎えました。それにもかかわらず予想以上の演題申込をいただき、さらに特別講演、シンポジウムへのご参加をお願いした先生、司会、座長をお願いした先生方がご多忙にもかかわらずご快諾いただき感謝いたしております。

さて昨年の春にアメリカ合衆国 Maryland, Bethesdaでありました非細胞型ヘモグロビン利用の人工酸素運搬体での討論内容から推察しても、わが国で開発中の細胞型酸素運搬体こそがこの分野で世界をリードするものと思いました。さらに今年の春にはNorthfield社が重合bovine hemoglobin開発から撤退しました。一方、人工血小板の開発にしてもわが国では着々と進行していますが、私が論文発表でみる限り諸外国では目立った進展がありません。そこで今回の学会のテーマを世界をリードする血液代替物としました。

シンポジウムでは細胞型酸素運搬体のさらなる改良、工業生産への躍進を目指して作成の基本から、材料とするヘモグロビン、リポソームの取り扱い、そして工業生産構成の問題点について検討いただきたく企画させていただきました。また特別講座にはナノサイズの微粒子が微少血管でどのような流れを示すか百武先生にお話しいただくようお願いいたしました。またすでに牛ヘモグロビンを材料とした人工酸素運搬体は獣医学領域では応用されているとは伺いますが、この分野での血液代替物とはどんなものか萩原先生からお話し頂くことにしております。そして半田先生からは人工血小板の開発について今までの経過と多少伏せるべき点もあろうかとは存じますが将来への構想についてお話しただけると期待しております。さらにこれは私自身の希望ですが、もしリポソームが今よりも大きくなり、より多くのヘモグロビンを含有させるようになればと思い、“人工細胞研究におけるGiant Liposome：酸素運搬への可能性”と題した話を湊元先生にお願いしました。

私自身は臨床医です。そして人工酸素運搬体、あるいは人工血小板代替物が早く臨床の場において活用できることを望むものの一人です。そのためにはそれぞれの製品の使用が厚生労働省から認可されなければなりません。そのような意味で良い製品を希望して、本年の学会の傾向も多少工業生産と言う面が強く打ちだされた感もなきにしもあらずと思われました。しかしそれがなければ臨床成績などはおろか、治験成績さえも得られません。そしてさらなる進歩をするために、将来への夢も持ちたいと企画いたしました。これらの企画をふまえて少しでも血液代替物開発に役立つように心から願う次第です。

会員の方、そしてこのような人工血液代替物に多少とも興味をお持ちの方々のご参加を願っております。

第16回日本血液代替物学会年次大会

大会長 高折益彦

(東宝塚さとう病院名誉院長)

お知らせとお願い

■会員・参加者の方々へ

<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 図書館2階 北里講堂（東京都新宿区信濃町35番地）

<受付>

平成21年10月16日、17日ともに午前8時20分から午後4時30分まで

<参加登録>

当日の混雑を防ぐために事前に同封しました登録用紙にお名前、ご住所、ご所属をご記入、ご持参いただき、受付デスクにご提出願います（なお、お忘れの場合には会場入口に登録記入デスクと登録用紙とを用意いたします）。

参加費 会員 ￥8,000

非会員 ￥10,000

と登録用紙を受付デスクにご提出願います。引換えに参加証をお渡しいたしますので記名デスクにてお名前、ご所属をご記入のうえ上着胸のポケット、ご婦人の場合にはネーム札ケースに入れて上着に付けて会場にご入場願います。

<入会申込み>

当日、会場での入会申込みは受付られません。なるべく学会当日以前にご入会願います。詳細は慶應義塾大学医学部呼吸器外科内日本血液代替物学会事務局（東京都新宿区信濃町35番地 Tel：03-3563-3493）にお訊ねになるか、あるいは学会ホームページ <http://www.blood-sub.jp/> をご参照願います。

ただ入会申込み書は受付に用意いたします。

<学会号（抄録集）>

この号が学会号（抄録集）です。お忘れなく当日ご持参下さい。部数に限りがありますが当日、受付にても1部¥1,500にて購入出来ます。

<懇親会>

会場外でのさらなる討議、参加者相互の親睦を図るため、学会第1日目（16日）講演終了後 午後5時20分 頃から慶應義塾大学病院新館11階 パレスホテル・オアシスにて懇親会を行ないます。懇親会費は参加費に含まれておりますのでぜひご参加下さい。

■スライド、動画使用について

1. ご使用ご希望の方は発表時間の少なくとも40分前にスライド受付係までに資料をご提出下さい。
2. スライド等映写できるスクリーンは1面のみです。
3. 本学会の発表はすべてPCプロジェクターで行いますのでご了承ください。
4. スライド映写係がPCに取り込んで試写しますのでご確認願います。
5. Windowsの場合（動画を含む場合を除く）はUSB フラッシュメモリまたはCD-Rに保存してご提出下さい。CD-Rについては、ハイブリッドフォーマットのみといたします。Macintosh および Windowsで動画を含むデータの場合は、ご自身のパソコンをお持ちください。なお、当日お持込になるPCまたはメディアのウイルスチェックは必ず事前に行ってください。スクリーンセーバー、ウイルスチェックならびに省電力設定はご発表前にあらかじめ解除しておいてください。静止画像はJPEG形式で作成されることをお勧めいたします。
6. 事務局でご用意しておりますPC（Windows）には、OS：Windows XP で PowerPoint 2003, 2007をインストールしており、PowerPoint 2000以降のバージョンには対応可能です。この環境にて正常に作動するデータをご用意ください。ご発表データは、会期終了後、事務局で責任を持って消去いたします。
7. 当日はUSBフラッシュメモリ、CD-R等のバックアップデータを必ずご用意ください。当日のデータ及びバックアップとして使用させていただきます。
8. 資料提出後には、試写を行ってください。
9. ご自身のPCでの発表を希望される場合は、D-sub15ピンによるモニター出力が必要です。事務局でD-sub15ピンの接続ケーブルをご用意いたしますが、ご持参いただくPCからD-sub15ピンへの変換コネクタが必要な場合には、各自でご用意ください。

D-sub15ピン以外では接続できませんのでご了承ください。

10. 電源ケーブルを必ずご持参ください。バッテリーでのご使用はトラブルの原因となります。

■講演発表

一般演題発表時間は1題12分です。シンポジウムでの発表は1題20分です。特別講演の発表時間は1題35～40分です。
ご発表いただきましたご講演の内容は学会機関誌“人工血液”へのご投稿をお願いします。

■質問・討論

ご質問、ご討論をなさる方は予めマイクの位置に移動され、演者の発表終了後に挙手をされて座長、司会者の指示を受けて下さい。
ご質問、ご討論時間は原則2分をお願いします。

■会期中各種関連会議

評議員会：10月16日（金）11：50～12：50 慶應義塾大学医学部北里記念図書館2階講堂 第1会議室
総 会：10月17日（土）13：40～14：20 慶應義塾大学医学部北里記念図書館2階講堂 北里講堂

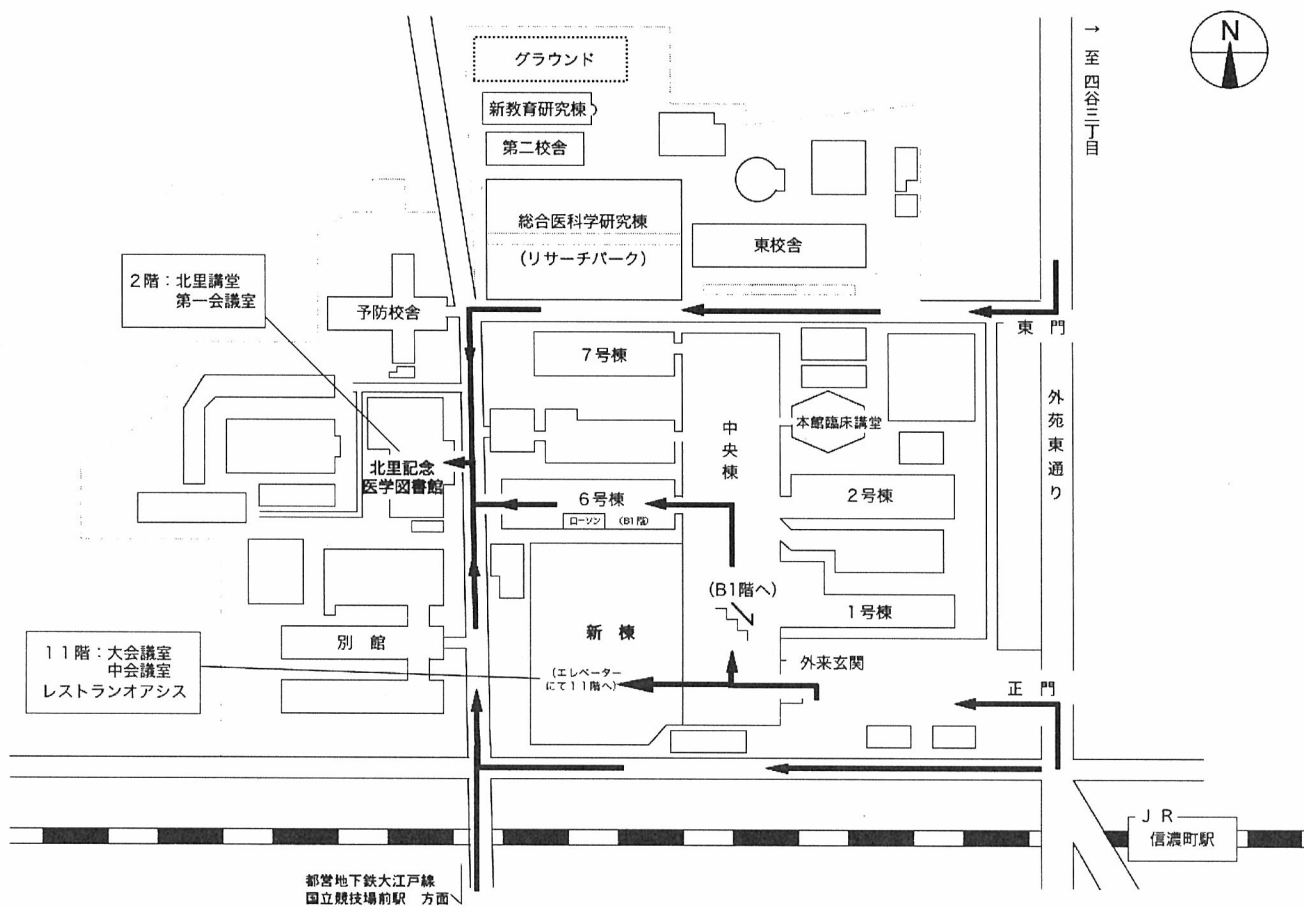
■大会事務局

〒665-0873 兵庫県宝塚市長尾町2番地1号
東宝塚さとう病院（大会長）高折益彦
Tel：0797-88-2200
Fax：0797-88-5782

大会日程表

	平成21年10月16日(金)	平成21年10月17日(土)
8:00		
8:30		
9:00	9:10-9:20 開会の辞	9:10-10:10 一般演題(3) — 3題 座長：小松晃之 早稲田大学理工学部 演者：宮里麻友美 藤原満博 異島 優
9:30	9:20-10:40 一般演題(1) — 4題(1題当たり20分) 座長：寺嶋克幸 東京臨海病院麻酔科 演者：田口和明 庄野 聡 酒井宏水 勢司泰久	
10:00		10:15-11:15 微小循環系でのナノ粒子の不思議な流れ 司会：小林紘一 慶應義塾大学名誉教授 演者：百武 徹 横浜国立大学大学院工学研究院 コメンテータ：富田 裕 慶應義塾大学医学部神経内科
10:30	10:40-11:40 獣医医療における血液代替物の意義 司会：清水 勝 東京女子医科大学名誉教授 演者：萩原克郎 酪農学園大学獣医学部 コメンテータ：並河和彦 麻布大学獣医学部	11:20-12:20 一般演題(4) — 3題 座長：堀之内宏久 慶應義塾大学呼吸器外科 演者：青木克憲 勝野峻介 武岡真司
11:00	11:50-12:50 昼 食 評議員会	
11:30		12:30-13:30 昼 食 Lunchon Seminar(代用血漿剤HES) 司会：小堀正雄 菊名病院麻酔科 演者：宮尾秀樹 埼玉大学医療センター麻酔科
12:30		13:40-14:20 総会
13:00	13:00-15:30 シンポジウム	14:25-15:25 人工血小板代替物の過去、現在、未来 司会：湯浅晋治 順天堂大学名誉教授 演者：半田 誠 慶應義塾大学医学部輸血学
13:30	“細胞型人工酸素運搬体を作る” 座長：武岡真司 早稲田大学大学院先進理工学研究科 演者：酒井宏水 横江淳一 柚木幹弘 金田伸一 コメンテータ：酒井康之 東京大学工業化学研究所 石原雅之 防衛医科大学内科	15:25-15:35 休憩
14:00		15:35-16:35 人工細胞研究におけるGiant Liposome : 酸素運搬体への可能性 司会：阿岸鉄三 東京女子医科大学名誉教授 演者：湊元幹太 三重大学工学部
14:30		16:35-16:45 閉会の辞
15:00		
15:30	15:30-15:40 休憩	
16:00	15:40-17:00 一般演題(2) — 4題 座長：米川元樹 札幌北楡病院 演者：奥田直人 堀之内宏久 高橋大輔 三宅誠司	
16:30		
17:00		
17:30	17:20-20:00 懇親会	
18:00		
18:30		
19:00		
19:30		
20:00		
20:30		

交通案内図



■JR総武線 「信濃町」駅下車 徒歩約5分

■都営地下鉄大江戸線「国立競技場」駅下車 (A1番出口), 徒歩約5分

平成21年10月16日(金)

開会の辞

9:10-9:20

一般演題 (1) — 4 題 (1 題当たり20分) 9:20-10:40

座長： 寺嶋克幸 東京臨海病院麻酔科

- ・出血性ショックモデルラットにおけるヘモグロビン小胞体頻回投与時の体内動態解析

田口和明

熊本大学大学院医学薬学教育部

- ・マウス致死性出血性ショックにおける人工赤血球の投与後の再投与と輸血について

庄野 聡

防衛医科大学防衛医学講座

- ・脳内出血モデルによるHb小胞体の脳神経組織への影響に関する検討

酒井宏水

早稲田大学理工学研究科

- ・制御不能尾動脈出血モデルを用いたヘモグロビン小胞体輸液蘇生の検討

勢司泰久

慶應義塾大学医学部呼吸器外科

一般演題 (2) — 4 題 15:40-17:00

座長： 米川元樹 札幌北検病院

- ・微小モデル血管内を流動する人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）分散流体の配位子反応

奥田直人

早稲田大学大学院先進理工学研究科

- ・実験腫瘍における腫瘍酸素分圧のマッピングと人工酸素運搬体投与による腫瘍の酸素加

堀之内宏久

慶應義塾大学医学部呼吸器外科

- ・ヘモグロビン小胞体（HbV）が免疫系に及ぼす影響

高橋大輔

北海道赤十字血液センター

- ・細胞型人工酸素運搬体混入血液での電解質（Na,K,Cl）濃度測定に関する検討

三宅誠司

大阪府済生会野江病院検査科

懇 親 会

17:20-20:00

特別講演

10:40-11:40

獣医医療における血液代替物の意義

司会： 清水 勝 東京女子医科大学名誉教授

演者： 萩原克郎 酪農学園大学獣医学部

コメンテータ：並河和彦 麻布大学獣医学部

昼食 評議員会 11:50-12:50

シンポジウム 13:00-15:30

“細胞型人工酸素運搬体を作る”

座長： 武岡真司 早稲田大学大学院先進理工学研究科

演者： 酒井宏水, 横江淳一, 柚木幹弘, 金田伸一

コメンテータ：酒井康之 東京大学工業化学研究所

石原雅之 防衛医科大学内科

休 憩

15:30~15:40

平成21年10月17日(土)

一般演題 (3) — 3 題 9:10-10:10

座長： 小松晃之 早稲田大学理工学部

- ・四塩化炭素誘発肝障害モデルラットにおけるヘモグロビン小胞体の体内動態の検討

宮里麻友美

熊本大学大学院薬学教育部

- ・ヘモグロビン小胞体への薬剤の吸着の検討

藤原満博

北海道赤十字血液センター

- ・強力な臓器保護剤としての新規S-ニトロソヒト血清アルブミンの開発

異島 優

熊本大学大学院医学薬学研究部

特別講演 10:15-11:15

微小循環系でのナノ粒子の不思議な流れ

司会： 小林紘一 慶應義塾大学名誉教授

演者： 百武 徹 横浜国立大学大学院工学研究院

コメンテータ： 富田 裕 慶應義塾大学医学部神経内科

一般演題 (4) — 3 題 11:20-12:20

座長： 堀之内宏久 慶應義塾大学呼吸器外科

- ・Oxy Map Systemによる tissue dysoxia の画像解析

青木克憲

浜松医科大学救急医学

- ・膜流動性の異なるドデカペプチド結合（アデノシン5'-二リン酸）内包リン脂質小胞体の調製とADP放出特性

勝野峻介

早稲田大学大学院先進理工学研究科

- ・放射性同位元素標識ドデカペプチド結合（アデノシン5'-二リン酸）内包リン脂質小胞体の調製とその血中動態・臓器分布

武岡真司

早稲田大学大学院先進理工学研究科

Lunchon Seminar 12:30-13:30

代用血漿剤HES

司会： 小堀正雄 菊名病院麻酔科

演者： 宮尾秀樹 埼玉大学医療センター麻酔科

総 会 13:40-14:20

特別講演 14:25-15:25

人工血小板代替物の過去，現在，未来

司会： 湯浅晋治 順天堂大学名誉教授

演者： 半田 誠 慶應義塾大学医学部輸血学

休 憩 15:25～15:35

特別講演 15:35-16:35

人工細胞研究におけるGiant Liposome：

酸素運搬体への可能性

司会： 阿岸鉄三 東京女子医科大学名誉教授

演者： 湊元幹太 三重大学工学部

閉会の辞 16:35-16:45

獣医医療における血液代替物の意義

萩原克郎

酪農学園大学獣医学部

私たちが日常食品として摂取している、牛乳、チーズ、バターなどの乳製品は、乳牛（ホルスタイン種）の乳を原料として食品加工されていることはご存知のことと思います。酪農家は、子牛から乳を生産する成牛を育成するまでに疾病予防に多くの労力と経費を費やしています。このような生産動物医療に従事する獣医師は、疾病罹患の少ない家畜の育成・生産のために畜産業の一端を支えています。動物種によりその対応は多岐にわたります。本講演では、ウシを例に獣医医療の一端をご紹介します。

ウシは、ヒトとは異なり免疫グロブリンをまったくもたない無グロブリン血漿で出生します。これは、胎盤構造上胎児期に抗体が移行しないことに起因し、新生子牛のケアを行う上で重要な点です。そこで、母牛から搾った初乳を直ちに給与して初乳中のグロブリンを子牛に供給しなければなりません。初乳中の抗体は新生子消化管粘膜上皮の Fc レセプター (FcRn) に結合し、結合した抗体は細胞内に取り込まれ細胞内を經由して乳び管に移行すると考えられています。新生子が初乳中の免疫グロブリンを吸収し得る時間は生後 24~36 時間以内と極めて短時間であり、ほとんど全ての γ -グロブリンを吸収します。IgA については大半が消化管に留まりますが、一部吸収された IgA は上皮より腸管内へ再び分泌されます。

このように初乳は、新生子にとって必要な栄養素のみならず不足する血液成分を補充する「血液代替物質」としてその役割を担っているとも言えます。その成分は、蛋白質、エネルギー源としての糖分、ビタミン、ミネラルを豊富に含んでおり、初乳成分中の蛋白質の 50~60% を免疫グロブリンが占めています。特にウシなどの反芻獣では IgG が多いのが特徴で母親血清中の免疫グロブリン比と類似しています。一方、反芻獣でない動物の初乳中のそれは IgA が大半を占め、上述の胎盤移行抗体の有無を反映しているようです。また、初乳中には白血球が約 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ 個存在しその約半数がリンパ球で、これら初乳中リンパ球は、消化管で短期間生存し、母親由来のリンパ球が新生子に移行し新生子の免疫機能に関与している可能性が示唆されています。このように、ウシの生理的な特徴と獣医医療はヒトの医療とはかなり異なりますが、ウシの初乳が多機能を持ったユニークな血液代替物質であり、新生子の生命維持に重要な要素である事例をご紹介します。

微小循環系でのナノ粒子の不思議な流れ

百武 徹

横浜国立大学大学院工学研究院

急速な少子高齢化の到来に伴う輸血用血液製剤不足の解消、また現行の血液製剤に対する様々なリスクの軽減を目指し、現在、赤血球製剤の代替物として、様々なタイプの人工酸素運搬体が開発中である。このうち、ヘモグロビンのリポソームに封入したカプセル型人工赤血球は、主に日本で開発が先行しており、すでに赤血球代替物としての有用性が確認されつつある。カプセル型人工赤血球の特徴として、その直径が約 200-250nm とヒトの赤血球の 1/30 程度のナノ粒子であり、赤血球が到達できない微小循環部位にも容易に酸素を運搬することができると考えられる。人工赤血球の循環器疾患への利用を念頭に置いた場合、血管内におけるナノ粒子としての人工赤血球の流体力学的挙動の理解が非常に重要となってくる。特に、微小血管内における酸素運搬過程は、人工赤血球と赤血球とのインタラクションの影響下にあるため、人工赤血球による血流への作用は複雑となる。このようなことから、微小循環系における不均一性改善メカニズムを詳細に解明するためには、実験的アプローチに加え、数値シミュレーションによる血球の挙動解析が有効であると考えられる。

本講演では、このナノ粒子としての人工赤血球が微小循環系における赤血球とのインタラクション下でどのような流体力学的挙動を示すのかを数値シミュレーションの結果をもとに解説する。特に微小血管分岐部に着目し、赤血球の一部を人工赤血球に置換した際の分岐部内における血球の挙動解析についての報告を行う。本研究では、流体力学的観点から血球を含む微小血管内を固液混相流と捉え、解析手法としては混相流に有力な手法である格子ボルツマン法 (Lattice Boltzmann Method : LBM) という流体解析手法を適用している。さらに、赤血球の変形、集合体の形成などのモデル化を行い、実際に近い現象の再現に成功している。これらの新しい計算手法を用いて微小血管分岐部における赤血球と人工赤血球の血球分配比を調べることで、人工赤血球の投入が分岐部において酸素供給の不均一性改善をもたらすメカニズムを明らかにできると考えられる。

人工血小板代替物の過去・現在・未来

半田 誠

慶應義塾大学輸血・細胞療法部

血小板の輸血は、有効期限が短くかつ厳密な保存条件が不可欠であり、緊急対応は極めて困難であることから、それを代替する薬物（血小板代替物）の開発が行われてきた。血小板代替物は、ヒト血小板そのものを加工した血小板由来産物と、血小板以外の構成成分から成り立った人工産物に大別され、後者がいわゆる人工血小板である。前者の開発の歴史は古く、米国において軍事目的のための国防費による研究が実に 50 年代から始まった。その結果、固定血小板や凍結乾燥血小板、あるいは凍結乾燥した血小板膜断片（infusible platelet membrane：IPM）などが開発され、IPM は初期臨床研究（フェーズ I/II）に供された。一方、後者は生体適合性のある担体（赤血球、アルブミン微粒子、リン脂質小胞体：リボソームなど）を用い、その表面に血小板受容体やリガンドを結合させたもので、90 年代初めにフィブリノゲンやその合成ペプチド（RGD）をコートした赤血球（Thromboerythrocyte）が先駆けとなり、いくつかの微粒子が開発され、フィブリノゲンを表面固定したアルブミン微粒子（Synthocyte や Simplat）は初期臨床研究に供された。しかしながら、いずれもベンチャー企業主導による開発のため、製造物の規格や研究内容の詳細はほとんど明らかにされていない。我々は 97 年より基礎的検討を行い、試行錯誤の結果、血小板の機能の一部を代替して、止血機能を有するプロトタイプの人工微粒子を開発した。本人工物は、生体適合性のある担体としてリボソームを選択し、標的分子としてフィブリノゲン γ 鎖由来の合成ペプチド（ γ 400-411：H12）をその表面に結合させ、リボソーム内水相に生理的血小板活性化物質のアデノシン二リン酸（ADP）を有するものである。将来の実用化に向けて、産物の最適化を進めるとともに、動物モデルにより安全性の検討や血小板製剤を代替する適応の把握を行っている。現在、固定凍結乾燥血小板（Stasix）と平均径が 1.2 ミクロンのフィブリノゲン結合アルブミン・マイクロスフェア（Simplat）が欧米で臨床試験に供されているといわれている。この機会に、歴史ある人工血小板代替物の現状と将来について考えてみたい。

人工細胞研究におけるGiant Liposome: 酸素運搬体への可能性

湊元幹太

三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻

リボソームは、リン脂質を水に懸濁すると自然に形成される、二分子膜で包まれた閉鎖小胞であり、1960年代にBanghamによって見出された。それ以来、細胞の膜系モデルとして研究され、薬剤や遺伝子の送達キャリアとしても利用されている。このうち、顕微鏡観察できる $\sim 1\text{ }\mu\text{m}$ 以上のものを巨大リボソーム(Giant Liposome, Giant Unilamellar Vesicle, GUV)と言い、細胞のサイズに近いことから“Cell-sized Liposome”とも呼ばれる。初期の試料にも恐らく含まれていたであろうが、 μm サイズに着目して、細胞モデル的な観点から研究されるようになったのは、ここ10～20年のことであり、従来のリボソーム($\sim 100\text{ nm}$ 程度)で盛んな医療応用に関してはほとんど未知数である。そこで、本発表ではGUVに関して、①細胞モデル構築研究例の紹介し、②調製法の現状と課題点に触れ、③細胞型酵素運搬体としての可能性について考える。GUVによる細胞機能模倣研究の嚆矢は、アクチン繊維や微小管など細胞骨格タンパク質との相互作用による膜の形態変換であり、重合に伴うGUVの変形が観察されている。最近では、膜マイクロドメイン構造形成、遺伝子発現系の導入、シグナル伝達系の再構成などの研究が展開され、GUVへの内水相物質封入や膜タンパク質の組込み技術も開発されてきている。これらの研究では、リン脂質薄膜の水和によるGUV調製法が頻用されるが、生理的塩濃度条件において、形成効率が著しく低い、粒径・多重度・形状がばらつく、あるいは大量調製が難しい、といった医療応用には不向きな点が未だ多い。今回、私どもの膜タンパク質再構成法や、水和法を改良し単層性とサイズ均一性を改善する試みについて紹介するとともに、現状のGUV研究知見に基づき細胞型酵素運搬体のための基材として利用できるか考えたい。

細胞型人工酸素運搬体をつくる ―ヘモグロビン精製から小胞体化まで

酒井宏水, 宗 慶太郎, 土田英俊

早稲田大学理工学研究所 酸素輸液プロジェクト

Hb を用いる人工酸素運搬体(HBOCs)の研究がここまで進展した理由の一つに, 幸運にも Hb が極めて安定な球状蛋白質であったことが挙げられる. Hb のヘムは, 通常 Fe^{2+} の状態で酸素を可逆的に結合解離するが, 次第にメト化(Fe^{3+} に酸化)する. 酸素の代わりに一酸化炭素(CO)を結合させると耐熱性を呈し, 低温殺菌処理(60°C , 10 時間)を経てもメト化や変性は無い. このとき, 夾雑する不安定な酵素などの蛋白質は変性不溶化し容易に除去でき, またウィルスも不活化される[1]. ウィルス除去膜を併用し安全性を高め, 得られる高純度 Hb 溶液は, 限外濾過膜処理で容易に 40 g/dL 以上に濃縮できる. これをリン脂質二分子膜で被覆し, 小粒子(250-280 nm)とする. CO は光反応で容易に除去でき, Hb は酸素を結合するようになる. 「リボソームは不安定なもの」と思われがちであるが, 条件を選び脱酸素化(deoxyHb)すれば, メト化を回避し室温で数年の保存に耐え得る[2].

Hb 小胞体は, Hb と 4 種類の脂質が, 互いに相互作用をして集合形成した小粒子であり, 分子集合体の典型である. 小胞体化工程において重要なのは, 分子間相互作用を制御して如何に沢山の Hb を出来るだけ少ない量の脂質で被覆し(粒子の高機能化), 粒子分散液として血液に匹敵する Hb 濃度(10 g/dL 以上)を達成するか, である[3,4]. リン脂質小胞体は多重層膜になり易いが, これを一枚膜にするため, 一般的にコレステロールを添加して脂質膜の曲率を低下させることや, 負電荷脂質を導入して脂質膜間の静電的反発を増大させる. ところが, Hb の等電点(pI)は約 7.0 であり, pH によって表面荷電が変化するので, 脂質膜と Hb との相互作用も考慮する必要がある. Hb と脂質膜との静電的反発を防ぐには, pI 付近の pH での調製が適当である. また, 電解質濃度が高いと, 脂質膜間の静電的反発作用を遮蔽することになるので, 電解質濃度を下げて調製することが一つのテクニックである. 脂質種を選択と組み合わせは無数にあるが, 生体投与試験(血液適合性, 代謝, 血行動態)を経て, 現行の組成に定着してきた[5-8].

[1] Protein Expr Purif 1993;4:563, [2] Bioconjug Chem 2000;11:425, [3] Langmuir 1996;12:1755, [4] Biotechnol Progr 1996;12:119, [5] Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2007;35:157, [6] Biochim Biophys Acta. 2008;1778:1035, [7] Bioconjug Chem 1997;8:539, [8] Am J Pathol 2001;159:1079.

微粒子製剤における創薬領域でのPEG化と将来への展望

横江 淳一

ニプロ株式会社 医薬品研究所 製剤研究部

リボソーム等の微粒子製剤は、様々な物理化学的特性を持つ薬物を封入することが可能であるだけでなく、内封薬物の放出制御、薬物のターゲティングへの適用及び副作用の低減や反復投与の回避といった効果が期待されるため、ドラッグデリバリーシステムを構築するための有用な手段の一つとして研究されてきた。一般に、薬物担体である微粒子を生体内に静脈内投与した際には、肝臓や脾臓などの細網内皮系に速やかに取り込まれるため、結果として細網内皮系以外の組織への送達効率が低下することが知られている。この微粒子担体に水溶性高分子であるポリエチレングリコール（以下、PEGと略す）を導入すると、静脈内投与後も細網内皮系に取り込まれにくく、血中での安定性も向上することから、結果的に標的部位への薬物移行量の増大、副作用の回避及び投与回数の減少といった効果を有し、PEGによる表面修飾が広く応用されている。この技術を実用化したリボソーム製剤としてDOXILが1995年より発売され、日本でも2007年に上市された。今後、PEG修飾がリボソームなどの微粒子製剤に適用される可能性は更に高まっていくと予想される。

本講演では、微粒子製剤、特にリボソーム製剤に焦点を絞り、ターゲティングへの適用方法及び薬物の封入など、リボソーム製剤の基本的な特徴及び製剤化する上での問題点を例示し、併せてヘモグロビン等のタンパクを包埋したリボソームの製剤化における課題も示す。また、現在国内で開発中であるPEG化微粒子製剤の実例を紹介する。更に、当社が生体内因性及び水溶性タンパク質であるアルブミンに着目し、PEGリボソーム製剤の安定性を更に向上する目的でアルブミンを表面に導入した新規PEGリボソーム製剤を岡山大学と共同で開発してきた例も紹介する。本研究では、内封薬物としてドキソルビシンを採用し、2種類の結合反応によりアルブミンをPEGリボソーム表面に導入した。その結果、アルブミン導入によりPEGリボソームの血中滞留性が更に増強されただけでなく、リボソーム及びドキソルビシンの血中での滞留性、肝臓及び脾臓への取り込み特性が導入方法の違いにより大きく影響を受け、更に抗腫瘍効果への影響も認められた。今回はアルブミンのリボソームへの導入の方法及び薬物の封入方法などの製造方法についても紹介する。本講演が包埋型人工赤血球の開発の一助となれば幸いである。

生物製剤の安全性確保とLEHの無菌化

－血漿分画製剤の製造工程におけるウイルス・プリオン不活化・除去対策を中心に－

柚木幹弘

株式会社ベネシス研究開発本部 大阪研究所 感染性病原体研究グループ

今回のシンポジウムのテーマである人工酸素運搬体（ヒトヘモグロビン小胞体；LEH）はヒト赤血球を原料として精製されたヘモグロビンを利用していることから、ウイルスやプリオンなどの病原体が混入する理論的リスクがある。この混入リスクに対する安全対策は血漿分画製剤で運用されている対策や経験、研究によって得られた知見などを参考に構築するのが現実的かつ効率的であると考えられる。血液製剤の安全対策は採血時、製造時、市販後安全監視とそのステージ毎に設定されているが、本日は製造時の安全対策のうち製造工程におけるウイルスやプリオンの不活化・除去の方法やその能力の評価手法などについてお話しする。

1. ウイルスやプリオンの不活化・除去の方法について

血漿分画製剤の製造工程におけるウイルスやプリオンの不活化・除去の方法についてはいくつかの選択肢がある。これらの方法は一長一短があり、完璧な方法というものは存在しない。バイオ医薬品の製造工程には、この方法の特性や製剤化しようとする蛋白の性状を良く理解したうえで適切な方法を選択し、工程内に配置する必要がある。ここではウイルスやプリオンの不活化・除去方法の概論についてお話しする。

2. ウイルスやプリオンの不活化・除去工程の評価について

工程に導入したウイルスやプリオンの不活化・除去方法について、その能力を評価する必要がある。能力を評価する上での原則は各種のガイダンスなどでルール化されており、この原則に基づき“クリアランス試験”がデザインされる。私達はこのクリアランス試験と平行して実際に問題となるウイルスとガイドラインで推奨されているモデルウイルス（例えば Parvovirus B19 と Canine / Porcine parvovirus）の物理化学的性状の比較研究も行っている。また、プリオンクリアランス試験についても 2000 年から“Investigational study”との位置付けで実施している。こちらについても試験に用いるプリオンソースの調製法について詳細な検討を併せて実施している。

ここでは試験のデザインと使用するウイルスを選択する上での留意点、ウイルスやプリオンの調製法が評価に与える影響などについて、私達の知見を紹介しながらお話しする。

3. 私達が注目しているウイルス不活化法とプリオン除去法について

最後に、現在私達が注目しているウイルス不活化法とプリオン除去法についてご紹介する。これらの方法は革新的な新規技術ではないが、思いのほか良い結果が得られている。ここではこの方法と私達の知見、将来の可能性についてお話しする。

なお、LEH のような製品では上記の基材となるヘモグロビンでの安全性の確保とともに小胞体作成の過程での病原体混入の防止と、さらにそのような危険性に対する無菌化の問題についても論及したい。

カプセル型人工酸素運搬体（LEH）の実用化に向けて －治験薬製造から量産化・商業生産に向けた課題－

金田伸一，後藤 博，上田 努，筒井洋治，木村哲寛，粕川博明

テルモ株式会社研究開発本部

ヘモグロビンを利用した人工酸素運搬体については，非カプセル型の開発が先行してきたが，昨年の FDA のワークショップでの報告のように，その安全性上の重大な問題点が指摘され，複数の製剤の開発が失敗に終わっている．一方，カプセル型人工酸素運搬体は，赤血球と同様にヘモグロビンのカプセルに内封させたことで，非カプセル型人工酸素運搬体の課題を解決し得ることが期待されているが，その実用化に際しては，製造工程の複雑さに起因する製造コストの高さ，歩留りの低さ，滅菌の困難さ，保存性といった課題に行く手を阻まれてきた経緯がある．我々は，これらの課題に対し，収率の良い製造工程，無菌操作法による製剤の調製，脱酸素状態を維持可能な充填方法等を取り入れた，パイロットスケールの製造工程を構築し，治験薬の製造が可能な段階に到っている．しかしながら，量産化，商業生産を考えた場合には，生物製剤であり，同時にリボソーム製剤である，カプセル型人工酸素運搬体の品質を保証しつつ，生産効率を大幅に向上させる技術開発が必須となる．本発表では，これらの点について，概説する．

一般演題 (1)

出血性ショックモデルラットにおけるヘモグロビン小胞体頻回投与時の体内動態解析

田口和明¹、渡邊博志^{1,2}、門脇大介^{1,2}、酒井宏水³、堀之内宏久⁴、土田英俊³、小林紘一⁴、丸山 徹^{1,2}、小田切優樹^{1,5}

¹熊本大学大学院医学薬学教育部、²熊本大学薬学部附属育薬フロンティアセンター、

³早稲田大学 理工学総合研究センター、⁴慶應義塾大学 医学部、⁵崇城大学薬学部

【緒言】人工酸素運搬体であるヘモグロビン小胞体 (HbV) の脂質膜表面は Polyethylene glycol (PEG) 修飾されている。近年、PEG 修飾リポソーム製剤投与により PEG 特異的 IgM が産生され、2 回目に投与した同一リポソームの血中滞留性が非常に悪くなる Accelerated Blood Clearance phenomenon (ABC 現象) が報告されている。HbV の臨床適用疾患は手術中や不慮の事故などの大量出血時であり、頻回投与を行う可能性は十分に考えられる。そのため、大量出血時における ABC 現象誘導に関する検討を行うことは、HbV を安全かつ有用に使用するための必要事項と考えられる。そこで本研究では、大量出血時に誘発する出血性ショックモデルラットを用い、HbV 頻回投与時における ABC 現象の誘導に関する検討を行った。

【方法】出血性ショックモデルラットは、全血液量の 40% を脱血し、作製した。体内動態の検討は、出血性ショックモデルラットを作製し、非標識 HbV 投与液 (1400mg/kg) で蘇生後、4 日及び 7 日目に ¹²⁵I-HbV (1400mg/kg) を用い検討した。抗 HbV IgM の検出は ELISA 法により評価した。食食能は、カーボンクリアランスを測定することで評価した。また、血中酸化ストレスは酸化アルブミン及びチオバルビツール酸反応陽性物質 (TBARS) により評価した。

【結果及び考察】出血性ショックモデルラットに、HbV (1400mg/kg) 投与したところ、抗 HbV IgM は投与後 4 日目に最も高値を示した。そこで、非標識 HbV 投与後、4 日及び 7 日目に体内動態検討を行ったところ、投与後 4 日・7 日目において、クリアランスの増大が確認され、肝臓への分布量の増大、排泄量の減少が確認された。また、投与後 4 日・7 日目において食食活性が有意に上昇していることが確認され、酸化ストレスマーカーである酸化アルブミン含量及び TBARS においても有意な上昇が確認された。以上より、出血性ショックモデルラットにおける HbV 頻回投与時の体内動態が明らかとなり、HbV の臨床使用に向けた有用な基礎データを提示することができた。

一般演題 (1)

マウス致死性出血性ショックにおける人工赤血球の投与後の再投与と輸血について

庄野 聡¹、木下 学²、高瀬凡平³、金田伸一⁴、斎藤大蔵⁵、関 修司²、石原雅之⁶、菊地 眞⁷

¹防衛医学講座、²免疫微生物学講座、³防衛医科大学校病院集中治療部、⁴テルモ株式会社研究開発センター、

⁵防衛医科大学校防衛医学研究センター外傷研究部門、⁶防衛医科大学校防衛医学研究センター医療工学研究部門、

⁷防衛医科大学校医用電子工学

【はじめに】大量出血患者の救命に際し、人工赤血球投与は極めて有効な対策手段であるが、致死性の低ヘモグロビンショックでの人工赤血球の投与は一時的な救命蘇生ができるもののマウスにおいては半減期が短いため再び低ヘモグロビンショックを起こすことを報告してきた。今回、人工赤血球の初回投与後の再投与と輸血による効果について検討した。

【方法】実験 1 マウスに頸静脈よりカニューレーションを行い、0.2ml の脱血と 5 % アルブミン投与を 7 回繰り返す。心停止直前の状態を作り、その後、テルモ社製の人工赤血球 TRM-645 を 0.5ml 投与した。実験 2 前実験を踏まえ、血液交換後、TRM-645 を 0.4ml 投与し、6 時間後に TRM-645、洗浄赤血球を投与した。実験 3 12 時間後に TRM-645 に再投与し、検討した。

【結果】実験 1 TRM-645 投与により最初の 6 時間までは全例蘇生したが、その後、生存率は低下した。実験 2 TRM-645 の 6 時間再投与群では 24 時間の生存率は単独投与に比べて高く、生存率の延長が認められた。また洗浄赤血球 6 時間再投与群では 72 時間までは全症例生存した。実験 3 人工赤血球 12 時間再投与群の生存率は 6 時間再投与群とほぼ同等で生存は延長することはなかった。

【結語】TRM-645 の再投与により致死性出血性ショックにおける生存の延長効果と TRM-645 投与後の輸血により長期予後が改善されることが認められた。輸血が供給できない環境での人工赤血球を投与後に、速やかに後送、輸血することで生存率を向上できることが示唆された。

一般演題 (1)

脳内出血モデルによる Hb 小胞体の脳神経組織への影響に関する検討

酒井宏水¹, 岡本紀子², 池田栄二³, 堀之内宏久³, 小林紘一³, 土田英俊¹

¹早稲田大学理工学研究所, ²Weill Medical College of Cornell University, ³慶應義塾大学医学部

脳では通常、血液脳関門が血液成分と脳組織間を遮蔽しているため、Hb 小胞体(HbV)が直接的に脳組織と接触することは無いと考えられるが、脳内出血や頭部外傷を伴う場合には、血液成分だけでなく HbV が脳組織に接触する。赤血球と HbV 由来の Hb および鉄の毒性が出現すると想定されるが、その過程は赤血球と同等と予想される。しかし HbV の脂質膜は赤血球膜とは異なるため、別の作用を示す可能性もある。米国で展開された分子内架橋 Hb(DCLHb)の臨床試験では、脳内出血患者への投与例で死亡率が上昇したとの報告もあり、脳組織に与える影響の検討は重要である。そこで本研究では HbV が直接的に脳神経細胞に接触することを想定し、脳内出血モデルとして HbV をラット脳実質に直接注入し、その後の行動学的および組織病理学的変化を 28 日間観察した。

Sevoflurane 麻酔下ラットを stereotaxic frame に固定し、試料溶液(HbV/rHSA, rRBC/rHSA) 20 μ l を、脳実質(caudate nucleus)に注入した。その後 28 日間、体重と運動機能の観察、摘出脳組織の H/E 染色、Berlin blue 染色、免疫抗体染色(ヒト Hb, GFAP, HO-1)、電顕観察を実施した。両群とも全例が犠牲死させるまで生存した。体重は初期に減少したがその後増加した。両群ともに後肢運動機能に若干の異常が認められた。病理検査の結果、両群ともに 1 日後に血腫近傍に好中球が見られたが、3 日後には消失した。HbV が血腫近傍の組織に浸潤している様子と、これを貪食するマクロファージが確認された。両群ともに血腫近傍に HO-1 とヘモジデリンが 3 日後から観察された。28 日後、HbV 粒子が僅かに観察されたが、血腫由来の RBC は消失していた。両群ともに 3 日後からアストロサイトが肥大化し、グリオシスがみられ、組織修復が進んでいることが解った。これらの結果から、HbV は脳内出血モデルにおいて、付加的な悪影響を与えるものでは無いことが示唆された。

一般演題 (1)

制御不能尾動脈出血モデルを用いたヘモグロビン小胞体輸液蘇生の検討

勢司泰久¹, 堀之内宏久¹, 酒井宏水², 土田英俊², 小林紘一¹

¹慶應義塾大学医学部呼吸器外科, ²早稲田大学理工学術院理工学研究所

【目的】継続的大量出血に対するヘモグロビン小胞体 (HbV) の蘇生効果を検討する為に、ラット尾動脈出血モデルを用いて大量輸液を実施した。

【方法】処置及び観察中は吸入麻酔で動物を維持した。挿管は頸動脈、大腿動脈、中足静脈、腹側尾動脈に行い、順に血圧測定、採血、輸液、放血経路とした。放血開始後、循環血液量の 30%を出血した時点から速度 56mL/kg/hr で持続輸液した。放血は継続させた。輸液剤は HbV の 5%アルブミン (Alb) 浮遊液、洗浄赤血球 (wRBC) のヒドロキシエチルスターチ (HES) 浮遊液、Alb, HES, 生理食塩液 (Sal) とした。

【結果】輸液開始後 2hr まで観察した。生存性では、HbV 及び wRBC 群は全例生存し、Sal 群は約 70%が死亡、Alb 及び HES 群は全例死亡した。心拍数、平均血圧及び呼吸数では HbV 及び wRBC 群が良好に推移したのに対し、Alb, HES 及び Sal 群は低値に推移した。出血量推移では HbV, wRBC, Alb 及び HES 群に比較し、Sal 群は低値であった。ヘマトクリットは wRBC 群が最も高く、HbV, Alb 及び HES 群は著しい低値を示した。また、Sal 群は中間で推移した。血中乳酸値では HbV 及び wRBC 群が低値に推移したが、Alb 及び HES 群は高値に、Sal 群は中間となった。pH では各群とも低下傾向を示したが、HbV 及び wRBC 群は比較的緩やかであった。

【考察】HbV は 90%以上の循環血液と置換した状態でも、生存時間延長、血行動態維持、酸素供給などで、洗浄赤血球に劣らない効果を示すことから、臨床適用において赤血球代替物として十分に機能すると考えられる。

一般演題 (2)

微小モデル血管内を流動する人工赤血球 (ヘモグロビン小胞体) 分散流体の配位子反応

奥田直人¹, 酒井宏水², 武岡真司¹, 土田英俊²

¹ 早稲田大学大学院先進理工学研究科, ² 早稲田大学理工学研究科

ヘモグロビン(Hb)を用いた非細胞型の人工酸素運搬体(Cell-free HBOCs)は, 投与の直後に, 血管収縮を引き起こすことが問題とされている. この要因として, ①血管内皮細胞由来の血管弛緩因子である一酸化窒素(NO)の捕捉のほか, ②肝微小循環において血管拡張因子として作用する一酸化炭素(CO)の捕捉や, ③酸素放出速度が増加すると酸素過多により細動脈が収縮し, 末梢組織へ十分な酸素を供給が出来なくなること, などが考えられている. しかし, 細胞型の Hb 小胞体(HbV: 粒径 250 nm)では, 血圧亢進を引き起こさない. 本研究では, ガス分子との反応性について非細胞型と細胞型で比較することを目的とした.

ガス透過性のある微小モデル血管(内径 25 μm , 長さ 12 cm)を用いた. Hb 濃度 10 g/dl に調製した 4 種類の試料[HbV 分散液, Hb 溶液, 重合 Hb 溶液(Poly_BHb), 赤血球] 100 μl を, 中心流速 1 mm/s で流動させ, 流動距離 1, 3, 5, 7, 9 cm における顕微スペクトルを測定し, 各試料の配位子反応(O_2 , CO, NO)を比較検討した. また, モデル血管内を流動する HbV および Hb 粒子の拡散の様子をシミュレーション解析し, 配位子反応が異なるメカニズムの解明を試みた.

HbV では, 酸素放出, CO 吸着および NO 吸着どの場合においても, Hb, Poly_BHb に対し見かけの反応速度に遅延が認められた. また, 赤血球とは同等の反応速度を有していた. 粒子拡散シミュレーションでは, 壁近傍(1 μm)から流入した Hb 粒子は流入口から 1 mm で管中央に達したが, HbV は流入口から 2.5 cm で管中央に達することが解った. このことから, HbV と Poly_BHb, Hb 間での見かけの配位子反応速度の差は, 側方拡散(攪拌効果)の違いによるものである事が示唆された.

一般演題 (2)

実験腫瘍における腫瘍酸素分圧のマッピングと人工酸素運搬体投与による腫瘍の酸素加

堀之内宏久¹, 泉 陽太郎¹, 酒井宏水², 小松晃之², 土田英俊², 小林紘一¹

¹ 慶應義塾大学医学部呼吸器外科, ² 早稲田大学理工学術院

人工酸素運搬体の使用法の中には赤血球代替の他に酸素治療薬としての利用法が考えられており, その中には悪性腫瘍を酸素加し, 治療効果を増強させる治療法も含まれている. 腫瘍内の組織酸素分圧の分布およびその変化についてはいまだ十分な知見が得られていない.

【目的】実験腫瘍の腫瘍内酸素分圧のマッピングを行い 2 次元的な腫瘍内での酸素分圧の分布を明らかにし, 人工酸素運搬体であるヘモグロビン小胞体, アルブミンヘムを投与することによって腫瘍組織内酸素分圧が経時的にどのように変化するかについて検討した.

【方法】ラットあるいはマウスの Dorsal Skin Window Chamber を用い, DSWC 内に腫瘍を移植, 48(72)時間後に腫瘍が直径 4-6mm 程度となったところで全身麻酔後, 顕微鏡下に腫瘍を同定し, YAG レーザーを 23 ミクロンの光束とし, 腫瘍に照射, Pb-CTTP の燐光の減衰曲線より腫瘍内の酸素分圧を測定, 腫瘍外縁より中心部まで測定を行った. 次に人工酸素運搬体を経静脈的に投与し, 腫瘍内の酸素分圧マッピングを行と同時に経時的な酸素分圧の変化を測定した.

【結果】腫瘍組織酸素分圧は, 周囲正常組織と比較し腫瘍辺縁部で $84.8 \pm 19.6\%$ に低下, 腫瘍中心部で $92.9 \pm 41.4\%$ と, 正常部分と有意差は認められなかった. また, 人工酸素運搬体を投与後の酸素マッピングではこの傾向は緩和され, 正常部分も含めて酸素分圧の上昇が認められた. 人工酸素運搬体投与後の腫瘍酸素分圧は, 投与後一時的に減少した後上昇し, アルブミンヘムでは 15 分間, ヘモグロビン小胞体では 22 分間高値を保ち, 緩やかに低下した.

【考察】腫瘍内の組織酸素分圧は均一でなく, 腫瘍の増殖部位で酸素消費が高い可能性が考えられた. 人工酸素運搬体の投与後上昇した腫瘍組織酸素分圧の低下は, 腫瘍および正常組織での代謝亢進が原因である可能性も考えられた.

一般演題 (2)

ヘモグロビン小胞体 (HbV) が免疫系に及ぼす影響

高橋大輔¹, 東 寛¹, 脇田大功², 藤原満博¹, 宗 慶太郎⁴, 酒井宏水⁴, 堀之内宏久⁵, 西村孝司^{2,3}, 小林紘一⁵, 土田英俊⁴, 池田久實¹

¹北海道赤十字血液センター, ²北海道大学遺伝子病制御研究所 ROYCE' 健康バイオ研究部門,

³北海道大学遺伝子病制御研究所免疫制御分野, ⁴早稲田大学理工学術院理工学研究所,

⁵慶應義塾大学医学部呼吸器外科

【目的】ヘモグロビン小胞体(HbV)は、高純度濃厚ヒトヘモグロビン溶液を脂質二分子膜で被覆し、表面をポリエチレングリコールで修飾した人工酸素運搬体である。我々はこれまで、HbV 輸注後のラット脾細胞中に、脾 T 細胞増殖を一過性に抑制させる細胞が存在すること、およびその特性について報告している。今回はセルソーティングシステムを用い、増殖抑制細胞の同定を試みた。

【方法】WKAH ラットに 20%相当の蛍光標識リボソーム、および生理食塩水をエーテル麻酔下にて尾静脈より輸注し、16 時間後に脾臓を摘出した。摘出した脾臓から脾細胞浮遊液を調製し、セルソーターにより蛍光標識リボソーム貪食細胞、非貪食細胞を単離した。それぞれの細胞画分の増殖能への影響について評価を行うために、生食輸注ラット脾細胞に蛍光標識リボソーム貪食細胞画分、非貪食画分をそれぞれ 1:1~1:1/32 の割合となるように混合し、低濃度 ConA 刺激 (0.3 μ g/mL) による脾細胞の増殖能を測定した。さらに、フローサイトメーターを用いて細胞表面マーカー解析を行った。

【結果・考察】蛍光標識リボソーム輸注ラット脾細胞中の 7.31 $\pm$ 0.89%にリボソーム貪食細胞群を認めた。この細胞群は細胞混合比 1:1/8 まで増殖抑制を示し、明らかな増殖抑制能を有していた。また、蛍光標識リボソーム輸注群の脾細胞からリボソーム貪食細胞を除去することで増殖抑制が解除されたことから、リボソーム貪食細胞が増殖抑制の主因と考えられた。さらにこの細胞は、細胞表面マーカー解析において Myeloid Lineage の細胞集団と推測された。近年、担癌患者などにおいて、T-cell 増殖抑制能を有する MDSCs(Myeloid Derived Suppressor Cells)が誘導されることが報告されている。リボソーム輸注ラット脾細胞中のリボソーム貪食細胞も、これまで報告されている MDSCs と同様の特徴を有しており、MDSCs 様の細胞である可能性が示唆された。

一般演題 (2)

細胞型人工酸素運搬体混入血液での電解質 (Na, K, Cl) 濃度測定に関する検討

三宅誠司¹, 武村次郎¹, 高折益彦²

¹大阪府済生会野江病院検査科, ²東宝塚さとう病院

【目的】わが国で開発を進めている細胞型人工酸素運搬体(HbV)はヘモグロビン(Hb)を基剤としている、しかしこのような人工酸素運搬体が混入した血液で臨床化学検査を行う際に各種測定値が影響を受けることが報告されている。ドライケミストリー法式では電極法にて血清電解質を測定しているが、上記の HbV は脂肪膜で覆われていて、かつその粒子は 200~300nm と微小で溶媒内に浮遊しているため上記の測定に干渉することも疑われ、今回その検討を試みた。

【方法】HbV 液に 6 名のインフォームド・コンセントを得た健康成人研究協力者からの血清を添加し、1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 混合液を作製し、これと HbV 原液をドライケミストリー法(DC 法: オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス社ビトロス 250)と、対照としてウェット法(W 法: 東芝メディカルシステム TBA200FRNEO)にて血清電解質, Na, K, Cl 値について各複数測定を行った。

【結果】DC 法では HbV 原液について Na 値は 155.0 $\pm$ 2.2mEq/L(以下、すべて mEq/L, 標準偏差の表記を省略), K 値は測定不能(HbV 溶液は K 非含有), Cl 値は 154.0 を記録し HbV の 1/2 混合血清についても Na 値で 148.0 と原血清(143.0)と生理食塩液(154.0)との混合予測値 148.1 とほとんど差を認めなかった。Cl 値についても 126.7 と原血清(107.0)と生理食塩液(154.0)との混合予測値 126.5 とほぼ一致していた。そして 1/4~1/32 混合まで実測値は予測値に一致していた。一方、W 法では HbV 原液 Na 値は 110.2, 1/2 混合血清が 125.7 で、予測値から逸脱していた。しかし 1/16 混合において予測値との差が -1.8 に縮小した。同様 Cl 値においても HbV 原液の測定値において 105.3, 1/2 混合において 104.5 とそれぞれの予測値 154.0 124.6 との間に差を認めた。そして 1/16 混合において予測値との差が -1.1 となった。K 値においても DC 法では予測値との差が 1/4 混合以下はすべて 0.07 であったが、W 法では 1/16 混合において初めて 0.10 以下となった。

【考察・結論】DC 法においては脂肪粒子の干渉がなく、臨床において発生すると予測される HbV の最大混入の場合においても上記の電解質濃度の測定が可能であった。一方、W 法においては 1/16 HbV の混合以下では臨床的に認容される測定が可能であったが、この混合量は一般男子症例においては 150ml に相当する。そのため実質的な臨床 HbV 使用時には測定不能と言える。

一般演題 (3)

四塩化炭素誘発肝障害モデルラットにおけるヘモグロビン小胞体の体内動態の検討

宮里麻友美¹, 田口和明¹, 渡邊博志^{1,2}, 酒井宏水³, 堀之内宏久⁴, 土田英俊³, 小林紘一⁴, 丸山 徹^{1,2}, 小田切優樹^{1,5}

¹熊本大学大学院薬学教育部, ²熊本大学薬学部附属育薬フロンティアセンター,

³早稲田大学理工学総合研究センター, ⁴慶應義塾大学 医学部, ⁵崇城大学薬学部

【緒言】人工酸素運搬体であるヘモグロビン小胞体(HbV)は大量出血時の他, 外科的手術中の血液補充としての利用が期待されている。肝硬変患者では, 門脈圧亢進により静脈瘤の破裂を起こしショックをきたすことがあるため, 肝障害を持つ患者に対し HbV を使用する可能性が十分想定される。肝臓は HbV の主要代謝臓器であり, さらに排泄においても重要な役割を担う。HbV が生体内に長期蓄積すると予期せぬ副作用の原因になりうるため, 肝機能低下時における HbV の体内動態の把握はヒトへ HbV を安全かつ有効に使用するために必要不可欠であると考えられる。このような背景の下, 本研究は, 四塩化炭素誘発肝障害モデルラットを作製し, HbV の脂質成分をトリチウム(³H)標識した ³H-HbV を用い, HbV の体内動態に関する基礎的検討を行った。

【方法】実験動物は SD 系雄性ラット (3 週齢, 約 50g) を用いた。四塩化炭素誘発肝障害モデルラットの作製は, ミネラルオイルに溶解した四塩化炭素 (CCl₄: mineral oil=1:4) を 400mg/kg body weight の投与量で規定曜日に週 3 回, 8 週間腹腔内投与した。体内動態の検討は, 作製した四塩化炭素誘発肝障害モデルラットに Cholesterol, [1,2-³H(N)]-で HbV の脂質膜を標識した ³H-HbV (1400mg/kg) を左大腿静脈より投与後, 経時的に開腹, 下大静脈より採血し, 臓器を摘出した。糞・尿は代謝ゲージを用い, 規定日に回収した。血液及び各臓器の放射活性は液体シンチレーションカウンターにより測定した。また, 各速度論パラメータは MULTI を用い算出した。

【結果及び考察】四塩化炭素誘発肝障害モデルラットに ³H-HbV を投与したところ, 健常時に比べわずかな血中滞留性の上昇が認められた。各臓器への分布量 (% of dose/gram tissue) は健常群, 四塩化炭素誘発肝障害モデル群間にほとんど変化は確認されなかった。また, 四塩化炭素誘発肝障害モデル群において排泄の遅延が確認された。以上, 本研究では HbV の肝機能障害時の体内動態を明らかにし, 肝機能低下時において HbV を有効かつ安全に使用するための有用な基礎データになりうると思われる。

一般演題 (3)

ヘモグロビン小胞体への薬剤の吸着の検討

藤原満博¹, 東 寛¹, 若本志乃舞¹, 泉 陽太郎², 酒井宏水³, 堀之内宏久², 土田英俊³, 小林紘一², 武田純三⁴, 池田久實¹

¹北海道赤十字血液センター, ²慶應義塾大学医学部呼吸器外科, ³早稲田大学理工学術院理工学研究所,

⁴慶應義塾大学医学部麻酔科

【目的】ヘモグロビン小胞体(Hemoglobin vesicles; HbV) は, Hb をリボソームに包埋させたセル型の人工酸素運搬体である。ICU でヘモグロビン小胞体を使用される場合, 循環血液の 20% 程度の輸注が想定されている。外傷や緊急手術の際には, HbV 輸注とともに治療剤を投与する可能性があり, また患者の中には, 持病に対してすでに服薬している場合もあると考えられる。ICU で使用される薬剤や患者が服薬している薬剤と HbV とが相互作用し, 吸着等によって血中濃度が有効濃度以下に低下してしまう可能性について検討した。また HbV を含む血漿中の薬剤濃度のモニターにおいて, HbV を除去するためのデキストラン添加・遠心法が有効であるかについての検討も試みた。

【方法】薬剤として, プロプラノロール, プロカインアミド, フェノバルビタール, ジアゼパム, トブラマイシン, ゲンタマイシン, テオフィリン, ハロペリドールを用いた。同意を得た健常人から採血した血漿中にて各薬剤を 10%-40% HbV と混合し, 混合直後および 37℃ にて 3 時間インキュベーション後の薬剤濃度を測定した。検体から HbV を除去するためには宗らのデキストラン凝集・遠心法を用いた。測定した薬剤濃度は HbV-crit を考慮に入れ補正した。

【結果・考察】HbV の濃度に依存していずれの薬剤においても濃度の減少がみられた。HbV 20% までは, 3 時間インキュベーションにおいても, その減少の程度は約 10~20% であった。HbV 40% では, 3 時間インキュベーションしたプロプラノロールおよびハロペリドールで最大約 30% の減少がみられた。以上のことから, 少なからず薬剤と Hb を内包するリボソームとの間に吸着等の相互作用があることが示唆され, 薬剤濃度の減少を考慮した投与をする必要があると考えられる。また, ハロペリドールはデキストラン添加によって既知濃度の 1/3 になり, 薬剤濃度の測定系によってはデキストランの干渉作用を受けることから, 薬剤濃度のモニターの上で注意を要すると思われる。

強力な臓器保護剤としての新規 S-ニトロソヒト血清アルブミンの開発

異島 優¹, 赤池孝章¹, 廣山秀一¹, 澤 智裕¹, 末永綾香¹, 丸山 徹^{1,2}, 甲斐俊哉^{1,3}, 小田切優樹^{1,4}

¹熊本大学大学院医学薬学研究部, ²熊本大学薬学部附属育薬フロンティアセンター,

³ニプロ株式会社 医薬品研究所, ⁴崇城大学薬学部

【目的】血中に最も多量に存在するヒト血清アルブミン(HSA)は、S-ニトロソ化(SNO)反応を介して一酸化窒素(NO)を運搬し、血管拡張作用や抗菌活性など新たな生物活性を有することが知られている。また HSA は、脂肪酸などの内因性リガンド輸送能を有し、その際に HSA の構造や機能変化を及ぼすことが明らかにされている。我々は SNO-HSA の作製を行う過程で、内因性リガンド結合の有無により SNO-HSA からの NO 放出が変動することを見い出すとともに、内因性のリガンドが SNO-HSA 量を制御するメカニズムを提示した。そこで今回、内因性リガンドの中でも最も豊富に存在し、かつ HSA に 5 つ以上の結合サイトを有する脂肪酸に着目して、脂肪酸を結合させた SNO-HSA を作製し、脂肪酸結合が及ぼす NO 放出能や生物活性への影響に関して検討を行った。

【方法】34 位の遊離型 SH 基を還元させた HSA を亜硝酸イソアミルと反応させることで、SNO 化を行った。肝虚血再灌流障害モデルは、Wistar 系ラットを用い、門脈と肝動脈を血流遮断鉗子で閉塞して血流を遮断し、45 分後に血流を再開することにより作製した。SNO-HSA は、血流再開直後に下大静脈より投与(0.1 μmol/rat)し、臓器障害性は血清 AST、ALT 値にて評価した。

【結果及び考察】*In vivo*において、肝虚血再灌流障害に対する保護効果の増強も脂肪酸結合量依存的に引き起こされた。さらに *In vitro*において、脂肪酸結合 SNO-HSA の SNO 転移反応を解析したところ、脱 SNO 化反応の上昇が脂肪酸結合量依存的に観察された。このことは、SNO 化部位である 34 位の遊離 Cys の SH 基の反応性の上昇、さらに細胞への結合性の増大に起因するものと考えられる。また、これらの脂肪酸結合に伴う SNO-HSA の作用機構には、カベオラ構造を介していることが初めて示唆された。このように、新規脂肪酸結合同型 SNO-HSA は SNO-HSA からの NO 放出を制御し、細胞に対して特異的に NO を輸送することから、虚血性疾患や臓器移植時などにおける臓器保護剤としての新規人工 NO 運搬体への応用が期待される。

一般演題 (4)

Oxy Map Systemによるtissue dysoxiaの画像解析

青木克憲, 吉野篤人

浜松医科大学救急医学

【目的】組織の酸素分圧分布を Oxy Map System により解析し, endotoxemia における tissue dysoxia のメカニズムを追求する.

【方法】雄性ウサギ(日本白色種, 3 kg)を実験動物とし回腸漿膜の酸素分圧を測定した. 1. 組織酸素分圧の測定には, ①酸素電極(ガス透過性のテフロンチューブ内に関電極と不関電極とを封入したクラークタイプ)による測定(Digital PO₂ Monitor (ユニークメディカル社製, POG203), ②Oxy Map System (Shoshin LTD) (Palladium-Porphine (Oxyphor R2, Oxygen Enterprises, LTD)の燐光の強さによる酸素分圧の測定)を使用した. 2. LPS (Escherichia coli-055:B5, DIFCO Lab.1mg/ml)投与後の変動を検討した.

【結果】1. 2つの方法による組織酸素分圧値は, ほぼ一致した. 2. LPS投与後, 血圧低下を反映して全身の酸素代謝は著明に悪化した. 3. 回腸漿膜酸素分圧の低下, 組織酸素分圧較差の持続的な負の較差が見られ, 動静脈シャント効果の出現を認めた. 4. 画像解析の精度は未だ不安定であるが, 回腸漿膜面における酸素分圧分布の不均一性がLPS投与後, 増強することが観察された.

【結語】endotoxemiaにおけるtissue dysoxiaは, 組織酸素分圧の不均一性が関与し, これが動静脈シャント様効果(stagnant hypoxia)をもたらす一因と考えられる.

一般演題 (4)

膜流動性の異なるドデカペプチド結合(アデノシン 5'-ニリン酸)内包リン脂質小胞体の調製とADP放出特性

勝野峻介, 岡村陽介, 半田 誠, 池田康夫, 武岡真司

早稲田大学大学院先進理工学研究科生命医科学専攻

【緒言】フィブリノーゲン g 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を結合させたリン脂質小胞体は, 活性化血小板間を架橋して血小板凝集を促進させ, アデノシン 5'-ニリン酸(ADP)を内包することで(H12-(ADP)小胞体), その止血能が向上できることを in vivo にて証明してきた. 本報では, 放射性同位元素(RI: [8-14C] ADP, [1,2-3H]cholesterol)標識した膜組成の異なる3種類のH12-(ADP)リボソームを調製し, 血小板凝集時におけるADP放出率を測定した.

【実験】各混合脂質(Table 1)を[8-14C]ADPを含むADP水溶液(1 mM, PBS)にて水和後, 高圧押出法にて粒径制御し((a):4 oC, (b), (c):r.t.), 超遠心分離精製した, [1,2-3H] cholesterolを添加・振とう後, ゲル濾過精製し, RI標識体を得た. PRP([PLT]= 2.0×10^5 /mL)にH12-(ADP)小胞体(a)-(c) ([lipid]f.c.=0.1 mg/mL)を添加し攪拌後, ADPにて血小板凝集を惹起させ, 透過率を測定した. さらに, 液体シンチレーションカウンターにてADP放出率を算出した.

【結果・考察】ADP未内包小胞体添加時の血小板凝集透過率は約35%に留まり, (c)を添加しても約40%と同程度であった. ところが(a)や(b)を添加すると, その透過率は共に約50%と増大し, 血小板の二次凝集を促進させる効果が発現した. これは, 内包ADPの放出に伴う凝集促進効果と考えられる. そこで, RI標識体を用いて同条件にて試験したところ, (c)は血小板凝集塊に 8.3 ± 1.1 %取り込まれたが, 内包ADPは全く放出されなかった. 他方, (a)や(b)の血小板凝集塊への取込率は(c)と同程度であったが, ADP放出率は(a) 58.8 ± 6.1 %, (b) 49.9 ± 5.0 %であった. 従って, H12-(ADP)小胞体は血小板凝集塊間に巻込まれる際に内包ADPが放出されると考えられているが, その放出にはリン脂質小胞体の膜流動性が関与すると思われる.

放射性同位元素標識ドデカペプチド結合 (アデノシン 5'-ニリン酸) 内包リン脂質小胞体の調製とその血中動態・臓器分布

武岡真司, 岡村陽介, 江藤薫子, 半田 誠, 池田康夫

早稲田大学大学院先進理工学研究科生命医科学専攻

【緒言】フィブリノーゲン g 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を結合させたリン脂質小胞体は, 活性化血小板間を架橋して血小板凝集を促進させ, アデノシン 5'-ニリン酸(ADP)を内包することで(H12-(ADP)小胞体), その止血能が向上できることを in vivo にて示してきた. 本報では, 放射性同位元素(RI: [8-14C] ADP, [1,2-3H]cholesterol)を用いて小胞体内水相の ADP と膜構成成分の cholesterol の一部を二重標識した H12-(ADP)小胞体を調製し, H12-(ADP)小胞体の体内動態を明らかにした.

【実験】Wistar 系雄性ラットに RI 標識 H12-(ADP)小胞体あるいは(ADP)小胞体を尾静脈投与した([lipid] = 10, 20, 40 mg/kg). 投与開始 5, 10, 15, 30 min, 1, 3, 6, 9, 24 hr 後に採血した(50 mL). 次いで, ラットを犠牲死させ, 脳, 心臓, 肺, 胃, 消化管, 腎臓, 膀胱を摘出し, ホモジナイズした. また, 尿, 糞は投与開始 3, 6, 9, 24 時間後に経時的に採取した. これらをそれぞれ均一な状態にし 50-100 mg 秤量し Solvable(2 mL, PerkinElmer 社製)を加えて可溶化し, 過酸化水素(400 mL)にて脱色した(r.t., 1 hr). その後, Hionic Fluor(15 mL)を添加し液体シンチレーションカウンター(LSC)にて測定した. 他方, ADP 水溶液(1 mM, PBS)と[8-14C]ADP 水溶液(3.7 MBq/mL)の混合液を尾静脈投与し(4 mL/kg), 同様の測定を行った.

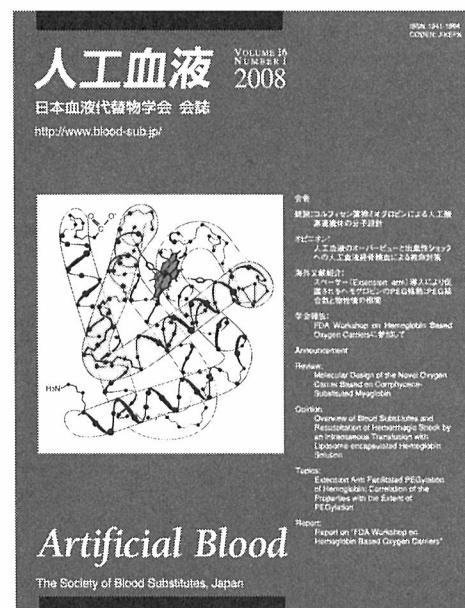
【結果・考察】 Wistar 系雄性ラットに RI 標識 H12-(ADP)小胞体を投与後, 経時的に採血し LSC 測定(3H, 14C の同時測定)したところ, 投与量によらず 3H, 14C 共に投与 6 時間後まではほぼ同等の 2 相性の血中動態挙動を示し, その後徐々に両者の乖離が認められた. また, (ADP)小胞体群でもほぼ同等の結果が得られ, H12 結合の有無に関わらず同等の血中動態を示した. 他方, ADP 水溶液投与では投与直後から速やかに血中から消失されたことから, ADP は小胞体に内包された状態で血中を安定に滞留していると判断された. 次いで, RI 標識 H12-(ADP)小胞体を 40 mg/kg にて投与し 24 時間後の各臓器の集積率を比較したところ, 3H, 14C 共とも顕著に脾臓に集積し, 次いで肝臓に集積した. また, (ADP)小胞体投与群もほぼ同様の結果が得られ, H12 結合による臓器分布の差異はないことを明らかにした. 他方, ADP 水溶液(1 mM)投与群では, 14C は速やかに尿中に排泄されることも確認できた. 最終的に, 3H は糞として排泄され, 14C は尿中に排泄された.

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

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

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

ワープロを用いて作製した原稿の投稿を原則とする。ただし、手書き原稿による投稿でも受け付ける。欧文による投稿を歓迎する。

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

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

ii) ハードコピー4部を郵送する。

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

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

4) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著

者名、全著者所属、英文著者名、英文著者所属、続いて連絡の取れる著者（corresponding author）の住所、英文住所を記入する。手書き原稿の場合はB5版、1行20字、20行とする。

5) 「原著論文」、「総説」、「トピックス」、「オピニオン」については、第2頁以降に和文抄録、Keywords（英文で6個程度）を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること。

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

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

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

（例）Rhodamine B (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), ポリグラフィシステム (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, 4⁶⁾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, 編集委員長に通知をすること.

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 (3) 2009年9月16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

再生紙を使用