人工工作 YOLUME 18 NUMBER 2 2010

VOLUME 18 NUMBER 2

日本血液代替物学会 会誌

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



土田英俊先生(1930-2010)

第17回年次大会プログラム

In Memoriam:

Dr. Eishun Tsuchida (1930—2010)

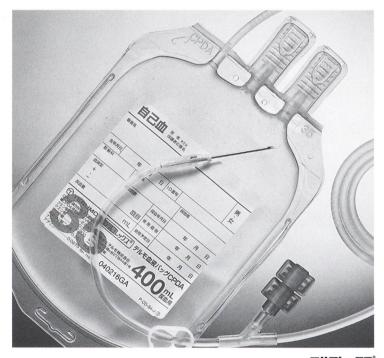
The 17th Annual Meeting Program

# Artificial Blood

The Society of Blood Substitutes, Japan

# 自己血輸血をサポート

# テルモ自己血輸血関連製品



テルフレックス゜

## テルモ血液バッグCPDA

(自己血貯血用血液バッグ)

※効能・効果、用法・用量、警告、禁忌を含む使用上の注意 については製品添付文書をご覧下さい。

**↑**₹ワイック®AC-185

ダイレクトなキー選択で、 さらに使いやすく

医療機器承認番号 21500BZZ00132





①、テルモ、TERUMO、テルフレックス、ヘモクイックはは テルモ株式会社の登録商標です。す。

◎テルモ株式会社 2008年1月月

## 目 次

Contents

# 人工血液

## 第18巻 第2号 2010年9月

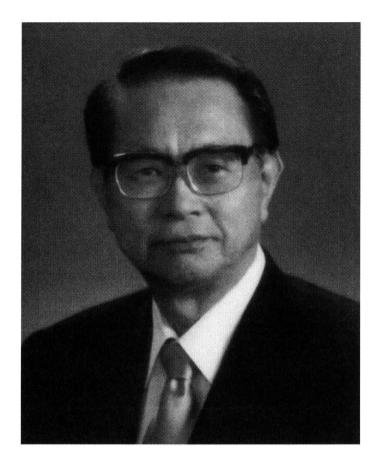
追悼 土田英俊先生(1930—2010)	43
第17回年次大会プログラム	
大会長挨拶	47
お知らせとお願い	48
大会日程表	50
交通案内図	51
プログラム	52
抄録	54

# **ARTIFICIAL BLOOD**

Vol. 18 No. 2 September, 2010

In Memoriam: Dr. Eishun Tsuchida (1930—2010) ·····	43
The 17th Annual Meeting Program	
Address from the President	47
Information ·····	48
Schedule ·····	<i>50</i>
Venue and Access ·····	51
Program ·····	52
	_

## 故土田英俊先生を偲んで



#### 土田英俊先生略歴

1930年 5 月 2 日生

#### 【学 歴】

1955 東京理科大学 理学部 化学科 卒業

1960 早稲田大学大学院 理工学研究科 修了

1963 学位:工学博士(早稲田大学)

#### 【職 歴】

#### 【早稲田大学関係】

1963 早稲田大学 理工学部 助手

1966 早稲田大学 理工学部 講師

1968 早稲田大学 理工学部 助教授

1973 早稲田大学 理工学部 教授

1968 早稲田大学 理工学研究所 兼任研究員 (1993.4より理工学総合研究センターに名称変更)

2001 早稲田大学 名誉教授/理工学総合研究センター 顧問研究員(2007.4より理工学術院総合研究所に名称変更)

## 【非常勤講師・客員教授など】

(国内)

北海道大学(理),東北大学(工),山形大学(工),筑波大学,茨城大学(理),東京工業大学(資源研·工),東京大学(工),東京都立大学(理·工),東京理科大学(理),お茶の水女子大学(理),千葉大学(工),群馬大学(工·医),信州大学(繊維·工),静岡大学(工),名古屋大学(工),岐阜大学(工),京都大学(工),大阪大学(理·工),大阪市立大学(理),広島大学(理·生),九州大学(工),九州工業大学(工),長崎大学(工),宮崎大学(工),(財)生産開発科学研究所(学術顧問·理事·高分子研究室室長),理化学研究所,工業技術院 繊維高分子材料研究所(物質工研),日本原子力研究所,慶應義塾大学(医)

#### (海 外)

California Inst. Tech., Stanford U., McGill U., British Columbia U., Royal Inst. Tech. Stockholm., Oxford U., Imperial College (London U.), Groningen U., Leiden U., Free U. Berlin, Max-Planck-Inst. Berlin/Mainz, Pisa U., Siena U., Chinese Acad. Scienses (栄誉教授), Peking U., South China U. Tech., Nankai U., Azerbaijan Acad. Sciences

#### 【日本化学会関係】

1978-80 庶務理事

1981-82 年会, プログラム委員長

1987-90 広報専門委員会 委員長

1990-91 関東支部長

1990-91 科学展90 組織委員長

1991-93 副会長

#### 【高分子学会関係】

1970-79 関東支部 理事

1978-86 常任理事

1984-86 「高分子」編集委員長

1984-86 関東支部 副支部長

1986-90 「Polymer Journal」編集長

1986-90 副会長

#### 【その他学会関係】

1986-90 有機合成化学協会 関東支部幹事

1986-98 日本バイオマテリアル学会 評議員

1987 - 英国王立化学学士院 特別会員

1987- 日本繊維学会 評議員

1991-98 日本工学アカデミー 理事・広報委員会 委員長

1993-99 日本血液代替物学会 会長

1996-98 日本医工学治療学会 評議委員

#### 【海外専門誌編集, 国際会議】

Editor Polymers for Advanced Technologies

Artificial Cells, Blood Substitutes and

Immobilization Biotechnology

Editorial Board Journal of Macromolecular Science-

Chemistry

Bioconjugate Chemistry

IUPAC 高分子錯体国際会議(Honorary Chairman)

#### 【政府関連機関 審議会委員 等】

宇宙開発事業団 スペースシャトル利用委員会,文部省 学術審議会,日本学術振興会 特別研究員等審査会,通商産業省 産業技術審議会,工業技術院 次世代産業基盤技術研究開発評価委員会,日本学術会議 材料工学研究連絡委員会・化学研究連絡委員会,中央教育審議会

#### 【研究領域代表】

1987-90 文部省科学研究費・重点領域研究「高分子錯体」 研究代表

1996-01 科学技術振興事業団戦略的基礎研究推進事業 研究領域

「極微細領域の現象(単一分子・原子レベルの反応制御):オキシジェニクス | 研究代表者

1997-03 厚生科学研究(高度先端医療研究事業:人工血液) 主任研究者

#### 【受賞】

1963. Mar. 小野梓記念学術賞(オリゴマーの研究) 早稲田大学

1986. Apr. 日本化学会学術賞(人工酸素運搬体) 日本化学会

1987. Oct. 大隈記念学術褒賞 (人工赤血球の展開) 早稲田大学

1989. Feb. 油脂優秀技術賞 (リピドポルフィン小胞体) 油脂工業学会

1991. May 高分子科学功績賞(高分子錯体の分子科学) 高分子学会

1995. Jun. Avogadro-Minakata賞(高分子錯体科学の確立) 伊・日化学会

1998. Nov. 紫綬褒章 (高分子科学と機能錯体化学)

2004. Nov. 瑞宝中綬章

(以 上)

## 故土田英俊先生 御逝去を追悼して

慶應義塾大学名誉教授 日本血液代替物学会 会長 小林紘一

土田 英俊 先生(早稲田大学名誉教授)におかれましては、去る平成22年4月25日午後6時40分にご逝去されました。享年79歳でした。ご葬儀は、ご遺族のご意向で、近親者の方々にて執り行われました。また、6月27日には、早稲田大学高分子研究室(西出宏之教授)主催の「土田英俊先生を偲ぶ会」がリーガロイヤルホテル、東京にて開催され、230名以上の方々が参加され、土田先生のご逝去の悲しみを分かち合い、また土田先生がお元気だった頃の思い出話やあの素晴らしい先生の笑顔を思い出しつつ先生の在りし日のお姿を偲びました。

土田先生は1963年に早稲田大学大学院 理工学研究科を修了(工学博士)後,助手, 講師, 助教授を経て1973年に教授に就任 され、2001年3月に定年によりご退職さ れるまで, 早稲田大学理工学部および同 大学院において,応用化学(高分子化学) の教育・研究に努められ、数多くの人材 を育成されました. 先生は一貫して「機 能物質系としての高分子錯体」を研究対 象に、その分子科学と機能の開発に取り 組み、世界に先駆けて新分野「高分子錯 体」を確立されました. 日本化学会, 高 分子学会などで要職を永く務められ、ま た代表発起人として日本血液代替物学会 を設立され、晩年を「人工血液」の研究 に捧げられました. 多くの学術誌の編集 委員長, 国際会議の組織委員長を務めら れ,内外の化学界に寄与されるとともに, 中央教育審議会委員など政府関係の会議 委員も数多く歴任されました. これらの ご功績により、諸学会からの多数の受賞 と共に、平成10年に紫綬褒章、平成16年 には瑞宝中綬章を受章されました.

特に土田先生のライフワークのひとつ としての人工血液に関しては、永年にわ たり『高分子錯体の電子過程制御』と 『分子集合科学』を基に, 高分子が構成 する疎水性雰囲気を巧みに調節すると錯 体部の電子移動が抑制できることを1983 年に発表し、世界で初めて生理条件下に おける可逆的な酸素錯体 (リピドヘム) の生成に成功されました. この錯体を高 濃度に含む水溶液は, 空気から酸素のみ を選択的に濃縮できるので、この発見は 血液と同じように酸素を溶解できる水溶 液の誕生につながり, 日本化学会学術賞 (1986), 大隈記念学術褒賞 (1987), 油 脂優秀技術賞(1989), 高分子科学功績 賞 (1991), Avogadro-Minakata賞 (1995) などを受賞されました. 北海道 赤十字血液センターの故 関口定美セン ター長, 慶應義塾大学医学部呼吸器外科 の小林紘一教授と, いわゆる完全合成系 のほか, 期限切れ赤血球の有効利用の観 点からヒト由来ヘモグロビンを用いる人 工酸素運搬体の共同研究を開始し, 我が 国における更なる開発促進の必要性を痛 感し、同士を結集して1993年に日本血液 代替物学会を設立し, 初代会長としてそ の御活動にあたりました. 国際血液代替 物学会 (ISBS) の会長Prof. Thomas M. S. Changほか欧米や中国などの同じ領域 の研究者との親交も長く、1997年の第7 回国際血液代替物学会(7-ISBS), 2003 年の第9回国際血液代替物学会(9-ISBS) の大会長をお努めになりました. 厚生省 (現 厚生労働省) も人工血液研究の必要 性を認識し、1997年度から6年間は、厚 生科学研究 (高度先端医療研究事業) の 代表者として機能と安全性の研究を推進 し、その後現在に至るまで人工血液の研 究が国策として推進されるようになりま した. その間, 我が国は薬害エイズや阪 神淡路大震災などの経験を踏まえ, 改正 薬事法には,安全で有用な人工血液の研 究を押し進めるべきことが明文化されま した、2001年に教授をご退任された後は、 早稲田大学理工学総合研究センターの顧 問研究員として「酸素輸液プロジェクト」 を立ち上げ、若手の研究者らと新しい人 工赤血球の開発や新しい効能の発見のほ か、単に学術的な興味の追求に留めず、 これを社会に還元させるため、企業との 連携を図り臨床応用可能な人工酸素運搬 体の開発を目指しましたが、道半ばにし てお亡くなりになりました.

私どもの土田先生のグループとの人工酸素運搬体の開発に関わる共同研究は25年にもなります。先生の学問に対する真摯な態度、慈愛に満ちた優しい瞳にはいつも励まされてきました。人工酸素運搬体の開発は基礎から臨床へと、いわゆるtranslational research の先駆けとなるものでしたが、残念ながら先生の御存命中には実現しませんでした。土田先生が築き上げられた学会や研究体制を十分に活用しながら、残された者たちが土田先生のご遺志を継いで、人工赤血球の実現を目指します。土田先生、どうぞ安らかにお眠り下さい。

ここに謹んで哀悼の意を捧げ、ご生前 の数多くのご業績に衷心より敬意を表 し、先生より頂いたご指導ご厚情に感謝 申し上げお別れの言葉とします.

## 第17回日本血液代替物学会年次大会

The 17th Annual Meeting of the Society of Blood Substitutes, Japan

## 『血液代替物科学の最前線』

大会長:小田切 優樹 (崇城大学薬学部教授・熊本大学客員教授)

会 期:平成22年10月18日(月),19日(火)

会 場:熊本市国際交流会館(熊本市花畑町4-8)

ランチョンセミナー: 平成22年10月19日 (火) 12:30~13:30 「肝疾患診療におけるアルブミン」

(主催:一般財団法人 化学及血清療法研究所)

年次大会事務局

〒860-0082 熊本市池田4-22-1

崇城大学薬学部

TEL: 096-326-3887, 4019

FAX: 096-326-3887, 5048

E-mail: otagirim@ph.sojo-u.ac.jp

## 大会長挨拶

この度、第17回を迎えました日本血液代替物学会の年次大会をお世話することとなりました。久しぶりに東京から離れ、年次大会を南の地「熊本」にて開催できますことを大変光栄に思いますとともに、その責任の重さを感じている次第です。

本大会は、「人工血液」をキーワードに、年に一回、専門家や関係者の方々が一堂に会して討議、情報交換する重要な場を提供してまいりました。本学会が主たる目的とする血液の機能の一部を代替するDDS製剤、「人工血液」の研究は、正に、医・薬・理・工学の複合領域であり、学際的協力のもとに様々な視点から検討されてきました。人工血液の臨床応用を更に推進させるためには、従前にも増し、生命科学を中心とした幅広い専門領域の技術・方法論の連携と融合を図ることが重要かと思われます。

第17回年次大会では、"有効性と安全性に優れた人工血液の開発"を肝に銘じ、「血液代替物科学の最前線」を大会テーマとさせていただきました。特別講演には、基礎・臨床で幅広く活躍されている著名な3人の先生方、内海英雄教授(九州大学)、尾池雄一教授(熊本大学)、馬場秀夫教授(熊本大学)をお招きし、最先端の研究成果について興味深いご講演を賜ります。シンポジウムでは、本大会の趣旨に相応しく、(1)「人工血小板の現状と将来」(2)「細胞型ナノ医薬品の新展開」に加え、特別企画シンポジウム「土田英俊教授メモリアルシンポジウム ~人工酸素運搬体の臨床応用~」を企図し、故土田先生を偲び、永年にわたる当学会への多大なる貢献と情熱に敬意と感謝の念を捧げたいと思います。

終わりに、ご多忙の中、特別講演やシンポジウムのご講演をご快諾いただいた先生方、またオーガナイザー の労をとっていただいた諸先生方に衷心より御礼申し上げます。

"森の都"熊本の水と歴史に育まれたまち、熊本市で開催される本大会が、参加者各位の熱い議論の盛り上がりにより、実り多いものとなることを祈念いたします。

第17回日本血液代替物学会年次大会 大会長 小田切 優樹

## お知らせとお願い

#### ■会員・参加者の方へ

#### <会場>

熊本市国際交流会館ホール (6階), 第3会議室 (4階)

(熊本市花畑町 4-8; TEL 096-359-2020)

#### <受付>

平成22年10月18日 (月) ホール 6 階で 8:40から

平成22年10月19日 (火) ホール 6 階で 9:00から

#### <参加登録>

事前参加登録は行いません. 当日参加登録は、受付デスクに備付けの登録用紙に必要事項を記入し、受付にご提出下さい.

参加登録費 10,000円

#### <新入会受付>

日本血液代替物学会に未入会の方は, 受付で入会手続きをおとり下さい.

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

#### <抄録集>

抄録集は、会員全員に事前送付しています。 当日お忘れなくご持参下さい。

また、当日、受付にて1部1.500円で販売いたします。

#### <ランチョンセミナー>

大会2日目昼にランチョンセミナーを開催します.全員の皆様のご参加をお待ちしています.

日時:平成22年10月19日(火)12:30~13:30

場所:熊本市国際交流会館ホール 6階

主催:一般財団法人 化学及血清療法研究所

#### <懇親会>

参加者相互の親睦を図るため、以下の通り、懇親会を開催します.参加費は無料ですので、奮ってご参加下さい.

日時:平成22年10月18日(月)19:00から 場所:熊本交通センターホテル 6 階菊の間

(熊本市桜町 3 - 10; TEL 096-326-8828)

#### ■演題発表される方へ

- 1. 本学会の発表は、全てPCプロジェクターで行います、映写できるスクリーンは1面のみです。
- 2. ご発表の1時間前までに、PC受付にて試写を行って下さい。
- 3. Windowsの場合(動画を含む場合を除く)は、USBフラッシュメモリーまたは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の場合は、ご自身のパソコンをご持参下さい。また、Windowsで動画を含むデータの場合は、ご自身のパソコンをご持参下さい。なお、当日お持ち込みになる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下さい。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、発表前にあらかじめ解除しておいて下さい。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。
- 4. 事務局で用意しておりますPC (Windows) には、OS: Windows XPでPower Point 2003, 2007をインストールしており、Power Point 2000以降のバージョンに対応可能です。この環境にて正常に作動するデータをご用意下さい。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。
- 5. 当日は、USBフラッシュメモリーまたはCD-R等のバックアップデータを必ずご用意下さい、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。
- 6. ご自身のPCでの発表を希望される場合は、D-sub 15ピンによるモニター出力が必要です。事務局でD-sub 15ピンの接続ケーブルを用意しますが、ご持参いただくPCからD-sub 15ピンへの変換コネクターが必要な場合には、各自でご用意下さい。

D-sub 15ピン以外では接続できませんので、ご了承下さい。

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

#### ■講演発表時間

特別講演の発表時間は50~60分です。特別企画及びシンポジウムの発表時間は、演者数により異なりますので、ご注意願います。 一般講演は、発表時間10分、質問時間5分です。

#### ■各種会議日程

理 事 会: 平成22年10月18日 (月) 12:00~13:00

(熊本市国際交流会館4階・第3会議室)

評議員会:平成22年10月18日(月)13:00~13:30

(熊本市国際交流会館4階・第3会議室)

総 会:平成22年10月18日(月)18:00~18:30

(熊本市国際交流会館6階・ホール)

#### ■大会事務局

〒860-0082 熊本市池田4-22-1

崇城大学薬学部

TEL: 096-326-3887, 4019

FAX: 096-326-3887, 5048

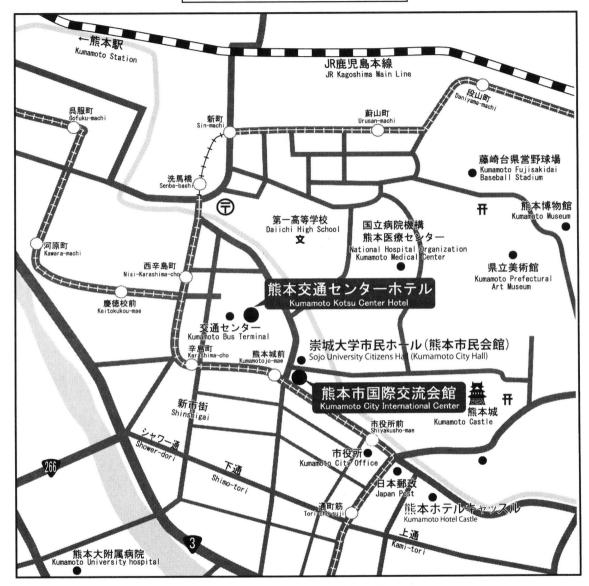
E-mail: otagirim@ph.sojo-u.ac.jp

学会のホームページにて、最新のお知らせ、注意事項、プログラムなどを掲載していきます。併せてご確認、ご利用下さい、 学会のホームページ http://www.blood-sub.jp/info/announce.html

## 大会日程表

	平成22年10月18日(月)	平成22年10月19日(火)
9:00	8:40-9:30 受付	9:20 - 11:20
9:30	9:30-9:40 開会の辞 9:40-10:10 大会長講演	シンポジウム② 細胞型ナノ医薬品の新展開
10:00	演者:小田切優樹 (崇城大学) 座長:小林紘一 (慶應義塾大学)	オーガナイザー: 武岡真司 (早稲田大学), 丸山一雄 (帝京大学)
10:30	10:10-12:00 シンポジウム① 人工血小板の現状と将来	演者:   丸山一雄(帝京大学)
1:00	オーガナイザー:	中山正道(東京女子医科大学) 宗 慶太郎(早稲田大学)
	半田 誠 (慶應義塾大学), 丸山 徹 (熊本大学) 演者:	武岡真司 (早稲田大学) 11:20-11:30 休憩
11:30	□ 富山佳昭(大阪大学) 鎌田徹治(慶應義塾大学) ※四、新(磨磨差勲大学)	11:30 - 12:30 特別講演②
12:00	半田 誠 (慶應義塾大学) 12:00 - 13:00 理事会	演者:   尾池雄一 (熊本大学)   座長:
12:30	442	<b>堀之内宏久</b> (慶應義塾大学)
		ランチョンセミナー 演者:
13:00	13:00 - 13:30 評議員会	<b>鈴木壱知</b> (独協医科大学越谷病院) 座長: 小田切優樹(崇城大学)
13:30	13:30 - 13:40 休憩 13:40 - 14:40	13:30 - 13:40 休憩
14:00	<ul><li>─ 特別講演①</li><li>演者:</li><li>内海英雄(九州大学)</li></ul>	特別講演③ 演者: 馬場秀夫(熊本大学)
14:30	── 座長: 小田切優樹 (崇城大学)	座長: 高折益彦 (東宝塚さとう病院)
	14:40 - 15:00 休憩	14:40 - 15:00 休憩
15:00	15:00 - 18:00   特別企画 	15:00 - 17:00 一般講演 座長:酒井宏水 (早稲田大学)
15:30	~人工酸素運搬体の臨床応用~」 オーガナイザー:	演者:三宅誠司(大阪府済生会野江病院) 高橋大輔(北海道赤十字血液センター)
16:00	- 小林紘一 (慶應義塾大学) 高折益彦 (東宝塚さとう病院)	勢司泰久(慶應義塾大学) 西川可穂子(防衛医科大学校) 座長:小松晃之(中央大学)
16:30	□ 演者: はじめに;小林紘一 (慶應義塾大学) 西井宏水 (早稲田大学)	演者:百武 徹 (横浜国立大学) 田口和明 (熊本大学) 大柿 滋 (熊本大学) 渡辺佳織 (熊本大学)
17:00	<ul><li>■ 堀之内宏久(慶應義塾大学)</li><li>東 寛(北海道赤十字血液センター)</li><li>木下 学(防衛医科大学校)</li><li>小田切優樹(崇城大学)</li></ul>	77:00 閉会の辞
17:30		
18:00	18:00 - 18:30 総会	-
18:30		-
19:00	19:00	-
	懇親会 (熊本交通センターホテル)	

# 交通案内図



会場へのアクセスイメージ





## 平成22年10月18日(月)

#### 9:30~9:40 開会の辞

#### 9:40~10:10 大会長講演

「アルブミンに夢を描いて35年」

小田切優樹 (崇城大学薬学部)

座長:小林紘一(慶應義塾大学医学部)

#### 10:10~12:00 シンポジウム① 「人工血小板の現状と将来」

オーガナイザー:半田 誠 (慶應義塾大学輸血・細胞療法センター), 丸山 徹 (熊本大学薬学部)

1.「血小板の活性化機構:ADPの果たす役割」

富山佳昭 (大阪大学医学部附属病院輸血部)

2.「血小板 α IIb β 3インテグリンの活性化メカニズム」

鎌田徹治 (慶應義塾大学医学部解剖学)

3. 「人工血小板の開発状況 |

半田 誠 (慶應義塾大学輸血・細胞療法センター)

12:00~13:00 理事会

13:00~13:30 評議員会

13:30~13:40 休憩

#### 13:40~14:40 特別講演①

「新たな磁気共鳴画像化法の開発と酸化ストレス疾患の可視化」

内海英雄(九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点、医薬品医療機器総合機構)

座長:小田切優樹 (崇城大学薬学部)

14:40~15:00 休憩

15:00~18:00 特別企画

「土田英俊教授メモリアルシンポジウム~人工酸素運搬体の臨床応用~|

オーガナイザー:小林紘一 (慶應義塾大学医学部), 高折益彦 (東宝塚さとう病院)

1. はじめに

小林紘一 (慶應義塾大学医学部)

2.「Hb小胞体の開発の歴史と現状」

酒井宏水 (早稲田大学バイオサイエンスシンガポール研究所)

3.「Hb小胞体の動物投与の成績」

**堀之内宏久**(慶應義塾大学医学部呼吸器外科)

4.「Hb小胞体の免疫応答への影響」

東 寛(北海道赤十字血液センター研究部)

- 5.「Liposome-encapsulated Hb (LEH) の動物モデルでの投与成績 血液交換モデル, 経骨輸血モデルでの知見 」 木下 学 (防衛医科大学校免疫微生物学)
- 6.「Hb小胞体の体内動態特性に基づく安全性評価」

小田切優樹 (崇城大学薬学部)

7.「カプセル型人工酸素運搬体開発の現状-非臨床から臨床へ-」

金田伸一(テルモ株式会社研究開発本部)

8. 「完全合成系人工酸素運搬体の開発」

小松晃之(中央大学理工学部)

9. おわりに

52

高折益彦 (東宝塚さとう病院)

#### 18:00~18:30 総会

**19:00~ 懇親会**(熊本交通センターホテル)

人工血液 Vol. 18, No.2, 2010

## 平成22年10月19日(火)

#### 9:20~11:20 シンポジウム② 「細胞型ナノ医薬品の新展開」

オーガナイザー:武岡真司(早稲田大学大学院先進理工学研究科)、丸山一雄(帝京大学薬学部)

1.「トランスフェリン修飾リポソームによる細胞内送達と癌治療への応用」

丸山一雄 (帝京大学薬学部)

2.「マルチターゲッティングDDSのための温度応答性ブロックコポリマーミセルの構築」 中山正道(東京女子医科大学先端生命医科学研究所)

3.「リポソーム技術を基盤とする骨髄指向性ナノ医薬品の構築」

宗 慶太郎 (早稲田大学先端生命医科学センター)

4.「アミノ酸型脂質からなるpH応答性リポソームとナノ医療としての可能性」 武岡真司(早稲田大学大学院先進理工学研究科)

11:20-11:30 休憩

11:30-12:30 特別講演②

「生活習慣病の病態生理と治療戦略」

尾池雄一 (熊本大学大学院生命科学研究部分子遺伝学)

座長:堀之内宏久(慶應義塾大学医学部呼吸器外科)

12:30~13:30 ランチョンセミナー (主催:一般財団法人 化学及血清療法研究所)

「肝疾患診療におけるアルブミン」

鈴木壱知 (独協医科大学越谷病院消化器内科)

座長:小田切優樹 (崇城大学薬学部)

13:30~13:40 休憩

13:40~14:40 特別講演③

「がん治療の最前線」

馬場秀夫(熊本大学大学院生命科学研究部消化器外科学)

座長:高折益彦 (東宝塚さとう病院)

14:40~15:00 休憩

#### 15:00~17:00 一般講演

**座長:酒井宏水**(早稲田大学バイオサイエンスシンガポール研究所)

- 1. 「HbV (liposome encapsulated hemoglobin) 膜への晶質浸透圧,膠質浸透圧作用」 三宅誠司 (大阪府済生会野江病院検査科)
- 2.「ラットのin vivoでの抗原特異的な二次免疫応答に対するヘモグロビン小胞体(HbV)投与の影響」 高橋大輔(北海道赤十字血液センター)
- 3.「ラット希釈性貧血モデルに対する一酸化炭素ヘモグロビン小胞体投与の効果」 勢司泰久(慶應義塾大学医学部呼吸器外科)
- 4.「外傷性大量出血時の大量輸血に伴う血小板減少病態時の人工血小板H12 (ADP) liposomeによる止血制御効果」 西川可穂子 (防衛医科大学校救急部)

座長:小松晃之(中央大学理工学部)

5.「シミュレーションによる人工赤血球動態の流体力学的考察」

百武 徹 (横浜国立大学大学院工学研究院)

6.「ヘモグロビン小胞体の出血性ショックモデルラットにおける大腸菌増殖抑制効果」

田口和明 (熊本大学大学院薬学教育部)

7. 「出血性ショックモデルラットにおける一酸化炭素結合型赤血球のチトクロームP450保護効果」 大柿 滋 (熊本大学大学院薬学教育部)

8.「α,-酸性糖タンパク質はS-ニトロソ化により抗菌活性を獲得する」

渡辺佳織 (熊本大学大学院薬学教育部)

#### 17:00~ 閉会の辞

ARTIFICIAL BLOOD Vol. 18, No.2, 2010

## 大会長講演

#### アルブミンに夢を描いて35年

小田切優樹

崇城大学薬学部, 熊本大学大学院生命科学研究部

薬物の血清タンパク結合に重要な役割を果たし、血液製剤やドラッグデリバリーシステム(DDS)キャリアーとして広く利用されているアルブミンの構造・機能や製剤学的特性の探究は、医療薬学上、極めて意義深い、演者は、1975年オランダ・ユトレヒト大学薬学部J. H. Perrin 教授の下に留学し、アルブミン研究を開始した、爾来、今日に至るまで、この分子のマルチな機能に魅せられ、限りない夢を描いて研究を続けてきた。本年会では、私どもの研究室で得られた知見を中心に、過去のアルブミン研究を振り返りながら、今後のアルブミン研究の展望について述べてみたい。

#### 1. 血清アルブミンの構造と機能の解明

アルブミン分子は,多くの物質を結合するにも関わらず,その結合サイトは限定されている.そこで,分光学的手法や構造活性相関,光アフィニティーラベル法,部位特異的変異法,X線結晶解析,分子モデリングなどを駆使して,アルブミン分子上のリガンド結合部位のトポロジー解析に着手した.その結果,従来のサイト I に加え,新たな結合サイトの存在を認め,これをサイト I と名付けた.さらに二重変異体 I R410A / Y411Aがサイト I ノックダウンレセプターとして機能することを見出した.一方,サイト I は少なくとも I 3つのサブサイトより形成されていることを初めて明らかにした.また,内因性リガンドの脂肪酸結合部位のマッピングを作成するとともに,I X線結晶構造解析を基に置換実験や変異体の結合実験を併用し,"静的プラス動的トポロジー"を構築した.

さらに、ヒトアルブミンに唯一遊離状態で存在する34位のシステイン(Cys-34)とグルタチオンなどの内因性物質やカプトプリルなどのSH含有薬物が非可逆的な共有結合体を形成することを見出し、この複合体形成が薬物の免疫学的な副作用の要因の1つであることを明らかにした。また、Cys-34の反応性がSH基の溶媒への露出度や周囲の静電的ポテンシャルといったミクロ環境に依存することを実証した。

#### 2. アルブミンの医薬への応用

ヒトアルブミン製剤は種々の疾患に汎用され、その市場は年間約1300億円に達しているが、慢性的な血液不足や製剤へのウイルス混入の危険性から、より有効かつ安全なアルブミン製剤の開発が切望されている。

現在、世界中で100以上のヒトアルブミンバリアントの存在が確認されているが、それらの大部分は有害性を示さないため、バリアントの特徴を把握することは、安全性にとって重要である。そこで、数十種類のバリアントの構造安定性と動態特性を評価し、ドメイン皿で帯電しているアミノ酸残基の変異が $\alpha$ -ヘリックスの構造変化を惹起して、アルブミン分子の熱安定性と血中滞留性に影響を及ぼすことを明らかにした。特に、Liprizziバリアント(R410C)では一残基置換であっても肝移行性が増大し、血中からの消失が著しく促進することを実証した。また、このバリアントが有する Cys 残基の SH を利用し、一酸化窒素の新規キャリアーとしての可能性を検討した結果、従来のS-ニトロソ化タンパクよりも高い抗菌活性や細胞保護効果を有することが細胞系及び虚血再還流モデルラットを用いて明らかになった。最近、遺伝子組換え型マンノース修飾アルブミンを作製し、肝臓へのNOの効率的なデリバリーによる肝虚血再還流障害改善効果を確認した。加えて興味深いことに、チオレドキシンとアルブミンの融合体は、チオレドキシンの抗酸化・抗炎症作用とアルブミンの血中滞留性を併せ持ち、敗血症に対し有効であることを見出した。

近年、疾患と酸化ストレスの関係が耳目を集め、臨床現場や医薬品開発において、簡便かつ高感度で特異性の高い酸化ストレスのバイオマーカーが求められている。そこで、アルブミンのCys-34の酸化還元状態のモニタリングにより、個々の患者での酸化ストレスや抗酸化剤の効果を定量的に評価する系を確立し、透析患者への静注鉄の過剰投与が血中酸化ストレスを増大させること、つまり貧血状態と鉄の蓄積量を考慮した投与設計の重要性を提唱した。加えて、腎保護薬である尿毒素吸着剤AST-120や高血圧治療剤であるオルメサルタンが腎不全患者の血中酸化ストレスを軽減するという、既知の薬理効果以外の有効性(プレイオトロピック効果)を臨床試験や腎不全モデルラットにより実証した。

私どもが永年アルブミンに託した夢は、今や、標的指向性、血中滞留性、抗酸化能等に優れた機能性アルブミン(例えば、糖化アルブミンや多量体化アルブミン)が、遺伝子工学的に自由自在にデザインできるようになり、今後、DDSをはじめ医薬への積極的な応用展開が期待されている。

## 特別講演①

#### 新たな磁気共鳴画像化法の開発と酸化ストレス疾患の可視化

内海英雄

九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点、医薬品医療機器総合機構

多くの生理現象や酸化ストレス疾患の成因・進展に活性酸素・フリーラジカルを含むレドックス代謝が密接に関与することが示唆されており、実験小動物でのレドックス動態を個体レベルで可視化できれば、生命現象の解明・疾病の解析とその治療法の確立・医薬品の開発に大きく貢献することが期待される。1889年以来、我々は生体計測 ESRI/MRI を開発し、ニトロキシルラジカルのシグナル変化を指標とする生体内レドックス動態の無侵襲評価方法を提唱し、潰瘍性大腸炎モデル、NSAIDs 誘発胃潰瘍モデル、薬物惹起肝・肺障害モデル、移植腫瘍モデル、中大脳動脈閉塞モデルなど有効性を明らかにしてきた。しかし、生体計測 ESRI は緩和時間の関係で空間・時間分解能が著しく乏しい欠点があった。

1988年にLurie はOverhauser 効果を用いたフリーラジカルのMRI可視化法(OMRI;Overhauser-MRI)を発表した。OMRIはMRIと同様に高い空間分解能を持ち,短時間測定が可能という特徴がある。我々はこのOMRIに新たなシークエンスを開発・特注すると共に,ニトロキシルプローブを組み合わせ,1)生体内局所集積性を持たせたスピンプローブを合成し,各々 $^{14}$ N, $^{15}$ N で標識し,2) $^{14}$ N, $^{15}$ N ラジカルを交互にESR 共鳴させ複数のプローブの同時画像化を報告した(PNAS 2006)。本法を用いて,レドックス反応を分離可視化すると共に,リポソーム膜内・外のレドックス反応を同時分離画像化した。

一方、疾患モデルにOMRI・ニトロキシルプローブ法を応用し、ラット脳虚血再還流における頭部レドックス動態を可視化し、レドックス代謝脳の低下がミトコンドリア障害によること(J Cereb Blood Flow Metab, 2009)、ラット下肢に移植した癌組織での抹消血管透過性と酸素分圧を可視化し、逆の相関があること(PNAS, 2009)を報告してきた。また、非ステロイド性抗炎症剤による胃粘膜損傷では胃粘膜内での活性酸素・レドックス制御異常が生じ、ラジカル消去剤がこの異常と炎症形成を抑制すること(JPET, 2006、投稿中)を生体計測ESRIおよびOMRIで明らかに示した。

以上のようにOMRIは非常に有用であることから、我々は、汎用性高い簡易OMRIと高感度OMRIの開発を行ってきた、簡易OMRIは通常のラボで使用でき、高感度OMRIは0.1ミリメートルの高解像度を有する。本装置は生体内のレドックス代謝や酸素濃度などの多情報を無侵襲可視化できることから、医療、創薬など広範囲な分野で幅広く用いられるものと期待している。

## 特別講演②

#### 生活習慣病の病態生理と治療戦略

尾池雄一

熊本大学大学院生命科学研究部・医学系・分子遺伝学

我が国では約4人に1人が65歳以上という超高齢化時代に突入しようとしており、「健康長寿』を真剣に考える重要性が増してきている。しかし現状は、「健康長寿』を脅かす糖尿病や動脈硬化症等の生活習慣病病態は増加しており、これらの病態の分子機構解明により、その制御が望まれている。近年、生活習慣の多様化に伴い、運動不足や肥満の増加が我々にとって深刻な問題となっている。また、運動不足や肥満に起因し生体内に生じる"慢性炎症"が、「健康長寿』を脅かすメタボリックシンドローム、糖尿病、動脈硬化性疾患など様々な疾患の基盤病態となることが注目を集めている。慢性炎症では、感染や外傷に対する生体防御反応である急性炎症と異なり、長期にわたるストレス応答のために実質細胞と多種の細胞から構成される間質細胞との相互作用が遷延化し、生体適応の過剰応答や変調等の破綻により組織リモデリングを生じて、臓器の機能不全をもたらす。例えば、脂肪細胞の老化や肥満に伴う内臓脂肪組織内の"慢性炎症"が、糖代謝異常、脂質代謝異常、血圧異常が一個体に集積するメタボリックシンドロームの病態形成に深く寄与することや、血管組織内や血管周囲の脂肪組織の"慢性炎症"が、血管内皮機能異常、動脈硬化の形成過程や動脈硬化プラークの不安定化に深く寄与することが明らかとなってきている。このことは、メタボリックシンドロームや動脈硬化プラークの不安定化に深く寄与することが明らかとなってきている。このことは、メタボリックシンドロームや動脈硬化性疾患等の"慢性炎症"を基盤病態とする生活習慣病において、鍵となる分子を同定することが病態の分子メカニズムを解明し、新規治療戦略を考えるうえで重要であることを示唆している。本講演では、生活習慣病の病態生理と、最近我々が同定した"慢性炎症"の鍵因子の1つであるアンジオポエチン様因子2(Angptl2)と生活習慣病発症・進展との関連、さらにAngptl2制御による『健康長寿』を目指した治療戦略の可能性をご紹介したい。

参考文献(原著)Cell Metab 10:178-188, 2009, Nat Med 15:1082-1087, 2009, Am J Pathol 176:2309-2319, 2010, (総説)Circ J 73:2192-2197, 2009, Trends Cardiovasc Med 18:6-14, 2008

## 特別講演③

#### がん治療の最前線

#### 馬場秀夫

熊本大学大学院生命科学研究部消化器外科

わが国は少子高齢化社会となり、年間約33万人ががんで亡くなっている。すなわち2人に1人ががんに罹り、3人に1人ががんで亡くなる時代であり、約三分の二が消化器癌である。消化器癌の発生に関しては、遺伝子の多段階変異で説明されているが、生来の遺伝的要因、慢性炎症、環境因子などの多くの因子が遺伝子変異をきたす原因と考えられている。

一般に、癌に対しては早期発見・早期治療が原則であり、早期の消化管癌に対しては、内視鏡的粘膜切除や、低侵襲の腹腔鏡手術が広く普及している。一方で、進行癌の治療に関しては外科的切除可能な症例に対しては手術が第一選択である。進行癌に対する手術に関しては、リンパ節の拡大郭清により治療成績の向上が試みられたが、最近のRCTの結果、拡大手術による治療成績向上効果には一定の限界があり、化学療法を中心とした補助療法との併用で予後向上が示されるようになってきた。切除不能進行再発癌に対しては、化学療法による治療が中心となるが、新規抗癌剤や分子標的治療薬の進歩に伴い、生存期間の延長が見られるようになってきた。当初切除不能癌に対しても、化学療法、分子標的治療による腫瘍縮小効果によって、二次的に切除可能になることがあり、切除できた症例は化学療法のみで切除できなかった症例より予後が良好であることが示され、当教室でもこのような集学的治療により治療成績の向上を目指している状況である。本講演では食道がん・胃がん・大腸がんの肝転移に対する治療法を具体的に示し、最近の治療成績の進歩を紹介する。

食道がん:リンパ節転移が高率で予後不良な癌腫である.早期食道がんに対しては内視鏡下粘膜切除や化学放射線療法も良好な成績を示しているが、進行癌に対しては手術と補助療法による治療が一般的である.当科では術前治療としての3剤併用療法(Docetaxel/Cisplatin/5-FU)後に根治的手術を行い良好な成績を示している.

胃がん:予防的大動脈周囲リンパ節郭清の効果が否定され、TS-1による術後補助化学療法により3年生存が10%向上することが示され、標準治療となった。進行再発胃がんに対してはTS-1もしくはTS-1+ cisplatinが標準治療として推奨されている。

大腸癌肝転移: 肝切除が唯一治癒を期待できる方法として多用されてきた. 肝切除が可能であれば5年生存率が約40%と良好である. 切除不能と考えられる肝転移に対しても、まず、化学療法を導入し、腫瘍が縮小して切除可能となれば肝切除を施行することで治療成績の更なる向上が期待できる. 肝切除可能となった症例のPFSとOSの中央値は1.7年と3年であり、非肝切除例の0.6年と1.8年より有意に良好であった. 肝切除可能になることは唯一の独立した予後因子であった.

集学的治療の効果判定としては、CT等の画像診断による腫瘍の大きさの変化を指標とし、腫瘍マーカーの変化を補助的に用いるが、抹消血中に出現するがん細胞(CTC)の数も、治療効果に鋭敏に反応し増減する。これまで、CTCを予後や治療効果判定の予測因子として利用する試みがなされているが、まだ解決されていない問題も多々ある。

本講演では、消化器癌に対する治療法の現状を紹介すると共に、臨床で遭遇する疑問点を如何に基礎的研究により解決できるのか、現在取り組んでいる研究の一旦も紹介したい.

#### ヘモグロビン小胞体の開発の歴史と現状

#### 酒井宏水

早稲田大学バイオサイエンスシンガポール研究所

へモグロビン(Hb)を微小カプセルに封入する概念は、Chang(McGill Univ.)の1950年代の研究にはじまる。1964年英国のBanghamらが、リン脂質が自発的に集合して小胞(liposome)を形成することを発見、1977年Djordjevici(Illinois Univ.)らがHbをliposomeに内包したLiposome Encapsulated Hb(LEH)を発表した。米国海軍研究所のRudolphらがLEHを継続したが、Hb内胞効率や生体適合性も十分ではなく中断した。日本では、1960年代に高分子薄膜のカプセルにHbを封入する試みや、1984年に近藤らがキチン修飾LEHを報告しているが、具体化されていない。

全合成系酸素運搬体リピドへムを開発していた土田英俊先生(早稲田大学)は、非使用(期限切れ)赤血球の有効利用について日本赤十字社側の要請を受け、1980年代の後半から、LEHの研究を開始した[1].「リポソームは脆弱なもの」と当時は考えられ、高分子を用いる安定化が試された[2]. また分子集合化学を基礎としたHb内包効率の向上、COを用いる高純度Hb精製技術、脱酸素化と表面修飾による長期室温保存、粒子表面の改質による生体適合性の向上などに取組んできた。従来のLEHと区別するため「ヘモグロビン小胞体: Hb-vesicles」と命名した。1993年に日本血液代替物学会の設立[3]、1997年より厚生科学研究費補助金を受け、慶應義塾大学医学部をはじめ医学側とのHb小胞体の研究開発の更なる基盤固めが行なわれた。2001年に早稲田大学に酸素輸液プロジェクトを立ち上げ、我々若手の研究者と取組んできた[4]。常に産学連携により実現を目指してきたが[5]、道半ばにして土田先生はお亡くなりになられた。

欧米では製法が簡単な修飾Hb(分子内架橋・重合)の開発が主流で、臨床試験が最終段階に到達し、Hb小胞体よりもかなり先んじていた。しかし後になって、赤血球構造の生理学的意義の欠如のため、NO捕捉による血圧亢進など思わぬ毒性が明らかになり、開発中断が相次ぎ淘汰が進んだ。今や「細胞型」は必須の条件になろうとしている。現行のHb小胞体製剤は、安定性、機能、安全性のどの項目においても、従来のLEHよりも優れていると自信を持って言える。土田先生が確立してくださった国内外研究機関との共同体制のもと、我々は地道でも着実に開発研究を前進させ、Hb小胞体の臨床応用を目指したい。

- [1] 鈴木, 宮内, 岡本, 高橋, 沢本, 大崎, 土田, 大野. 人工臓器 1988; 17: 708-11.
- [2] Satoh T, Kobayashi K, Sekiguchi S, Tsuchida E, ASAIO J 1992; 38, 580-4.
- [3] 土田英俊. 人工血液 1993; 1: 2.
- [4] Tsuchida E, Sou K, Nakagawa A, Sakai H, Komatsu T, Kobayashi K. Bioconjugate Chem 2009; 20: 1419-40.
- [5] Taguchi K, Maruyama T, Iwao Y, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Tsuchida E, Kai T, Otagiri M. J Control Release. 2009; 136: 232-9

58

#### Hb小胞体の動物投与の成績

堀之内宏久¹, 勢司泰久¹, 泉 陽太郎¹, 酒井宏水², 小林紘一¹

<sup>1</sup>慶應義塾大学医学部呼吸器外科, <sup>2</sup>早稲田大学バイオサイエンスシンガポール研究所

高純度に分離精製した人Hbを脂質2重膜で被覆したヘモグロビン小胞体(以下HbV)はユニークな膜構造と血管内滞留時間を考慮した粒径制御により人工酸素運搬体としての可能性が大である。HbVの動物投与試験は1994年よりはじまり、小動物から霊長類まで多くの動物種に経静脈投与、経動脈投与、腹腔内投与、気道内投与など種々の投与方法を用いて行った。使用した動物種は mouse, rat, rabbit, beagle dog, Rhesus monkey などである。投与試験は短期実験として

- 1.90%交換輸血試験(rat) 2.50%出血ショック蘇生試験(rat) 3.40%出血ショック蘇生試験(Rabbit 反復ショックモデル) 4.50%出血ショック蘇生試験(Beagle) 5.人工心肺装着時の臓器血流と酸素需給に関する検討(rat) 6.制御不能出血性ショック蘇生実験(大血管損傷モデル,rat) 7.制御不能出血性ショック蘇生実験(腎破裂モデル,rat) 8.制御不能出血性ショック(尾動脈持続出血モデル,rat)を用いた大量急速注入の検討 9.挫滅症候群モデルにおけるサイトカインの変動(rat) 10.希釈貧血ショックモデルに対する COHbV 投与による蘇生・生存試験(rat) などをおこない,長期実験として
- 11. 単回投与試験(20 mL/kg, 1年までrat) 12. 反復投与試験(10 mL/kg/日×14 日rat) 13. 40%出血ショック蘇生長期生存試験(Beagle) 14. 体外循環モデルにおける高次脳機能の保護効果に関する検討(rat) 15. 単回投与長期生存試験(Rhesus monkey)などを行った.

その結果,短期的にはショックの蘇生効果,臓器,組織の酸素加,安全性ともに良好な結果であった.Beagle 犬の50%脱血ショック蘇生試験では投与直後に肺動脈圧の上昇が認められたが,症例数も少なく,再検証が必要である.持続出血モデルに対する大量,急速投与試験では循環血液量の1.5倍の輸注に耐えられることも明らかとなった.

長期試験では輸血と比較すると比較的大量の脂質が血中に投与されることになるためか、一過性の高脂質血症が認められたが、7日間で正常値に復し、臓器機能、臓器の組織学的変化も可逆的であった。Beagle 犬への大量・急速投与後の検討では食欲の回復も速やかで、犬舎内での行動異常は認められず、高次脳機能に与える影響も少ないと考えられた。霊長類における検討では、血液・生化学的変化も含め、安全性は高いと判断された。

また、酸素運搬体として液体換気液、腫瘍に対する放射線感受性増強効果をもたらす物質、脳血管疾患への治療剤としての検討を行い、治療に結び付く結果が得られた.

以上のように動物投与成績では安全性、効果の面で良好な結果が得られている。ただし、HbVの血中滞留時間(半減期)は rat24時間、Rhesus monkeyで72時間程度であり、その後は赤血球数が回復するまで軽度の貧血状態のまま推移していた。

HbV の酸素運搬体としての使命を考えると、輸血治療を補完する物質としての臨床応用を進めるべきであると考えられた.

#### HbVの免疫応答への影響

#### 東 寛,池田久實

北海道赤十字血液センター研究部

Hemoglobin vesicle (以下 HbV) は、Hb分子が脂質 2 重膜に包埋されており、リポソーム製剤とも言える。HbV が既存のリポソーム製剤と異なる点は、血液代替物としての使用を目的とするゆえに、生体への大量の投与が前提とされる点である。その結果、既存のリポソーム製剤では認められなかった有害事象が生体に生ずる可能性がある。そのため、その優れた酸素運搬能の検証とともに、これまで HbV の生体適合性が様々な角度から検討されてきた。我々の施設では、HbV の開発当初から、HbV とヒトの血球成分、補体、あるいは凝固系などの血漿タンパクとの相互作用の有無を検討し、現在の組成の HbV が優れた生体適合性を有していることを報告してきた。

一方,リポソームの性質として生体に投与されると,速やかに食細胞系(Monophagocytic system (MPS))に取り込まれることが知られているが,HbV も投与後に速やかに脾や肝等のMPSに取り込まれることがわかっていた.MPSを構成するmacrophage系の細胞は免疫応答と密接にかかわっていることから,大量のリポソームを一度に貪食したMPSの細胞が,免疫応答に何らかの影響を与える可能性の検討が残されていた.そこで,ラットに総血液量の20% (v/v) に相当するHbV を投与した後に脾を摘出し,脾細胞全体を非特異的なT細胞のマイトジェンであるConcanavalin Aを加えて培養したところ,T細胞の増殖反応が有意に低下していることが明らかになった.この現象はHbV 投与後 6 時間後から 3 日後まで観察され,投与後 7 日目には回復していた.すなわち,T細胞の増殖抑制はHbV 投与後に一過性に認められるものであった.Hb分子を内包しない空の vesicle でも,また,Keyhole limpet hemocyanine(KLH)を用いた蛋白抗原特異的刺激でも同様の現象が見られた.この現象がいかなる機序でおこるのかを検討した結果,脾のMPSを構成しているphagocyte(immature macrophage)がHbV を貪食し,T細胞の増殖を抑制する機能を獲得していること,また,この抑制機能にはHbV を貪食した細胞から産生される nitric oxide が関与していることを示唆する結果が得られた.

はたして、これらのex vivoでの結果がin vivoでも同様に観察されるか否かを調べるためにHbV 投与下におけるKLH 抗原刺激に対する 1 次抗体反応および 2 次抗体反応を検討した。その結果、両反応とも生理食塩水投与群と同等の抗体反応のおこることが確認された。

以上のことから、HbV はMPSの細胞が豊富に存在する局所の免疫応答に一過性に影響を与える可能性があるが、全身的な免疫 応答には影響はないと推定された。一方で、得られた結果は、リポソームが、それを貪食した細胞をいわゆる抑制性 macrophage へと誘導する作用のあることを示している。この事実は、HbV を含めたリポソームの臨床応用面の新たな展開を予感させる。

Liposome-encapsulated Hb (LEH) の動物モデルでの投与成績一血液交換モデル, 経骨輸血モデルでの知見ー

木下  $\phi^1$ , 庄野  $\delta^{1,2}$ , 野上弥志郎<sup>3</sup>, 高瀬凡平<sup>4</sup>, 西川可穂子<sup>5</sup>, 金田伸一<sup>6</sup>, 田中良弘<sup>7</sup>, 斎藤大蔵<sup>8</sup>, 石原雅之<sup>7</sup>, 菊地 真<sup>9</sup>, 関 修司<sup>1</sup>

<sup>1</sup>防衛医科大学校免疫微生物学講座,<sup>2</sup>防衛医学講座,<sup>3</sup>外科学講座,<sup>4</sup>集中治療部,<sup>5</sup>救急部,<sup>6</sup>テルモ株式会社研究開発本部,<sup>7</sup>防衛医学研究センター医療工学研究部門,<sup>8</sup>外傷研究部門,<sup>9</sup>医用工学講座

LEH は優れた酸素運搬能を有し、その投与により外傷性大量出血時の致死的低ヘモグロビン(Hb)血症に対する救命効果が期待される。ラットの血液交換モデルやマウスの致死的出血性ショックモデルにおけるLEH の投与効果を検討した。LEH はテルモ社より供与されたものを用いた。

【ラット血液交換モデル】ラットの大腿動脈より0.2mL/minで脱血を行い,これと等量のLEH(Hb 6g/dL),ラット洗浄赤血球(wRBC,Hb 6g/dL),5%アルブミン(Alb)を大腿静脈より投与することで血液交換を150分間行った.実験終了後,Alb群は全例死亡したがwRBC群は全例生存した.LEH群は80%が生存し顕著な救命効果が得られた.血中NOx値はLEH投与で減少せず,一方,肝臓や腎臓でのHypoxia-inducible factor- $1\alpha$ (HIF- $1\alpha$ )の発現はLEH投与により明らかに抑制された.しかし,大量輸血に伴う肺うっ血がwRBC群,LEH群で認められ,またLEH群では実験終了48時間後にLEHを貪食したと考えられるクッパー細胞の著明な増加が認められた.

【マウス致死性大量出血と経骨輸血】(1) マウスの血液約1.5mLを5% Albで置換し致死的低Hb血症(Hb 5g/dL)を作成後,LEHや5% Alb,マウス wRBC を投与し蘇生を試みた。Alb群は全例死亡したがwRBC群は80%生存しLEH群でも20%が生存し得た。LEH投与による血中TNF値の上昇や $NO_2$ ,  $NO_3$ で値の減少は認められなかった。

(2) 次に脱血と輸液により Hb 6 g/dL の低 Hb 血症をマウスに作成後,さらに 0.3mL を脱血した.これに LEH や wRBC,Alb を 経大腿骨投与し蘇生を試みた.wRBC 投与では Alb 投与に比し顕著な救命効果は認められなかったが(共に生存率 30%),LEH 投与では 80%が救命され顕著な救命効果があった.これは LEH が本来の RBC に比し粒子径が小さく,よりスムーズに循環血中へと 移行したためで,血中 Hb 値は LEH 群で wRBC 群より 有意に高値であった.LEH 投与による TNF 上昇や  $NO_2$ ,  $NO_3$  値の減少は認められなかった.本モデルで経骨輸血の代わりに経静脈輸血を行うと,wRBC, LEH 両群とも生存率は 80%と差はなくなった.

【結語】LEHはNO消去作用を誘導せずに、出血性ショックや低Hb血症に対する顕著な救命効果が認められた。また、出血性ショックなどでの末梢血管虚脱時の蘇生においてもLEHを経骨輸血することで、より効果的な救命蘇生効果が得られた。今後はクッパー細胞による貪食や生体の異物反応に留意した上で、臨床応用を検討したい。

#### ヘモグロビン小胞体の体内動態特性に基づく安全性評価

田口和明1, 丸山 徹1, 小田切優樹1.2

1熊本大学大学院薬学教育部,2崇城大学薬学部

2008年、Journal of American Medical Association(JAMA)誌において、欧米で開発された5種類の非細胞型HBOCs の臨床試験結果を基に、メタアナリシスを行ったところ、非細胞型HBOCs投与群の死亡率および心筋梗塞発症率が対照群に比べ高いというエビデンスが報告された。これを受け、人工酸素運搬体の開発過程で動物試験における十分な検討とその解釈の重要性が求められるようになった。

へモグロビン小胞体(HbV)の有用性は数多くの前臨床試験において確認されているが、前臨床試験で必要不可欠な検討項目である体内動態に関する情報は不足している。薬物動態試験は薬物の開発過程においてただ単なる、薬物の吸収(Absorption)・分布(Distribution)・代謝(Metabolism)・排泄(Excretion)といった、いわゆる ADME を把握するだけでなく、これらのデータを踏まえた上で安全性を考える上で有用である。また、HbV の場合、赤血球代替物であるため投与量が通常のリポソーム製剤の100倍以上と多く、これまでの構築されてきた動態解析の成果を当てはめることは難しく、予期せぬ副作用や生体蓄積性が懸念されると同時に、新たにHbV の臨床使用状況でデータを構築する必要がある。

現在,上市されている Amphotericin B内封リポソーム製剤(AmBisome®)は健常人と病態患者によって体内動態が一部異なること,また,HbV のような肝代謝型薬物は肝機能低下時に体内動態が変動することが報告されている。さらに,PEG 修飾リポソームにおいて,ある投与間隔で 2 回投与を行うと 2 回目投与された PEG 修飾リポソームの血中クリアランスが亢進するといった,いわゆる Accelerated Blood Clearance Phenomenon(ABC 現象)が誘導されることが報告されている。そのため,PEG 修飾リポソーム製剤である HbV においても健常時と病態時(大量出血・肝疾患時),また類回投与時において体内動態が異なる可能性が懸念される。これらの条件をふまえて HbV の体内動態特性を把握することは,緊急治療薬である HbV を万人対応型薬物として,安全かつ有効に臨床使用するために重要であり,ヒトの HbV の臨床試験に向けた至適投与計画の立案や HbV 開発の際の有用な基礎資料になるものと考えられる。

本シンポジウムでは、我々がこれまで明らかにしてきた、HbV構成成分の体内挙動・出血性ショック及び四塩化炭素誘発慢性肝障害時におけるHbVの体内動態評価・HbV類回投与時でのAccelerated Blood Clearance Phenomenon(ABC)現象への影響・ヒトへの外挿、について紹介し、これらの結果より解釈されたHbVの安全性について体内動態特性の観点より考察する。

62

#### カプセル型人工酸素運搬体開発の現状ー非臨床から臨床へー

金田伸一

#### テルモ株式会社研究開発本部

へモグロビンを利用した人工酸素運搬体については、非カプセル型について、その安全性上の重大な問題点が指摘され、多くの 開発が失敗に終わっている。これに対し、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を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。

一方,その実用化に際しては、生物学的製剤であり、且つリポソーム製剤であることの特性を考慮した品質保証が必要となる.また、非臨床試験においては、カプセル化の意義を明確にすること、リポソーム製剤としての安全性の確認を十分に行うこと、カプセル型人工酸素運搬体としての特徴も踏まえた適応症の選択、その領域における有効性の評価を行うことが必要であり、さらに、これらの試験結果を踏まえた、適切な臨床試験の設計が求められる.

我々は、これらの、前例のない課題に対し、夫々、適宜対応しつつ、虚血性疾患の治療を目的とした開発を行うべく、非臨床試験を実施し、医薬品としての第1相試験へ進む予定である。本発表では、開発の現状と、今後の進め方について概説する。

#### 完全合成系人工酸素運搬体の開発

小松晃之

中央大学理工学部応用化学科

土田英俊先生が永年展開してきた人工酸素運搬体の研究は、1970年代の"高分子へム錯体"の合成に始まる。当時の錯体化学の常識では、生理条件下(水中、37℃)における可逆的な酸素配位へム錯体の生成は困難と考えられていた。しかし、不可能は可能となり、さらなる挑戦は一貫して「完全合成系人工酸素運搬体の開発」として現在に至る。演者は、1980年代後半からその一端を担ってきたので、本講演ではその道程と展望について述べたい。

土田先生は、早稲田大学理工学部において、高分子化学の教育・研究に努められ、世界に先駆け新分野「高分子錯体」を確立された。高分子錯体とは、バイオマテリアルはもちろん、エネルギーやエレクトロニクス材料の開発においても根幹をなす高分子化学の一分野である。ヘモグロビンは、まさに生物進化が創り出した究極の高分子錯体といえる。そのヘモグロビンの機能(酸素輸送)を化学の手で再現(または凌駕)し、人類のために役立てたいという純粋な想いが、人工酸素運搬体開発の根源にはある。

1981年、ヘムをポリビニルイミダゾールに結合させた単純な構造の高分子へム錯体が、低温下(-30℃)で酸素を結合できることがわかった。当時の分析技術では、不安定錯体の同定に苦労したことは想像に難くない。間もなく合成高分子に代わり、リン脂質小胞体(リポソーム)が利用されるようになった。ヘムにも高度な化学修飾が施され、1983年、リポソームの二分子膜層間に両親媒性へム(リピドヘム)を包埋したリポソーム-リピドヘムが、初めて生理条件下で酸素を吸脱着できる物質系として完成した。さらに安定構造に改良されたポリ(リポソーム-リピドヘム)は、動物投与試験を可能とし、医学側との協同研究が始まった。ここに完全合成系人工酸素運搬体の潮流が誕生した。ヘム誘導体の精密合成技術は、リピドヘム-マイクロスフェア(1992年)や自己組織化リピドヘムリポソーム(1996年)などの新しい製剤を生み出す原動力ともなった。

1995年、ヒト血清アルブミンの多分子結合能に着目し、疎水ドメインに合成へムを包接させたアルブミン-ヘムを開発した。ニプロ(株)の御協力も得て製剤化が可能となり、動物試験を繰り返しながら、生体内酸素輸送能を詳細に評価した。2004年、遺伝子組換え技術を駆使してアルブミンの中にヘモグロビンのヘムポケット構造を構築、得られた組換えアルブミン-ヘムが分子設計通り酸素結合解離できることを実証した。25年前の"高分子へム錯体"は、部位特異的アミノ酸置換により酸素親和性が調節できる"組換えアルブミン-ヘム"へと進化した。

完全合成系人工酸素運搬体の実現が、人工赤血球開発の最終目標の一つであることは間違いない。現在進めている新しい人工酸素運搬体の展開についても併せて紹介したい。

## シンポジウム(1)-1

血小板の活性化機構:ADPの果たす役割

富山佳昭

大阪大学医学部附属病院輸血部

血小板は直径  $2\mu$ mの円盤状の細胞であり、止血のみならず病的血栓形成に極めて重要な役割を担っている。血小板特有の構造として開放小管系が存在するが、血小板はこの構造を用いて顆粒内物質を効率よく外部に放出する。ADP は血小板濃染顆粒に局在し、血小板  $10^{11}$  個あたり約  $2\mu$  mol 存在しており、in vitro においては比較的弱い活性化物質である。近年、生体内に近い流動下での実験にて動脈血栓形成の分子機構が解明されつつあるが、血小板 ADP 受容体のクローニングも相俟って、生体内での血栓形成における血小板内 ADP の重要性が明らかとなってきた。

血栓形成は,血小板表面の種々の接着分子を介した接着現象であり,血栓形成初期には血小板膜糖蛋白 GPIb-IX と von Willebrand 因子の結合により血小板が粘着し,それに引き続いて血小板膜 GPIIb-IIIa(インテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3)を介して血小板どうしの凝集塊を生じ血栓を形成する.血小板が活性化すると,アラキドン酸からのトロンボキサン  $A_2$ 合成や濃染顆粒からの ADP の放出を生じ,これらの血小板活性化物質は,positive feedback 機構により血小板をさらに活性化し,血栓をより強固にする.血小板上の ADP 受容体として, $G_0$ 蛋白が共役した  $P2Y_1$ と  $G_1$ 蛋白共役  $P2Y_2$ の 2 種類がクローニングされている.演者らは,血小板機能異常症の症例より本邦初の  $P2Y_2$ 欠損例を見出した.この症例では出血時間が延長していたが,身体的な出血傾向は比較的軽微であった.遺伝子異常は  $P2Y_2$ 遺伝子において翻訳開始コドン ATG が AGG に変異する点突然変異のホモ接合体であり,発現実験にてこの変異により  $P2Y_2$ が欠損することを証明した.興味深いことに,全血を用いた流動下でのコラーゲン固相化プレート上の血栓形成実験において,コントロール血に較べ患者血では血栓形成が極めて脆弱で不安定であった.さらに, $P2Y_2$ は GPIIb-IIIa の活性化の維持に極めて重要であることが明らかとなった.以上の成績からも,止血および血栓形成機構において放出 ADP および  $P2Y_2$ を介したシグナルが重要であることが理解できる.さらに  $P2Y_2$ の阻害薬としてクロピドグレルやプラスグレルが臨床に使用されており,メタ解析によりこれら薬剤の優れた抗血栓作用が示されている.以上の成績は ADP と  $P2Y_2$ の結合が血栓形成のセンサーとして機能していると考えられる.

## シンポジウム(1-2

#### 血小板α Ι bβ3 インテグリンの活性化メカニズム

#### 鎌田徹治

#### 慶應義塾大学医学部解剖学

ヒトの血管内で有効な止血血栓が作られるためには、血小板が互いに結合して凝集塊を形成することが必要である.この過程で 最も重要な働きをしているのが,血小板膜表面のαIIbβ3インテグリン(GPIIb-IIIa複合体)と血漿中のフィブリノーゲンの結合で ある、以前から、αIIbβ3は血小板の活性化に伴い、立体構造を変化させてフィブリノーゲンとの結合親和性を高めると考えられて いたが、詳細は不明であった、ところが、2002年に $\alpha$ V $\beta$ 3、2008年に $\alpha$ IIIb $\beta$ 3の結晶構造および高解像度電子顕微鏡像が発表され て以来,インテグリンの活性化メカニズムの解明が一気に進んだ.これらによるとインテグリンのα鎖とβ鎖は,それぞれN末端側 の頭部とC末端側の脚部で構成され、頭部は互いに会合してリガンド結合部を形成する、結晶構造では脚部が途中で折れ曲がり、 頭部を細胞膜側に向けた bent form が観察されたが、電子顕微鏡像ではリガンドペプチド存在下で脚部がまっすぐで頭部を上に向 けた extended form が有意に観察された.以上の結果から,bent form は低親和性であり,extended form は高親和性レセプターで あることが推測され、インテグリンの活性化はbent formから extended formへと立体構造が変化することでおこるとする switchblade theoryが提唱された。しかし、このような構造変化は必要とせず、bent formのままで活性をもつとするdead-bolt theoryも 提唱され,未だに決着を見ていない.我々は分子生物学的手法を用い,構造がbentあるいはextended formに固定でされた変異 αIIbβ3分子を作成し、動物細胞膜上に発現させてフィブリノーゲンとの結合を調べた。その結果、bent form, extended form は それぞれ低親和性、高親和性であることがわかった.一方、 $\alpha IIb \beta 3$ は細胞内シグナル経路の活性化に伴って構造を変化させる.近 年,血小板活性化に伴い,talin などの細胞内分子がlpha IIbeta 3の細胞内ドメインに結合してlpha IIb鎖とeta 3鎖の細胞内ドメイン同士の結 合を解離する結果、活性化がおこることがわかった、しかし、この細胞内の構造変化がどの様にして細胞外に伝達されるのかは明 らかにされていない。我々は、細胞内ドメイン解離によるαIIbβ3活性化は、細胞外の脚部の解離を阻害することにより完全に抑 制されること, 逆に脚部の解離を促進することで活性化がおこることを見いだした. 以上の結果を総合すると, αIIbβ3の活性化は bent formから extended formへと構造を変化する結果おこり、この変化はαIIbβ3細胞内ドメインの解離に引き続いて細胞外の脚 部の結合が解離することによってもたらされると考えられた.

## シンポジウム(1)-3

#### 人工血小板の開発状況

半田 誠

慶應義塾大学輸血・細胞療法センター

有効期間が短くかつ保存条件が厳密で、緊急使用が困難な血小板濃厚液の機能を代替できる人工血小板は、凍結乾燥したヒト血小板由来産物(広義の人工血小板)と、生体適合性に優れたアルブミン微粒子やリン脂質小胞体(リポソーム)、乳酸/グリコール酸共重合体の担体表面にヒトフィブリノゲンもしくはそのペプチドを結合させた人工物(これが、いわゆる狭義の人工血小板)に大別される。すでに、いくつかの試験物が初期臨床試験に供されているが未だ実用化には至っていない。

人工血小板は残存した血小板の機能(主に凝集能)を補助することで、血小板輸血に代わって血小板減少症の止血や出血予防を行う。血小板凝集を仲介する血小板膜受容体蛋白 GPIIb/IIIa のリガンドであるフィブリノゲンは、流血中で血小板と常に接触しているが、その受容体とは結合しない。しかし、血小板が刺激を受けて活性化されると、GPIIb/IIIa の受容体機能が誘導され、フィブリノゲンと結合することで、血小板凝集反応が惹起される。そこで活性化された血小板に特異的に結合する人工物として、大量に純化することが可能なヒトフィブリノゲンを付加したアルブミン微粒子が欧米で複数開発された。

我々は、フィブリノゲンのGPIIb/IIIaへの特異的結合部位が、その $\gamma$ 鎖のカルボキシ末端を構成する12個のアミノ酸配列 ( $^{400}$ HHLGGAKQAGDV $^{411}$ : H12) であることに着目した。そこで、表面結合リガンドとしてヒトフィブリノゲンの代わりにH12合成ペプチドを、担体として血液適合性に優れかつ既に臨床応用がなされているリポソームを使用した完全合成型人工血小板(H12リポソーム、生物材料を一切使用しない)を開発した。さらに、その止血作用を強化する目的で、細胞活性化とともに血小板より放出される生理的な血小板刺激物質のアデノシン2リン酸(ADP)を内包化させた平均直径250ナノメータの人工微粒子(H12 (ADP) リポソーム)を人工血小板のプロトタイプとして最終的に開発するに至った。実際、H12 (ADP) リポソームは活性化した血小板に特異的に結合することで、出血部位に選択的に集積し、血小板凝集を増強するとともに、凝集依存性に内包化されたADPを放出することで、血小板に匹敵する止血効果(出血時間短縮効果)を発揮することが抗がん剤惹起ウサギ血小板減少症モデルで証明された。H12 (ADP) リポソームの利点は、その表面をポリエチレングリコールで修飾することでその血中滞留時間を長く(平均6時間)できることである。人工血小板の開発はすべて欧米のバイオベンチャー主導で行われてきた。したがって、その開発状況や実際の試験結果の詳細は公表されてこなかった。本邦で独自に開発が進められてきたH12 (ADP) リポソームのデータを示して、人工血小板の実用化に向けた課題を述べる。

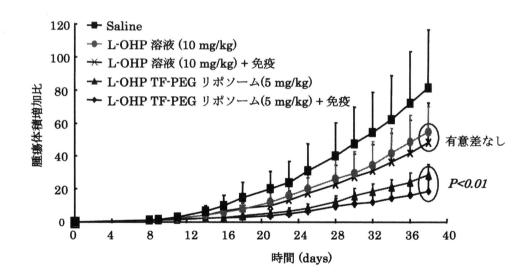
## シンポジウム②-1

#### トランスフェリン修飾リポソームによる細胞内送達と癌治療への応用

#### 丸山一雄

#### 帝京大学薬学部

我々は、リポソーム製剤による化学療法とがん免疫療法の組合せで、治療効果をあげるべく、種々の検討を行っている。PEGリポソーム(PEG-LP)の高い血中滞留特性は、新生血管の発達した固形癌組織への移行量の増大を導き、内封した薬物を高濃度に送達させることが可能である(EPR効果)。PEGの先端にトランスフェリン(TF)を修飾したTF- PEG-LPは、癌組織に移行後、レセプターを介したエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれることから、薬物の癌細胞内送達を可能にした。その応用として、京大原子炉施設と脳腫瘍の治療に向けたボロン中性子捕捉療法の研究を進めている。ボロン化合物自身には腫瘍集積性はないが、TF- PEG-LPの特性によって、必要充分な濃度を送達可能となり高い治療効果が実証された。中性子線発生用の加速器の整備事業が進められる中、ボロン化合物を送達するためのDDSが必要であり、TF- PEG-LPが注目されている。また、単独使用では有効性が認められない抗癌剤オキサリプラチン(L-OHP)をTF- PEG-LPに内封すると、固形癌に対して高い有効性を示した。L-OHP封入TF- PEG-LPは、L-OHP単独使用で見られる骨髄抑制が低く、がん免疫療法の組合せが可能である。Colon26担がんマウスに対して、L-OHP封入TF- PEG-LPによる治療と腫瘍細胞を標的としたDCワクチンによる免疫療法を施したところ、単独による治療効果よりも更に治療効果の高まることが見出され、その有用性が示された。シンポジウムでは、TF-PEG-LP製剤の開発とその癌治療について解説する。現在、L-OHP封入TF-リポソームについては、ベンチャー企業が更なる研究開発を進め、米国に於いて臨床第2相試験を遂行中である。



## シンポジウム(2)-2

#### マルチターゲティングDDSのための温度応答性ブロックコポリマーミセルの構築

#### 中山正道

東京女子医科大学先端生命医科学研究所

近年、効果的かつ戦略的な薬物治療の追求は世界的な重要課題の一つとなっている。ドラッグデリバリーシステム(DDS)は、薬物の標的指向化(ターゲティング)の実現においてナノテクノロジーの効果が最も発揮される領域であり、薬物を標的部位に効率的にデリバリーするための運搬体(キャリア)が精力的に研究されている。ナノサイズの薬物キャリアは、その大きさや表面物性により長時間の血中滞留性を実現でき、固形がん特有の血管透過性の亢進とリンパ系の未発達により、がん部位に集積することが知られている。一方、薬物キャリアが標的部位に集積したのち、超音波などの物理エネルギーを用いて薬物作用をON-OFF制御するインテリジェント型DDSは、薬物の作用部位と作用時間を制御可能とする次世代DDSとして期待されている。外部刺激のなかでも、熱エネルギーの利用は正常組織への低い侵襲性、および医療デバイス側の開発の面からも有望視されている。このように薬物の標的治療効果をさらに向上させるために、複数のターゲティングを巧みに組み合わせ、それぞれの効果を増幅させる"マルチターゲティングDDS"が注目を集めている。

両親媒性のブロック共重合体から形成される高分子ミセルは、その粒径が 10-100 nm ときわめて小さく、疎水性内核には薬物を物理的あるいは化学的に封入することができる。高分子ミセルに抗がん剤を担持させて静脈投与すると、固形がん部位の特性によりがん近傍に薬物内包高分子ミセルが集積しやすいことが知られている。演者は、温度応答性高分子鎖と疎水性高分子鎖からなる分子量制御されたブロック共重合体を合成することに成功し、40 ℃付近を境とする温度変化でミセル外殻が親水性/疎水性と可逆的に性質が変化する温度応答性高分子ミセルを分子設計した。この温度応答性ミセルは培養細胞に対して毒性を示さず、またミセル内核に薬物を封入することで、疎水性抗がん剤の水溶性を飛躍的に改善できることが明らかとなった。標的部位に対する局所加温治療との併用により、標的部位に集積した温度応答性薬物キャリアからの薬物放出の促進、あるいは標的細胞内への薬物キャリアの取り込みが増大するインテリジェント型薬物治療システムの構築が期待できる。

本講演では、温度応答性高分子ミセルの精密分子設計とその特性について紹介するとともに、局所加温治療との併用の可能性について議論する.

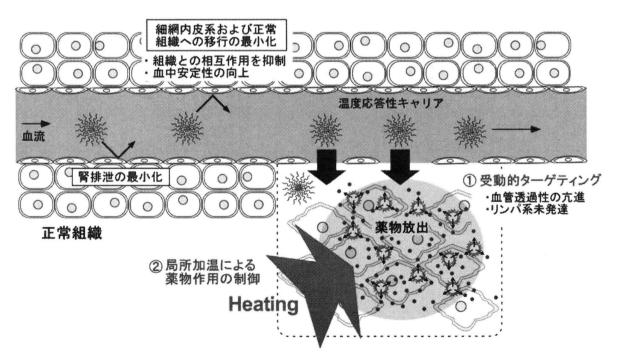


図1 温度応答性薬物キャリアを用いるマルチターゲティング DDS

## シンポジウム②-3

#### リポソーム技術を基盤とする骨髄指向性ナノ医薬品の構築

宗 慶太郎

早稲田大学先端生命医科学センター

リポソームは細胞型人工酸素運搬体としての応用のほか,各種薬物や遺伝子の運搬体としての応用が期待されている。人工酸素 運搬体の研究開発で蓄積されたリポソーム技術を薬物運搬体として応用するため、主に体内動態に注目して検討を進めているので、 その進捗状況を報告したい。

酸素運搬体に利用されるリポソームは大量投与を想定して開発され、薬物運搬体として少量投与で使用される血中滞留性リポソームとは粒子径や脂質組成などで異なる特徴を有している。このリポソームを輸血代替として大量投与(670mg lipid/kg body weight)すると、肝臓、脾臓、骨髄に捕捉され、 $2\sim3$  日程度の半減期で血中から消失する。一方、少量投与(15mg lipid/kg body weight)では数時間以内に血中から消失し、興味深いことに、骨髄への顕著な局在化を認める。

リポソームを構成する脂質組成と体内動態との関連を調べたところ、骨髄への局在化はカルボン酸を有する負電荷脂質でリポソーム表面を修飾することにより誘起されていることが明らかになった。また、少量のポリエチレングリコール(0.6mol%程度)でさらに表面修飾することにより肝臓への取り込が抑制され、骨髄での取り込が受動的に増大する。リポソームを捕捉した骨髄組織切片の電子顕微鏡観察では、多数のリポソームを取込んだ骨髄マクロファージが観測された。これらの結果から、リポソームに導入した負電荷脂質が、骨髄マクロファージとの相互作用に関与して骨髄への取り込が促進されるものと考えられる。この特徴的な体内動態特性を利用して、抗腫瘍薬や造血因子を骨髄に効率的に運搬するためのナノ医薬品の構築を目指している。

疾患モデル動物での検討を進める中で、動物種によりリポソームの初期取り込みにおける臓器特異性が異なることも解ってきている。現在検討中の骨髄指向性リポソームはマウスやラットでは肝臓ないし脾臓に主に捕捉され骨髄の取り込みはあまり顕著でない。一方、ウサギやサルなどより大型動物では骨髄での取り込が顕著に認められる。これらの知見は、治療薬として人工酸素運搬体を少量投与する場合にも共有できると考えられる。

## シンポジウム(2)-4

#### アミノ酸型脂質からなるpH応答性リポソームとナノ医療としての可能性

武岡真司, 甘利拓也

早稲田大学大学院先進理工学研究科生命医科学専攻

リポソームは、その高い血液適合性と比較的容易な表面修飾性、水溶性分子の高い保持能力と、外的な刺激による内包物の放出特性から、薬物運搬体として古くから注目されている。そして、リポソームを構成する脂質成分も生体内での認識や薬物放出の機能に重要な役割を担っている。当研究室では、カチオン性やアニオン性のアミノ酸を親水性頭部とした2本鎖のアミノ酸型脂質からなるリポソームを機能性リポソームとして展開している。

グルタミン酸を1個あるいは2個頭部に持った両イオン性の脂質から成るリポソームは、pHに応じて解離状態が変化する.pHの低下と共にリポソームのゼータ電位が上昇しpHが4.8あるいは5.8付近でマイナスからプラスに転ずる.これに伴って、アニオン性リポソームとの膜融合能が著しく増加する.これらのリポソームに抗癌剤としてドキソルビシン(DOX)をリモートローディング法により内包させ、これをHela細胞に取り込ませたところ、後者の方が核移行したDOX量が高く、細胞増殖抑制が認められた".これは、エンドサイト―シスにて取り込まれたリポソームがエンドソーム内の低pHによってエンドソーム膜と融合し、内包DOXを細胞質へ効率高く放出したためと考察される.そして、そのpH応答性は後者の方が適していたものと思われる.

我々は、このpH応答性リポソームにターゲティング機能を付与するために、表面のPEG鎖を介して乳癌に特異的に抗原 (ErbB2) に対する抗体のFab'フラグメントを結合させた。このpH応答性イムノリポソームをRho-PEにて蛍光標識してErbB2 発 現量の異なる培養系乳癌細胞に取り込ませたところ、ErbB2過剰発現細胞に特異的に結合して効率的に取り込まれ、細胞増殖抑制 効果を示した。また、担癌マウスに DOX を内包させた pH応答性イムノリポソームを投与して、抗腫瘍効果を pH応答性リポソームや DPPC からなるリポソームと比較したところ、高い効果が認められた。アミノ酸型脂質自体の細胞毒性は極めて低く、血液適合性においても問題は認められていない。現在、応答する pHが更に高いアミノ酸型脂質に対して、その評価を同様に行って pH応答リポソームの最適化を行っている。

アミノ酸型脂質は、アミノ酸の組合せの多様性と合成の容易さからその親水部の構造を大きく変化させることができ、多機能が期待できる。ここでは、pH応答性の機能に特化した分子設計を行ったが、カチオン性のアミノ酸型脂質では低細胞毒性で効率の高いトランスフェクション剤としての研究が進んでいるし、更に特定のレセプターや酵素に対する認識能を付与することもできる。アミノ酸型脂質が、リポソームを用いるナノ医療に貢献することを期待している。

本研究の一部は、早稲田大学大学院先進理工学研究科の仙波教授ならびに東京大学医科学研究所山本教授と共同で行われた. <sup>10</sup> Obata, Y., Tajima, S., Takeoka, S., "Evaluation of pH-responsive liposomes containing amino acid-based zwitterionic lipids for improving intracellular drug delivery in vitro and in vivo", *J. Controlled Release*, 142, 267-276 (2010).

## 一般講演-1

#### HbV (liposome encapsulated hemoglobin) 膜への晶質浸透圧、膠質浸透圧作用

三宅誠司1,杉山裕之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】

liposome emulsionと食塩水との混合を行った前回の研究において想定される食塩水希釈が得られず、その原因の一つにliposome 膜の水透過性が想定された。そこで今回liposome emulsionと食塩水を混合し、晶質浸透圧、膠質浸透圧により混合食塩水のNaとClイオン濃度にどのような変化が生じるのか否かをドライケミストリー法オーソ・クリニカル・ダイアグノスティック社製VITOROS250を使用して検討した。

#### 【方法】

前回の研究の際と同様に今回の研究対象としたliposomeの作製にはHbVと同一材料を用い、HbVと同径のliposome粒子内に蒸留水を内包させ、これを蒸留水内に分散させた。

晶質浸透圧に関する研究では2.5%アルブミン液(AS1)0.1mlにliposome 原液(L)0.5mlを混合し、さらに2.5%食塩液0.2mlを混合(L1 -0)、混合0時間値とした。そして混合後可及的速やかにNa,Clの濃度を測定した。次に(L)2.5mlと2.5%食塩液1.0mlを混合し、15分後この混合液の0.5mlと(AS1)0.1mlを混合(L1 -1)、Na,Cl混合15分値として測定した。同様に2時間後、24時間後、1週間後にNa,Cl濃度を測定した。これらの測定は異なる実験日に3回ずつ計15回行い、実測値平均値と標準偏差とを算出した。

膠質浸透圧に関する研究では(L)0.4mlと20%アルブミン液(AS2)0.2mlを混合し、さらに2.0%食塩液0.4mlを混合(L2 -0),混合 0 時間値として可及的速やかにNa,Cl濃度を測定した。次に(L)1.2mlと2.0%食塩液1.2ml,(AS2)0.6mlを混合(L2 -1),その 5 分後,15 分後,180 分後のNa,Cl濃度を測定した。これらの測定は異なる実験日に 3 回ずつ計15 回行い,実測値平均値と標準偏差とを算出した。

#### 【結果】

晶質浸透圧の研究でのNa値についてL1 -0の0分値は $107.5 \pm 0.7$  mEq/L,L1 -1の15分後で $108.2 \pm 0.6$  mEq/L,2 時間後で $108.2 \pm 0.6$  mEq/L,24時間後では $108.3 \pm 0.7$ mEq/L,1 週間後で $108.4 \pm 1.0$  mEq/L であった.Cl値について L1 -0の0分Cl値は $106.0 \pm 0.7$  mEq/L,L1 -1の15分後で $106.0 \pm 0.8$ mEq/L,2 時間後で $106.1 \pm 0.7$  mEq/L,24時間後Cl値は $106.5 \pm 0.8$  mEq/L,1 週間後Cl値は $106.3 \pm 0.7$  mEq/Lであった.なお,L1 -0での食塩液混合から測定値提示までの時間は $3.07 \pm 0.03$ 分であった.

膠質浸透圧の研究でのNa値についてはL2 - 0の0分値が149.3 ± 1.3mEq/L, L2 - 1の5分後で149.4 ± 1.2 mEq/L, 15分後で149.3 ± 1.1 mEq/L, 3時間後で149.1 ± 1.2mEq/Lであった。Cl値についてはL2 - 0の0分値で139.9 ± 1.0 mEq/L, L2 - 1の5分後で139.5 ± 1.5mEq/L, 15分後で139.3 ± 1.2mEq/L, 3時間後で138.9 ± 1.2mEq/Lであった。なおL2 - 0でのアルブミン液混合から測定値提示までの時間は2.61 ± 0.22分であった。

#### 【考察】

アルブミン添加リポソーム液の電解質濃度測定での晶質浸透圧による影響でNa値,Cl値のL1-1の15分後,2時間後,24時間後,1週間後の測定結果においていずれも初期L1-0データから時間経過による変化を示さずliposomecrit を考慮した予測値より低値となった。したがってliposome内部の水分画の外部への移行は少なくとも3分以内に生じていたことを示した。なお同様に,膠質浸透圧の影響は少なくとも4%アルブミンとの接触3時間以内では認められなかった。したがって前回の測定値に膠質浸透圧の影響が存在することは否定された。しかしさらなる長時間の観察の必要性は認められる可能性があった。

#### 【結論】

以上の結果から、前回の研究で認められた予想値を超える電解質濃度の低下は、晶質浸透圧によるliposome膜を介する水分子の外液への移動によると結論することが出来た。

## 一般講演-2

#### ラットの in vivo での抗原特異的な二次免疫応答に対するヘモグロビン小胞体(HbV)投与の影響

高橋大輔1, 東 寛1, 藤原満博1, 酒井宏水2, 堀之内宏久3, 小林紘一3, 池田久實1

<sup>1</sup>北海道赤十字血液センター,<sup>2</sup>早稲田大学総合研究機構バイオサイエンス連携研究所,<sup>3</sup>慶應義塾大学医学部呼吸器外科

【目的】へモグロビン小胞体(HbV)は,高純度濃厚ヘモグロビン溶液を脂質二分子膜に包埋し,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,ラットを用いたHbV の免疫系に及ぼす影響の一連の検討において,HbV 投与により脾細胞の非特異的刺激(concanavalin A; ConA)に対する増殖反応が一過性に低下することを明らかとしている.さらに,特異抗原として keyhole limpet hemocyanin(KLH)を感作したラット脾細胞において HbV 投与後,KLH に対する in vitro での増殖反応が ConA 刺激の場合と同様に一過性に抑制されることをみいだしている.そこで KLH 感作ラットにおいて,二次免疫反応である抗KLH-IgG および IgM 抗体産生が,HbV 投与によって影響されるか否かについて検討した.さらに,KLH 感作ラットに HbV を投与後に KLH で再刺激した場合,KLH に対する脾臓メモリー T細胞の増殖能が維持されるかについて検討を試みた.

【方法】(1) KLHの免疫、WKAHラットに一次免疫用KLHを0.1mg/0.2ml/ratで皮下注した。2週間後に、HbVまたは対照の生理食塩水を全血液量の20%にて尾静脈から輸注した。HbV投与16時間後に、二次免疫用KLHまたは生理食塩水を0.1mg/0.2ml/ratで皮下注した。二次免疫後、1、3、5、7日に採血し、血漿を抗体濃度測定まで凍結保存した。(2) 抗KLHラット IgGおよび IgM抗体濃度の測定には、レビスKLHラット-IgGおよびIgM ELISA KIT(シバヤギ、群馬)を用いた。(3) Tリンパ球増殖反応。2度目のKLH刺激後、3-4ヶ月後に脾臓を摘出した。RPMI-1640/FCS/2-MEに懸濁した脾細胞を、丸底96wellプレートに2X10⁵個/wellで分注し、ConAまたはKLHを添加した。培養72時間後、各wellに18.5kBqの³H-デオキシチミジン(10ul)を添加し、その24時間後にセルハーベスターにて細胞を回収した。細胞DNAに取り込まれた³H-デオキシチミジン量は液体シンチレーションカウンターにて測定した。ConA終濃度は、0、0.3、3ug/ml、KLH終濃度は、0、1、3、10、30mg/mlとした。【結果】(1) HbV投与によって、KLH感作ラットの二次免疫反応である抗KLH-IgGおよび IgM抗体産生の抑制を認めなかった。(2) KLH感作ラットにHbV投与16時間後にKLH刺激をおこなった群から、3-4ヶ月後に摘出した脾臓のT細胞は、KLH刺激に対し対照群と同等な増殖反応を示した。

【考察】ラットのKLHに対するin vitroでの二次免疫応答(細胞増殖)にはHbV 投与による一過性の抑制がみられるのに対し、KLH抗体産生にみられるin vivoでの二次免疫応答には影響しないことがみとめられた。さらにIn vivoにおける二次刺激後も、KLH特異的メモリーT細胞が長期にわたって存在していることが確認できた。これらのことから、HbV はラットの免疫応答に影響を及ぼさないことが示唆される。

## 一般講演-3

#### ラット希釈性貧血モデルに対する一酸化炭素ヘモグロビン小胞体投与の効果

勢司泰久<sup>1</sup>, 堀之内宏久<sup>1</sup>, 酒井宏水<sup>2</sup>, 小林紘一<sup>1</sup>

1慶應義塾大学医学部呼吸器外科、2早稲田大学バイオサイエンスシンガポール研究所

【緒言】昨年は、ヘモグロビン小胞体(HbV)を約95%の血液交換に相当するラット継続出血モデルへ適用した場合の有効性について報告した。しかし蘇生液が大量に必要であった為、現在は投与量抑制及び生存時間延長について検討を進めている。その過程で、HbVの製造中間体である一酸化炭素HbV(COHbV)を貧血モデルに投与したところ、一酸化炭素ヘモグロビン(COHb)から一酸化炭素(CO)が比較的容易に解離し、酸素運搬能を回復する所見が得られたので報告する。

【方法】ラットを自発呼吸下セボフルラン吸入にて麻酔し、動静脈を血圧測定、採血(脱血)、輸液用に確保した。ヒドロキシエチルデンプン70000を用いて等量同時血液交換(容量80mL/kg,速度56mL/kg/hr)を課し、希釈性貧血モデルを作製した。希釈終了時の平均血圧は約55mmHg、ヘマトクリット(Ht)は約8%、ヘモグロビン(Hb)濃度は約3g/dLであった。続いて蘇生液として生理食塩液(10mL/kg)、COHbV(COHb = 66%、10及び15mL/kg)、人工肺1回通過で純酸素暴露した1回暴露COHbV(COHb = 38%、15及び20mL/kg)、人工肺2.25hr循環で純酸素暴露した酸素置換COHbV(COHb = 0%、15mL/kg)を投与し、投与後3hrまで経時的に測定、採血を行い、血液ガス分析装置を用いてHb構成比等を分析した。更に、抜管閉創して覚醒させ、生存時間を検討した。

【結果】COHbV 及び 1 回暴露 COHbV を投与した群では COHb 比が上昇し、その後は経時的に低下、酸素  $(O_2)$  Hb 比が上昇した.一方、酸素置換 COHbV を投与した群の COHb 比は交換終了時よりも低下した.また、COHbV 及び 1 回暴露 COHbV 投与によって上昇した乳酸値も  $O_2$ Hb の増加に応じて低下傾向を示し、酸素運搬能の回復が認められた.更に、15mL/kg以上の投与群では、投与後 24hr の Ht が約 9 %にも拘らず、生存例が認められた.

【考察】血液製剤使用指針では、 $Hb \leq 6$  g/dLが適用の目安とされる。今回、Hb = 3 g/dLの貧血モデルに投与した結果、15mL/kg以上のCOHbV及び酸素暴露COHbV 投与群では、投与後24hr以上生存する例が現れ、改善効果が認められている。COは有毒ガスとして一般に認知されているが、近年、COW入による抗炎症作用など、組織保護効果が報告されている。また、COHbは安定性に優れる他、Hbのメト化を抑制する為の高度な脱酸素環境維持の軽減が可能であり、人工酸素運搬体の備蓄保存性の向上が期待される。一方、人工心肺装置を流用することで、容易に酸素化することが可能である為,CO 投与が好ましくない状況にも対応可能である。以上よりCOHbV は多くの利点を持つ輸液剤として有用と考えられる。

## 外傷性大量出血時の大量輸血に伴う血小板減少病態時の人工血小板 H12 (ADP) liposome による止血制御効果

西川可穗子¹,木下 学², 萩沢康介³,庄野 聡²4,勝野俊介⁵,宮崎裕美ө,小野 聡ө,斎藤大蔵ө,関 修司²,阪本敏久¹

<sup>1</sup>防衛医科大学校救急部, <sup>2</sup>防衛医科大学校免疫微生物, <sup>3</sup>陸上自衛隊部隊医学実験隊, <sup>4</sup>防衛医科大学校防衛医学,

外傷性大量出血時の大量輸血では血小板減少を伴う出血傾向が増悪し止血制御をより困難にする。その結果,更なる輸血が必要となり,負の連鎖が増大し,最終的に大量失血で死に至ることが少なくない。H12(ADP)liposome はfibrinogen γ鎖C末端(H12)を担持させたliposomeで,出血部位に存在する活性化血小板同士を架橋すると共に内包 ADP を放出し血小板凝集を促進することで血小板代替物として止血効果が期待される。外傷性大量出血と輸血に伴う血小板減少モデルを作製し,H12 liposome による止血制御を検討した。

【方法】家兎の大腿動静脈より脱血と洗浄赤血球輸血を繰り返し(計約200mL), 急性血小板減少モデルを作製した. これにH12 liposome を投与し, 耳介出血時間や外傷性肝損傷後の予後と出血量への影響を血小板投与群 (plate rich phase:PRP群), 血漿投与群 (plate poor phase:PPP群) と比較した.

【結果と考察】脱血・輸血により血小板の低下と(<6×10<sup>4</sup>/μL),耳介出血時間の顕著な延長(>10min)を認めたが,H12 liposome 投与で,PRP投与時と同程度の出血時間短縮が認められた。肝損傷後の予後は,PPP群で10例中9例が出血死したがH12 liposome 群ではPRP群と同様に全例救命し得た。肝損傷後の出血量および臓器止血時間は,H12 liposome 群ではPRP群と同様にPPP群に比し出血量の明らかな減少と臓器止血時間の短縮を認め,高い止血効果が示唆された。肝損傷2日後の肺,肝,腎の組織学的検討ではH12 liposome 投与による血栓形成などは認められなかった。

【結語】脱血・輸血による急性血小板減少モデルにおいて外傷性肝損傷を作製した。PPPの投与ではほとんどが出血死したが、H12 liposome 投与により PRP 投与と同程度の止血救命効果が得られた。H12 liposome 投与後の肺、肝、腎の組織においても血栓形成など特異な変化は観察されず、H12 liposome による外傷性大量出血時の輸血に伴う血小板減少病態時の止血制御への有用性が示唆された。

<sup>5</sup>早稲田大学先進理工学部,6防衛医科大学校外傷研究部門

## シミュレーションによる人工赤血球動態の流体力学的考察

百武 徹

横浜国立大学大学院工学研究院

【緒言】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、ヘモグロビンをリポソームに封入したカプセル型人工赤血球の開発が進められている。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、微小循環系での人工赤血球の利用を考えた場合、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人工赤血球動態を解明するためには、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。

【方法】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た。また、赤血球に関しては、Immersed boundary methodを用いて赤血球の変形を計算した。赤血球集合に関してカットオフ半径内において赤血球表同士に Morse potential が働くと考え、赤血球集合現象を再現した。直径20 $\mu$ mの微小血管を考え、そこに赤血球と人工赤血球の混在した流れを作り、人工赤血球がどのような挙動を示すのかを調べた。

【結果及び考察】解析の結果、赤血球の変形に伴う軸集中および血漿層の形成が再現できた。集合モデルでは赤血球が集合体を形成し、管中心部を流れる様子が見られた。さらに、人工赤血球に置換することにより、血漿層はさらに厚くなり、この血漿層部分に人工赤血球が多く分布するようになった。これは赤血球の軸集中により人工赤血球が管壁へと移動した結果であり、この管内分布の違いが微小血管系における各粒子の流動特性に大きな影響をもたらすと考えられる。

## ヘモグロビン小胞体の出血性ショックモデルラットにおける大腸菌増殖抑制効果

田口和明1, 渡邊博志1.2, 酒井宏水3, 堀之内宏久4, 小林絋一4, 丸山 徹1.2, 小田切優樹1.5

<sup>1</sup>熊本大学大学院薬学教育部,<sup>2</sup>熊本大学薬学部附属育薬フロンティアセンター,<sup>3</sup>早稲田大学バイオサイエンスシンガポール研究所, <sup>4</sup>慶應義塾大学医学部,<sup>5</sup>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)は事故や術中の大量出血時における臨床使用が期待されている。事故などの外傷時には、受傷数日後の感染による死亡が問題となっており、この感染を低下させることは、患者の致死率の低下に繋がる。これまでに当研究室では、出血性ショックモデルラットをHbVで蘇生することで投与3日~5日後に補体活性が上昇することを見出している。補体は病原体に対する生体防御に重要な役割を有しており、その生物活性の1つとして溶菌作用がある。そのため、HbV投与により、病原体感染を抑制する可能性は十分に考えられる。そこで本研究では、出血性ショックモデルラットに対するHbVまたは洗浄赤血球(RBC)の蘇生が大腸菌感染に及ぼす影響について検討した。

#### 【方法】

出血性ショックモデルラットは、全血液量の40%を脱血することにより作製し、HbVまたはRBC(1400mg Hb/kg)で蘇生した。蘇生 4 日及び 7 日後に血漿を回収し、in vitro において大腸菌(E.Coli ATCC株)の菌増殖実験を行った。脾臓摘出処置は出血性ショック誘起 5 日前に行った。また、敗血症モデルラットは盲腸に注射針で穴を空ける Cecal ligation and puncture モデルを用い評価した。

#### 【結果及び考察】

## 出血性ショックモデルラットにおける一酸化炭素結合型赤血球のチトクローム P450 保護効果

大柿 滋1,田口和明1,渡邉博志1.2,小田切優樹1.3,丸山 徹1.2

<sup>1</sup>熊本大学大学院薬学教育部, <sup>2</sup>熊本大学薬学部附属育薬フロンティアセンター, <sup>3</sup>崇城大学薬学部

### 【緒言】

大量出血に伴う輸血施行時には虚血再灌流障害が生じる事が知られている.虚血再灌流時では薬物代謝の一端を担うチトクローム P450 (CYP) の発現が影響される.したがって輸血施行に伴う薬物治療に際して,CYPの安定化が求められている.ところで,一酸化炭素(CO)はヘムタンパクの安定化への寄与や細胞傷害を軽減することから虚血再灌流時における CYP 破壊を保護する可能性が考えられる.そこで本研究では,出血性ショックモデルラットを用いて,COのCYP 保護効果を検討した.その際,COキャリアーとして輸血で用いられる赤血球(RBC)を用い,CO結合型 RBC(CO-RBC)の有用性を検討した.

#### 【方法】

全血液量の40%を脱血することで出血性ショックモデルラットを作製した. 等容量のRBC またはCO-RBC により蘇生し、蘇生 1 時間後に肝ミクロソーム画分を遠心分離した. 肝CYP発現量はウェスタンブロット法により検討した. また、クッパー細胞阻害 実験はクッパー細胞不活剤であるガドリニウム塩酸塩( $GdCl_3$ )を出血性ショックモデル作製24時間前に腹腔内投与(10mg/kg)し、同様の検討を行った.

#### 【結果及び考察】

未処置ラット群と比較して、RBC蘇生群では蘇生後 1 時間における肝CYP 発現量が有意に低下した。一方、CO-RBC 蘇生群では発現量の維持が観察された。そこで、このCYP 保護メカニズムを解明するために、CO-RBC 蘇生が虚血再灌流時に活性化される肝クッパー細胞に及ぼす影響を検討した。GdCl3 処置後、出血性ショックモデルラットにRBC またはCO-RBC 蘇生を行ったところ、両群とも蘇生後 1 時間における肝CYP 発現量の低下は観察されなかった。これらの結果より、大量出血に伴う RBC 輸血ではクッパー細胞の活性化により肝CYP 発現の低下が起こることが判明した。またその機序として、COがクッパー細胞活性化を抑制することで肝CYP 保護の役割を担っているのではないかと推察された。以上より、CO-RBC がCYP 保護の観点から大量出血時における蘇生剤として有用である可能性を初めて提示することができた。

## α,-酸性糖タンパク質は S-ニトロソ化により抗菌活性を獲得する

渡辺佳織1,異島 優1,末永綾香1,渡邊博志1,2,甲斐俊哉1,3,丸山 徹1,2,小田切優樹1,4

「熊本大学大学院薬学教育部、『熊本大学薬学部附属育薬フロンティアセンター、『ニプロ株式会社医薬品研究所、4崇城大学薬学部

### 【緒言】

代表的な急性期タンパク質である $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質(AGP)は,F1\*S体と A体という二つのvariantが生体内に約2~3:1の割合で存在しているが,その機能的差異に関する報告はリガンド結合能に止まっている.これら両バリアントのアミノ酸配列の違いの一つに,A体のみが持つ149番目の遊離型システイン(Cys-149)残基がある.我々は,本残基が急性期に増加する一酸化窒素(NO)の標的分子になり,S-ニトロソ化されることで炎症時に生物機能を発揮しているのではないかと仮説を立て,このことを実証すべく,本研究では,A体のCys-149がS-ニトロソ化されたSNO-AGPを初めて作製し,本修飾体の生物活性を明らかにするために,他のS-ニトロソ化タンパク質で報告されている抗菌作用について評価した.

#### 【方法】

AGPと S-Nitrosoglutathione(GS-NO)を37℃にて反応させ、SNO-AGPを作製した. 抗菌作用はグラム陽性菌である枯草菌(B. subtilis)、化膿性溶血性連鎖球菌(S. pyogenes)、グラム陰性菌である緑膿菌(P. aeruginosa)や大腸菌(E. coli)、サルモネラ属の細菌であるネズミチフス菌(S. typhimurium)を用いた. M9培地中で、各種細菌をOD $_{630}$  = 0.05 ± 0.01に調製し、各RS-NOsを培地上清に加え、37 $^{\circ}$ 、9 h 反応後のOD $_{630}$ を測定した. この値を、PBSを加えた群と比較することで濁度率(%)を算出し、抗菌活性を評価した.

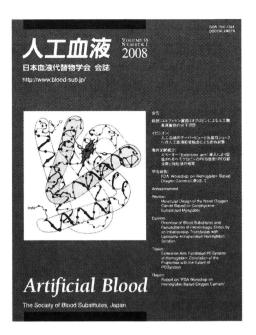
#### 【結果及び考察】

 $In\ vitro$  及び細胞系のデータではあるものの、今回初めて SNO-AGP が生成することを見出した。また、AGP は S-ニトロソ化により抗菌活性を新たに獲得することが判明した。種々の細菌を用いた検討から、SNO-AGP は広域な抗菌スペクトルを有することが明らかとなった。抗菌活性を菌の増殖阻害濃度で評価したところ、低分子の GS-NO では数 mM、ヒト血清アルブミンのような血清タンパク質の SNO 体では、数  $\mu$  M ~数十 $\mu$  M であったのに対して、SNO-AGP は数十 nM という極めて低濃度で菌の増殖を阻害した。興味深いことに、SNO-AGP の抗菌活性はこれまで報告されている SNO 化タンパク質の中で最も強力であった。これらの結果と、急性相反応物質である AGP が炎症時に著しく増加することを考え合わせると、SNO-AGP が炎症時における内因的な抗菌作用の一端を担っている可能性が示唆された。SNO-AGP のユニークな抗菌活性を創薬学的アプローチに応用することで、新たな抗菌剤や抗菌補助剤の開発に繋がる可能性が期待される。

# **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.



# 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.

人工血液 Vol. 18, No.2, 2010

- 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,  $\mu$  m, L, mL,  $\mu$  L, mol, g, mg,  $\mu$  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: <sup>2)</sup>, <sup>3.5)</sup>, <sup>1.46)</sup>, 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:

- 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.
- 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 or 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: Artificial Blood Editorial Office
  The Society of Blood Substitutes, Japan
  Division of General Thoracic Surgery, Department of Surgery,
  Keio University, School of Medicine
  35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan
  Tel: +81-3-5363-3493 Fax: +81-3-5363-3499
  E-mail: amorjsbs@sc.itc.keio.ac.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。論文の版権は本学会に譲渡しなければならない。このため、著者の代表者は、本誌に添付の著作権譲渡同意書(Copyright Transfer Agreement)或は、本会のホームページサイト(http://www.blood-sub.jp/home/index.html)からダウンロードしたものに署名捺印の上、郵送、Fax、またはpdfファイルとしてE-mailにて編集委員会宛に提出する。

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

- 1) 原稿の種類は、「原著論文」、「総説」、「学会報告」、「トピックス」、「オピニオン」、「海外文献紹介」から選び、これを第1頁の右肩上に明記すること。これらに該当しない原稿も受け付ける。査読意見によっては種類が変更される場合がある。次のいずれかの方法により、送付状(任意のフォーマット)を添えて編集委員長宛に投稿する。
  - i) 文章と図表の電子ファイルをE-メールで送付する (使用したソフトを明記すること). 文章・表のファイル形式は, doc, txtが好ましい. 図は, ppt, jpg, tiffが好ましい.
  - ii) ハードコピー4部を郵送する.
- 2)投稿論文の査読は、編集委員長が選んだ人工血液分野の研究者に依頼する、査読意見によっては、原稿の修正を求める場合がある、修正論文(Revised Manuscript)の投稿に際しては、送付状に「査読意見に対する回答」を添え、意見に対して一つ一つ回答をするとともに、修正箇所がある場合にはこれを明記する。
- 3) 掲載決定通知の後,著者は採択論文の文章・図表のファイルを電子媒体として,指定する宛先に送付すること (使用したソフトを明記すること).文章・表のファイル形式は,doc,txtが好ましい.図は,ppt,jpg,tiffが好ましい.
- 4) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著

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

- 5)「原著論文」,「総説」,「トピックス」,「オピニオン」については,第2頁以降に和文抄録,Keywords(英文で6個程度)を付け、最終頁または別紙に英文抄録を付けること.
- 6)投稿論文に記載の研究が公的助成を受けて実施された場合には、謝辞にその旨を記載すること。また、Conflict of Interests (例えば、論文に記載された薬品を販売する企業と著者との利害関係: 雇用、コンサルタント、研究助成、株式、特許など)があれば、これを第1頁の脚注、謝辞などに記載すること。
- 7) ヒトを対象とした研究結果、および動物実験の結果を掲載する場合には、各研究機関のガイドラインに従って実施したことを方法等に明記すること.
- 8)論文中の略語は初出の際に省略しないこと、薬品、医薬品、測定装置等は、外国語名の場合は言語のまま用い、日本語化しているものはカタカナとする、型式、販売(製造)元とその所在地も記入すること。
- (例) Rhodamine B (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), ポリグラフシステム (LEG-1000; 日本光電工業, 東京)
- 9) 句読点はコンマ(,) ピリオド(.) とする.
- 10) 文中の英語に使用するフォントは、Times, Helvetica, Courier, Symbolを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめること。
- 11) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm,  $\mu m$ , L, mL,  $\mu L$ , mol, g, mg,  $\mu g$ , 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2,35,1.46 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.
- 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, あらかじめ版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無いが,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

〒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 日本血液代替物学会 会誌「人工血液」編集部 宛 電話:03-5363-3493, FAX:03-5363-3499

E-mail: amorjsbs@sc.itc.keio.ac.jp

# 人工血液

日本血液代替物学会会誌

# Artificial Blood

The Official Journal of The Society of Blood Substitutes, Japan

日本血液代替物学会 会長 小林 紘一殿 To: Dr. Koichi Kobayashi President The Society of Blood Substitutes, Japan

日本血液代替物学会 会誌「人工血液」に投稿した論文

表題							
Manuscript Title:							
Am In the Market of Market			٠	. II	***	184600	t=n)
につきまして, 倫理規定に準拠した ことを誓約いたします. なお, 掲載							
I attest that the content of the ab the journal of the Society of Bloo been confirmed by all coauthors. V	d Subst	itutes,	Japan,	conform	ns to ethi	ical standa	rds and has
	平成	年	月	日			
	Date:						
代表著者(署名) Corresponding Author(Si	gnature	)				* ;	
連絡先 Contact Address:							

(本用紙はコピーしたものを使用されても結構です.) This form may be photocopied for use.

日本血液代替物学会 会誌「人工血液」編集部 〒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 E-mail:amorjsbs@sc.itc.keio.ac.jp

Artificial Blood Editorial Office
The Society of Blood Substitutes, Japan
Division of General Thoracic Surgery, Department of Surgery, Keio University, School of Medicine
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan
Tel: +81-3-5363-3493 Fax: +81-3-5363-3499 E-mail: amorjsbs@sc.itc.keio.ac.jp



85





		м Е	МО			
	**					
 				······································		,
100						

### 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.18(2) 2010年9月24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 〒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 〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7 TEL (03) 3265-8961 FAX (03) 3264-1995

M E M O