

人工血液

第 18 卷 第 4 号 2011 年 3 月

目 次

会告	126
In Memoriam:	
Memorial for Professor Eishun Tsuchida	127
原著	Effects of crystalloid and colloid osmotic pressure on HbV (liposome encapsulated hemoglobin) membraneSeiji Miyake 他 128
総説	リポソーム技術を基盤とする骨髄指向性薬物送達キャリアー宗慶太郎 134
	バイオ医薬品におけるプリオンの問題 ーヒト赤血球を原料とする人工酸素運搬体をめぐる問題ー柚木 幹弘 他 142
トピックス	
血小板の活性化機能：ADPの果たす役割富山 佳昭 151	
事務局たより	154

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 18 No. 4 March, 2011

Contents

Announcement	126
In Memoriam:	
Memorial for Professor Eishun Tsuchida	127
Original Article:	
Effects of crystalloid and colloid osmotic pressure on HbV (liposome encapsulated hemoglobin) membraneSeiji Miyake, et al. 128	
Review: Bone Marrow-Targeted Drug Delivery Carriers Based on Liposome Technology	Keitaro Sou 134
Current Situation of Prion Risks on Biological Products - Points on the Consideration for Prion Risk in Artificial Blood Products Derived from Human Red Cells -Mikihiro Yunoki, et al. 142	
Topics : Molecular mechanism for platelet activation: a role for ADPYoshiaki Tomiyama 151	

会 告

第18回日本血液代替物学会年次大会

期 日： 2011年10月27日（木）～ 28日（金）

会 場： 北海道大学医学部学友会館フラテ（札幌市北区北15条7丁目）

大会長： 米川 元樹（特定医療法人北楡会 札幌北楡病院 理事長）

テーマ： 「血液代替物実用化を促進させよう」

【特別講演】

- ・ iPS細胞から血小板を作る（仮題）
- ・ 酸素はわれわれに善玉か悪玉か（仮題）
- ・ 血液代替物の歴史と現状（仮題）

【教育講演】

- ・ 臨床治験について（仮題）
- ・ リポソームの組成とその組織親和性（仮題）

【シンポジウム】

- ・ 人工酸素運搬体の実用化を促進するためには
- ・ 虚血灌流障害と酸素運搬体

【一般演題】

【ランチョン】

演題募集締切： 2011年7月末日

※ 演題募集はホームページにて行います。その他詳細につきましても
ホームページ上でお知らせする予定です。

<http://sbsj2011.jp>

大会事務局（連絡先）：

〒003-0006 札幌市白石区東札幌6条6丁目5-1

特定医療法人北楡会 札幌北楡病院

TEL: 011-865-0111 FAX: 011-863-5553

E-mail: sbsj2011@hokuyu-aoth.org

担当：津島

Memorial for Professor Eishun Tsuchida

Eishun Tsuchida (Professor Emeritus, Waseda University) passed away on April 25, 2010 at the age of 79 years. I first met him in the 1980's when he presented his research in an international congress and I have been impressed ever since with his research, development and contribution to the area of blood substitutes. We have developed a very close research and collegial friendship and it is with great sadness that it has to come to an end.

Professor Tsuchida obtained his PhD from Waseda University in 1963, and rose rapidly from assistant, lecturer, assistant professor to his professorship appointment in 1973. His pioneering research led to the establishment of a new field of "macromolecular complexes as functional material systems". He held important positions in the Chemistry Society of Japan and The Society of Polymer Science, Japan. Examples of his many awards and prizes included the Purple Ribbon Medal in 1998, and the Grand Cordon of the Sacred Treasure in 2004. His most important life's work is in the area of blood substitutes. He reported in 1983 his research in this area on "Electronic process control of macromolecular complex" and "Molecular assembly science". His novel reversible aqueous oxygen complex (lipid-heme) that can carry oxygen similar to that of red blood cell is another first in the world. This research was recognized by awards from the Chemical Society of Japan (1986), Ohkuma Memorial Academic Award (1987), Fat and Oil Excellent Technology Prize (1989), Macromolecular Science Achievement Prize (1991), and the Avogadro-Minakata prize (1995). In collaboration with the late S. Sekiguchi (Hokkaido Red Cross Blood Center) and Professor K. Kobayashi (Keio University), Dr. Sakai (Waseda University) and many others, he develops a human hemoglobin liposome blood substitute towards clinical application. Together they organized the Society of Blood Substitutes of Japan in 1993 and he acted as its first chairman. He interacted closely with me and other researchers around the world and contributed tremendously to the international efforts in this area and the International Society for Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology. In addition to acting as one of the associate editors of our journal he also organized and chaired in Japan the 1997 7th International Symposium on Blood Substitutes (7-ISBS) and the 2003 9th International Symposium on Blood Substitutes (9-ISBS). In 1997 he received major research support for 6 years on blood substitutes from The Ministry of Health and Welfare (current Ministry of Health, Labour and Welfare). In 2001, he became an Emeritus Professor and launched the "Oxygen Infusion Project" of the Advanced Research Institute for Science and Engineering, Waseda University. With this he actively interacted with academics and industries to develop this work towards clinical use. This was close to its aim but Professor Tsuchida did not see its final completion and use. His colleagues Professor Kabayashi, Dr. Sakai and others are continuing with this effort towards the clinical use of this important project.

All researchers and developers in the area of blood substitutes have lost an important researcher, pioneer and friend. My personal research and collegial friendship with him for the last 30 years has also regretfully come to a close. However, his enormous contribution and his friendship will always stay with us all, both in Japan and all over the world.

Professor Thomas Ming Swi Chang, OC., MD, CM, PhD, FRCPC, FRSC
Director, Artificial Cells & Organs Research Centre
Departments of Physiology, Medicine and Biomedical Engineering
McGill University, Montreal, Quebec, Canada
Honorary President and Editor in Chief
International Society for Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology
11 Jan 2011, Montreal, Quebec, Canada

Effects of crystalloid and colloid osmotic pressure on HbV (liposome encapsulated hemoglobin) membrane

Seiji Miyake ^{(1) #}, Hiromi Sakai ⁽²⁾, Masuhiko Takaori ⁽³⁾

Abstract

To clarify the unexpected decrease in electrolyte concentrations of saline mixed with liposome vesicle emulsion observed in previous studies, the same liposome vesicles were emulsified into 0.625 g% saline containing 0.4 g% albumin. Then Na and Cl ion concentrations were measured serially at 0, 15, 120 min, 24 and 168 hr, respectively, in Exp. 1. The measured values were within $107.5 \pm 0.7 \sim 108.4 \pm 1.0$ mEq/L for Na ion and $106.0 \pm 0.7 \sim 106.5 \pm 0.8$ mEq/L for Cl ion. These values were most comparable with the predict-1 value, which was calculated on the assumption that water permeates the liposome membrane freely. Results show that water permeation had been completed within at least 3.07 ± 0.03 min after the vesicles contacted with the saline. In Exp. 2, the liposome vesicles emulsified in 0.8 g% saline were mixed with 4 g% albumin solution. Then Na and Cl ion concentrations in the mixture were measured serially at 0 (detected time of 2.61 ± 0.03 min), 5, 15, 180 min after mixing, respectively. The Na and Cl ion concentrations were within $149.1 \pm 1.2 \sim 149.4 \pm 1.2$ mEq/L and $138.9 \pm 1.2 \sim 139.9 \pm 1.0$ mEq/L, respectively. No significant change was observed in either Na or Cl ion concentrations within 3 hr after mixing. Those results showed that colloid osmotic pressure associated with albumin in the saline did not contribute to the water permeation observed in Exp. 1. Therefore, results show that the unexpected decrease in electrolyte concentration of saline mixed with liposome emulsion observed in the previous study resulted from efflux of inside water of liposome vesicles induced by crystalloid osmotic pressure.

Keywords

liposome, phospholipid membrane, permeability, osmotic pressure, crystalloid, colloid, water efflux, artificial oxygen carrier, hemoglobin based

1. Introduction

We reported interference with a hemoglobin-based oxygen carrier (HbV, prepared by encapsulation of hemoglobin solution with liposome membrane) on electrolyte ion measurements using polarography in our previous study¹⁾. In that study, the electrolyte concentrations were determined using a wet method (TBA-200FRNEOTM; Toshiba Medical Systems Corp., Ohtawara, Tochigi, Japan), which showed limited performance when the HbV was mixed at lower volume rates. To explain the limitation, we prepared emulsions of liposome vesicles in which distilled water was encapsulated. Then we observed the interference with liposome vesicles per se on measurements of electrolyte (Na

and Cl) ion concentrations by comparing results obtained using wet and dry methods²⁾. Results show that liposome vesicles alone never interfere with polarographic measurements of electrolyte ion concentrations when using the W method. In the study, however, we observed lower electrolyte ion concentrations in the mixture of the liposome emulsion than those predicted, particularly when the mixing rate of the emulsion in saline was at 1:1 but not less. Some possibilities were proposed. Among them, it was strongly presumed that water inside of liposome vesicles diffused out through the liposome membrane by osmosis because the liposome membrane had been documented as a semipermeable membrane by Chang³⁾. Therefore it was

(1) Osaka Prefecture Saiseikai Noe Hospital, 2-2-33 Higashi-Imahuku, Jyotou-ku, Osaka 536-0002, Japan

(2) Waseda Bioscience Research Institute in Singapore; 11 Biopolis Way #05-01/02 Helios, Singapore, 138667 Republic of Singapore

(3) East Takarazuka Sato Hospital, 2-1 Nagao, Takarazuka, Hyogo 665-0873, Japan

Seiji Miyake, B.M.T. passed away after the submission of this manuscript.

論文受付 2010年10月20日 論文受理 2011年1月17日

thought that the saline mixed with the liposome emulsion would be diluted more excessively than when diluted with water outside of the vesicles. Therefore, assuming that water does not permeate the membrane, a lower electrolyte concentration might be observed than the calculated concentration.

To resolve the speculation presented above, we attempted first to measure Na and Cl ion concentrations serially until 168 hr after the liposome emulsion was mixed with saline. Second, we observed additional effects of colloid osmotic pressure on the liposome vesicles for 3 hr because, in the previous studies, human albumin had been added at 4 g% to all examined materials for adjustment to the clinical sample^{1,2)}.

2. Materials and Methods

Liposome vesicles encapsulating distilled water were prepared at Waseda Bioscience Research Institute in Singapore. Preparation of the liposome vesicle encapsulating distilled water was described elsewhere²⁾. Briefly, a mixture of cholesterol, phospholipid, and other lipids was dissolved in distilled water and stirred overnight. The liposome vesicle diameter was adjusted approximately 220 nm by extrusion through filters under 30 kgf/cm² pressure. Liposomecrit, the volume ratio of liposome vesicles emulsified in distilled water, was determined as 46.6% after 100,000 × g ultracentrifugation (Optima LX-80; Beckman Coulter Inc., Brea, Ca. U.S.A.). The emulsion was sealed with air and stored in a refrigerator at 4°C.

In the first experiment (Exp. 1), human albumin powder (A1653-5G; Sigma-Aldrich Corp., St Louis, Mo. U.S.A.) was dissolved in distilled water to 2.5 g%. This albumin solution of 0.1 ml was added to the liposome emulsion of 0.5 ml. Then this mixture was transferred to a sample analysis vessel for VITROS250TM (Ortho Clinical Diagnostics Inc., Rochester, N.Y. U.S.A.). To the mixture described above, 2.5 g% saline of 0.2 ml was added and mixed well within 3-4 s. The vessel was set into the analyzer quickly. Analyses of Na and Cl ion concentrations were started promptly. Subsequently, Na and Cl ion concentrations in the same mixture of the liposome emulsion, saline, and albumin as prepared above were measured concomitantly at 15 and 120 min, and at 24 and 168 hr using the same analyzer. These measurements were performed in triplicate for each sample. The procedure described above and measurements were repeated on four separate days.

In the second experiment (Exp. 2), the liposome emulsion of 0.4 ml was mixed with 2.0 g% saline of 0.4 ml in the sample vessel for VITROS250TM. Subsequently, 25 g% albumin solution of 0.2 ml was added to the mixture.

Immediately after mixing, measurements of Na and Cl ion concentrations in the above mixture were conducted. Then the liposome emulsion, the saline, and albumin solution were mixed at the same mixing rate described above. The Na and Cl ion concentrations in the latter mixture were measured concomitantly using the same analyzer at 5, 15, and 180 min after mixing. Each measurement was conducted in triplicate. The experimental procedures and measurements were repeated on four separate days. Before and after measurements of the mixtures, Na and Cl ion concentrations in 0.96 g% saline of 1.0 ml mixed with 0.4 g% the albumin of 0.2 ml in Exp. 1 and with 4.0 g% the albumin in Exp. 2 were measured, respectively, as reference in triplicate.

The predicted concentrations of Na and Cl ions for the mixture were calculated mathematically. The predict-1 values in Exp. 1 and Exp. 2 were calculated on the assumption that water molecules permeate the liposome membrane freely as follows. For example, the concentration (g%) of Cl in the mixture was obtained dividing the Cl amount in the mixture by the water volume of the mixture as $0.2 \times 2.5 / 0.1 + 0.2 + 0.5$. Then the concentration of Cl (0.625 g%) was converted to 106.9 mEq/L through multiplication by 154/0.9.

However, the predict-2 value in Exp. 1 was calculated on the assumption that water molecules do not permeate the liposome membrane. In the latter calculation, liposomecrit of 46.6 vol% was used for subtraction of the water volume in the liposome emulsion. Consequently, the water volume of the mixture (0.1 + 0.2 + 0.5) used for the equation for calculating the predict-1 value was modified to 0.1 + 0.2 + 0.5 (1 - 0.466).

The increment in Na concentration associated with addition of albumin which fundamentally contains Na molecule⁴⁾ was calculated by averaging differences between Na and Cl ion concentrations found in Exp. 1 and Exp. 2, respectively. Consequently, 0.7 mEq/L was determined as the increment in Na ion concentration in Exp. 1 in which the albumin was added at 0.4 g%, and as 6.6 mEq/L in Exp. 2 added at 4.0 g%.

These experimental procedures including preparation of mixtures and measurement of Na and Cl concentrations were conducted at Osaka Prefecture Saiseikai Noe Hospital. All data were recorded and reported as means and standard deviations in Table 1 and Table 2. Comparison of means was done using Student's *t* test and *p* < 0.05 was inferred as statistically significant.

3. Results

3.1. Experiment 1

The interval between mixing 2.5 g% saline into the liposome emulsion containing albumin and display of Na and

Cl concentrations on the analyzer was 3.07 ± 0.03 min. As shown in Table 1, the actually measured values for Na ion concentrations were within $107.5 \pm 0.7 \sim 108.4 \pm 1.0$ mEq/L during 0 min and 168 hr after mixing the liposome emulsion with 2.5 g% saline. These Na concentrations did not differ significantly from each other. The predict-2 value, which was calculated on the assumption that water molecules do not permeate through the liposome membrane, was 152.8 mEq/L. This value was markedly higher than the actually measured values. On the other hand, the predict-1 value, which was calculated on the assumption that water permeates freely through the liposome membrane, was 108.8 mEq/L. It differed by 1.3 mEq/L at the most from the actually measured values.

Actually measured Cl ion concentrations ranged at $106.0 \pm 0.7 \sim 106.5 \pm 0.8$ mEq/L during 0 min and 168 hr after mixing the liposome emulsion with 2.5% saline. The predict-2 value of 150.9 mEq/L for the Cl ion concentration was markedly higher than the actually measured value of 106.0 ± 0.7 . On the other hand, the predict-1 value of 106.9 mEq/L was very close to the actually measured values with the maximum difference of 0.9 ± 0.8 mEq/L.

The Na ion concentration for the reference solution was 137.0 ± 0.8 mEq/L for the actually measured value and 136.2 mEq/L for the predicted value. The Cl ion concentration of the reference solution was 136.3 ± 0.7 mEq/L for the actually measured value and 135.5 mEq/L was for the predicted value. Differences of the actually measured value and the

Table 1. (Predict-1): Calculated Na and Cl ion concentrations (mEq/L) in the mixture on the assumption that water molecules permeated the liposome membrane freely. (Predict-2): Calculated Na and Cl ion concentrations in the mixture on the assumption that water molecules could not permeate the liposome membrane. The Na ion concentrations in predict-1, -2, and the reference solution were adjusted, respectively, by adding Na ion contained in albumin powder (see text).

Time after mixing	0 min. n=15	15 min. n=15	120 min. n=15	24 h. n=15	168 h. n=15	Reference Solution n=30
Na ion concentration						
actually measured	107.5 ± 0.7	108.2 ± 0.6	108.2 ± 0.8	108.3 ± 0.7	108.4 ± 1.0	137.0 ± 0.8
predict-1	108.8					136.2 (predicted)
predict-2	152.8					
Cl ion concentration						
actually measured	106.0 ± 0.7	106.0 ± 0.8	106.1 ± 0.7	106.5 ± 0.8	106.3 ± 0.7	136.3 ± 0.7
predict-1	106.9					135.5 (predicted)
predict-2	150.9					

Table 2. (Predict-1): Calculated Na and Cl ion concentrations (mEq/L) in the mixture on the assumption that water molecules permeated the liposome membrane freely. The Na ion concentrations for predict-1 and reference solution were adjusted, respectively, by adding concentration of Na ion contained in albumin powder (see text).

Time after mixing	0 min. n=15	5 min. n=15	15 min. n=15	180 min. n=15	Reference Solution n=30
Na ion concentration					
actually measured	149.3 ± 1.3	149.4 ± 1.2	149.3 ± 1.1	149.1 ± 1.2	142.2 ± 0.8
predict-1	146.7				142.1 (predicted)
Cl ion concentration					
actually measured	139.9 ± 1.0	139.5 ± 1.5	139.3 ± 1.2	138.9 ± 1.2	135.6 ± 0.7
predict-1	136.9				135.5 (predicted)

predicted value were 0.8 mEq/L for each of Na ion and Cl ion concentrations.

3.2. Experiment 2

The interval between the mixing 25 g% albumin solution with liposome vesicles emulsified in the saline and display of Na and Cl concentrations on the analyzer was 2.61 ± 0.03 min. Actually measured Na ion concentrations were $149.4 \pm 1.2 \sim 149.1 \pm 1.2$ mEq/L during 0 min and 180 min after the mixing of the liposome emulsion and the albumin solution, as shown in Table 2. These values did not differ significantly from each other. A maximal difference of 2.7 mEq/L was observed between those actually measured values and the predict-1 value of 146.7 mEq/L, which was calculated using the equation on the assumption that water permeates the liposome membrane freely.

Actually measured Cl ion concentrations were 139.9 ± 1.0 mEq/L at 0 min $\sim 138.9 \pm 1.2$ at 180 min after mixing with the albumin solution. The Cl ion concentrations tended to decrease gradually over time, but no significant difference was found between the final measured value at 180 min and the initial value. Those values differed 3.0 ± 1.5 mEq/L at most from the predict-1 value of 136.9 mEq/L.

The Na ion concentration of the reference solution was 142.2 ± 0.8 mEq/L for the actually measured values and 142.1 mEq/L for the predicted value. The Cl ion concentration of the reference solution was 135.6 ± 0.7 mEq/L for the actually measured value and 135.5 mEq/L for the predicted value. Differences between the actually measured and predicted values were 0.1 mEq/L for each of Na ion and Cl ion.

4. Discussion

As observed in Exp. 1, the serially measured means of Na and Cl ion concentrations respectively showed a narrow range of less than 1.0 mEq/L. Furthermore, these values were closest to the predict-1 values calculated on the assumption that water would permeate the liposome membrane freely. On the other hand, they were so different from the predict-2 values calculated on the assumption that water would not permeate the liposome membrane. Results show that the added saline to the liposome emulsion should be diluted by water outside of the liposome vesicles alone. Paula et al.⁵⁾ reported that the water permeability coefficient for bilayer liposome membrane is $2.4 \cdot 10^{-2} - 5.0 \cdot 10^{-3}$ cm/s which was determined using a light scattering method. Carruthers et al.⁶⁾ and Jansen et al.⁷⁾ reported a similar but slightly smaller permeability coefficient. The Na or Cl ion concentrations were displayed on the analyzer within 3.07 ± 0.03 min after mixing the liposome emulsion with the saline in

Exp. 1. Therefore it was presumed that the water efflux from the liposome vesicles was completed within the display period described above, which explains that the predict-1 value should become closer to the actually measured value for each electrolyte ion concentration. Hauser et al.⁸⁾ reported that the Na ion permeability coefficient through an egg lecithin membrane was $0.53-2.2 \cdot 10^{-14}$ cm/s and less 1/1,000 times than that for Cl ion. Furthermore, Paula et al.⁵⁾ reported that the K ion permeability coefficient of $1.5 \cdot 10^{-10} - 1.7 \cdot 10^{-12}$ cm/s was markedly lower than the coefficient of water. However, those authors emphasize that those permeability coefficients varied depending on physicochemical property of phospholipid, thickness, and surface continuity of liposome membrane and the smooth sphericity of vesicles.

In the previous studies^{1,2)} we added albumin to the examined samples for simulating clinical samples and for accuracy in determination by analyzers. In Exp. 2, therefore, we examined the effect of colloid osmotic pressure influencing to the water efflux. We observed changes in Na and Cl ion concentrations of the liposome emulsified in the saline serially until 3 hr after mixing albumin. Results show that the Na and Cl ion concentrations did not change significantly within 3 hr. All experimental procedures were completed in the previous studies within 3 hr. Therefore, it was verified that colloid osmotic pressure associated with the added albumin did not affect the water efflux from the vesicles within 3 hr. However, a slight decreasing trend was observed in the Cl ion concentration from the initial to the final measurement time, although no statistical significance was found. We presumed that, if we would extend the observation period longer, we might find a statistically significant decrease in those changes, but such an investigation would be beyond the scope of this study. The above results demonstrated the possibility that the inside water of the liposome vesicles diffused out through the liposome membrane by osmosis and diluted the saline more than predicted. We can exclude the other possibility concerning with the measurement of liposomecrit²⁾.

One limitation of this study is that we were unable to measure the electrolyte concentrations immediately when the liposome vesicles contacted the saline in Exp. 1. We attempted to measure Na and Cl ion concentrations as soon as possible after the liposome emulsion was mixed with the saline. However, 3.07 ± 0.03 min was needed to display the ion concentrations on the analyzer. Therefore, we did not observe precise changes in concentrations of Na and Cl ion at the moment of mixing, namely, at 0 min after mixing. Detection and display by the analyzer were delayed extremely compared with water movement through the

liposome membrane, as reported previously by the authors⁵⁻⁷⁾.

Another limitation was that we used very low-concentration (0.4 g%) albumin for minimizing the contribution of colloid osmotic pressure in Exp. 1. Such a low concentration of albumin is never experienced in clinical practice. Therefore, it has not been warranted whether the analyzer can determine electrolyte concentrations accurately or not. Fortunately, the measured values of Na and Cl ion concentrations in the reference solution containing the low concentration albumin remained in the acceptable range.

5. Conclusion

It was concluded based on crystalloid osmotic pressure that the efflux of inside water of the liposome vesicles occurred promptly after mixing with the saline. Colloid osmotic pressure associated with 4 g% albumin did not influence the water efflux at least 3 hr. Therefore, the difference between actually measured and predicted values for Na and Cl ion concentrations — which was observed in the previous study³⁾ particularly when liposome emulsion was mixed to saline at 1:1 volume ratio — was explained as produced by the efflux of water from liposome vesicles.

Acknowledgment

This study was supported by a Grant from the Japanese Ministry of Health, Welfare and Labor Research Project “Clinical Applications of Artificial Oxygen Carrier H18-Drug Innovation H18-General-022”.

References

1. Miyake S, Takemura J, Takaori M. Determination of electrolyte concentrations in serum containing cellular artificial oxygen carrier (HbV) *Artif Blood* 2010; 18: 3-8.
2. Miyake S, Takemura J, Sakai H, Takaori M. Measurement of electrolyte concentrations in serum containing liposome vesicles *Artif Blood* 2010; 18: 91-96.
3. Chang TMS. Semipermeable aqueous microcapsules (artificial cells) with emphasis on experiments in an extracorporeal shunt system. *Trans Am Soc Artif Int Organs* 1996; 12: 13-19.
4. Report from Sigma-Aldrich. Jan. 2010.
5. Paula S, Volkov AG, Van Hoek AN, Haines TH, Deamer DW. Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness. *Biophys J* 1996; 70: 339-348.
6. Carruthers A, Melchior DL. Studies of the relationship between bilayer water permeability, and bilayer physical state. *Biochemistry* 1983; 22: 5797-5807.
7. Jansen M, Blume A. A comparative study of diffusive and osmotic water permeation across bilayer composed of phospholipids with different head group and fatty acyl chains. *Biophys J* 1995; 68: 997-1008.
8. Hauser H, Oldani D, Phillips MC. Mechanism of ion escape from phosphatidylcholine and phosphatidylserine single bilayer vesicles. *Biochemistry* 1973; 12: 4507-4517.

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

三宅誠司¹⁾，酒井宏水²⁾，高折益彦³⁾

- 1) 大阪府済生会野江病院検査科
- 2) Waseda Bioscience Research Institute in Singapore
- 3) 東宝塚さとう病院

和文要約 前回の研究で 蒸留水内包 liposome emulsion を一定濃度の食塩液と混合した時，とくに 1:1 容量混合でみられた食塩液中の Na イオン，Cl イオンの予想以上の低下原因を明らかにするため以下の研究を行なった．研究 1 では前回使用したものと同質，同サイズの liposome 粒子を 0.4 g% アルブミンを含む 0.625 g% の食塩液に浮遊させ，0，15，120 分，24，168 時間後にその食塩液中の Na，Cl イオン濃度を測定した．その結果，実測した Na，Cl イオン濃度はそれぞれ $107.5 \pm 0.7 \sim 108.4 \pm 1.0$ mEq/L， $106.0 \pm 0.7 \sim 106.5 \pm 0.08$ mEq/L にあり，時間経過による変化は認められなかった．そして liposome 粒子内部の水分によって Na，Cl イオン濃度が希釈されると推定した予測値にはほぼ一致した．したがって前回の研究で認められた liposome emulsion を一定濃度の食塩液と混合した時にみられた予想以上の Na イオン，Cl イオンの希釈は上記 liposome 粒子内部の水分の浮遊液への移動によると結論された．またその水分移動は liposome 粒子と食塩液との混合後測定器が表示するまでの 3.07 ± 0.03 分以内に生じていたことが推定された．研究 2 では 0.625 g% 食塩液に上記 liposome 粒子を浮遊させた後にアルブミンを 4.0% になるように添加し，0，5，15，180 分に浮遊液中の Na，Cl 濃度を測定した．その結果，Na，Cl イオン濃度はそれぞれ $149.4 \pm 1.2 \sim 149.1 \pm 1.2$ mEq/L， $139.9 \pm 1.0 \sim 138.9 \pm 1.2$ mEq/L であって，多少，時間経過とともに低下傾向，すなわちコロイド浸透圧によると思われる liposome 粒子の内部の水分の移動傾向がみとめられたが統計学的には有意性を立証するに至らなかった．すなわち初期測定時から 3 時間測定時までで変化は認められなかった．そのため前回の研究での観察時間，3 時間以内では少なくとも測定系に共存した 4 g% アルブミンの膠質浸透圧はこの liposome 粒子内部の水分の粒子外移動に関与していなかったことが確認された．

リポソーム技術を基盤とする骨髄指向性薬物送達キャリアー

Bone Marrow-Targeted Drug Delivery Carriers Based on Liposome Technology

宗 慶太郎

Keitaro Sou

和文抄録

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、薬物キャリアー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。このリポソームにヘモグロビンを内包させた人工酸素運搬体（Hb小胞体）を大量投与（680 mg lipid/kg body weight）すると、主に肝臓、脾臓、骨髄に捕捉され、2～3日程度の半減期で血中から消失する。一方、薬物送達の対象となる少投与量（15 mg lipid/kg body weight）では、興味深いことに骨髄に集中した体内分布が観測される。この体内動態特性により、骨髄に薬剤を効率的に運搬できる薬物送達システムとしての新しい応用が期待できる。

Abstract

Liposomes are expected as carriers of drugs and genes as well as application for artificial oxygen carriers. Liposomes for artificial oxygen carriers have been engineered in consideration of large infusion doses, therefore their specifications are unique in size and lipid composition in comparison with conventional long-circulating liposomes for drug carriers at small infusion dose. Artificial oxygen carriers, liposomes encapsulating hemoglobin (Hb-vesicles), are distributed in liver, spleen, and bone marrow mainly, and disappear from blood in half life of two or three days at large doses (680 mg lipid/kg body weight). On the other hand, interestingly, the liposomes are distributed in bone marrow locally at small infusion dose such as 15 mg lipid/kg body weight. This finding may offer a new application of the liposomes for drug delivery system which can carry therapeutics to bone marrow effectively.

Keywords

biodistribution, bone marrow, drug delivery, liposomes, macrophages,

1. はじめに

リポソームは閉鎖小胞構造の分子集合体で、リン脂質を水相で懸濁すると自発的に形成される^{1,2)}。リポソームの内水相には水溶性薬物、タンパク質、遺伝子、生理活性物質などを内包できることから、薬物送達キャリアーとしての様々な応用が検討されてきた。特に薬物を目標とする部位まで安定かつ効率的に届けるための薬物送達システムに期待がよせられている。

従来、リポソームに限らず微粒子の経静脈投与では、投与した微粒子の大部分が肝臓と脾臓に捕捉されることが知られている。このため、肝脾での捕捉を回避し血中滞留性を向上させ、目標とする部位への到達率を向上させる方法論が検討されてき

た。血中滞留性の向上にはポリエチレングリコール（PEG）によるリポソーム表面修飾が有効で、このPEG修飾リポソームに抗悪性腫瘍剤ドキソルビシンを内包した医薬品（Doxil[®]）が臨床で実用化されている^{3,4)}。腫瘍組織では血管透過性が著しく亢進しているため、リポソームのような微粒子でも血管外に流出し、血中滞留性を向上させれば腫瘍組織で流出するリポソームの割合が増大する（受動的ターゲティング）^{5,6)}。更に、生体内で特異的集合現象に関与する分子（例えば抗体、アプタマー、リガンド）をリポソーム表面に取り付けることで、特定の部位に積極的に治療薬を送り届ける能動的ターゲティングを可能にする薬物送達システムの構築が検討されている。

早稲田大学 先端生命医科学センター 〒162-8480 東京都新宿区若松町2-2 Center for Advanced Biomedical Sciences, Waseda University (TWIns), 2-2 Wakamatsu-cho, Shinjuku, Tokyo 162-8480, Japan.

論文受付 2011年1月8日 論文受理 2011年1月17日

人工酸素運搬体の研究開発分野では1970年代にリポソームが登場し、これまでにリポソームの内水相にヘモグロビンを内包したタイプとリポソームの二分子膜に合成ヘムを包埋したタイプの人工酸素運搬体が開発されている⁷⁻¹¹⁾。人工酸素運搬体を輸血代替として投与する場合、薬物送達キャリアーとしての応用に比較してリポソームの投与量が数十倍に及ぶため、脂質成分や製法の最適化によりできるだけ少ない脂質でヘモグロビンを効率良く内包でき、かつ大量投与に耐えうる高い安全性を有するリポソームが検討されてきた¹²⁻¹⁴⁾。このように大量投与でも安全性の高いリポソームは、人工酸素運搬体としての応用のみならず、薬物送達キャリアーとして様々な応用が期待される。本稿では、細胞型人工酸素運搬体の研究開発の中で見出された骨髓に指向性を示すリポソームの特異な体内動態について概説し、骨髓を標的とする新しい薬物送達キャリアーとしての応用について展望する。

2. リポソームの体内動態評価

リポソームをキャリアーとする薬物送達システムにおいて、薬物動態はキャリアーであるリポソームの体内動態に依るため、リポソームの体内動態の定量評価が重要になる。イメージング技術を利用することにより、投与したリポソームの体内動態を非侵襲で定量的に可視化でき、安全性や有効性に関連する多くの情報が得られる。*In vivo* イメージングとしては、X線、CT、PET (positron emission tomography)/SPECT (single photon emission tomography)、光イメージング、核磁気共鳴イメージング (MRI) などが、動物を対象とする基礎研究から人体を対象とする臨床診断まで、生きた生体を対象に広く用いられている。SPECTでは体内に投与した放射性化合物から放出されるガンマ線を体外で検出して定量的に画像化する。リポソームを放射性同位元素で標識して投与し、経時的に取得した画像を解析することで経時変化を含めた体内動態の詳細な情報が得られ、^{99m}Tc、¹²³I、⁶⁷Ga、¹¹¹InなどがSPECT核種としてイメージングに用いられる。

リポソームの標識部位として、表面、二分子膜内、内水相があるが、予め調製したリポソームの内水相に [technetium-99m]pertechnetate (^{99m}TcO₄⁻) を後導入する方法で簡便に標識できる¹⁵⁾。^{99m}Tcは放射壊変によりγ線を放出する放射性同位元素であり、比較的安価に入手でき、γカメラ計測に適したエネルギー (140 keV) を放出し、物理学的半減期は6 hrで蓄積性もないので臨床でも多用される核種である。^{99m}TcO₄⁻はチオール化合物と安定な複合体を形成し、この性質を利用して小胞体内水相を標識できる。図1Aに示すスキームのように、チオール化合物としてグルタチオン (30~200 mM) を内包したリポソームを調製し、粒子径制御や諸物性計測を完了させた後、体内動態実験を行う直前に^{99m}Tcで標識することができる。^{99m}Tcはリポソーム膜を透過できないため、両親媒性の hexamethylpropylene amine oxime (HMPAO) と複合体を形成させてからリポソームと混合する。^{99m}Tc-HMPAOは局所脳血流シンチグラフィ剤として用いられる放射性医薬品であり、

その両親媒構造により血液脳関門を通過することの特徴とする。この^{99m}Tc-HMPAO複合体の両親媒構造によりリポソーム膜を透過できるようになり、内水相まで浸入してグルタチオンと^{99m}Tcが複合体を形成する。^{99m}Tc-グルタチオン複合体はリポソーム膜を透過できないので^{99m}Tcを封じ込めたりポソームが得られ、未導入の^{99m}Tcはゲル濾過や超遠心分離で除去できる。^{99m}Tcとグルタチオンは1対2の安定な複合体を形成し¹⁶⁾、通常80%以上の高効率で標識できる。血漿中 (37℃) でインキュベーションし経時的にリポソームから^{99m}Tcの漏出を定量したところ、98%以上の^{99m}Tcが48時間後までリポソーム内に留

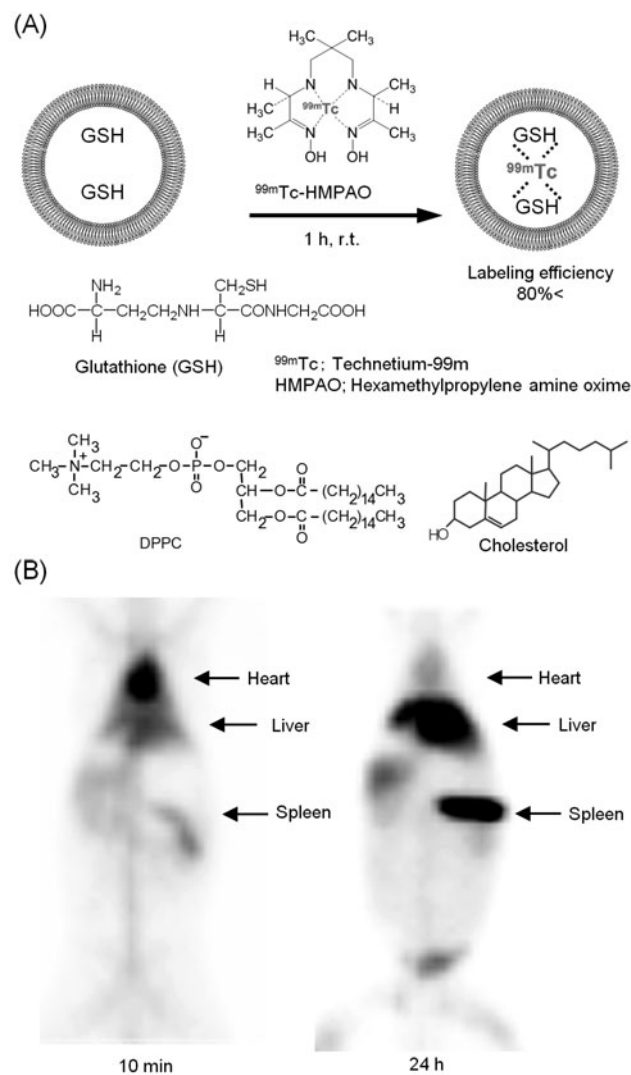


Fig. 1. Biodistribution study of radioisotope-labeled liposomes. (A) Remote loading of technetium-99m (^{99m}Tc) into preformed liposomes encapsulating glutathione (GSH). 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and cholesterol which are typically used as component of liposomes. (B) Static gamma camera images of rabbits acquired at 10 min and 6 h after intravenous injection of conventional ^{99m}Tc-labeled liposome composed by DPPC and cholesterol at 15 mg lipids/kg body.

り、少なくとも2日程度の実験においては安定標識体として取り扱えるものと考えられる¹⁷⁾。

こうして^{99m}Tc標識した一般的なリポソーム (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, DPPC/Cholesterol, 1/1 molar ratio) を経静脈投与したウサギをガンマカメラ下でスキャンすると通常図1 Bに示すような画像が得られる。リポソームを投与して10分後の画像では、リポソームが血流中に存在するため心臓の血液プールに強い放射線量が観測される。投与してから24時間後には肝臓と脾臓に強い放射線量が観測され、リポソームの大部分が肝脾に分布していることがわかる。リポソームは肝脾で単核食細胞系に捕捉されることが明らかになっている^{18, 19)}。

3. リポソームの表面修飾による骨髓選択性の発現と増強

リポソームはリン脂質を主成分とする両親媒性分子の集合体であるため、両親媒構造を有する特定の分子をリン脂質と混合して分子集合させることで、リポソーム表面を特定の分子で修飾できる。特定分子で表面修飾することにより特定細胞や特定組織との相互作用を選択的に増幅することで、標的部位に選択的に薬剤を送達できるキャリアーとしての付加機能が創出される。

人工酸素運搬体に用いられるリポソームの表面物性に関する特徴的な成分として負電荷脂質が挙げられ、この負電荷脂質はリポソームによるヘモグロビンの内包効率を最大化するために必要な成分である。リン脂質とコレステロールで形成される一般的な脂質膜は表面が電荷的に中性であり、多重層膜を形成する傾向がある。このような多重層リポソームでは、被覆層数が多いほど単位脂質量当たりの内包量が減少する。大雑把に見積もって、二枚膜リポソームでは一枚膜リポソームに比較して単位脂質量当たりのヘモグロビン内包量がほぼ半分に減少する。このため、ヘモグロビンをリポソームに効率高く内包するには、均一粒子径の一枚膜リポソームを調製する技術が必要であり、負電荷脂質はこの内包技術において重要な役割を担っている。すなわち、負電荷脂質の導入による被覆層間の静電反発を利用して被覆層数の減少を促すことで、高い効率でヘモグロビンを一枚膜リポソームに内包することができる²⁰⁻²²⁾。

図2 Aに示すように市販のパルミチン酸 (PA) やジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG) に加え、合成脂質; 1,5-*O*-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSG) が負電荷脂質として使用できる。これらの負電荷脂質は、分子構造特異的にリポソームの生体適合性に関与することが明らかになっている²³⁻²⁵⁾。最近の研究から、負電荷脂質の導入によりリポソームの体内動態にも著しい変化が認められることがわかってきた¹⁷⁾。図2 Bは、各種負電荷脂質 (総脂質に対して9 mol%) を含有するリポソームをウサギに投与 (投与量15 mg lipid/kg) して24時間後の骨髓への分布率を比較した結果である。負電荷脂質を含有していないリポソームは図1 Bにも示すように骨髓には殆ど分布せず、分布率は投与量の $2.3 \pm 0.4\%$ にすぎない。負電荷脂質としてPAやDPPGを導入したリポソームでも骨髓

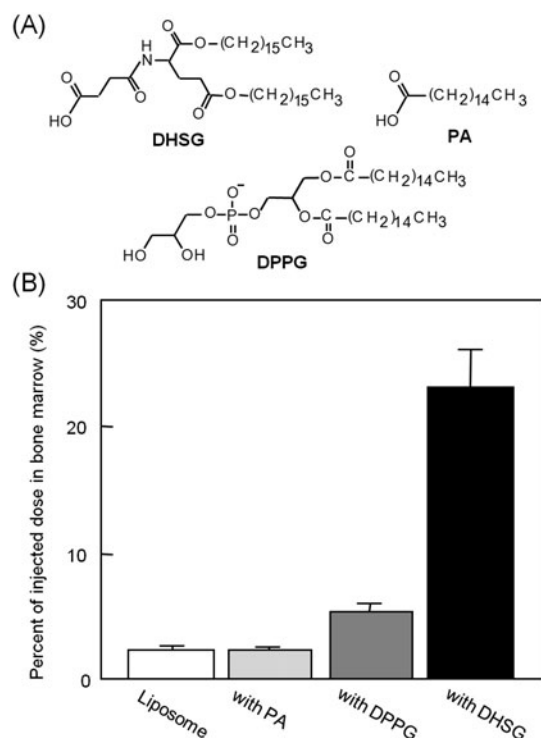


Fig. 2. Structural specific effect of surface modification with anionic lipids on uptake of liposomes by rabbit bone marrow. (A) Structure of anionic lipids for preparing negatively charged liposomes. DHSG; 1,5-*O*-dihexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate, PA; palmitic acid, DPPG; 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol. (B) Comparison of the liposome uptake by bone marrow at 24 h after injection. Liposomes were injected at 15 mg lipids/kg body weight into rabbits intravenously.

への分布率に大きな変化はなく、負電荷脂質を含有していないリポソームと同レベルの低値である。一方、DHSGを導入したリポソームでは、骨髓への分布率が $23.1 \pm 3.1\%$ にまで大幅に増大する。この結果より、DHSGの分子構造に特異的な相互作用が関与して骨髓への分布が増大していると考えられる。

図3には、DHSGを含有させたリポソームに更に1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[monomethoxy poly (ethylene glycol) (5000)] (PEG-DSPE)を導入し、ウサギに投与 (投与量15 mg lipid/kg) して24時間後の臓器分布を示している¹⁷⁾。PEG-DSPEの導入量は0.3~2.6 mol%として、PEG-DSPE含量による臓器分布の変化を調べた。DHSGを含有させたリポソームでは、PEG-DSPEの導入量に関わらず骨髓への高い分布率を示し、特に0.6 mol%の導入で最も高値を示した。一方、PEG修飾量の増大により肝臓への分布率が有意に減少することから、PEG修飾は主に肝臓への取込みを抑制していることがわかる。PEG-DSPE 0.6 mol%の導入で骨髓への分布率が最も高い値を示したのは、PEG修飾により肝臓への取込みが抑制され、受動的に骨髓への分布率が高まった結果と考えられる。0.6 mol%以上にPEG-DSPEを増やしていくと、肝臓および骨髓の両者とも取込みが抑制される傾向を認めた。これは、

PEG-DSPEの増大によりリポソーム表面のDHSG親水基がPEG鎖で遮蔽されるためと考えられる。

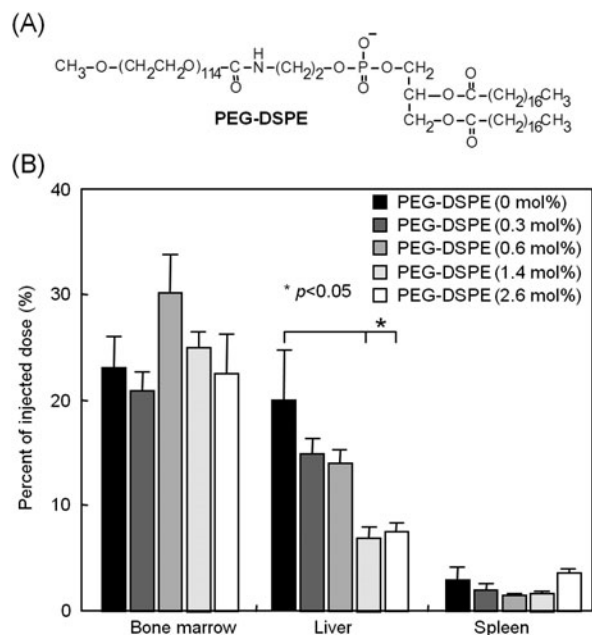


Fig. 3. Effect of surface modification with poly(ethylene glycol) (PEG) on organ distribution of liposomes containing DHSG. (A) Structure of PEG-DSPE. (B) Biodistribution of liposomes in bone marrow, liver, and spleen at 24h after injection. Liposomes were injected at 15 mg lipids/kg body weight into rabbits intravenously.

4. 骨髄指向性リポソームの臓器分布過程¹⁷⁾

骨髄への最も高い分布率が認められた、DHSGと0.6 mol%のPEG-DSPEで修飾した骨髄指向性リポソーム (図4 A) について、ウサギに投与後 (投与量 15 mg lipid/kg) からの臓器分布の時間推移を詳しく調べた。図4 B に示すように、投与10分後のガンマカメラ像は心臓と肝臓の血液プール像を示し、投与リポソームは血中にて循環していることがわかるが、時間経過と共に骨髄への分布が明確となる。図1 Bに示すDHSGを含有していないリポソーム投与後の画像と比較すると、その相違は明確である。この画像から、骨髄、肝臓、脾臓への取込み量の経時変化を解析したのが図4 Cである。投与後から骨髄への取込みが進行し、6時間後には投与量の68.5 ± 3.3%に達した。

リポソームを捕捉したウサギ骨髄切片の透過型電子顕微鏡観察から、リポソームは形態学的に骨髄マクロファージと同定される単核食細胞に捕捉されることが明らかになっている。骨髄マクロファージのファゴソーム内に多数のリポソームが取込まれていることから、ファゴサイトーシスにより捕捉されているものと考えられる。従って、骨髄指向性リポソームは骨髄マクロファージのファゴサイトーシス機構を特異的に標的化している。

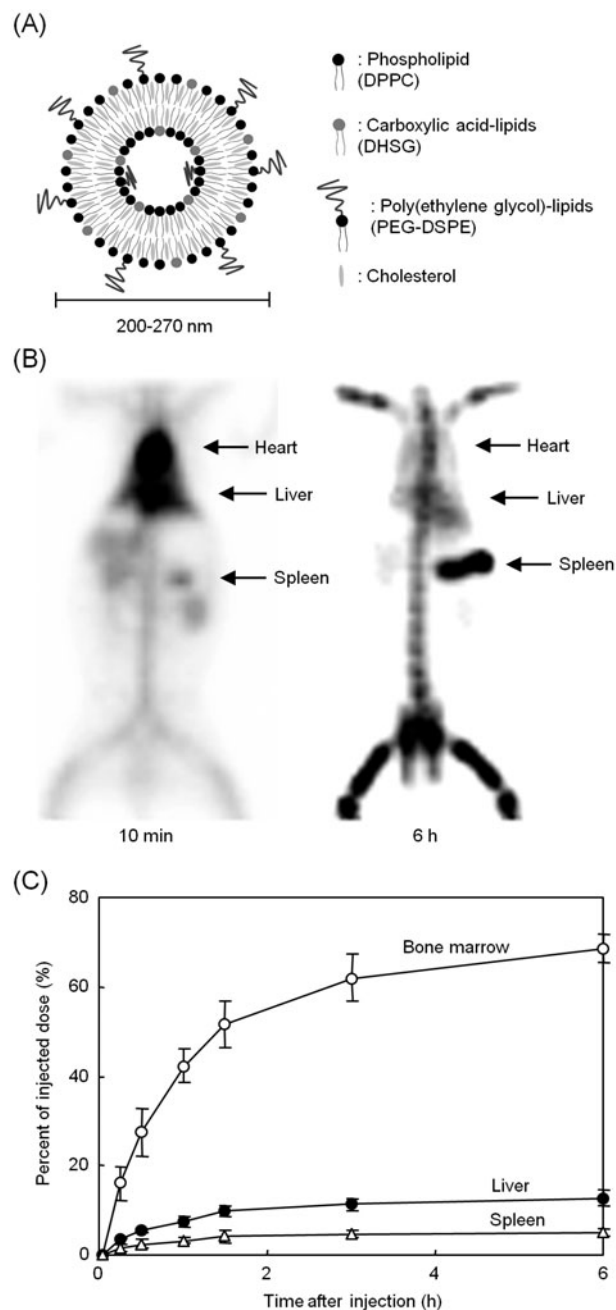


Fig. 4. Bone marrow-targeted liposomal carriers. (A) Schematic representation of bone marrow-targeted liposomal carriers which consisted of four kinds of lipids. (B) Static gamma camera images of rabbits acquired at 10 min and 6 h after intravenous injection of bone marrow-targeted liposomal carriers at 15 mg lipids/kg body weight. (C) Initial distribution profiles of bone marrow-targeted liposomal carriers as a percentage of the injected dose analyzed from the gamma camera images.

5. 投与量と動物種による体内動態の相違

薬物送達キャリアーとして応用では、脂質の投与量にして 15 mg/kg 程度での体内動態が対象となるが、細胞型人工酸素運搬体として応用する場合には、その数十倍の脂質に加えヘモグロビンが投与される。これまでにDHSGを含有するリポソーム

ムにヘモグロビンを内包したヘモグロビン小胞体の体内動態がマウス、ラット、ウサギで調べられており、主に肝臓、脾臓、骨髄に捕捉されることがわかっている²⁶⁻²⁸⁾。体内動態に特に顕著な種差は認められず、複数種動物試験データを基にした血中半減期の見積もりでは、血液量の25%程度のヘモグロビン小胞体をヒトに投与した場合の血中半減期は3～4日程度と見積もられている²⁶⁻²⁸⁾。ただし、ヘモグロビン小胞体の血中半減期や体内動態は投与量に依存するため、投与量が少なくなるにつれ血中半減期が短くなる。このため、健康人に僅かな量を投与する第1相試験などでは、多量投与から予想される体内動態と異なる特性を示す可能性がある。本稿で注目している骨髄指向性は少量投与で顕著に認められるが、大量投与では特に骨髄に偏った体内分布は観測されていない²⁶⁾。少量投与では各臓器で

の初期取込み速度が顕著に反映され、肝臓や脾臓に比べ骨髄での取込み速度が著しく速いため骨髄に偏った体内分布となるが、骨髄での単核食細胞系による取込み飽和量以上のリポソームを投与すると、骨髄での取込みが飽和するため、肝臓や脾臓での取込み率が增大してくるものと考えられる。また、図5に示すように少量投与であっても動物種により異なる臓器分布を示し、これまでに検討したアカゲザルとウサギでは骨髄への高い分布率を示すが(～70%)、ラットでは特に脾臓への分布率が高く、マウスでは肝臓への分布率が高いことがわかっている^{29,30)}。

6. 分子機構に関する考察

リポソームに骨髄指向性を発現させる要因はDHSGの導入であり、骨髄マクロファージによる捕捉を促す情報分子となっていることが予想されるが、その分子機構の詳細はまだ明らかでない。ここでは、DHSGの分子構造や既知の生体システムから推測される分子機構の関与について考察してみる。分子構造に選択的な生体反応では受容体(レセプター)の関与が示唆され、実際にマクロファージ表面には様々な受容体が発現しており、これら受容体が特別な分子構造(リガンド)と特異的かつ選択的に相互作用することがわかっている。マクロファージは細菌やウイルスなど外来異物に対する生体防御の役割において注目されることが多いが、恒常的に脂肪や細胞の代謝に関与しており、血中から酸化リポタンパク質や老化細胞などの微粒子を選択的に除去している。このように血中から微粒子を選択的に除去するのに受容体が関与しており、具体的にはスカベンジャー受容体やホスファチジルセリン(PS)受容体が酸化リポタンパク質中の酸化リン脂質や老化細胞表面のホスファチジルセリンをリガンドとして認識している³¹⁻³⁵⁾。これらのリガンドとなる脂質が末端カルボキシル基を有している点は注目に値し(図6)、

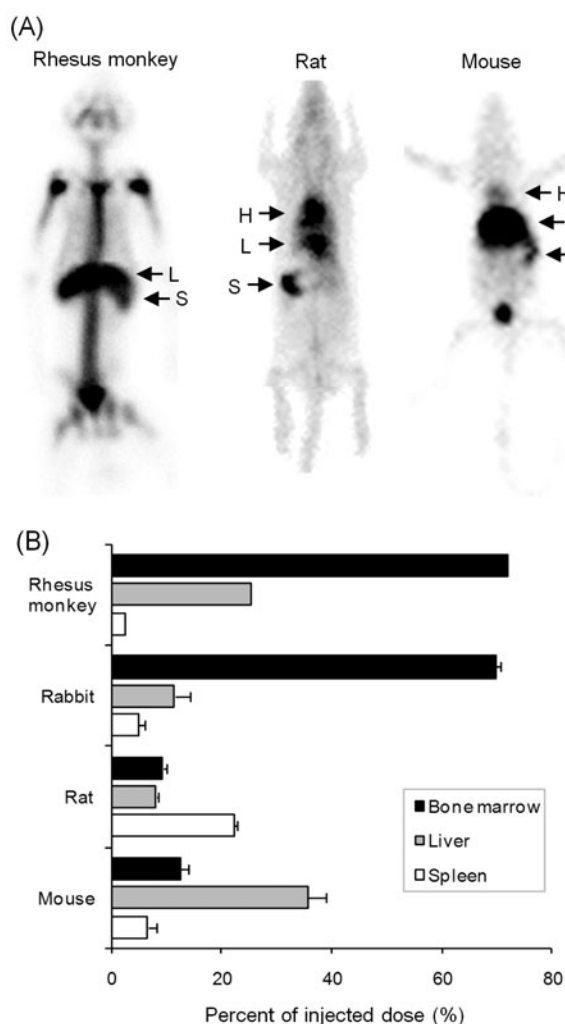


Fig. 5. Biodistribution of bone marrow-targeted liposomal carriers in various species. (A) Static gamma camera images of rhesus monkeys (at 3 h), rats (at 6 h), and mice (at 6 h) after intravenous injection of bone marrow-targeted liposomal carriers at 15 mg lipids/kg body weight. (B) Biodistribution of bone marrow-targeted liposomal carriers in rhesus monkeys (at 3 h), rabbits (at 6 h), rats (at 6 h), and mice (at 6 h) after injection. H: heart, L: liver, S: spleen

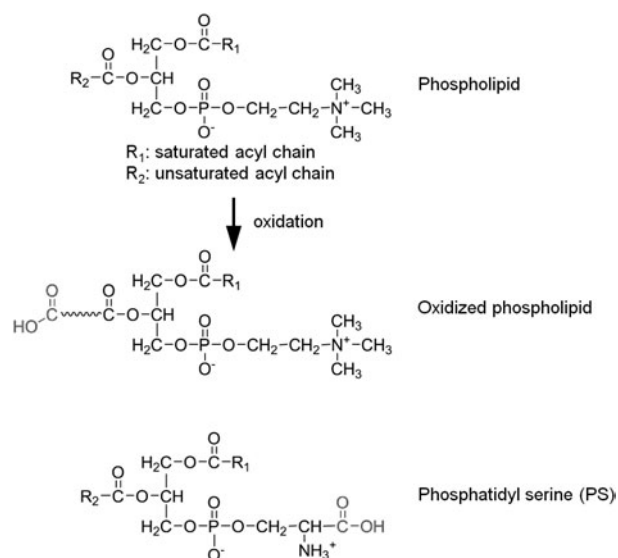


Fig. 6. Structure of known lipid ligands against scavenger receptors. Oxidation of unsaturated fatty acid in phospholipids produces terminal carboxyl group. PS has a carboxyl group at its hydrophilic head group.

DHSGの末端カルボキシル基がマクロファージ表面のスカーベンジャー受容体に認識されている可能性が示唆される。最近の研究では、酸化リン脂質のカルボキシル基が脂質膜に露出した“Whisker model”がスカーベンジャー受容体との結合に重要であることが明らかにされている³³⁾。図2に示すようにPAも末端にカルボキシル基を有しているが、DHSGと異なり骨髄マクロファージによる取込みに関与しない。これはPAのような脂肪酸の分子長はリン脂質に比較して短いため、末端カルボキシル基がリン脂質の親水部に埋もれて脂質膜に露出していないことが原因かもしれない³⁶⁾。

ところで、スカーベンジャー受容体はマクロファージや内皮細胞表面に広く発現しているため、この点においてDHSGがスカーベンジャー受容体に結合する場合、なぜ骨髄マクロファージに選択的に捕捉されるのかが説明できない。しかし、リポタンパク質や細胞など生体粒子の血中からのクリアランスにおいて、骨髄がその役割を担うことを示す観測例が報告されている。リポタンパク質の一種であるカイロミクロンの代謝では、ウサギや霊長類のマーモセットにおいて骨髄が主要な臓器であることが報告されている³⁷⁾。また、カイロミクロンの代謝臓器には種差を認め、ラット、モルモット、犬では骨髄での取込みは低く、ラットとモルモットでは脾臓での取込みが高い。この動物種による臓器分布の相違は、図5に示す骨髄指向性リポソームで観測された傾向とよく似ている。従来、肝臓と脾臓が主に注目されていた好中球の血中からのクリアランスにおいても、最近の研究や臨床診断から、かなりの部分を骨髄が担っていることが報告されている^{30, 38, 39)}。成人骨髄から一日に血中に放出される血球細胞は 4.9×10^{11} 個におよび^{40, 41)}、これを重量に換算すると年間88kgの血球細胞が骨髄から放出されていることになる。物質収支の観点から血中に放出した分は補充が必要であり、骨髄が造血に必要な物質として脂肪や老化細胞を血中から積極的に取込むシステムは合理的である。げっ歯類では、脾臓などでの髄外造血が微粒子の体内動態に影響している可能性がある。

7. おわりに

赤血球、白血球、血小板産生臓器として機能している骨髄を標的とする薬物送達システムには、様々な応用が期待できる。リポソームはモジュール方式で構成されているため、内包する薬剤を診断薬、治療薬、造血刺激因子などと取り替えることは容易であり、造血機能に関連する疾患に様々な治療戦略を提供できる。骨髄マクロファージに寄生するリーシュマニア症の治療には、骨髄マクロファージへの効率的な薬物送達システムが検討されており⁴²⁾、骨髄指向性リポソームが有効なキャリアとなるであろう。PEG修飾リポソームにドキソルビシンを内包したDoxil[®]が骨髄腫治療の併用薬剤として検討されているが⁴³⁾、このような骨髄腫治療薬のデリバリーに骨髄指向性リポソームが役に立つ可能性が高い。骨髄マクロファージにファゴサイトーシスで取込まれていることから、pH応答性などの内包薬物を効率的に放出させる仕組みをリポソームに付加することにより、より効果的な薬物送達システムが構築できるものと考えら

れる。また、これらの薬物キャリアーの体内動態特性を活用するための医薬品化合物の開発、イメージング診断と治療を同時に行う“theranostic”医薬品の開発など、リポソーム技術を基盤とする新しい創薬の方法論の展開も期待される^{44, 45)}。

謝辞

本稿で紹介した研究は、早稲田大学 土田英俊名誉教授、武岡真司教授、酒井宏水准教授の御指導御助言の下に行われた。また、実験の遂行にあたり人工酸素運搬体の研究開発に携わる先生方、学生諸氏の多くの協力を得た。In vivo イメージングは、Professor William T. Phillips, Professor Beth Goins (University of Texas, Health Science Center at San Antonio) の御指導御協力の下に行われた。ここに深く感謝いたします。本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金、日本学術振興会二国間共同研究事業（日米）の支援を受けた。記して謝意を表する。

参考文献

1. Bangham AD, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structure modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. J Mol Biol 1964; 8: 660-668.
2. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J Mol Biol 1965; 13: 238-252.
3. Gabizon A, Catane R, Uziely B, Kaufman B, Safra T, Cohen R, Martin F, Huang A, Barenholz Y. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. Cancer Res 1994; 54: 987-992.
4. Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. Clin Pharmacokinet 2003; 42: 19-436.
5. Maeda H. The tumor blood vessel as an ideal target for macromolecular anticancer agents, J Control Release 1992; 19: 315-324.
6. Maruyama K. Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects. Adv Drug Deliv Rev (in press)
7. Djordjevic L, Miller IF. Lipid encapsulated hemoglobin as a synthetic erythrocyte. Fed Proc 1977; 36: 567-571.
8. Tsuchida E. Liposome-embedded iron-porphyrins as an artificial oxygen carrier. Ann NY Acad Sci 1985; 446: 429-442.
9. Farmer MC, Rudolph AS, Vandegriff KD, Hayre MD, Bayne SA, Johnson SA Liposome-encapsulated hemoglobin: oxygen binding properties and respiratory function. Biomater Artif Cells Artif Organs 1988; 16: 289-299.
10. Tsuchida E, ed. Blood Substitutes: Present and Future Perspectives. Amsterdam: Elsevier, 1998.

11. Phillips WT, Klipper RW, Awasthi VD, Rudolph AS, Cliff R, Kwasiborski V, Goins BA. Polyethylene glycol-modified liposome-encapsulated hemoglobin: a long circulating red cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288: 665-670.
12. 土田英俊, 酒井宏水, 武岡真司, 宗 慶太郎, 小林絃一. 酸素輸液 (人工赤血球). *医学のあゆみ* 2003; 205: 558-566.
13. Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, Ikeda E, Sou K, Takeoka S, Suematsu M, Takaori M, Kobayashi K, Tsuchida E. Physiologic capacity of reticuloendothelial system for degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 874-884.
14. Tsuchida E, Sou K, Nakagawa A, Sakai H, Komatsu T, Kobayashi K. Artificial oxygen carriers, hemoglobin vesicles and albumin-hemes, based on bioconjugate chemistry. *Bioconjug Chem* 2009; 20: 1419-40.
15. Phillips WT, Rudolph AS, Goins B, Timmons JH, Klipper R, Blumhardt R. A simple method for producing a technetium-99m labeled liposome which is stable in vivo. *Nucl Med Biol* 1992; 19: 539-547.
16. Baba K, Moretti JL, Weinmann P, Senekowitsch-Schmidtke R, Ercan MT. Tc-glutathione complex (Tc-GSH): labelling, chemical characterization and biodistribution in rats. *Met Based Drugs* 1999; 6: 329-336.
17. Sou K, Goins B, Takeoka S, Tsuchida E, Phillips WT. Selective uptake of surface-modified phospholipid vesicles by bone marrow macrophages in vivo. *Biomaterials* 2007; 28: 2655-2666.
18. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 283-318.
19. Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, Ikeda E, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. *Am J Pathol* 2001; 159: 1079-1088.
20. Takeoka S, Ohgushi T, Terasse K, Ohmori T, Tsuchida E. Layer-controlled hemoglobin vesicles by interaction of hemoglobin with a phospholipid assembly. *Langmuir* 1996; 12: 1755-1759.
21. Sou K, Naito Y, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. Effective encapsulation of proteins into size-controlled phospholipid vesicles using freeze-thawing and extrusion. *Biotechnol Prog* 2003; 19: 1547-1552.
22. Sato T, Sakai H, Sou K, Medebach M, Glatter O, Tsuchida E. Static structures and dynamics of hemoglobin vesicle (HBV) developed as a transfusion alternative. *J Phys Chem B* 2009; 113: 8418-8428.
23. Abe H, Fujihara M, Azuma H, Ikeda H, Ikebuchi K, Takeoka S, Tsuchida E, Harashima H. Interaction of hemoglobin vesicles, a cellular-type artificial oxygen carrier, with human plasma: effects on coagulation, kallikrein-kinin, and complement systems. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2006; 34: 1-10.
24. Abe H, Azuma H, Yamaguchi M, Fujihara M, Ikeda H, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E. Effects of hemoglobin vesicles, a liposomal artificial oxygen carrier, on hematological responses, complement and anaphylactic reactions in rats. *Artif Cells Blood Substit Biotechnol* 2007; 35: 157-172.
25. Sou K, Tsuchida E. Electrostatic interactions and complement activation on the surface of phospholipid vesicle containing acidic lipids: effect of the structure of acidic groups. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2008; 1778: 1035-1041.
26. Sou K, Klipper R, Goins B, Tsuchida E, Phillips WT. Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312: 702-709.
27. Taguchi K, Maruyama T, Iwao Y, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Tsuchida E, Kai T, Otagiri M. Pharmacokinetics of single and repeated injection of hemoglobin-vesicles in hemorrhagic shock rat model. *J Control Release* 2009; 136: 232-239.
28. 田口和明, 丸山徹, 小田切優樹. ヘモグロビン小胞体 (HBV) の体内動態特性. *人工血液* 2010; 17: 169-178.
29. Sou K, Goins B, Leland MM, Tsuchida E, Phillips WT. Bone marrow-targeted liposomal carriers: A feasibility study in nonhuman primates. *Nanomedicine* 2010; 5: 41-49.
30. Sou K, Goins B, Oyajobi BO, Travi BL, Phillips WT. Bone marrow-targeted liposomal carriers. *Expert Opin Drug Deliv* (in press)
31. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; 148: 2207-2216.
32. Erwig LP, Henson PM. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* 2008; 15: 243-250.
33. Greenberg ME, Li XM, Gugiu BG, Gu X, Qin J, Salomon RG, Hazen SL. The lipid whisker model of the structure of oxidized cell membranes. *J Biol Chem*. 2008; 283: 2385-2396.
34. Gao D, Ashraf MZ, Kar NS, Lin D, Sayre LM, Podrez EA. Structural basis for the recognition of oxidized phospholipids in oxidized low density lipoproteins by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI. *J Biol Chem* 2010; 285: 4447-4454.

35. Bochkov VN, Oskolkova OV, Birukov KG, Levonen AL, Binder CJ, St_ckl J. Generation and biological activities of oxidized phospholipids. *Antioxid Redox Signal* 2010; 12: 1009-1059.
36. Notman R, Noro MG, Anwar J. Interaction of oleic acid with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) bilayers simulated by molecular dynamics. *J Phys Chem B* 2007; 111: 12748-12755.
37. Hussain MM, Mahley RW, Boyles JK, Lindquist PA, Brecht WJ, Innerarity TL. Chylomicron metabolism. Chylomicron uptake by bone marrow in different animal species. *J Biol Chem* 1989; 264: 17931-17938.
38. Furze RC, Rankin SM. The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB J* 2008; 22: 3111-3119.
39. Rankin SM. The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *J Leukoc Biol* 2010; 88: 241-251.
40. Fliedner TM, Steinbach KH, Hoelzer D. Adaptation to environmental change: the role of cell-renewal systems. In: Finckh ES, ed. *The Effects of Environment on Cells and Tissues*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1976.
41. Fliedner TM, Graessle D, Paulsen C, Reimers K. Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure. *Cancer Biother Radiopharm* 2002; 17: 405-426.
42. Schettini DA, Ribeiro RR, Demicheli C, Rocha OG, Melo MN, Michalick MS, Frézard F. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. *Int J Pharm* 2006; 315: 140-147.
43. Chanan-Khan A, Miller KC, Musial L, Padmanabhan S, Yu J, Ailawadhi S, Sher T, Mohr A, Bernstein ZP, Barcos M, Patel M, Iancu D, Lee K, Czuczman MS. Bortezomib in combination with pegylated liposomal doxorubicin and thalidomide is an effective steroid independent salvage regimen for patients with relapsed or refractory multiple myeloma: results of a phase II clinical trial. *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 1096-1101.
44. Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G. Nanotheranostics and image-guided drug delivery: current concepts and future directions. *Mol Pharm* 2010; 7: 1899-1912.
45. Phillips WT, Goins B, Sou K, Bao A. Radiolabeled liposomes as theranostic agents. In: Goins B and Phillips WT, eds. *Nanoimaging*. Singapore: Pan Stanford Publishing Pte Ltd, 2011.

バイオ医薬品におけるプリオンの問題 ーヒト赤血球を原料とする人工酸素運搬体をめぐる問題ー

Current Situation of Prion Risks on Biological Products - Points on the Consideration for Prion Risk in Artificial Blood Products Derived from Human Red Cells -

柚木 幹弘^(1,2,3), 萩原 克郎⁽²⁾, 生田 和良⁽³⁾

Mikihiro Yunoki^(1,2,3), Katsuro Hagiwara⁽²⁾, Kazuyoshi Ikuta⁽³⁾

和文抄録

生体成分を原料とするバイオ医薬品やヒト血液成分を原料とする血漿分画製剤には感染性病原体の理論的混入リスクが存在する。そのため、製造工程における安全対策の導入と製造工程中の感染性病原体の不活化・除去能力の評価が求められている。本稿では、ヒト血液由来の赤血球を原料とする人工酸素運搬体を中心に、注目すべき感染性病原体のひとつであるプリオンの問題に関して、1) 疫学などの背景、2) 輸血領域で現在とられている施策、3) バイオ医薬品のプリオンに対する安全対策研究の現状、などについて概説する。

Abstract

Biological products derived from animal materials and human blood theoretically carry the possible risks of contamination with infectious pathogens. Therefore, to employ the safety measures against the risks during manufacturing process, evaluation for pathogen inactivation and/or removal ability during the manufacturing process steps in individual products are required. Prion issue is an important risk factor of the biological / blood products. In this manuscript, points to consider the above possibility such as 1) epidemiology and background of prion issue, 2) safety measures against prion risks in blood transfusion and blood products fields, and 3) current situation through several researches against prion risks in the field, are summarized.

Keywords

Prion, Biological product, Blood, Safety, vCJD

1. はじめに

抗体医薬を始めとするバイオ医薬品の基本的な製造手法は確立されており、原料や細胞由来の病原体混入リスクや製造工程における病原体等の不活化・除去能力の評価に関する多くの知見が集積されている。血液製剤や血漿分画製剤についても、多くの研究や対策の実施、教訓によって得られた数多くの知見の集積がある。一方、新しい領域の血液代替物は開発途上であるが故に、これらのリスク評価は研究成果の集積途上にあると言える。このような製剤には、その製剤特性を理解した上でバイオ医薬品や血液・血漿分画製剤で得られた知見からそのリスク

の全容を俯瞰し、製造工程をデザインした上で、その製剤のリスクを評価する必要がある。本稿では研究開発途上の血液代替物の一つであり、日本の献血血液由来の赤血球を原料とする人工酸素運搬体を中心にバイオ医薬品におけるプリオン問題の現状について概説する。

2. BSE 及び vCJD の発生

1986年、英国においてこれまでに確認されていない神経症状を呈するウシの疾患が流行していることが報告された。この疾患は狂牛病 (Mad Cow Disease) と一般的に報道されたが、学

(1) ㈱ベネシス安全管理部 品質安全対策グループ 〒541-8505 大阪市中央区北浜2-6-18 Pathogenic Risk Management, Benesis Corp. Pathogenic Risk Management, Benesis Corporation, 2-6-18, Kitahama, Chuo-ku, Osaka, 541-8505 Japan.

(2) 酪農学園大学大学院獣医学研究科 病原体リスク管理学講座 School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University

(3) 大阪大学微生物病研究所 ウイルス免疫分野 Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

論文受付 2010年1月23日 論文受理 2011年1月24日

術的には伝染性海綿脳症（Transmissible Spongiform Encephalopathy, TSE）のひとつであり、ウシ海綿脳症（Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE）と名付けられた。このBSE発生の原因が、ヒツジのTSEであるスクレイピーに感染した個体を含む肉骨粉の摂取によることが指摘され、BSEは羊のTSEの原因物質による感染によって生じることが疑われた。英国の公衆衛生当局は、英国国内の家畜飼料からこの肉骨粉を排除する決定と、ウシ全頭モニタリング制度を導入することにより、更なる流行の拡大を抑止した。BSEは全世界的に流行する事が懸念されたが、そのほとんどが英国での発生にとどまり1992年をピーク（年間発生頭数約37,000頭）にその発生は減少した（Fig. 1）^{1,2)}。

日本においては2001年にBSEの発生が初めて確認され、その後、英国と同様の全頭モニタリング制度の導入と全頭検査が導入された。日本では2010年12月現在で総計36例の発生が確認されている³⁾。

ところが、1996年に英国においてこれまでに確認されていない病態を呈するクロイツフェルトヤコブ病（Creutzfeldt-Jakob Disease, CJD）が報告された。この新しいヒトの疾患はこれまでのCJDとは違い若年性であることが特徴であるとされ、変異型CJD（Valiant CJD, vCJD）と命名された。このvCJDはBSE同様にほとんどが英国で発見され、その流行パターンがBSEのパターンと相関関係にあることから、vCJDの原因がBSE発症ウシ由来の原料の摂取によるものと疑われた。このvCJDはBSE同様に全世界的に流行・拡大することが懸念されたが大流行には至らず、全世界の現時点での総発生数は221名となっている。一番多く発生した英国では2000年に28例の発生をピークとした現時点の総計174名（内、生存4例）、続いてフランスの2005-2006年の6例をピークとする総計25名であった（図1）^{2,4)}。日本においては2004年にvCJD患者が1名（英国渡航歴有）発生している⁵⁾。

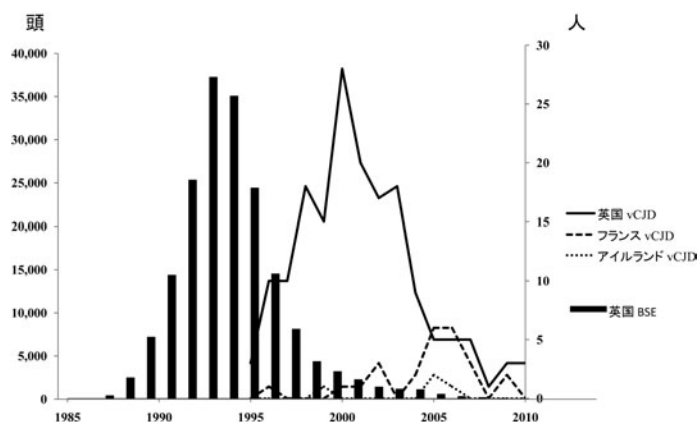


Fig. 1. BSEとvCJDの流行経過（引用1）2）より改変）。

3. 伝達性海綿状脳症の原因物質であるプリオン蛋白

CJD/vCJD, BSE, ScrapieなどのTSEの原因物質については長い間論争があったが、1982年にPrusinerがプリオン説を提唱したことで一定の収束を得た⁶⁾。プリオン（Prion）とは蛋白性の感染性粒子という意味であるProteinaceous Infectious Particleの短縮形造語であり、この感染性病原体はウイルス等と異なり遺伝情報を持たない蛋白質そのものである。ヒトの正常型プリオン蛋白（Celler Prion protein, PrP^c）はCD230と同じで、第20番染色体にPRNP遺伝子としてコードされている⁷⁾。病原体としての感染性プリオン蛋白質はウイルス等の外来性物質ではなく、宿主の蛋白分解酵素感受性で α ヘリックスリッチな構造をしているPrP^cが β シートリッチな構造をとる、蛋白分解酵素抵抗性（Proteinase resistance prion protein, PrP^{res}）の構造に変換したものである。これを異常型プリオン蛋白と呼ぶが、PrP^{res}の種類により蛋白質分解酵素への抵抗性は同じではない。この構造変換はPrP^{res}を種として、体内のPrP^cが次々にPrP^{res}に変化・結合・集積するものと考えられている。また、感染性プリオン蛋白は単量体でなく重合体として存在していると考えられ、粒子径10nm以下の重合体は感染性がなく、20～25nmの粒子径のものが最も感染性が高いとの報告がある⁸⁾。通常病原体はその存続のために宿主に感染・増殖し、遺伝情報の伝達により子孫を増やすというのが一般的な理解である。しかしながら、このプリオンは存続させるべき遺伝情報を持たないことから、これまでの概念に一石を投じることになった。これらのプリオン蛋白は、高次構造の違いを除いて宿主蛋白そのものであることから、新しい感染性病原体の概念がここに確立することになった。

4. 社会の反応

BSEとvCJDの関連性が指摘された事は、畜産を中心とした食品安全上のBSE問題を再び惹起する事となった。さらに、感染性プリオン蛋白は蛋白分解酵素に抵抗性であるだけでなく、121℃のオートクレーブ滅菌にも耐えるなど不活化が困難であることから、医薬品領域においても大きな問題を惹起した。医薬品にはゼラチンカプセルなどウシ由来の原材料が数多く使用されていることから、日欧米の規制当局はプリオンに関するガイダンスの制定や行政指導をおこなった。厚生労働省も、1996年にメーカーに対してウシ由来原材料の使用実態と原産国の把握を求めた⁹⁾、そしてプリオンに対するリスク評価を2000年に求めた¹⁰⁾。メーカーはこのBSE問題に対応するとともに、可能なものについてはウシ由来以外の原料への切り替えを行った。

ヒトや動物組織を原料とする蛋白医薬製剤は、その製剤化工程で強力な蛋白変性操作は導入されていない。そこで、ヨーロッパの規制当局は1998, 2003, 2004, 2009, 2010年にプリオンのリスク評価に関する見解を発出した^{11, 12, 13)}。日本においても2003年に厚生労働省よりプリオン対策強化が通知された¹⁴⁾。これを受け、ウシ組織抽出物由来の医薬品や血液製剤のメーカーは各蛋白医薬製剤に導入されている工程のプリオン除去能力

の評価を行い、必要に応じてプリオンに対するリスク低減のために、ウシ原産国の変更や新たな工程の導入を実施した。

5. CJDの疫学

ヒトのプリオン病であるCJDには孤発性CJD (Sporadic CJD, sCJD)、家族 (遺伝) 性CJD (Familial CJD, fCJD)、医原性CJD (iatrogenic CJD, iCJD) そしてvCJDがある。sCJDは55歳以上のヒトに約100万人に1人の割合で発症するCJDであるが、輸血などを通じてのヒト-ヒト感染例の報告は現時点ではない。医薬品への感染性プリオン蛋白の混入リスクが高いもののひとつに、輸血を始めとする血液製剤がある。献血後にvCJDに感染していることが判明したドナー由来の血液製剤を輸血された事例が英国で確認され、現時点で受血者4名がvCJDに感染したと考えられている¹⁵⁾。2010年のWHO見解ではヒト血液は低感染性組織のカテゴリーに分類され、vCJDの感染性あり、CJDは感染性なしと判断されている¹⁶⁾。更に、英国では血友病患者もモニタリングされている。本年、死亡した血友病患者の病理解剖を行ったところ、脾臓に異常型プリオン蛋白が発見された¹⁷⁾。この患者は生前に神経症状を発症していなかったにも関わらずvCJDに感染していた。英国健康保健局 (Health Protection Agency, HPA) 及び米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) は見解を出したが、そのリスクレベルの変更は行わなかった^{18,19)}。この事例は輸血製剤だけではなく血漿分画製剤でもリスクが残存することを示すことになった。2010年、欧米の規制当局はそれぞれ、メーカーが実施する製剤のリスクアセスメントに関するガイダンス (改定案) を発表した^{11,13,20)}。また、他の医原性感染として硬膜移植、ヒト脳下垂体由来製剤 (成長ホルモンなど)、角膜移植や手術器具を介しての感染も認められている^{21,22)}。

日本ではCJDのサーベイランスが実施されており、1999年から2009年までの間に確認された1324例のCJDは、sCJDが1019例 (77%)、fCJDが220例 (16.6%)、iCJD (全例硬膜移植) が80例 (6.0%、期間外を加えると総計138名))、vCJDが1例 (0.1%)、分類できないCJDが4例 (0.3%) であった²²⁾。この中で実際に輸血によるリスクがあると考えられるドナーとなりうるのはiCJDとvCJD患者由来であるが、手術歴などの確認によりiCJD患者がドナーになる可能性を排除しており、現実にはvCJDのリスクを検討する必要がある。日本のvCJDは現時点で1例であるが、英国渡航に由来してvCJDに感染するリスクと、その感染者が献血し、輸血を通して国内で感染が拡大するリスクを検討したところ、2007年までに0.06人が発症し、ポアソン分布を適用すると少なくとも1人の発生は否定できないが、2人以上の発生は極めて低いという結果が得られた。次に輸血による感染予測が行われた。モデル予測は、1) 1990年に20代前半の感染者が1名存在し、2) 輸血感染による潜伏期間は食餌による感染時と同じ、3) 汚染血の輸血で必ず感染、4) 輸血歴のある人や海外渡航歴のある人の献血制限は実施しない、5) 輸血経験者の死亡率は増加しないという条件で実施した。その結果、感染者数は2003年ごろにピークを迎え、累

積発症者数の増加は2010年代の前半ではほぼ終わり、0.563人という結果となった。これらの結果から、現在のBSE/vCJDの疫学状況等の知見が大きく変化しない限り、2010年以降の日本における輸血によるvCJD感染が現実には発生する可能性は非常に低いと考えられる²³⁾。

6. 血液及び血液成分のリスクとその低減策

プリオンリスクの実効的対策は、検査によるリスク排除である。現在、日本ではウシに対して世界でも例を見ない全数検査を行っており、世界的にも最高レベルの対策を取っている。これに加えて、餌の管理、臨床症状のモニタリング、イヤータグによる全数管理、屠場での解体方法や交差汚染の管理など、多くの対策を組み合わせることによってその安全性を確保している。ヒトのvCJDについてもウシの場合と同様に多数の検体を迅速に安価に検査する方法を開発する必要がある。vCJD検査の産業応用できる手法として、蛋白分解酵素を用いないELISA法が提案されている²⁴⁾。しかしながら産業応用可能でCJD/vCJDに有効な検査手法は現時点で開発されていない²⁵⁾。

血液は主に赤血球、血小板、白血球、血漿の画分に分けることができる。プリオン蛋白は細胞膜上に存在すると考えられていることから、血液細胞が輸血領域における主なプリオン伝播リスクであると考えられる。輸血によるvCJD感染リスクの低減策を講じる必要があるが、献血基準の中にCJD/vCJDリスクを低減させる問診項目として英国などの滞在歴を設定し、ドナーの適格性を確保している。また、白血球除去フィルターがプリオン除去に効果があるとされ、その効果が確認されているものもある^{25,26)}。血漿分画製剤の原料となる血漿については、更に6ヵ月の貯留保管を行った後に日本赤十字社からメーカーに出荷されることにより、採血 (原料) 段階でのリスク低減を行っている。更に、血漿分画製剤の製造工程においてプリオンを除去する工程を導入することによりその安全性の確保に努めている²⁷⁾。

7. 人工酸素運搬体

現在開発研究が進められている人工酸素運搬体の種類はいくつかあるが、その多くはヒト赤血球よりヘモグロビンを抽出・精製した高純度・高濃度のヒトヘモグロビン (Hb) 溶液を原料とし、脂質二重膜で包埋したりボソーム型又は非カプセル型架橋修飾・PEG修飾の形状をとる²⁸⁾。ヒト赤血球の大きさは約8μm、精製したHbは約4nmの大きさであり、これを小胞体に包埋した時の小胞体径は約200~250nmである^{28,29)}。これらの運搬体はHbをヒト赤血球から得ていることから、ドナー由来の病原体の混入が理論的なリスク因子として存在する。この人工酸素運搬体に使用されるHbは赤血球を出発原料として精製されるが、Hbの大きさが約4nmに対して、異常型プリオン蛋白単分子の分子量は約30,000、感染性プリオン蛋白の粒子は10nm以上の重合体⁸⁾と考えられる。Hbの精製工程におけるプリオン除去は血漿分画製剤の製造工程に導入されているプリオン除去手法を応用可能であると考えられ、人工酸素運搬体の製

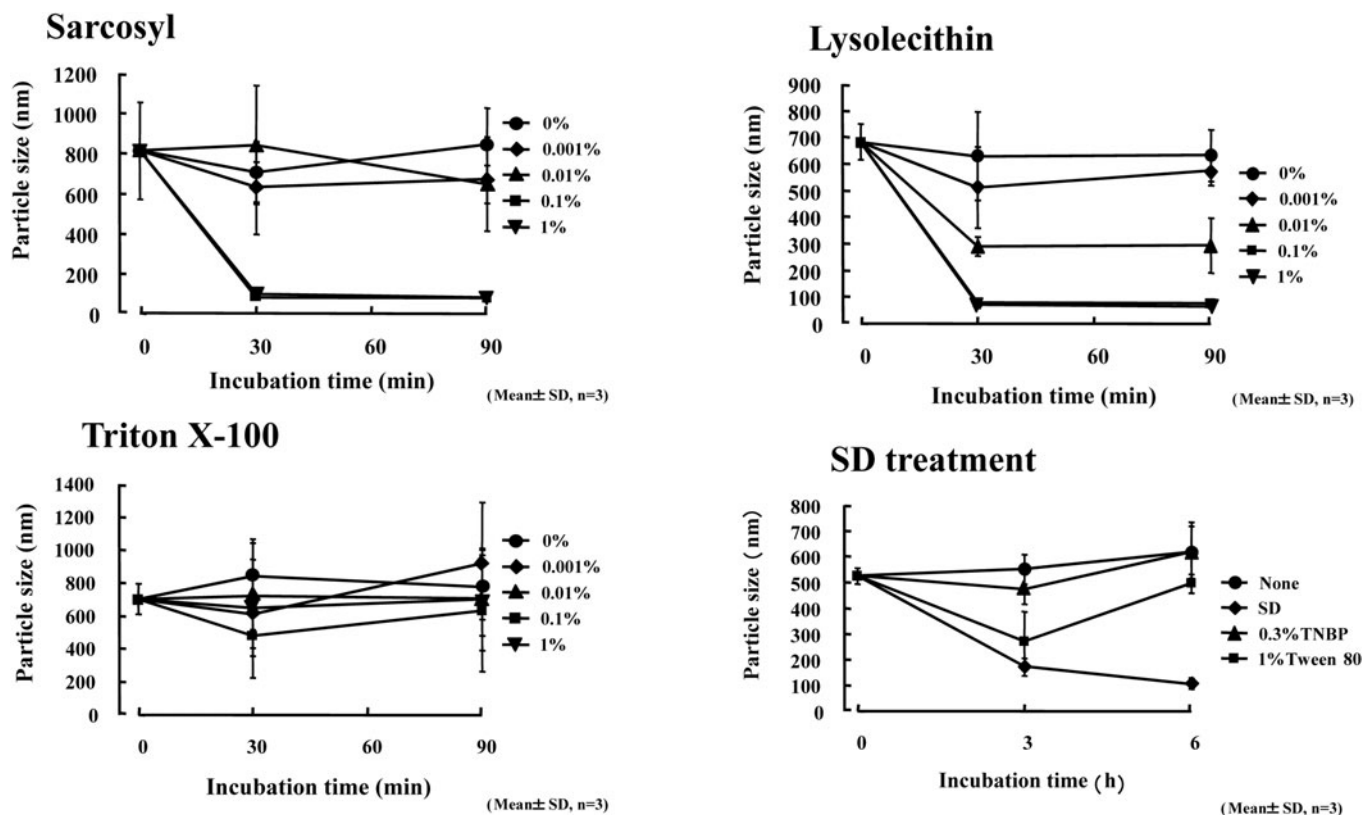


Fig. 2. 界面活性剤処理による263K株感染ハムスター脳由来マイクロソーム画分の粒子径変化（文献30より引用）。

造工程にプリオン除去工程を導入するには赤血球からヘモグロビンを精製する過程に導入するのが適している。

8. 工程評価を行う上でのプリオン材料調製法の問題

プリオン除去に関する工程評価を行う場合、感染動物の脳を出発材料として調製することが一般的である。プリオン研究初期には脳ホモジネート（Brain Homogenate, BH）を用いていたが、その後は精製操作を加えて膜画分（Microsomal Fraction, MF）が主に使われるようになった。本来、工程評価に用いるプリオン材料は感染動物の血液や血漿を用いることが望ましい。しかしながら、血液から工程評価に用いることができる量の感染性プリオン蛋白を得ることは困難であり、このMFを使用せざるを得ない。しかしながらMFは工程評価に用いる材料として最適化されたものではなかった。

そこで私たちは、ヒツジのスクレイピー株（Hamster adopted scrapie ハムスター263K）を用いてこのMFの粒子径に着目した工程評価材料としての適格性を検討した。MFの平均粒子径は約800nm程度あったのに対して、Sarcosyl や Lysolecithin や超音波処理によって短時間で、約200nm以下の平均粒子径にすることができた。ウイルス不活化に用いられるSD処理は用いられるTri(n-butyl) phosphate (TNBP) と Polyoxyethylensorbitan monooleate (Tween80) を組み合わせて長時間処理しないと平均粒子径を200nm以下に出来な

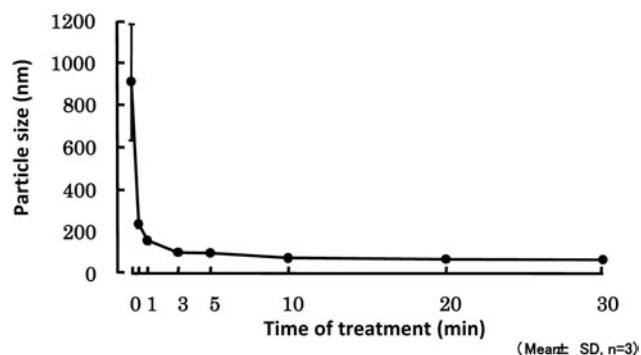


Fig. 3. 超音波処理による263K株感染ハムスター脳由来マイクロソーム画分の粒子径変化（文献30より引用）。

った。これに対して、Polyoxyethylene-p-isooctylphenol (Triton X-100) は平均粒子径に影響を与えなかった (Fig. 2, 3)³⁰⁾。また、MFをPBSに添加し220nm, 100nm, 75nm, 35nm, 19nm, 15nmのろ過膜でろ過したところ、100nmと75nmのろ過膜の結果において超音波処理の有無で除去効果（除去指数, Log Reduction Factor, LRF）に差が生じた (Table 1)³⁰⁾。このことより、工程評価に用いるプリオン材料はSarcosilやLysolecithinなどの界面活性剤処理や超音波処理を行う事が望ましいことが明らかになった。なお、超音波処理

Table 1. PBS中の263K株異常型プリオン除去（文献30より引用）。

公称膜孔径	PVDFフィルター				Planovaフィルター					
	220nm		100nm		72nm		35nm		15nm	
超音波処理	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし
ろ過前	4.2 / 3.5	3.5 / 4.2	4.2 / 3.5	3.5 / 4.2	4.2 / 4.2	3.5 / 4.2	4.2 / 4.2	3.5 / 4.2	4.2 / 4.2	3.5 / 4.2
ろ過後	3.8 / 3.8	3.1 / 3.8	3.8 / 3.1	2.4 / 3.1	2.4 / 2.4	<1.0 / <1.0	<1.0 / <1.0	<1.0 / <1.0	<1.0 / <1.0	<1.0 / <1.0
除去指数	0.4 / -0.3	0.4 / 0.4	0.4 / 0.4	1.1 / 1.1	1.8 / 1.8	≥2.5 / ≥3.2	≥3.2 / ≥3.2	≥2.5 / ≥3.2	≥3.2 / ≥3.2	≥2.5 / ≥3.2

ウエスタンブロッティング（WB法）による評価。

数値はNon-detectable endpoint法によって求めた総Log₁₀値で示した。

したMFは組成の変化がなく、工程サンプルに与える影響は最小限に止めることができるが、界面活性剤処理したMFは界面活性剤が残存することから工程サンプル及び評価に与える影響を考慮する必要がある。

次に、このプリオン材料が工程評価を行う上で、血液中の感染性プリオン蛋白をどこまで反映・再現させているかという問題がある。輸血でvCJDが伝播することが報告されており、血液細胞画分には膜結合蛋白であるプリオン蛋白が含まれることは予測できる。しかしながら血漿には感染性プリオン蛋白が細胞断片として含まれるのか、それとも可溶化画分として存在するのかについては不明点が多い。私たちは血漿分画製剤の製造工程に導入されているウイルス除去膜（平均膜孔径15nm）を用いて、実際の製造条件を模倣してプリオン蛋白の除去性能を評価した。この15nmのろ過膜はバイオ医薬品分野に産業応用できる世界で最も公称膜孔径の小さなウイルス除去膜である。この膜処理により、ウエスタンブロッティング（WB）法による評価でろ液中の異常型プリオン蛋白は検出限界以下にまで除去され3.5Log以上の除去指数を示した。これに対して、動物への接種実験ではろ液中の感染性プリオン蛋白は4.0Log以上の除去指数を示したものの、一部のサンプルで感染性を認めた。更にこの15nmろ液を150,000g、1時間の超遠心操作を行い、得られた上清画分と沈殿画分について感染実験を行った。この超遠心条件はプリオン蛋白を濃縮する時に採用されている条件であるが、驚くべきことに両方の画分に感染性が認められた（Table 2）^{30,31)}。感染動物の脳ホモジネートの超遠心上清に感染性が認められることはBerardiらが報告している³²⁾が、この上清画分に残存する感染性プリオン蛋白が15nmの膜を通過することが可能であることは新しい知見である。一方、Silveiraらは約20～25nmの重合体が最も感染性が高く、10nm以下の画分には感染性は認められなかったと報告している⁸⁾。15nmのウイルス除去膜はその孔径に近い粒子径を有するパルボウイルスなどを高負荷した時に一部のウイルスがろ液に認められることを経験している³³⁾が、15nm以下の大きさの感染性プリオン蛋白が膜を通過した可能性がある。一方、vCJD感染マウスの、赤血球、Buffy coat、血小板含有血漿、血漿等を正常マウスに

Table 2. 15nmろ過による異常型プリオン蛋白の除去（文献30, 31より引用）。

	Lysolecthin及び超音波処理263K		超音波処理263K	
	WB（定量）	BA（定量）	WB（定量）	BA（定性）
ろ過前	6.1 / 6.1	7.97 / 8.30	3.6	発症
ろ過後	<2.6 / <2.6	<3.25 / 4.30	<0.8	発症
除去係数	≥3.5 / 3.5	≥4.72 / 4.00	≥2.8	NA
超遠心沈殿	NA	NA	<1.0	発症
超遠心上清	NA	NA	<1.0	発症

WB：ウエスタンブロッティングによる評価。

数値はNon-detectable endpoint法によって求めた総Log₁₀値で示した。

BA：動物接種試験による定量又は定性評価。

定量評価は階段希釈サンプルを用い一群6匹の結果からKarbar法により、総ID50（Log₁₀）値で示した。

脳内又は静注にて接種したところ、赤血球画分には感染性が認められなかったものの、それ以外のサンプルすべてに感染性が認められた³⁴⁾。これらの結果はあくまで実験的に得られた現象であり、ヒト血漿中の存在様式を証明したものではないが、感染性プリオン蛋白はこれまでに知られている膜結合型としての存在様式に加えて、血漿中に可溶化又は非常に微細な画分（私たちは、Soluble like formとした）としても存在し得ることを示唆することとなった。

赤血球を原料とするHbを考える場合、混入してくるプリオン蛋白の形態として、膜由来（結合）とSoluble like formのプリオン蛋白の2つの存在様式が考えられる。血漿も同様に細胞断片及びSoluble like formの存在様式が理論的に考えられる。現在評価試験に用いているプリオン材料はその両方を含んでいることが実験結果から示されているので、評価結果は両方の存在様式を反映したものと思われる。しかしながら、Soluble like formの感染性プリオン蛋白の実態や血漿中の感染性プリオン蛋白の存在様式に関する知見はほとんどないので、Soluble like formの意味についての更なる研究が求められる。

9. 工程評価を行う上でのプリオン株の問題

現在工程評価にはvCJDのモデルとして、263K株などが主に使用されている。これは263K株が長期にわたりプリオン研究に用いられてきており、評価手法が確立していたことや、BSEやvCJDの動物馴化株がなかったことによる。しかしながら、263K株を評価に用いる場合は、BSE株、vCJD株の持つ蛋白分解酵素（PK）への抵抗性等の性状が異なる可能性があることを考慮する必要がある。また、再利用するデバイスや設備などのプリオン清浄化（不活化）に関しても、プリオン蛋白の持つ性状から慎重にその条件を設定する必要がある³⁵⁾。これらのことから、vCJDやBSEのモデルとして263K株を用いることによる影響を工程条件設定時や評価時には必ず意識しておくべきである。

米国赤十字のAkimovらは、vCJDのマウス馴化株及び細胞培養法を樹立した³⁶⁾。私たちはこの株と関連技術を導入し、vCJDを直接用いた評価試験技術確立とvCJDのモデルとしての263K株の妥当性に関する検討を進めている。vCJD感染マウス脳由来の超音波処理プリオン材料を用いて15nmろ過膜による異常型プリオン蛋白の除去特性をWB法で評価したところ、2.8Logの除去指数を示したものの、ろ液中に異常型プリオン蛋白を認めた（Table 3）³⁷⁾。この結果から、同じ方法で調製したプリオン材料を用いたろ過実験では、263K株も、vCJD株も同様のろ過（除去）特性を示すことが明らかになった。しかしながら263K株はこれまでWBレベルで15nmろ過後液には検出された事がなかったのに対して、vCJD株は検出された。この結果は検出感度によるものなのか、263K株とvCJD株由来の異常型プリオンの物性の違いによるものなのか、現時点で判断することはできない。感染性を含めた詳細を更に検討する必要がある。

Table 3. 15nmろ過膜によるvCJD及び263K由来・超音波処理マイクロソーマル画分中の異常型プリオン蛋白の除去。

	vCJD	263K
ろ過前	3.1	4.2
ろ過後	0.3	<1.0
除去指数	2.8	≥3.2

ウエスタンブロッティング（WB法）による検出。

数値はNon-detectable endpoint法によって求めた総Log₁₀値で示した。

10. リスク評価を行う上での留意点

工程評価を行う上でのプリオン材料の留意点は上述の通りであるが、製剤のリスク評価を行うにあたっては他にも留意すべき点がある。まず、製剤のリスク評価はいくつかの施策の組合せによって完成するという点が挙げられる。人工酸素運搬体のリスク評価を行う場合、原料に対する評価と工程に対する評価が基本となる。そしてその製剤を投与される患者に対するリスク・ベネフィットに基づき有用性の判断を行うことになる。

原料に対する評価は、1ロットの製剤を製造するための原料

（赤血球）に異常型プリオン蛋白が混入する量を疫学的に推定することによって行う。現在、日本では輸血によるvCJDの発生確率は1人と考えられている²³⁾。現在、ヒト血液中のvCJDの感染価を定量的に推測することができないが、英国ではvCJDに汚染していると思われる輸血例66例中4例が感染している³⁸⁾。vCJD感染マウスのBuffy coat、赤血球及び血漿を静注ルートによりマウスに感染させたところ、Buffy coatと血漿は感染性を示し、赤血球画分は感染性を示さなかった³⁴⁾。これらの知見に基づけば、日本の献血由来のvCJD陽性原料を製造に用いる可能性はほとんどないと解釈されるが、原料画分には感染性が認められることから、任意のロットに混入する推定最大量は1単位（ドナー）となる。よって、工程の評価はこれを基準として考えることになる。

具体的な対策として、次の対策が考えられる。まず、採血時に白血球除去膜処理を導入し、原料段階でのリスク低減策を講じる。白血球除去膜は白血球除去によるリスク低減に加え、プリオン蛋白そのものの除去が期待できる。しかしながら白血球除去膜によるプリオン蛋白除去については一部の製品を除き評価は定まっていない^{11, 12, 25)}。次に製造工程におけるリスク低減を行う。工程にはプリオン除去の堅牢性を確保するために、除去能力を示す複数の工程を導入する。この能力についてはガイドラインに従って評価する必要がある。ウイルスを対象とした評価においては数値目標が設定されているが、プリオンを対象とした評価では現時点で数値目標は設定されていない^{39, 40, 41)}。このことから、プリオンを対象とした評価において、目標とする数値の妥当性や必要とする安全係数についての更なる議論が必要であり、得られた数値（RLF）だけで安全性を判断するのは時期尚早である。むしろ、製造工程中にプリオン除去の機作が異なる工程を複数導入することによってセーフティーネットを構成する方が効果的であり、工程の堅牢性も高くなると考えられる。

血漿分画製剤やHb精製工程に導入可能と思われるデバイスは、採血時の白血球除去フィルターの他に、ウイルス除去フィルター、デプスフィルター、荷電された除菌・清澄ろ過フィルター等があり、蛋白質の精製工程としては、エタノール分画、硫酸分画、ポリエチレングリコール分画、クロマトグラフィー等が考えられ、複数の工程対応は可能と考えられる。なお、目標とする除去係数やその妥当性を評価するために血液中の感染性プリオンの性状や感染価についての更なる研究が望まれる。

工程での除去能力はプリオンに対する安全性確保の根幹となるので慎重な試験デザインと解釈が求められる。基本的な手法はガイドライン^{11, 39, 40, 42)}に記述されているが、ガイドラインは策定時のMinimum requirementであって、指針のひとつにすぎない。よって、実際にはその製剤と製造工程の特性を良く理解した上でデザインしなければならない。工程のプリオン除去評価を行うにあたって、WBレベルで検出限界以下になったプリオン除去に関する重要工程については、動物への接種実験で感染性の有無を確認することが望ましい⁴³⁾。また、プリオン蛋白の実態が良く分かっていない以上、不十分な知識や誤解に基

づくデザインによる評価試験の結果解釈は誤った判断を導く可能性を秘めていることを明確に理解しておかなければならない。製剤の有効性と安全性は承認審査の時に評価されるが、有用性は科学技術の進歩により得られたプリオンに関する新しい知見に基づき、その時々には評価・確保されなければならないことも理解しておくべきである。

謝辞

本研究の一部は大阪大学微生物病研究所、酪農学園大学獣医学部、米国赤十字、ベネシスの共同研究として実施された。また、本研究の一部は厚生労働科学研究（H22－医薬－一般－006）として実施された。本稿を執筆するにあたって、（株）ベネシ岡島文子氏、池田美朗氏の貢献に深謝します。これらの共同研究の成果が血液製剤領域のみならずバイオ医薬品領域の安全性向上に役立つことを願います。

引用文献

1. World Organization for Animal Health. Number of reported cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in farmed cattle worldwide. http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm (2010.12.22 downloaded)
2. 食品安全委員会. 「牛海綿状脳症 (BSE) と変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD)」について. http://www.fsc.go.jp/sonota/faq_bse-tori.html (2010.12.22 downloaded)
3. 農林水産省. BSE患者発生状況. http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/bse/b_kantiku/index.html (2010.12.22 downloaded)
4. The European Creutzfeldt Jakob Disease Surveillance Network. vCJD cases Worldwide. <http://www.eurocjd.ed.ac.uk/> (2010.12.22 downloaded)
5. Eurosurveillance editorial team. First case of vCJD reported in a Japanese patient. Eurosurveillance. 10 February 2005; 10(6). <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2640> (2011.1.9 downloaded)
6. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science. 1982; 216: 136-44.
7. Robakis NK, Devine-Gage EA, Jenkins EC, Kascsak RJ, Brown WT, Krawczun MS, Silverman WP. Localization of a human gene homologous to the PrP gene on the p ARM of chromosome 20 and detection of PrP-related antigens in normal human brain. Biochem Biophys Res Commun 1986; 140: 758-765.
8. Silveira JR, Raymond GR, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, Caughey B. The most infectious prion protein particles. Nature 2005; 437: 257-261.
9. 厚生省薬務局審査課・薬務局医療機器開発課. ウシ由来物を用いた医薬品等に関する調査依頼について. 薬審第165号 平成8年3月27日.
10. 厚生省医薬安全課長. ウシ等由来物を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について. 医薬発第1226号 平成12年12月12日.
11. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medical Agency. CHMP position statement on Creutzfeldt-Jakob disease and plasma-derived and urine-derived medicinal products. Draft EMEA/CPMP/BWP/2879/02/rev 2. 24 June 2010.
12. European Medical Agency. Concept Paper on the Need To Update the CHMP Position Statement on CJD and Plasma-Derived and Urine-Derived Medicinal Products. EMEA/CHMP/BWP/253246/2009. 23 July 2009. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003742.pdf (2011.1.8 downloaded)
13. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) and Committee for Advanced Therapies (CAT), European Medicines Agency. CHMP/CAT position statement on Creutzfeldt-Jakob disease and advanced therapy medicinal products. Draft, EMEA/CHMP/CAT/BWP/353632/2010. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/07/WC500095069.pdf (2010.12.24 downloaded)
14. 厚生労働省医薬局長. ウシ等由来物及び人由来物を原料として製造される医薬品、医療器具等の品質及び安全性確保の強化について. 医薬発第0414005号 平成15年4月14日
15. National Blood Service Scottish National Blood Transfusion Service Welsh Blood Service and Northern Ireland Blood Transfusion Service National CJD Surveillance Unit. TRANSFUSION MEDICINE EPIDEMIOLOGY REVIEW (TMER). <http://www.cjd.ed.ac.uk/TMER/TMER.htm> (2010.12.25 downloaded)
16. World Health Organization. Tables on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible Spongiform Encephalopathies Updated 2010, WHO/EMP/QSM/2010.1. <http://www.who.int/bloodproducts/tablestissueinfectivity.pdf> (2010.12.25 downloaded)
17. Peden A, McCardle L, Head MW, Love S, Ward HJ, Cousens SN, Keeling DM, Millar CM, Hill FG, Ironside JW. Variant CJD infection in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with haemophilia. Haemophilia 2010; 16: 296-304.
18. vCJD abnormal prion protein found in a patient with haemophilia at post mortem. Health Protection Agency. Press release, 17 February 2009. <http://www.hpa.org.uk/NewsCentre/NationalPressReleases/2009PressReleases/090217vCJDABNORMALPRIONPROTEINFOUNDINAPATIENTWITH/> (2010.12.24 downloaded)
19. 21st Meeting of the Transmissible spongiform Encephalopathies Advisory Committee. June 12, 2009.

- <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/Calendar/UCM164322.pdf>
20. A 2010 Update of the Draft Quantitative Risk Assessment of vCJD Risk Potentially Associated with the Use of Human Plasma-Derived Factor VIII Manufactured Under United States (US) License From Plasma Collected in the US. October 6, 2010. Center for Biologics Evaluation and Research US Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/TransmissibleSpongiformEncephalopathiesAdvisoryCommittee/UCM231018.pdf> (2010.12.24 downloaded)
 21. ヒト・プリオン病－感染症としての変遷と新たな課題. 萩原健一, 山河 芳夫, 花田 賢太郎. ウイルス. 2009; 59: 155-166
 22. 薬事・食品衛生審議会 平成21年度 第3回 血液事業部会運営委員会資料「変異型Creutzfeldt-Jakob病 (vCJD) の国内外の発生状況」. 山田正仁. <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/12/dl/s1210-8n.pdf> (2010.12.25 downloaded)
 23. 薬事・食品衛生審議会 平成21年度 第3回 血液事業部会運営委員会資料「英国渡航に由来するvCJD感染リスクの評価と献血制限のあり方について」. 梯 正之. <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/12/dl/s1210-8o.pdf> (downloaded 2010.12.25)
 24. Tattum MH, Jones S, Pal S, Khalili-Shirazi A, Collinge J, Jackson GS. A highly sensitive immunoassay for the detection of prion-infected material in whole human blood without the use of proteinase K. *Transfusion*. 2010; 50: 2619-2627.
 25. FDA. Informational Issue Summary, FDA's Currently-Recommended Policies to Reduce the Possible Risk of Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) by Blood and Blood Products Transmissible Spongiform Encephalopathies Advisory Committee 22nd Meeting October 28-29, 2010. <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/BloodVaccinesandOtherBiologics/TransmissibleSpongiformEncephalopathiesAdvisoryCommittee/UCM231179.pdf> (2010.12.25 downloaded)
 26. 日本赤十字社ホームページ. <http://www.jrc.or.jp/donation/refrain/detail/detail09.html> (2010.12.25 downloaded)
 27. Yunoki M, Urayama T, Ikuta K. Possible removal of prion agents from blood products during the manufacturing process. *Future Virol* 2006; 1: 659-674.
 28. 人工赤血球. *New Current*. 2006.9.1; 17: 2-10.
 29. 武岡真司. 分子集合科学を利用した人工血液の創世. *人工血液* 2005; 13: 136-147.
 30. Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Hattori S, Ohtani M, Narita Y, Kawabata Y, Miyatake Y, Nanjo A, Iwao E, Morita M, Wilson E, MacLean C and Ikuta K. Prion removal by nanofiltration under different experimental conditions. *Biologicals* 2008; 36: 27-36.
 31. Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Kanai Y, Nishida A, Yoshikawa M, Ohkubo Y, Kawabata Y, Hagiwara K, Ikuta K. Infectious prion protein in the filtrate even after 15nm filtration. *Biologicals*. 2010; 38: 311-313.
 32. Berardi VA, Cardone F, Valanzano A, Lu M, Pocchiari M. Preparation of soluble infectious samples from scrapie-infected brain: a new tool to study the clearance of transmissible spongiform encephalopathy agents during plasma fractionation. *Transfusion*. 2006; 46: 652-8.
 33. 柚木幹弘, 浦山健, 西田真直, 辻川宗男, 堀井肇, 西槇秀雄, 上村八尋, 鍵谷昌男, 佐藤進一郎, 加藤俊明, 関口定美. Antithrombin-III製剤の製造工程のウイルスバリデーション試験. *医薬品研究*. 1999; 30: 331-341.
 34. Cervenakova L, Yakovleva O, McKenzie C, et al: Similar levels of infectivity in the blood of mice infected with humanderived vCJD and GSS strains of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 2003; 43: 1687-1694.
 35. Lee D*, Lebing W, Stenland C, Petteway S. Methods of inactivation of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) as applied to production chromatography processes. *DownStream* 27: 18-22. [http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/B1A81AC9A032FB48C1257628001CD8A9/\\$file/18113084.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/B1A81AC9A032FB48C1257628001CD8A9/$file/18113084.pdf) (2011.1.9 downloaded)
 36. Akimov S, Yakovleva O, Vasilyeva I, McKenzie C, Cervenakova L. Persistent propagation of variant Creutzfeldt-Jakob disease agent in murine spleen stromal cell culture with features of mesenchymal stem cells. *J Virol*. 2008; 82: 10959-19562. Epub 2008 Aug 20.
 37. 久保 純, 大久保祐士, 中川 典子, 佐々木祐子, 柚木 幹弘, Larisa Cervenakova, 萩原 克郎, 生田 和良. vCJDを用いた血漿分画製剤の工程評価. 第58回日本ウイルス学会学術集会 (2010徳島)
 38. Shimian Z, Chyang TF, Lawrence B. Schonberger. Transfusion transmission of human prion diseases. *Transfusion Med Rev* 2008; 20: 58-69
 39. The European agency for the evaluation of medicinal products/committee for proprietary medical products (CPMP) biotechnology working party: Note for guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. CPMP/BWP /268/95. 14 Feb. 1996.
 40. 厚生省医薬安全局長. 血漿分画製剤のウイルスに対する安全性確保に関するガイドラインについて. 医薬発第1047号 1999.8.30

41. 厚生労働省医薬食品局長.「血液製剤等に係る遡及調査ガイドライン」の一部改正について. 薬食発第1226008号, 薬食発第1226009号, 薬食発第1226010号, 薬食発第1226011号. 平成20年12月26日

42. 厚生省医薬安全局審査管理課長.「ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウイルス安全性評価」について. 医薬審第329号 平成12年2月22日

血小板の活性化機能：ADPの果たす役割

Molecular mechanism for platelet activation: a role for ADP

富山 佳昭
Yoshiaki Tomiyama

和文抄録

血小板がその止血機能を発揮する際、血小板内から放出されるアデノシン二リン酸（ADP）が重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。血小板ADP受容体としてはG蛋白共役型受容体であるP2Y₁およびP2Y₁₂が存在するが、特にP2Y₁₂はG_i蛋白を共役しており、ADP刺激による細胞内cAMPの低下を惹起し血小板機能発現に極めて重要な役割を担っている。このP2Y₁₂の重要性は、P2Y₁₂欠損患者における出血傾向、P2Y₁₂欠損血小板を用いたex vivo実験での血栓形成能の障害からも明らかである。P2Y₁₂を介したシグナルはフィブリノゲン受容体であるインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb-IIIa)の活性化を持続させるために必須であり、最終的に止血血栓の安定化に寄与している。さらに、最近ではチエノピリジン系P2Y₁₂阻害剤の優れた抗血栓作用が明らかにされ、P2Y₁₂が抗血小板薬の分子標的としても注目されている。

Abstract

Recent advance in platelet biology has revealed that adenosine-5'-diphosphate (ADP) play a crucial role in platelet function. Platelets possess at least two major G protein-coupled ADP receptors: P2Y₁ and P2Y₁₂. P2Y₁₂ is a G_i-coupled receptor responsible for mediating the inhibition of adenylyl cyclase and sustained platelet aggregation. The importance of P2Y₁₂ is underscored by the clinical features of patients with P2Y₁₂ deficiency and ex vivo experiments using P2Y₁₂-deficient platelets. ADP interaction with P2Y₁₂ plays a critical role in the maintenance of $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation. Moreover, P2Y₁₂ is now the target of efficacious antithrombotic thienopyridine agents such as clopidogrel and prasugrel.

Keywords

ADP, P2Y₁₂, integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, bleeding tendency

1. はじめに

人工血小板の作製において、血小板による止血機構の詳細な解析は血小板機能発現の中核を成す分子を同定する上においても必要不可欠である。血管が傷害され血管内皮が脱落すると、流血中の血小板は血管内皮を裏打ちしている血管内皮下組織、主としてコラーゲン線維、に曝露され直ちに活性化し血管傷害部位を閉塞し止血する。この過程は、① 血小板粘着 → ② 血小板活性化と放出反応 → ③ 血小板凝集、の段階により構成されており、その主要な分子機構を図1に示す^{1,3)}。血小板膜に存在する接着分子受容体であるGPIb-IXやインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb-IIIaとも呼ばれている)はそれぞれ血小板の初期の粘着と、血小板凝集に必須の糖蛋白であるが、これらの糖

蛋白に加え血小板内から放出されるアデノシン二リン酸（ADP）とその受容体であるP2Y₁₂の重要性が明らかとなっている。

2. P2Y₁₂の血小板における機能

血小板活性化物質であるADPは赤血球内にも存在するが、血小板内においては濃染顆粒内に貯蔵されている。血小板10¹¹個あたり約2.5 μ mol存在し、血小板の活性化に伴い細胞外に放出され血栓形成局所においては数 μ Mの濃度になると考えられる。放出されたADPはさらなる血小板の活性化を促す。ADPはin vitroの血小板凝集惹起作用に関してその活性は決して強力ではないものの、生体内での血栓形成において極めて重要な

大阪大学医学部附属病院 輸血部 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-15 Department of Blood Transfusion, Osaka University Hospital, 2-15 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, JAPAN

論文受付 2010年12月14日 論文受理 2011年1月24日

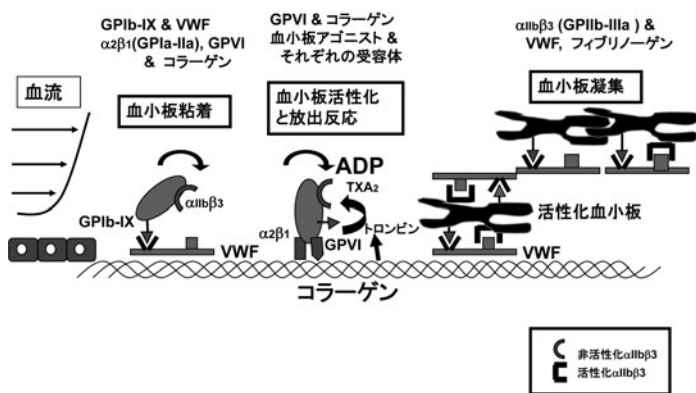


図1. 止血栓形成の分子機構（文献3より引用）。止血栓および病的血栓の形成過程は1）血小板粘着 → 2）血小板活性化と放出反応 → 3）血小板凝集の段階により構成されている。血小板粘着にはGPIIb-IXが、血小板凝集にはインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb-IIIa)が必須であるが、血小板から放出されるADPは血小板活性化反応および $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化を維持する上で極めて重要である。

役割を担っている。血小板は2種類のADP受容体を有しており、1996年にP2Y₁が⁵、2001年にP2Y₁₂が同定された⁴⁾。どちらも7回膜貫通型の受容体でありG蛋白が共役している（図2）。ヒトではこれらの遺伝子は3番染色体の長腕に存在し、P2Y₁は373個の、P2Y₁₂は342個のアミノ酸から構成されている。ADP刺激により同時にこれら2つの受容体が作動するが、P2Y₁受容体はG蛋白質のGaqを共役しており、ホスホリパーゼC（PLC）を活性化し、細胞内Ca²⁺イオンの上昇、血小板の形態変化（shape change）や一過性の血小板凝集を惹起する。一方、P2Y₁₂受容体はGaiを共役しており、ADP刺激による細胞内cAMPの低下を惹起すると共に、放出反応の増強や血小板凝集の安定化に必要である（図2）^{5,6)}。

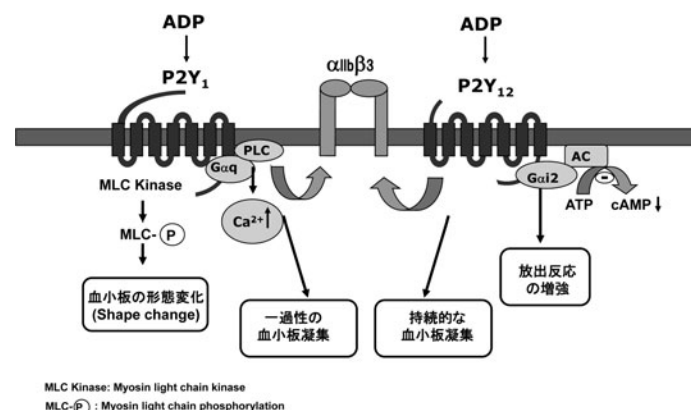


図2. 血小板におけるADP受容体（文献5を一部改変し引用）。血小板は2種類のADP受容体（P2Y₁およびP2Y₁₂）を有しており、P2Y₁受容体はGaqを介して、ホスホリパーゼC（PLC）を活性化し、細胞内Ca²⁺イオンの上昇、血小板の形態変化（shape change）や一過性の血小板凝集を惹起し、P2Y₁₂受容体はGai2を介して、アデニル酸シクラーゼ（AC）を抑制し、細胞内cAMPの低下を惹起すると共に、血小板の持続的な凝集に必要である。

3. P2Y₁₂欠損患者の臨床症状

筆者らは本邦初のP2Y₁₂欠損患者を同定しているが、この患者ではP2Y₁₂の翻訳開始コドンATGがAGGに変異するホモ接合体異常を有しており、その結果P2Y₁₂が完全に欠損していた。臨床症状としては出血時間の延長と軽度の出血傾向が認められた。過去に出産2回、中絶1回を経験しているが、出血量は多かったものの輸血するほどの多量出血ではなかった。この患者の血小板凝集能検査を図3に示す⁷⁾。ADP惹起血小板凝集が極端に障害されているのが解る。さらに興味深いこととしてADP以外にも、低濃度のコラーゲンやU46619（トロンボキサンA₂のアナログ）に対しても血小板凝集が障害されていた。このように、ADP以外の血小板活性化物質の刺激により血小板が凝集する場合においても活性化血小板から放出されたADPは血小板凝集に重要な機能を担っていることが理解できる。

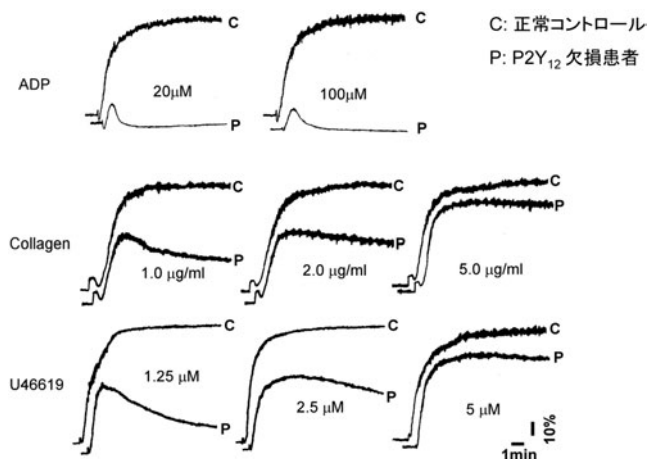


図3. ADP受容体P2Y₁₂欠損患者における血小板凝集異常（文献7より引用）。ADP受容体P2Y₁₂が欠損すると、ADP以外にも、コラーゲンやTXA₂アナログであるU46619に対しても血小板凝集が障害され、血小板凝集塊は極めて脆弱となる。

血小板凝集には血小板膜上の接着分子受容体であるインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb-IIIa)の活性化が必要不可欠である。 $\alpha_{IIb}\beta_3$ はフィブリノゲンおよびフォンビルブランド因子の受容体であり、活性化型となって初めてその機能を発揮する。この $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化は活性化型の $\alpha_{IIb}\beta_3$ のみを認識するユニークなPAC1抗体の結合で解析可能である。図4に示すように、強力な血小板活性化物質であるトロンピンで血小板を活性化させると $\alpha_{IIb}\beta_3$ が活性化すると共に、 α 顆粒放出の指標であるPセレクチンが発現してくる。筆者らは、P2Y₁₂阻害剤を添加しない状態で血小板をトロンピンで活性化させ、活性化が完了した時点においてP2Y₁₂阻害剤を加えると、Pセレクチンの発現は変化しないがPAC1抗体の結合が低下し $\alpha_{IIb}\beta_3$ が非活性化状態に戻ることを明らかにした⁸⁾。この成績は、トロンピン刺激による $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化の持続には血小板から放出されたADPとP2Y₁₂の反応が必須であり、この反応が阻害されると $\alpha_{IIb}\beta_3$ が非活性化型に戻

ることを示している（図4）。生体に近い条件にすべく、血流下でのex vivoでの血栓形成実験を行なうと、P2Y₁₂欠損血小板では血栓形成能が悪く正常血小板による血栓に較べ約半分の高さの血栓しか形成できず、また形成された血栓も極めて脆弱であることが明らかとなった⁷⁾。このようにP2Y₁₂が欠損すると $\alpha_{IIb}\beta_3$ の安定した活性化が阻害される結果、血小板凝集反応が障害され血栓形成が脆弱となり、また血栓サイズも減少することが示された。

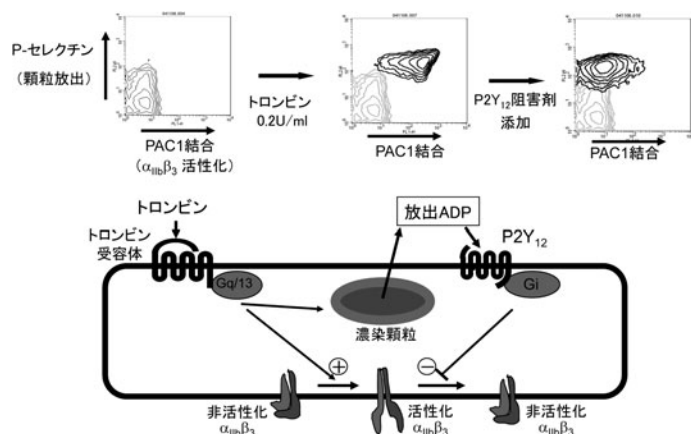


図4. P2Y₁₂のインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化維持機構。トロンピンで血小板を活性化させると $\alpha_{IIb}\beta_3$ が活性化（= PAC1の結合）すると共に、 α 顆粒放出の指標であるPセレクトインが発現するが、P2Y₁₂阻害剤を加えると、Pセレクトインの発現は変化しないがPAC1抗体の結合が低下し $\alpha_{IIb}\beta_3$ が非活性化状態に戻る。このようにP2Y₁₂を阻害すると $\alpha_{IIb}\beta_3$ の安定した活性化が障害される。

4. P2Y₁₂阻害薬の臨床成績

P2Y₁₂阻害剤としてはチエノピリジン系抗血小板薬であるチクロピジン、クロピドグレルやprasugrelが知られており、これらの薬剤は優れた抗血栓作用を有することが示されている^{5,6)}。クロピドグレル75mg/日は、アスピリン325mg/日との二重盲検比較試験においてハイリスク患者における血管性イベント（脳梗塞、心筋梗塞、末梢動脈疾患）を約8.7%減少させた（CAPRIE試験）⁹⁾。さらに、クロピドグレルと比べより効果発現が早くより強力な作用を有するP2Y₁₂阻害剤、prasugrelとクロピドグレルとの二重盲検比較試験が行われた（TRITON-TIMI38試験）¹⁰⁾。prasugrel群の血管性イベントはクロピドグレル群よりも約18%減少したものの（prasugrel群9.9%、クロピドグレル群12.1%）、出血合併症は約33%増加した（prasugrel群2.4%、クロピドグレル群1.8%）¹¹⁾。これらの成績は、より強力なP2Y₁₂阻害は血管イベントの抑制効果は増強するが、一方では血小板機能を障害し出血の合併症も増加させることを示している。

5. おわりに

血小板からの放出ADPとその受容体であるP2Y₁₂は、血小板の止血機能に極めて重要な役割を担っている。これらの成績より、ADPを内包した人工血小板の作製は、血管傷害部位において局所ADP濃度を上昇させることにより流血中の血小板を必要な部位に効率よくリクルートし安定な止血血栓を形成することに寄与すると推察される。

謝辞

本研究の一部は、独立行政法人日本学術振興会科学研究費補助金および厚生労働科学研究費補助金の助成を受けた。

文献

1. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 1998; 94: 657-666.
2. Kulkarni S, Doppeide SM, Yap CL, et al. A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest* 2000; 105: 783-791.
3. 富山佳昭. 血栓形成のメカニズム up-to-date. *Angiology Frontier* 2007; 6: 11-17.
4. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001; 409: 202-207.
5. Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 2001; 86: 222-232.
6. Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation. *J Clin Invest* 2004; 113: 340-345.
7. Shiraga M, Miyata S, Kato H, et al. Impaired platelet function in a patient with P2Y₁₂ deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2315-2323.
8. Kamae T, Shiraga M, Kashiwagi H, et al. Critical role of ADP interaction with P2Y₁₂ receptor in the maintenance of $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation: association with Rap1B activation. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1379-1387.
9. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996; 348: 1329-1339.
10. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2007; 357: 2001-2015.
11. Wiviott SD, Braunwald E, Angiolillo DJ, et al. Greater clinical benefit of more intensive oral antiplatelet therapy with prasugrel in patients with diabetes mellitus in the trial to assess improvement in therapeutic outcomes by optimizing platelet inhibition with prasugrel-thrombolysis in myocardial infarction 38. *Circulation* 2008; 118: 1626-1636.

日本血液代替物学会 総会

1. 日 時 :
平成22年10月18日 (月) 18:00～
2. 場 所 :
熊本市国際交流会館大ホール
〒860-0806 熊本県熊本市花畑町4-8

3. 議 題 : ① 第17回年次大会の報告
② 会員動向
③ 平成21年度事業報告
④ 平成21年度会計報告
⑤ 平成22年度事業計画

以下審議内容を略記します。

①年次大会の開催状況として下記事項が報告された。

- 1) 第17回日本血液代替物学会年次大会
- 2) 平成22年10月18日 (月)・19日 (火)
- 3) 熊本県熊本市花畑町4-8 熊本市国際交流会館
- 4) 日本血液代替物学会会員、
臨床医学・理工学研究者、
国内の大学および医療機関臨床医、
血液センター関係者の参加があった。

②会員状況は以下のとおり。

- 1) 維持会員：4 社
- 2) 賛助会員：1 社
- 3) 学生会員：1 名
- 4) 正会員：121名
- 5) 購読会員：15箇所

③平成21年度事業報告(平成21年4月1日～平成22年3月31日)
が行われ各々承認された。

- 1) 定期総会の開催
平成21年10月17日 (土) 慶應義塾大学信濃町キャンパス北里講堂にて開催。
- 2) 第16回年次大会 (大会長 高折益彦)
平成21年10月16日 (金)・17日 (土)
慶應義塾大学信濃町キャンパス北里講堂にて行われた。
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第17巻1号～4号

④平成21年度収支決算報告が行われ承認された。

平成21年度 会計 収支決算表
(自 平成21年4月1日 至 平成22年3月31日)

収 入		支 出	
摘 要	金 額	摘 要	金 額
前期繰越金	7,983,390	会誌出版費	3,057,905
正会員会費	410,000	集会・委員会費	585,240
入会金	10,000	年会補助金	1,245,278
維持会員会費	8,000,000	ホームページ維持費	610,680
賛助会員会費	200,000	事務人件費	3,000,525
購読会員会費	48,000	事務費	314,424
雑収入	45,670	次期繰越金	7,906,468
利息	23,460		
計	16,720,520	計	16,720,520

⑥平成22年度事業 (実績報告)

- 1) 定期総会の開催
平成22年10月18日 (月) 於 熊本市国際交流会館大ホール
- 2) 第17回年次大会の開催 (大会長 小田切優樹)
平成22年10月18日 (月)・19日 (火)
於 熊本市国際交流会館
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第18巻1号～4号 (予定)
- 4) 市民公開講座を後援

現行役員は下記の通り。

日本血液代替物学会 役員名簿

顧 問	尾形利郎	東海大学医学部 名誉教授	西 勝英	肥後医育振興会 理事	
	高久史磨	自治医科大学 学長	半田 誠	慶應義塾大学医学部 教授	
	堀 原一	筑波大学 名誉教授	平澤博之	千葉大学 名誉教授	
会 長	小林紘一	慶應義塾大学 名誉教授	堀之内宏久	慶應義塾大学医学部 准教授	
副 会 長	池田康夫	早稲田大学理工学術院 教授	米川元樹	特定医療法人北楡会 理事長	
理 事	東 寛	北海道赤十字血液センター 研究部長	監 事	清水 勝	西城病院 理事
	小田切優樹	崇城大学薬学部 教授		阿岸鉄三	ふれあい町田ホスピタル
	酒井宏水	早稲田大学総合研究機構 准教授			血液浄化センター センター長
	末松 誠	慶應義塾大学医学部 医学部長		(事務局) 堀之内宏久	慶應義塾大学医学部 准教授
	高折益彦	東宝塚さとう病院 名誉院長		(会誌担当) 酒井宏水	早稲田大学総合研究機構 准教授
	武岡真司	早稲田大学理工学術院 教授		(HP担当) 藤島清太郎	慶應義塾大学医学部 講師

日本血液代替物学会 評議員名簿

青木 克憲	浜松医科大学 教授	末松 誠	慶應義塾大学医学部 医学部長
阿岸 鉄三	ふれあい町田ホスピタル	高折 益彦	東宝塚さとう病院 名誉院長
	血液浄化センター センター長	高久 史磨	自治医科大学 学長
東 寛	北海道赤十字血液センター 研究部長	高橋 晃	テルモ(株) 取締役特別顧問
阿部喜代司	筑波大学 名誉教授	高橋 英嗣	佐賀大学大学院 教授
池田 久實	北海道赤十字血液センター 所長	武岡 真司	早稲田大学理工学術院 教授
池田 康夫	早稲田大学理工学術院 教授	田所 憲治	日本赤十字社血液事業本部 中央血液研究所 所長
池淵 研二	埼玉医科大学 教授	友田 輝夫	東京医科大学 教授
石原 弘規	弘前大学医学部 准教授	仲井 邦彦	東北大学大学院医学研究科 准教授
伊藤 俊之	京都赤十字血液センター	長澤 俊郎	筑波大学臨床医学系 元教授
稲田 英一	順天堂大学医学部 教授	中島 常隆	(株)ベネシス 経営戦略部 担当部長
大柳 治正	近畿大学医学部 教授	西 勝英	熊本大学 名誉教授
尾形 利郎	東海大学医学部 名誉教授	西出 宏之	早稲田大学理工学術院 教授
小田切優樹	崇城大学薬学部 教授	西谷 孝子	ナノキャリア株式会社
片岡 一則	東京大学大学院 教授	半田 誠	慶應義塾大学医学部 教授
川村 明夫	特定医療法人北楡会 会長	平澤 博之	千葉大学 名誉教授
木下 学	防衛医科大学校 准教授	福島 昭二	神戸学院大学薬学部 教授
黒澤 良和	藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授	藤井 寿一	東京女子医科大学 教授
小林 紘一	慶應義塾大学 名誉教授	藤島清太郎	慶應義塾大学医学部 准教授
小松 晃之	中央大学理工学部 教授	船津 昭信	(財)化学及血清療法研究所 理事長
斎藤 英彦	名古屋セントラル病院 院長	外 須美夫	九州大学大学院医学研究院 教授
酒井 清孝	早稲田大学理工学術院 教授	堀 進悟	慶應義塾大学医学部 教授
酒井 宏水	早稲田大学総合研究機構 准教授	堀 原一	筑波大学 名誉教授
佐久間一郎	カレスサッポロ北光記念クリニック 所長	堀之内宏久	慶應義塾大学医学部 准教授
佐藤 誠	ニプロファーマ(株) 社長	宮尾 秀樹	埼玉医科大学総合医療センター 教授
清水 勝	西城病院 理事	村田 満	慶應義塾大学医学部 教授
十字 猛夫	日本赤十字血液事業本部	湯浅 晋治	順天堂大学 名誉教授
	中央血液研究所 前所長	米川 元樹	特定医療法人北楡会 理事長

(ア順敬称略)

日本血液代替物学会 会則

第1章 総則

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

第2条：（事務局）本会の事務局は当分の間、会長の所属機関内に置く。

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

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

第4条：（事業）本会は前条の目的達成のため、次の事業を行う。

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

第2章 会員

第5条：（種別）本会会員は次の分類とする。

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

第6条：（会費）会員は、つぎの種別に従って会費を納めなければならない。

- 1) 正会員 年額 1万円
 - 2) 講読会員 年額 6千円
 - 3) 学生会員 年額 5千円
 - 4) 賛助会員 年額 1口以上（1口20万円）
 - 5) 維持会員 年額 10口以上（1口20万円）
2. 既納の会費はいかなる理由があっても、これを返還しない。

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

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

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

第3章 役員、顧問、評議員および職員

第10条：（設置および定数）本会に次の役員を置く。

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

第11条：（役員の選任）役員は、別に定めるところにより、正会員の内から評議員会で選出し、監事は正会員の中から総会で選出する。

2. 顧問は、会長が委嘱し、その任期は役員の任期に準ずる。

第12条：（任期）役員および監事の任期は2年とし、再任を妨げない。

第13条：（会長）会長は、各事業を司り本会を代表統括する。

第14条：（副会長）会長を補佐し会長に事故があるときはその代理となる。

第15条：（理事）理事は理事会を組織して、この会則に定められた事項のほか、評議員会および総会の権限に属する事項以外の事項を評議し、施行する。

第16条：（監事）監事は、資産の状況および理事の会務執行状況を監査する。

第17条：（顧問）顧問は、理事会および評議員会に出席して、意見を述べることができる。

第18条：（評議員）評議員は正会員の中から総会で選出し、任期は2年とする。ただし再任を妨げない。

2. 評議員は、評議員会を組織し、この会則に定められた事項を決議するほか、会長を補佐して本会の運営を助ける。

第19条：（事務局および職員）本会の事務を処理するため、事務局および職員を置く。

2. 職員人事は会長が任命権者となり、有給とする。

第4章 年次大会長

第20条：（大会長と職務）本会に年次大会を主宰する大会長1名をおく。また、大会長を補佐し、大会長に事故があったとき、または欠けたときには、その職務を代行する副大会長1名をおくことができる。

第21条：（選任）大会長および副大会長は、評議員の中から、理事会の議決によって選任される。
2. 理事会の議決によって、副大会長を次年度の大会長とすることができる。

第22条：（任期）大会長および副大会長の任期は、選任された日に始まり、学会年次大会が終了した日に終わる。

第5章 会 議

第23条：（会議）本会の会議は、つぎの3種とする。

- 1) 理事会
- 2) 総 会
- 3) 評議員会

第24条：（理事会）理事会は、理事をもって構成する。

2. 理事会は年4回以上会長が召集する。ただし、会長が必要と認めたとき、または、理事の3分の1が会議の目的および事項を示して請求したときは、臨時理事会を召集することができる。
3. 理事会の議長は会長とする。
4. 理事会は、理事会構成現在数の3分の2以上が出席しなければ、議事を開き、議決することができない。ただし、当該議事について文書によってあらかじめ意志を表示した者は、これを出席者とみなす。
5. 監事は、理事会に出席して、本会の運営について意見を述べることができる。

第25条：（総会）総会は、通常総会、臨時総会の2種とし、会長が召集する。

2. 総会は、正会員をもって構成する。
3. 通常総会は、年一回開く。
4. 臨時総会は、次の場合に召集する。
 - 1) 理事会で必要と認めた場合
 - 2) 監事、または会員50名以上から会議の目的を示して請求があった場合

第26条：（総会議長）通常総会の議長は会長とし、臨時総会の議長は、会議の都度会員の互選で定める。

第27条：（総会の通知）総会の召集は、その開会期日1週間前までに、総会に付すべき事項、日時および場所を記録した書面または会誌で、会員に通知しなければならない。

2. 出席会員の3分の2以上の同意があったときは、あら

かじめ通知しなかった事項について審議し、議決することができる。

第28条：（審議事項）次の事項は、通常総会の承認を求めなければならない。

- 1) 事業報告および会員の異動状況書
- 2) 収支決算、財産目録、貸借対照表
- 3) 事業計画および収支予算
- 4) 前記各項のほか、理事会で必要と認めた事項

第29条：（総会の定足数）総会は、正会員現在数の5分の1以上出席しなければ、議事を開き、議決することができない。ただし、当該議事について、あらかじめ書面をもって意志を表示したものは出席者と見なす。

2. 総会に出席できない正会員は、出席正会員を代理人として、その権限を委任することができる。
3. 総会の議決は、出席会員の過半数をもって決し、可否同数のときは議長の決するところによる。

第30条：（総会議事録の通知）総会の議事の要領および議決した事項は、正会員に通知する。

第31条：（評議員会）評議員会は、評議員で組織し、必要がある場合に会長が召集する。

2. 会長は評議員会の議長となる。

第32条：（審議事項）評議員会は、この会則に定めるもののほか、理事会で必要と認めた事項を審議する。

第33条：（評議員会の定足数）評議員会は、評議員現在数の2分の1以上の出席がなければ、議事を開き、議決することができない。ただし、当該議事について、あらかじめ書面をもって意志を表示したものは出席者と見なす。

2. 評議員会の議事は、出席評議員の過半数をもって決し、可否同数のときは、議長の決するところによる。評議員会に出席できない評議員は、出席評議員を代理人として、その権限を委任することができる。
3. 会長は、書面で評議員の意見を求め、評議員会の召集および前項の議決にかえることができる。

第34条：（議事録の保存）全ての会議には議事録を作成し、議長および出席者代表者2名以上が署名押印のうえ、これを保存する。

第6章 資産及び会計

第35条：（資産）本会の資産は次の通りとする。

- 1) 会 費
- 2) 寄付金
- 3) 事業にともなう収入

- 4) 資産から生じる果実
- 5) その他の収入

第36条：（資産の管理）本会の資産は、会長が管理し、現金は理事会の議決によって、确实な有価証券を購入するか、または定額郵便貯金とするか、もしくは确实な信託銀行に信託するか、あるいは定額預金として会長が保管する。

第37条：（寄付の受領）寄付金品は、理事会の議決を経てこれを受領する。

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

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

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

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

第7章 会則の変更ならびに解散

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

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

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

第8章 補 則

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

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

M E M O

[illegible]

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):

ii) 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 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

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, 4,6)}などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名。論文題名。誌名。西暦発行年；巻数：頁～頁。とし、誌名の省略は医学中央雑誌またはIndex Medicus に準拠する。単行本の場合は全著者名。題名。編集者名。書名。発行地：発行書店、年号；頁～頁。の順とする。電子文献の場合は、ホームページ名。改行してアドレス（引用した西暦年月）とする。

(例)

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

14) 既発表の図表, その他を引用, 転載する場合には, あらかじめ著作権所有者の許可を得ること. また, 掲載論文の著作権は本学会に帰属する.

15) 二次掲載について. 本誌は, 他の言語ですでに掲載された論文を和文で二次掲載することは二重投稿ではなく正当な掲載と認めるが, 著者は以下の事項を遵守する.

- a) すでに掲載された論文であること.
- b) 著者は両方の雑誌の編集者より許可を得ていること. 二

次掲載する編集者に最初に掲載されたもののコピー, 別刷, もしくは原稿のいずれかを添付すること.

- c) 論旨を変えないこと. 執筆者は同一(順不同)であること.
- d) 二次掲載版のタイトル・ページに掲載される脚注には, その論文の全体もしくは一部分がすでに掲載されている旨を明記し, 更に初出文献も示すこと. 適切な脚注の例を以下に示す. 「This article is based on a study first reported in the [...]雑誌タイトル(完全な典拠情報を添えたもの) [...]」(訳: この論文記事は, [...] に最初に報告された研究に基づくものである)」.

これらの要件を満たしている場合は, その旨を明記して, 総説または論文記事(二次掲載)として投稿する.

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

17) 掲載料. 掲載料は無料とし, 論説, 総説, 原著, 報告等については別刷り30部を贈呈する. それを越える分についての費用は著者の負担とする(およそ1部100円). カラー写真掲載・アート紙希望などの場合は, 著者の実費負担とする.

18) 原稿の送付先

〒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:

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

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

平成 年 月 日

Date:

代表著者（署名）

Corresponding Author (Signature) _____

連絡先

Contact Address:

（本用紙はコピーしたものを使用されても結構です。）

This form may be photocopied for use.

日本血液代替物学会 会誌「人工血液」編集部

〒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

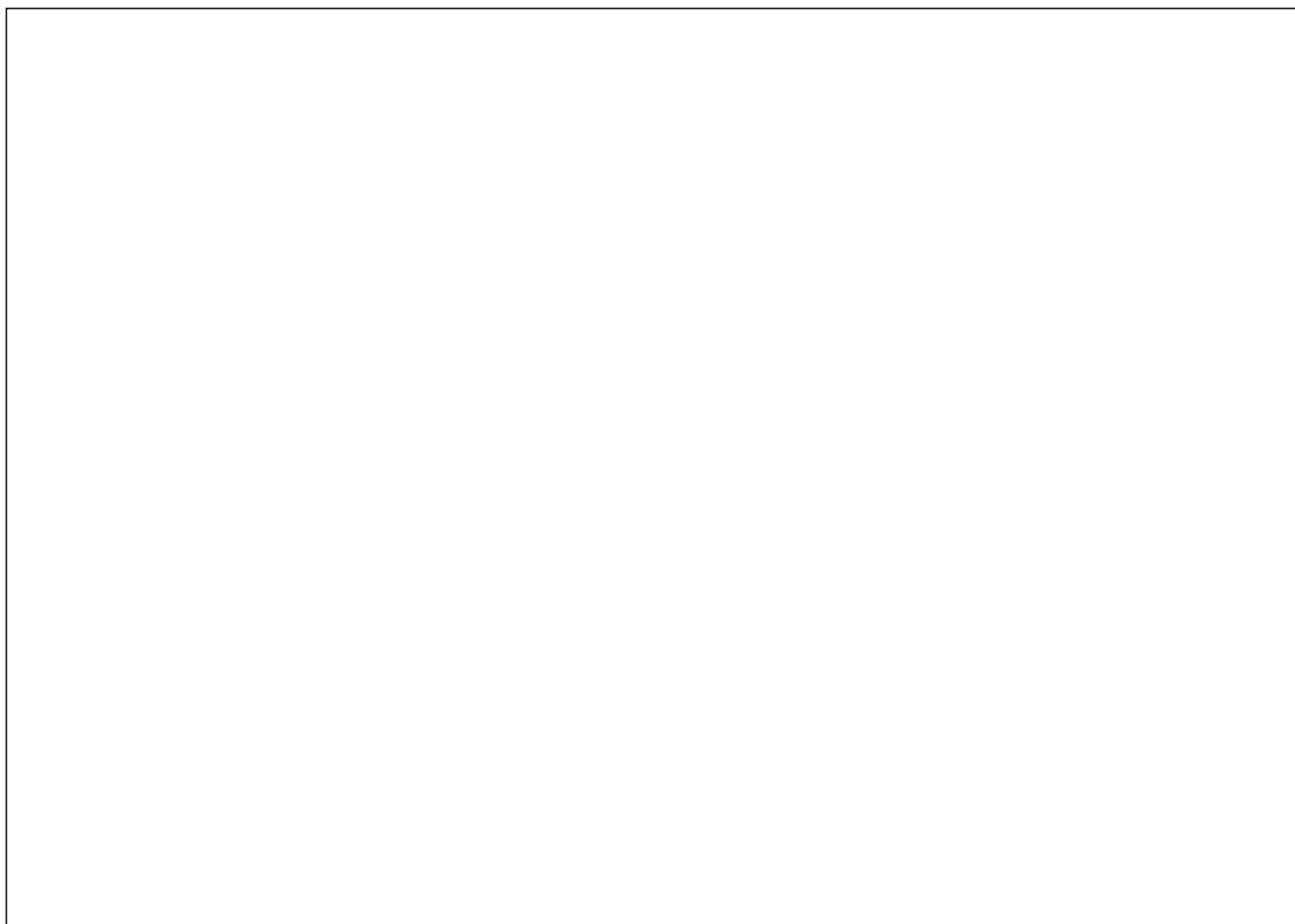
Tel: +81-3-5363-3493 Fax: +81-3-5363-3499 E-mail : amorjsbs@sc.itc.keio.ac.jp

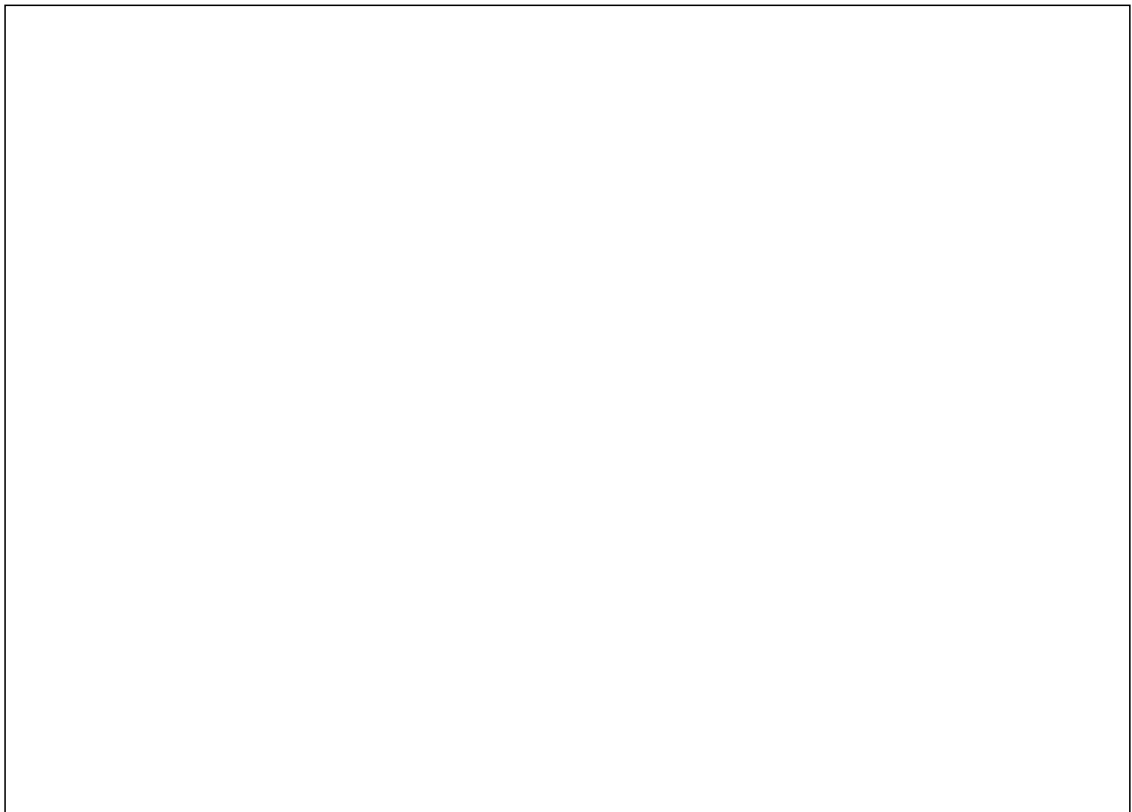
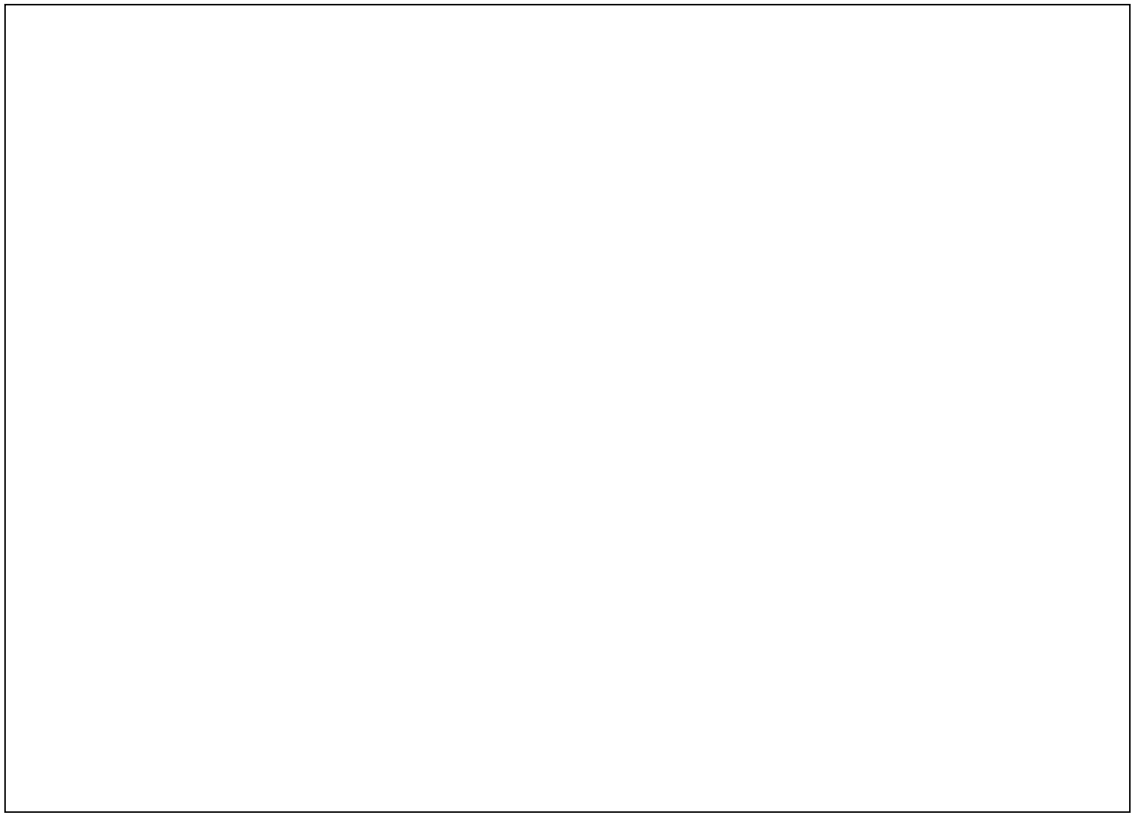
●編集後記●

三宅先生・高折先生からは、続報として本号でもliposome分散系の電解質濃度について英字原著論文の投稿を頂いた。本誌活性化のために御協力頂き、誠に有難うございます。宗先生からはリボソームの表面状態と臓器特異性、特に骨髓移行性について話題提供頂いた。薬物キャリアの機能とイメージングの機能を同時に持つ“theranostic agent”という新しい領域の可能性はとても興味深い。今後の実用化に向けた展開を期待したい。柚木先生からは、生成物製剤開発におけるプリオン対策について、最先端の話題を提供頂いた。人工血液の開発者にとっては頭の痛い問題であるが、安全性向上のためには、一つ一つ解決して行かなければならない。今後も御指導を頂きたい。現在最も有望視されている人工血小板は、ADPを内包し、これが傷口で放出されると血小板が集まって止血を促進する仕組みであ

る。富山先生からは血小板のADP受容体とADPの反応性について最新の話提供を頂いた。人工血小板のより最適なformulationの決定に重要な内容と思われた。他方、赤血球からはATPが放出され血管弛緩作用を示すという。エネルギー代謝に関わるものと教わってきたATPとADPが血管系の恒常性に寄与していることはとても興味深い。

今回の総説、トピックス、計3件は、一昨年、昨年の代替物学会年次大会の講演者をお願いして御寄稿頂いたものです。本誌は慢性的に投稿数が不足しております。会員の皆様には、是非とも御寄稿・話題提供に御協力を頂きたく、よろしくお願い申し上げます。





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 (4) 2011年3月30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