

人工血液

第20巻 第2号 2012年12月

総説	生体投与可能なナノ構造体の構築と血小板代替物への応用岡村 陽介 他	38
	一過性脳虚血による脳機能障害と人工酸素運搬体の脳保護効果山口 拓 他	48
	危機管理の視点からみた輸血用血液準備の重要性と 人工血液の開発西山 靖将 他	58

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 20 No. 2 December, 2012

	<i>Review: Development of Injectable Nanostructures and Their Medical Application for Platelet Substitutes</i>Yosuke Okamura, et al.	38
	<i>Brain Dysfunction Induced by Transient Cerebral Ischemia and Cerebral Protective Effects of Liposome-Encapsulated Hemoglobin</i>Taku Yamaguchi, et al.	48
	<i>Significance of artificial blood from the view point of crisis management</i>Yasumasa Nishiyama, et al.	58

生体投与可能なナノ構造体の構築と 血小板代替物への応用

Development of Injectable Nanostructures and Their Medical Application for Platelet Substitutes

岡村 陽介^{(1),(2)*}, 武岡 真司^{(2),(3)}

Yosuke Okamura^{(1),(2)*}, Shinji Takeoka^{(2),(3)}

和文抄録

血小板は、血液凝固系と連動した巧妙かつ複雑な止血機構を有しており、これら全てを人工系で模倣することは不可能といっても過言ではない。我々は、血小板が血管損傷部位で凝集する分子機構に着目し、粘着した活性化血小板を認識できる分子をナノ構造体の表面に担持させれば、それが損傷部位へ特異的に集積して血栓形成を誘導する起点となり、集積したナノ構造体が出血部位を充填する効果が期待できるとの発想に基づいて、極めて単純な血小板代替物の設計に結びつけた。具体的には、活性化血小板の認識部位としてフィブリノーゲン γ 鎖C末端ドテカペプチド (HHLGGAKQAGDV: H12) を担持させた生体投与可能なナノ構造体 (球状ナノ粒子やナノシート) を構築し、それらの止血効果に関する知見を集積してきた。

Abstract

Platelet has complicate mechanisms of hemostasis, such as tethering, adhesion, aggregation and release of various agonists from granules, followed by fibrin clot formation. It seems to be difficult to develop platelet substitutes with all mechanisms as shown above. We therefore focused molecular mechanism of platelet aggregation (interaction between fibrinogen and platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor). Our strategy for the development of platelet substitutes relies on the fact that biocompatible nanostructures specifically accumulate toward activated platelets on the vascular injury, which are filled up by virtue of own mass of nanostructures. In fact, we designed the nanostructures such as spherical nanoparticles and nanosheets composed of albumins, lipids and biodegradable polymers, to which fibrinogen γ -chain dodecapeptide (H12) was chemically conjugated.

Keywords

platelet substitute, nanostructures, albumin nanoparticles, liposomes, nanosheets, fibrinogen γ -chain dodecapeptide (H12)

1. はじめに

血小板は一次血栓形成を通じて生体の止血機構の中心的役割を果たす。血小板の量的・質的異常により惹起される出血の予防や治療に対して唯一信頼できる手段は血小板輸血である。その供給量はここ5年間で急増しており¹⁾、高度医療に必須な血小板輸血の需要は将来も減少することはないと予想される。しかし、人口減少と高齢化に伴う献血者数の低下により、確保できる血小板製剤の絶対量の減少が予想されること、その保存期

間は日本では4日間と非常に短く厳密な保存条件が要求されることから、緊急時等の供給体制が極めて困難であるのが現状である。さらに、核酸増幅検査の導入により血液製剤の安全性は著しく向上したものの、未だにウイルス感染などのリスクは完全には払拭されてはいない。不必要な輸血を減少させる努力が払われているものの、赤血球輸血とは異なり自己血輸血の推進が図れないため、今後の先進医療において、安定供給可能な血小板代替物の開発は当然目指すべき方向であろう²⁾。

(1) 東海大学 創造科学技術研究機構 〒259-1292 神奈川県平塚市北金目4-1-1 Institute of Innovative Science and Technology, Tokai University, 4-1-1 Kitakaname, Hiratsuka, Kanagawa 259-1292, JAPAN. (* Corresponding Author.

(2) 早稲田大学 欧州バイオメディカルサイエンス研究所 European Biomedical Science Institute, Waseda University

(3) 早稲田大学大学院 先進理工学研究科 生命医科学専攻 Department of Life Science and Medical Bioscience, Graduate School of Advanced Science and Engineering, TWIns, Waseda University

論文受付2012年8月1日 論文受理2012年8月28日

2. 血小板の止血機序

血小板は通常血管内を流動している。しかし、血管損傷部位に露出した内皮下組織、特にコラーゲンを認識すると、直ちに血小板の接着が起こる。血小板の膜表面には、コラーゲンやそれに結合したフォンビレブランド因子 (VWF) を認識する受容体がある。高血流条件下では、血小板膜糖蛋白質Ib (GPIb) がVWFを介したコラーゲンとの相互作用によって血小板が接着し、ローリング速度が緩やかになる³⁾。次いで、コラーゲン受容体であるGPIa/IIa ($\alpha_2\beta_1$ インテグリン) やGPVIがコラーゲンと直接結合して強固に粘着する^{4,5)}。更には、接着や粘着の刺激が細胞内に伝わり、複雑なシグナル伝達経路を経て血小板膜糖蛋白質GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$ インテグリン) が“折れ曲がり状態”から“立ち上がり状態”へと高次構造が変化し (活性化)、血漿蛋白質であるフィブリノーゲンやVWFを介した血小板凝集 (一次凝集) が起こる⁶⁾。同時に、細胞内シグナル伝達によって血小板の形態が変化して偽足を出して伸展すると共に、血小板内の濃染顆粒が開放小管系と膜融合して血小板活性化因子であるセロトニン、アデノシン5'-二リン酸 (ADP) 等が放出され、ポジティブフィードバックによって血小板の活性化が亢進する。さらに α 顆粒からフィブリノーゲン、VWF、フィブロンネクチン等を放出、同時にP-セレクトリンが血小板表面に発現し、血小板あるいは白血球をも巻き込んだネットワークを形成して血小板凝集 (二次凝集、ここまで一次止血と呼ぶ) を促す⁷⁾。最後にトロンボキサンA₂の放出や血小板表面に凝固系の活性化に必要な場 (ホスファチジルセリン) が提供され、血漿中の凝固系が活性化されて最終的にはフィブリノーゲンがフィブリン塊となって止血 (二次止血) が完了する。このように血小板の止血機構は、接着、粘着、凝集、形態変化、顆粒の放出、血液凝固因子の活性化など、巧妙かつ複雑に制御された多段階の反応が動的に連動しているため、これらの機能を全て模倣した人工系の構築は非現実的と思われる。

3. 従来の血小板代替物の研究動向

血小板代替物は、血小板自体を加工した血小板由来産物と血小板以外の成分から成る人工産物の2種類に大別される。前者の研究開発の歴史は古く、1950年代より米国にて始まり、例えば、ホルマリン固定を施した凍結乾燥血小板 (StasixTM)⁸⁾ やヒト血小板を凍結融解にて破壊後加熱処理した粉末製剤 (Infusible Platelet Membrane: IPM)⁹⁾ がこれにあたる。膜表面のGPIbはインタクトであるため、それを介したVWFとの相互作用により出血部位への特異的集積性を有し、その表面上で凝固因子を活性化させトロンビン生成を助長する働きがあるとされている。IPMは他の血小板代替物に先駆けて臨床試験を実施した。フェーズII試験では、 $5 \times 10^4/\mu\text{L}$ 以下の血小板減少患者40例のうち27例 (65%) で出血症状を改善させた¹⁰⁾。しかし、フェーズIII試験の後、理由は公表されないまま開発は中断されている。後者の血小板代替物 (人工産物) の研究は、フィブリノーゲンを吸着させたラテックスビーズがADP刺激させた活性化血小板と迅速に反応することをCollerら¹¹⁾ が1980年に報告したことに

始まる。その後、ヒト赤血球にフィブリノーゲン¹²⁾ やその一部の結合サイトであるRGD¹³⁾ を固相化した例が報告され、血小板の凝集反応を媒介するリガンドの固相化により残存血小板の凝集能を増強する実例となった。1999年にはLeviら¹⁴⁾ により、フィブリノーゲンを吸着させた粒子径約3 μm のアルブミンマイクロカプセル (SynthocyteTM) が開発され、血小板減少ウサギの出血時間を顕著に短縮させる効果を詳細に報告した。しかし上述の研究例は、ヒト血液由来の成分を全てあるいは一部で構成された血小板代替物であり、ウイルス感染等のリスクは残存している。そのような背景の下、近年、完全人工系の血小板代替物の開発に注力され始めてきている。例えば、2009年にBertramらは、RGDペプチドを結合させた乳酸-グリコール酸共重合体から成る粒子径約350nmのナノ粒子を開発した。このRGDナノ粒子は大腿動脈出血モデルにおいて未投与系と比較して出血時間を大幅に短縮させることを実証している¹⁵⁾。さらにごく最近、Ravikumarらは、VWFやコラーゲンを認識する合成ペプチドあるいはRGDペプチド等、数種類のペプチドをリボソーム1粒子に結合させた血小板代替物を提案し、静脈や動脈に相当するいずれの血流条件下においても*in vitro*出血部位モデル基板上を特異的に認識できるリボソームであることを明らかにしている^{16,17)}。

4. 血小板代替物の開発戦略

我が国では、慶應義塾大学医学部 池田康夫教授 (現早稲田大学大学院 先進理工学研究科 生命医科学専攻) 並びに慶應義塾大学医学部 輸血細胞療法センター 半田誠教授を研究代表者とした厚生労働科学研究費の補助を受け、感染の危険性がなく長期間保存可能な完全人工系の血小板代替物の創製を目指し、世界に先駆けて開発、提案してきた¹⁸⁻²⁰⁾。具体的には、血小板が粘着・凝集する分子機序に着目し、コラーゲン、VWFあるいは活性化血小板表面を認識できる分子をナノ構造体表面に担持できれば、出血部位へ特異的に集積して血栓形成を誘導する起点となり、集積したナノ構造体が出血部位を充填する効果が期待できるとの発想から、極めて単純な血小板代替物を設計した。特に著者らは、2003年以降、活性化血小板に対する認識部位としてフィブリノーゲン γ 鎖C末端に存在するドデカペプチド (HHLGGAKQAGDV: H12) を担持させた生体投与可能なナノ構造体 (球状ナノ粒子やナノシート) の開発に絞り込み、それらの止血効果に関する知見を集積してきた (Figure 1)。次節以降、認識部位としてH12を選定した経緯とそれを結合させたナノ構造体の作製法や止血能評価の結果を紹介する。

4.1. 認識部位としてのH12

血漿蛋白質であるフィブリノーゲンは、粘着して活性化した血小板間を繋ぐ架橋剤の役目を果たす。従来報告されてきたように、フィブリノーゲンを結合させた粒子は減少した残存血小板の凝集を補助する効果が期待できる^{11,12,14)}。実際、血小板数を正常値の5分の1程度に調節した血小板減少モデル血液にフィブリノーゲンを結合させたアルブミンナノ粒子 (製造法の詳細は

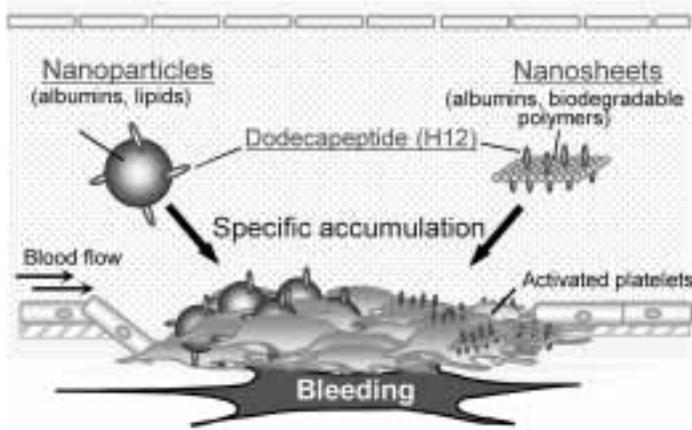


Figure 1 Strategy for the development of platelet substitutes. Biocompatible nanostructures (spherical nanoparticles and nanosheets) carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide (H12) specifically accumulate toward activated platelets on the vascular injury, which are filled up by virtue of own mass of nanostructures.

後述)を添加し、出血部位を模倣したコラーゲン固相化基板上を流動させたところ、ナノ粒子の添加量の増大と共に流動血小板の粘着数が増大したことから、アルブミンナノ粒子は血小板凝集増強効果を発現することを再現できた²¹⁾。しかしながら、フィブリノーゲン自体は4℃で保存すると凝集する非常に扱いにくい蛋白質であると共に²²⁾、水溶液中では速やかに失活することも判明し²¹⁾、製剤としての安定性が担保できないと判断した。

フィブリノーゲンの γ 鎖C末端の400-411番目に存在するドデカペプチド (H12)、 α 鎖の95-98あるいは572-575番目に存在するテトラペプチド (RGDS, RGDF) の3カ所が、活性化GPIIb/IIIaに対する結合サイトとして知られている^{23,24)}。そこで、H12とRGDを認識部位の候補に挙げ、モデルキャリアとしてラテックスビーズを使用して両者の機能を比較した²⁵⁾。血小板減少モデル血液中 ($2.0 \times 10^4/\mu\text{L}$, 正常の10分の1) にH12あるいはRGD結合ラテックスビーズを添加し、コラーゲン基板に対する血小板の凝集挙動を観察したところ、ペプチド未結合系と比較して、両者とも血小板凝集を約2倍程度促進させた。さらに、実験終了後の基板を走査電子顕微鏡にて観察したところ、コラーゲン基板上にまず血小板が粘着した後にH12あるいはRGD結合体が結合し、これを巻き込むようにして血小板が凝集している様子が確認できた。この結果は、認識部位としてフィブリノーゲンの代わりにその機能ペプチドを用いても、血小板凝集を促進させる能力は保持できることを意味する。

次いで、未活性化血小板に対する両ペプチド結合体の認識能をフローサイトメトリーにて評価した。RGD結合体では僅かではあるが未活性化血小板に非特異的にも吸着することが判明した²⁵⁾。これは、血流中で未活性化血小板と反応し病的血栓を惹起させる可能性を示唆している。しかし、H12結合体では未活性化血小板とは一切反応しなかった²⁵⁾。さらに、H12結合体と未活性化血小板を混合してもその活性化 (GPIIb/IIIa活性化やP-

セレクチンの発現) を惹起させないことも確認できている²⁵⁾。従って、ナノ構造体にH12を結合させることで、出血部位に粘着した活性化血小板にのみ特異的に集積する能力を付与できると判断し、血小板代替物の認識部位としてH12を選定するに至った。

4.2. 生体投与可能な球状ナノ構造体の調製と機能評価

4.2.1. アルブミンナノ粒子、リボソームの調製

ヒト血清アルブミンは、5g/dLと血漿中で最も多く存在する蛋白質であり、コロイド浸透圧の調節や、栄養物や代謝物などの運搬を担っている。これを利用した微粒子 (例えば、アルブミン大凝集体、アルブミンマイクロスフェア、アルブミンマイクロカプセルなど) は生体適合性・生分解性を有するため、既に1950年代から静注用製剤として血管造影剤、超音波診断用増感剤や徐放性薬物担体などに臨床使用されている。しかし、これらのアルブミン粒子は、高温加熱処理を施すスプレードライ法や有機溶媒による不可逆な変性あるいは界面活性剤や架橋剤を用いるため、粒子径の制御や添加物の除去操作が煩雑であった²⁶⁾。そこで我々は、遺伝子組換えヒト血清アルブミン (rHSA) をマクロモノマーと見なし、ジスルフィド縮合重合を誘起させてアルブミンナノ粒子を調製する方法を確立した²⁷⁾。これはrHSA水溶液のpHと温度を制御するだけでナノ粒子を調製できるクリーンな方法であり、親水性の表面を持つナノ粒子となる (Figure 2左図)。アルブミンナノ粒子表面にH12を結合させる方法は、架橋剤を利用した表面修飾技術を用いれば達成できる。ここではナノ粒子の血中滞留性を鑑みて、片末端にN-ヒドロキシスクシンイミド基、もう片末端にマレイミド基を有する二官能性ポリエチレングリコール (PEG) 誘導体を導入している^{28,29)}。まず、前者がアルブミンナノ粒子表面のリジン残基のアミノ基と反応し、マレイミド基含有PEGが粒子表面に固定される。遠心分離にて洗浄後、システイン残基をN末端に導入したH12を混合するだけで、H12がマレイミド基を介して定量的に結合する。

他方、リン脂質を水中に分散させると自発的に集合し、多重層のリボソームが形成する³⁰⁾。これを孔径の異なるフィルターに順次透過させるエクストルージョン法を利用すると、粒子径と被覆層数の制御が可能となる (Figure 2右図)。一般的にリボソームには次の長所が挙げられる。①膜成分であるリン脂質やコレステロールは生体適合性や生分解性に優れる、②水溶性や脂溶性の低分子薬物、蛋白質や遺伝子などの高分子を内水相あるいは膜内に封入できる、③粒径や脂質組成により血中滞留時間や体内動態を調節できる³¹⁾、④リボソームの表面に蛋白質やペプチドを担持させて特定部位への指向性や集積性 (ターゲティング) を付与できる³²⁻³⁴⁾。我々は、グルタミン酸に炭素数18のアシル鎖を2本結合させた合成脂質 (Glu2C18) に、PEG鎖を介してH12を結合させたH12-PEG-Glu2C18を独自に合成した³⁵⁾。これをDPPC・コレステロールを主成分とする粒径250nm程度のリボソームに導入し、人工系血小板代替物として開発してきた。さらにリボソームの止血効果を増強させるために、内水相に血小板凝集を惹起させるアデノシン5'-二リン酸 (ADP)

を封入している点も新規である³⁶⁾。次項ではリポソームの評価結果に絞って解説する。

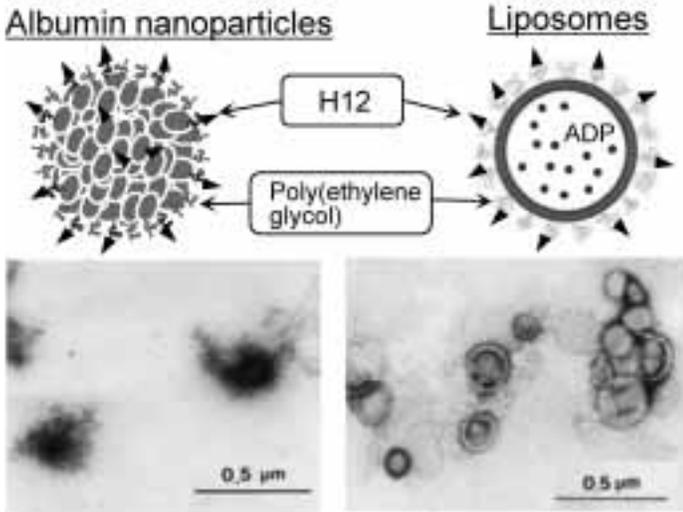


Figure 2 Schematic images and electron micrographs of spherical nanoparticles. Left and right images show albumin nanoparticles and liposomes, respectively.

4.2.2. 機能評価

設計したH12-リポソームが出血部位に対して特異的に集積することが必須条件であり、この実証実験を試みた。リポソームを可視化するために、水溶性造影剤であるイオパミドールを内包させたH12-リポソームを調製した³⁷⁾。これをWister系雄性ラットに投与し、投与5分後に尾静脈に沿って1cmの傷をつけ、出血が止まるまで生理食塩水に浸漬させた (Figure 3a)。実験小動物用X線コンピュータ断層撮影法 (eXplore Locus CT system, GEヘルスケア社製) を用いて出血部位周辺を撮影したところ、出血部位に対応する領域が白く造影された (Figure 3b)。その断面図 (Figure 3c) や3D像 (Figure 3d) もそれを支持した。他方、H12未結合のイオパミドール内包リポソーム群 (Figure 3e, f) やイオパミドール水溶液投与群 (Figure 3g, h) では造影されなかった。従って、H12-リポソームが出血部位に対して特異的に集積することを *in vivo* 試験で実証できた。

続いて、止血能を増幅させるためにADPを内水相に封入したリポソーム (H12-(ADP)-リポソーム) を調製し、その放出特性を検討した³⁶⁾。まず、H12を担持させていない (ADP) リポソームを多血小板血漿に添加した後 (Figure 4, 実線矢印)、コラーゲン (f.c. 0.4 μg/mL) にて血小板凝集を惹起させ (破線矢印)、その透過率変化を血小板凝集計にて計測した。Figure 4A (i) に示すように、コラーゲン添加から約1分後に血小板形態変化に伴う緩やかな透過率の減少が見られ、その後安定な血小板凝集が惹起するコラーゲン凝集特有の透過率曲線を描いた。この時の最大透過率は42 ± 5%であり、コントロールリポソーム (H12未結合且つADP未内包) と同等であったことから、本リポソームは血小板凝集に何ら寄与しない。次に、ADPを内包させていな



Figure 3 Specific accumulation of H12-liposomes containing a water-soluble contrast dye, iopamidol, at the injury site in the tail vein as visualized by an eXplore Locus CT system. (a) Photo of rat tail with a 1-cm-long incision at the tail vein. (b) CT image of H12-(iopamidol)-liposome accumulation. (c) Cross-sectional CT image of (b). (d) Three-dimensional CT image of (b). (e) CT image of iopamidol-liposome infusion. (f) Cross-sectional CT image of (e). (g) CT image of iopamidol solution infusion. (h) Cross-sectional CT image of (g). Arrows show accumulation points of H12-(iopamidol)-liposomes. (Cited and partially modified from reference 37)

いH12-リポソームでの最大透過率は49 ± 6%となり、僅かに増大した (Figure 4A (ii))。これは、リポソーム表面のH12によって血小板と多点結合し、血小板凝集塊形成を促進させた効果と考えられる。最後に、H12-(ADP)-リポソームを添加して同様に評価した。Figure 4A (iii) に示すように、コラーゲン添加直後から透過率の上昇が見られ、最大透過率は65 ± 6%に到達した。コラーゲンを添加しなければ血小板凝集は全く起こらないことから (Figure 4A (iv))、血小板凝集の刺激を受けてH12-(ADP)-リポソームからADPが放出されたことを示唆する興味深い結果である。次いで、測定終了後の血小板凝集塊を電子顕微鏡にて観察した。リポソームを検出するために、ウサギ由来抗H12抗体と抗ウサギIgGを結合させた金コロイドによる免疫染色法を利用してリポソームを識別できるように工夫した。Figure 4Bの矢印で示すように、血小板間に多数のリポソームが存在しており、その形状は球状ではなく変形しているように思われる。従

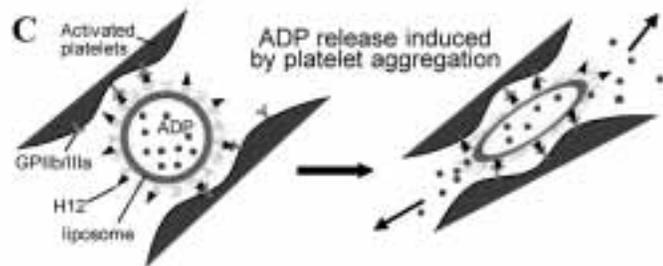
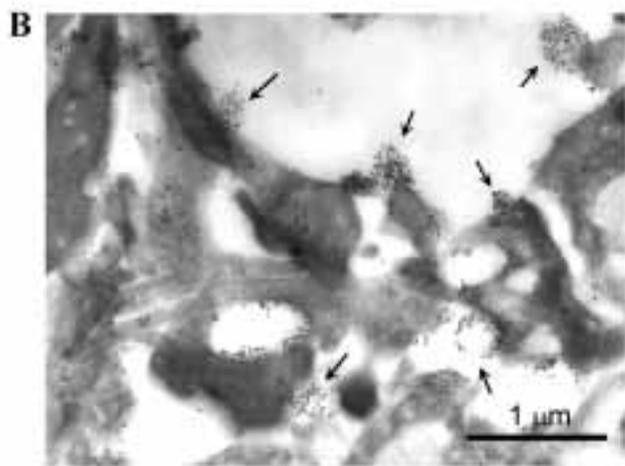
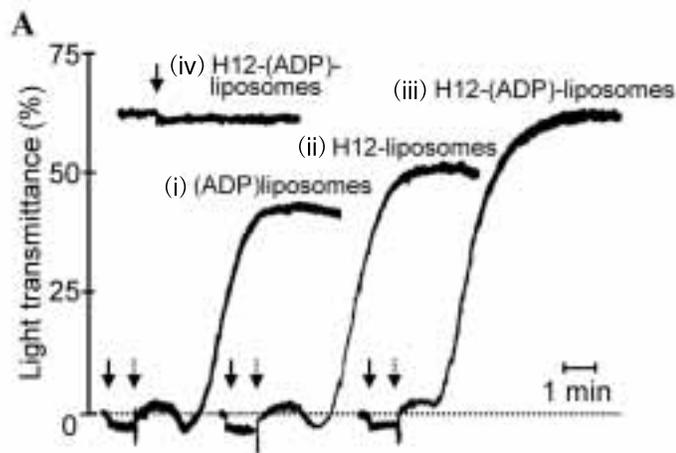


Figure 4 (A) Aggregation measurement in platelet-rich plasma ($[platelet] = 2.0 \times 10^5/\mu L$) obtained from healthy volunteer in response to collagen in the presence of (ADP)-liposomes (i), H12-liposomes (ii), H12-(ADP)-liposomes (iii), or in the presence of H12-(ADP)-liposomes alone (iv). Traces are representative data obtained from at least three independent experiments. Solid and dot arrows indicate the time of liposome (lipid concentration: $fc, 0.20mg/mL$) and collagen ($fc, 0.4\mu g/mL$) administration, respectively. (B) Electron micrograph of the platelet aggregates involving the H12-(ADP)-liposomes. The vesicles detected by colloidal gold for H12 were distributed on the platelet surface and between adherent platelets (arrows). (C) Schematic image of mechanism of ADP release from liposomes into platelet aggregates. (Cited and partially modified from reference 36 and 38)

って、H12-(ADP)-リポソームは、H12を介して多点結合して血小板凝集塊に巻き込まれ、その際に血小板凝集内で受ける物理的な刺激によって変形してADPを放出することで血小板凝集を顕著に促進させるリポソームと言える (Figure 4C)³⁶。これは、ドラッグデリバリーとコントロールリリースを同時に実現させた薬物運搬体としての可能性を秘める新しい知見である。

最後に、H12-(ADP)-リポソームの *in vivo* 止血能評価の結果をまとめる³⁶。まず、ニュージーランドホワイトウサギに抗がん剤のブスルファンを $30mg/kg$ を2回に分けて投与すると、その副作用によって、投与15日後には血小板数のみが正常ウサギ (血小板数: $37 \pm 8 \times 10^4/\mu L$) の15分の1程度 (血小板数: $2.4 \pm 1.3 \times 10^4/\mu L$) まで再現性よく減少する重篤な血小板減少症モデルウサギを作製することができる。このウサギの耳にメスで6mmの長さに切傷し、生理食塩水中に浸し出血が止まるまでの時間 (出血時間) を測定したところ 1695 ± 197 秒となり、正常ウサギのそれ (112 ± 24 秒) と比較して約15倍も延長した (Figure 5)。まず、30分前に予めウサギ血小板を輸血したところ、投与量依存的に血小板数が増大する。結果として出血時間を顕著に短縮させることができ、血小板輸血の効果を再確認した。そこで、血小板輸血の代わりにH12-(ADP)-リポソームを投与したところ、出血時間が投与量依存的に有意に短縮され、かつ血小板輸血に匹敵する程の止血効果が発現した (Figure 5)。これは、H12によってリポソームが特異的に出血部位に集積し、内包したADPが効率よくその場で放出されて安定な血小板凝集塊を形成させたためと考えられる。現在のところ、H12-(ADP)-リポソームを投与しても、血球成分、血液凝固系には何ら影響しないことを確認しているが³⁶、今後は、臨床試験を見据えながらナノ粒子の安全性に関するより詳細な知見を集積する必要があると考えられる。

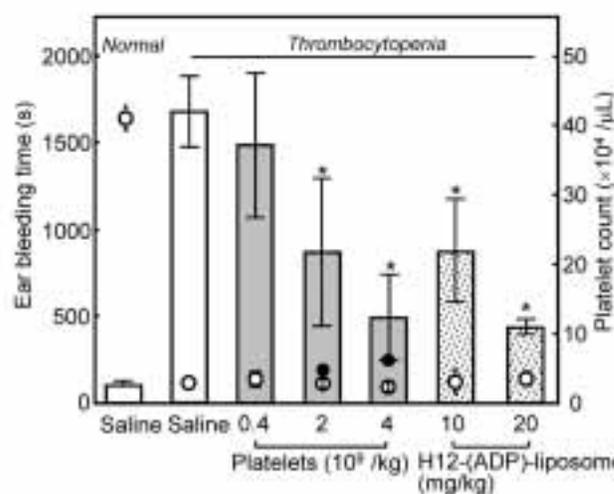


Figure 5 Hemostatic effects of administration of platelet concentrates and H12-(ADP)-liposomes on ear bleeding time in thrombocytopenic rabbit models (white column). ○, platelet count in rabbits; ●, platelet count 30min after administration of platelet concentrate. * $P < 0.05$ vs. saline group. (Cited and partially modified from reference 36)

4.3. 生体投与可能なシート状ナノ構造体の調製と機能評価

4.3.1. ナノシートの調製

従来の生体投与可能なナノ構造体は上述のような球状粒子が常識であったが、果たしてこの形状が最適な構造であろうか。例えば、赤血球は両面中央部が凹んだ直径約 $8\ \mu\text{m}$ の円盤状、血小板は直径 $3\ \mu\text{m}$ 程度の円盤状を呈している。ナノ構造体を製造する立場から鑑みると、球状粒子を作るのが最も簡単な方法である。これは、脂質や高分子（蛋白質を含む）の疎水性相互作用を利用した分子集合を考慮した際、球状に集合した方が熱力学的に安定であるためである。もし円盤状など種々の形状を有するナノ構造体を構築することができれば、表裏面が存在し、標的部位に対して広い接触面積を提供できるという球状形態にはない性質が期待できる。さらに、その大きさ、膜厚、表裏面の修飾状態などが制御できるため、生体投与可能な新しいナノ構造体として提案できる。

半導体技術を革新的に発展させたのは、任意の形状や大きさのサブマイクロ・ナノスケールのパターンを精密に基板上に描画するフォトリソグラフィーと呼ばれる技術である。最近我々は、この技術に着目して生体投与可能なナノシートを基板上で作製し、かつ剥離させて分散液を得る技術を確立した³⁹⁻⁴¹。これは、既存の基板上のボトムアップ型ナノテクノロジーを分散系とする発想であり、Figure 6Aや7Aに図示したような4工程でナノシート分散体を作製する手法を提案している³⁹。まず、①紫外線フォトリソグラフィー加工技術と自己組織化単分子膜形成技術を用いて疎水性マイクロパターン基板を作製する。こ

の時のパターンの形状と大きさは、用いるフォトマスクによって任意に制御できる。次いで、②マイクロパターン基板の疎水性領域を鋳型とし、ナノシートの原料となるナノ粒子（蛋白質も含む）を疎水性相互作用にて選択的に吸着させて、③化学的あるいは物理的に2次元架橋させてシート化させる。最後に、④界面活性剤を用いて基板から剥離、あるいは水溶性高分子から成る支持膜にナノシートを転写させて水中で支持膜を溶解させて分散体を得る、という簡便な方法である。ナノシート表面に認識部位を結合させる方法はナノシートの分散体を得てからでもよいし、基板上にナノシートを吸着させた状態で結合させてもよい。後者の方法を採用すれば、ナノシートの裏面に対して表面とは別の認識部位を結合させることも可能となる。ナノシートの原料は、蛋白質などの生体高分子や生分解性高分子から成るナノ粒子など、疎水性パターン上に疎水性相互作用で選択的に吸着できることが要件である。これまでに、アルブミン⁴⁰や代表的な生分解性高分子である乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA)⁴¹のナノ粒子から成るナノシートの調製に成功している。以下にこれらを紹介する。

(1) アルブミンナノシート⁴⁰

ナノシートの原料となるナノ粒子として、生体適合性・生分解性を有するヒト血清アルブミンの遺伝子組換え体 (rHSA) に着目した。rHSAは等電点 ($\text{pI} = 4.9$) 付近では見かけの電荷がゼロに近づく。この付近のpHに調整したローダミン標識rHSAの水溶液を疎水性マイクロパターン基板に浸漬させると、rHSAはパターン（オクタデシルトリメトキシシラン：ODS）上に選

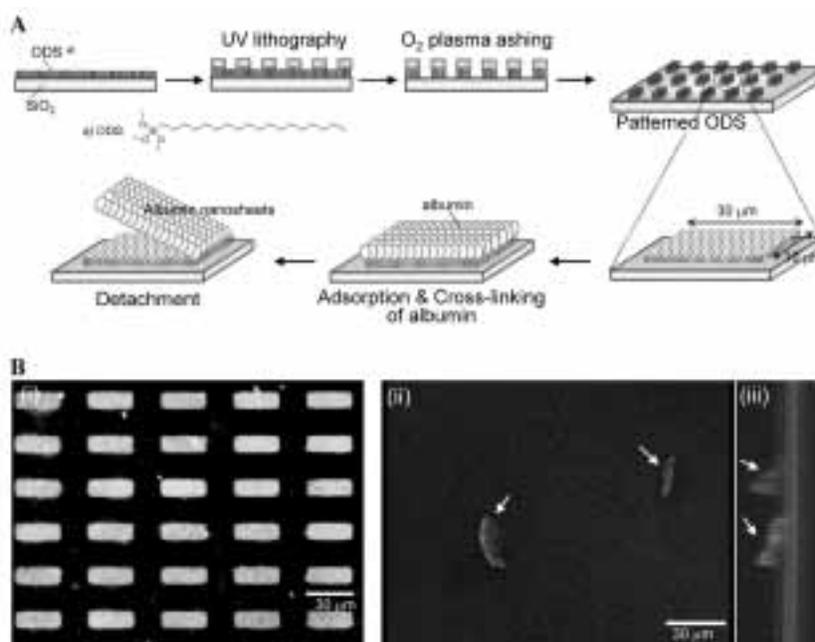


Figure 6 (A) Preparation of free-standing albumin-nanosheets on the patterned octadecyltrimethoxysilane self-assembled monolayer region (ODS-SAM). (B) (i) Observation of SH bound rHSA adsorbed onto the patterned ODS-SAM using fluorescent microscope. (ii) Observation of the free-standing rHSA-nanosheets (arrows) detached from the patterned ODS-SAM and (iii) the 90° rotation image of (ii) using confocal laser fluorescent microscope. (Cited and partially modified from reference 40)

択的に吸着するようになる (Figure 6B (i)). この時、吸着した rHSA 同士の電荷反発が低下しているため、rHSA 間の疎水性相互作用が増大して互いに密に吸着する。この吸着機構を基に逆の発想に転換すれば、疎水性相互作用で吸着している rHSA は、例えばラウリルエーテルのような界面活性剤を作用させると基板から簡便に脱着可能となる。次いで、吸着した rHSA 間を2次元的に架橋させてシート化させるために、適当なスペーサー長を持つ架橋剤スクシンイミジル6 [3'-(2-ピリジルジチオ)プロピオアミド]ヘキサネートを予め結合させ、その還元によってチオール基を露出させた (rHSA 1 分子あたり約7.4 分子のチオール基を導入)。チオール基導入後も rHSA は ODS パターン上に選択的に吸着した。その後、酸化触媒として作用する銅 (II) イオンを含む緩衝液中に浸漬させると、チオール基の酸化が速やかに進行して rHSA 間のジスルフィド結合が生起する。実際、ラウリルエーテルを作用させて基板から剥離させ共焦点顕微鏡にて観察したところ、Figure 6B (ii), (iii) に示すようにパターン通りの形状を保持したアルブミンナノシートが得られ、rHSA 間の2次元架橋が均一に進行したことが明らかとなった。さらに原子間力顕微鏡にて膜厚を測定したところ、ナノシートの膜厚は約4.5 nm と見積もられ、これは rHSA 単分子の大きさに相当した⁴²⁾。従って、得られたアルブミンナノシートは、現在報告されている自己支持性ナノシートの中でも最も薄い膜厚であり、高い柔軟性を呈していることも特筆すべき点である。

(2) PLGA ナノシート⁴¹⁾

次に生分解性高分子の PLGA から成るナノ粒子を用いた方法

を紹介する。今回、ナノシート表面に H12 を結合させるために、アミノ基を有するキトサンを含むポリビニルアルコール (PVA) 水溶液を乳化剤とした O/W 型エマルジョン法を採用して、PLGA ナノ粒子 (粒径: 164 ± 26 nm) を調製した。血小板とほぼ同等の大きさのナノシートを調製するために直径 $3 \mu\text{m}$ のディスク状の ODS パターンを描いた。シート化には粒子間の2次元架橋が必須であり、それを達成するにはまず PLGA ナノ粒子を疎水性 ODS パターン上に高密度に配列させなければならない。そこで、ODS パターン領域以外は2-メチル [(ポリエチレンオキシ)プロピル]トリクロロシラン (mPEO) で修飾した基板にして、ナノ粒子の非特異的吸着を完全に抑制できるよう工夫した (Figure 7A)。さらに、PLGA ナノ粒子を ODS パターン上に吸着させるために、粒子のゼータ電位がほぼゼロとなる pH に調整したリン酸緩衝液 (pH 7.0) にナノ粒子を分散させた。この条件の下、我々は、PLGA ナノ粒子分散液 ($1 \times 10^{12}/\text{mL}$) を基板上に滴下して窒素ガスで吹流して吸着させるドライパターニング法と超純水洗浄を10回繰返すことで、ODS パターン上のみナノ粒子を高密度に配列させる技術を確認した (Figure 7B (i), (ii))。次いで、シート化させるために粒子間の2次元架橋法を検討した。最近我々は、ポリスチレン粒子をそのガラス転移温度 (T_g) 付近 (110°C) に加熱すると隣接する粒子同士が形状を維持した状態で2次元的に熱融合する現象⁴³⁾を採用し、PLGA ナノ粒子 ($T_g: 58.8^\circ\text{C}$) を選択的に吸着させた基板を 60°C で2分間加熱するだけでナノシート化することに成功している。Figure 7A に示すように、水溶性高分子の PVA 水溶液を基板上にキャストし乾燥させると、ピンセットにて簡便に剥離できる

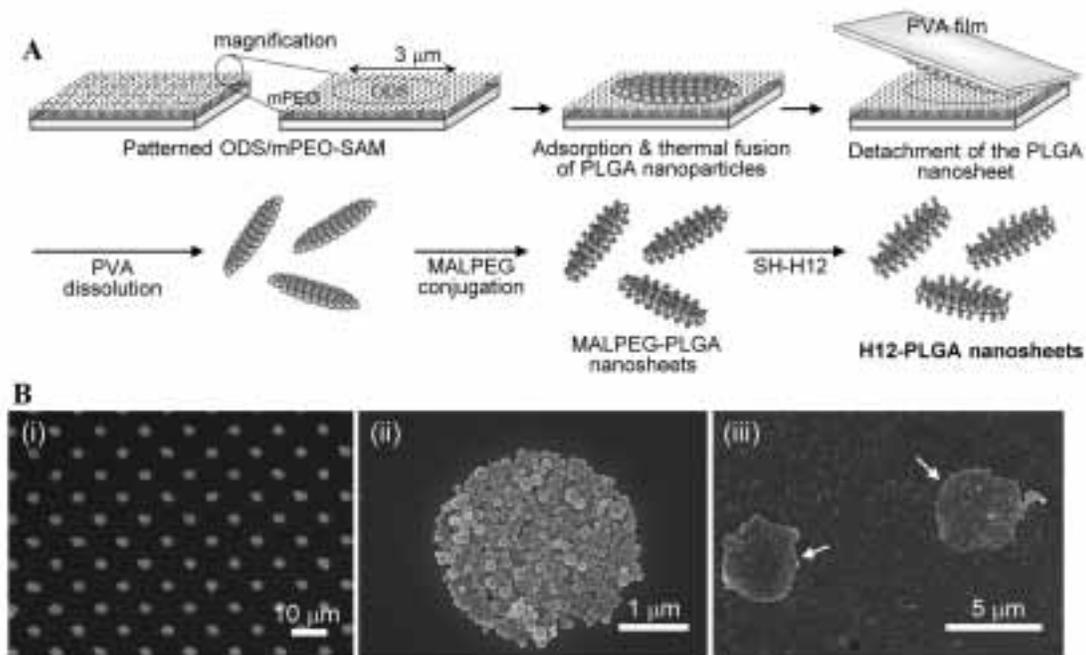


Figure 7 (A) Preparation of free-standing H12-conjugated nanosheets composed of poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) using a patterned ODS-SAM on a SiO_2 substrate. (B) (i) SEM image of the PLGA nanoparticles adsorbed specifically onto the disk-patterned ODS-SAM. (ii) Magnified SEM image of (i). (iii) SEM image of the free-standing PLGA nanosheets (arrows). (Cited and partially modified from reference 41)

程の柔軟かつ強靱な透明支持膜が得られる。興味深いことに、基板上的PLGA ナノシートは全てPVA 支持膜側に完全に転写されていた。この現象は、PLGA ナノシートとODS間の疎水性相互作用は乾燥時には働かずにファンデルワールス力のみとなる一方、ナノシートとPVA 支持膜間には静電的相互作用や水素結合が付加されて結合が強まり、結果としてナノシートはPVA 支持膜側に完全に転写されたためと説明できる。あとは、得られたPVA 支持膜を水溶液中で溶解させれば、パターン通りの直径 $3 \mu\text{m}$ のディスク状を保持したPLGA ナノシート分散液を得ることができる (Figure 7B (iii))。この時、ナノシートの膜厚はPLGA ナノ粒子の粒径に依存するので約 $140\text{--}180\text{nm}$ である。

PLGA ナノシート表面にH12を結合させる方法は、架橋剤を利用したナノ粒子の表面修飾技術 (4.2.1項を参照) を用いれば達成できる。ここでも、片末端にN-ヒドロキシスクシンイミド基、もう片末端にマレイミド基を有する二官能性PEG 誘導体を架橋剤として使用している (Figure 7A)。未反応のH12を高速液体クロマトグラフィーにて検出しH12の仕込み量から逆算することで、H12はナノシート1枚当たり 6.1×10^5 分子結合した計算となった。ナノシート1枚の平均表面積 ($14.9 \mu\text{m}^2$) からH12結合密度に換算すれば 4.1×10^4 分子/ μm^2 と見積もられ、止血能を発現したナノ粒子のH12結合密度とほぼ同程度に制御している。

4.3.2. 機能評価

本項では、H12-PLGA ナノシートに絞って紹介する⁴¹⁾。上述通り、我々は血小板とほぼ同等の大きさ (直径 $3 \mu\text{m}$) のディスク状で膜厚を約 160nm に制御したPLGA ナノシートを調製することに成功した。そこで、4.3.項の冒頭で記述したりサーチクエスチョン「従来の生体投与可能なナノ構造体は球状粒子が常識であるが、果たしてこの形状が最適な構造であろうか？」に対する実験を計画した。具体的には、構造体の形状 (ナノシート vs. 球状粒子) と活性化血小板に対する粘着挙動の相違を比較した。そのため、比較対照群として、PLGA ナノシートの平均表面積 (1枚: $14.9 \mu\text{m}^2$) とほぼ同等の表面積となるPLGA マイクロ粒子 (粒径: 約 $2.2 \mu\text{m}$, 表面積: $15.2 \mu\text{m}^2$) をO/Wエマルジョン法で予め調製した。この時、H12結合密度も同等となるよう制御した。

血小板減少モデル血液中 ($2.0 \times 10^4/\mu\text{L}$, 正常の10分の1) にDiOC18にて蛍光標識したH12-PLGA マイクロ粒子を添加し、コラーゲン基板に対する粒子の粘着挙動を観察した。Figure 8Aに示すように、H12未結合体では基板にほとんど粘着しなかったが、H12-PLGA マイクロ粒子は顕著に粘着したことから、特異的に粘着血小板に粘着することを確認した。その時の粘着速度は $7.7 \pm 1.3/\text{mm}^2/\text{s}$ と算出された (Figure 8A)。そこで、マイクロ粒子の代わりにH12-PLGA ナノシートを添加したところ、同様にコラーゲン基板に特異的に粘着した。興味深いことに、その粘着速度は $14.5 \pm 2.3/\text{mm}^2/\text{s}$ と算出され、マイクロ粒子と比較して約2倍増大する結果が得られた (Figure 8A)。これは、PLGA ナノシートはシート状構造であるために壁面近傍 (コラ

ーゲン) を流動しやすく、さらに広い接触面積を提供するために粘着力が増大したためと考えられる。さらに、流動後の基板を走査型電子顕微鏡で観察すると、広い接触面積を有するナノシートは、ナノ粒子添加系と比較して血小板凝集を2次元方向に促進させる足場になることが明らかとなった (Figure 8B)。従って、ナノ構造体の形状は止血効果の重要なパラメータとなることを実証した。今後は、より高い止血効果を発現するナノシートの大きさ、膜厚を詳細に検討しながら、大量調製法を確立していく計画を立てている。

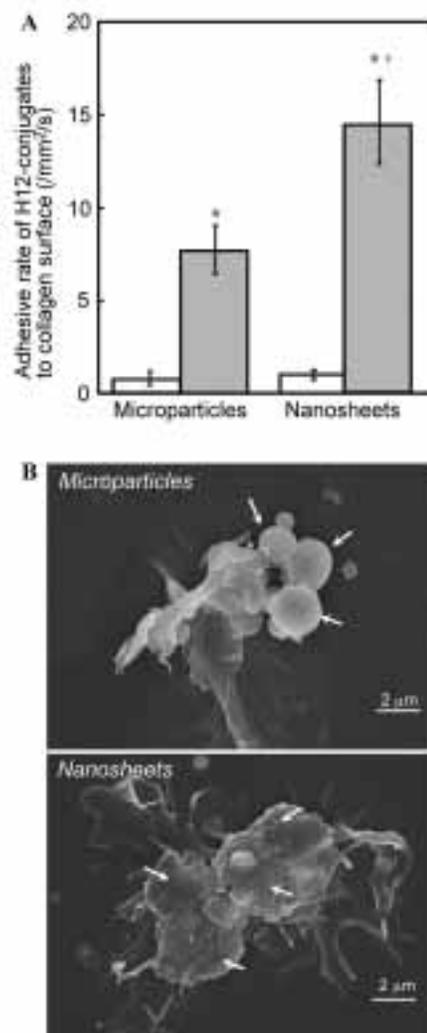


Figure 8 (A) Adhesive rates of the H12-PLGA nanosheets and H12-PLGA microparticles in the thrombocytopenic blood toward the collagen-immobilized surface at a shear rate of 150 s^{-1} . Solid or open columns show H12-conjugates or non-conjugates, respectively. Count of platelets and the H12-PLGA nanosheets or H12-PLGA microparticles was $2.0 \times 10^4/\mu\text{L}$. * $P < 0.05$ for H12-PLGA nanosheets or H12-PLGA microparticles group vs. PBS group, and † $P < 0.05$ for H12-PLGA nanosheets group vs. H12-PLGA microparticles group. (B) SEM images of platelet thrombi involving H12-PLGA microparticles and H12-PLGA nanosheets, respectively. Arrows in the SEM images indicate microparticles and nanosheets. (Cited and partially modified from reference 41)

5. 将来展望と今後の課題

血小板代替物の研究開発を期待するニーズが高いにも関わらず、未だ実用化には至っていない。しかし、我々のグループでは、血小板減少動物モデルを用いた止血効果に関する知見が確実に得られており、完全人工系の血小板代替物の設計方針の妥当性は実証された。そして、海外の研究グループも完全人工型血小板代替物の開発に移行してきている。今後は、ナノ構造体の形状に関する知見を集約していきながら、ナノ構造体の最適化並びに安全性試験を行うことは勿論のこと、ナノ構造体を巻込んだ血栓の線溶系に及ぼす影響、反復投与に対する代謝系、細網内皮系、免疫系に及ぼす影響や抗原性の検討を詳細に行う予定である。同時に、臨床試験に向けた適応法（出血の予防なのか、治療なのか）を明確にし、臨床試験のプロトコルを作成していく計画を立てている。現在では、バイオテクノロジーやオプトエレクトロニクスの進歩により血小板やナノ構造体の動的機能に関する多くの情報が短期間に蓄積できるため、この情報を基に新しいナノ構造体の製剤化技術の改良に繋げることも可能であろう。近い将来に実用可能な血小板代替物が創製されるであろうし、それに限らずドラッグデリバリーシステムの基盤技術の発展にも貢献することにもなるであろう。

6. 謝辞

本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）、日本学術振興会科学研究費「基盤B（21300181）」、文部科学省 私立大学学術研究高度化推進事業「早稲田大学 ハイテク・リサーチ・センター」の助成より行われた。記して謝意を表する。

参考文献

- 1 日本赤十字社ホームページ
<http://www.jrc.or.jp/blood/shiryo/index.html>
- 2 半田誠, 岡村陽介, 武岡真司, 池田康夫. 血小板代替物. 血栓止血誌 2008; 19: 774-778.
- 3 Ikeda Y, Handa M, Kawano K, Kamata T, Murata M, Araki Y, Anbo H, Kawai Y, Watanabe K, Itagaki I. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest* 1991; 87: 1234-1240.
- 4 Santro SA, Zutter MM. The $\alpha_2\beta_1$ integrin: A collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Hemost* 1995; 74: 813-821.
- 5 Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res* 2004; 114: 221-233.
- 6 Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 2002; 110: 599-611.
- 7 Marguerie GA, Plow EF, Edgington TS. Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *J Biol Chem* 1979; 254: 5357-5363.
- 8 Bode AP, Fischer TH. Lyophilized platelets: fifty years in the making. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007; 35: 125-133.
- 9 Graham SS, Gonchoroff NJ, Miller JL. Infusible platelet membranes retain partial functionality of the platelet GPIb/IX/V receptor complex. *Am J Clin Pathol* 2001; 115: 144-147.
- 10 Blajchman MA. Substitutes and alternatives to platelet transfusions in thrombocytopenic patients. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1637-1641.
- 11 Coller BS. Interaction of normal, thrombasthenic, and Bernard-Soulier platelets with immobilized fibrinogen: defective platelet-fibrinogen interaction in thrombasthenia. *Blood* 1980; 55: 169-178.
- 12 Agam G, Livne AA. Erythrocytes with covalently-bound fibrinogen as a cellular replacement for the treatment of thrombocytopenia. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 105-112.
- 13 Coller BS, Springer KT, Beer JH, Mohandas N, Scudder LE, Norton KJ, West SM. Thromboerythrocyte. *In vitro* studies of potential autologous, semi-artificial alternative to platelet transfusions. *J Clin Invest* 1992; 89: 546-555.
- 14 Levi M, Friederich PW, Middleton S, de Groot PG, Wu YP, Harris R, Biemond BJ, Heijnen HF, Levin J, ten Cate JW. Fibrinogen-coated albumin microcapsules reduce bleeding in severely thrombocytopenic rabbits. *Nat Med* 1999; 5: 107-111.
- 15 Bertram JP, Williams CA, Robinson R, Segal SS, Flynn NT, Lavik EB. Intravenous hemostat: nanotechnology to halt bleeding. *Sci Transl Med* 2009; 1: 11ra22.
- 16 Ravikumar M, Modery CL, Wong TL, Dzuricky M, Sen Gupta A. Mimicking Adhesive Functionalities of Blood Platelets using Ligand-Decorated Liposomes. *Bioconjug Chem* 2012; 23: 1266-1275.
- 17 Ravikumar M, Modery CL, Wong TL, Sen Gupta A. Peptide-decorated liposomes promote arrest and aggregation of activated platelets under flow on vascular injury relevant protein surfaces in vitro. *Biomacromolecules* 2012; 13: 1495-1502.
- 18 Kitaguchi T, Murata M, Iijima K, Kamide K, Imagawa T, Ikeda Y. Characterization of liposomes carrying von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib α : a potential substitute for platelet transfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 784-789.
- 19 Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, Tsuchida E, Handa M, Ikeda Y. Rolling properties of rGPIb α -conjugated phospholipid vesicles with different membrane flexibilities on vWf surface under flow conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 765-770.
- 20 Teramura Y, Okamura Y, Takeoka S, Tsuchiyama H, Narumi H, Kainoh M, Handa M, Ikeda Y, Tsuchida E.

- Hemostatic effects of polymerized albumin particles bearing rGPIa/IIa in thrombocytopenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306: 256-260.
- 21 Takeoka S, Teramura Y, Okamura Y, Handa M, Ikeda Y, Tsuchida E. Fibrinogen-conjugated albumin polymers and their interaction with platelets under flow conditions. *Biomacromolecules* 2001; 2: 1192-1197.
 - 22 Wertheimer E, Shapiro B, Fodor-Salomonowicz I. Stability of fibrinogen in normal and pathological plasma. *Brit J Exp Pathol* 1944; 25: 121-125.
 - 23 Hawiger J, Kloczewiak M, Bednarek MA, Timmons S. Platelet receptor recognition domains on the α chain of human fibrinogen: structure-function analysis. *Biochemistry* 1989; 28: 2909-2914.
 - 24 Kloczewiak M, Timmons S, Lukas TJ, Hawiger J. Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxy-terminal segment of the γ chain. *Biochemistry* 1984; 23: 1767-1774.
 - 25 Takeoka S, Okamura Y, Teramura Y, Watanabe N, Suzuki H, Tsuchida E, Handa M, Ikeda Y. Function of fibrinogen γ -chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 312: 773-779.
 - 26 Gupta PK, Hung CT. Albumin microspheres. I: Physico-chemical characteristics. *J Microencapsul* 1989; 6: 427-462.
 - 27 Takeoka S, Teramura Y, Ohkawa H, Ikeda Y, Tsuchida E. Conjugation of von Willebrand factor-binding domain of platelet glycoprotein Ib α to size-controlled albumin microspheres. *Biomacromolecules* 2000; 1: 290-295.
 - 28 Okamura Y, Fujie T, Maruyama H, Handa M, Ikeda Y, Takeoka S. Prolonged hemostatic ability of poly(ethylene glycol)-modified polymerized albumin particles carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide. *Transfusion* 2007; 47: 1254-1262.
 - 29 Okamura Y, Fujie T, Nogawa M, Maruyama H, Handa M, Ikeda Y, Takeoka S. Hemostatic effects of polymerized albumin particles carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide as platelet substitutes in severely thrombocytopenic rabbits. *Transf Med* 2008; 18: 158-166.
 - 30 Bangham AD, Standish MM, Watkins J. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965; 13: 238-252.
 - 31 Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L. Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett* 1990; 268: 235-237.
 - 32 Adler-Moore J, Poffitt RT. AmBiosome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 21-30.
 - 33 Maruyama K. In vivo targeting by liposome. *Biol Pharm Bull* 2000; 23: 791-799.
 - 34 Maruyama K. PEG-immunoliposome. *Bioscience Reports* 2002; 22: 251-266.
 - 35 Okamura Y, Maekawa I, Teramura Y, Maruyama H, Handa H, Ikeda Y, Takeoka S. Hemostatic effects of phospholipid vesicles carrying fibrinogen- γ chain dodecapeptide *in vitro* and *in vivo*. *Bioconj Chem* 2005; 16: 1589-1596.
 - 36 Okamura Y, Takeoka S, Eto K, Maekawa I, Fujie T, Maruyama H, Ikeda Y, Handa M. Development of fibrinogen γ -chain peptide-coated, adenosine 5'-diphosphate-encapsulated liposomes as a synthetic platelet substitute. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 470-477.
 - 37 Okamura Y, Eto K, Maruyama H, Handa M, Ikeda Y, Takeoka S. Visualization of liposomes carrying fibrinogen γ -chain dodecapeptide accumulated to sites of vascular injury using computed tomography. *Nanomedicine* 2010; 6: 391-396.
 - 38 Okamura Y, Katsuno S, Suzuki H, Maruyama H, Handa M, Ikeda Y, Takeoka S. Release properties of adenosine diphosphate from phospholipid vesicles with different membrane flexibilities and their hemostatic effects as a platelet substitute. *J Control Release* 2010; 148: 373-379.
 - 39 Takeoka S, Okamura Y, Fujie T, Fukui Y. Development of biodegradable nanosheets as nano-adhesive plaster. *Pure Appl Chem* 2008; 80: 2259-2271.
 - 40 Okamura Y, Goto T, Niwa D, Fukui Y, Otsuka M, Motohashi N, Osaka T, Takeoka S. Fabrication of free-standing albumin-nanosheets having heterosurface. *J Biomed Mater Res A* 2009; 89A: 233-241.
 - 41 Okamura Y, Fukui Y, Kabata K, Suzuki H, Handa M, Ikeda Y, Takeoka S. Novel platelet substitutes: disk-shaped biodegradable nanosheets and their enhanced effects on platelet aggregation. *Bioconj Chem* 2009; 20: 1958-1965.
 - 42 Carter DC, Ho JX. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem* 1994; 45: 153-204.
 - 43 Okamura Y, Utsunomiya S, Suzuki H, Niwa D, Osaka T, Takeoka S. Fabrication of freestanding nanoparticle-fused sheets and their hetero-modification using sacrificial film. *Colloids Surf A* 2008; 318: 184-190.

一過性脳虚血による脳機能障害と人工酸素運搬体の脳保護効果

Brain Dysfunction Induced by Transient Cerebral Ischemia and Cerebral Protective Effects of Liposome-Encapsulated Hemoglobin

山口 拓^(1,2), 富樫 廣子⁽³⁾, 吉岡 充弘⁽¹⁾

Taku Yamaguchi^(1,2), Hiroko Togashi⁽³⁾, Mitsuhiro Yoshioka⁽¹⁾

和文抄録

本稿では一過性脳虚血モデルラットにおける脳機能障害としての行動変容を探索し、その脳機能障害に対するナノカプセル型人工酸素運搬体である TRM-645 (TRM) の効果を検討した我々の研究成果を中心に概説する。一過性脳虚血 (脳虚血再灌流) モデルラットには、両側総頸動脈を閉塞した2-血管閉塞 (2VO) ならびに2VOの処置に加えて両側椎骨動脈を永久閉塞した4-血管閉塞 (4VO) モデルを用いて評価した。2VOモデルラットは高架式十字迷路試験において不安惹起行動が認められ、この行動変容は脳虚血中に投与したTRMによって改善された。また、2VOによって海馬内組織酸素分圧 (PtO₂) は低下したが、TRMによってそのPtO₂の低下は抑制された。これらのことから、2VOによる不安惹起行動に対するTRMの改善機序のひとつとして、2VOによる低灌流状態において、側副血行路を介した酸素供給がTRMによって図られたことが推察される。一方、4VOモデルラットは文脈的恐怖条件付け試験において長期記憶障害が認められ、この行動変容もTRMによって改善された。さらに文脈的恐怖条件付け試験後の海馬CA1領域におけるリン酸化cAMP response element binding protein (CREB) の発現は減少しており、この変化はTRMによって有意に改善した。また、海馬内PtO₂においてTRMは脳虚血中の著明なPtO₂の低下に対して影響を及ぼさなかったが、脳虚血後に観察された過酸素状態に対して有意な抑制効果が認められた。これらのことから、4VOによる長期記憶障害ならびに海馬におけるリン酸化CREBの発現減少に対するTRMの改善作用は、TRMが脳虚血直後に認められる海馬内の過酸素状態を正常化することによって発現することが示唆された。以上の研究成果から、2VOによる不安惹起行動および4VOによる長期記憶障害に対するTRMの脳保護効果が明らかとなった。また、TRMは一過性脳虚血による異常な脳内酸素動態を正常化することによって、虚血性脳機能障害の改善作用を発現することが示唆された。さらに、TRMを含むナノカプセル型人工酸素運搬体は脳虚血性疾患に対する酸素治療という臨床応用ならびに急性脳梗塞の治療薬としての可能性が期待された。

Abstract

Liposome-encapsulated hemoglobin has been developed as a blood substitute. In spite of its size (1/30 – 1/40 of erythrocytes), liposome-encapsulated hemoglobin has an oxygen-carrying capacity comparable to erythrocytes. Thus, liposome-encapsulated hemoglobin is expected to carry oxygen into vital organs via collateral routes during ischemia induced by vascular embolism. In the present review, we introduced the therapeutic effects of TRM-645 (TRM: hemoglobin concentration of 6 g/dl; 2.5 or 5 ml/kg), a liposome-encapsulated hemoglobin, on brain dysfunctions in rats after transient cerebral ischemia. We investigated effects of TRM in rats treated with two-vessel occlusion (2VO) which was induced by 10-min clamping of bilateral common carotid arteries and with four-vessel occlusion (4VO) which was prepared by bilaterally occluding the vertebral arteries and common carotid arteries, as transient cerebral ischemic models. Saline or TRM (5 ml/kg) was administered via the tail vein immediately after ischemic insult. In rats treated with 2VO, formation of long-term potentiation (LTP) in the hippocampus was markedly impaired and the open arm durations in the elevated plus-maze decreased significantly 4 days after 2VO, compared to those of sham-

(1) 北海道大学大学院医学研究科神経薬理学分野 〒060-8638 北海道札幌市北区北15条西7丁目 Department of Neuropharmacology Hokkaido University Graduate School of Medicine North-15, West-7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan

(2) 長崎国際大学薬学部薬理学研究室 〒859-3298 長崎県佐世保市ハウステンボス町2825-7 Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki International University 2825-7 Huis Ten Bosch, Sasebo, Nagasaki 859-3298, Japan

(3) 北海道医療大学薬学部薬理学講座病態生理学 〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢1757 Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences Health Sciences University of Hokkaido 1757 Kanazawa, Ishikari-Tobetsu 061-0293, Japan

論文受付2012年4月18日 論文受理2012年8月13日

operated rats, suggesting the hippocampal synaptic dysfunction and anxiogenic properties in 2VO rats. TRM restored the hippocampal LTP formation and normalized the anxiety-related behavior. TRM also improved the decreased tissue oxygen partial pressure in the 2VO rat hippocampus, possibly due to oxygen delivery to ischemic regions. In rats treated with 4VO, the freezing rate was significantly decreased in the contextual fear conditioning (CFC) test. Phosphorylation of the cyclic AMP response element-binding protein (CREB) in the hippocampal CA1 region after the CFC test was attenuated. These 4VO-induced impairments were significantly alleviated by the administration of TRM (5 ml/kg, i.v.) during occlusion. Moreover, TRM did not alter hippocampal blood flow and tissue oxygen pressure during 4VO, but it did suppress hyperoxia after ischemia – reperfusion. These findings suggest that TRM, an artificial oxygen carrier, could be a novel therapeutic agent for brain dysfunction after transient cerebral ischemia. Furthermore, liposome-encapsulated hemoglobin including TRM might have therapeutic potentials for protecting the brain from neurological complications associated with acute ischemic stroke, as a promising blood substitute for oxygen therapy.

Keywords

一過性脳虚血, 脳機能障害, 不安惹起行動, 長期記憶障害, 人工酸素運搬体

1. はじめに

脳の重量は体重の2%程度であるが、脳の消費エネルギーは総消費エネルギーの約18%を占めている。この脳へのエネルギーや酸素は脳血流を介して供給され、また脳血流は老廃物や不要物を排出するといった重要な役割を担っている。したがって、脳血流が遮断されて血液が脳細胞に供給されなくなると脳は機能不全となることは周知の事実である。一方、虚血性脳疾患の治療においては、可能な限り早期に虚血領域の血流を再開させること、虚血再開直後に生じる活性酸素などのフリーラジカル産生を抑制することが、脳機能障害後遺症を軽減する上で重要である。現在、脳梗塞における急性期治療として、2009年脳卒中治療ガイドラインにおいて、発症後3時間以内の脳梗塞に対しては、外科的処置やrt-PA(Recombinant tissue plasminogen activator)による血流再建が有効とされている¹⁾。しかしながら治療可能時間(Therapeutic time window)は発症3時間に限定され、その治療可能時間を越える梗塞に対しては血流再開が施されても再灌流障害(Reperfusion injury)を引き起こし、症状を悪化させる恐れがあることが知られている²⁾。この再灌流障害は腫脹とフリーラジカルによってペナンプラと呼ばれる脳梗塞周辺部に壊死を誘発すると考えられており、これを阻止することが重要な脳梗塞治療の課題となっている。そのため、発症後24時間以内にフリーラジカル除去能を有するエダラボンの投与が有効であるとされている³⁾。このように、現在の急性期脳梗塞に対する治療ターゲットは、梗塞による血流遮断の改善と再灌流時に発生する増悪イベント抑制の2点にあるが、これに対する治療戦略は適応範囲が狭く、有効性も満足できるものではないために、さらなる治療薬・治療法の開発が急務である。

臓器移植などの高度先進医療や交通事故による外傷などの増加に伴い、輸血医療の重要性が増している。また、少子・高齢化等による供血者の減少から、輸血用血液の将来的な不足が見込まれている。さらに、多くの国々では十分な輸血前の血液検査が行われず、病原性ウィルスの混入など輸血用血液の安全性が担保されていないのが現状である。このような社会的要求

を背景に、安定的な血液供給と輸血による感染症などの有害作用を防止するために、“人工酸素運搬体”の開発が続けられている⁴⁾。現在開発中の人工酸素運搬体は、非生体材料を用いた有機フッ素化合物であるパーフルオロケミカル類、生体材料を用いた無細胞性ヘモグロビン(Hb)製剤と細胞性Hb製剤に大別される。無細胞性Hb製剤については、初期の未修飾Hb製剤で α -鎖- β -鎖間が血中で解離し腎臓より排泄されるため、血漿中の滞在時間が短く腎機能を障害する欠点があった^{5,6)}。また、Hbが一酸化窒素(NO)を捕捉して消去するため、血圧の上昇、血小板の凝集や消化管の収縮による腹痛などの副作用が指摘されてきた^{7,8)}。現在では、これら副作用の軽減を図るためにHb β 鎖のSH基にNO供与能を付与した製剤⁹⁾など未修飾Hbに化学修飾を加えた無細胞性Hb製剤の開発が行われ、一部の製剤については海外で臨床試験の段階にある。一方、Hbをリポソームで封入した細胞性Hb製剤は、Hbが直接血管壁に接触する事がなく、NO消去に伴う上述の副次作用を防止することができる。また、リポソームの大きさを調節することによって血中の滞在時間を長くすることが可能である^{10,11)}。これらの人工酸素運搬体は、これまで「人工赤血球である輸血代替物」として開発されてきたが、新たに人工心肺充填液や移植臓器の保存液など虚血組織への“酸素供給療法”という観点から臨床応用の可能性が注目されるようになってきた。

以上の背景をもとに本稿では、テルモ株式会社が創製したナノカプセル型人工酸素運搬体であるTRM-645の効果について、一過性脳虚血のモデルとして2-血管閉塞(2VO)¹²⁾および4-血管閉塞(4VO)¹³⁾モデルラットを用いて、これらの一過性脳虚血モデルラットに認められる脳機能障害を指標に検討した我々の研究成果を中心に概説する。なお、紙面の都合上、実験方法等の詳細については、本総説のもとになった我々の既報論文^{12,13)}をご確認頂きたい。

2. ナノカプセル型人工酸素運搬体TRM-645の製剤的特徴

テルモ株式会社が創製したナノカプセル型人工酸素運搬体であるTRM-645(TRM)は、期限切れ輸血製剤由来の精製ヒト

ヘモグロビンをリポソームに封入させたりポソーム化ヘモグロビン (p50 = 35.9 mmHg, 製剤中ヘモグロビン濃度: 6%) である¹⁴⁾。このTRMは、生体適合性の向上や粒子の凝集を避けるために、表面がポリエチレングリコールによって修飾されている。また、TRMの粒子径は約200nmで赤血球の1/30~1/40であるため、赤血球が通過できない組織においても酸素供給が可能となる。さらにウィルスフリーであり、ヘモグロビン精製工程により抗原性を排除しているため、血液型に依存しない有用性が確認されている¹⁴⁾。

3. 一過性脳虚血モデルラットの脳機能障害と人工酸素運搬体

3-1. 一過性脳虚血モデルラットの作製について^{12, 13)}

10~15週齢のWistar系雄性ラットを使用した。4VOラットはPulsinelliらの方法¹⁵⁾に準じて作製した。ペントバルビタール(40mg/kg, i.p.)麻酔下に両側椎骨動脈を電氣的に永久焼灼し、7日後に1%ハロタン吸入麻酔下に両側総頸動脈をクレンメにて30分間閉塞した後に血流を再開通させた。2VOラットには両側総頸動脈10分間閉塞のみを施行した。術中は、低体温効果による虚血保護作用を避けるために、体温をヒートパットにて $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (直腸温)に維持した。両側椎骨動脈の永久焼灼に加えて両側総頸動脈に偽手術(Sham operation: Sham)を、あるいは両側総頸動脈にのみ偽手術を施行したSham群を、4VO群あるいは2VO群それぞれの対照群とした。

3-2. 2-血管閉塞モデルラットが示す脳機能障害に対する人工酸素運搬体の効果¹²⁾

1) 2VOラットにおける電気生理学的検討

海馬は虚血に対して脆弱な脳領域の一つである。Moriら(1998)は、10分間の両側総頸動脈の血流遮断(2VO)によって、高頻度刺激後の海馬歯状回での長期増強現象(long-term

potentiation: LTP)が障害されることを報告している¹⁶⁾。これまでの研究からLTPは、学習・記憶に関連した電気生理学的基盤と考えられてきた¹⁷⁾。この一過性脳虚血による海馬でのLTP形成障害の病態生理学的意義については未だ不明の点が多いが、虚血再灌流による脳機能障害の指標の一つとして有用であると考えられている¹⁸⁾。そこで、2VOラットの海馬歯状回にて認められるLTP形成障害を指標に、TRMの効果を電気生理学的に検討した。

TRMを2.5ml/kgにて投与した2VO群においてLTPの形成は認められたが、溶媒を投与した2VO群との間に有意差は認められなかった(Fig. 1)。しかしながら、TRMを5ml/kgにて投与した2VO群では、溶媒投与群と比較して有意なLTP形成を認め、一過性脳虚血によるLTP形成障害に対して改善効果が認められた(Fig. 1)。本検討と並行して実施した2VOラット脳の組織学的検討において、ニッスル染色およびニューラルレッド染色による組織学的変化を光学顕微鏡下に観察したところ、海馬歯状回およびCA1領域での明らかな細胞脱落は認められなかった^{16, 19)}。

2) 2VOラットにおける行動薬理学的検討

海馬は扁桃体を含む辺縁系と共に情動調節に重要な役割を果たしている脳部位である^{20, 21)}。また、情動ストレスによって海馬のLTP形成が障害されることが報告されている²²⁾。ヒトの脳梗塞後にも抑うつや不安などの情動変化が高率に生じることが報告されている²³⁾ことから、一過性脳虚血後による海馬シナプス伝達の障害は、不安などの情動変化と関連している可能性も考えられている。これらを背景に、生得的な不安水準の評価試験である高架式十字迷路(EPM)試験²⁴⁾を用いて2VOラットの不安関連行動について評価し、その行動変容に対するTRMの効果を行動薬理学的に検討した。

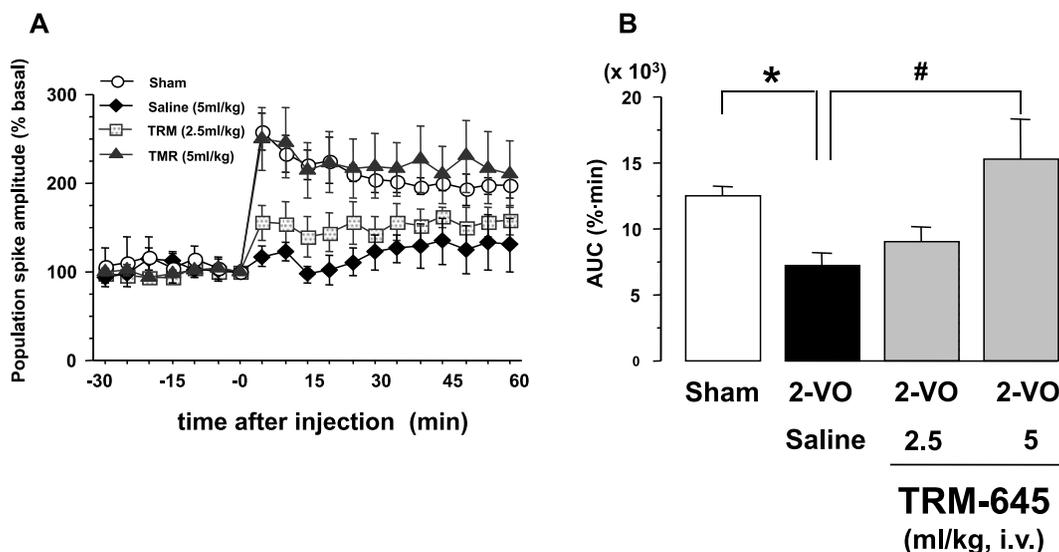


Fig. 1. 脳虚血-再灌流による海馬歯状回LTP障害に対するTRM-645の効果

A) 高頻度刺激時の海馬歯状回における誘発集合電位の経時的変化(高頻度刺激時の誘発集合電位を100%とした。) (B) グラフAにおける高頻度刺激後の曲線下面積(AUC) *p<0.05 vs Sham群, #p<0.05 vs Saline群(文献12から改変引用)

200luxの照明強度条件下において、Sham群と2VO群との間に差はなかったが、2VO群においてオープンアーム滞在時間のわずかな減少傾向が観察され、不安惹起状態である可能性が推察された。そこで、Sham群のオープンアーム滞在時間を増加させる条件である暗条件下の20luxの照明強度においてさらに検討を進めたところ、2VO群に有意なオープンアーム滞在時間の減少が認められ、明らかな不安惹起が観察された (Fig. 2)。この2VOラットに認められた不安関連行動に対するTRMの効果を検討したところ、Salineを投与した2VO群が示すオープンアーム滞在時間の短縮は、TRM (5ml/kg, i.v.)を投与した2VO群において有意に改善された (Fig. 2)。

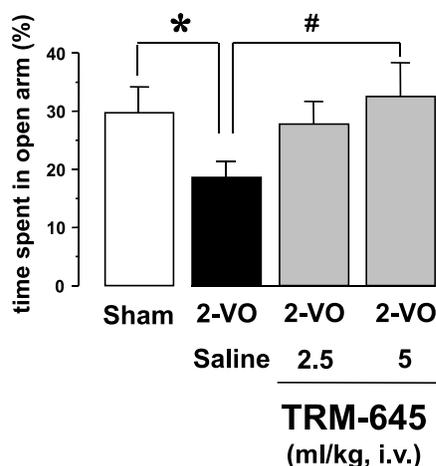


Fig. 2. 脳虚血-再灌流後による不安関連行動に対するTRM-645の効果
暗条件下にて実施した高架式十字迷路試験における2VOラットの不安関連行動とTRM-645の効果。オープンアーム滞在時間の多寡は生得的な不安水準の指標となる (10分間の測定におけるオープンアーム滞在時間の割合%)。* $p < 0.05$ vs Sham群, # $p < 0.05$ vs Saline群 (文献12から改変引用)

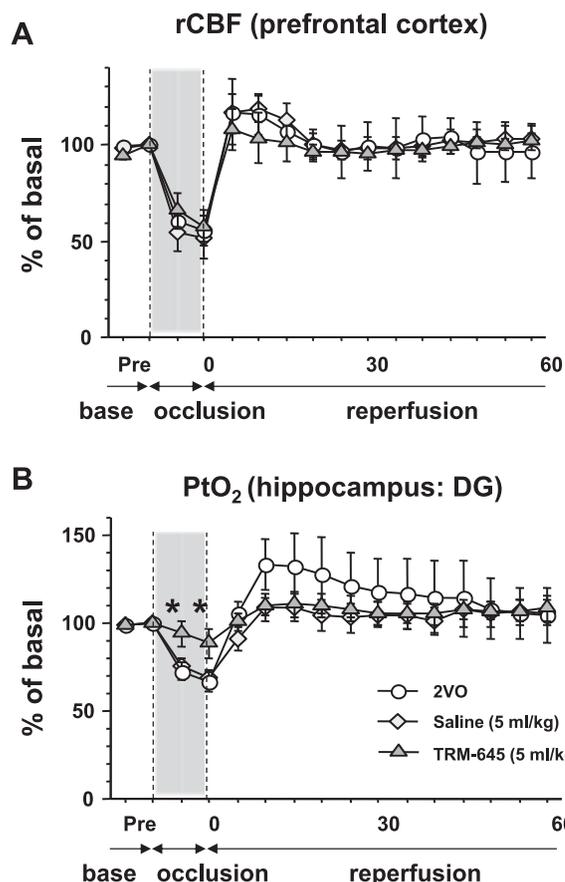


Fig. 3. 2VOラットにおける脳虚血-再灌流後の局所脳血流および脳内酸素分圧変化に対するTRM-645の効果
(A) レーザードップラー血流系を用いた皮質前頭野における局所脳血流量の変化。(B) 酸素電極法を用いた海馬歯状回における組織酸素分圧の変化。(いずれも虚血開始時の値を100%とした変化率にて表示した。) * $p < 0.05$ vs Control群 (文献12から改変引用)

3) 2VOラットにおける脳血行動態学的検討

前頭皮質血流量は、両側頸動脈の10分間閉塞により、前値の約40%まで低下したが、血管閉塞解除後は一時的な過灌流状態を示した (Fig. 3A)。この虚血中の血流低下あるいは再開通後の過灌流状態に対してTRMは影響を及ぼさなかった。一方、海馬内組織酸素分圧を検討したところ、2VOによって海馬における酸素分圧は低下し、その酸素分圧の低下はTRMによって抑制された (Fig. 3B)。

3-3. 4-血管閉塞モデルラットが示す脳機能障害に対する人工酸素運搬体の効果¹³⁾

1) 4VOラットにおける行動薬理的検討

4VOラットが示す行動変容について、①短期記憶をY字迷路 (Y-maze) 試験、②自発運動量をオープンフィールド (OF) 試験、③生得的な不安水準をEPM試験、④恐怖記憶 (記憶に依存した不安水準) / 長期記憶を文脈的恐怖条件付け (CFC) 試験によって探索し、その行動変容に対するTRMの効果を行行動薬理的に検討した。

虚血後7日目から行動解析したY-maze試験、OF試験およびEPM試験において、Sham群と4VOを処置したSaline投与群との間に変化は認められなかった。また、いずれのTRM (5ml/kg, i.v.) の投与群においても有意な変化は認められなかった。しかしながらCFC試験においてのみ長期記憶障害 (すくみ行動の発現低下) と考えられる行動変容が4VO群に観察された (Fig. 4)。この4VO群に認められる長期記憶障害は、TRMを投与した4VO群において改善効果が認められた (Fig. 4)。

2) 4VOラットにおける組織化学的検討

虚血脆弱性を有すると考えられている海馬CA1領域を中心にニッスル染色による4VOラットの組織学的変化を光学顕微鏡下に観察した。海馬CA1, CA3領域、歯状回、扁桃体基底外側核、第二次体性感覚皮質での明らかな細胞脱落は認められなかった。

神経活動マーカーの指標の一つとして用いられるリン酸化cAMP response element binding protein (CREB) に対する免疫陽性細胞は、CFC試験後に海馬CA1領域で発現することが

知られている^{25, 26)}。海馬CA1領域における4VO群のリン酸化CREB免疫陽性細胞は、Sham群と比較して有意に減少していた (Fig. 5, 6)。また、他の海馬歯状回、海馬CA3領域、第二次体性感覚皮質、扁桃体基底外側核では虚血による変化はなかった (Fig. 6)。さらに、4VOによる海馬CA1領域におけるリン酸化CREB免疫陽性細胞の発現減少は、TRMの投与によって有意に改善した (Fig. 5, 6)。

3) 4VOラットにおける脳血行動態および循環動態学的検討

4VOを処置したラットの海馬内血流量において、虚血中の著明な血流量の低下が観察されたが、この4VOによる血流低下に対してTRMによる変化はなかった (Fig. 7A)。また、海馬内組織酸素分圧において、TRMは虚血中の著明な酸素分圧の低下に対して変化を示さなかったが、虚血後に観察された過酸素状態に対して有意に抑制効果が認められた (Fig. 7B)。一方、大

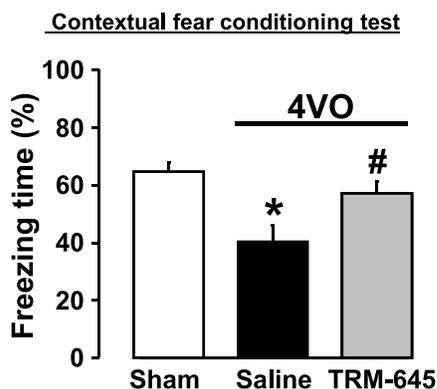


Fig. 4. 4VOラットにおける長期記憶障害に対するTRM-645の効果
 文脈的恐怖条件付け試験における4VOラットの長期記憶障害とTRM-645の効果。すくみ行動発現率の多寡は長期記憶・恐怖記憶の指標となる (15分間の測定におけるすくみ行動発現率の割合%)。* $p < 0.05$ vs Sham群, # $p < 0.05$ vs Saline群 (文献13から改変引用)

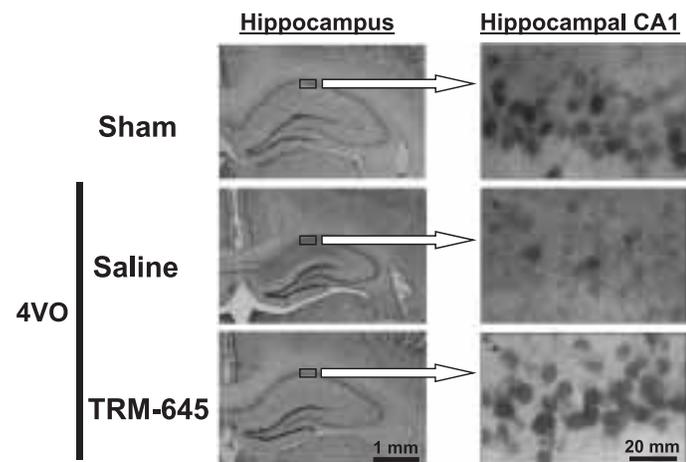


Fig. 5. 背側海馬領域におけるリン酸化CREB免疫陽性細胞の発現に対するTRM-645の効果
 海馬CA1領域を含む背側海馬領域における抗リン酸化CREB抗体を用いた免疫組織学的検討の典型例。(文献13から改変引用)

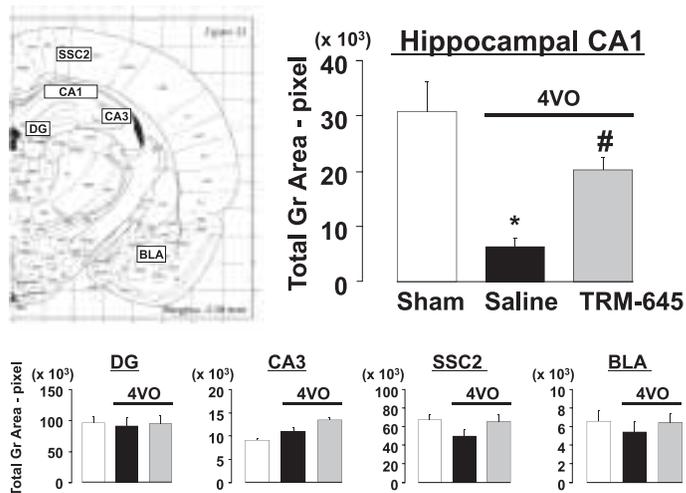


Fig. 6. 脳内リン酸化CREB免疫陽性細胞の発現に対するTRM-645の効果
 背側海馬領域における抗リン酸化CREB抗体を用いた免疫組織学的検討。免疫陽性細胞の計測はデンシトリービデオ画像解析によって定量した。
 CA1: 海馬CA1領域, CA3: 海馬CA3領域, DG: 歯状回, SSC2: 第二次体性感覚皮質, BLA: 扁桃体基底外側核。* $p < 0.05$ vs Sham群, # $p < 0.05$ vs Saline群 (文献13から改変引用)

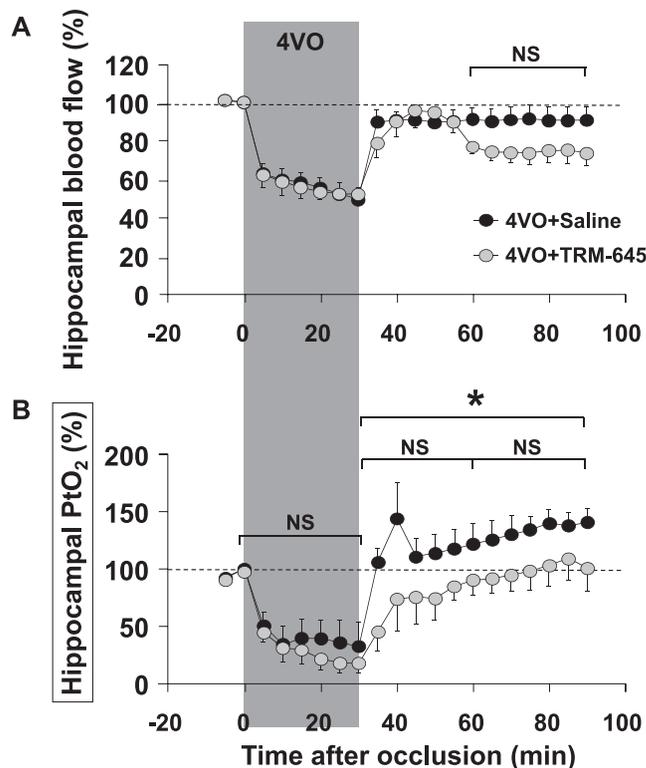


Fig. 7. 4VOラットにおける海馬領域の脳血行動態に対するTRM-645の効果
 (A) レーザードップラー血流系を用いた局所脳血流量の変化。(B) 酸素電極法を用いた脳内組織酸素分圧の変化。(いずれも虚血開始時の値を100%とした変化率にて表示した。) * $p < 0.05$ vs Saline群, NS: 有意差無し。(文献13から改変引用)

腿動脈圧について、虚血中および虚血後において有意な変化は無かったが、虚血30分から60分後までTRM投与群において動脈圧の軽度な上昇が観察された。また心拍数について、TRM投与群において虚血中に低下傾向が観察されたが、虚血中および虚血後において有意な変化は無かった。TRM投与群の大腿動脈圧ならびに心拍数に軽度の変化が認められたことから、intactラットに対してTRMの効果を検討したところ、いずれの指標においても有意な変化は認められなかった。

4. 一過性脳虚血モデルラットの脳機能障害に対する人工酸素運搬体の保護効果とその作用機序

4-1. 2-血管閉塞モデルラットが示す情動機能障害に対する人工酸素運搬体の改善機序¹²⁾

2VOモデルラットを用いた検討においては、人工酸素運搬体の脳虚血疾患急性期への応用の可能性を追究するために、海馬歯状回でのLTP形成とEPM試験における不安関連行動を指標として、一過性脳虚血後の脳機能障害に対するTRMの効果について検討した。TRMの投与用量については、あらかじめ2.5ml/kgから30ml/kgまでの用量負荷実験を行った(データ未掲載)。その結果、2.5ml/kgと5ml/kgでは脳組織酸素分圧は投与前値より高値を示したが、それ以上の投与量では、むしろ脳組織酸素分圧が低下することが明らかとなった。これは代償可能範囲を超えた過剰な前負荷によって、心機能障害が生じたことによると考えられた。これに対して、TRM 2.5ml/kgと5ml/kgは、心循環系に与える影響も少ないことから、適切な投与用量であると判断した。

海馬歯状回のLTP形成は、2VO群では有意に障害されたが、TRMの投与によって改善された。この結果は、TRMが遅発的な脳機能障害を改善したことを示しており、TRMが一過性不完全脳虚血による脳血流の低下に伴った脳組織酸素分圧の低下を代償できる十分な酸素供給能を有していることが推察される。EPM試験による不安関連行動の評価においても、2VOの処置によって生じた不安惹起様行動は、TRMによって改善された。これは、電気生理学的検討の結果と一致するものであり、虚血中のTRMの処置によって海馬での神経伝達が正常に維持されたことを示唆している。事実、2VOラットの脳血流はTRMあるいはSalineを投与しても、対照群と同様に前値の40~50%まで低下するが、虚血中の脳組織酸素分圧の低下については、TRMの投与によって抑制され、対照群より有意に高値を維持した。すなわち、TRMによって脳組織酸素分圧が高く維持できたのは、単なる輸液効果によるものではなく、TRMの有する酸素供給能によるものであることが示された。TRMは、その直径が約200nmで赤血球のおよそ30分の1である¹⁴⁾。そのため、赤血球が通過できない微細な側副経路を通過して虚血領域に到達し、酸素を供給し得たのではないかと推測される。

リポソーム封入型人工酸素運搬体については、再灌流後の活性酸素を含むフリーラジカルをリポソーム内に閉じこめ、結果的にフリーラジカル除去作用を示す可能性が報告されている²⁷⁾。本研究においても、TRMを投与した2VO群の脳組織酸素分圧

の経時変化に関しては、2VO処置のみの群に認められるような再灌流直後の脳組織酸素分圧の過剰な上昇²⁸⁾は認められず、TRMが再灌流後の細胞傷害性についても保護的に作用している可能性がある。実際、TRMによるLTP形成障害の改善効果は、虚血中のみならず、再灌流直後あるいは24時間後にTRM 5ml/kgを投与することによっても得られている。この効果は同様の評価系において、虚血後に投与したフリーラジカル消去薬エダラボンの効果²⁹⁾に匹敵するものであった。虚血24時間後では、まだ遅発性の脳機能障害は進行性であり、LTP形成障害も虚血4日目に比較して軽度である。この時期にTRMを投与することによって、虚血状態にある脳組織に酸素を供与し、脳機能障害の進行を抑制する可能性も考えられる。この点については、時間依存性を含めたさらなる検討が必要である。

以上のことから、2VOによる海馬LTP形成障害ならびに不安惹起行動に対するTRMの改善機序のひとつとして、2VOによる脳血流の低下状態にTRMを投与したことによる側副血行路を介した酸素供給が図られたことが推察される。

4-2. 4-血管閉塞モデルラットが示す認知機能障害に対する人工酸素運搬体の改善機序¹³⁾

4VO処置はOF試験における自発運動量に影響を与えなかった。脳虚血再灌流後1日目に自発運動量は最も顕著に増加し、その後減少して、5-7日目には脳虚血再灌流群と対照群との差はなくなることが報告されている^{30,31)}。本検討ではOF試験を脳虚血再灌流8日後に施行したことから、脳虚血再灌流処置により自発運動量に影響を及ぼさなかったことは上述の過去の報告と一致する。したがって、4VOによるその他の行動変化は自発運動量の多寡によるものではないと考えられる。

Y-maze試験では、4VOによる自発交替行動の変化は観測されなかった。自発交替行動は短期記憶を反映していると考えられており^{32,33)}、Y-maze試験における本結果は4VO処置が短期記憶に影響を与えないことを示唆する。

臨床研究において、一過性脳梗塞は認知障害のみならず、脳梗塞の生存者中において約20-30%に神経精神学的な合併症として不安障害を発症することが報告されている^{34,35)}。しかしながら、EPM試験における本検討では、4VOによるラットの不安関連行動は変化がなかった。Bantsieleらも4VOによるEPM試験での不安関連行動に変化がないことを報告している³⁶⁾。一方で、上述したように我々は4VO処置の30分よりも緩和な総頸動脈閉塞10分間の2VO処置によってEPM試験での不安惹起様行動を誘発することを見出している¹²⁾。これらの知見から、不安障害の発症は虚血の条件に依存する可能性が示唆されるが、脳虚血と不安障害の関係についてはさらなる研究が必要である。

4VOによる一過性脳虚血は、CFC試験でのFreezing発現率を減少させた。CFC試験は記憶の神経基盤を研究する上で広く用いられている行動評価試験である。この試験において、恐怖行動の表出時に認められるFreezingは学習・記憶の指標として用いられている^{37,38)}。したがって、CFC試験における4VOによるFreezing発現率の減少は、特に長期記憶障害を反映していると考えられる。この4VOにて誘発されたFreezingの減少は、虚

血中のTRM投与によってその他の試験での行動に変化を与えることなく抑制された。これらの結果から、4VOによるCFC試験でのFreezingの減少は、不安や恐怖と関連のない長期記憶障害である可能性が考えられる。さらに、TRMは他の行動試験において行動異常を引き起こすことなく、虚血再灌流後の長期記憶障害を改善する可能性がある。したがって、TRMは“酸素運搬薬”として脳梗塞などの脳虚血再灌流障害への新たな治療アプローチになる可能性があると考えられる。

本検討にて使用した4VOラットでは、認知機能に加えて、海馬CA1領域におけるCREBのリン酸化も障害されていた。転写因子の一つであるCREBはProtein kinase AやCalcium/calmodulin-dependent kinase IVなどのCREBに対するリン酸化酵素によってserine 133がリン酸化されることにより活性化される^{39, 40}。このCREBのリン酸化は、CREBによって制御される遺伝子転写の活性化に必須段階であるとされている^{41, 42}。このように、CREBのリン酸化は遺伝子発現依存的な記憶過程における脳の活性化部位を同定するためのマーカーとなることが知られている^{25, 26}。さらに、最近の研究において、恐怖記憶の想起には強化と消去の2つの過程があることが示されており、これらの2つの過程はCREBのリン酸化に続く新たな遺伝子発現に依存して発現する⁴³。さらに、海馬におけるタンパク合成が記憶の強化過程において必須であることが示されている⁴⁴。すなわち、CFC試験後に認められるCREBのリン酸化が4VOによって抑制されたことは、記憶過程に必須である海馬の神経回路網の障害を示唆する。4VOによるFreezing発現の抑制は、いかなる記憶の過程に障害を受けたのかは未だ明らかではないが、記憶の獲得と強化の両過程、もしくはその一方が障害された結果であると推測される。この4VOによる海馬CA1領域でのCREBリン酸化の障害に対して、TRMは抑制効果を示した。この結果は、TRMが脳虚血再灌流により誘発される海馬の神経回路網の障害を改善する脳保護効果を有することを示唆する。同時にこの脳内機序は、4VOによる長期記憶障害に対するTRMの改善効果と密接な関連性があると推察される。

4VOを処置したラットの大腿動脈圧ならびに心拍数については、虚血中および虚血後において有意な変化はなかった。海馬内血流量に関しては虚血中の著明な血流量の低下に対してTRM投与による変化はなかった。海馬内組織酸素分圧に関して、TRMは虚血中の著明な酸素分圧の低下に対して変化を示さなかったが、虚血後に観察された過酸素状態に対して抑制効果が認められた。MCAOモデルラット⁴⁵ならびに我々の報告である2VOラット¹²)を用いた報告では、TRMが虚血領域に酸素を運搬することが示されているが、この矛盾はおそらく脳虚血モデルの違いによるものであると考えられる。これらの知見と4VOモデルによって得られた結果を考え合わせると、TRMは酸素供給以外のメカニズムを介して脳保護効果を発現することが示唆される。すなわち、脳虚血再灌流後の海馬機能障害におけるTRMの改善効果には次の2つのメカニズムが存在すると考えられる。① 脳虚血再灌流後に観測された海馬内の過酸素状態をTRMによって回避できる可能性、② 脳虚血再灌流時に

産生されて神経細胞傷害を引き起こすと考えられている活性酸素種などをTRMが除去する可能性²⁷)が指摘される。さらなる詳細な研究が必要ではあるが、TRMによる脳虚血再灌流後の過酸素状態の正常化および活性酸素種などの神経細胞傷害性分子の除去能、もしくはそれらの一方が本検討で観察された脳虚血による機能障害に対するTRMの脳保護効果の作用メカニズムであると考えられる。

以上の研究成果から、TRMの4VOによる記憶障害に対する改善効果(脳保護効果)が明らかとなった。また、行動薬理学的検討にて見出された4VOによる長期記憶障害に対するTRMの改善作用は、一過性脳虚血による海馬CA1領域におけるリン酸化CREBの発現減少を抑制すること、さらにTRMが脳虚血直後に認められる海馬内の過酸素状態を正常化することによって発現する可能性が示唆された。

Fig. 8に一過性脳虚血モデルラットを用いた脳機能障害とTRMの効果について追究した我々のこれまでの研究成果をまとめた。

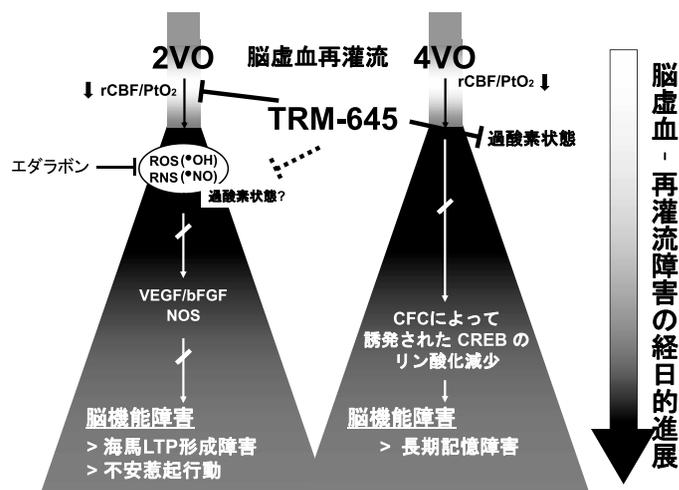


Fig. 8. 一過性脳虚血による脳機能障害に対するTRM-645の効果
rCBF: 局所脳血流量, PtO₂: 脳内組織酸素分圧, エダラボン: ラジカル消去薬, ROS: 活性酸素種, RNS: 活性窒素種, VEGF: 血管内皮細胞増殖因子, bFGF: 塩基性線維芽細胞増殖因子, NOS: 一酸化窒素合成酵素, LTP: 長期増強現象, CFC: 恐怖条件付け

5. “酸素運搬薬”としての人工酸素運搬体の応用

これまでに、人工酸素運搬体は脳虚血もしくは急性出血における後遺症に対して保護的な作用を示すことが報告されている。例えば、人工酸素運搬体は、ラットの中大脳動脈閉塞(MCAO: Middle cerebral artery occlusion)モデル^{46, 47}、もしくは霊長類のMCAOモデル⁴⁸)における梗塞層の拡大に対して抑制的に作用することやラットにおける血液希釈による致死率や代謝性アシドーシスの発症を抑制することが報告されている⁴⁹。しかしながら、脳虚血再灌流後の認知機能障害に対する人工酸素運搬体の効果は未だ明らかにされていない。現在、人工酸素運搬体による梗塞領域への酸素供給能は未だ論議中であるが、基礎研

究において人工酸素運搬体はラットの血中酸素含有量を上昇させたとの報告がある⁴⁶⁾。しかしながら、陽電子放射断層撮影(PET: Positron emission tomography)を用いた研究において、ラジオアイソトープで標識した人工酸素運搬体をMCAOモデルラットに投与すると、大脳皮質ではその放射活性が観測されたが、虚血中心部では観測されなかった⁴⁵⁾。したがって、人工酸素運搬体の梗塞領域における酸素供給能に着目して、人工酸素運搬体の脳虚血再灌流障害に対する脳保護効果のメカニズムを明らかにすることは急務である。近年開発されたりポソーム封入型のヘモグロビン製剤は、これまでの研究から、虚血組織へも十分な酸素供給能を有する可能性があり⁵⁰⁾、急性期の虚血性血管疾患に対する酸素治療薬としての有用性が期待されている。我々も2VOおよび4VOラットといった2種類の一過性脳虚血モデルにおいて、上述したような人工酸素運搬体の脳虚血再灌流障害に対する脳保護効果を確認した^{12, 13)}。このように人工酸素運搬体は、酸素運搬“役”としてのみならず、酸素運搬“薬”として利用できる可能性が考えられた。

6. おわりに

以上の研究成果から、2VOによる不安惹起行動および4VOによる記憶障害に対するTRMの改善効果(脳保護効果)が明らかとなった。また、TRMは一過性脳虚血による異常な脳内酸素動態を正常化することによって、虚血性脳機能障害の改善作用を発現することが示唆された。さらに、TRMを含むナノカプセル型人工酸素運搬体は代替輸血用製剤の有望な候補としてのみならず、脳虚血性疾患に対する酸素治療という臨床応用ならびに急性脳梗塞の治療薬としての可能性が期待される。

謝 辞

TRM-645を供与頂きましたテルモ株式会社、ならびに本研究に協力を頂きました当研究室の大学院生であった掛端 仁 博士、濱館直史 博士に感謝致します。

引用文献

1. Ogawa A, Mori E, Minematsu K, Taki W, Takahashi A, Nemoto S, Miyamoto S, Sasaki M, Inoue T, Group MJS. Randomized trial of intraarterial infusion of urokinase within 6 hours of middle cerebral artery stroke: the middle cerebral artery embolism local fibrinolytic intervention trial (MELT) Japan. *Stroke* 2007; 38: 2633-2639.
2. McCord J. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-163.
3. Lapchak P. A critical assessment of edaravone acute ischemic stroke efficacy trials: is edaravone an effective neuroprotective therapy? *Expert Opin Pharmacother* 2010; 11: 1753-1763.
4. Scott GM, Kucik FD, Goodnough TL, Monk GT. Blood substitutes: evolution and future applications. *Clin Chem* 1997; 43:1724-1731.

5. Sasaki H, Takeoka S, Park SI, Kose T, Nishide H, Izumi Y, Yoshizu A, Kobayashi K, Tsuchida E. Surface Modification of hemoglobin Vesicles with Poly(ethylene-glycol) and Effects on Aggregation, Viscosity, and Blood Flow during 90% Exchange Transfusion in Anesthetized Rats. *Bioconjug Chem* 1997; 8: 23-30.
6. Ogata Y. Characteristics and function of human hemoglobin vesicles as an oxygen carrier. *Polymers or Advanced Technologies* 2000; 11: 205-209.
7. Nakai K, Usuba A, Motoki R, Takahashi TA. Effect of a hemoglobin-encapsulated liposomes, neo red cell, in perfused rat coronary circulation. *Jpn J Artif Organs* 1997; 26: 553-556.
8. Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H908-H915.
9. Nakai K, Sakuma I, Togashi H, Yoshioka M, Sugawara T, Satoh H, Kitabatake A. S-nitrosylated polyethylene glycol-conjugated hemoglobin derivative as a candidate material for oxygen therapeutics. *Adv Exp Med Biol* 2003; 519:207-16.
10. Nakai K, Usuba A, Ohta T, Kuwabara M, Nakazato Y, Motoki R, Takahashi AT. Art. Cells. Coronary Vascular Bed Perfusion with a Polyethylene Glycol-Modified Hemoglobin-encapsulated Liposome, Neo Red Cell, in Rats. *Artif Organs* 1998; 22: 320-325.
11. Tsutsui Y, Asakawa Y, Goto H, Kimura T, Ogata Y. Assessment of the oxygen transport capacity of NRCs with a 70% blood exchange in rats. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol* 1998; 22: 347-760.
12. Kakehata J, Yamaguchi T, Togashi H, Sakuma I, Otani H, Morimoto Y, Yoshioka M. Therapeutic potentials of an artificial oxygen-carrier, liposome-encapsulated hemoglobin, for ischemia/reperfusion-induced cerebral dysfunction in rats. *J Pharmacol Sci* 2010; 114 :189-197.
13. Hamadate N, Yamaguchi T, Sugawara A, Togashi H, Izumi T, Yoshida T, Ohmura Y, Yoshioka M. Liposome-encapsulated hemoglobin ameliorates impairment of fear memory and hippocampal dysfunction after cerebral ischemia in rats. *J Pharmacol Sci* 2010; 114: 409-419.
14. Kaneda S, Ishizuka T, Goto H, Kimura T, Inaba K, Kasukawa H. Liposome-encapsulated hemoglobin, TRM-645: Current status of the development and important issues for clinical application. *Artif Organs* 2009; 33: 146-152.
15. Pulsinelli WA, Brierley JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 1979; 10: 267-272.

16. Mori K, Yoshioka M, Suda N, Togashi H, Matsumoto M, Ueno K, Saito H. An incomplete cerebral ischemia produced a delayed dysfunction in the rat hippocampal system. *Brain Res* 1998; 795: 221-226.
17. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973; 232: 331-356.
18. 富樫広子, 吉岡充弘, 一過性脳虚血と海馬長期増強, 日本薬理学雑誌 1998; 111: 55-63
19. Kakehata J, Togashi H, Yamaguchi T, Morimoto Y, Yoshioka M. Effects of propofol and halothane on long-term potentiation in the rat hippocampus after transient cerebral ischaemia. *Eur J Anaesthesiol* 2007; 24: 1021-1027.
20. Ishikawa A, Nakamura S. Ventral Hippocampal Neurons Project Axons Simultaneously to the Medial Prefrontal Cortex and Amygdala in the Rat. *J Neurophysiol* 2006; 96: 2134-2138.
21. Vertes PR. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 2006; 142: 1-20.
22. Matsumoto M, Togashi H, Ohashi S, Tachibana K, Yamaguchi T, Yoshioka M. Serotonergic modulation of psychological stress-induced alteration in synaptic plasticity in the rat hippocampal CA1 field. *Brain Res* 2004; 1022: 221-225.
23. Früwald S, Löffler H, Eher R, Saletu B, Baumhackl U. Relationship between depression, anxiety and quality of life: A study of stroke patients compared to chronic low back pain and myocardial ischemia patients. *Psychopathology* 2001; 34: 50-56.
24. 山口 拓, 富樫廣子, 松本真知子, 吉岡充弘, 高架式十字迷路法を用いた不安水準の評価とその応用, 日本薬理学雑誌 2005; 126: 99-105.
25. Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. Fear memory retrieval induces CREB phosphorylation and Fos expression within the amygdala. *Eur J Neurosci* 2001; 13, 1453-1458.
26. Viola H, Furman M, Izquierdo LA, Alonso M, Barros DM, de Souza MM, Izquierdo I, Medina JH. Phosphorylated cAMP response element-binding protein as a molecular marker of memory processing in rat hippocampus: effect of novelty. *J Neurosci* 2000; 20, RC112.
27. Takeoka S, Teraamura Y, Atoji T, Tsuchida E. Effect of Hb-Encapsulation with Vesicle on H₂O₂ Reaction and Lipid Peroxidation. *Bioconjugate Chem* 2002; 13: 1302-1308.
28. Moskvin AN, Zhilyaev SY, Sharapov OI, Platonova TF, Gutsaeva DR, Kostkin VB, Demchenko IT. Brain blood flow modulates the neurotoxic action of hyperbaric oxygen via neuronal and endothelial nitric oxide. *Neurosci Behav Physiol* 2003; 33: 883-888.
29. Otani H, Togashi H, Jesmin S, Sakuma I, Yamaguchi T, Matsumoto M, Kakehata J, Yoshioka M. Temporal effects of edaravone, a free radical scavenger, on transient ischemia-induced neuronal dysfunction in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 2005; 512: 129-137.
30. Block F, Schwarz M. Dextromethorphan reduces functional deficits and neuronal damage after global ischemia in rats. *Brain Res* 1996; 741, 153-159.
31. Karasawa Y, Araki H, Otomo S. Changes in locomotor activity and passive avoidance task performance induced by cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Stroke* 1994; 25, 645-650.
32. Hughes RN. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci Biobehav Rev* 2004; 28, 497-505.
33. Sarter M, Bodewitz G., Stephens DN. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. *Psychopharmacology (Berl)* 1988; 94, 491-495.
34. Aström M. Generalized anxiety disorder in stroke patients. A 3-year longitudinal study. *Stroke* 1996; 27, 270-275.
35. Chemerinski E, Robinson RG. The neuropsychiatry of stroke. *Psychosomatics* 2000; 41, 5-14.
36. Bantsiele GB, Bentué-Ferrer D, Saïkali S, Laviolle B, Bourin M, Reymann JM. Behavioral effects of four antidepressants on an ischemic rat model of emotional disturbances. *Behav Brain Res* 2009; 201, 265-271.
37. Rudy JW, Huff NC, Matus-Amat P. Understanding contextual fear conditioning: insights from a two-process model. *Neurosci Biobehav Rev* 2004; 28, 675-685.
38. Sandi C. The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage. *Neural Plast* 1998; 6, 41-52.
39. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2, 599-609.
40. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 1999; 68, 821-861.
41. Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca²⁺- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 1996; 87, 1203-1214.
42. Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 1998; 21, 127-148.
43. Trifilieff P, Herry C, Vanhoutte P, Caboche J, Desmedt A, Riedel G, Mons N, Micheau J. Foreground contextual fear

- memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ERK/CREB activation. *Learn Mem* 2006; 13, 349-358.
44. Mamiya N, Fukushima H, Suzuki A, Matsuyama Z, Homma S, Frankland PW, Kida S. Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *J Neurosci* 2009; 29, 402-413.
 45. Urakami T, Kawaguchi AT, Akai S, Hatanaka K, Koide H, Shimizu K, Asai T, Fukumoto D, Harada N, Tsukada H, Oku N. In vivo distribution of liposome-encapsulated hemoglobin determined by positron emission tomography. *Artif Organs* 2009; 33, 164-168.
 46. Fukumoto D, Kawaguchi AT, Haida M, Yamano M, Ogata Y, Tsukada H. Liposome-encapsulated hemoglobin reduces the size of cerebral infarction in rats: effect of oxygen affinity. *Artif Organs* 2009; 33, 159-163.
 47. Kawaguchi AT, Fukumoto D, Haida M, Ogata Y, Yamano M, Tsukada H. Liposome-encapsulated hemoglobin reduces the size of cerebral infarction in the rat: evaluation with photochemically induced thrombosis of the middle cerebral artery. *Stroke* 2007; 38, 1626-1632.
 48. Kawaguchi AT, Haida M, Yamano M, Fukumoto D, Ogata Y, Tsukada H. Liposome-encapsulated hemoglobin ameliorates ischemic stroke in nonhuman primates: an acute study. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 332, 429-436.
 49. Nogami Y, Kinoshita M, Takase B, Ogata Y, Saitoh D, Kikuchi M, Ishihara M, Maehara T. Liposome-encapsulated hemoglobin transfusion rescues rats undergoing progressive hemodilution from lethal organ hypoxia without scavenging nitric oxide. *Ann Surg* 2008; 248, 310-319.
 50. Sakai H, Cabrales P, Tasi GA, Tsuchida E, Intaglietta M. Oxygen release from low and normal P50 Hb vesicles in transiently occluded arterioles of the hamster window model. *Am J Physiol heart Circ Physiol* 2005; 288: 2897-2903.

危機管理の視点からみた輸血用血液準備の重要性と人工血液の開発

Significance of artificial blood from the view point of crisis management

西山 靖将⁽¹⁾, 木下 学⁽²⁾, 染田 英利⁽¹⁾, 柳川 錬平⁽¹⁾, 萩沢 康介⁽³⁾, 妻鳥 元太郎⁽¹⁾

Yasumasa Nishiyama⁽¹⁾, Manabu Kinoshita⁽²⁾, Hidetoshi Someda⁽¹⁾,

Rempei Yanagawa⁽¹⁾, Kohsuke Hagsawa⁽³⁾, Gentaro Tsumatori⁽¹⁾

和文抄録

輸血医療は外傷外科と同様、戦場の負傷者の救命を目的として戦争とともに進歩してきた側面がある。しかしながら輸血には、未知の感染や血液型不適合、使用期限などの人血固有の課題が残されている。また、少子高齢化が進めば十分な供血力を将来も維持していくことは容易でない。我が国は南北に細長く山地の多い国土を有し、地震などの大規模災害による同時多数の負傷者へ対応を平素から備えておくことは重要である。生命維持に不可欠な血液の最も重要な機能は体内の酸素運搬であり、この機能を代償する人工酸素運搬体、すなわち人工血液の開発が望まれる。この人工血液は供血者に依存することなく長期保存も可能であるため、突然にしかも大量の輸血が求められる緊急事態において救命の一助としての有用性が期待される。本稿では過去の歴史を振り返り、危機管理の視点からみた輸血用血液準備の重要性と人工血液開発の意義について述べる。

Abstract

Clinical practice of blood transfusion developed along with military medicine including first aid technique and trauma treatment during the past wars. The blood transfusion replenished reduced circulating blood volume in wounded soldiers and saved their life. There are some specific problems, however, associated with the blood transfusion practice, such as risk of infection of unknown pathogen, incompatibility to blood type and limited storage period. In Japan, decreasing in blood donation might be realized in the future, because of increase in aging population and decrease in birth rate. Furthermore we have special geographical characteristics in Japan that are long and narrow lands from the North to South and are covered most with mountainous area it would suspect obstructiveness for transportation and treatment of casualties in a large disaster. Thus it should be necessary to have always certain provision against such situation. From the above reasons, development of artificial blood, namely artificial oxygen carrier, which has crucial role as a mean of oxygen delivery system in the body has been expected. The artificial blood could be stored without any special preservation devices and just on shelf for a long time after its preparation and also could be used immediately for life-saving in emergency case that requires massive blood transfusion. This paper describes the potential significance of the artificial blood from the view point of crisis management, looking back upon the history of blood transfusion.

Keywords

transfusion, artificial blood, blood substitute, crisis management, military medicine, war

1. はじめに

人類の英知である医学は、戦争や大災害などの未曾有の危機から人命を守るという先人たちの弛まぬ努力の成果である。特に多数の負傷者が発生する戦時においては「兵士の救命＝人的

戦闘力の維持」すなわち戦争の勝敗に直結するため、国家の命運を賭けて時代の先端医学が惜しみなく投入された。20世紀は二度にわたる世界大戦、その後の幾多の紛争が勃発し無数の尊い人命が失われた。一方でこのような数々の武力衝突を経て医

(1) 防衛医科大学校 防衛医学講座 〒359-8513 埼玉県所沢市並木3-2 Department of Defense Medicine, National Defense Medical College 3-2, Namiki, Tokorozawa, Saitama, 359-8513 Japan milimed@ndmc.ac.jp

(2) 同免疫微生物学講座 Department of Immunology and Microbiology, National Defense Medical College

(3) 同生理学講座 Department of Physiology, National Defense Medical College

論文受付2012年7月20日 論文受理2012年8月22日

学が進歩した事も遺憾ではあるが事実である¹⁾。とりわけ大量出血患者に対しては輸血治療という最も有効な手段を得ることができた。我が国では常に地震や風水害等の自然災害が発生し、また鉄道・航空機事故やエネルギープラント災害、地下鉄サリン事件のような化学剤テロに至るまで多岐にわたる人為的な災害も経験してきた。このことから過去の教訓を学びつつ、緊急事態を想定し多数の人命を救うための対策が必要である。そこで、これまでの危機的状況下に求められた血液確保のための取り組みを振り返りつつ、輸血に関する諸問題を補完できる可能性を秘めた人工血液への期待について危機管理の視点から考察したい。

2. 血液先史時代

血液に対する人々の認識は文明の発達とともに変遷してきた。古代ギリシア文学のオデュッセイアには英雄オデュッセウスが生け贄の子羊の新鮮血を用いて降霊の儀式を行うくだりがある²⁾。紀元前ローマ帝国の兵士たちは死亡した剣闘士や闘牛の血液を強壯飲料にしていた³⁾。ローマ教皇インノケンティウス8世は若返り目的に少年の血液を飲用したとも伝えられている。このような「血＝神聖で活力の源」というイメージがその後の宗教文化や吸血鬼伝説に影響を及ぼしたと想像される。我が国でも同様の伝承が存在する。歌舞伎の「八重桐廓断」では割腹自殺した夫の血を飲んで神通力を得た妻の八重桐が山姥に化し故郷の深山で男児を出産する。そしてその子はやがて強力無双の勇者である坂田の金時、すなわち金太郎となる。このように洋の東西を問わず古代の人々は、血液は生命の根源であり神秘性の象徴として捉えていた。

血液に対する科学的な理解は、17世紀初頭英国のWilliam Harveyの血液循環説に始まった。「動物では心臓の拍動によって血液が全身を循環し、出血すれば循環血液量が減少し死に至る」という画期的な報告だった。そして血液補充による救命の可能性、すなわち輸血の探究が始まった。

3. 輸血学の起こり

初めての輸血は17世紀後半にフランス国王ルイ14世の侍医であるJ.B.Denysによって、ガレノスの四体液説に基づく精神安定作用を目的に子羊の血液が輸血された。しかし患者は異種輸血による激しい溶血性の副作用を起こして死亡した。教会から輸血禁止令が出され輸血は危険という認識がしばらく定着した⁴⁾。1825年、出産後の弛緩出血に悩んでいた英国の産科医James Blundellは10名の患者に人血輸血（同種輸血）を行い5名が生存した事を報告した⁵⁾。彼の試みは再び輸血に対する人々の関心を誘い多くの医師が輸血を試みた。1875年Landoisは、当時の輸血症例を供血者と受血者の血管吻合術による輸血と注射器具を用いた輸血に分類してそれぞれの効果を比較したが、いずれの方法も粗雑な手技のため高い死亡率であったと報告した⁶⁾。1900年、オーストリアのLandsteinerがヒトの血液型（A・B・O型）を発見するとマッチングにより安全性が向上し輸血の普及が進んだ⁷⁾。

4. 第一次世界大戦と輸血の進歩

戦争の歴史上、最初に輸血が行われたのは南北戦争であった。しかし極めて限定的な使用で本格的な輸血が試みられたのは1914年に始まった第一次世界大戦以降である⁸⁾。従来は刀剣や単発小銃を用いた短期決戦型の戦闘であった。しかし第一次世界大戦からは、土木工事を施して造った塹壕に新たに発明された機関銃を設置した強固な防御陣地が盛んに造られた。これら塹壕を利用した戦闘の結果、事態は膠着し長期戦化した。更に技術革新によって開発された戦車や航空機という大型兵器も戦場に投入された。このように野戦築城技術と近代化兵器を組み合わせた新しい戦法で著しい数の負傷者が発生した。戦闘による死者は900万人を超え、相当数の兵士が大量出血で死亡したと考えられる。第一次世界大戦でどの程度の輸血が行われたかは記録上定かでない。前線で治療に従事した英国軍医の記録によると、前方の野戦病院では輸血用血液が不足し出血大量による死亡が相次いだ。“hemorrhage is the greatest enemy of the surgeon”と当時を回顧しているのは特筆に値する。更に興味深いことに同記録では輸血による救命例も紹介している。砲弾破裂による両足の複雑骨折で受傷後半日を経過した兵士が運ばれて来た。皮膚は蒼白で体温は冷たく意識も低下。直ちにKimpton Tubeを用いて500cc輸血を実施。その後下腿切断術を行い術後経過良好にて6日後退院したとのことである。ところがこのような成功例は一部であって止血処置が容易でない胸腹部の負傷は致命的であった⁹⁾。兵士の損耗は継戦能力に影響するため、負傷者の治療に必要な血液の確保は大きな課題であった。第一次世界大戦以前は血液が凝固しないうちに輸血を行うことが必要で、このために患者と供血者を両隣に並べて処置をしていた。また血液を介した梅毒感染が問題となりスクリーニング検査を行う必要があった。このことから採取した血液を次に使用するまで凝固しないまま保存できる手立てが求められた。第一次世界大戦開始当初、それまで凝固阻止に使われていたヒル（蛭）から抽出されたヒルジンの毒性が判明した。そして同時期にクエン酸ソーダにブドウ糖を加えた新たな抗凝固剤が開発され最大3週間の保存を可能にした。抗凝固剤と冷蔵庫という二大成果のおかげで時間的余裕をもった輸血が可能となった。その後1936年に始まったスペイン戦争でこの新たな抗凝固剤入り血液の輸血を試みたところ、その有効性が実証された。これに伴い副作用発現や保存血液の品質劣化などに関する研究も進み、その成果は第二次世界大戦に引き継がれた¹⁰⁾。

ところで本邦では、東京大学の塩田廣重博士、九州大学の後藤七郎博士らが第一次世界大戦中の欧州で輸血を学ぶ機会を得ていた。後藤は大学教官でありながら陸軍軍医でもあった。帰国後の1919年、塩田は子宮筋腫の貧血症に対して輸血を行い、これが本邦初めてとされている。また後藤は輸血を併用して膿胸手術を成功させ、両者は我が国の輸血医療の先駆者として多大な貢献をした¹¹⁾。尚、塩田は1930年の浜口雄幸首相襲撃事件の際に輸血用器具と血液型判定試薬を携行して事件現場に駆けつけ、居合わせた首相の親族を供血者にして輸血を行った。その結果、瀕死の首相を病院まで搬送し手術を行うことができた。

この事件は大きく報道され輸血に対する人々の興味を引くこととなった。

前述のように、第一次世界大戦では抗凝固剤の有効性が確認され保存血液による輸血が普及した。そこで多くの健常者から採血を行って大量の血液を常時保存するための方策が各国で始まり、いわゆる血液銀行の創設へと展開した¹²⁾。ソ連では1926年にモスクワ市に輸血のための中央組織が創設され以後全土に拡大した。1935年には2万2千例、1940年には20万例の献血数に増えた。ソ連は隣国フィンランドとの国境紛争やドイツの国力増強に備えて国家主導の輸血体制を整備したと考えられる¹³⁾。1936年、同国のYudinらが成人屍体の血液を人体に輸血したことを報告した。彼らは、犬を用いた動物実験で効果を検証し、繊維素溶解現象により抗凝固剤を必要としない死体血は、細菌感染症や悪性腫瘍例を除けば輸血使用可能と判断していた¹⁴⁾。来る大戦を意識し、血液銀行だけによる供給能力の限界を予測して様々な手段を講じて血液確保を検討していた国内事情が推察される。

実用化までには至らなかったが本邦でも死体血輸血例が存在する。1938年の日中戦争にて右大腿部の貫通銃創で受傷後3時間経過し出血性ショック状態の兵士が包帯所（応急救護所）に収容された。耳朶血を絞りだしO型と判定。傍らの頭部砲弾創で即死後2時間経過した戦死者も同じ血液型であることが判明した。軍医の気転で戦死者の心臓から200mlを採血、リング液輸液と共に死体血を輸血したところ橈骨動脈が触知された。明らかな副反応はなく野戦病院に後送り救命し得た¹⁵⁾。なお、この時軍医を補佐していた見習士官は我が国の心臓外科学の草分けを行った榊原任博士であった。現場軍医の着意を学術活動として報告している点からも、当時の軍医は失血対策に高い関心を持っていたものと推察される。昭和7年の陸軍軍医学校卒業式での御前講演によれば、「(前略)世界大戦当時ノ経験並ビニ其ノ研究ニ依リ合法的輸血ハ危険ナキノミナラズ却テ極メテ有効ナル治療法ノ一トナリ現在ニ於テハ軍陣医学上特ニ重要ナル地位ヲ占ムルニ至リ」と記録が残されている¹⁶⁾。出血対策を医学上の最重要課題と位置づけ、海外での研究成果に強い関心を寄せていたと思われる。

5. 第二次世界大戦と輸血供給体制の確立

そもそも輸血用血液は使用期限があることから、使用時期や必要量を予測した上で待機的に準備しなければならない。第二次世界大戦前夜の各国では、第一次世界大戦の経験を踏まえて輸血体制の整備にとりかかった。1930年代後半から英国は保存血増量のために、献血者確保のため組織づくり、一人当たりの採血量の検討、抗凝固剤の濃度決定や有効保存期間の設定などの検討に入った。そしてこのような取り組みは米国にも波及した¹⁷⁾。

米国最初の血液銀行は、1936年にFantusがシカゴのCook County Hospitalに設けた病院内輸血室から始まった。1941年の真珠湾攻撃以降の風雲急を告げる時局の中で、国防血液計画（Armed Services Blood Program : ASBP）が発表された。米

国内の献血量を増やすため先ず献血者の確保から始まった。サンフランシスコのIrwin Blood Bankを皮切りに主要都市に採血窓口が開設され、メディアを活用した献血者募集活動が盛んに行われた。更に血液採取や血液型判定に従事する技術者の養成、長距離輸送にも耐えられるデイスポーザブルバッグの試作、輸送用の保冷コンテナやそれらを搭載できる航空機の整備が行われた。このような様々な試みを経て、米本土から世界各地へのグローバルな血液供給体制が確立されていった¹⁸⁾。1943年に英国で新しい抗凝固保存液ACD（Acid-citrate-dextrose solution）が開発された。従来品と比べ滅菌が可能で最短で20日、最長で28日間の血液保存が可能となった¹⁹⁾。この新たな抗凝固剤は雑菌の繁殖を抑制し血液の性状を損なうことなく保存できたので広く普及した。最終的に米国内の採血量は1333万パイント（1パイント=470ml）にも達した。大戦末期までに米軍は世界各地に約83万パイントの血液を輸送した²⁰⁾。米本土から比較的近い欧州に比べて、太平洋地域では血液供給が十分ではなかった。なぜならばカバーすべき地域があまりにも広大で、しかも熱帯地域特有の気象が影響し米本土から端末までの空輸が制限されることがあったからである。このため各地域で兵士から採血が行われた（Fig.1.）。



Fig. 1. Blood bank established in military camp, New Guinea, 1945. Donors are waiting outside dispensary housing.¹⁸⁾

残念なことであるが、本邦の輸血に関する状況は終戦時に関係資料が焼失してしまい詳細は不明である。

6. 朝鮮戦争と輸血の発達

大戦終結後も東西対立は深刻化し1950年に朝鮮半島で武力衝突が発生した。3年間の戦闘による犠牲は一般市民を含めて300万人を上回った。多数の兵士を投入した人海戦術による地上戦に、対地ロケット砲など大量の砲弾で地域制圧できる新型兵器や航空爆撃も加わり、第二次大戦を超える激しい戦闘となった。1950年7月に米軍極東司令部は朝鮮半島向けの輸血業務を専門に取り扱う部隊「406th Medical General Laboratory」を東京に設置した。同年9月には戦闘の激化により韓国国内での需要が日本からの供給を上回り、米本土から直接韓国に追加補

充を行った。米軍は戦争間を通じて研究チームを派遣し輸血に関する調査を行った。具体的には、血液保存期間による効果、大量輸血に伴う副反応などの基礎的検討から、血液の必要量の算定や輸送手段などの運用面の検討まで行った。その結果、血液保存期間が14日を過ぎると品質劣化が加速することが判明した。このため比較的新鮮な血液を前方の野戦病院で、使用期限の近い血液を後方病院で使用する基準を設け保存血液の節用を図った。また長距離輸送のために、野外で粗雑な取り扱いをされても破損することなく保冷できる工夫が求められた。第二次大戦中は樽状の頑丈な食品用メタルコンテナに着目し、内部に氷を詰めて血液ビンを保冷輸送していた (Fig.2)。朝鮮戦争開戦当初も第二次大戦中に使用されたものを流用していた。しかし輸送後のコンテナ回収率が低く次の輸送に支障が生じた。そこで軽量合板製で積上げの容易な木製コンテナが開発された。そこへ持って故障の多かったサーモスタットも改良され冷蔵能力が向上した。血液所要の算定に関しては、敵と味方の戦力規模や戦闘方法に大きく影響され、ゲリラや警察活動による犠牲者も多く、戦闘による被害予測は困難であった。大まかな試算であるが朝鮮戦争中の米軍兵士に対する輸血実績によれば、患者一人あたり軽症例で平均2.2単位、重症例で4.4単位が必要と見積もられた。このデータはその後の様々な事態において血液準備量の目安とされた²¹⁾。



Fig. 2. Whale blood packed in ice in marmite can container for transportation, Italy, 1944.¹⁸⁾
(ETO: European Theater of Operations)

7. 冷戦期以降の武力衝突での輸血：輸血用血液確保の重要性和その難しさ

砂漠地帯が主戦場の中東戦争では戦車が活躍した。まもなく戦車を破壊するため対戦車兵器や重武装した航空機による空からの攻撃が編み出された。従来からの銃撃戦による外傷に加えて、戦車戦で生じた爆発破片で受傷部位は複雑かつ重症化し、

また高熱による熱傷も合併した複合損傷が増加した²²⁾。1973年の第4次中東戦争では総動員で臨んだイスラエルではほとんどの成人男性が出征し、残った女性が主な供血者となる事態に陥った。更に悪いことに、アラブ諸国が最新鋭対空ミサイルを導入したため、イスラエル国内から野戦病院までの空輸ができず前線の兵士から採血せざるを得なかった²³⁾。兵器の進歩による戦傷の重症化は輸血の所要を増大させるとともに、血液の供給力（供血者の確保や輸血用血液の輸送）の問題が浮上したのである。

ベトナム戦争初期での米軍兵士の主要死因は出血であった。このため早期輸血を試みたところ死亡率の改善が認められたのだが、戦況の泥沼化でジャングル深くに戦闘が拡大し陸上輸送は停滞した。そこで南ベトナム沖に海軍病院船Sanctuaryを派遣し、洋上の輸血拠点と前線をへりで結んだ。この船は最大1500単位の血液を保存できる大型冷蔵庫を有し約300単位の血液を常に用意していた。任務期間中の4年間で約2900名の重症外傷の手術を行い延べ32000単位の輸血を行った²⁴⁾。その後はベトナムの経験から前方の救護施設でも輸血ができる体制を準備したものの、予想に反して湾岸戦争では約100万単位の血液が期限切れ在庫として破棄された。血液所要の見積もりの難しさという課題が明らかになった²⁵⁾。

1982年に起きたフォークランド紛争は、紛争地が英国本土から8000マイル、最も近隣の領土からでも3000マイル以上もはるか遠方の離島のため、英国にとっては限られた軍需という困難な状況下に強いられた。英上陸部隊とアルゼンチン守備隊との地上戦により英軍の被害は銃砲弾による負傷が全体の半数を超える270名であった。この紛争の教訓として当局は輸血用血液確保の問題を挙げている。アルゼンチン空軍の猛攻により英艦隊は大きな損害を被ったが、その中でも大型輸送船が沈没しその積荷である上陸部隊を支援するための輸送ヘリコプターを失った。このため島への物資輸送力が低下し、適切な時期や場所に血液が届けられず必要時に不足する事態が起こった。実は不測時に備えて上陸地の野戦病院から沖合の病院船への重傷患者の空輸を計画していたが、制空権が不安定な状況下では想定どおりに患者を空輸することができなかった。遠隔離島に対する血液供給の難しさを考えさせられる紛争であった²⁶⁾。

8. ボスニア紛争や湾岸戦争以降の武力衝突やテロ攻撃、災害等の特徴

激しい市街戦のボスニア紛争では、交戦地域からわずか500m後方のサラエボ州立病院における約8か月間の集計によると、搬送された負傷者3215名中504名（16%）に患者1人あたり平均1.9Lの輸血が行われた。中でも重症の37名に対しては大量輸血が行われ計約1000Lの血液が使用されたが生存率は30%に満たなかった²⁷⁾。紛争前のサラエボ市の人口は55万人であったが、成人男性は出征し残った市民の多くは遠方へ避難した。その上、サラエボ市は高台に囲まれた盆地であるため周囲から包囲された砲撃により一般市民も含めて6万人が負傷し1万人が死亡した。こうした大幅な人口減少により、この地域の供血

能力は著しく低下した²⁸⁾。大量輸血が想定されるような緊急事態においては、数量に限界がある血液の効率的な使用が重要であるので、同報告では費用対効果を踏まえた血液使用基準の再考を提言している。

これまでの通常兵器を使用した戦争における死因としては外傷性の大量出血によるものが最も多く約半数を占めていた²⁸⁾。特に現代戦では、厚い装甲や強固な施設を貫通する誘導兵器によって、爆発で散乱する金属やコンクリート片、激しい爆風、高熱や火炎による複合損傷が増加した²⁹⁾。敵方の射程外から攻撃できる長距離精密誘導兵器による重症外傷が多発する傾向にある³⁰⁾。一方で東西冷戦の終結以降、多様な脅威に対する即応性を重視するため部隊装備の軽量化が図られてきた。米軍の医療部隊でも軽量化が導入され医薬品の保冷機器も小型化し血液の携行数量も制限された。イラク戦争時、携行血液を使い果たした場合には、派遣前の健康診断により血液型を登録したベースキャンプの兵士から採血して対応した。オーダーから約20分で輸血準備が整ったのでwalking blood bankと呼ばれた³¹⁾。しかしながらイラク戦争では進軍速度が速く広大な砂漠地帯に部隊が散開し陸路伝いで前方への物資輸送が困難な地域もあった。そこでペルシャ湾に血液保存用冷蔵施設を増設した病院船Comfortを運航させ洋上からヘリを使って前方に血液を輸送した。興味深いことに、ベトナム戦と同様にあらかじめ乗組員の血液型を登録しておき船内での手術で輸血用血液が不足した場合は乗組員から採血をして輸血に用いた。この時の状況を当時の衛生士官は“The crew can function as a walking blood bank at a moment's notice.”と回想している³²⁾。

アフガニスタン戦争に参加したカナダ軍は最新の武装をしていたが、不慣れな山岳戦闘や友軍との誤射・誤爆により6年の任務期間中1000名以上が戦闘で負傷し150名以上が死亡した。アフガニスタンへの派遣はカナダ軍にとって朝鮮戦争以来の実戦だったので、特殊任務部隊用の救急法であるTactical Combat Casualty Care (TCCC)の教育を全ての派遣兵士に対して行った。この救急法はベトナムやイラクの教訓から簡易止血器具(ターニケット)や止血剤パウダーを使用して速やかな止血処置を重視したものである。しかしながら実戦下では救助にあたる兵士も危険にさらされるため、自衛戦闘を行いながら負傷者の手当てを行うには限界があった³³⁾。このため現場で輸血を開始できれば出血性ショックを回避できたであろう。

広島・長崎での原爆被害に基づいて、もし核爆発が起きた場合に必要となる医療資源を見積もった研究によると、医薬品や衛生用品の不足や医療施設の破壊に加え輸血用血液の深刻な枯渇が想定されている。その理由として二つ挙げている。一つは核爆発に伴う猛烈な爆風による外傷や熱傷患者が多発し輸血需要が急増する事、もう一つは都市部の被害は大幅な人口減少をきたし供血者確保が困難になる事である。このような理由から大量破壊兵器による輸血体制への計り知れない負の効果が推定されている³⁴⁾。

近年、簡易製造できる即席爆発装置(Improvised Explosive Device: IED)を用いた破壊行為が報じられている。遺棄され

た地雷や砲弾に金属片を詰め込み爆発の威力で内容物を四方に飛散させて殺傷できることから別名「路肩爆弾」と呼ばれ爆弾テロによく用いられている。特に市街地中心部や地下鉄等の比較的閉鎖された空間に多数の人が密集する場所で起こる爆弾テロは、爆弾破片のみならず圧縮された爆風やガラス破片により瞬時に多数の負傷者が発生する。2004年のスペイン列車爆弾テロはその典型であった³⁵⁾。多くの一般市民が瞬時に負傷する爆弾テロも、戦傷と同じく現場での出血対策がその予後に大きく影響する。

自然災害での輸血確保も重要課題である。1995年の兵庫県南部地震(阪神・淡路大震災)では輸血用血液確保のための工夫が注目され、その後の災害対策にも生かされている。具体的には、いざという時のために平素から在庫備蓄に留意していたこと、被害が及ばなかった周辺地域の保存血液を融通し合い自衛隊が被災地の医療機関に輸送協力したことである³⁶⁾。地震が多発するイランでは人口1100万人の首都テヘランで大地震が発生した場合の血液所要を過去の災害事例から検討したところ、発災から24時間以内に10万単位以上の血液が不足すると見積もられている³⁷⁾。このように多数の負傷者が同時発生する緊急事態では、平常時と異なり、血液採取から保存、輸送、そして配分に至る全ての過程で何らかの支障が生じることが予測される。生命維持のためには失われた血液を速やかに補充し循環血液量を保持しなければならない。そこで人血であるがゆえの諸課題を克服でき緊急時を乗り切れる人工血液は魅力的であろう。

9. 人工血液開発に期待すること

武力紛争のみならず、今後懸念される東南海地震や首都直下型地震などの大規模震災においても、輸血用血液の不足が問題となるであろうことは想像に難くない。危機管理の視点から言えば、最大被害シナリオを準備し、必要な対策を一つ一つ実施すべきであることは言うまでもない。我が国は南北に細長く山岳地帯や離島など僻地が多い。このような地形上の特性が救命活動を制約し更なる被害の増加も否定できない。輸血用血液の供給体制はかかる点を考慮すべきではないだろうか。参考までに、これまで血液の不足を補うために冷凍保存した輸血用血液の研究が行われてきた。長期の凍結保存という利点があるものの、凍結融解による赤血球への影響、冷凍設備の維持管理、解凍や洗浄を行うための煩雑な手技を要するため、緊急時に手軽に使用できるものではない。ましてや多数の傷病者が出るような現場では相当な混乱が生じることが想像される。持ち運びが容易で、ある一定期間の保存が効き、血液型に関係なく投与出来るような人工血液が開発されれば、我が国の危機管理だけでなく人類に対して多大な恩恵を授けるであろう。人工血液が本来の血液とほぼ同等の機能を有し、かつ高い安全性のものまで作り上げていくには課題が少なからず存在すると思われる。我が国が世界に誇る先端科学を駆使して実用化される日が待ち望まれる。

10. おわりに

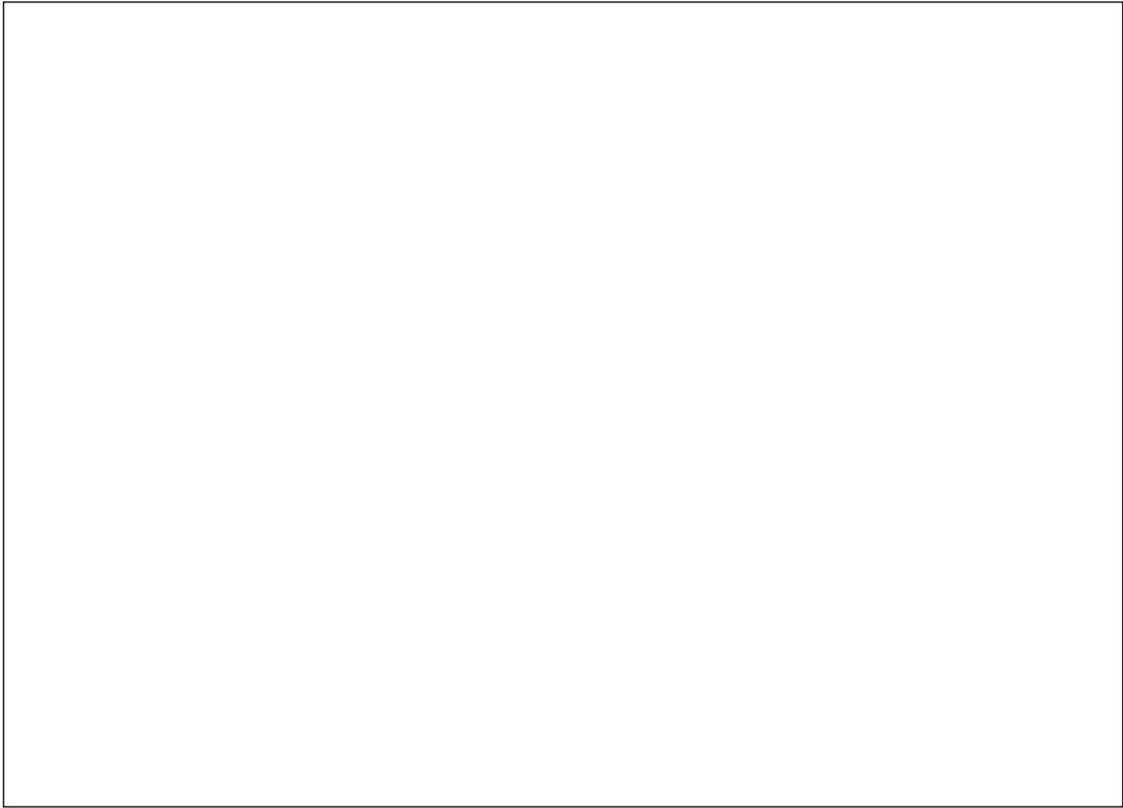
2011年3月11日に発災した東日本大震災で得た教訓は「想定を超える危機が起きた」という事実である。我が国は国土の特性から災害とは隣り合わせ関係にあり、「まさか」に対する平素からの準備が求められている。周知のとおり、他国に例を見ないほどの少子高齢化が進行し、このままでは若年層の減少で血液の確保が容易でない時代が到来するかもしれない。多数の負傷者が発生するような事態に際してゼロ・カジャルティの実現に向け人工血液の貢献が期待される。

本文の内容は、著者らの科学的知見に基づく個人的見解であり、防衛省の公式見解ではないことを申し添える。

参考文献

1. Angus D, Lawrence R. War: a crucible for advances in surgery. *CMAJ* 2006; 175: 1411-3.
2. Renahan R. The staunching of Odysseus' blood: the healing power of magic. *Am J Philol* 1992; 113: 1-4.
3. Moog FP, Karenberg A. Between horror and hope: gradiator's blood as a cure for epileptics in ancient medicine. *J Hist Neurosci* 2003; 12: 137-43.
4. Farr AD. The first human blood transfusion. *Med Hist* 1980; 24: 143-62.
5. Blundell J. Observations on transfusion of blood. *Lancet* 1828; 2: 321-4.
6. Landois L. Die transfusion des blutes. Leipzig SCW Vogel 1875.
7. 隅田幸男. 臨床血液学. 金原出版 1978; 518.
8. Jeffrey HC. Blood transfusion in war. *J R Army Med Corp* 1974; 120: 24-30.
9. Primrose A. The value of the transfusion of blood in the treatment of the wounded in war. *Ann Surg* 1919; 66: 118-26.
10. Vaughan JM. War wounds and air raid casualties. *Br Med J* 1939; 1: 933-6.
11. 塩田広重, 後藤七郎. 子宮筋腫ニ因スル高度ノ患者ニジャンブロー氏輸血法ヲ施行シ好結果ヲ得シ一例ノ供覧. *日本外科学会雑誌* 1919; 20: 234-6.
12. Whyte JH, Milamed DR. Blood and war. *Ulster Med J* 2010; 79: 125-34.
13. Bagdasarov A. Blood transfusion in the U.S.S.R. *Br Med J* 1942; 2: 445-6.
14. Kavatov VB. Biomedical aspects of the use of cadaver blood. *Vestn Akad Med Nauk SSSR* 1991; 9: 18-24.
15. 西村敏雄. 瀕死ノ戦傷者ニ屍体ヨリ得タル血液ヲ輸血シタル一例. *陸軍軍医団雑誌* 1938; 307: 190-2.
16. 第五八輸血ニ就テ. *陸軍軍医学校五十年史*. 不二出版1988; 353-8.
17. Montgomery LC. Progress in war medicine since 1939. *Can Med Assoc J* 1948; 56: 211-6.
18. Kendrick DB. Blood program in World War II. Office of Surgeon General 1964.
19. Loutit JF, Mollison PL. Advantages of a sodium-citrate-glucose mixture as a blood preservative. *Br Med J* 1943; 11: 744-5.
20. United States military blood program. <http://www.militaryblood.dod.mil/> (2012年7月現在)
21. Steer A, Hullinghorst RL, Mason RP. Blood program in Korean War. *Mil Med* 1955; 117: 415-26.
22. Ryan JM, Cooper GJ, Haywood IR, Milner SM. Field surgery on a future conventional battlefield: strategy and wound management. *Ann R Coll Surg Engl* 1991; 73: 13-20.
23. Sandler SG, Hermoni D. Blood transfusion therapy in the rear hospital during the Yom Kippur War. *Mil Med* 1977; 142: 49-53.
24. Monaghan WP, Levan DR, Camp FR. Military blood banking: blood transfusion abroad a naval hospital ship receiving multiple casualties in a combat zone, a controlled medical environment. *Transfusion* 1977; 17: 473-8.
25. Bowersox JC, Hess JR. Trauma and military applications of blood substitutes. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994; 22: 145-57.
26. Marsh AR. A short but distant war - the Falklands Campaign. *J R Soc Med* 1983; 76: 972-82.
27. Begovic M, Mazlagic D, Straus S, Mazlagic B. Blood transfusion requirements among war casualties in Sarajevo. *Prehosp Disaster Med* 1994; 9: 20-4.
28. Bellamy RF. The cause of death in conventional land warfare: implications for combat casualty care research. *Mil Med* 1984; 149: 55-62.
29. Bellamy RF. The medical effects of conventional weapons. *World J Surg* 1992; 16: 888-92.
30. Ramasamy A, Harrison SE, Stewart M, Midwinter M. Penetrating missile injuries during the Iraqi insurgency. *Ann R Coll Surg Engl* 2009; 91: 551-8.
31. Cassella D, Apenzeller G, Stich J. From donor to patient in 20 minutes. *Crit Care Nurse* 2009; 29: 27-32.
32. Brian V. Naval hospital ship heads for home after treating casualties of Gulf War. *JAMA* 2003; 289: 2635-6.
33. Savage E, Forestier C, Withers N, Tien H, Pannell D. Tactical combat casualty care in the Canadian Forces: Lessons learned from the Afghan War. *J Can Chir* 2011; 54: 118-23.
34. Abrams HL. Medical resources after nuclear war. *JAMA* 1984; 252: 653-8.
35. Jose Peral GCJ, Turegano FF, Guerrero JE. 11 March 2004: The terrorist bomb explosions in Madrid, Spain - An analysis of the logistics, injuries, and clinical management

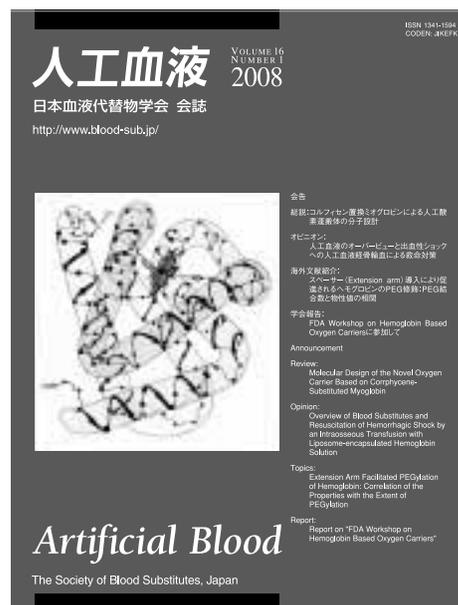
- of casualties treated at the closest hospital. *Critical Care* 2005; 9: 104-11.
36. 山川和美. 輸血用血液の供給における危機管理：震災時の供給について. 第26回日本血液事業学会総会シンポジウム 2002.
37. Tabatabaie M, Ardalan A, Shokouhi M. Estimating blood transfusion requirements in preparation for a major earthquake: the Tehran, Iran Study. *Prehosp Disaster Med* 2010; 25: 246-52.



Call for Papers

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

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



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

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

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

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

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

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

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

ii) Submission by post of four sets of hardcopies.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

References to electronic sources should be given as follows:

Name of website.

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

Examples:

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

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

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

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

16) Address for manuscripts to be sent:
Attn: 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
E-mail : amorcito@a5.keio.jp

投稿規定（平成20年9月30日改訂）

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

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

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

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

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

ii) ハードコピー4部を郵送する。

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

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

4) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著

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

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

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

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

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

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

9) 句読点はコンマ（,）ピリオド（.）とする。

10) 文中の英語に使用するフォントは、Times, Helvetica, Courier, Symbolを原則とし、英文半角小文字とする。ただし、文頭および固有名詞は大文字で書きはじめること。

11) 数字はアラビア数字を使い、度量衡の単位はm, cm, mm, μ m, L, mL, μ L, mol, g, mg, μ g, ng, pg, fg, N/10などを用いる。

12) FigureとTable：引用順にそれぞれ番号を付けること。表題、説明、図表中文字は、全て英文とすることが好ましい。本文中に挿入箇所を明記すること。Figureは直接オフセット印刷とする。Tableは編集部にて入力し原図とする。

13) 文献：本文に引用した順序に番号を付け、文中では²⁾, ^{3,5)}, ^{1, 4,6)}などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名、論文題名、誌名、西暦発行年；巻数：頁～頁。とし、誌名の省略は医学中央雑誌またはIndex Medicusに準拠する。単行本の場合は全著者名、題名、編集者名、書名、発行地：発行書店、年号；頁～頁。の順とする。電子文献の場合は、ホームページ名、改行してアドレス（引用した西暦年月）とする。

(例)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

18) 原稿の送付先

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

日本血液代替物学会 会誌「人工血液」編集部 宛

E-mail: amorcito@a5.keio.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
E-mail: amorcito@a5.keio.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
E-mail: amorcito@a5.keio.jp

●編集後記●

本号では先ず東海大学の岡村先生ほかから、ナノバイオテクノロジーを駆使した、人工血小板とナノシートの設計と臨床応用までの過程についておまとめ頂いた。マテリアルサイエンスは新しい物質系を生み出す多くの可能性を含んでおり、今後の展開を期待したい。2つ目の総説では、北海道大学の山口先生ほかより、テルモが開発してきたTRMが脳梗塞治療に有効であることを実証した内容をおまとめ頂いた。有効性が明らかであるにも関わらず、テルモ社は2012年春にTRMの開発中断を決定した。テルモは1980年代から人工赤血球製剤の研究を継続してきた。他方ニプロ社も社内事情のため同時期に開発を中断した。人工赤血球開発の一つの時代が終わった感がある。最後

の総説では、防衛医大の西山先生ほかより、国家の安全保障・危機管理の観点からの人工血液の必要性と期待についておまとめ頂いた。人工血液の研究をしている研究者にとっては実に刺激を受ける臨場感のある内容であり、また反面、国費を受けて人工血液の研究をしていることに責任を感じずにはいられない。

さて、本誌は慢性的な投稿数の不足に陥っております。また、学会の維持会員数が減少し予算的にも年間の刊行数を少なくせざるを得ない状況でございます。皆様の御理解を頂きたくよろしくお願い申し上げます。今後も本学会の活性化に御協力をお願い致します。
(酒井 宏水)



編集委員会

●酒井 宏水 (委員長), 東 寛, 武岡 真司, 堀之内 宏久, 棟近 公司, 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.20 (2) 2012年12月14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
