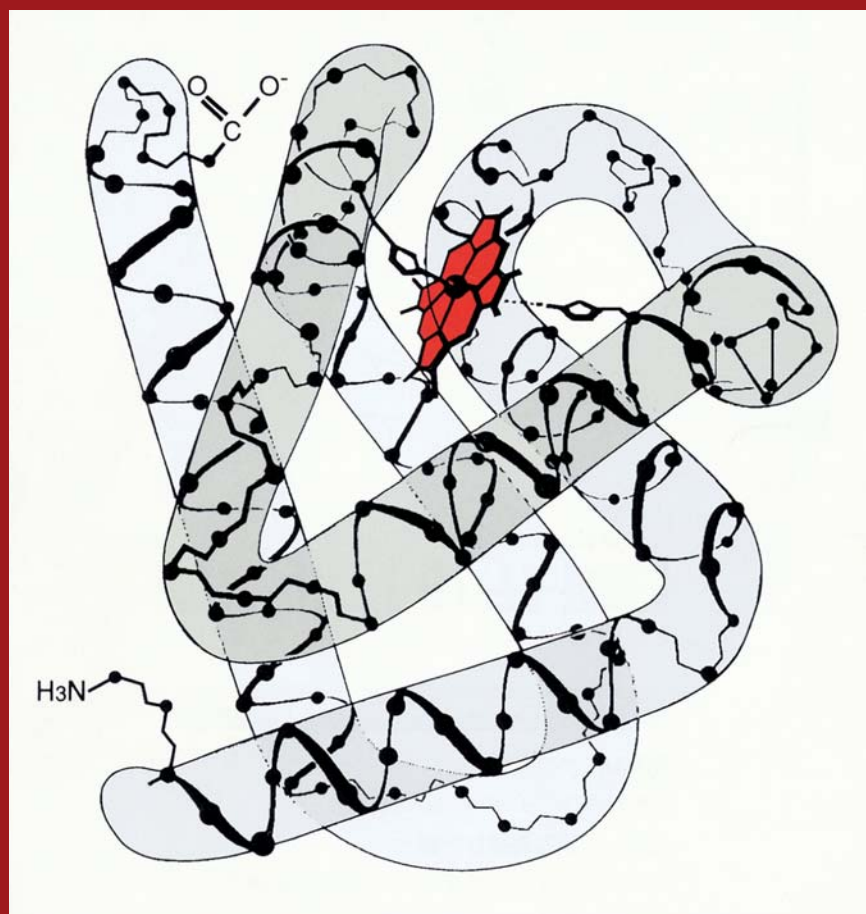


人工血液

VOLUME 23
NUMBER 1
2015

日本血液代替物学会 会誌

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



第22回年次大会プログラム

総説:ヘモグロビン小胞体を用いた臓器組織灌流
保存液の開発

事務局より

The 22nd Annual Meeting Program

Review:

Development of Perfusate for
Tissue/Organ Preservation with Artificial
Oxygen-Carrying Hemoglobin Vesicles

Artificial Blood

The Society of Blood Substitutes, Japan

「熊本から世界へ」
健やかな未来をつくる
私たちは、ワクチンや血漿分画製剤など
生物学的医薬品に特化した「製薬メーカー」です。



健やかな未来をつくる



人工血液

第23巻 第1号 2015年9月

第22回年次大会プログラム

大会長挨拶	3
お知らせとお願い	4
大会日程表	6
交通案内図	7
プログラム	8
抄録	11

総説 ヘモグロビン小胞体を用いた臓器組織灌流保存液の開発

..... 荒木 淳 他 47

事務局たより

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 23 No. 1 September, 2015

The 22nd Annual Meeting Program

<i>Address from the President</i>	3
<i>Information</i>	4
<i>Schedule</i>	6
<i>Venue and Access</i>	7
<i>Program</i>	8
<i>Abstracts</i>	11

Review : Development of Perfusate for Tissue/Organ Preservation with Artificial Oxygen-Carrying Hemoglobin Vesicles

..... Jun Araki, et al. 47

第22回日本血液代替物学会年次大会

The 22nd Annual Meeting of the Society of Blood Substitutes, Japan

『血液代替物のイノベーション～基礎から臨床へ～』

大会長：丸山 徹（熊本大学薬学部教授）

会 期：平成27年10月22日（木）、23日（金）

会 場：熊本大学薬学部・宮本記念館コンベンションホール
（熊本市中央区大江本町5-1）

ランチョンセミナー：平成27年10月22日（木） 11：40～12：30

「経皮吸収型製剤の薬学的管理」

（主催：久光製薬株式会社）

【年次大会事務局】

熊本大学薬学部薬剤学分野

〒 862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1

TEL/FAX：096-371-4153

E-mail：sbsj2015@kumamoto-u.ac.jp

大会長挨拶

この度、第22回を迎えました日本血液代替物学会の年次大会をお世話することとなりました。5年振りに、年次大会を南の地「熊本」にて開催できますことを大変光栄に思いますとともに、責任の重さを感じている次第です。

本大会は、血液の機能の一部を代替するDDS製剤「人工血液」をキーワードに、年に1回、医・薬・理・工学の専門家や関係者の方々が一堂に会して討議、情報交換する重要な場を提供してまいりました。本大会の主たる目的である「人工血液」の実用化に向けた研究を更に推進させるためには、従前にも増し、生命科学を中心とした幅広い専門領域の技術・方法論の連携と融合を図ることが重要であることは言うまでもありません。

第22回年次大会では、これまでの血液代替物研究を振り返りつつ、これからの新たな展開を討議すべく、「血液代替物のイノベーション ～基礎から臨床へ～」を大会テーマとさせていただきました。特別講演には、基礎・臨床領域で幅広く活躍されている著名な4人の先生方、向山政志 教授（熊本大学）、岩瀬弘敬 教授（熊本大学）、奥 直人 教授（静岡県立大学）、杉本幸彦 教授（熊本大学）をお招きし、最先端の研究成果について興味深いご講演を賜ります。また、2日目の招待講演では、Hemosol社の設立者で人工酸素運搬体HBOCを開発し、故土田英俊先生とも親交の深かったCarleton Hsia博士から、現在CEOを務められるNanoBlood社（米国）の研究成果についてご紹介いただきます。さらに、シンポジウムでは、本大会の趣旨に相応しく、1)「人工赤血球製剤の臨床への橋渡し研究」、2)「血清アルブミンの結合・融合技術による新機能製剤の開発」、3)「人工血小板の新しい展開に向けて」の3つのテーマを企画しました。

終わりに、ご多忙の中、特別講演、招待講演やシンポジウムのご講演をご快諾いただきました先生方、またオーガナイザーの労をとっていただきました諸先生方に衷心より御礼申し上げますとともに、参加者各位の熱い議論の盛り上がりにより、“森と水の都”熊本で開催される本大会が実り多きものとなることを祈念いたします。

第22回日本血液代替物学会年次大会
大会長 丸山 徹
(熊本大学薬学部 教授)

お知らせとお願い

■会員・参加者の皆様へ

- 会場
熊本大学薬学部・宮本記念館 1 階コンベンションホール、1 階カンファレンスルーム
(熊本市中央区大江本町 5-1)
- 受付
平成 27 年 10 月 22 日 (木) 1 階フロアで 8:00 から
平成 27 年 10 月 23 日 (金) 1 階フロアで 8:00 から
- 参加登録
参加登録費 一般: 10,000 円、学生: 3,000 円
事前参加登録は行いません。本年次大会ホームページより参加申込書 (pdf ファイル) をあらかじめダウンロード、印刷していただき、必要事項をご記入の上、当日年次大会受付にお持ち下さい (<http://www.blood-sub.jp/kaikoku.php>)。
参加登録費は、年次大会受付にて現金でお支払い下さい (クレジットカードは使用できません)。参加登録後、ネームカードをお渡しますので、所属・氏名をご記入下さい。会期中、ネームカードは会場内で必ずご着用下さい。
- 新入会受付
日本血液代替物学会に未入会の方は、受付で入会手続きをおとり下さい。
年会費は、正会員 10,000 円、購読会員 3,000 円、学生会員 3,000 円です。
- 抄録集
抄録集は、会員全員及び発表者 (非会員) に事前送付しています。当日お忘れなくご持参下さい。また、当日、受付にて 1 部 1,500 円で販売いたします。
- ランチョンセミナー
大会 1 日目昼にランチョンセミナーを開催します。全員の皆様のご参加をお待ちしています。
日時: 平成 27 年 10 月 22 日 (木) 11:40~12:30
場所: 熊本大学薬学部・宮本記念館 1 階コンベンションホール
主催: 久光製薬株式会社
- 招待講演 (ランチョンセミナー形式)
大会 2 日目昼 (平成 27 年 10 月 23 日 (金) 11:55~12:50) の招待講演は、お弁当を用意しています。
- 懇親会
参加費: 2,000 円
参加者相互の親睦を図るため、以下の通り、懇親会を開催します。受付にて、参加登録費と一緒に懇親会参加費を現金でお支払い下さい。皆様のご参加をお待ちしております。
日時: 平成 27 年 10 月 22 日 (木) 18:30 から
場所: 熊本大学薬学部・宮本記念館 1 階カンファレンスルーム
- 発表者へのお願い
 1. 発表形式は、液晶プロジェクターを用いたプレゼンテーションのみとします。発表内容は、PowerPoint 等のプレゼンテーションソフトを使用してご用意下さい。
 2. 発表時に使用するパーソナルコンピューター (PC) は各自でご準備下さい。発表者は、事前の休憩時間にご自分の PC を指定された端末に接続し、液晶プロジェクターから問題なく投影されることを必ずご確認願います。
 3. 念のため事務局で PC (Windows 7、PowerPoint 2013 対応) を用意しますが、あくまでも予備となります。

4. PC のトラブルに備えて、発表原稿ファイルを USB メモリ等の一般的なメディアにバックアップしてご持参下さい。
5. プロジェクター画面の解像度は XGA (1,024×768 ピクセル) ですので、画面の設定を XGA に合わせて下さい。
6. 動画ファイルは Windows Media Player で再生できるものをお願いします。事前に再生できるかご確認下さい。
7. ご使用いただく PC は mini D-sub 15pin のモニター出力端子が必要です。この端子がない PC をご使用の場合は、必ず別途変換コネクタをご持参下さい。
8. Mac を使用される発表者は、必ず外付けのコネクタをご持参下さい。
9. スクリーンセーバー、ならびに省電力設定は予め解除して下さい。

■講演発表時間

特別講演	60 分
招待講演 (ランチョン形式)	55 分
大会長講演	30 分
シンポジウム講演	各オーガナイザーに一任
一般演題	発表 10 分 + 討論 4 分 (交代 1 分) 計 15 分

発表は時間厳守をお願いします。

発表と討論における使用言語は、日本語または英語とします。

■学生講演賞

本年次大会では「学生講演賞」を設けて、優れた講演を顕彰します。

選考方法：審査委員の審査結果をもとに、審査委員会において選考・決定する。

選考基準：発表内容、プレゼンテーション、質疑応答などにおいて優れた講演であり、講演者の今後の一層の研究活動発展の可能性が期待されるもの。

授 与：賞状は本年次大会の閉会時に、審査委員長から本人に授与する。

授与式には、受賞者本人が必ず出席すること。

■各種会議日程

理 事 会	平成 27 年 10 月 22 日 (木) 11:40~12:10 (熊本大学薬学部・宮本記念館 1 階カンファレンスルーム)
評議員会	平成 27 年 10 月 22 日 (木) 12:10~12:40 (熊本大学薬学部・宮本記念館 1 階カンファレンスルーム)
総 会	平成 27 年 10 月 22 日 (木) 12:40~13:10 (熊本大学薬学部・宮本記念館 1 階コンベンションホール)

■大会事務局

熊本大学薬学部 薬剤学分野
〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1
TEL/FAX: 096-371-4153
E-mail: sbsj2015@kumamoto-u.ac.jp

学会のホームページにて、最新のお知らせ、注意事項、プログラムなどを掲載していきます。併せてご確認、ご利用下さい。

学会のホームページ <http://www.blood-sub.jp/kaikoku.php>

大会日程表

	平成 27 年 10 月 22 日 (木)		平成 27 年 10 月 23 日 (金)	
8:00	8:00～	受付	8:00～	受付
8:30				
9:00	8:55～9:00	開会の辞		
	9:00～9:30	大会長講演 演者：丸山 徹(熊本大学) 座長：小林紘一(慶應義塾大学)	9:00～10:30	シンポジウム 3 「人工血小板の新しい展開に向けて」 オーガナイザー： 武岡真司(早稲田大学) 木下 学(防衛医科大学校) 演者： S13 木下 学(防衛医科大学校) S14 萩沢康介(防衛医科大学校) S15 多喜川真人(早稲田大学) S16 鈴木英紀(日本医科大学) S17 丸山 徹(熊本大学)
9:30	9:30～11:30	シンポジウム 1 「人工赤血球製剤の臨床への橋渡し研究」 オーガナイザー： 酒井宏水(奈良県立医科大学) 高折益彦(東宝塚さとう病院) 演者： S1 酒井宏水(奈良県立医科大学) S2 東 寛(旭川医科大学) S3 小田切優樹(崇城大学) S4 高瀬凡平(防衛医科大学校) S5 朝比奈はるか(防衛医科大学校) S6 河野光智(東海大学) S7 内藤祐介(奈良県立医科大学)	10:30～10:40	休憩
10:00			10:40～11:40	特別講演 3 「人工赤血球から脳梗塞治療薬開発へ」 演者：奥 直人(静岡県立大学) 座長：武岡真司(早稲田大学)
10:30				
11:00				
11:30	11:30～11:40	休憩	11:40～11:55	休憩
	11:40～12:30	ランチョンセミナー 「経皮吸収型製剤の薬学的管理」 演者：宮村重幸(熊本中央病院) 座長：渡邊博志(熊本大学) 主催：久光製薬株式会社	11:55～12:50	招待講演(ランチョン形式) 「A Hemoglobin And Superoxide Taming Drug That Makes Crystalloid An Alternative to Blood Transfusion」 演者：Carleton J. C. Hsia(NanoBlood LLC) 座長：酒井宏水(奈良県立医科大学)
12:00				
12:30	12:40～13:10	総会	12:50～13:10	休憩
13:00	13:10～13:20	休憩	13:10～14:10	特別講演 4 「プロスタグランジンの炎症作用～生理と病態を繋ぐもの～」 演者：杉本幸彦(熊本大学) 座長：小田切優樹(崇城大学)
13:30	13:20～14:20	特別講演 1 「CKDとメタボリックシンドローム～心腎代謝連関とバイオマーカーの意義～」 演者：向山政志(熊本大学) 座長：東 寛(旭川医科大学)		
14:00			14:10～14:20	休憩
14:30	14:20～14:30	休憩	14:20～16:20	一般講演 2 座長：山崎啓之(崇城大学)、異島 優(熊本大学) 演者： G5 カ久直昭(千葉労災病院) G6 得能正裕(崇城大学) G7 大澤史佳(早稲田大学) G8 梅崎至高(崇城大学) G9 戸田翔太(熊本大学) G10 木下 遼(熊本大学) G11 永尾紗理(熊本大学) G12 大柿 滋(熊本大学)
15:00	14:30～16:10	シンポジウム 2 「血清アルブミンの結合・融合技術による新機能製剤の開発」 オーガナイザー： 小松晃之(中央大学)・丸山 徹(熊本大学) 演者： S8 小松晃之(中央大学) S9 伊藤大知(東京大学) S10 北岸宏亮(同志社大学) S11 山田佳奈(中央大学) S12 渡邊博志(熊本大学)		
15:30				
16:00	16:10～16:20	休憩	16:20～16:30	学生講演賞発表・閉会の辞
16:30	16:20～17:20	一般講演 1 座長：安楽 誠(崇城大学) 演者： G1 岩崎 瞳(中央大学) G2 横幕恭子(中央大学) G3 Tianshu Li(早稲田大学) G4 河野陽介(崇城大学)		
17:00				
17:30	17:20～17:30	休憩		
	17:30～18:30	特別講演 2 「乳癌に対するホルモン療法～温故知新～」 演者：岩瀬弘敬(熊本大学) 座長：堀之内宏久(さいたま市立病院)		
18:00				
18:30	18:30～20:00	懇親会		

交通案内

熊本大学薬学部への交通アクセス

出発点	アクセス方法		所要時間
JR 熊本駅	バス	健軍方面行き、「味噌天神」下車、徒歩 5 分	約 30 分
	市電	健軍行き、「味噌天神」下車、徒歩 5 分	約 30 分
	タクシー		約 10 分
交通センター	バス	新外・京塚・帯山行き、木山行き（健軍経由）、自衛隊環状線などに乗車、「味噌天神」下車、徒歩 5 分	約 20 分
	タクシー		約 10 分
熊本空港	バス	空港リムジンバス（県庁経由）、大分・延岡発特急バス、高森発快速バスに乗車、「味噌天神」下車、徒歩 5 分	約 40 分
	タクシー		約 30 分
JR 新水前寺駅	徒歩 10 分		約 10 分

熊本大学薬学部（大江キャンパス）への交通アクセス



住所：〒 862-0973
 熊本市中央区大江本町 5-1
 TEL：096-371-4153

熊本大学薬学部（大江キャンパス）内の詳細図



年次大会会場：
 宮本記念館 1 階
 コンベンションホール

懇親会会場：
 宮本記念館 1 階
 カンファレンスルーム

第1日目 平成27年10月22日(木)

8:55~9:00 開会の辞

9:00~9:30 大会長講演

「 α_1 -酸性糖タンパク質の構造・機能特性を基盤とした創薬展開」

丸山 徹(熊本大学薬学部)

座長:小林 紘一(慶應義塾大学医学部)

9:30~11:30 シンポジウム1「人工赤血球製剤の臨床への橋渡し研究」

オーガナイザー:酒井 宏水(奈良県立医科大学)、高折 益彦(東宝塚さとう病院)

S1.「備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤の実用化を目指す研究」

酒井 宏水(奈良県立医科大学)

S2.「人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)を構成する脂質2重膜の薬理作用について」

東 寛(旭川医科大学)

S3.「細胞型人工酸素運搬体ヘモグロビン小胞体の体内挙動と安全性評価〜正常から病態へ〜」

小田切 優樹(崇城大学薬学部)

S4.「出血性ショック心臓の催不整脈性に対する人工酸素運搬体の効果」

高瀬 凡平(防衛医科大学校)

S5.「凝固障害を伴う出血性ショックに対して人工赤血球による蘇生の試み」

朝比奈 はるか(防衛医科大学校)

S6.「ラット肺切除周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与の循環動態と血液酸素化に及ぼす影響」

河野 光智(東海大学医学部)

S7.「ヘモグロビン小胞体の換気不全時の有用性に関する検討」

内藤 祐介(奈良県立医科大学)

11:30~11:40 休憩

11:40~12:40 ランチョンセミナー(主催:久光製薬株式会社)

「経皮吸収型製剤の薬学的管理」

宮村 重幸(熊本中央病院薬局長)

座長:渡邊 博志(熊本大学薬学部)

11:40~12:10 理事会(宮本記念館カンファレンスルーム)

12:10~12:40 評議員会(宮本記念館カンファレンスルーム)

12:40~13:10 総会(宮本記念館コンベンションホール)

13:10~13:20 休憩

13:20~14:20 特別講演1

「CKDとメタボリックシンドローム〜心腎代謝連関とバイオマーカーの意義〜」

向山 政志(熊本大学大学院生命科学研究部)

座長:東 寛(旭川医科大学)

14:20~14:30 休憩

14:30~16:10 シンポジウム2「血清アルブミンの結合・融合技術による新機能製剤の開発」

オーガナイザー:小松 晃之(中央大学理工学部)、丸山 徹(熊本大学薬学部)

S8.「人工酸素運搬体“HemoAct™”の実用化に向けた研究展開」

小松 晃之（中央大学理工学部）

S9. 「アルブミン／ブタ由来ヘモグロビン人工赤血球の開発と酸素親和性の制御」

伊藤 大知（東京大学大学院医学系研究科）

S10. 「人工酸素運搬体 HemoCD の血清アルブミン表面への結合による血中滞留性の向上」

北岸 宏亮（同志社大学理工学部）

S11. 「イヌ用人工血液の開発」

山田 佳奈（中央大学理工学部）

S12. 「アルブミン融合技術を基盤とした血中滞留型チオレドキシンの創製と急性腎障害治療への応用」

渡邊 博志（熊本大学薬学部）

16:10～16:20 休憩

16:20～17:20 一般演題 1

座長：安楽 誠（崇城大学薬学部）

G1. 「HemoAct™ の効率高い精製と酸素親和性測定」

岩崎 瞳（中央大学理工学部）

G2. 「ブタヘモグロビンを用いた HemoAct™ の合成と酸素結合能」

横幕 恭子（中央大学理工学部）

G3. 「Study of amino acid-containing cationic liposomes on the immune stimulation of human macrophages and THP-1 monocytes」

Tianshu Li（早稲田大学理工学術院）

G4. 「アルブミン製剤処方の基礎的検討：抗酸化剤としての N-アセチルメチオニンの有用性について」

河野 陽介（崇城大学薬学部）

17:20～17:30 休憩

17:30～18:30 特別講演 2

「乳癌に対するホルモン療法～温故知新～」

岩瀬 弘敬（熊本大学大学院生命科学研究部）

座長：堀之内 宏久（さいたま市立病院）

18:30～20:00 懇親会（熊本大学薬学部・宮本記念館 1 階カンファレンスルーム）

第2日目 平成27年10月23日(金)

- 9:00~10:30 シンポジウム3「人工血小板の新しい展開に向けて」
オーガナイザー：武岡 真司（早稲田大学理工学術院）、木下 学（防衛医科大学校）
S13.「救急医療における人工血小板の必要性と展望」
木下 学（防衛医科大学校）
S14.「レーザー衝撃波による肺出血に対する H12-ADP-liposome の救命効果」
萩沢 康介（防衛医科大学校）
S15.「血小板：赤血球：血漿（1：1：1）蘇生輸血の新展開」
多喜川 真人（早稲田大学大学院先進理工学研究科）
S16.「ウサギ肝およびマウス肺出血モデルにおける人工血小板投与時の超微細形態像」
鈴木 英紀（日本医科大学）
S17.「人工血小板 H12(ADP)リポソームの繰り返し投与における体内動態特性」
丸山 徹（熊本大学薬学部）
- 10:30~10:40 休憩
- 10:40~11:40 特別講演3
「人工赤血球から脳梗塞治療薬開発へ」
奥 直人（静岡県立大学薬学部・薬学研究院）
座長：武岡 真司（早稲田大学理工学術院）
- 11:40~11:55 休憩
- 11:55~12:50 招待講演（ランチョンセミナー形式）
「A Hemoglobin And Superoxide Taming Drug That Makes Crystalloid An Alternative to Blood Transfusion」
Carleton J. C. Hsia (NanoBlood LLC)
座長：酒井 宏水（奈良県立医科大学）
- 12:50~13:10 休憩
- 13:10~14:10 特別講演4
「プロスタグランジンの炎症作用 ～生理と病態を繋ぐもの～」
杉本 幸彦（熊本大学大学院生命科学研究部）
座長：小田切 優樹（崇城大学薬学部）
- 14:10~14:20 休憩
- 14:20~16:20 一般演題2
座長：山崎 啓之（崇城大学薬学部）、異島 優（熊本大学薬学部）
G5.「人工赤血球は port-wine stain 色素レーザー治療の増感剤としての役割を担う」
力久 直昭（千葉労災病院）
G6.「ヘモグロビン小胞体蘇生が輸血関連急性肺障害に与える影響」
得能 正裕（崇城大学薬学部）
G7.「磁性粒子内包血小板代替物 H12-(ADP/mp) リポソームの構築」
大澤 史佳（早稲田大学大学院先進理工学研究科）
G8.「アセトアミノフェン誘発肝障害に対するヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン/フラーレンナノ粒子の抑制効果」
梅崎 至高（崇城大学薬学部）
G9.「血中滞留型アルブミン融合 BMP7 の設計と持続的腎保護作用の評価」
戸田 翔太（熊本大学薬学部）
G10.「新規ナノ EPR 増強剤である一酸化窒素付加アルブミンダイマーを用いた高分子抗癌剤治療の効率化」
木下 遼（熊本大学薬学部）
G11.「炎症性腸疾患に対する一酸化炭素結合型ヘモグロビン小胞体の有用性評価」
永尾 紗理（熊本大学薬学部）
G12.「横紋筋融解症誘発腎障害モデルラットに対する一酸化炭素付加赤血球の有用性評価」
大柿 滋（熊本大学薬学部）
- 16:20~16:30 学生講演賞発表・閉会の辞

α_1 -酸性糖タンパク質の構造・機能特性を基盤とした創薬展開

丸山 徹^{1,2}

¹ 熊本大学・薬学部, ² 熊本大薬・育薬フロンティアセンター

α_1 -酸性糖タンパク質((AGP)別称: orosomucoid)は, 183 個のアミノ酸残基から成る β シート構造に富むペプチド鎖に対して, 5 本の糖鎖が N-グリコシド結合した糖タンパク質である。また, 枝分かれした糖鎖末端にシアル酸残基が局在するため, 血漿タンパク質の中で最も負に帯電している。ヒトの場合, AGP は F1*S 体及び A 体と称する 2 つの多型遺伝子によりコードされている。大部分の AGP は肝臓で生合成されるが, 最近では, 単球や脂肪細胞のように肝臓以外の細胞でも生合成されることが見出されている。通常, AGP は血漿中に 40-100(mg/dl)存在しているが, 急性相反応物質であるため, 炎症や感染といったストレス下において生合成が亢進し, 血漿中濃度が数倍程度増加する。そのため, 急性心筋梗塞をはじめとする各種炎症性疾患や癌疾患における病態判定のマーカーとしても活用されている。

現在までのところ, AGP の生理機能としては, 1) ナノキャリア(輸送担体), 2) 抗炎症作用, 3) 免疫調節能, 4) バリア機能, の 4 つが提示されている。例えば, AGP は疎水性低分子のキャリアであるリポカリンファミリーに属しており, 血漿中において, リゾリン脂質やステロイドホルモンをはじめとする内因性物質や薬物等の外因性物質と堅固に結合し, それらの組織移行性や生物活性を制御している。また, AGP は血管内皮及び糸球体表面に形成される負電荷バリアの構成因子の一つとして血管透過性や糸球体ろ過を制御していることが明らかにされている。さらに, 免疫調節能については, AGP と各種免疫担当細胞との関連性が指摘されている。

このように AGP は多様な生理活性を有しているものの, それらに関する作用機序については未だ不明な点が多く残されている。そのため, 作用機序を分子レベルで明らかにすることができれば, 病態発症メカニズムの解明, 医薬品開発やその適正使用への応用が大いに期待できる。本講演では, AGP の構造と機能特性ならびに創薬シーズとしての可能性について, 我々の研究成果を中心に紹介する。

【文献】

- 1) Structural insights into differences in drug-binding selectivity between two forms of human α_1 -acid glycoprotein genetic variants, the A and F1*S forms, *J Biol Chem*, 286, 14427-34 (2011).
- 2) α_1 -Acid glycoprotein up-regulates CD163 via TLR4/CD14 protein pathway: possible protection against hemolysis-induced oxidative stress, *J Biol Chem*, 287, 30688-700 (2012).
- 3) S-nitrosated α_1 -acid glycoprotein kills drug-resistant bacteria and aids survival in sepsis, *FASEB J*, 27, 391-8 (2013).

CKD とメタボリックシンドローム ～心腎代謝連関とバイオマーカーの意義～

向山政志

熊本大学大学院生命科学研究部腎臓内科学

慢性腎臓病(chronic kidney disease: CKD)の概念が提唱されてから早くも 10 年以上が過ぎ、今や CKD はわが国および欧米、アジア諸国で「国民病」としての地位を確立した。とくに、CKD が独立した重要な心血管病のリスクであることが認識されるに至り(心腎連関)、それへの啓蒙活動と対策が方々でなされている。にもかかわらず、CKD 患者数は一向に減少に転ずる気配がない。CKD 発症・進展の基盤にメタボリックシンドローム(metabolic syndrome: MetS)の病態が深く関与していることが、その抑制を困難にしている理由のひとつと考えられる。

心腎連関(心腎症候群とも呼ばれる)には種々の要因が関与するが、とくに腎臓・心臓局所でのレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAA 系)活性化の意義が指摘され、RAA 系(アルドステロンを含まない場合は RA 系と称する)阻害の理論的根拠とされてきた。さらに、心腎症候群では糖・脂質を代表とする代謝異常が高頻度に合併し、「心腎代謝連関」ともいうべき円環の存在が想定される。日本高血圧学会から発刊された「高血圧治療ガイドライン 2014」では、MetS 合併高血圧治療において、インスリン抵抗性改善に有利な RA 系阻害薬を第一選択に勧めている。

我々はこれまで、内分泌代謝的な立場から腎疾患の病態をとらえ、そのひとつの例として、内因性の RAA 系阻害薬としての Na 利尿ペプチドの役割を明らかにするため、臨床・基礎両面からアプローチしてきた。さらに、バイオマーカーとしての BNP の役割、急性腎障害における好中球ゲラチナーゼ関連リポカリン(Ngal)の意義、脂肪組織の病態への関与や脂質異常の臓器連関における意義についても検討してきた。最近、RAA 系および Na 利尿ペプチド系とエネルギー代謝との関連や、cardiorenal-anemia 症候群と Ngal の関連、さらに糖脂質代謝異常における組織慢性炎症(自然炎症)の意義が注目され、それら病態の分子基盤が明らかにされつつある。

今後の腎疾患診療においては、エビデンスに基づいた適切な治療を行うとともに、個々の病態に応じて心腎代謝連関を意識した治療介入とフォローアップ、およびバイオマーカーを含めた新たな治療戦略の開発がより重要となると考えられる。

特別講演 2

乳癌に対するホルモン療法 ―温故知新―

岩瀬弘敬

熊本大学大学院生命科学研究部 乳腺・内分泌外科

乳癌は女性の罹患する悪性腫瘍の中で最も頻度の高い疾患であるが、約 80% の乳癌は組織内にエストロゲン受容体(ER)を発現しており、これらはエストロゲン依存性に増殖するとされている。したがって、ホルモン療法は、乳癌組織内のエストロゲンを枯渇させること、もしくはERの機能を阻害することにある。かつては、経験的に卵巣や副腎を摘出するような外科的療法や大量エストロゲン療法が行われたが、1970年代に選択的ER機能修飾薬であるタモキシフェンが登場して以来、エストロゲンの供給を断つLH-RHアゴニストやアロマターゼ阻害薬、選択的ER機能抑制薬などによる薬物的ホルモン療法が主流となった。ホルモン療法は化学療法に比べ、副作用が少なく、奏効期間も長いが、ほとんどの症例では一旦奏効が得られたとしても、一定の期間後には耐性を来すためこの耐性化克服が課題である。

一方、最近の分子生物学の発展により、ERはリガンド刺激だけでなく、HER familyやIGFRなどの膜型増殖因子のリン酸化刺激を受けることが判明しており、ホルモン療法耐性機構の一つとされている。したがって、mTOR阻害薬、PI3K阻害薬、CDK4/6阻害薬などの細胞内シグナル伝達阻害薬とホルモン療法との併用が臨床応用されている。さらには、長期間のエストロゲン枯渇療法に耐性となった閉経後再発乳癌においては、逆説的ながらエストロゲン付加療法にも奏効が認められることが解っており、古典的な治療にも再び焦点が当てられている。

本講演では、ホルモン療法についての歴史的概説と、教室で行っているホルモン療法に関わる最新の研究成果について述べる。

人工赤血球から脳梗塞治療薬開発へ

奥 直人

静岡県立大学薬学部

我々の研究はリポソーム DDS からスタートした。創薬におけるマイクロドーズ試験の潮流を受け、リポソームや脂質ナノ粒子のマイクロドーズ試験を可能とするために、2007 年に簡便にナノ粒子をポジトロン放出核種で標識できる方法論を開発した。この方法論を用いる機会を与えてくださったのは東海大学の川口章先生であった。先生は Liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) が脳梗塞ペナンプラ領域(脳梗塞の周囲の領域)の治療に有効であることを示されていた。そこで LEH をポジトロン放出核種で標識し脳梗塞モデルラットに投与したところ、ペナンプラ領域に LEH が集積することを見出した。LEH の作用機構には 2 つの可能性が考えられた。1 つは血栓を超えて低分子の LEH が脳血管を流れること、もう 1 つは LEH が脳内に浸潤できることである。そこで栓子法による一過性中大脳動脈閉塞(t-MCAO)モデルラットを用い、まず虚血再灌流後に蛍光標識リポソームを静脈内投与したところ、脳細胞死や脳浮腫が明らかとなる以前にリポソームが脳梗塞部位に集積することを見出した。

脳血管障害は我が国の要介護 1 位の疾患であり、その 6 割が脳梗塞である。標準治療として組織プラスミノゲン活性化因子(t-PA)による血栓溶解療法が行われるが、投与可能時間の制限などから適応患者は数%に過ぎない。また再灌流を可能としても、二次的な障害として活性酸素や炎症性サイトカインなどの有害物質による脳細胞の損傷が起こる。まず虚血再灌流障害治療を念頭に、脳保護効果を有するアシアロエリスロポエチン(AEPO)修飾リポソームを虚血再灌流モデルに投与したところ、虚血再灌流障害の抑制、運動機能低下の改善が観察された。同様にリポソーム化 FK506(FK-Lip)を用いた場合にも虚血再灌流障害の抑制が観察された。さらに臨床応用を考え、リモートローディングが可能な塩酸ファスジルリポソームについても検討を行い、虚血再灌流障害に対する有効性を見出している。塩酸ファスジルは、くも膜下出血術後の脳血管攣縮を抑制する薬剤であり、脳虚血に伴う症状を改善することも知られているため、適用範囲は広いと考えている。

次に血栓溶解後の虚血再灌流傷害に加え、虚血状態でも DDS 製剤が有効に働く可能性についても検討を行った。虚血時にリポソームを投与し、脳内挙動を観察したところ、虚血時にも虚血部位にリポソームが集積すること、さらに FK-Lip 投与により、リポソームの集積に応じた脳細胞傷害抑制効果が観察された。また t-PA により血栓溶解が可能で、実際の病態に近い(Photochemically-induced thrombosis model)を用いて、t-PA の治療可能時間の延長が行えるかどうかについても検討を進めている。将来的には LEH との併用療法なども考えられ、本研究成果が心疾患を含む虚血性疾患全般へ貢献することを期待している。

特別講演 4

プロスタグランジンの炎症作用～生理と病態を繋ぐもの

杉本幸彦

熊本大学大学院生命科学研究部（薬学系）薬学生化学分野

プロスタグランジン(PG)は、細胞膜リン脂質から切り出されたアラキドン酸を基質として、シクロオキシゲナーゼ(COX)とPG合成酵素によって産生される生理活性脂質であり、 PGE_2 、 PGD_2 、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 、 PGI_2 の4種類が存在し、広義においてはトロンボキサン(TXA_2)も含まれる(図1)。産生されたPGは速やかに細胞外に放出され、産生細胞の周囲に存在する細胞のみに作用して多彩な生理作用を発揮する。アスピリンをはじめとする非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)は、COXに作用してPG合成を阻害することで解熱鎮痛抗炎症作用を発揮する。PG類は、似通った構造をもつにも関わらず、各PGには特異的な受容体(GPCR)が存在し、その作用を介達している。とくに、 PGE_2 には四種類の異なる受容体サブタイプ($\text{EP1} \sim \text{EP4}$)が存在し、これらは互いに異なる細胞内シグナル伝達に共役している。

炎症は、本来生体の防御反応であり、病原体などの刺激によって惹起され、局所における血管・細胞反応の結果、当初の炎症刺激が排除され終息して生理条件を保っている。急性炎症の症状には、発赤、熱感、浮腫、疼痛、さらには中枢を介した発熱や視床下部-下垂体前葉-副腎皮質系応答なども含まれる。NSAIDsは、これらの炎症症状を鎮めることから、各症状はそれぞれPGの作用によって説明できると考えられてきた。実際、PG受容体欠損マウスや受容体選択的薬物を用いた解析によって、各症状に関わるPGやその受容体、作用機序が明らかとなった。その結果、急性炎症の各症状を発現する末梢や中枢の部位において、PGは共通の作用様式ではなく、部位毎に異なる受容体・作用機序を介して、さまざまな作用を発揮していることがわかってきた。本講演では、急性炎症の各症状に関わるPG受容体とその分子機構について概説し、NSAIDs作用との相関について考察する。

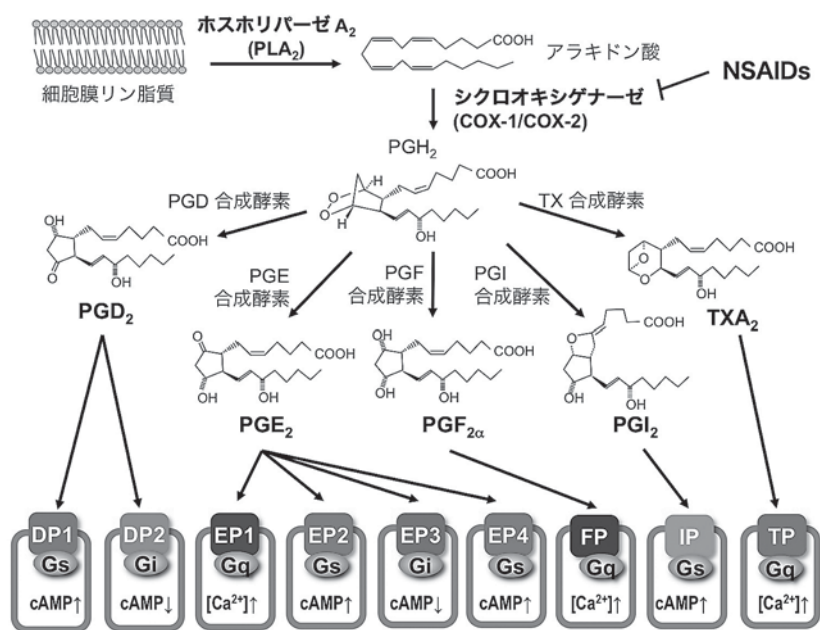


図1. プロスタグランジンの産生経路と受容体

A Hemoglobin And Superoxide Taming Drug That Makes Crystalloid An Alternative to Blood Transfusion

Carleton J. C. Hsia, NanoBlood LLC, Sioux Falls, SD 57107 www.nanorbc.com

Vascular cell free hemoglobin (CFH) and superoxide over-production complicates a vast number of hypovolemic and isovolumic medical conditions and diseases. We present the results of preclinical studies that indicate nano Red Blood Cell (nanoRBC, aka PolyNitroxylated Pegylated Hemoglobin (PNPH)) has the potential to substitute for blood transfusion in the treatment of hypovolemia, and also treats general un-medical needs hindered by toxicities resulting from superoxide, CFH and inadequate blood flow. nanoRBC's mechanism of action is related to its ability to dismutate vascular superoxide, thereby increasing the oxygen delivery capacity of blood through preservation and restoration of vascular nitric oxide. nanoRBC allows the reserve oxygen delivery capacity of blood to be utilized with or without conjunctive volume replacement crystalloid.

Preclinical efficacy studies carried out independently in three leading laboratories in the U.S. on 4 different conditions are presented: (1) hemolytic Sickle Cell Disease (SCD), a chronic condition with manifestation of vascular pathophysiologies (CFH and inadequate blood flow), best illustrates the therapeutic mechanism of nanoRBC. Here, a single administration of nanoRBC corrects hemolysis-induced anemia as manifested in aortic stiffness and pulmonary hypertension in transgenic SCD mice. (2) In a mouse model of hemorrhagic CFH toxicity induced by controlled cortical impact, nanoRBC completely prevents cortical neuronal death. The results of (1) and (2) support the hypothesis that nanoRBC has protective neurovascular activities, and through this mechanism would be effective in treating not only hemorrhagic stroke, ischemic stroke and traumatic brain injuries but also chronic conditions, such as in SCD, that suffer from severe vaso-occlusive crisis and stroke. Further studies show the following: (3) In a transient middle cerebral occlusion rat model of ischemic stroke, during a 2 hour ischemic phase, a continuous infusion of nanoRBC completely prevents the spread of the vaso-constrictive ischemia beyond the initial ischemic core to the penumbra. Thus, nanoRBC extends the therapeutic window for thrombolytic intervention and control CSF toxicity from hemorrhagic transformation. (4) In a mouse model of traumatic brain injury complicated with hemorrhagic shock, nanoRBC restores mean arterial pressure from 25 mm Hg to 80 mm Hg over a 50 fold dose range (2 ml/kg - 100 ml/kg) and maintains cerebral blood flow and reduces the increase in intra-cerebral pressure due to edema.

These results provide preclinical safety and efficacy data to support the clinical use of nanoRBC as a drug to make crystalloid an alternative to blood transfusion.

備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤の実用化を目指す研究

○酒井宏水¹, 小田切優樹², 東 寛³, 木下 学⁴, 高瀬凡平⁴, 河野光智⁵, 岩本美智子⁶, 堀之内宏久⁷, 高折益彦⁸, 小林紘一⁹

¹ 奈良県立医科大学, ² 崇城大学薬学部, ³ 旭川医科大学, ⁴ 防衛医科大学校, ⁵ 東海大学医学部, ⁶ 三愛病院, ⁷ さいたま市立病院,
⁸ 川崎医科大学, ⁹ 慶應義塾大学

日本の献血-輸血システムの安全性は世界最高水準である。そして輸血は医療に不可欠の、有効な治療行為として国民の医療と健康福祉に多大の貢献をしている。しかし、危機的出血にある傷病者に対し輸血が出来ない状況がある。先ず、離島・へき地医療、夜間救急、緊急手術の現場では、輸血用血液を確保できない場合がある。プレホスピタルの現場では、救急救命士が重度傷病者に対して輸血することはできない。大規模自然災害(東南海トラフ、首都直下型地震)、テロ、有事の際、輸血用血液の大量需要と迅速な供給の必要性にどう備えるか、国家的な危機管理対応策が必要とされている。他方、少子高齢化のため今後、血液が慢性的に不足するとの試算が公表され、不安を残している。

この課題を解決するため、輸血治療を「補完」する人工赤血球(ヘモグロビン ベシクル, Hb-V)を開発し、その有効性と安全性を多角的に研究してきた。医療機関で発生する期限切れ赤血球(廃棄血)は、諸工程を経て、感染源を含まず、血液型がなく、長期保存に耐え、緊急時にいつでも投与できる人工赤血球製剤に「再生」される。これまで厚生労働科学研究(創薬基盤推進研究事業)として推進され、動物投与試験により安全性と有効性に関する膨大な知見を得てきた。国際的にみても、生体適合性、酸素輸送効果、保存安定性などの特性は、他者の追随を許していない。しかし、特定生物製剤として開発のハードルが高いこと、医療機関で発生する期限切れ赤血球を集めるシステムが無いこと、また上述の輸血の課題と本製剤の必要性が平和な日本では十分に認識されないことが、国内製薬企業の開発意欲を削ぐ要因となっている。

2015年4月1日より、国の新たな機関として国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)が発足した。米国NIHのようにAMEDは日本の医療研究の司令塔を担い、実用化までの一貫した強力な支援を提供するものと期待されている。本研究に関する上述の背景と課題を明示し、そして本製剤の有用性を主張し、幸いにも2015年度、本研究課題がAMED臨床研究・治験推進研究事業に採択された。アカデミアのコンソーシアムを構成し、AMED支援を最大限活用して開発を進め、治験に橋渡しすることを目指している。

人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)を構成する脂質2重膜の薬理作用について

○東 寛¹, 吉田陽一郎¹, 高橋弘典¹, 高橋大輔², 藤原満博², 酒井宏水³¹ 旭川医科大学, ² 日本赤十字社北海道ブロック血液センター, ³ 奈良県立医科大学

人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)は、脂質2重膜(リポソーム)にヒトヘモグロビンを内包した構造を持っていて、様々な動物実験結果から、優れた生体適合性を有している事が示されている。血流中を循環したあと、HbVは投与後に細網内皮系の細胞に捕捉され、支障なく分解、排泄される。HbVの投与を受けたラットの脾臓を用いたex vivoの実験系において、Concanavalin A(Con A)刺激による脾T細胞の増殖が一過性に抑制される事が明らかにされている。Hb分子を内包しない空のリポソームの場合でも同じ結果が観察される事から、この現象には、HbVを構成している脂質2重膜(リポソーム)を脾マクロファージが捕捉することが関与していると考えられる。HbVの臨床応用に当たっては、例え一過性であるにしろ、リポソームがそれを捕捉したマクロファージにどのような影響を与えるのかを詳細に検討し、その知見を集積しておくことが重要である。

現在までに、1)空リポソームを投与後の脾細胞はCon A刺激に対する増殖が一過性に抑制されている。2)リポソームを貪食した脾マクロファージがT細胞の増殖を抑制する機能を一過性に獲得する。3)T細胞の増殖抑制にはマクロファージと脾T細胞との接触が必要である。4)増殖抑制にはマクロファージの産生するNOが関与している。5)HbVの投与はin vivoに於ける抗体産生反応を抑制しない。6)Con A刺激下で、空リポソームを投与した脾臓細胞からのTNF- α 、IFN- γ 、RANTES等のサイトカイン/ケモカインの産生は増強するが、LPS刺激に対する応答性は変化しない。7)僅か循環血液量の2%(v/v)の投与(あるいは1%(v/v)x2)でも1)の現象が再現性も持って観察される、等の知見を得ている。一連の実験結果は、HbVの血液代替物としての使用を想定して、HbV(あるいは空リポソーム)の投与量を循環血液量の20%(v/v)と大量に設定して投与したものである。7)の結果から、これらの反応はリポソームの薬理作用を受けた可逆的な生体反応(マクロファージの活性化)の結果であると解釈できる。これらを総合すると、ex vivoで観察される一過性の免疫抑制は、生体の免疫応答そのものには重大な影響を与えないと考えられる。

今後は、リポソームを捕捉したマクロファージの細胞内の変化に関する知見を集積する事が必要であると考ええる。実験で使用しているリポソームのサイズは直径250nmである。近年、類似のサイズの脂質2重膜が生体の細胞からmicrovesicleとして分泌され、種々の生理的現象に関わっている事がわかってきている。従って、脂質2重膜であるリポソームを捕捉したマクロファージが、どのような特徴を獲得するのか、いかなる経路で活性化シグナルが伝達されて行くのかを検討する事は、microvesicleの生理作用の解明にも繋がる可能性がある。

細胞型人工酸素運搬体 ヘモグロビン小胞体の体内挙動と安全性評価 ～正常から病態へ～

○小田切優樹¹，田口和明¹，丸山 徹²，酒井宏水³

¹ 崇城大学薬学部，² 熊本大学薬学部，³ 奈良県立医科大学

【緒言】 細胞型人工酸素運搬体であるヘモグロビン小胞体(HbV)は怪我や事故による大量出血時の他，外科的手術中の血液補充としての利用が期待されている．そのため，HbV は万人へ安全かつ有効に使用することが必要不可欠であると考えられる．これまでに我々は，健常動物(マウス・ラット・サル)及び病態動物(出血性ショック・肝硬変・高脂血症)におけるHbVの体内動態及び安全性を評価してきた．本講演では，これまで得られてきた健常動物及び病態モデル動物を用いたHbVの体内動態特性と安全性について紹介する．

【実験】 体内動態の検討は，HbVの内部ヘモグロビンを標識した¹²⁵I-HbVまたは脂質膜(コレステロール)を標識した³H-HbVを用い評価した．出血性ショックモデルラットは全血液量の40%を脱血することで作製した．慢性肝障害モデルラットは，ミネラルオイルに溶解した四塩化炭素(CCl₄：mineral oil = 1：4)を週3回，8週間腹腔内投与し作製した．高脂血症モデルマウス(ApoE欠損マウス)は日本SLCより購入し，実験に用いた．

【結果と考察】 HbV及びその構成成分の体内動態実験(健常マウス及びラット)の結果より，HbVは小胞体構造を保持した状態で血中を循環後，主に肝臓・脾臓に分布することが確認された．その後，内部Hbは速やかに臓器より消失し尿中に排泄されるのに対して，HbV脂質成分は，糞中に排泄されることが確認され，内部Hbと脂質膜はHbVの分解後で異なる挙動を示した．さらに，HbVを霊長類であるに投与しカンクイザル生体反応性を評価したところ，HbVにおける悪影響は確認されなかった．

次に，出血性ショックモデルラットにおけるHbVの体内動態を評価したところ，主要分布臓器や排泄経路は健常時と同様のプロファイルを示し，生体蓄積性も確認されなかった．また，慢性肝障害モデルラットにおける安全性評価を行ったところ，HbV投与により一時的な血漿パラメータの変動や臓器へのヘモジデリンの沈着はあるものの，著しい悪影響はなく，生体蓄積性もなかった．さらに，高脂血症モデルマウス(ApoE欠損マウス)を用いHbVの体内動態，生化学的及び病理組織学的検討を行った結果，HbV投与により一時的な脂質関連の血漿パラメータの変動が起こるものの，HbVは十分な代謝排泄性を有していることが確認された．

【結論】 以上，HbVは健常時のみならず，病態時においても，十分な代謝・排泄性，さらには安全性を有していると考えられる．

【文献】

- 1) Taguchi K et al. *J Control Release*. **2009**, 136: 232-9.
- 2) Taguchi K et al. *Drug Metab Dispos*. **2009**, 37: 1456-63.
- 3) Taguchi K et al. *Toxicol Appl Pharmacol*. **2010**, 248: 234-41.
- 4) Taguchi K et al. *J Pharm Sci*. **2011**, 100: 775-83.
- 5) Taguchi K et al. *J Drug Metab Toxicol*. **2012**, 3: 128-34

出血性ショック心臓の催不整脈性に対する人工酸素運搬体の効果

○高瀬凡平¹, 田中良弘², 橋本賢一¹, 東村悠子¹¹ 防衛医科大学校病院, 集中治療部, ² 救急部

出血性ショック心臓(HS)においては低心機能・致死性不整脈により予後不良となる。これまで、リポソーム封入ヘモグロビン(A-Oxg)の有効性を報告してきた。LHb(Hgb=6g)またはHbV(Hgb=10g)の異なったHgb濃度のA-OxgのHSにおける効果を実験的に検討した。方法: SD rat(n=30)に30%出血性ショック状態を作成し、非蘇生群、洗浄赤血球(RBC)蘇生群、生理食塩水蘇生群、5%アルブミン蘇生群、A-Oxg-LHb蘇生群及びA-Oxg-HbV蘇生群の6群間で心筋を摘出Tyrode液で灌流後Na channel感受性色素を用いたOptical mapping system(OMP)で興奮伝播・活動電位持続時間不均一性(Action potential duration dispersion: APDd)、致死性催不整脈性を検討した。結果: 蘇生群では、5群とも全例蘇生に成功した。しかし、生理食塩水、5%アルブミン群ではOMPで著明な左心室伝導遅延とburst pacingによる心室細動が全例で誘発されたのに対し、RBC蘇生群・A-Oxg-LHb蘇生群・A-Oxg-HbV蘇生群では、伝導遅延・心室細動誘発ともに認められなかった。生理食塩水、5%アルブミン群では著明にAPDd値が増大したが、RBC蘇生群・A-Oxg-LHb蘇生群・A-Oxg-HbV蘇生群では正常に保たれていた。結語: HSでは、左心室伝導遅延とAPDd増大を惹起し、電気的不安定性から致死性不整脈が誘発されると示唆された。A-Oxg治療はHgb濃度が異なってもRBC治療と同等に、これら指標の保持と予防効果を有すると示唆された。

凝固障害を伴う出血性ショックに対して人工赤血球による蘇生の試み

○朝比奈はるか¹, 萩沢康介², 木下 学³, 酒井宏水⁴, 斎藤大蔵⁵

¹ 防衛医科大学校救急部, ² 同生理学講座, ³ 同免疫微生物学講座, ⁴ 奈良県立医科大学化学教室,

⁵ 防衛医科大学校・防衛医学研究センター外傷研究部門

【緒言】 大量出血による凝固障害をともなう病態において, 人工赤血球(HbV)の有用性について検証するための動物モデルを作成する.

【実験】 2.5kgの雄性ウサギの大腿動静脈にカニューレーションし, 400mlの脱血返血で血小板を分離し低血小板状態にする. 開腹し, 肝臓にデルマパンチを使用して穿孔性 injury を作成. Injury から自由に出血させながら赤血球または HbV を同量投与する. 30 分後に血小板 (PRP) を投与して止血を図る. 30 分後から止血までに出血した分を赤血球または HbV で補充し, 急性期の予後を検討した.

【結果と考察】 脱血後に血小板数は平均 4 万程度になった. Injury からの自由出血で Hb 値は 6 g/dl を割り込んだ. 止血には PRP 投与から 1 時間ほど要し, この間に Hb 値は 5 g/dl 程となり血小板数は平均 8 万程度になった. 止血後の輸血により Hb 値は 10 g/dl 程となり, 蘇生に成功した.

【結論】 急性易出血性病態における臓器出血では, 酸素運搬体である赤血球と, 止血凝固能を有する血小板成分の投与が重要であったが, 人工酸素運搬体である HbV の投与は赤血球輸血に代替出来る可能性が推測された.

ラット肺切除周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与の循環動態と血液酸素化に及ぼす影響

○河野光智¹, 松田信作², 神山育男², 堀之内宏久³, 渡辺真純², 酒井宏水⁴, 小林紘一², 岩崎正之¹

¹ 東海大学医学部外科学系呼吸器外科学, ² 慶應義塾大学医学部呼吸器外科, ³ さいたま市立病院呼吸器外科,

⁴ 奈良県立医科大学医学部化学教室

【背景】 人工酸素運搬体として開発されたヘモグロビン小胞体(HbV)はヘモグロビンを内包させたリポソームで, 期限切れ輸血用ヒト赤血球よりヘモグロビンを抽出精製し, リポソームに内包, 膜表面を PEG 修飾して粒径を 250nm, P50 は 32Torr に調製した粒子である。血液型がなく, ウィルスなどの感染源を排除され, 室温で2年以上の備蓄が可能など, 優れた性質を有する。血液中で酸素運搬体として機能することは様々な動物モデルで確認され, 出血性ショックの蘇生に用いた場合も良好な成績が得られた。輸血の頻度が高い周術期の大量出血に対しても, 赤血球輸血の代替となると期待される。これまでに我々は肺切除術中に大量出血する動物モデルとしてマウスを用い, HbV の有効性と安全性を検討しているが, マウスでは循環動態と血液酸素化の評価が出来なかった。

【目的】 ラットにおいて肺切除術を行い, 同時に脱血する周術期出血モデルを作成する。HbV を投与し, 循環動態と血液の酸素化に及ぼす影響を評価し, 有効性を検討する。

【方法】 ラットに麻酔をかけ, 総頸動脈及び内頸静脈からポリエチレンチューブを挿入し, 動脈血圧連続測定を開始する。経口挿管し人工呼吸器管理下に開胸し, 左肺全摘除する。動脈カニューレより, 全循環血液量の30%を脱血した後, 脱血量と等量のHbV液を輸液する。閉胸後, 人工呼吸器を止め, 自発呼吸を確認後, 抜管する。人工呼吸器離脱後1時間まで血圧のモニタリングと動脈血液ガス分析, 血中乳酸値の測定を行う。輸液を変え以下の動物群を作成する。①生理食塩水群, ②5%アルブミン群, ③ヘモグロビン小胞体群: HbVを5%アルブミン液に分散した液体。Hb濃度は8.6g/dlに調整する。④ラット保存血液群: ラット赤血球を生理食塩水で洗浄後, 5%アルブミン液に分散させた液体。Hb濃度は8.6g/dlに調整する。

【結果】 肺切除術後, 脱血により血圧は30mmHgまでに低下するが, 各輸液により上昇する。人工呼吸器を停止すると, 生理食塩水群では血圧が急速に低下し, 全例が死亡した。アルブミン群では60%の生存率であった。HbV群とラット赤血球輸血群は循環動態が安定し維持され, 全例が生存した。動脈血酸素分圧はヘモグロビン小胞体群では人工呼吸器離脱後もラット保存赤血球輸血群と同等で, 血中乳酸値も低値が維持された。

【結論】 呼吸機能が低下する左肺全摘術中の大量出血でショック状態に陥ったラットにおいて, HbVの投与は循環動態を安定させ, 動脈血酸素分圧も維持して保存血液投与と同等の効果を示した。周術期の大量出血に対しても, HbV投与が有効である可能性が示唆された。

ヘモグロビン小胞体の換気不全時の有用性に関する検討

○内藤祐介¹, 井上聡己¹, 酒井宏水², 川口昌彦¹

¹ 奈良県立医科大学麻酔科, ² 奈良県立医科大学化学教室

【緒言】 気管異物や急性喉頭蓋炎などによる急性の換気停止は、脳障害や心停止を回避するために速やかな換気再開と酸素化の維持が重要である。そのため気管挿管が必要となるが上記病態ではしばしば挿管困難が認められ臨床的に問題となる。ヘモグロビン小胞体(HbV)はヘモグロビンを酸素化した状態で投与可能であるため、HbVを経静脈的投与することによりに酸素を供給でき、換気停止時に心停止までの時間が延長する可能性がある。

【実験】 対象はSDラットオス 290-300g。イソフルランにより麻酔導入後、14G 静脈留置カテーテルを用い挿管し人工呼吸を開始した。その後、右外頸静脈と尾動脈よりカテーテルを挿入した。尾動脈のカテーテルより動脈圧を連続的に監視した。ロクロニウム 1.0mg を静脈内投与した後、人工呼吸を停止し予め割り付けられた4群に従い薬剤を投与し、循環虚脱までの時間を計測した(A群：空気で機械換気+薬剤投与なし, B群：純酸素で換気+薬剤投与なし, C群：純酸素で換気+生理食塩水 6mL 投与, D群：純酸素で換気+HbV を 6mL 投与)。

【結果と考察】 脈圧(収縮期血圧-拡張期血圧)が 20mmHg 未満となる点を循環虚脱と定義した。各群における循環虚脱までの平均時間は A 群 30.7 秒(4.7), B 群 59.6 秒(2.6), C 群 95 秒(17.2), D 群 135 秒(14.2)であった。()内の数値は標準偏差。一元配置分散分析の結果、HbV を投与した D 群は他群に比較して循環虚脱までの時間が延長した($P<0.001$)。本研究は HbV の換気不全時の有用性を検討した初の研究である。HbV 群は非薬剤投与群である B 群に比べて循環虚脱までの時間を約 75 秒延長した。ラットの 1 分あたりの酸素消費量はヒトの 7 倍であるため理論上、ヒトでは 5 分の延長が見込める。そのため換気停止時に次の処置までの橋渡しとなる可能性がある。

【結論】 本実験では酸素化された HbV を投与することにより循環虚脱までの時間が延長した。簡易的に酸素化を維持する方法として換気不全時に応用が期待される。

人工酸素運搬体 “HemoAct™” の実用化に向けた研究展開

小松晃之

中央大学理工学部

少子高齢化により献血者層(若年層)人口が減少すると、安定した輸血液の備蓄が難しくなる。日本赤十字社の推計によれば、平成 39 年(12 年後)には年間 89 万人分の血液が不足すると予測されている¹⁾。血液型に関係なくいつでも誰にでも使用できる人工酸素運搬体の実現が、輸血治療を補完するための医療対策の一環として、また危機管理の主要施策として強く望まれる状況になっている。

ごく最近、我々はヘモグロビン(Hb)の分子表面にヒト血清アルブミン(HSA)を共有結合した構造の人工酸素運搬体(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター[Hb-HSA₃、製剤名“HemoAct™”]を開発し、その構造と酸素結合能を明らかにした²⁻⁶⁾。原料は、Hb(ヒト、ウシ、ブタ由来)／HSA(血清由来、遺伝子組換え体)／市販の架橋剤のみで、コストの高い試薬は一切不要。製造工程は 2 ステップと少なく、特殊な装置も必要ない。イオン交換カラムを用いることで簡単に精製できる。HemoAct™溶液の粘度は 2.8 cP(全血液は 4.0 cP)で血液適合性も良い。酸素親和性は赤血球に比べ高いが($P_{50}=9$ Torr)、窒素雰囲気で調製すると低酸素親和性の製剤($P_{50}=27$ Torr)も得られる⁵⁾。特筆すべきは、等電点(pI=5.1)が HSA と等しいので、血中滞留性に優れ、投与後の急激な血圧上昇を惹起しない点である⁶⁾。また、粒径(約 10 nm)が小さいため、梗塞部位へ酸素を運ぶ酸素治療薬としても有用と考えられる。

さらにこれらの知見を応用し、動物用人工血液の開発にも着手している。メタノール資化性 *Pichia* 酵母を用いて遺伝子組換えイヌ血清アルブミン(rCSA)を産生、イヌ用 HemoAct™(Hb-HSA₃)を合成した。獣医療に大きな貢献をもたらすものと期待している。

赤血球代替物の実現が、せまりくる深刻な血液不足の危機を乗り越えるための切り札になることを願い、現在 HemoAct™の実用化に向けた研究展開を急ピッチで進めている。

【文献】

- 1) 平成 26 年度第 2 回血液事業部会献血推進調査会(<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000067171.html>)資料 2-1
- 2) D. Tomita, T. Kimura, H. Hosaka, Y. Daijima, R. Haruki, K. Ludwig, C. Böttcher, T. Komatsu, *Biomacromolecules* **2013**, 14, 1816.
- 3) H. Hosaka, R. Haruki, K. Yamada, C. Böttcher, T. Komatsu, *PLoS One* 2014, 9, e110541
- 4) 小松晃之, 化学と工業, **2014**, 67, 677.
- 5) T. Kimura, R. Shinohara, C. Böttcher, T. Komatsu, *J. Mater. Chem. B* **2015**, 3, 6157.
- 6) R. Haruki, T. Kimura, H. Iwasaki, K. Yamada, I. Kamiyama, M. Kohno, K. Taguchi, S. Nagao, T. Maruyama, M. Otagiri, T. Komatsu, *Sci. Rep.* **2015**, 5, 12778.

アルブミン／ブタ由来ヘモグロビン人工赤血球の開発と酸素親和性の制御

○伊藤大知^{1,2}, 松浦麻衣¹, Yao-Tong Lai¹, 太田誠一², 赤松憲樹³, 中尾真一³, 酒井康行⁴¹ 東京大学大学院工学系研究科, ² 東京大学大学院医学系研究科, ³ 工学院大学環境エネルギー化学科, ⁴ 東京大学生産技術研究所

【緒言】 再生医療における細胞の三次元培養では、酸素供給が課題である¹。我々は、シラス多孔質ガラス (SPG) 膜乳化法を用いて、ヘモグロビン (Hb) とアルブミンからなる新規酸素運搬体を開発した²。これは細胞に対し取り込まれにくいサイズである一方、Hb 単体や赤血球に比べて、酸素親和性の制御が十分でなく、p50 値が低下する。そこで本研究では、架橋や酸化抑制物質の封入により、Hb 人工赤血球の酸素解離能を制御するとともに、Met 化も抑制し、再生組織の培養環境に応じて適切に酸素運搬が可能な、酸素運搬能の実現を目指した。

【実験】 ブタ血液から新鮮 pHb を抽出し、ウシ血清アルブミンを混合して分散相とした。SPG 膜で膜乳化を行い、エマルションをグルタルアルデヒド (GA) により架橋し、一段階架橋マイクロスフィア (MS) を作製した。さらに、乳化の前段階で架橋剤 Bis (3, 5-dibromosalicyl) Fumarate により酸素親和性を低下させた架橋 Hb を材料に用いた二段階架橋 MS や、抗酸化酵素を封入した抗酸化酵素 SOD/CAT 封入 MS を作製した。これらの MS の酸素解離曲線測定、光学顕微鏡像・SEM 像、シアンヘモグロビンアッセイによる酸化 Hb の定量、MTT アッセイによる細胞毒性の評価を行った。

【結果と考察】 pHb では bHb に比べ、BSA 量を増加しなければ、エマルションが安定化しなかったが、BSA 量を最適化することにより、均一な粒子サイズの pHb/BSA 粒子の作製に成功した。抗酸化酵素を封入・材料に架橋 Hb を用いた場合も、MS 表面や粒度分布に変化は見られなかった。DBBF により二段階に架橋することで、既存の MS より酸素親和性の低い MS 作製に成功した。さらに、SOD/CAT 封入により Hb 酸化速度の遅延が確認され、人工赤血球の活性維持が示唆された。

MTT assay では、SOD/CAT を含まない MS は毒性が低く細胞数が増加していたが、SOD/CAT 封入 MS では Hb 活性が保持され、産生される活性酸素種 (ROS) により逆に毒性が高まることが示唆された。トランスウェルにより細胞と非接触な条件で SOD/CAT 封入 MS を播種した場合には毒性が低下しており、ROS が細胞に到達する前に失活したためと考察している。MS 表面にはアルブミンが選択的に被覆しており、生体適合性は高いと考えていたが、更なる粒子表面構造の検討や ROS が細胞にどのように影響を与えるかを検討する必要があると考えている。

【結論】 均一な粒子サイズの pHb/BSA 粒子の作製に成功し、二段階架橋により酸素解離曲線を制御することに成功した。

【文献】

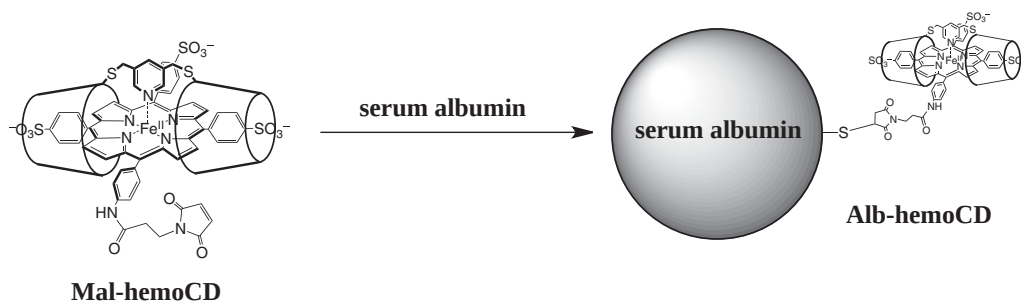
- 1) Volkmer E, Drosse I, Otto S et al. : TISSUE ENGINEERING, 2008 (14) 1331-40
- 2) Lai Y-T, Sakai Y, Ito T et al. : Colloids and Surfaces B, 2015 (127) 1-7

人工酸素運搬体 HemoCD の血清アルブミン表面への結合による血中滞留性の向上

北岸宏亮

同志社大学理工学部

【緒言】我々はこれまでに完全合成化合物による酸素結合錯体として、水溶性鉄(II)ポルフィリンとメチル化シクロデキストリン二量体から構築される超分子錯体 hemoCD を合成し、人工酸素運搬体としての機能評価を行ってきた¹⁾。その結果、hemoCD には生体毒性がなく、生理条件下においてヘモグロビンと同等の酸素吸脱着能を示すことが明らかになったが、一方で hemoCD は分子サイズが小さいために血中滞留性が低く、投与からわずか 30 分以内に 8 割以上の hemoCD が糸球体ろ過を受けて尿中に排泄されることが明らかとなった。そこで本研究では hemoCD の血中滞留性を簡便に向上させるための手段として、血清アルブミンに注目し、血清アルブミンの表面に存在するシステイン残基と in situ でコンジュゲートが可能な新規 hemoCD 誘導体(Mal-hemoCD, 下図)を合成、その酸素結合挙動および血中滞留性の評価を行った²⁾。



【結果と考察】Mal-hemoCD は水中で可逆的に酸素と結合した($P_{1/2}=9.0$ Torr, $t_{1/2}=23$ h at pH 7 and 25°C). Mal-hemoCD の水溶液を血清アルブミンと混合すると、アルブミン表面のシステイン残基(Cys34)との Michael 付加反応により縮合し、アルブミン修飾 hemoCD(Alb-hemoCD)が得られた。Alb-hemoCD の血中滞留性を調べるために、ラットを用いた薬物動態実験を実施したところ、未修飾の hemoCD は血中投与後 1 時間以内に血中から完全に消失するのに対し、Alb-hemoCD は投与 3 時間後においても投与量の 50% 以上が血中に滞在していた。さらに興味深いことに、アルブミンを修飾する前の Mal-hemoCD の水溶液をコントロール実験として静脈中に投与したところ、Mal-hemoCD も Alb-hemoCD ほどではないが良好な血中滞留性を示した。投与後の血中成分の分析を行った結果、投与された Mal-hemoCD は血中で血清アルブミンと Michael 付加反応を起こし(血中バイオコンジュゲーション)、血中で Alb-hemoCD となって循環することが明らかとなった。この結果は、Mal-hemoCD を血清と混合することによって高い血中滞留性を示す酸素輸液が得られることを示唆しており、比較的簡便な調製方法として今後の発展が期待できる。

【文献】

- 1) T. Ueda, H. Kitagishi, K. Kano, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4337–4347.
- 2) H. Kitagishi, H. Kawasaki, K. Kano, *Chem. Asian J.* **2015**, *10*, 1768–1775.

イヌ用人工血液の開発

○山田佳奈, 秋山元英, 小松晃之

中央大学理工学部

【緒言】 日本は犬猫飼育頭数 2031 万頭(2014 年)を超えるペット超大国である。動物医療の需要も年々高まり続けているが、“輸血”については未だ十分な体制が整っていない。そのため、ペット用人工血液の開発に大きな期待が寄せられている。本報では、まずイヌ用アルブミン製剤として、メタノール資化性 *Pichia* 酵母を用いた遺伝子組換えイヌ血清アルブミン(rCSA, Mw: 65,700)の産生法を確立し、その物性を明らかにしたので報告する。さらに、イヌ用人工酸素運搬体(赤血球代替物)として、ウシヘモグロビン(Hb, Mw: 64,500)の分子表面に rCSA を結合させたコア-シェル型の(ヘモグロビン-イヌ血清アルブミン)クラスター(Hb-rCSA₃, 製剤名“HemoAct™”)を合成し、その構造、物性、酸素結合能を明らかにしたので報告する。

【実験】 rCSA は当研究室で確立した *Pichia* 酵母(GS115)系を用いて産生し、アフィニティークロマトグラフィー/陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。得られた rCSA の物性をイヌ血漿由来の CSA と比較した。さらに、高純度ウシ Hb の PBS 溶液([Hb]=0.1mM)に架橋剤 Succinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate(SMCC)を加え、Hb の分子表面にマレイミド基を構築した後^{1,2)}、それを rCSA(1mM)と反応させることにより Hb-rCSA₃ を合成した。余剰の rCSA は陰イオン交換クロマトグラフィーにより除去した。Hb 定量/蛋白質定量から平均 rCSA 結合数を決定、等電点電気泳動から pI 値を測定した。HemoXAnalyzer を用いて酸素結合解離曲線を測定し(37℃)、酸素親和性の指標である P_{50} 及び Hill 係数(n)を決定した。

【結果と考察】 得られた rCSA の Native-PAGE, SDS-PAGE は 66kDa 付近に単一なバンドを示し、HPLC 曲線もイヌ血漿由来の CSA と一致した。また、MALDI-TOFMS により rCSA の分子量が CSA と等しいことを確認した。rCSA を用いて合成した Hb-rCSA₃ の rCSA/Hb 比は 3.0 であり、Hb に rCSA が平均 3 個結合した構造が明らかとなった。等電点(pI: 4.7)は rCSA, CSA の値(pI=4.5)と同等であった。Hb-rCSA₃ の P_{50} は 9Torr, n は 1.6 で、Hb に比べ高い酸素親和性を有することがわかった。

【結論】 高純度 rCSA の合成に成功し、その構造と物性を明らかにした。さらに、ヘモグロビンをコア、rCSA をシェルとした Hb-rCSA₃ を初めて合成し、その構造と酸素結合能を明らかにした。rCSA はイヌ用血漿増量剤、Hb-rCSA₃ はイヌ用人工酸素運搬体として、動物医療に大きく貢献するものと期待される。

【文献】

- 1) D. Tomita, T. Kimura, H. Hosaka, Y. Daijima, R. Haruki, K. Ludwig, C. Böttcher, T. Komatsu, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1816.
- 2) H. Hosaka, R. Haruki, K. Yamada, C. Böttcher, T. Komatsu, *PLoS One* **2014**, *9*, e110541.

シンポジウム2-S12

アルブミン融合技術を基盤とした血中滞留型チオレドキシンの創製と急性腎障害治療への応用

○渡邊博志^{1,2}, 異島 優^{1,2}, 小田切優樹^{3,4}, 丸山 徹^{1,2}

¹熊本大学薬学部, ²熊本大薬育薬フロンティアセンター, ³崇城大学薬学部, ⁴崇城大 DDS 研

【緒言】 抗酸化炎症モジュレーターとして知られているチオレドキシン(Trx)は, 細胞内外のレドックス状態の調節を行うことで, 酸化ストレスに対する防御機構の一端を担う. この Trx の優れた生物活性を利用して各種酸化ストレス疾患に対する有用性が報告されてきた. しかしながら, Trx は 12kDa のタンパク質であるため, 投与後大部分が速やかに腎排泄される. 最近, 私達は Trx の臨床応用の課題である血中半減期の延長を企図して, ピキア酵母発現系を用いてアルブミン(HSA)と Trx の融合体(HSA-Trx)の作製に成功した. 放射標識並びに FITC 標識した HSA-Trx のマウスにおける体内動態解析の結果, HSA-Trx は Trx に比べて血中半減期が約 10 倍延長するとともに, 腎尿細管細胞への移行性が増大した. 本シンポジウムでは, HSA-Trx の体内動態特性に基づいた急性腎障害(AKI)治療への応用について紹介する.

【実験】 横紋筋融解症 AKI モデルはマウスに 24 時間の絶水処置後, 50% グリセロールを筋肉内投与することで作製した. 造影剤腎症モデルは, ラットにインドメタシン, L-NAME, 非イオン性造影剤(イオバルソール)の順で静脈内投与した. シスプラチン腎症はマウスにシスプラチン(15mg/kg)を腹腔内単回投与して作製した.

【結果と考察】 FITC 標識 HSA-Trx の静脈内投与後のマウス腎臓内局在について評価したところ, 腎皮質から皮髄境界領域にかけての尿細管上皮細胞に FITC 由来の蛍光が観察された. 致死性のグリセロール誘発 AKI モデルマウスを作製し, 10 日間の生存観察を行ったところ, HSA-Trx の投与は生存率を有意に上昇させた(PBS 投与群は 20%, HSA-Trx 投与群は 60%). また, HSA-Trx の投与は, グリセロール誘発の腎機能低下と腎組織障害を顕著に抑制し, 横紋筋融解症 AKI に特徴的な褐色尿も回復した. その際, HSA-Trx 投与群では血漿中及び腎組織中酸化ストレスに加え, 血漿中炎症性サイトカインの産生を有意に抑制した. 臨床応用を視野に置き, HSA-Trx の後投与による治療効果を検討したところ, グリセロール投与の 1 時間あるいは 3 時間後に HSA-Trx を投与しても, 同時投与に匹敵する優れた腎保護効果が認められた. 一方, 薬剤性 AKI である造影剤腎症並びにシスプラチン腎症モデルに対しても, HSA-Trx はその持続した抗酸化炎症作用により障害抑制効果を示した. 大変興味深いことに, AKI 動物の腎切片を用いた検討から, その障害領域と HSA-Trx の腎臓内局在は良く一致していた.

【結論】 HSA-Trx は, Trx が有する抗酸化炎症作用に加え, HSA に由来する優れた血中滞留性と腎尿細管移行特性により, 酸化ストレスや炎症が病態形成に深く関与する AKI に対する有用な治療薬となり得る可能性が示された.

【文献】

- 1) Kodama A et al. *Biochim Biophys Acta*. 1840, 1152-1162 (2014)
- 2) Kodama A et al. *Kidney Int*. 83, 446-454 (2013)
- 3) Ikuta S et al. *J Control Release*. 147, 17-23 (2010)

救急医療における人工血小板の必要性と展望

○木下 学¹, 萩沢康介², 朝比奈はるか³, 田中良弘³, 斎藤大蔵⁴, 高瀬凡平⁵

¹ 防衛医科大学校免疫微生物学講座, ² 同生理学講座, ³ 同救急部, ⁴ 同防衛医学研究センター外傷研究部門,

⁵ 防衛医科大学校病院集中治療部

交通事故や爆発事故などを含めた偶発的事故による重度外傷症例のうち、救命し得た可能性のある死(preventable death)の中で最も多いものの1つが、大量失血による出血性ショックである。迅速なERへの患者搬送と共に、最も重要となってくるのがプレホスピタルでの止血制御である。欧米での試みを中心にプレホスピタルでの止血制御の試みと止血剤の必要性について述べる。

四肢の動脈性出血に対してはタニケットによる止血処置が極めて有効であるが、体幹部の出血に対しては未だ有効な止血手段がない。これに対して、体幹部用のタニケットが開発され、現在改良が重ねられている。また、腹部大動脈損傷による動脈性大量出血に対しては、Resuscitative Endovascular Balloon Occlusion of the Aorta (REBOA)、いわゆる動脈内バルーン閉鎖(intra-aortic balloon occlusion, IABO)による出血量の軽減化対策が試みられている。

一方、このような外科的止血処置の他に、止血剤としてはトラネキサム酸(TXA)による線溶系を阻害する検討がなされているが、血小板成分を含む新鮮血輸血による止血が現時点では最も信頼性の高い処置ではないかと考えられている。すなわち、出血性ショックの救命に最も重要な対策は赤血球輸血の他に、外科的内科的な出血源に対する止血制御であり、現時点では血小板による止血促進が最も信頼性の高い治療処置と考えられている。

周知のように血小板の保存に関しては常温振とうで3-4日間しか止血凝固機能が維持出来ず、大災害など緊急時の大量需要を満たすには供給体制に不安が残る。人工血小板 H12 (ADP) liposome は完全合成系であるため、大量生産が可能で、室温静置で6-12カ月間の保存が可能である。また、H12 (ADP) liposome は血小板減少病態時には血小板代替物として止血機能を発揮するが、血小板数が正常な状態での投与でも出血部位に集積しADPを放出するため、代謝産物であるアデノシンによる損傷部位での組織保護効果が誘導され、外傷時の救命率が改善する所見が動物実験で得られている。

このように外傷性大量出血時の救命救急には止血制御が極めて重要であり、人工血小板 H12 (ADP) liposome は救命救急医療に画期的な進歩をもたらすことが期待される。

シンポジウム3-S14

レーザー衝撃波による肺出血に対する H12-ADP-liposome の救命効果

○萩沢康介¹, 木下 学², 宮脇博基³, 佐藤俊一⁴, 鈴木英紀⁵, 多喜川真人⁶, 武岡真司⁶, 斎藤大蔵⁷, 西田育弘¹

¹ 防衛医科大学校生理学講座, ² 同免疫微生物学講座, ³ 同救急部, ⁴ 防衛医科大学校・防衛医学研究センター情報システム研究部門,

⁵ 日本医科大学形態解析共同研究施設, ⁶ 早稲田大学先進理工学部, ⁷ 防衛医科大学校・防衛医学研究センター外傷研究部門

【緒言】 爆発等の衝撃による多発外傷では、心臓大血管・肝臓・腎臓等の臓器損傷とともに、肺出血が合併することが多い。我々はレーザー誘起衝撃波による致死的なマウス肺出血モデルを作成し、H12-ADP-liposome の予防投与が衝撃波による肺胞傷害を軽減し、生命予後を改善することを確認している。今回、肺出血後に H12-ADP-liposome を投与することで救命治療が可能か検討した。

【方法】 レーザー誘起衝撃波(8J)を右側背から照射した後に、H12-ADP-liposome をマウスの尾静脈から投与した(n=12)。H12-PBS-liposome を投与したものを対照(n=12)として、24 時間後の生存率を比較した。

【結果】 24 時間後の生存率は H12-ADP-liposome 群が 7/12(58%)であったのに対して H12-PBS-liposome 投与群は 1/12(8%)であった(p=0.027)。病理学的検討では H12-ADP-liposome 群は生理食塩水投与群に比べて非照射側(左側)肺での出血面積が縮小していた。

【結論】 H12-ADP-liposome の投与が、衝撃波による致死肺出血の救命に有用である可能性が示唆された。

血小板：赤血球：血漿(1：1：1)蘇生輸血の新展開

○多喜川真人¹，萩沢康介²，木下 学³，朝比奈はるか⁴，斎藤大蔵⁵，武岡真司¹

¹ 早稲田大学大学院 先進理工学研究科，² 防衛医科大学校生理学講座，³ 同免疫微生物学講座，⁴ 同救急部，

⁵ 防衛医科大学校・防衛医学研究センター外傷研究部門

【緒言】 大量出血による凝固障害をともなうショック病態において，血小板代替物を使用して最適の蘇生輸血法を開発する．

【方法】 ウサギ(♂2.5kg)の大腿動静脈にカニューレションし，400mlの脱血・洗浄赤血球輸血で血小板を分離し低血小板状態にする．開腹し，肝臓にデルマパンチを使用して穿孔性 injury を作成する．Injury 部位にバルーンによる圧迫止血を行いながら，蘇生輸血すなわち血小板：赤血球：血漿(1：1：1)を投与する．血小板輸血を H12- (ADP) liposome で置き換えた群と従来輸血法の群とで血行動態と生命予後を比較した．

【結果】 脱血後に血小板数は平均 4 万 / μ L 程度になった．Injury 後には Hb 値は 6 g/dl 程度となり，平均動脈圧は 40 mmHg 程度になった．血小板輸血ないし H12- (ADP) liposome 投与から 1 時間程度で止血を確認した．止血後の赤血球輸血により平均動脈圧は 50 mmHg 程度になった．いずれの群でも 24 時間後の生存率は 70%であった．一方，血小板輸血を PPP で，赤血球輸血を 5% albumin で置き換えたものは殆ど数時間で死亡した．

【結論】 大量出血による凝固障害をともなう病態において，H12- (ADP) liposome を使用した新しい蘇生輸血は，従来の輸血法と同等の救命効果を有していることを確認した．

【文献】

- ・ Holcomb JB, Wade CE, Michalek JE, Chisholm GB, Zarzabal LA, Schreiber MA, et al. *Annals of Surgery*, **2008**, 248, 447-458.
- ・ Hagiwara K, Nishikawa K, Yanagawa R, Kinoshita M, Doi M, Suzuki H, et al. *Transfusion*. **2015**, 55, 314-325.

ウサギ肝およびマウス肺出血モデルにおける人工血小板投与時の超微細形態像

○鈴木英紀¹, 萩沢康介², 武岡真司³, 半田 誠⁴, 木下 学²¹ 日本医科大学・共同研究センター形態解析共同研究施設, ² 防衛医科大学, ³ 早稲田大学理工学術院,⁴ 慶應義塾大学医学部輸血・細胞療法センター

【緒言】 フィブリノゲンγ鎖C末端のドデカペプチド(H12)を結合させ、さらにADPを内包させたH12-(ADP)リボソームは、ヒト血小板凝集を促進させる。また、動物実験において、本リボソームは出血時間を短縮させることが知られている。今回、ウサギ肝出血およびマウス肺出血モデルにおける本リボソームの分布を電顕的に観察した。

【方法】 1)肝出血モデルは血小板数を $5 \times 10^4/\text{ml}$ に減少させたウサギで行った。すなわち、右大腿動脈および左大腿静脈にカニューレションを行い、動脈は脱血と動脈圧測定用、静脈は輸液および輸血用とし、脱血と低分子デキストラン液および洗浄赤血球の輸血を繰り返して、血小板数を減少させた。この後、ウサギを開腹し、肝臓の一葉にDerma punch(直径5mm)を刺して貫通、損傷させ、oozing出血を持続させた。パルーンカテによる圧迫止血を行いながら、直ちにH12-(ADP)リボソームを体重当たり20mg/kg投与した。同時に、損傷0分から5分経過後、および5分から10分経過後の出血量を測定し、止血を確認できたものの肝出血部を切り出し、電顕検索試料とした。2)マウス肺出血モデルは、レーザー衝撃波を照射して作製した。すなわち、マウスを剃毛後、腹臥位に固定し、レーザー装置をマウス右側背より密着させた上で、8Jの衝撃波を右肺全体に照射した。気道閉塞による窒息死を防止する体位をとりながら、H12-(ADP)リボソームを尾静脈から120ml(20mg/kg)投与し、60分間呼吸状態などを観察した後、右肺および左肺を切り出して電顕検索試料とした。

【結果】 H12-リボソームを凍結超薄切片法で観察すると、直径100~400nm前後の粒子状を示し、リボソームに特徴的な二重膜も観察された。しかし、通常の超薄切片法では、リボソームは試料作製過程に使う有機溶媒のために溶解されて不明瞭な像を示すが、識別は可能であった。ウサギ肝出血モデルにおいて、肝損傷部では肝細胞の上部に多くの赤血球、少数の白血球が見られ、損傷部からやや遠い部位にフィブリンに囲まれた血小板凝集塊が観察された。凝集塊中にはH12-(ADP)リボソームが多数観察された。一方、マウス肺出血モデルでは、衝撃波を照射した右肺では、ヒトのblast lung injury様の致死性肺出血が見られた。すなわち、胸膜直下から深部にかけて肺胞中に多量の出血が見られ、赤血球とフィブリンが観察された。さらに、肺胞毛細血管中に血小板凝集が見られた。肺胞で形成された大凝集塊も観察された。しかし、左肺では肺胞出血はわずかであった。H12-(ADP)リボソームはウサギ肝出血モデルと同様に血小板凝集塊中に観察された。

【考察】 ウサギ肝出血およびマウス肺出血モデルにおいて、人工血小板のH12-(ADP)リボソームはともに血小板凝集塊に巻き込まれることを観察した。ウサギ肝出血モデルにおける本リボソームは、血小板減少状態であっても、凝集塊を大きくすることに寄与し、肝出血死を防ぐものと考えられる。また、マウス肺出血モデルにおける本リボソームの投与は、H12-リボソームまたは(ADP)リボソームに比べて延命効果があることから、H12を介してリボソームは凝集塊に巻き込まれ、その局所でADPを放出することが必須と考えられる。ADPは病変部で代謝され、アデノシン作用を示すことによって、延命効果を示すと考えられる。

人工血小板 H12(ADP) リポソームの繰り返し投与における体内動態特性

○丸山 徹¹, 橋本麻衣^{1,2}, 田口和明²¹ 熊本大学薬学部, ² 崇城大学薬学部

血小板としての機能を備えた H12(ADP) リポソームは, in vitro 系はもとより各種血小板減少状態モデル動物において, 血小板に匹敵する止血効果を発揮することが実証され, 血小板代替物としての臨床応用が期待されている. H12(ADP) リポソームを開発する過程において, 本製剤の体内動態を前臨床段階で詳細に解析し, 薬物動態学的観点から有効性及び安全性を評価する必要がある. 本シンポジウムでは, これまで我々が構築した H12(ADP) リポソームの体内動態, 特に繰り返し投与時における特性に焦点をあてて紹介する.

健常動物に対する H12(ADP) リポソームの体内動態特性を解析した結果, 本製剤はインタクトなまま血中を滞留した後, 肝臓や脾臓に分布して分解・代謝され, 脂質成分は糞中に, 内封されている ADP は尿中へ排泄されること, またそれを反映して生体内蓄積性は低いことが明らかとなった. H12(ADP) リポソームを繰り返し投与すると, 他のリポソーム製剤と同様, PEG を認識する ABC 現象が出現した.

プスルファン誘発血小板減少症モデルラットにおける体内動態を解析した結果, 血中滞留性は健常時に比べて低下するものの, 代謝・排泄・蓄積性においては健常時と類似した挙動を示した. 興味深いことに, 本病態モデルへ H12(ADP) リポソームを繰り返し投与しても, ABC 現象は出現しなかった.

40% 脱血と赤血球輸血により作成した希釈性血小板減少症モデルラットを用いて, H12(ADP) リポソームの体内動態を解析した結果, 2) と類似した特性を示すことが判明した. 他方, 繰り返し投与すると, 健常時と同様に ABC 現象が観察された.

以上の知見から, H12(ADP) リポソームを繰り返し投与する場合, 投与状況によって ABC 現象の出現する可能性が示されたものの, 現時点で想定される適応疾患と適応方法であれば体内動態に及ぼす影響は少ないことが明らかとなった.

【文献】

- 1) Effect of Repeated Injections of Adenosine Diphosphate-Encapsulated Liposomes Coated with a Fibrinogen γ -Chain Dodecapeptide Developed as a Synthetic Platelet Substitute on Accelerated Blood Clearance in a Healthy and an Anticancer Drug-Induced Thrombocytopenia Rat Model. *J Pharm Sci* (2015) in press.
- 2) Pharmacokinetic Properties of Single and Repeated Injection of Liposomal Platelet Substitute in a Rat Model of Red Blood Cell Transfusion-Induced Dilutional Thrombocytopenia, *J Pharm Sci*. 2015 in press.

一般演題1-G1

HemoAct™ の効率高い精製と酸素親和性測定

○岩崎 瞳, 船木亮佑, 篠原隆一, 小松晃之

中央大学理工学部

【緒言】我々はヘモグロビン(Hb)の分子表面に3個のヒト血清アルブミン(HSA)を結合させたコア-シェル型の(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター(Hb-HSA₃, 製剤名“HemoAct™”)を開発し, 人工酸素運搬体製剤としての実用化を目指した研究を進めている¹⁻⁴⁾. 本報では, HemoAct™の効率高い精製法を確立するとともに, その酸素親和性を詳細に解析したので報告する.

【実験】高純度ウシ Hb 溶液に架橋剤 Succinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)を加え, Hb の分子表面にマレイミド基を構築した後, それをHSA溶液に滴下し, 4℃で14hr攪拌した. 余剰のHSAを陰イオン交換クロマトグラフィー(Q Sepharose Fast Flow)により除去し, Hb-HSA₃(HemoAct™)を得た. HemoxAnalyzerを用いて酸素結合解離曲線を測定し(37℃), 酸素親和性の指標である P_{50} および協同性を示す Hill 係数(n)を決定した. さらに, 酸素親和性の pH, Cl^- 濃度および IHP 濃度依存性を測定した.

【結果と考察】これまで HemoAct™の精製(反応溶液からの未反応 HSA の除去)は, ゲルろ過クロマトグラフィーにより行ってきたが, 溶出液を分画分取しなければならない煩雑さがあった. そこで, 陰イオン交換クロマトグラフィーを用いたところ, 余剰の HSA が簡単に除去され, NaCl 濃度を上げるだけで HemoAct™が単離できることがわかった. 今後, HemoAct™の製造は大幅に効率化されることになる.

HemoAct™の酸素親和性は Hb に比べ高く, 協同性は低い(P_{50} =9 Torr, n =1.5). これは Hb の酸素親和性に影響を及ぼす Cys-93(β)や, 協同性に影響する表面 Lys 残基に架橋剤 SMCC が結合しているためである. Hb の P_{50} は pH, Cl^- 濃度, IHP 濃度の上昇により変化するが, HemoAct™の P_{50} は pH, Cl^- 濃度および IHP 濃度によらず一定であった. プロトンや Cl^- , IHP の結合部位である N 末端 NH_2 基や表面 Lys 残基が SMCC によって修飾されているためと考えられる.

【結論】陰イオン交換カラムを用いた効率高い HemoAct™の精製法を確立した. HemoAct™の酸素親和性は pH, Cl^- 濃度, IHP 濃度によらず一定であり, 安定した酸素輸送が可能である.

【文献】

- 1) D. Tomita, T. Kimura, H. Hosaka, Y. Daijima, R. Haruki, K. Ludwig, C. Böttcher, T. Komatsu, *Biomacromolecules* **2013**, 14, 1816.
- 2) H. Hosaka, R. Haruki, K. Yamada, C. Böttcher, T. Komatsu, *PLoS One* **2014**, 9, e110541.
- 3) 小松晃之, 化学と工業, **2014**, 67, 677.
- 4) R. Haruki, T. Kimura, H. Iwasaki, K. Yamada, I. Kamiyama, M. Kohno, K. Taguchi, S. Nagao, T. Maruyama, M. Otagiri, T. Komatsu, *Sci. Rep.* **2015**, 5, 12778.

一般演題1-G2

ブタヘモグロビンを用いた HemoAct™ の合成と酸素結合力

○横幕恭子, 小松晃之

中央大学理工学部

【緒言】 ウシヘモグロビン(HbBv)及びヒトヘモグロビン(HbA)の分子表面3個のヒト血清アルブミン(HSA)を共有結合した(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター(HbBv-HSA₃, HbA-HSA₃, 製剤名“HemoAct™”)を開発し, 人工酸素運搬体製剤としての実用化を目指した研究を進めている¹⁻⁴⁾. 本報では, 従来のHbBv-HSA₃, HbA-HSA₃に加え, 酸素結合部位としてブタヘモグロビン(HbSw)を用いたHbSw-HSA₃を新たに合成し, その構造と酸素結合力を明らかにしたので報告する.

【実験】 ブタ赤血球から精製した高純度HbSwのPBS溶液([HbSw]=0.1mM)に架橋剤 Succinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate(SMCC)を加え, Hbの分子表面にマレイミド基を構築した後, それをHSA([HSA]/[HbSw]=10(mol/mol))と反応させることによりHbSw-HSA₃を合成した. 余剰のHSAはゲルろ過クロマトグラフィーにより除去した. Hb定量及び蛋白質定量から平均HSA結合数を決定し, 等電点電気泳動からpI値を測定した. HemoxAnalyzerを用いて酸素結合解離曲線を測定し(37℃), 酸素親和性の指標であるP₅₀及び協同性を示すHill係数(n)を決定した.

【結果と考察】 HbSwの純度は, Native-PAGE, SDS-PAGE, UV-vis. スペクトル測定により確認した(収率: 71%, metHb: 1%以下). HbBvやHbAと同様, HbSwを原料としてもHbSw-HSA₃が合成できることがわかった. 平均HSA結合数は3.2であり, Hb1分子あたり約3個のHSAが結合している. 等電点(pI: 5.0)はHSA, HbBv-HSA₃, HbA-HSA₃の値と同等であった. またHbSw-HSA₃のP₅₀は9Torr, nは1.6であり, HbSwより低下したが, HbBv-HSA₃(P₅₀: 9Torr, n: 1.4), HbA-HSA₃(P₅₀: 8Torr, n: 1.4)と近い値となった.

【結論】 HbSwの分子表面にHSAを結合させたHbSw-HSA₃を合成し, その構造と酸素結合力を明らかにした. HbSw-HSA₃も人工酸素運搬体製剤HemoAct™として十分な機能を有し, 多くの用途展開が期待される.

【文献】

- 1) D. Tomita, T. Kimura, H. Hosaka, Y. Daijima, R. Haruki, K. Ludwig, C. Böttcher, T. Komatsu, *Biomacromolecules*, **2013**, 14, 1816.
- 2) H. Hosaka, R. Haruki, K. Yamada, C. Böttcher, T. Komatsu, *PLoS One* **2014**, 9, e110541.
- 3) T. Kimura, R. Shinohara, C. Böttcher, T. Komatsu, *J. Mater. Chem. B* **2015**, 3, 6157.
- 4) R. Haruki, T. Kimura, H. Iwasaki, K. Yamada, I. Kamiyama, M. Kohno, K. Taguchi, S. Nagao, T. Maruyama, M. Otagiri, T. Komatsu, *Sci. Rep.* **2015**, 5, 12778.

一般演題1-G3

Study of amino acid-containing cationic liposomes on the immune stimulation of human macrophages and THP-1 monocytes

○ Tianshu LI¹, Shinji TAKEOKA^{1,2}

¹Research Organization for Nano & Life Innovation, Waseda University,

²Department of Life Science and Medical Bioscience, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University

Liposomes are bilayer-structured nanoparticles composing of amphiphilic lipids. It is widely applied as cancer drug delivery system (DDS) due to its enhanced permeability and retention (EPR) effect. However, its accessibility to the mononuclear phagocytic system (MPS) resulted in a rapid clearance of the drugs from the blood circulation after systemic administration. It seems that MPS is a natural target for some liposomes. Therefore, it is of great importance to investigate the interaction between the liposomes and the immune system such as macrophages and other immune cells in order to explore the novel applications of liposomes, for example, as immune adjuvant and vaccine delivery system.

In this study, we designed a series of amino acid (ie, arginine and lysine)-containing cationic lipids, which have different chemical structures in the hydrophilic and lipophilic moieties and the spacers between them, to study the structural effect on the stimulation of immune cells such as human macrophages and THP-1 monocytes (Figure 1). The results of IL-1 β ELISA tests indicated that the liposomes with 14-carbons fatty acids and 3 or 5-carbons spacers were more potent in the NLRP3 inflammasome activation than those with 16- and 18-carbons fatty acids, and 0 or 7-carbons spacers. The mechanisms may include the cellular internalization of the cationic liposomes and the subsequent lysosome rupture detected by flow cytometry. Meanwhile, no significant ROS induction was confirmed using confocal laser scanning microscopy.

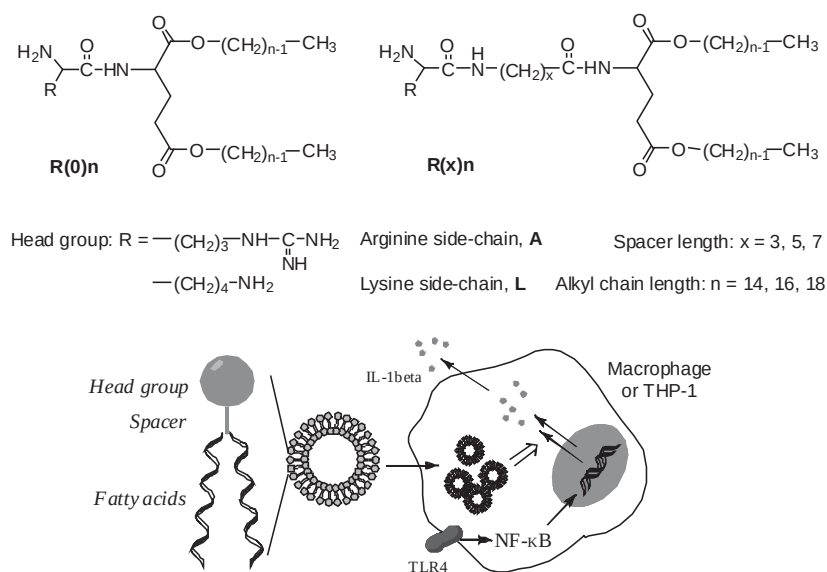


Fig.1. Structures of amino acid-containing cationic lipids developed in Takeoka Laboratory and image of the activation of immune cells by cationic liposomes.

一般演題1-G4

アルブミン製剤処方の基礎的検討：抗酸化剤としての N-アセチルメチオニンの有用性について

○河野陽介^{1,4}, 安楽 誠¹, 山崎啓之^{1,2}, 丸山 徹³, 岡山善郎⁴, 平山文俊^{1,2}, 小田切優樹^{1,2}

¹ 崇城大学薬学部, ² 崇城大 DDS 研, ³ 熊本大学薬学部, ⁴ ファーマダイワ

【緒言】 アルブミン製剤は血液を原料とするため有害なウイルスや夾雑蛋白質が混入する可能性が予測される。現在、これらの混入を防ぐため、低温殺菌法が用いられている。その際、アルブミンの熱変性を防ぐ目的でアルブミン製剤には、カプリル酸ナトリウム (Capl) と N-アセチル-L-トリプトファン (N-AcTrp) の 2 種の安定化剤が添加されている。我々はこれまでに、これら添加剤において、Capl は安定化剤として、N-AcTrp は酸化防止剤としての役割を担うことを明らかにした¹⁾。さらに最近我々は、より安定化効果を有するアミノ酸としてメチオニンに着目し、N-アセチル-L-メチオニン (N-AcMet) が光照射に対して N-AcTrp より優れた抗酸化及び安定化効果を有することを明らかにした²⁾。そこで今回、アルブミン製剤の酸化に及ぼす影響について、腎不全時進展に関与する有力な活性酸素クロロミン T を用いて、N-AcMet 及び N-AcTrp 添加群、非添加群におけるアルブミンの構造・機能変化について比較検討した。

【方法】 各試験サンプルを各濃度クロロミン T (CT) と経時的に反応させ、透析、凍結乾燥後、3 種の酸化 HSA (CT 処理 HSA (非添加群), CT 処理 HSA (N-AcTrp 添加群), CT 処理 HSA (N-AcMet 添加群)) を調製し、下記の方法で試験を行った。添加剤の抗酸化効果は、ESR スペクトル、カルボニル含量、タンパク質過酸化物質 (AOPP) 含量及びペルオキシナイトライト消去率により評価した。構造及び熱安定性の評価は、円二色性 (CD) スペクトル及び断熱型示差走査熱量計 (DSC) により評価した。

【結果及び考察】 クロロミン T によるアルブミンの酸化は、N-AcMet 添加群では N-AcTrp 添加群に比べて、各種抗酸化評価系において、有意に減少させた。また、酸化後のアルブミンの構造安定性を CD スペクトル及び DSC により評価した結果、N-AcTrp 添加時と比較して、N-AcMet 添加時のアルブミンの顕著な構造及び熱安定性が観察された。

【結論】 N-AcMet は、アルブミン製剤において、N-AcTrp より有効な抗酸化及び安定化効果を示す添加剤である可能性が強く示唆された。

【文献】

- 1) Anraku M, Tsurusaki Y, Watanabe H, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M., *Biochim Biophys Acta*. **2004**, 1702, 9.
- 2) Kouno Y, Anraku M, Yamasaki K, Okayama Y, Iohara D, Ishima Y, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Hirayama F, Otagiri M., *Biochim Biophys Acta*. **2014**, 1840, 2806.

一般演題2-G5

人工赤血球は port-wine stain 色素レーザー治療の増感剤としての役割を担う

○力久直昭¹, 佐藤兼重², 酒井宏水³

¹千葉労災病院, ²千葉大学, ³奈良県立医科大学

【緒言】 色素レーザー照射法は赤アザ(port-wine stain)の治療方法として確立しており, 保険収載された治療である。照射されたレーザー光は異常血管内のヘモグロビン(absorbers/heaters)に吸収され熱エネルギーに変換される。この熱エネルギーが血管壁に伝わり血管内皮が破壊され, 最終的に血管(target)が壊死し吸収されて port-wine stain が消失する。人工赤血球(Hb-V)を静脈投与してレーザー光の absorbers/heaters を増やしてから照射治療を行うことによって, レーザーの治療効果は向上すると考えられる。当学会第 20 回年次大会(奈良)で人工赤血球を投与することによって, レーザー照射後の血管周囲の皮膚軟部組織の熱損傷が軽減することを報告した。今回, 治療の target である血管の損傷強度について組織学的統計学的に解析したので, その結果を報告する。

【実験】 鶏の肉髯に 3 条件のエネルギー(4J/cm², 5 J/cm² または 6 J/cm², いずれも 10ms, 皮膚表面の冷却処置なし)で色素レーザーを照射した。照射後 2 時間に局所採取して作製された HE 染色標本を組織学的に評価した。各 1 条件につき 240 の血管について, 以下の評価に基づき評価した。

(評点)0: 著変なし, 1: 赤血球凝集, 赤血球脱核, 2: 血管壁傷害, 3: 血管周囲への出血

【結果と考察】 照射条件 4J では, 人工赤血球未処理(HbV-)で平均スコア 1.4 ± 0.86 , 人工赤血球処理(HbV+)で 1.6 ± 1.02 であり, HbV+ で有意に増加した($p < 0.05$)。

照射条件 5J では, HbV- で 1.6 ± 0.89 , HbV+ で 1.7 ± 0.94 であり, HbV- と HbV+ の間に有意な差は認められなかった。

照射条件 6J では, HbV- で 1.7 ± 0.83 , HbV+ で 2.2 ± 0.80 であり, HbV+ で有意に増加した($p < 0.01$)。また, 照射エネルギーの上昇により, 血管傷害スコアが増加する傾向があった。Hb-V の投与後に色素レーザーを照射すると肉髯の血管が有意に多く破壊されることがわかった。

【結論】 人工赤血球は色素レーザーの増感剤としての役割担うことができ, この臨床応用によって port-wine stain 治療の成績が向上すると期待できる。

【文献】

- 1) 力久直昭 ヘモグロビンを含んだ血液代替物を利用した単純性血管腫のレーザー治療の効果についての考察(解説) 人工血液 2011; 18: 110-113
- 2) Zenzie HH, Smirnov MZ. Extended theory of selective photothermolysis. Altshuler GB, Anderson RR, Manstein D. *Lasers Surg Med.* 2001; 29: 416-32.

ヘモグロビン小胞体蘇生が輸血関連急性肺障害に与える影響

○得能正裕¹, 田口和明¹, 山崎啓之¹, 酒井宏水², 小田切優樹¹

¹ 崇城大学薬学部, ² 奈良県立医科大学

【緒言】 輸血関連急性肺障害 (TRALI) は、非心原性の肺水腫に伴う呼吸困難を呈する重篤な輸血による副作用である。TRALI の詳細な機序は未だに解明されていないが、好中球の関与が示唆されており、外傷や感染症などの被輸血者側の素因と、血液製剤側因子の両面により好中球が活性化され、発症に至るという two-event 仮説が提唱されている。赤血球 (RBC) の長期保存がもたらす種々の生化学的・構造的変化や物質の蓄積は Storage lesion と呼ばれ、血液製剤側の危険因子として重要であることが示唆されている。我々は、室温で 2 年間の構造安定性が証明されているヘモグロビン小胞体 (HbV) が、保存 RBC 濃厚液 (PRBC) の持つ血液製剤側の危険因子を回避することで TRALI の発症を抑制するのではないかと仮定した。そこで本研究では、出血性ショックラットを新鮮 PRBC、保存 PRBC、HbV で蘇生した場合の肺障害を比較評価した。

【実験】 雄性 Lewis ラットから採取した血液を CPDA 液で処理することで PRBC を作成し、0 日保存または 28 日保存したものを、それぞれ新鮮 PRBC (PRBC-0)、保存 PRBC (PRBC-28) として使用した。HbV は製造後 1 年経過したものをを用いた。出血性ショックラットは Nicholson らの方法¹⁾を基に作製し、PRBC または HbV にて蘇生した。肺障害の評価は、輸血 6 時間後における気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中のエバンスブルー漏出度及びタンパク濃度、肺 Wet/Dry 重量比により行った。さらに、肺組織切片中のミエロペルオキシダーゼ (MPO) 染色及び 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 染色をおこない、肺への好中球集積と酸化ストレスについて評価した。

【結果と考察】 輸血 6 時間後までの生存率は、PRBC-0 群で 83.3%、PRBC-28 群で 76.9%、HbV 群で 90.9% であった。BALF 中のエバンスブルー漏出度及びタンパク濃度と肺 Wet/Dry 重量比は、PRBC-28 群において PRBC-0 群と比較して増加したが、HbV 群では PRBC-0 群と同程度であった。肺組織 MPO 染色及び 8-OHdG 染色においては、PRBC-28 群で MPO と 8-OHdG の蓄積が観察され、肺への好中球集積と酸化ストレスが肺障害に関与する可能性が示唆された。

【結論】 HbV は出血性ショック時における輸血製剤として新鮮 PRBC と同様の蘇生効果を示し、保存 PRBC 輸血時に惹起された肺障害は観察されなかった。このことから、HbV は長期保存した場合においても TRALI を惹起しないと考えられた。

【文献】

1) Nicholson SE et al., *J Trauma*. 2011, 70, 466-71

一般演題2-G7

磁性粒子内包血小板代替物 H12-(ADP/mp) リボソームの構築

○大澤史佳, 武岡真司

早稲田大学先進理工学研究科

【要旨】 当研究室では血小板代替物としてリン脂質二分子膜小胞体(リボソーム)表面の PEG 鎖末端にフィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチドを結合させ、その内水相に血小板凝集惹起物質の ADP を内包させた、H12-(ADP)リボソームを調製している。磁性ナノ粒子(mp)は既に MRI 用造影剤として使用されており、また、磁場により移動が可能であることから薬剤輸送システムへの応用が期待されている。本研究では、新しい血小板代替物として、磁性ナノ粒子を内包させた H12-(ADP/mp)リボソームの構築を目的として、今回は本リボソームの調製法の確立を行った。

磁性ナノ粒子の内包・除去方法、内包量の測定方法、また、リボソーム調製法を検討した。既存の H12-(ADP)リボソームの標準作業手順書を基に、磁性ナノ粒子を水和法にて内包する方法や鉄塩の加水分解¹⁾を用いてリボソーム内で磁性ナノ粒子を作製する方法を用いてリボソームを調製した。混合脂質(DPPC/Cholesterol/DHSG/PEG-DSPE=5/5/1/0.03)、磁性ナノ粒子(Fe_3O_4)を用いてリボソームを調製した。粒子径、ゼータ電位、脂質組成比、ADP 内包量、mp 内包量、H12 担持量等を測定した。内包量は紫外可視分光光度計を用い、400nm での吸光度から算出した。

【文献】

1) H. Iida et al., *Journal of Colloid and Interface Science*, **314**, 274-280 (2007)

一般演題2-G8

アセトアミノフェン誘発肝障害に対するヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン/フラーレンナノ粒子の抑制効果

○梅崎至高¹, 庵原大輔¹, 安楽 誠^{1,2}, 上釜兼人², 平山文俊^{1,2}

¹ 崇城大学薬学部, ² 崇城大 DDS 研

【緒言】 アセトアミノフェン (APAP) は小児から高齢者, 妊婦にまで広く使用される解熱鎮痛薬である。しかし, APAP を過量に服用すると, 酸化ストレス障害である肝障害 (APAP 肝障害) が誘発される。現在治療薬として N-アセチルシステインが使用されるが, 十分な治療効果が得られないため, APAP 肝障害に対する新規治療薬の開発が望まれている。当研究室ではこれまでに, ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン (HP- β -CyD) を用いて, 抗酸化能を有する水酸化フラーレン ($C_{60}(OH)_{10}$) を水中で安定なナノ粒子として高濃度に調製可能なことを明らかにした。そこで, 本研究では抗酸化剤として $C_{60}(OH)_{10}$ /HP- β -CyD ナノ粒子の医薬への応用を目的として, APAP 肝障害への影響ならびに肝障害抑制メカニズムについて検討した。

【方法】 APAP (400 mg/kg) を C57BL/6 マウス腹腔内に投与し APAP 肝障害を誘発させ, その 30 分後に $C_{60}(OH)_{10}$ /HP- β -CyD ナノ粒子 (200 mg/kg) を腹腔内投与した。APAP 投与から 24 時間後に採血を行い, 肝障害の指標となるトランスアミナーゼ (ALT, AST) を測定し, 致死率を検討した。また, 肝臓組織切片のニトロチロシン染色を行い, 酸化ストレス抑制効果を検討した。さらに, APAP 誘発肝障害の発生過程で産生する一連の活性酸素種 (一酸化窒素 (NO), スーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$), ペルオキシナイトライト ($ONOO^-$)) に対する $C_{60}(OH)_{10}$ /HP- β -CyD ナノ粒子の抑制効果を検討した。

【結果及び考察】 APAP を過量投与したマウスの ALT 値および AST 値は著しく上昇し, 肝臓組織の出血, 炎症が観察された。一方, APAP を過量投与後, $C_{60}(OH)_{10}$ /HP- β -CyD ナノ粒子を腹腔内投与したマウスでは, ALT 値, AST 値の増加が顕著に抑制された。また, APAP 過量投与群は 40 時間以内に全数死亡するのに対し, $C_{60}(OH)_{10}$ /HP- β -CyD ナノ粒子投与群では 48 時間以降においても 80% の生存率を維持した。 $C_{60}(OH)_{10}$ /HP- β -CyD ナノ粒子の APAP 誘発肝障害抑制メカニズムを明らかにするために, 肝臓のニトロチロシン染色を行うと, $C_{60}(OH)_{10}$ /HP- β -CyD ナノ粒子は Control 群と比較し, 顕著にニトロチロシン陽性率を低下させた。また, $C_{60}(OH)_{10}$ /HP- β -CyD ナノ粒子は NO, $O_2^{\cdot-}$, $ONOO^-$ に対して, 濃度依存的に抑制効果を示した。以上の結果より, $C_{60}(OH)_{10}$ /HP- β -CyD ナノ粒子は, APAP 肝障害発症に関与する $ONOO^-$ 等のラジカル種を消去することで酸化ストレスを抑制し, 肝臓保護効果を示したものと考えられる。

【結論】 $C_{60}(OH)_{10}$ /HP- β -CyD ナノ粒子は有力な抗酸化剤として APAP 肝障害ならびに各種酸化ストレス関連疾患への応用が期待される。

【文献】

1) Umezaki et al., Biomaterials, 45, 115-123 (2015).

一般演題2-G9

血中滞留型アルブミン融合 BMP7 の設計と持続的腎保護作用の評価

○戸田翔太¹, 渡邊博志^{1,2}, 異島 優^{1,2}, 小田切優樹^{3,4}, 丸山 徹^{1,2}

¹熊本大学薬学部, ²熊本大薬育薬フロンティアセンター, ³崇城大学薬学部, ⁴崇城大 DDS 研

【緒言】 高齢化社会の進展に伴い慢性腎臓病が増加しており、患者数は国内で 1300 万人以上となっている。腎疾患に対しては、降圧薬やステロイドなど、様々な薬が投与されるが病態進行を回復させる薬剤は未だ存在しない。最近では、腎尿細管修復能を有するタンパク質として BMP7 (骨形成タンパク質) が注目されている。しかしながら、BMP7 は約 10kDa のタンパク質であり、投与後大部分が速やかに腎排泄されるため、その低い血中滞留性と活性の持続性が臨床応用に向けた課題となっている。本研究では、BMP7 をアルブミン (HSA) と融合化し、臨床応用の課題を改善した HSA-BMP7 融合体を作製するとともに、その腎保護効果を片側尿管結紮 (UUO) 及びシスプラチン誘発腎障害マウスを用いて検討した。

【実験】 pPIC9 ベクター上で HSA 及び BMP7 を融合させ、ピキア酵母発現系を用いて HSA-BMP7 を発現・精製した。その際、BMP7 の 3 つの糖鎖結合部位に変異を施すことで糖鎖を欠損させた。腎間質線維化モデルである UUO マウスに対しては、尿管結紮直後に HSA-BMP7 あるいは BMP7 を週 1 回尾静脈内投与を行い、その抗線維化作用について評価を行った。シスプラチン腎障害マウスに対しては、シスプラチン投与 30 分前に HSA-BMP7 を尾静脈内投与し、4 日後に腎機能及び腎組織学的評価を行った。

【結果と考察】 融合化が BMP7 の活性に及ぼす影響を評価するため、ヒト近位尿細管上皮細胞株 (HK-2) を用いて、尿細管修復に関わる BMP7 シグナルである Smad1/5/8 のリン酸化を Western blotting により検出した。その結果、HSA-BMP7 は BMP7 に比べると弱いものの、Smad1/5/8 のリン酸化活性を保持していた。次に、マウス筋芽細胞株 (C2C12) を用いて、BMP7 の腎治療応用における問題点である骨芽細胞への分化を ALP 活性により評価した。HSA-BMP7 添加群では、BMP7 に比べ ALP 活性が顕著に減少していた。これは、元来 BMP7 が有する 3 つの糖鎖を欠損したためであると推察された。次に UUO マウスを用いて、HSA-BMP7 の腎線維化抑制効果について評価した。マッソントリクローム染色により線維化の程度を評価したところ、HSA-BMP7 投与により有意な線維化抑制効果が観察された。一方、HSA-BMP7 の構成成分である HSA または BMP7 の単独投与では線維化抑制効果は確認されなかった。また、腎線維芽細胞マーカーである α -SMA の免疫染色と線維化関連因子の mRNA 発現、線維化の原因であるコラーゲンの主成分であるヒドロキシプロリン定量を行ったところ、HSA-BMP7 投与群で有意な抑制効果が見られた。さらにシスプラチン腎障害マウスにおいて、HSA-BMP7 の投与は有意な腎機能改善効果を示した。また腎組織障害の程度を PAS 染色により評価したところ、シスプラチン投与群で観察された尿細管の核の脱落や変性は、HSA-BMP7 投与により抑制された。TUNEL 染色を行ったところ、シスプラチン投与群で多数観察された TUNEL 陽性細胞は、HSA-BMP7 投与により減少した。

【結論】 BMP7 の血中滞留性を改善し、生理活性を持続化した HSA-BMP7 は、BMP7 の臨床応用における課題を克服するため、新規腎疾患治療薬としての開発が期待される。

一般演題2-G10

新規ナノ EPR 増強剤である一酸化窒素付加アルブミンダイマーを用いた高分子抗癌剤治療の効率化

○木下 遼¹, 異島 優¹, 池田真由美¹, 方 軍², 前田 浩², 渡邊博志¹, 小田切優樹², 丸山 徹¹

¹ 熊本大学薬学部, ² 崇城大学薬学部

【緒言】 癌化学療法において、EPR 効果を根幹とする高分子抗癌剤の開発が進んでいる一方で、それらの腫瘍集積量は十分ではなく、満足な治療効果には未だ至っていない。高分子抗癌剤治療の効率化を図るには内因的な EPR 効果の増強によるアプローチが最適であると考え、EPR 増強因子である一酸化窒素(NO)に着目した。NO の短い半減期の克服及び、腫瘍への効率的なデリバリーを目指し、ヒト血清アルブミンの二量体をキャリアとして用いた一酸化窒素付加アルブミンダイマー(SNO-HSA Dimer)を新規ナノ EPR 増強剤として作製した¹⁾。本研究では SNO-HSA Dimer の有用性を実証すべく、その EPR 増強作用の動態的解析並びに既存の高分子抗癌剤(Doxil[®], Abraxane[®])を用いた治療への波及効果の評価を行った。

【実験】 既報に従い SNO-HSA Dimer を調製した。高血管透過性の C26 担癌マウス及び低透過性の B16F10 担癌マウスを作成し、SNO-HSA Dimer 及び EPR 効果の指標であるエバンスブルー(EB)を併用投与し、EB の腫瘍血管漏出及び腫瘍内浸透性を評価した。さらに、SNO-HSA Dimer と Doxil[®], Abraxane[®] を併用投与し、抗腫瘍活性並びに抗癌剤の体内分布への影響を評価した。

【結果と考察】 EPR 増強の動態的解析において、SNO-HSA Dimer 投与 0.5-3h 後に EB の血管漏出および腫瘍内浸透の亢進が確認された。また、アルブミン結合型抗癌剤 Abraxane[®] を用いた治療への SNO-HSA Dimer 併用により、Abraxane[®] の腫瘍移行を亢進する結果、抗腫瘍活性を有意に増強し、さらには副作用の軽減化した。リポソーム製剤 Doxil[®] を用いた治療でも同様に、SNO-HSA Dimer は Doxil[®] の腫瘍移行並びに抗腫瘍活性を有意に増強した。この現象は C26 担癌モデルのみならず Doxil[®] への治療抵抗性を示す B16F10 担癌モデルにおいても観察された²⁾。

【結論】 SNO-HSA Dimer は時間限定的な EPR 効果の増強及び腫瘍内全域への浸透性亢進を発揮することで、血管透過性の程度に依存せず、多様な剤形の高分子抗癌剤の腫瘍移行並びに抗腫瘍活性を増強することから、汎用性の高いナノ EPR 増強剤として機能することが示された。今後、抗癌剤の適応範囲拡大や副作用の低減といった治療効率の向上への貢献が期待される。

【文献】

- 1) Y. Ishima, D. Chen, J. Fang, H, et al. *Bioconjug. Chem.* **2012**, 23, 264-271.
- 2) R. Kinoshita, Y. Ishima, M. Ikeda, et al. *J Control. Release.* **2015**, in press.

炎症性腸疾患に対する一酸化炭素結合型ヘモグロビン小胞体の有用性評価

○永尾紗理¹, 田口和明², 酒井宏水³, 小田切優樹², 丸山 徹¹

¹熊本大学薬学部, ²崇城大学薬学部, ³奈良県立医科大学

【緒言】 内因・外因的に供給された一酸化炭素(CO)は、生体内において、シグナル伝達分子として機能する上に、抗炎症、抗酸化効果などの多面的な生理作用を介して生体保護作用を発揮することから、近年になり新規創薬シーズとして注目を集めている。しかしながら、ガス分子であるCOを生体内でコントロールすることは容易でなく、COの臨床使用は未だ成し遂げられていない。この課題を克服すべく、我々は、新規CO供与体として、COに高い親和性を持つヘモグロビンをリン脂質二重膜に高濃度に封入したヘモグロビン小胞体(HbV)を利用する着想に至った。そこで本研究では、HbVにCOを結合させたCO結合型HbV(CO-HbV)の新規CO供与体としての実用性を追求するために、病態の発症および進展に炎症や活性酸素が関与し、また、有効な治療薬が存在しない難治性炎症性腸疾患に対する、CO-HbVの有用性を検証した。

【方法】 マウスに2%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を7日間自由飲水させることでDSS誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスを作製し、CO-HbVの有効性および作用メカニズムについて検討した。生存率の評価においては、DSSの濃度を5%とし、観察期間終了時点まで飲水を継続させた。

【結果および考察】 DSS飲水開始2～3日後から下痢症状が観察され始め、7日後には炎症状態が完成し肉眼的血便も認められたことから、モデルの妥当性を確かめることが出来た。そこで、症状が現れ始めたDSS飲水開始3日後に、生理食塩水、HbVまたはCO-HbVを静脈内投与して治療効果を比較検討した。その結果、CO-HbV投与群において、体重減少、便の硬さ、血便の状態により評価するDisease Activity Index(DAI)スコアは有意に減少し、大腸の長さの短縮が抑制され、治療効果が認められた。この結果は、HE染色による大腸の組織学的評価の結果からも支持された。また、血便に伴う貧血症状の指標である血中の赤血球数およびヘモグロビン値の減少抑制が認められた。加えて、生存率評価の結果から、CO-HbVは有意な生存率改善効果も示した。続いて、CO-HbVの作用メカニズムの解明をCOの抗炎症および抗酸化作用に着目し、検討した。その結果、CO-HbV投与により、大腸への好中球の浸潤および血中の炎症性サイトカイン産生が抑制され、抗炎症効果が認められた。また、組織中酸化産物(ニトロチロシン)の免疫染色により、大腸組織中の酸化産物は著明に減少し、抗酸化作用も認められた。

【結論】 DSS誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスに対する有用性評価において、CO-HbVは血便や下痢などの大腸炎の症状を有意に改善し、形態学・組織学的大腸の変化も明らかに改善した。さらにCO-HbVの大腸炎の改善効果は、COの抗炎症・抗酸化作用に起因していることが示唆された。したがってCO-HbVは、潰瘍性大腸炎に対する有望な新規治療薬になり得る可能性が示された。

一般演題2-G12

横紋筋融解症誘発腎障害モデルラットに対する一酸化炭素付加赤血球の有用性評価

○大柿 滋¹, 田口和明², 異島 優¹, 渡邊博志¹, 小田切優樹², 丸山 徹¹

¹ 熊本大学薬学部, ² 崇城大学薬学部

【緒言】 横紋筋融解症(クラッシュシンドロームを含む)に伴う急性腎障害(AKI)は、ミオグロビンの漏出と虚血再灌流虚血に伴う大量の活性酸素種や炎症により惹起される予後不良な疾患であり、未だ有効な治療戦略は確立していない。最近、我々は、臓器保護因子である一酸化炭素(CO)を赤血球(RBC)に付加した CO-RBC が、抗酸化・抗炎症効果を発揮する結果、肝虚血再灌流障害に対して優れた治療効果を発揮することを見出した¹⁻²⁾。本研究では、横紋筋融解症 AKI に対する CO-RBC の有用性について評価した。

【方法】 24 時間絶水したラットに、50% グリセロール(10mL/kg)を筋肉内投与することで横紋筋融解症 AKI モデルを作製した。グリセロール投与後 3 時間目に、腎機能(BUN, Cr, CCr, 褐色尿)、酸化ストレス、炎症性サイトカイン及び生存率を評価した。クラッシュシンドロームは、既報に従いラバーバント圧迫法で作製し、5 時間後に圧迫を解除した。

【結果と考察】 グリセロール誘発横紋筋融解症及びその外傷モデルである出血性ショック併発(40%脱血+50%グリセロール処置)群では、生存率の顕著な低下が観察された。その際、腎機能が有意に低下していたことから、横紋筋融解誘発 AKI が生存率の低下に大きく寄与していることが判明した。この系に RBC を後投与しても生存率及び腎機能障害は改善しなかったが、CO-RBC 投与群では、100%の生存と腎機能の顕著な回復が観察された。また、病態群や RBC 投与群では、酸化ストレスの上昇及び炎症性サイトカインの産生が亢進していたが、CO-RBC 投与群では、両者の増加が有意に抑制されていた。同様な結果は、CO 結合型ヘモグロビン小胞体(CO-HbV)投与群でも観察することができた。このことから、CO による抗酸化・抗炎症効果が治療効果において重要な役割を果たしていることが判明した。さらに、致死性のクラッシュシンドロームモデルラットに対する CO-RBC の後投与効果を検証したところ、病態群では 9 時間以内に、RBC 投与群では 18 時間以内に全例が死亡した。対照的に、CO-RBC 投与群では、腎機能の低下が有意に抑制されており、全例が生存していた。

【結論】 優れた抗炎症・抗酸化作用を有する CO-RBC は横紋筋融解症誘発 AKI に対する新規治療薬となり得る可能性が示唆された。

【文献】

1) Ogaki S, Taguchi K, Maeda H, Watanabe H, Ishima Y, Otagiri M, Maruyama T, *Biochem Pharmacol*, **2015**, in press.

第 22 回日本血液代替物学会年次大会 協賛企業・団体ご芳名

本年次大会の開催につきましては、下記の企業、財団法人よりご支援、ご協力を
いただいております。ここに社名、法人名を記して謝意を表します。

The 22nd Annual Meeting of the SBSJ is partially supported by the following
companies and foundation.

財団法人化学及血清療法研究所

熊本国際観光コンベンション協会

熊本大学薬学部同窓会

ニプロ株式会社

久光製薬株式会社

株式会社 ファーマダイワ

(五十音順)

ヘモグロビン小胞体を用いた臓器組織灌流保存液の開発

Development of Perfusate for Tissue/Organ Preservation with Artificial Oxygen-Carrying Hemoglobin Vesicles

荒木 淳^(*)(¹), 酒井 宏水⁽²⁾, 武内 大⁽³⁾, 光嶋 勲⁽¹⁾

Jun Araki⁽¹⁾, Hiromi Sakai⁽²⁾, Dai Takeuchi⁽¹⁾, Isao Koshima⁽¹⁾

和文抄録

外傷などにより体の一部が切断されてしまった場合、可及的速やかに専門医による再接合術を受けることができれば、その術後の機能は良好に回復する。しかし、切断端の虚血時間が長くなった場合は、その生着や術後機能が著しく損なわれるばかりか、手術後の再灌流障害が重篤となり、急性腎不全から死に至る例もあり、問題となっている。これまで切断肢の保存は湿潤冷却が原則である。今回我々は、人工赤血球ヘモグロビン小胞体 (HbV) を用いて、酸素運搬能をもつ臓器組織保存液の開発を行った。Wistar ラットを全身麻酔下に、左後肢を大腿骨幹部レベルで完全切断した。大腿動脈および静脈にカニューレーションを行い、臓器保存液 ET-Kyoto と HbV を等量混合して作成した灌流液 (HbV 群) および ET-Kyoto 単体 (ETK 群) にて常温灌流した。6 時間常温灌流後、大腿動脈および静脈、大腿神経および坐骨神経を顕微鏡下で吻合し、切断肢再接合術を行った。静脈灌流液の血液ガス分析の結果、ETK 群に比べて HbV 群では組織が酸素供給を受けて好気代謝が保たれていたことを示唆した。組織学的検査では、湿潤冷却群に比べ、HbV 群では軽度、ETK 群では重度の間質性浮腫を生じた。再接合術は全例行えたが、湿潤冷却群は術後 3 日以内に四肢が壊死し、ETK 群は血流が保たれていたものの 3 日以内に死亡し、HbV 群のみが長期生着に成功し、3 か月後の歩行検査でも良好な機能回復が認められた。酸素運搬能をもつ人工赤血球を用いた四肢灌流保存法は、従来の組織保存液を用いた灌流保存や湿潤冷却法に比べて有効であることが示された。本法は自家移植のみならず、心臓・肺・肝・腎・脾臓・小腸・子宮などの同種移植にも幅広く用いることができる可能性がある。

Abstract

For managing major limb amputation, it is important to consider ischemic time and reperfusion injury by free radicals after the blood supply is reestablished. State of preservation during transplant surgery is crucial for the survival and function of the tissue, graft, or organ. In this study, we confirmed the effect of intermittent blood flow in rat ischemic hind limb and developed a new oxygenic preservation method using artificial oxygen carrying hemoglobin vesicles (HbVs). Wistar rat hind limb was performed total amputation, normothermic preservation by perfusion with extracellular-trehalose-Kyoto (ETK) solution or HbV, and microsurgical replantation of the left hind limb. Venous efflux was analyzed, the amputated limb evaluated after 6 hr perfusion, and the replantation outcome of each model was compared. Hemoglobin vesicle-treated limbs appeared to have much better oxygenation than ETK-treated limbs. Aerobic respiration remained in the amputated limb, gastrocnemius muscle was well maintained, and the overall replantation was successful in the limb preserved using HbV. These studies demonstrated that oxygenic preservation is effective for rat ischemic limb, suggesting that this method may be useful for other replantation and organ transplantation surgeries.

Keywords

Artificial oxygen carriers, Hemoglobin vesicles, Normothermic perfusion, Oxygenic preservation, Warm ischemia time

(1) 東京大学医学部形成外科 〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1 Department of Plastic Surgery, University of Tokyo Graduate School of Medicine, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-Ku, Tokyo 113-8655, Japan. E-mail: ja980079@yahoo.co.jp

(2) 奈良県立医科大学化学教室 〒634-8521 奈良県橿原市四条町 840 Department of Chemistry, Nara Medical University, 840 Shijo-cho, Kashihara, Nara, 634-8521, Japan

(3) 埼玉医科大学総合医療センター 形成外科 〒350-8550 埼玉県川越市鴨田 1981 Department of Plastic Surgery, Saitama Medical Center, Saitama Medical University, 1981 Kamoda, Kawagoe, Saitama 350-8550, Japan

論文受付 2015 年 7 月 20 日 論文受理 2015 年 8 月 17 日

1. 酸素を運搬する臓器組織灌流液の必要性

近年、移植医療の進歩により、心臓・肺・肝臓・腎臓・小腸など生命維持臓器の移植だけでなく、海外では顔面¹⁾・前腕²⁾・喉頭³⁾・子宮⁴⁾といった患者の生活の質 (Quality of Life; QOL) 向上のための移植医療が行われるようになってきている。これら移植において組織の虚血時間は術後の機能予後に大きくかわるため、良好な状態で組織を保存する方法の開発が期待されているが、現在湿潤冷却が原則である。四肢の大切断においては、虚血時間は湿潤冷却で4-6時間が限度とされており⁵⁻⁷⁾、長時間になると血管の破たんや浮腫、組織壊死に陥る⁸⁾。四肢移植においてはドナーの選択^{9,10)}、手術適応の計画^{11,12)}とともに、血液再灌流までの虚血時間が大変重要である⁸⁾。骨・腱・脂肪・皮膚は比較的長い虚血時間にも耐性があるが、筋・血管・神経などは虚血によって傷害を受けやすく、組織壊死や機能障害、あるいは再灌流障害の結果としてコンパートメント症候群をきたしやすい^{5,6,8)}。また、これらの問題を解決し、例えば再接着手術に成功したとしても、長時間に及ぶ虚血状態を経た移植片からのフリーラジカルなどの影響により、腎臓や肝臓が機能不全をきたし (虚血再灌流障害)、結果として死に至るという問題があり、移植片の保存法の改善に関する研究が期待されている。

腎臓¹³⁾や肺¹⁴⁾に対しては臓器保存液を用いた灌流保存法が行われているが、四肢の保存には使われておらず、ブタの前腕に自己血を灌流した実験的報告のみである⁸⁾。ヘモグロビン小胞体 (Hemoglobin vesicles; HbV) はリン脂質に純度の高いヒトヘモグロビンを封入させた人工酸素運搬体であり、自己血より高い酸素運搬能を持ち、代替血液としてだけでなく、臓器組織灌流保存液としての効果が期待されている¹⁵⁾。

今回我々は、人工赤血球ヘモグロビン小胞体 (HbV) と従来の臓器保存液 extracellular-trehalose-Kyoto (ETK) を用いて、酸素運搬能をもつ臓器組織保存液を作成し、ラット後肢切断、灌流、再接着モデルを用いて複合組織に対する保存効果の検討を行った。詳細については、Transplantation 誌に掲載されているので、それをご覧いただきたい (文献番号 24)。

2. 人工赤血球ヘモグロビン小胞体による臓器灌流試験

(1) 実験方法

ETK (大塚製薬製) は京都大学呼吸器外科において開発され、トレハロース、グルコン酸ナトリウムなどを含む高ナトリウム、低カリウムの細胞外液型組成で、肺、肝臓、腎臓などの保存に使われている。HbV は奈良県立医大化学教室で調製された。最終 Hb 濃度を 10 g/dL とした。ETK と 1:1 で等量混合して灌流液を作成した。

本研究では Wistar ラットを用いた。全身麻酔下に左大腿骨幹部レベルで完全切断した。4 検体は生食ガーゼに包み 4℃ で湿潤冷却保存した。残りの 8 検体は大腿動静脈をポリエチレンチューブにてカニューレションし、うち 4 検体は ETK のみを灌流し (ETK 群)、残りの 4 検体は HbV を用いて作成した灌流

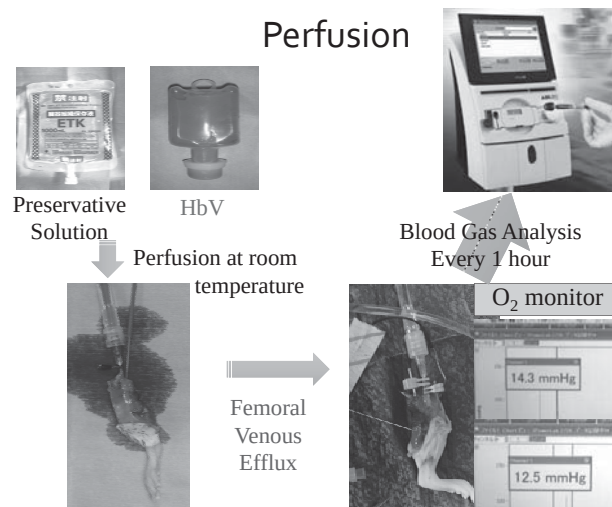


図 1. ラット大腿への灌流実験

作成された HbV 保存液および従来の組織保存液 (ETK) を、切断したラット後肢の大腿動脈より灌流する。大腿静脈からの還流液を 1 時間おきに採取し、血液ガス分析を行った。

液 (HbV 群) を灌流した。大腿静脈からの還流液を、1 時間おきに採取し、血液ガス分析を行った (図 1)。灌流中は切断肢を生食ガーゼで包み、室温浸潤に保ち、約 6 時間灌流後、再接着手術を開始した。大腿骨および大腿筋群を接合し、大腿動静脈・神経および坐骨神経を顕微鏡下に 10-0 ナイロンで吻合した。合計の虚血時間が 8 時間になるように、血液を再灌流させた。血管の開通を確認し、閉創した。ラットの頸部にエリザベスカラーを装着し、自食を防いだ。術後 7 日間、1 日 2 回の抗生物質と鎮痛薬の投与を行った。

(2) 実験結果

ETK と HbV 灌流液のそれぞれの血液ガス分析を灌流前に測定した。ETK のみで灌流した切断肢は虚血で白色であったが HbV で灌流したものは赤色であった。大腿静脈からの還流液において、酸素代謝を示す 3 つの重要な指標、PO₂、PCO₂、乳酸値を比較した。PO₂ は ETK 群では 80 mmHg 程度に維持されたが、HbV 群では 30 mmHg 程度に低下しており、統計学的に有意差を認めた。PCO₂ は、灌流後 1 時間で ETK 群が 8.2 ± 2.1 mmHg、HbV 群が 19.6 ± 10.1 mmHg であり、時間が経つごとに両方とも低下していったが、両群間に統計学的有意差は認めなかった。乳酸値は、灌流後 1 時間で ETK 群が 2.7 ± 0.3 mmHg、HbV 群が 1.8 ± 0.6 mmHg であり、時間が経つとともにともに低下した。灌流後 3 時間では有意差は認めなかったが、4~6 時間で HbV 群の方が有意に高くなった (図 2)。

4℃ で湿潤冷却保存された切断肢は、肉眼的変化および重量の増減を認めなかった。ETK 群は著名な浮腫と 130% の重量増加を認めた。HbV 群は中等度の浮腫と 110% の重量増加を認めた。腓腹筋の組織所見では、湿潤冷却に比べて、ETK 群は筋線維の委縮と著名な間質性浮腫を認めた。HbV 群では組織構造は

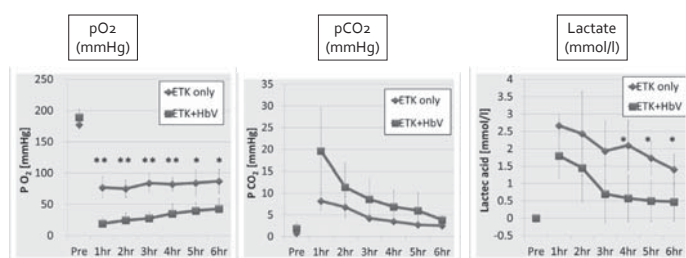


図2. 静脈還流液の血液ガス分析の結果

HbV 群では、PO₂ は低く (C), PCO₂ は高い傾向があり (D), 乳酸値は低値であり (E), 好気性代謝が保たれていることが示唆された。

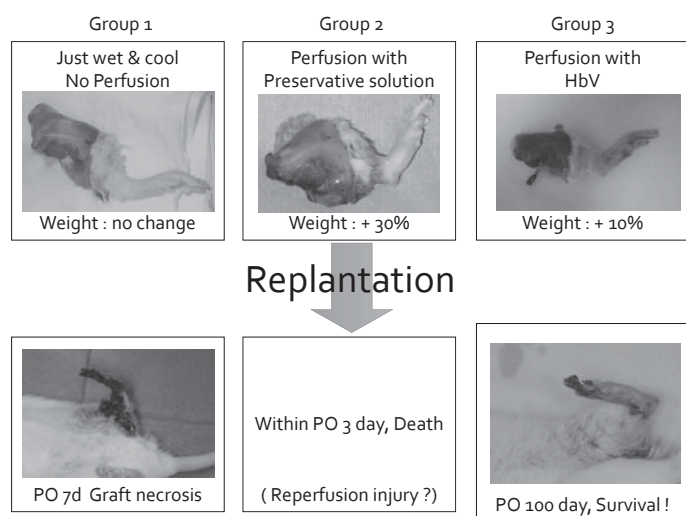


図3. ラット後肢保存後の肉眼的所見および再接着手術の結果

湿潤冷却 (4℃) で保存したものは肉眼的変化も重量増加も認めなかった。ETK により常温にて灌流保存したものは肉眼的には浮腫が強く、重量も約 130% 増加し、組織学的にも重度間質性浮腫と委縮した筋線維を認めた。HbV を用いた保存液を灌流したものは、肉眼的には軽度の浮腫を認め、重量増加は 110% であり、組織学的には筋線維の委縮や間質性浮腫は軽度であり、構造は保たれていた。再接着手術の結果、湿潤冷却群は手術直後より末梢の血液循環は不十分なようであり、術後 3 日以内に四肢壊死に陥った。ETK 群は手術後、末梢の血液循環は良さそうに見えたが、全身状態不良により術後 3 日以内に死亡した。HbV 群は末梢血液循環が非常に良好であり、全身状態も良好で、切断肢も完全に生着した。さらに術後 3 か月での歩行機能も良好で、再接着した左後肢をうまく使って歩行していた。

比較的保たれており、若干の筋線維の委縮と間質性浮腫を認めた。

全例で再接着術は完遂できた。湿潤冷却群は手術直後より末梢の血液循環は不十分なようであり、術後 3 日以内に四肢壊死に陥った。ETK 群は手術後、末梢の血液循環は良さそうに見えたが、全身状態不良により術後 3 日以内に死亡した。原因は虚血再灌流障害によるものと思われた。一方 HbV 群は末梢血液循環が非常に良好であり、全身状態も良好で、切断肢も完全に生着した。さらに術後 3 か月での歩行機能も良好で、再接着した左後肢をうまく使って歩行していた (図 3)。

3. 人工赤血球の臓器灌流液としての可能性と今後の課題

体循環による組織への酸素供給には安全域があり、実際の需要量は供給量の 4 分の 1 程度であるといわれている¹⁶⁾。この考えに沿って、十分とはいえないまでも、少しでも酸素運搬能のある保存法が組織の虚血ダメージを軽減させるのではないかと考え、本実験を施行した。四肢の保存に自己血を用いた灌流の実験は報告されているが¹⁷⁾、大量の採血を要するため、実際の臨床現場では応用がかなり限られてくる。ETK やヘモグロビンを用いた臓器保存に関しては報告があり¹⁸⁾、我々は今回 HbV を用いてラット後肢切断—灌流—再接着実験を行った。小胞体に分散させたヘモグロビンは安定性が高く、保存や血液循環にも優れていて、血液型や病原性の心配もなく、細網内皮系で代謝され、動物実験では輸血代替としての効果が示されている。そのサイズは赤血球の 8 μm に比べて、0.25 μm と小さく、微小血管を循環するのに適している¹⁵⁾。

我々はコントロールの保存液および HbV 保存液の基材として ETK を用いた。ETK による常温灌流保存は、他の University of Wisconsin 液 (UW) や intracellular-trehalose-Kyoto 液 (ITK) よりも優れているという報告がある¹⁹⁾。ETK は高ナトリウム、低カリウムの細胞外液型組成で、UW や ITK は低ナトリウム、高カリウムの細胞内液型組成である²⁰⁾。本研究では、ラット四肢大切断の再接着術を、ETK と HbV を等量混合して作成した保存液を灌流させることで、約 8 時間もの温阻血時間を克服して成功させた。虚血時間には、約 6 時間の灌流時間と、約 2 時間の再接着術が含まれた。この方法以外の、従来の湿潤冷却や ETK を単独で用いた場合では成功しなかった。これまでの報告では 4 時間の温阻血を克服したのは 10 例中たった 2 例であるため²¹⁾、本法は非常に優秀な保存法であることが分かる。しながら、今後もより保存時間を長く保存状態を良くしていくために、保存液の組成の最適化など検討すべき課題はある。

組織、臓器への酸素運搬に関しては多くの報告がある。液体 (血液) の酸素含有量は以下の等式で表すことができる²²⁾。

$$\text{酸素含有量 (mL/dL)} = \text{PO}_2 \times 0.0225 + \text{Hb} \times \text{SO}_2 \times 1.306$$

ただし PO₂ は平均酸素分圧 (20% 酸素吸入下で動脈血は 15.4 kPa), Hb はヘモグロビン濃度 (g/dL), SO₂ は酸素飽和度 (通常約 1) である。

この等式によると、赤血球のヘモグロビンがほとんど (約 99%) の酸素を持っており、残る 1% だけが組織液に溶解していることになる²³⁾。今回作成した保存液の最終ヘモグロビン濃度は 5 g/dL であり、切断肢にとって決して十分な酸素供給量ではないが、ETK 単体よりはるかに良い酸素供給ができていたと思われる。事実、切断肢からの静脈還流液の血液ガス分析によると、HbV 群では明らかに好氣的代謝が保たれており、筋組織も維持され、再接着手術も成功した。

本研究では、HbV の全身投与で通常みられる肝臓や脾臓 (細網内皮系) でのマクロファージの貪食像が、灌流後の切断肢の腓腹筋生検では見られなかった。このことは HbV がヘパリン生食による灌流にて洗い出され、組織内に残らないことを意味

する。ETKのような臓器保存液は日本では医薬品のカテゴリーに入らず、HbVの臓器保存液としての利用は、代替血液として全身投与する場合と異なりリスクもより低いと考えられ、臨床使用において重要な可能性を持つと考えられる²⁴⁾。

切断肢に対する保存法は現在、湿潤冷却が主である。酸素運搬能を持つHbVを用いたこの新しい保存法は、臨床的には切断肢だけでなく、頭皮²⁵⁾、耳²⁶⁾、鼻²⁷⁾、口唇²⁸⁾、陰茎²⁹⁾など他の再接着手術にも応用できる可能性がある。さらに、有効性と安全性が示されれば、心臓、肺、腎臓、小腸などの移植医療にも応用できる可能性がある。特に心移植に関しては虚血時間は4時間が限度とされており、現在は移植片の輸送に用いる飛行機をチャーターするなどして虚血時間短縮を図っているが、莫大な費用がかかっている。本法の応用により通常の飛行機輸送でよくなるだけでも、患者の負担は激減する。また虚血時間の関係で移植適応外となることもあり、移植医療における大きな問題であるドナー不足の解決の可能性もあり、その意義は大きい。

謝 辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）ほかの支援を受けて実施した。

参考文献

1. Siemionow M, Papay F, Alam D, Bernard S, Djohan R, Gordon C, Hendrickson M, Lohman R, Eghtesad B, Coffman K, Kodish E, Paradis C, Avery R, Fung J. Near-total human face transplantation for a severely disfigured patient in the USA. *Lancet* 2009; 18: 203-209.
2. Jones JW, Gruber SA, Barker JH, Breidenbach WC. Successful hand transplantation. One-year follow-up. Louisville Hand Transplant Team. *N Engl J Med* 2000; 343: 468-473.
3. Strome M, Stein J, Esclamado R, Hicks D, Lorenz RR, Braun W, Yetman R, Eliachar I, Mayes J. Laryngeal transplantation and 40 month follow up. *N Engl J Med* 2001; 344: 1676-1679.
4. Delaere P, Vranckx J, Verleden G, De Leyn P, Van Raemdonck D; Leuven Tracheal Transplant Group. Tracheal allotransplantation after withdrawal of immunosuppressive therapy. *N Engl J Med* 2010; 14: 138-145.
5. Steinau H-U. Limb Replantation and Postischemia Syndrome of Acute Ischemic-Induced Myopathy and Reperfusion Injury. New York: Springer Verlag 1988; 9: 33.
6. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002; 10: 620-630.
7. Muramatsu I, Takahata N, Usui M, Ishii S. Metabolic and histologic changes in the ischemic muscles of replanted doglegs. *Clin Orthop Relat Res* 1985; 196: 292-299.
8. Constantinescu MA, Knall E, Xu X, Kiermeir DM, Jenni H, Gygax E, Rieben R, Banič A, Vögelin E. Preservation of

amputated extremities by extracorporeal blood perfusion; a feasibility study in a porcine model. *J Surg Res* 2011; 171: 291-299.

9. Petruzzo P, Lanzetta M, Dubernard JM, Margreiter R, Schuind F, Breidenbach W, Noll R, Schneeberger S, van Holder C, Kaufman C, Jablecki J, Landin L, Cavadas P. The international registry on hand and composite tissue transplantation. *Transplantation* 2008; 86: 487-492.
10. Hettiaratchy S, Randolph MA, Andrew Lee WP. Long-term consideration of hand transplantation. *Transplantation* 2003; 75: 1605.
11. Atkins SE, Winterton RIS, Kay SP. Upper limb amputations: where, when and how to replant. *Curr Orthop* 2008; 22: 31-41.
12. Lloyd MS, Teo TC, Pickford MA, Arnstein PM. Preoperative management of the amputated limb. *Emerg Med J* 2005; 22: 478-480.
13. Moers C, Smits JM, Maathuis MH, Treckmann J, van Gelder F, Napieralski BP, van Kasterop-Kutz M, van der Heide JJ, Squifflet JP, van Heurn E, Kirste GR, Rahmel A, Leuvenink HG, Paul A, Pirenne J, Ploeg RJ. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med* 2009; 360: 7-19.
14. Cypel M, Yeung JC, Liu M, Anraku M, Chen F, Karolak W, Sato M, Laratta J, Azad S, Madonik M, Chow CW, Chaparro C, Hutcheon M, Singer LG, Slutsky AS, Yasufuku K, de Perrot M, Pierre AF, Waddell TK, Keshavjee S. Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation. *N Engl J Med* 2011; 364: 1431-1440.
15. Sakai H, Sou K, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Haemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers: present situation and future visions. *J Intern Med* 2008; 263: 4-15.
16. Thomas D. The physiology of oxygen delivery. *Vox Sang* 2004; 87 Suppl 1: 70-73.
17. Muller S, Constantinescu MA, Kiermeir DM, Gajanayake T, Bongoni AK, Vollbach FH, Meoli M, Plock J, Jenni H, Banič A, Rieben R, Vögelin E. Ischemia/reperfusion injury of porcine limbs after extracorporeal perfusion. *J Surg Res* 2013; 181: 170-182.
18. Yamaoka I, Kikuchi T, Arata T, Kobayashi E. Organ preservation using a photosynthetic solution. *Transplant Res* 2012; 1: 2.
19. Iwai S, Kikuchi T, Kasahara N, Teratani T, Yokoo T, Sakonju I, Okano S, Kobayashi E. Impact of normothermic preservation with extracellular type solution containing trehalose on rat kidney grafting from a cardiac death donor. *PLoS One* 2012; 7: e33157.
20. Moen J, Claesson K, Pienaar H, Lindell S, Ploeg RJ, McAnulty JF, Vreugdenhil P, Southard JH, Belzer FO. Preservation

- of dog liver, kidney and pancreas using the Belzer-UW solution with a high-sodium and low-potassium content. *Transplantation* 1989; 47: 940-945.
21. Salgado CJ, Jamali AA, Ortiz JA, Cho JJ, Battista V, Mardini S, Chen HC, Gonzales R. Effects of hyperbaric oxygen on the replanted extremity subjected to prolonged warm ischaemia. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2010; 63: 532-537.
 22. Lumb AB, Nair S. Effects of increased inspired oxygen concentration on tissue oxygenation: theoretical considerations. *Eur J Anaesthesiol* 2010; 27: 275-279.
 23. Araki J, Kato H, Doi K, Kuno S, Kinoshita K, Minoda K, Kanayama K, Yoshimura K. Application of normobaric hyperoxygenation to an ischemic flap and a composite skin graft. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2014; 2: e152.
 24. Araki J, Sakai H, Takeuchi D, Kagaya Y, Tashiro K, Naito M, Mihara M, Narushima M, Iida T, Koshima I. Normothermic preservation of the rat hind limb with artificial oxygen-carrying hemoglobin vesicles. *Transplantation* 2015; 99: 687-692.
 25. Cheng K, Zhou S, Jiang K, Wang S, Dong J, Huang W, Chang T. Microsurgical replantation of the avulsed scalp: report of 20 cases. *Plast Reconstr Surg* 1996; 97: 1099-1106.
 26. Kind GM, Buncke GM, Placik OJ, Jansen DA, D'Amore T, Buncke HJ Jr. Total ear replantation. *Plast Reconstr Surg* 1997; 99: 1858-1867.
 27. Hammond DC, Bouwense CL, Hankins WT, Maxwell-Davis GS, Furdyna J, Capraro PA. Microsurgical replantation of the amputated nose. *Plast Reconstr Surg* 2000; 105: 2133-2136.
 28. Walton RL, Beahm EK, Brown RE, Upton J, Reinke K, Fudem G, Banis J, Davidson J, Dabb R, Kalimuthu R, Kitzmiller WJ, Gottlieb LJ, Buncke HJ. Microsurgical replantation of the lip: a multi-institutional experience. *Plast Reconstr Surg* 1998; 102: 358-368.
 29. Griffiths M, Britto J, Frame J. 5-year follow-up of replantation of penis and testis in a child. *Lancet* 2003; 361: 263.

日本血液代替物学会 総会

1. 日 時：
平成26年12月 8 日（月）13：15～

2. 場 所：
中央大学理工学部 3号館 3階小ホール
〒112-8551東京都文京区春日1-13-27
3. 議 題：① 第21回年次大会の報告
② 会員動向
③ 平成25年度事業報告
④ 平成25年度会計報告
⑤ 平成26年度事業計画（経過報告）

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) 事業名 第21回日本血液代替物学会年次大会
(大会長 小松晃之)
- 2) 開催年月日 平成26年12月 8 日（月）・9 日（火）
- 3) 開催場所 東京都文京区春日1-13-27 中央大学理工学部
3号館 3階小ホール
- 4) 参加範囲 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

② 会員状況は以下の通り

- 1) 賛助会員：3 社
- 2) 正 会 員：74名
- 3) 購読会員：3 箇所

③ 平成25年度事業報告（平成25年4月1日～平成26年3月31日）
が行なわれ各々承認された。

- 1) 定期総会の開催
平成25年12月 6 日（金）奈良県新公会堂 会議室3-4にて
開催。
- 2) 第20回年次大会の開催（大会長 酒井 宏水）
平成25年12月 6 日（金）・7 日（土） 於 奈良県新公会
堂 会議室3-4
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第21巻 1号

④平成25年度収支決算報告が行なわれ承認された。

平成 25 年度会計報告
収支決算表
(自 平成25年 4 月 1 日 至 平成26年 3 月31日)
(単位:円)

収 入		支 出	
摘 要	金 額	摘 要	金 額
前 期 繰 越 金	8,433,603	会 誌 出 版 費	424,415
正 会 員 会 費	520,000	集会・委員会費	467,075
入 会 金	0	年 会 補 助 金	2,000,000
維持会員会費	2,000,000	ホームページ維持費	689,220
賛助会員会費	400,000	謝 金	184,500
購読会員会費	18,000	事務費(消耗費)	8,944
学生会員会費	0	事務費(通信費)	33,500
雑 収 入	843,095	雑 役 務 費	5,250
利 息	3,201	次 期 繰 越 金	8,404,995
計	12,217,899	計	12,217,899

※賛助会員(中外製薬株式会社)からの平成25年度会費(200,000円)の振込が平成26年4月10日であったため、平成26年度会費に繰り入れる。

⑤ 平成26年度事業（経過報告）

- 1) 定期総会の開催
平成26年12月 8 日（月）13：15～13：40
於 中央大学理工学部 3号館 3階小ホール
- 2) 第21回年次大会の開催（大会長：小松晃之）
平成26年12月 8 日（月）・9 日（火）
於 中央大学理工学部 3号館 3階小ホール
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第22巻 1号

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 武岡 真司 殿

To: Dr. Shinji Takeoka

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
〒634-8521 奈良県橿原市四条町840 奈良県立医科大学医学部化学教室内
E-mail: artificial-blood@naramed-u.ac.jp

Artificial Blood Editorial Office
The Society of Blood Substitutes, Japan
Department of Chemistry Nara Medical University
840 Shijo-cho, Kashihara, Nara 634-8521, Japan
E-mail: artificial-blood@naramed-u.ac.jp

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 Nov. 20, 2013)

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>), 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 or Artificial Oxygen Carriers. In: Winslow RM, ed. *Blood Substitutes*. London: Academic Press (Elsevier), 2006; 514-522.
4. Department of Chemistry, Nara Medical University, Japan. http://www.naramed-u.ac.jp/~chem/ENGLISH_PAGE/e_invest_blood.html (last accessed Nov. 2013)

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:

Prof Hiromi Sakai
Editor of Artificial Blood
Department of Chemistry
Nara Medical University
840 Shijo-cho, Kashihara, Nara 634-8521, Japan
E-mail : artificial-blood@naramed-u.ac.jp

投稿規定（平成25年11月20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>）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) 論文中的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. Department of Chemistry, Nara Medical University, Japan. http://www.naramed-u.ac.jp/~chem/ENGLISH_PAGE/e_invest_blood.html (last accessed Nov. 2013)

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

〒634-8521

奈良県橿原市四条町840

奈良県立医科大学化学教室内

「人工血液」編集委員長 酒井宏水 宛

E-mail: artificial-blood@naramed-u.ac.jp



中外製薬

Roche ロシュグループ



at the Front Line
CHUGAI ONCOLOGY



NEUTROGIN

遺伝子組換えヒトG-CSF製剤

生物由来製品、処方箋医薬品^{注)}

ノイトロジン[®] 注

NEUTROGIN[®]

注) 注意-医師等の処方箋により使用すること

レノグラスチム (遺伝子組換え) 製剤

薬価基準収載

50 μ g
100 μ g
250 μ g

「効能・効果」、「用法・用量」、「用法・用量に関連する使用上の注意」、
「【禁忌】を含む使用上の注意」等につきましては、添付文書をご参照下さい。
<http://www.chugai-pharm.co.jp>

(資料請求先)
製造販売元 **中外製薬株式会社**
〒103-8324 東京都中央区日本橋室町2-1-1



2015年3月作成

アニマルフリーサイトカイン

製造工程において動物由来原料を一切使用せずに大腸菌を培養し、発現させ精製したサイトカイン

コードNo.	サイトカイン名	容量
014-23961	Activin A, Human	10 μ g
010-23963	(Animal-derived-free)	1mg
028-16451	BDNF, Human	10 μ g
024-16453	(Animal-derived-free)	1mg
059-07873	EGF, Human	100 μ g
053-07871	(Animal-derived-free)	500 μ g
064-05381	basicFGF (FGF2 /bFGF), Human	50 μ g
068-05384	(Animal-derived-free)	100 μ g
060-05383		1mg
072-06101	G-CSF, Human (Animal-derived-free)	10 μ g
078-06103		1mg
197-15511	SCF, Human (Animal-derived-free)	10 μ g
193-15513		1mg
207-17581		10 μ g
201-17584	TPO, Human (Animal-derived-free)	500 μ g
203-17583		1mg
226-01781	VEGF-A ₁₆₅ , Human	10 μ g
222-01783	(Animal-derived-free)	1mg

和光純薬工業(株)では、さまざまな組換え体のサイトカインを取扱っています。この他にも各種サイトカインを多数取り揃えています。ぜひご利用ください。

インターフェロン

コードNo.	サイトカイン名	容量
092-06061	Interferon- β , Human	20 μ g
093-06111	Interferon- γ , Human	100 μ g
099-06113	(Animal-derived-free)	1mg
093-05631	Interferon- γ , Human	100 μ g
099-05633		1mg
090-06981	Interferon- γ , Mouse	100 μ g
096-06983	(Animal-derived-free)	1mg
094-04701	Interferon- γ , Mouse	100 μ g
090-04703		1mg
099-04251	Interferon- γ , Rat	100 μ g
096-05241	Interferon- λ 1, Human	20 μ g
095-05211	Interferon- λ 2, Human	20 μ g
092-05221	Interferon- λ 2, Mouse	20 μ g
095-06171	Interferon- ω , Human	100 μ g

ご購入に際し製品情報(適用法規・保管条件など)のご確認は、当社総合カタログおよび検索サイト(siyaku.com)をご参照ください。

和光純薬工業株式会社

本社：〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号
東京本店：〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号
営業所：北海道・東北・筑波・藤沢・東海・中国・九州

問い合わせ先

フリーダイヤル：0120-052-099 フリーファックス：0120-052-806

URL：http://www.wako-chem.co.jp

E-mail：labchem-tec@wako-chem.co.jp

研究機器の検索サイト「研究機器オンライン」

和研薬の研究機器オンラインが、検索しやすくなって新登場！！

研究用途に
合わせた検索も
ラクラク！

② 研究機器オンライントップへ！



リニューアル

予算申請の
金額に合わせた
検索もラクラク！



特長

- ① 予算申請に便利 → 指定範囲の金額で検索が可能に！
- ② 研究用途から機器検索 → 細胞解析・有機合成・タンパク質解析などのカテゴリ検索
- ③ あのメーカーのあの機器を → フリーワード検索やメーカー別索引も可能！
- ④ 製品情報の充実 → 各製品の仕様表が詳細になりました！

和研薬の **NEW** 研究機器オンラインは、
PC、スマートフォンやタブレット端末からアクセス！

URL <http://www.wakenyaku.co.jp/ctg/>



和研薬 研究機器

検索

編集委員

●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.23(1) 2015年9月30日発行

〒162-8480 東京都新宿区若松町2-2 Twins 2F
早稲田大学先進理工学部生命医科学専攻
生体分子集合科学／ナノ医工学研究室内
TEL & FAX (03) 5369-7324
〒634-8521 奈良県橿原市四条町840
奈良県立医科大学化学教室内
TEL & FAX (0744) 29-8810
〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7
TEL (03) 3265-8961 FAX (03) 3264-1995

ひたむきな命の頑張りに、
未来を届ける薬があります。

JB

「^{けつ}^{しやう}^{ぶん}^{えん}^{せい}^{ざい}」で、皆様のお役に立ちたいから。
日本血液製剤機構は、さらに前進していきます。

善意と医療のかけ橋



JBキャラクター
ジェイバード(JBird)です。

一般団法人
日本血液製剤機構
Japan Blood Products Organization



日本血液代替物学会
<http://www.blood-sub.jp/>