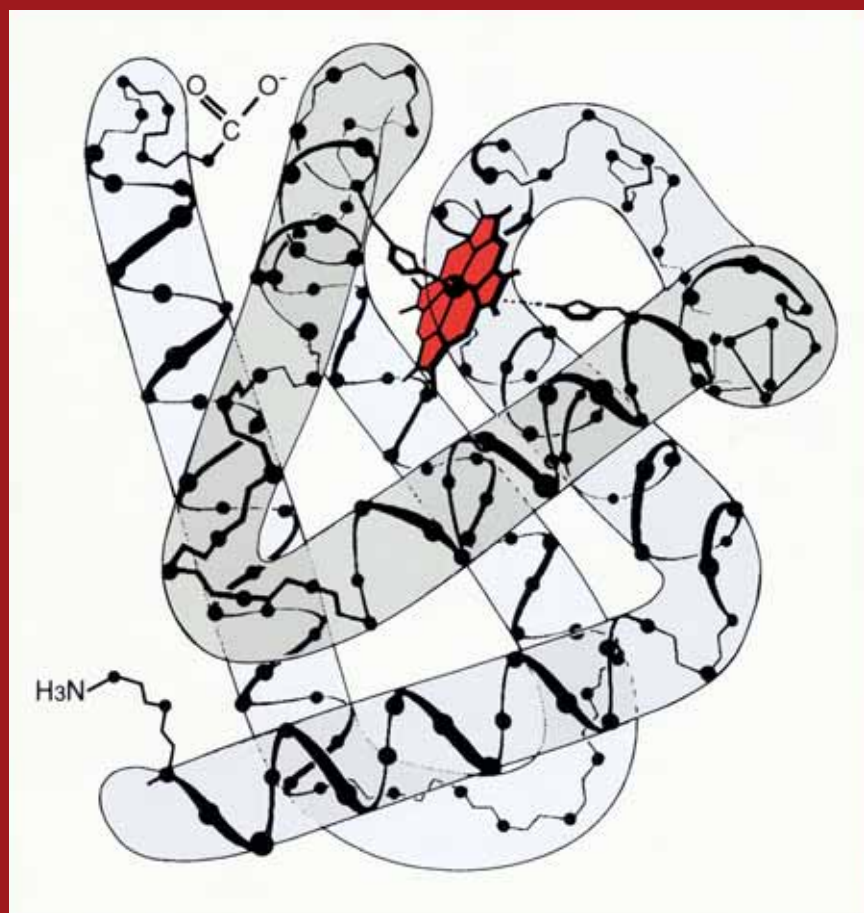


# 人工血液

VOLUME 24  
NUMBER 1  
2016

日本血液代替物学会 会誌

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



## 第23回年次大会プログラム

総説:リポソームDDSを用いた脳梗塞治療薬の開発

総説:人工酸素運搬体制剤の適正粘度

総説:人工酸素運搬体は妊娠高血圧症候群ラットモデルの胎盤低酸素・胎仔発育不全を治療する

事務局より

## The 23rd Annual Meeting Program

### Review:

Development of Neuroprotective Agents with Liposomal Drug Delivery System for the Treatment of Ischemic Stroke

### Review:

Optimal Viscosity of Artificial Oxygen Carrier

### Review:

Artificial Oxygen Carriers Rescues Placental Hypoxia and Improves Fetal Development in the Rat Pre-Eclampsia Model

# Artificial Blood

The Society of Blood Substitutes, Japan

# 善意と医療のかけ橋

善意の献血による血液製剤を通じ  
高い倫理観と使命感をもって人びとの健康に貢献します



血漿分画製剤(液状・静注用免疫グロブリン製剤)

## 献血ヴェノグロブリン®H5%静注

0.5g/10mL・1g/20mL・2.5g/50mL・5g/100mL・10g/200mL

(生物学的製剤基準 ポリエチレングリコール処理免疫グロブリン) **献血**

血漿分画製剤[静注用免疫グロブリン製剤(液状)]

## 献血ポリグロビン®N5%静注

0.5g/10mL

2.5g/50mL

5g/100mL

## 献血ポリグロビン®N10%静注

5g/50mL

10g/100mL

生物学的製剤基準「pH4処理酸性免疫グロブリン」 **献血**

血漿分画製剤(血液凝固阻止剤)

## ノイアート®静注用 500単位・1500単位

(生物学的製剤基準 乾燥濃縮人アンチトロンビンⅢ) **献血**

血漿分画製剤

## クロスエイトMC静注用 250単位・500単位 1000単位・2000単位

生物学的製剤基準「乾燥濃縮人血液凝固第Ⅷ因子」 **献血**

血漿分画製剤

## 献血アルブミン5%静注 5g/100mL 12.5g/250mL **「JB」**

## 献血アルブミン25%静注 5g/20mL 12.5g/50mL **「ベネシス」**

(生物学的製剤基準 人血清アルブミン) **献血**

## 献血アルブミン20%静注 4g/20mL 10g/50mL **「JB」**

## 赤十字アルブミン25%静注 12.5g/50mL

薬価基準収載 特定生物由来製品 処方箋医薬品 (注意・医師等の処方箋により使用すること)

※効能・効果、用法・用量、禁忌・原則禁忌を含む使用上の注意等については、添付文書をご参照ください。

製造販売元  
一般社団法人  
**JB 日本血液製剤機構**

2016年2月作成

[資料請求先]

日本血液製剤機構 くすり相談室 〒105-6107 東京都港区浜松町 2-4-1 医療関係者向け製品情報サイト <http://www.jbpo.or.jp/med/di/>

## 人工血液

第 24 巻 第 1 号 2016 年 10 月

## 第 23 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：リポソーム DDS を用いた脳梗塞治療薬の開発

..... 福田 達也 他 48

## 総説：人工酸素運搬体製剤の適正粘度

..... 高折 益彦 56

## 総説：人工酸素運搬体は妊娠高血圧症候群ラットモデルの

胎盤低酸素・胎仔発育不全を治療する

..... 太田 英伸 他 63

事務局たより

## ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 24 No. 1 October, 2016

*The 23rd 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 Neuroprotective Agents with Liposomal Drug  
Delivery System for the Treatment of Ischemic Stroke*

..... Tatsuya Fukuta, et al. 48

*Review : Optimal Viscosity of Artificial Oxygen Carrier*

..... Masuhiko Takaori 56

*Review : Artificial Oxygen Carriers Rescues Placental Hypoxia and Improves  
Fetal Development in the Rat Pre-Eclampsia Model*

..... Hidenobu Ohta, et al. 63

## 第23回日本血液代替物学会年次大会

The 23rd Annual Meeting of the Society of Blood Substitutes, Japan

『人工血液の必要性と適応 — ラボと臨床現場のクロストーク —』

大会長：木下 学（防衛医科大学校免疫微生物学講座）

会 期：2016年11月24日（木）、25日（金）

会 場：早稲田大学・西早稲田キャンパス55号館  
（東京都新宿区 大久保3丁目4-1）

【年次大会事務局】

早稲田大学 先進理工学研究科 武岡研究室内  
〒162-8480 東京都新宿区若松町 2-2 Twins  
Tel/Fax：03-5369-7324  
E-mail：sbsjms@gmail.com

---

## 大会長挨拶

この度、第23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。本邦における人工血液研究発祥の地である早稲田大学西早稲田キャンパス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。

本大会の主たる目的である「人工血液」の実用化に向けた研究は、「人工赤血球」「人工血小板」共に基礎研究をほぼ終了し、次の段階である「first in human」、すなわちヒトへの投与へと挑戦する段階に差し掛かっています。創薬におけるこの段階は「死の谷 (death valley)」とも呼ばれ、製薬化に至る過程の中でも最も厳しいと言われるステップであります。しかし、ここを乗り越えて行かなければ、人工血液研究の究極の目標であろう「社会への貢献」に繋がりません。

第23回年次大会は、これまでの血液代替物研究を振り返りつつ、臨床現場のどのような場面で人工血液が必要とされ、そのニーズを満たすには何が足りて何が足りないのかを、作る側と使う側の両方から見い出して行く議論の場にしたいと考えております。そこで今回の大会テーマを、「人工血液の必要性と適応—ラボと臨床現場のクロストーク」とさせていただきました。このような人工血液の開発には行政サイドの後押しも不可欠であります。特別講演には、厚生労働省の血液行政にも非常に詳しい国立保健医療科学院健康危機管理研究部部長の金谷泰宏先生に「血液製剤の安定的確保・供給体制の構築に向けた現状と課題」というタイトルで行政の視点から御講演をお願いしております。また、教育講演として敗血症性ショックや出血性ショックを含めたショック研究の世界的権威で先月、国際ショック学会（東京）を主催された千葉大学名誉教授の平澤博之先生、出血性ショック時にも重要となる肝臓の自然免疫研究の第一人者である防衛医科大学校関修司教授に人工血液とは少し違った角度から御講演をお願いしております。シンポジウムでは、1)「人工赤血球製剤の適応と臨床試験」、2)「人工血小板製剤の適応と臨床試験」を予定し、作る側と使う側の専門家に徹底討論して頂こうと考えております。さらに将来の関連領域の発展を考え、3)「次世代医療を支えるバイオマテリアルのイノベーション」を企画しました。また、優秀演題選考講演のセッションを設け、最優秀演題1つ、優秀演題3つを表彰致しますので、若手を始め新進気鋭の研究者の奮っての御参加をお待ちしております。

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頂きました先生方、またオーガナイザーの労をとって頂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、“人工血液研究発祥の地”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23回日本血液代替物学会年次大会  
大会長 木下 学  
(防衛医科大学校免疫微生物学講座)

## お知らせとお願い

### ■会員・参加者の皆様へ

#### ●会場

早稲田大学・西早稲田キャンパス 55 号館  
(東京都新宿区大久保 3 丁目 4-1)

#### ●受付

平成 28 年 11 月 24 日 (木) 8:30 から  
平成 28 年 11 月 25 日 (金) 8:30 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が、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\\_moushikomi.php](http://www.blood-sub.jp/kaikoku_moushikomi.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。

#### ●入会受付

受付にて日本血液代替物学会の入会手続きも行っております。  
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。

#### ●年次大会予稿集

第 23 回年次大会の予稿集 (会誌「人工血液」2016 年号に含まれる) は、発表者の方には事前送付 (郵送) させていただきますので、当日はお忘れなくお持ちください。また、複数冊ご希望の方には、年次大会受付にて一部 1,500 円で販売致します。

#### ●大会長講演と招待講演 (ランチョン形式)

大会初日の大会長講演 (11 月 24 日 (木) 11:40~12:30) と 2 日目の招待講演 (11 月 25 日 (金) 11:40~12:20) は、お弁当を用意しています。

#### ●懇親会

参加費:3,000 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 28 年 11 月 24 日 (木) 18:00 から

場所:早稲田大学理工キャンパス内ロームスクエア

### ■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

|                        |                         |
|------------------------|-------------------------|
| 大会長講演                  | 50 分                    |
| 特別講演                   | 50 分                    |
| 教育講演                   | 50 分                    |
| 招待講演（ランチョン形式）          | 40 分                    |
| シンポジウム講演               | 各オーガナイザーに一任             |
| 会長賞選考講演                | 発表 10 分 + 質疑 5 分 計 15 分 |
| 特別セッション ‘Cutting Edge’ | 発表 12 分 + 質疑 5 分 計 17 分 |

演題数との関係で若干時間配分が変更になることもございます。  
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。

#### ■会長賞

本年次大会では「会長賞」を設けて、発表演題の中から最優秀演題 1 題、優秀演題 3 題を顕彰します。

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を有すると期待されるもの。

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 28 年 11 月 24 日（木）11：40～12：10  
（早稲田大学・西早稲田キャンパス 55 号館 S 棟 2 階第 2 会議室）
- 評議員会：平成 28 年 11 月 24 日（木）12：10～12：40  
（早稲田大学・西早稲田キャンパス 55 号館 S 棟 2 階第 2 会議室）
- 総 会：平成 28 年 11 月 24 日（木）12：40～13：10  
（大会会場）

#### ■大会事務局

早稲田大学 先進理工学研究科 武岡研究室内  
〒162-8480 東京都新宿区若松町 2-2 Twins  
Tel/Fax：03-5369-7324  
E-mail：sbsjms@gmail.com

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 28 年 11 月 24 日 (木)                                                                                                                                                                                                                    |                                             | 平成 28 年 11 月 25 日 (金)                                                                                                                                                                                                  |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 8:00  |                                                                                                                                                                                                                                          |                                             |                                                                                                                                                                                                                        |    |
| 8:30  | 8:30 ~                                                                                                                                                                                                                                   | 受付                                          | 8:30 ~                                                                                                                                                                                                                 | 受付 |
| 9:00  |                                                                                                                                                                                                                                          |                                             |                                                                                                                                                                                                                        |    |
| 9:30  | 9:25~9:30 開会の辞<br>9:30~11:30 シンポジウム 1<br>「人工赤血球製剤の適応と臨床試験」<br>オーガナイザー：<br>高折益彦(川崎医科大学)<br>高瀬凡平(防衛医科大学校)<br>演者：<br>S1 酒井宏水(奈良県立医科大学)<br>S2 河野光智(東海大学)<br>S3 照井克生(埼玉医科大学総合医療センター)<br>S4 田中良弘(防衛医科大学校)<br>S5 増野智彦(日本医科大学)<br>S6 高須 修(久留米大学) |                                             | 9:30~11:30 シンポジウム 2<br>「人工血小板製剤の適応と臨床試験」<br>オーガナイザー：<br>武岡真司(早稲田大学)<br>萩沢康介(防衛医科大学校)<br>演者：<br>S7 萩沢康介(防衛医科大学校)<br>S8 丸山 徹(熊本大学)<br>S9 小倉崇以(前橋赤十字病院)<br>S10 三池 徹(佐賀大学)<br>S11 石倉宏恭(福岡大学)                               |    |
| 10:00 |                                                                                                                                                                                                                                          |                                             |                                                                                                                                                                                                                        |    |
| 10:30 |                                                                                                                                                                                                                                          |                                             |                                                                                                                                                                                                                        |    |
| 11:00 |                                                                                                                                                                                                                                          |                                             |                                                                                                                                                                                                                        |    |
| 11:30 | 11:30~11:40 休憩<br>11:40~12:30 大会長講演(ランチョン形式)<br>「出血性ショックなど侵襲時の免疫不全病態について」<br>演者：木下 学(防衛医科大学校)<br>座長：齋藤大蔵(防衛医科大学校)                                                                                                                        | 理事会：<br>11:40~12:10<br>評議員会：<br>12:10~12:40 | 11:30~11:40 休憩<br>11:40~12:20 招待講演(ランチョン形式)<br>「‘さらさら血液’を考える」<br>演者：高折益彦(川崎医科大学)<br>座長：木下 学(防衛医科大学校)                                                                                                                   |    |
| 12:00 |                                                                                                                                                                                                                                          |                                             | 12:20~12:30 休憩                                                                                                                                                                                                         |    |
| 12:30 | 12:40~13:10 総会                                                                                                                                                                                                                           |                                             | 12:30~13:20 教育講演 2<br>「若き研究者のためのショックの病態と治療序論」<br>演者：平澤博之(千葉大学)<br>座長：木下 学(防衛医科大学校)                                                                                                                                     |    |
| 13:00 | 13:10~14:00 教育講演 1<br>「免疫臓器としての肝臓：免疫と代謝との融合に向けて」<br>演者：関 修司(防衛医科大学校)<br>座長：東 寛(旭川医科大学)                                                                                                                                                   |                                             | 13:20~13:30 休憩                                                                                                                                                                                                         |    |
| 13:30 |                                                                                                                                                                                                                                          |                                             | 13:30~14:20 特別講演<br>「血液製剤の安定的確保・供給体制の構築に向けた現状と課題」<br>演者：金谷泰宏(国立保健医療科学院)<br>座長：半田 誠(慶應義塾大学)                                                                                                                             |    |
| 14:00 | 14:00~14:10 休憩<br>14:10~16:50 会長賞選考講演<br>座長：<br>酒井宏水(奈良県立医科大学)<br>丸山 徹(熊本大学)<br>演者：<br>Y1 月花正幸(北海道大学)<br>Y2 横幕恭子(中央大学)<br>Y3 山岸健人(早稲田大学)<br>Y4 山田孫平(奈良県立医科大学)<br>Y5 柳澤洋輝(熊本大学)                                                           |                                             | 14:20~14:30 休憩                                                                                                                                                                                                         |    |
| 14:30 |                                                                                                                                                                                                                                          |                                             | 14:30~16:30 シンポジウム 3<br>「次世代医療を支えるバイオマテリアルのイノベーション」<br>オーガナイザー：<br>小松晃之(中央大学)<br>守本祐司(防衛医科大学校)<br>演者：<br>S12 野本貴大(東京工業大学)<br>S13 竹内俊文(神戸大学)<br>S14 鈴木 亮(帝京大学)<br>S15 宮田昌悟(慶應義塾大学)<br>S16 藤枝俊宣(早稲田大学)<br>S17 秋山元英(中央大学) |    |
| 15:00 |                                                                                                                                                                                                                                          |                                             |                                                                                                                                                                                                                        |    |
| 15:30 | 15:30~15:40 (休憩)                                                                                                                                                                                                                         |                                             |                                                                                                                                                                                                                        |    |
| 16:00 | Y6 西脇圭亮(早稲田大学)<br>Y7 岩崎 瞳(中央大学)<br>Y8 Bi Jing(熊本大学)<br>Y9 峯岸彩夏(同志社大学)<br>Y10 多喜川真人(早稲田大学)                                                                                                                                                |                                             |                                                                                                                                                                                                                        |    |
| 16:30 |                                                                                                                                                                                                                                          |                                             | 16:30 閉会の辞                                                                                                                                                                                                             |    |
|       | 16:50~17:00 休憩                                                                                                                                                                                                                           |                                             |                                                                                                                                                                                                                        |    |
| 17:00 | 17:00~18:00 特別セッション ‘Cutting Edge’<br>座長：小田切優樹(崇城大学)<br>G1 丸山 徹(熊本大学)<br>G2 酒井宏水(奈良県立医科大学)<br>G3 東 寛(旭川医科大学)<br>G4 橋本賢一(防衛医科大学校)                                                                                                         |                                             |                                                                                                                                                                                                                        |    |
| 17:30 |                                                                                                                                                                                                                                          |                                             |                                                                                                                                                                                                                        |    |
| 18:00 | 18:00~20:00 懇親会(会長賞発表)                                                                                                                                                                                                                   |                                             |                                                                                                                                                                                                                        |    |

# 交通案内

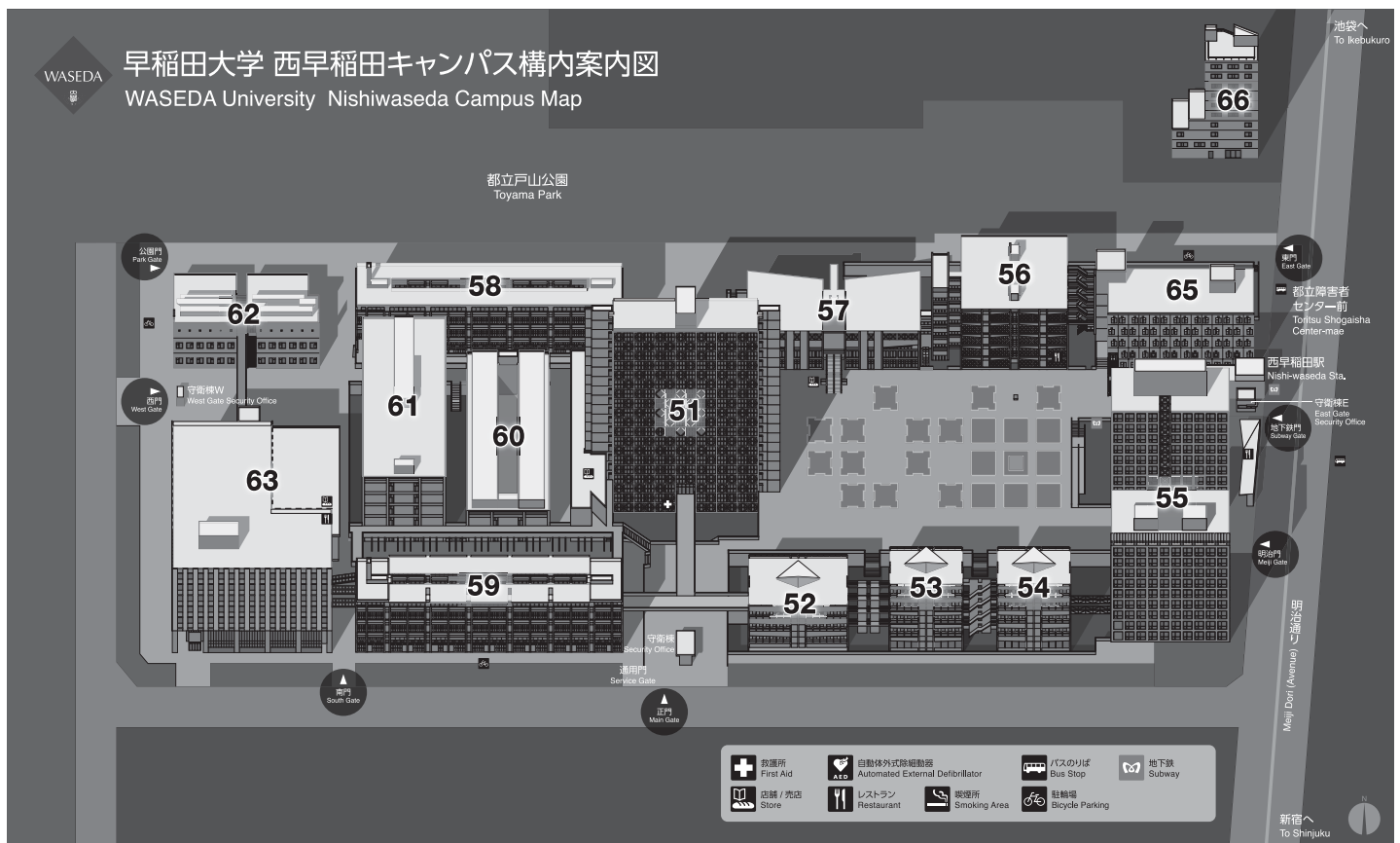
## 早稲田大学西早稲田キャンパス 55 号館への交通アクセス

|     |           |                    |
|-----|-----------|--------------------|
| 電車で | JR 山手線    | 高田馬場駅から徒歩 15 分     |
|     | 西武新宿線     | 高田馬場駅から徒歩 15 分     |
|     | 東京メトロ副都心線 | 西早稲田駅に直結           |
|     | 東京メトロ東西線  | 早稲田駅から徒歩 22 分      |
| バスで | 都バス       | 新宿駅西口—早稲田、早大理工前バス停 |
|     |           | 高田馬場駅—九段下、早大理工前バス停 |

## 早稲田大学西早稲田キャンパス構内案内図

住所：〒169-8555

東京都新宿区大久保 3 丁目 4-1



## 第1日目 平成28年11月24日(木)

9:25~9:30 開会の辞

9:30~11:30 シンポジウム1「人工赤血球製剤の適応と臨床試験」

オーガナイザー：高折 益彦（川崎医科大学）、高瀬 凡平（防衛医科大学校）

- 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.「ラット肺切除周術期出血における高酸素親和型ヘモグロビン小胞体投与の効果」  
河野 光智（東海大学医学部）
- S3.「産科出血による母体死亡の現状と人工赤血球への期待」  
照井 克生（埼玉医科大学総合医療センター）
- S4.「出血性ショックに対する人工酸素運搬体（Liposome hemoglobin）による治療」  
田中 良弘（防衛医科大学校）
- S5.「出血性ショック患者に対する人工赤血球投与の効果と問題点」  
増野 智彦（日本医科大学）
- S6.「救命救急センター搬入外傷例からみた人工赤血球の適応に関する考察」  
高須 修（久留米大学医学部）

11:30~11:40 休憩

11:40~12:30 大会長講演（ランチョン形式）

「出血性ショックなど侵襲時の免疫不全病態について」

木下 学（防衛医科大学校）

座長：齋藤 大蔵（防衛医科大学校）

11:40~12:10 理事会（早稲田大学・西早稲田キャンパス 55号館 S棟 2階第2会議室）

12:10~12:40 評議員会（早稲田大学・西早稲田キャンパス 55号館 S棟 2階第2会議室）

12:40~13:10 総会（大会会場）

13:10~14:00 教育講演1

「免疫臓器としての肝臓：免疫と代謝との融合に向けて」

関 修司（防衛医科大学校）

座長：東 寛（旭川医科大学）

14:00~14:10 休憩

14:10~16:50 会長賞選考講演

座長：酒井 宏水（奈良県立医科大学）

丸山 徹（熊本大学薬学部）

Y1.「人工酸素運搬体 HemoAct™ を用いた脳虚血再灌流障害に対する脳保護療法」

月花 正幸（北海道大学医学部）

Y2.「イヌ用・ネコ用人工酸素運搬体（HemoAct-C™, HemoAct-F™）の開発」

横幕 恭子（中央大学理工学部）

Y3.「柔軟性と密着性を有する高分子ナノシート型電極を用いた生体信号計測技術の開発」

山岸 健人（早稲田大学大学院先進理工学研究科）

Y4.「ヘモグロビンのメト化を抑制する機能を有する人工赤血球」

山田 孫平（奈良県立医科大学）

Y5.「非アルコール性脂肪性肝疾患に対する一酸化炭素デリバリーの有用性評価」  
柳澤 洋輝（熊本大学薬学教育部）

15:30~15:40 休憩

Y6.「皮膚欠損治療に向けた幹細胞担持多孔質ナノシートの開発」  
西脇 圭亮（早稲田大学大学院先進理工学研究科）

Y7.「ラット 20%血液交換モデルを用いた HemoAct™ の安全性評価」  
岩崎 瞳（中央大学理工学部）

Y8.「腎線維化マウスに対するビタミン D 受容体活性化剤とビタミン A 誘導体の治療効果」  
Bi Jing（熊本大学薬学教育部）

Y9.「血中に存在する内因性 CO の選択的除去により引き起こされる生体内反応」  
峯岸 彩夏（同志社大学理工学部）

Y10.「人工血小板 H-12(ADP)liposomes を用いた蘇生輸血の止血救命効果の評価」  
多喜川 真人（早稲田大学大学院先進理工学研究科）

16:50~17:00 休憩

17:00~18:00 特別セッション 'Cutting Edge'

座長：小田切 優樹（崇城大学薬学部）

G1.「クラッシュ症候群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」  
丸山 徹（熊本大学薬学部）

G2.「赤血球の解糖系が産生する電子エネルギーの活用による人工赤血球（ヘモグロビン ベシクル）の機能持続効果」  
酒井 宏水（奈良県立医科大学）

G3.「リポソームにより誘導される抑制マクロファージの機能解析」  
東 寛（旭川医科大学）

G4.「人工酸素運搬体の心筋活動電位不均一性と致死性不整脈誘発に及ぼす影響：Optical mapping 法を用いた出血性ショック心臓蘇生後における実験的検討」  
橋本 賢一（防衛医科大学校）

18:00~20:00 懇親会（会長賞発表）（早稲田大学理工キャンパス内ロームスクエア）

## 第2日目 平成28年11月25日(金)

- 9:30~11:30 シンポジウム2「人工血小板製剤の適応と臨床試験」  
オーガナイザー：武岡 真司（早稲田大学理工学術院）、萩沢 康介（防衛医科大学校）  
S7.「大量出血性凝固障害を H12-ADP-liposome で制御する ―最適の病院前治療に向けて―」  
萩沢 康介（防衛医科大学校）  
S8.「人工血小板 H12(ADP)リボソームの前臨床段階における体内動態特性と臨床試験にむけた課題」  
丸山 徹（熊本大学薬学部）  
S9.「Traumatic Bleeding Severity Score (TBSS) の開発：大量輸血療法の適応と血液代替物」  
小倉 崇以（前橋赤十字病院高度救命救急センター集中治療科・救急科）  
S10.「救急医における人工血小板への期待」  
三池 徹（佐賀大学医学部附属病院高度救命救急センター）  
S11.「救命率向上を目指した重傷外傷患者に対する人工血小板の可能性」  
石倉 宏恭（福岡大学病院救命救急センター）

11:30~11:40 休憩

- 11:40~12:20 招待講演（ランチョン形式）  
「さらさら血液」を考える  
高折 益彦（川崎医科大学）  
座長：木下 学（防衛医科大学校）

12:20~12:30 休憩

- 12:30~13:20 教育講演2  
「若き研究者のためのショックの病態と治療序論」  
平澤 博之（千葉大学、東千葉メディカルセンター）  
座長：木下 学（防衛医科大学校）

13:20~13:30 休憩

- 13:30~14:20 特別講演  
「血液製剤の安定的確保・供給体制の構築に向けた現状と課題」  
金谷 泰宏（国立保健医療科学院）  
座長：半田 誠（慶應義塾大学医学部）

14:20~14:30 休憩

- 14:30~16:30 シンポジウム3「次世代医療を支えるバイオマテリアルのイノベーション」  
オーガナイザー：小松 晃之（中央大学理工学部）、守本 祐司（防衛医科大学校）  
S12.「酸応答性無機有機ハイブリッド型光増感剤デリバリーシステム」  
野本 貴大（東京工業大学化学生命科学研究所）  
S13.「血中タンパク質を捕捉して高い血中循環性を示す分子インプリントナノキャリア」  
竹内 俊文（神戸大学工学研究科）  
S14.「心血管疾患をターゲットとしたリボソーム製剤の開発」  
鈴木 亮（帝京大学薬学部）  
S15.「工学的アプローチによる細胞ソーティング」  
宮田 昌悟（慶應義塾大学理工学部）  
S16.「血小板代替物研究から生まれた医療材料：医療用ナノシート（ナノ絆創膏）の開発」  
藤枝 俊宣（早稲田大学高等研究所、JST さきがけ）  
S17.「がん治療用光増感剤としてのアルブミン-金属ポルフィリン錯体の開発」  
秋山 元英（中央大学理工学部）

16:30 閉会の辞

### 出血性ショックなど侵襲時の免疫不全病態について

木下 学

防衛医科大学校 免疫微生物学講座  
manabu@ndmc.ac.jp

将来のヒト臨床において人工赤血球や人工血小板を使うであろう状況としては、やはり出血性ショック患者の救命蘇生にこれらを輸血する場合が最も考えられる。しかしながら、出血性ショックに陥るような大量出血などの重篤な侵襲病態では、生体は細胞免疫や液性免疫が低下する免疫不全状態を呈することが分かって来た。人工赤血球や人工血小板は当然ながら生体にとっては本来の赤血球や血小板とは全く違う異物であり、健全な生体では異物認識機構が適切に働くことで細網内系により排除されてしまう。リボゾーム表面に付ける polyethylene glycol (PEG) 鎖の改良などで異物反応は大幅に改善されているが、人工赤血球や人工血小板を投与する際には生体の免疫応答には十分注意を払う必要がある。

一方、出血性ショックのような重度侵襲下にある生体では細胞性免疫や液性免疫などの生体防御能が低下することから、人工赤血球や人工血小板といった異物の除去にも重度侵襲が重大な影響を及ぼすことが容易に想像できる。非感染性の最も重篤な侵襲モデルとして熱傷モデルがよく利用されるが、私達はこの熱傷モデルのマウスを用いて、細菌感染時の免疫能に重度侵襲が及ぼす影響を研究してきた。熱傷マウスでは熱傷直後より IFN- $\gamma$  産生に代表される細胞性免疫応答が低下し、マクロファージによる異物貪食能も低下する。細胞性免疫能は熱傷後 7 日目に最も低下しその後回復していく。抗体産生に代表される液性免疫も熱傷直後から 7 日目にかけて徐々に低下して行く。この際に産生が低下していく抗体は、とくに抗原がないのに生体内に存在する自然抗体と呼ばれるもので抗原非特異的な抗体である。すなわち、生体にとって初めての異物であっても反応する抗体である。一方、好中球は熱傷刺激によって過剰に活性化し活性酸素産生能は亢進する。しかし貪食能や殺菌能はむしろ減弱するため好中球免疫能も減弱すると考えられる。好中球の産生する活性酸素は正常時には異物の貪食処理に貢献するが、熱傷後に過剰産生される好中球の活性酸素はもっぱら臓器傷害に働く。

このように熱傷などの重度侵襲時には細胞性免疫や液性免疫、好中球免疫などが同時に低下する複合免疫不全の病態を呈し、この免疫不全病態は侵襲直後よりもむしろ 5~7 日後に最もひどくなる。出血性ショック患者の病態もこのように異物処理能が極端に低下していることが考えられるため、実験動物で人工赤血球や人工血小板を投与し様々な検討を行う場合も、この侵襲後の免疫不全病態、すなわち異物処理能の低下を十分念頭に置く必要がある。また、出血性ショックにより免疫能が低下している生体に、さらに異物の大量負荷を与えることによる免疫不全の重篤化にも十分に注意する必要があると考える。

## 特別講演

### 血液製剤の安定的確保・供給体制の構築に向けた現状と課題

金谷泰宏

国立保健医療科学院 健康危機管理研究部

血液製剤は、輸血用血液製剤と血漿分画製剤に区分され、人体から採取された血液を原料とするという性質上、有限で貴重なものであると同時に、血液を介して感染する病原体が混入するリスクを完全には否定できないという特徴を有している。このため、「安全な血液製剤の安定供給の確保等に関する法律」は、血液製剤の特殊性に鑑み、①安全性の向上、②国内自給の原則、安定供給の確保、③適正使用の推進、④公正の確保及び透明性の向上を法の基本理念としている。とりわけ血漿分画製剤は、止血・凝固領域に関する緊急性の高い病態及び慢性疾患の治療に不可欠な生物由来製剤であり、その安定供給は、国内では安定した献血者の確保、不足する部分については海外からの安定供給、貯留保管、製造体制の確保、国内血漿分画製剤事業者の製造規模・能力、バッグなど素材メーカーの供給体制、医療機関への確実な搬送などの一連のサプライチェーンが有機的に機能することで確保される。すなわち、一連の過程の如何なる部分が欠落しても血漿分画製剤の安定的確保や安定供給は望めない。先般、国内メーカーが、承認書とは異なる製造方法によって製造された血漿分画製剤を販売したことで、出荷停止の処分を受けたところであるが、出荷停止になった製剤の中には代替が利かない製剤が含まれるなど、国民の生命を脅かす事態に発展しかねない事態が発生した。また、過去においては、海外メーカーの遺伝子組換え型 FVIII 製剤のわが国への製剤輸出が停止したことにより、国内で必要な FVIII 製剤が品薄になるという事態も発生している。徐々に遺伝子組換え製剤への切り替えが進んでいるものの、一部の希少疾患患者向けの製剤については、企業としての社会的責任に基づいて製造されていることもあり、安全性を含めより高い開発コストが求められる遺伝子組換え製剤への切り替えを進めていくことは難しい。その意味で、血漿の確保、血漿分画製剤の製造工程、原材料の輸送および製品の流通の工程において、自然災害および人為的災害がもたらす影響を考慮し、血漿分画製剤の供給体制が有する脆弱性について、製剤別、工程別にその脆弱性を明らかにした上で、箇々の脆弱性をカバーする対策について検証することが急務である。我々は、これらの血漿分画製剤毎の脆弱性の検証を進めており、本講演では、検討の現状について報告を行う。

### 免疫臓器としての肝臓：免疫と代謝との融合に向けて

関 修司

防衛医科大学校 免疫・微生物学講座  
btraums@ndmc.ac.jp

肝臓は生後も重要な免疫臓器であり、Natural Killer T(NK)細胞、NKT細胞、マクロファージ(Kupffer細胞)などの自然免疫担当細胞を豊富に有する。生体に侵入した細菌の80%は肝臓に集積しKupffer細胞(K細胞)により処理されること、肝臓は補体や急性期蛋白を産生することは以前から知られている。しかし、それぞれの自然免疫担当細胞の免疫能や相互作用についての詳細は不明であった。私たちの研究は肝臓のNKT細胞の発見とその抗腫瘍機能の同定から始まり、以降、肝臓の時に予想外な免疫の世界に魅了されてきた。本講演では、肝臓の免疫能について以下の4点に関して解説したい。

#### 1. NKT細胞の抗腫瘍免疫、急性肝傷害における役割

NKT細胞はIL-12より活性化され肝臓への腫瘍の転移を抑制する一方、TNF(tumor necrosis factor)により活性化しFas-ligand(FasL)を表出し、TNF/FasL/Fas経路により肝傷害や多臓器不全を誘導する。NKT細胞の2面性である。

#### 2. 2種類のK細胞とその機能の同定

F4/80+K細胞には卵黄嚢由来で活性酸素産制と貪食細菌能を主体とする肝固有のK細胞(CD68+)と、骨髄由来で炎症性サイトカイン産生(IL-12,TNF)を主体として抗腫瘍免疫と炎症に関与する遊走K細胞(CD11b+)の2種類がある。すなわち、固有K細胞は細菌感染防御を、遊走K細胞は抗腫瘍免疫を担い明確に役割を分担している。なお、前者は放射線抵抗性でclodronate liposome感受性、後者は放射線感受性でclodronate liposome抵抗性である。

#### 3. 遊走Kupffer細胞と急性肝障害、NASH(非アルコール性脂肪性肝炎)

四塩化炭素による急性肝傷害と、FGF5欠損マウスにおいて高脂肪食により発症するNASH様肝病変は、遊走K細胞の産生するTNFとFASLが関与する。遊走K細胞の負の側面である。FGF5欠損マウスNASHモデルでは、低線量放射線照射(1Gy)の間欠投与により遊走K細胞が減少し、なんら明らかな副作用も無く劇的に改善する。

#### 4. Resveratrol(RSV)による固有K細胞の活性化と脂肪肝の改善

マウスに高脂肪食を摂取させると脂肪肝となるが、ポリフェノールの一種であるRSVを添加すると脂肪滴を含有する固有K細胞が増殖し、逆にTNF産生遊走K細胞が減少し脂肪肝が改善する。すなわち、固有K細胞の貪食殺菌能と脂肪の飲食消化能は表裏一体であり、肝の免疫と代謝の全体像を明らかにすることが、生活習慣病の治療戦略に結びつくものと大いに期待される。

### 若き研究者のためのショックの病態と治療序論

平澤博之

千葉大学 / 東千葉メディカルセンター  
hhirasawa@faculty.chiba-u.jp

ショックに関する研究は、敗血症性ショックに関する研究を中心にここ 20 年間で著しい進歩をとげた。本教育講演では、血液代替物に関する研究に勤しんでいる若い研究者を対象として、ショックの病態と治療につき解説したい。まずショックの定義そのものが、2006 年の国際コンセンサスカンファレンスを契機に大きく変わった。そのカンファレンスの報告書には以下の 3 点 すなわち、1) ショックの定義に低血圧は不要である。2) 生理的な検査で組織還流が不適切であることを証明するのが重要である。3) ショック診断のためのバイオマーカーとして最も重要なのは血中乳酸値であると、記載されている。すなわちショックとは単に低血圧ではなく、組織還流不全により引き起こされる組織酸素代謝の失調としてとらえるべきであり、血圧ではなく血中乳酸値で診断すべきであると提唱したものである。この提案はその後のショックの臨床に大きな影響を与え、敗血症性ショックの世界的なスタンダードとなっている Surviving Sepsis Campaign Guidelines においても、ショックにおける循環管理のエンドポイントは、血中乳酸値を正常域に戻すことであると明記されている。

この観点より血液代替物がショックの治療においてどのような効果を発揮するかを考えてみたい。ショックはその循環動態により、心原性ショック、循環血液量減少性ショック、血管閉塞性ショック、血流量分布不均衡性ショックに分類されるが、血液代替物が活躍するのは当然ながら循環血液量減少性ショックであり、さらに循環血液量減少性ショックには全血が減少する場合と脱水などにより血漿成分が減少する場合があるが、前者の場合である。しかし酸素運搬能を十分に維持するほどの酸素運搬体すなわち人工赤血球が輸注されたとしても、血流が組織まで到達するのか、組織へ適切に酸素を供給して呉れる(手渡して呉れる)のか、さらには組織細胞が供給された酸素を十分に利用出来るのかなども考慮する必要がある。すなわち血液代替物による酸素運搬能の維持は循環血液量減少性ショックの治療における必要条件のひとつであり、重要な因子ではあるが、十分条件ではないということも理解しておくべきであり、その有効性に関してはやはり血中乳酸値を用いて論ずべきである。

#### 【文献】

- 1) Antonelli M, Levy M, Andrews PJD, et al: Hemodynamic monitoring in shock and implications for management. International Consensus Conference, Paris, France, 27-28, April 2006. Intensive Care Med 33:575-590, 2007
- 2) Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al: Surviving sepsis campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock. 2012. Crit Care Med 2013;41:580-637
- 3) 平澤博之: 敗血症の病態生理と診療の最近の話題. 日本腹部救急医学会雑誌 2014;34:815-22
- 4) Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al: The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). JAMA 2016;315:801-10

## 招待講演

### 「さらさら血液」を考える

高折益彦

川崎医科大学名誉教授

最近は血液のサラサラ化がメタボリックシンドローム予防、治療に大切であると云われている。しかし1950～1970頃にも血液のさらさら化が強調されたことがあった。すなわちショック時には血液 pH の低下とともに赤血球の凝集、血液の泥化(sludging)により末梢微小循環不全をきたし、組織の酸素代謝が障害される。そのためには①赤血球の凝集を抑え②末梢微小循環の血流量を増加させる治療法が用いられた。当時、赤血球の凝集、血流の泥化のためには低分子デキストランが用いられた。一方、血液希釈によって微小循環での血流速度を高め、赤血球の凝集を解消し、かつ末梢循環量、ひいては酸素運搬量も増加させることが流行した。すなわち心筋を含む虚血組織への血流改善、あるいは体外循環時の末梢循環改善、凍傷治療、移植皮膚の生着率の向上、難治性皮膚潰瘍治療などに血液希釈が利用された。しかし血液希釈は酸素運搬に必要なヘモグロビン量の低下を来すので当然その程度には限界が生じた。また血液粘度の低下から心筋への血流量低下、末梢微小血管の虚脱も生じさせた。現在我が国で開発されている人工酸素運搬体製剤の粘度は細胞型人工酸素運搬体製剤で 3.8centipoise、非細胞型人工酸素運搬体製剤で 2.8centipois であって対照とした血液の粘度よりは低値である。したがってこれらの製品を大量に使用した場合には上述の末梢組織での血流不全を来す可能性がある。しかし実地臨床での人工酸素運搬体製剤の使用量は出血傾向発生の回避の面から 20～25 ml/kg・day に制限されると思われ、このような循環系への好ましからざる影響は実際には生じないものと予測される。それ故に現在我が国で開発が進められている人工酸素運搬体製剤はその粘度の面からみて臨床的に安全であると思われる。

## 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<sup>1</sup>, 小田切優樹<sup>2</sup>, 東 寛<sup>3</sup>, 木下 学<sup>4</sup>, 高瀬凡平<sup>4</sup>, 河野光智<sup>5</sup>, 岩本美智子<sup>6</sup>, 堀之内宏久<sup>7</sup>, 高折益彦<sup>8</sup>, 小林絃一<sup>9</sup>

<sup>1</sup> 奈良県立医科大学, <sup>2</sup> 崇城大学薬学部, <sup>3</sup> 旭川医科大学, <sup>4</sup> 防衛医科大学校, <sup>5</sup> 東海大学医学部, <sup>6</sup> 四街道徳洲会病院, <sup>7</sup> さいたま市立病院, <sup>8</sup> 川崎医科大学, <sup>9</sup> 慶應義塾大学

hirosakai@naramed-u.ac.jp

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。人工赤血球(Hb-V)は、酸素を結合する蛋白質 Hb 約 3 万個を脂質膜で包んだ小球粒子(直径: 約 250-280nm)である。その濃厚分散系(占有体積 40%, [Hb]=10 g/dL)の特徴は、a) 血液型が無い、b) ウィルスなど感染源を排除、c) 室温で 2 年以上の備蓄が可能、d) 大量投与しても代謝系を経て分解排泄される、e) 血漿中に均一に分散し、赤血球が到達し得ない末梢組織にも酸素を供給する、更に f) 出血性ショック蘇生液、臓器灌流液として、優れた効能を示す(*Crit Care Med* 2004; *J Intern Med* 2008; *Shock* 2012; *Transplantation* 2015; *Sci Rep* 2015, ほか)。北米で展開された修飾 Hb(分子内架橋、重合体)は、血管内皮由来弛緩因子(NO)を捕捉し、血管収縮や血管損傷などを引き起こす(Natanson et al, *JAMA* 2008; 299:2304-12)。g) 対して HbV は、本来毒性をもつ Hb 分子を脂質膜で覆うことで、Hb の副作用を回避できる(*J Biol Chem* 2008 ほか)。

これまでに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。2015 年 4 月 1 日より、本研究課題は、日本医療研究開発機構(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。

### ラット肺切除周術期出血における高酸素親和型ヘモグロビン小胞体投与の効果

○河野光智<sup>1</sup>, 橋本 諒<sup>1</sup>, 大岩加奈<sup>1</sup>, 中川知己<sup>1</sup>, 増田良太<sup>1</sup>, 神山育男<sup>2</sup>, 堀之内宏久<sup>3</sup>, 渡辺真純<sup>2</sup>, 酒井宏水<sup>4</sup>, 小林紘一<sup>2</sup>, 岩崎正之<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東海大学医学部外科学系呼吸器外科学, <sup>2</sup> 慶應義塾大学医学部呼吸器外科, <sup>3</sup> さいたま市立病院呼吸器外科, <sup>4</sup> 奈良県立医科大学医学部化学教室

kohno@1993.jukuin.keio.ac.jp

**【緒言】** 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)が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ている。将来、手術中の大量出血に対してHbVが投与されることも見込まれるため、我々は肺切除モデルを用いてHbVの有効性と安全性を検討してきた。一方、ヘモグロビン小胞体の特筆すべき特徴の一つは酸素親和性を変化させることが出来る点である。通常型HbVはP50を生理的な28Torrに調整するが、P50を9Torrに低下させて高酸素親和型HbV(LowP50HbV)を作製できる。この高酸素親和型を輸液することによって皮膚筋弁の低酸素を改善し生着率が高まることや、腫瘍組織内の酸素分圧が高まり放射線治療効果が增加することが確認されている。肺切除時の大量出血に対する高酸素親和型HbVの投与には、酸素化の改善をもたらす効果が期待できる。ラット肺切除周術期出血モデルにおいて、LowP50HbV投与が循環動態と血液の酸素化に及ぼす影響を評価した。

**【実験】** ラットで人工呼吸器管理下に左肺を全摘除する。全循環血液量の30%を脱血し、等量の輸血或いは輸液を行う。人工呼吸器離脱後1時間まで血圧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。輸血、輸液を変え以下の動物群を作成する。(1)生理食塩水N/S群、(2)5%アルブミンAlb群、(3)通常型ヘモグロビン小胞体HbV群(HbVを5%アルブミン液に分散)、(4)高酸素親和型ヘモグロビン小胞体LowP50HbV群(高酸素親和型HbVを5%アルブミン液に分散)、(5)ラット赤血球液ratRBC群(ラット赤血球を5%アルブミン液に分散)。HbVとLowP50HbV、ratRBCのHb濃度は8.6g/dlに調整する。

**【結果と考察】** 肺切除術後、脱血によりラットの血圧は30mmHgまで低下しショック状態となるが、各輸液により上昇した。人工呼吸器離脱後、N/S群では血圧が低下し1時間以内に全例が死亡した。Alb群は生存率60%であった。HbV群とLowP50HbV群、ratRBC群は血圧が維持され、全例が生存した。人工呼吸器離脱1時間後の動脈血酸素分圧(mean±SD mmHg)はHbV群では $57.6 \pm 5.9$ , LowP50HbV群で $72.5 \pm 14.5$ , ratRBC群で $62.0 \pm 14.4$ と、有意差は認めないがLowP50HbV群で高値を示す傾向を認めた(HbV vs. LowP50HbV;  $p=0.053$ )。HbV群とLowP50HbV群、ratRBC群の3群では血中乳酸値も低値が維持された。

**【結論】** 左肺全摘術中の大量脱血でショック状態に陥ったラットにおいて、HbVやLowP50HbVの投与は循環動態を安定させ赤血球投与と同等の効果を示した。肺切除により呼吸機能が低下した状態でLowP50HbVは酸素化の改善をもたらす可能性がある。

## 産科出血による母体死亡の現状と人工赤血球への期待

照井克生

埼玉医科大学総合医療センター 産科麻酔科

terui@saitama-med.ac.jp

厚生労働科学研究費補助金による妊産婦死亡症例検討会が、日本産婦人科医会の協力により 2010 年より行われている(主任研究者：池田智明 三重大学産科婦人科学教室)。その結果は「母体安全への提言」として毎年まとめられ、周産期センターや大学病院に配布される。その中で特筆されるのは、日本は先進国の中では例外的に産科出血が死亡原因の第一位である実態である。産科出血は、早期に発見し輸血や止血治療を適切に開始すれば、死亡例の多くが回避可能と考えられるからである。日本では年間分娩数の半数以上が産科一次施設で担われており、急変時に対応する人的・物的資源が不足しているし、産科出血を過小評価しやすい要因も複数存在する。妊産婦死亡症例検討会の事例でも、自験例でも、予期せぬ産科大量出血に対して、診断が遅れ、血液製剤を発注するのが遅れ、輸血なしに高次施設への搬送中に心停止に至る事例が後を絶たない。

産科と出血とは切っても切れない関係にある。出血リスクが高いと予想される症例を妊婦健診で抽出して高次医療機関に紹介することも行われるが、ローリスク妊婦であっても、出産時の弛緩出血や産道の裂傷、子宮型羊水塞栓症による消費性凝固障害などにより、突発的に大量出血となることがある。従って分娩を取り扱う施設においては、大量出血に十分に対処できる態勢が必須と言える。しかし小規模分娩施設においては、希に発生する産科大量出血に対して輸血用血液製剤を常備しておくことは現実的ではない。

上記研究班の分担研究として平成 24 年に実施した「分娩取り扱い施設における産科危機的出血への輸血対応に関する調査」の結果、院内発症の輸血必要症例数は年に 1 例もなかった施設が 57% を占め、輸血用血液製剤を院内に常備している施設は非周産期センターでは 18% のみであった。産科出血例を高次施設へと搬送するのに要する時間が 20 分以内の施設は 51% のみで、1 時間以上を要する施設が 5% あった。輸血用血液製剤を常備できない理由は、「常備しても使わず無駄になる」「コストが取れない」「使用期限が近づいても返却できない」などであった。血液製剤のクロスマッチを院外に発注している施設もあった。日赤による輸血用血液製剤製造体制集約化の影響は明らかに認めなかったが、輸血用血小板製剤供給に時間を要する実態も浮かび上がった。

産科出血の特徴として、羊水中に豊富に存在するトロンボプラスチンが分娩時に母体血中に流入し、消費性凝固障害が急速に進展することが挙げられる。産科大量出血における凝固因子補充の重要性については、日本の産科医は古くから実感として認識していた。近年になり外傷領域のエビデンスから、海外の産科医や麻酔科医もフィブリノゲンなど凝固因子補充の重要性を認識するようになった。新鮮凍結血漿は保存期間が長いため、産科一次施設であっても常備しやすい。しかし産褥出血例に対して新鮮凍結血漿のみが輸血され、当院到着時には重度の貧血により低酸素性脳障害を来した例も経験した。外傷領域で一般的となった制限輸液や低血圧許容は、あくまで短時間で救急搬送して手術治療に繋げられる状況でのエビデンスである。患者搬送に時間を要する日本の現状では、制限輸液は搬送前に循環血液量減少で死亡した時代に逆行する恐れがある。人工赤血球が切に求められる産科の現状がある。

## 出血性ショックに対する人工酸素運搬体 (Liposome hemoglobin) による治療

○田中良弘<sup>1</sup>, 吉村有矢<sup>1</sup>, 高瀬凡平<sup>2</sup>, 関根康雅<sup>1</sup>, 秋富慎司<sup>1</sup>, 朝比奈はるか<sup>1</sup>, 齋藤大蔵<sup>1</sup>, 池内尚司<sup>1</sup><sup>1</sup> 防衛医科大学校病院 救急部, <sup>2</sup> 同 集中治療部

yoshit@ndmc.ac.jp

【背景】: 外傷死の30~40%は受傷後早期の大量出血に伴う失血死で, 受傷後2~3時間以内の外傷死の中に Preventable trauma death (PTD) が存在するとされる。PTDの頻度を減少させるために, 外傷初期からの大量輸血の必要性が提唱されて久しいが, 実際の臨床現場では, 救急搬送に時間を要して輸血開始が遅れ, 凝固能破綻から外傷死に陥る症例も少なからず存在する。我々はこれまで, 外傷性出血性ショックに対する人工酸素運搬体 (Liposome hemoglobin: 以下 LHb) を用いた救命治療の研究を施行して来た。今回は, 多発外傷に対する LHb を用いた治療の可能性とその位置付けを調べる目的で, 以下の臨床研究および基礎研究を施行した。

【臨床研究】2013~2015年の3年間に, 当救命救急センターに搬送された1917例中, CPAを除いた外傷症例は650例(32.6%)であり, うち臓器損傷を含む重症多発外傷は294例(14.7%)であった。死亡例は32例で, 全外傷における死亡率は4.9%である。死因は頭部外傷が15例(46.9%)と最多で, 出血性ショックが12例(37.5%)と次いだ。これらの主な出血部位は, 骨盤5例, 胸部2例, 腹部3例, 四肢1例, 顔面1例で, いずれも受傷24時間以内の早期死亡であった。Trauma and Injury Severity Score methodによる予測生存率が50%以上であったのは8例。症例に関与していない救急科専門医3名以上によるpeer reviewの結果, 出血性ショック12例中6例(50%)がPTDの可能性ありと判定された。出血性ショックの重症例の救命には早期の止血手術と輸血が重要である。Pre-hospitalからLHbを早期に使用できたならば, 死亡を回避し救命の可能性が向上したと思われる症例を提示する。

【基礎研究】外傷性出血性ショックに対するLHbによる治療効果を判定する目的で, 循環血液量の30%を25分間かけて脱血する急性出血性ショックモデルをSDラット(9-10週齢, 雄)で作成し, 下記の5群に分類して, LHbの出血性ショック心臓の催不整脈性に対する治療効果を判定した。

- (1) Shock 単独群(n=10): 25分間かけて脱血後, 無治療で15分間経過を観察。
- (2) 生食群(n=7): 脱血後, 出血量と同量の生理食塩水で蘇生し, 15分間観察。
- (3) 5% Albumin (ALB) 群(n=7): 脱血後, 同量の5% ALBで蘇生し, 15分間観察。
- (4) LHb 群(n=10): 脱血後, 同量の酸素化LHbで蘇生し, 15分間観察。
- (5) RBC 群(n=7): 脱血後, 同量の酸素化自己洗浄赤血球(RBC)で蘇生し, 15分間観察。

脱血中, 蘇生後ともに5分毎に血行動態を計測し, 心エコーにより左室壁運動を観察した。再灌流15分後の計測後には, 迅速に心臓を摘出, Tyrode液により灌流後, Na<sup>+</sup>感受性蛍光色素であるdi-4-ANEPPSにて染色, Langendorff灌流心とし, 心筋活動電位, 心伝導速度と伝導パターンをOptical mapping analysisによって解析した。また電気生理学的に5~100V直流電流による心室性頻拍/心室細動(VT/VF)の誘発を計15回施行し, 致死性不整脈(VT/VF)の催不整脈性を判定した。

【結果】: Shock 単独群, 生食群, 5% ALB 群では, 全例に心臓の壁運動の異常と, VT/VFが誘発された。LHb 群, RBC 群ではほぼ全例に心臓の壁運動の正常化が見られ, VT/VFは誘発されなかった。

【結語】: 酸素化LHbは, 出血性ショック心臓の致死性不整脈を効果的に治療し得る有効的な治療手段である。また, 外傷死亡症例の後ろ向き解析では, LHbを早期に使用すれば, 救命の可能性が高まる出血性ショック死も確かに存在すると思われる。

### 出血性ショック患者に対する人工赤血球投与の効果と問題点

○増野智彦, 横田裕行

日本医科大学 高度救命救急センター  
Masuno@nms.ac.jp

危機的出血を呈する出血性ショック患者に対する初期輸液療法としては、これまで crystalloid 大量投与が主に行われてきた。しかし、外科的止血が得られる以前に crystalloid の大量輸液を行うことは再出血を助長する可能性があるため、近年では外科的止血が得られるまでは初期輸液を制限するとともに低血圧を容認し、酸素運搬能および凝固機能の改善を目的に、赤血球、新鮮凍結血漿、血小板投与を早期から積極的に行う Damage Control Resuscitation の考えが広まりつつある。しかし保存血輸血の投与には、準備や適合性の確認に時間を要すること、また大量輸血に伴い様々な生体反応が惹起され、臓器不全発症が増加するなどの問題点が指摘されている。人工血液は、血液型適合の必要がなくいつでも誰にでも投与でき、長期保存が可能であり、感染の危険性も少ないといった特徴を持つため、外傷患者や術中大量出血症例に対する使用の有効性が期待され開発が進められてきた。

我々はヒト重合型ヘモグロビンをを用いた人工赤血球(PolyHeme, Northfield Laboratories)を使用した基礎研究ならびに臨床研究に關与する機会を得たので今回その結果を含めて報告する。まずはじめに、ラット出血性ショックモデルを用い、人工赤血球を初期輸液として使用した場合の蘇生効果および出血性ショック後臓器障害に対する影響を crystalloid, ラット血液投与群と比較検討した。結果は、人工赤血球投与群では crystalloid, ラット血液に比べ、早期に組織酸素飽和度を上昇させ、酸素負債を改善すること、また過剰な炎症反応を抑制し、臓器障害発生を軽減する効果があることが確認された<sup>1)</sup>。続いて行った第二層臨床試験においても、人工赤血球は保存血輸血に比べ、サイトカイン産生および好中球活性化を抑制するとの結果を得ている。これらの結果をもとに外傷性出血性ショック患者に対して人工赤血球を初期蘇生輸液として用いた場合の効果を検証する第三層臨床試験が行われた。結果は、Day 1, Day 30 死亡率および多臓器障害の発生率において、人工赤血球の使用は対照群と有意差が見られなかった。また、人工赤血球のもつ NO 吸着能によると考えられる心筋梗塞の発症が、対照群に比べ人工赤血球群において増える結果となり、臨床承認は見送られた<sup>2)</sup>。

これまで人工血液がもつ問題点を克服すべく様々な人工血液が開発されてきたが、いまだ臨床使用にまでは至っていない。保存血を使用する限りは不適合性、感染、臓器不全などの合併症を避けることはできず、重症外傷や災害等による多数傷病者に対応する救急医にとっては、安全でいつでもどこでも使用可能な人工血液の開発は急務であると言える。今後更なる改善が進み、リスクを抑え最大の効果を発揮できる人工血液の開発が望まれる。

#### 【文献】

- 1) Masuno T, Moore EE, Cheng AM, et al. *Surgery*. **2005**, *138*, 335-41.
- 2) Moore EE, Moore FA, Fabian TC, et al. *J Am Coll Surg*. **2009**, *208*, 1-13.

### 救命救急センター搬入外傷例からみた人工赤血球の適応に関する考察

○高須 修<sup>1,2</sup>, 鍋田雅和<sup>1,2</sup>, 宇津秀晃<sup>1,2</sup>, 森田敏夫<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 久留米大学医学部救急医学, <sup>2</sup> 久留米大学病院高度救命救急センター

takasu\_osamu@kurume-u.ac.jp

**【背景・目的】** 人工赤血球の臨床応用を想定した場合, ①出血性ショックが死因の大部分を占め, ②緊急輸血を必要とする頻度が高く, ③病院前診療が広く行われる重症外傷症例は, その良い適応と考えられる. 本研究では, 外傷患者に対する緊急輸血の現状を調査し, 人工赤血球輸血の適応となりうる症例, 特に緊急輸血を施行したものの救命できなかった症例の特徴を検討し, 人工赤血球投与の意義・適応を考察した.

**【対象】** 2014 年 1 月～2015 年 12 月に, 久留米大学病院高度救命救急センターに搬入された外傷症例のうち, 転院症例, 搬入時心肺停止例, 15 歳以下の症例を除外した 402 例.

**【方法】** 診療録を用いて retrospective に, 搬送方法(救急車, ドクターヘリ等), 緊急輸血コード I(血液型判定および交差試験ともに未実施)および緊急輸血コード II(血液型判定のみ実施)による RCC, FFP 輸血の有無と投与量, 搬入時バイタルサインと血液検査所見等を調査. 緊急輸血施行群と未施行群, 救命例(生存例)と非救命例(死亡例)の比較を行った.

**【結果】** ①緊急輸血は, コード I 41 例(10.2%, RCC  $5.8 \pm 5.8$  単位, FFP  $5.3 \pm 4.8$  単位), コード I+II 52 例(12.9%, RCC  $9.9 \pm 8.1$  単位, FFP  $9.6 \pm 8.3$  単位)に施行. このうち死亡は各々 20 例, 24 例であった. ②救急車搬送(以下 G 群, 153 例)中, コード I 17 例(死亡 9), I+II 20 例(死亡 9), ドクターヘリ搬送(以下 H 群, 241 例)中, コード I 23 例(死亡 11), I+II 30 例(死亡 15)に施行. ③緊急輸血コード I+II 施行群は未施行群に比べ, G 群, H 群ともに, 搬入時収縮期血圧は低値で, ショック指数(脈拍/収縮期血圧), 乳酸値は有意に高値であった. ④緊急輸血コード I 施行群の生存例と死亡例の間には, 搬入時 sBP, ショック指数, pH に有意差を認めないものの, 死亡例で乳酸値が有意に高値[中央値 2.7(2.2-4.3)mmol/l vs 6.5(2.6-9.3)mmol/l]で, fibrinogen が有意に低値[中央値 212(171-264)mg/dl vs 139(82-197)mg/dl]であった.

**【考察・結語】** 外傷患者の約 1 割に緊急輸血を必要とした. バイタルサインの異常がその投与基準(判断根拠)になったと推測されるが, 非救命例においては, 搬入時に既に乳酸アシドーシスと凝固系の破綻が進行しており, より早期に緊急輸血を開始する必要があると考えられた. 人工赤血球輸血は, 出血が疑われる外傷例において, 収縮期血圧など循環指標の悪化が顕性化する前に, 末梢循環不全, 乳酸アシドーシスの進行を防ぐ目的で, より早期から適応になる可能性が示唆された.

## シンポジウム2-S7

### 大量出血性凝固障害を H12-ADP-liposome で制御する ―最適の病院前治療に向けて―

○萩沢康介<sup>1</sup>, 木下 学<sup>2</sup>, 多喜川真人<sup>3</sup>, 武岡真司<sup>3</sup>, 鈴木英紀<sup>4</sup>, 宮崎裕美<sup>5</sup>, 斎藤大蔵<sup>5</sup>

<sup>1</sup> 防衛医科大学校生理学講座, <sup>2</sup> 同免疫微生物学講座, <sup>3</sup> 早稲田大学先進理工学部, <sup>4</sup> 日本医科大学形態解析共同研究施設, <sup>5</sup> 防衛医科大学校・防衛医学研究センター外傷研究部門

hagisawa@ndmc.ac.jp

外傷性の大量出血から生じる出血性ショックの防止・治療には、迅速な止血と輸血が不可欠である。しかしながら、いったん外傷性の凝固障害に至ると制御は難しくなる。海外では、病院に到着する前の受傷現場ないしは搬送中に止血とともに輸血を開始する取り組みが検討されている<sup>(1)</sup>。いっぽう、赤血球：血小板：血漿を 1:1:1 の単位比で大量出血発症の当初から投与することが患者の生命予後を改善することが様々な臨床研究で示されている<sup>(2)</sup>。

H12-ADP-liposome は通常の血小板輸血のような補給(保存方法・期限)の制約がないため、受傷現場ないしは搬送中から止血制御を行える利点がある。我々はこれまでに、①ウサギの大量出血に伴う大量輸血後の希釈性凝固障害が生じた場合の止血制御に H12-ADP-liposome が通常の血小板輸血と同等の止血促進効果を発揮して、救命につながることを報告<sup>(3,4)</sup>し、②出血性ショック時の蘇生輸血(赤血球：血小板：血漿の 1:1:1 輸血)として H12-ADP-liposome が機能することも報告した(昨年度本学会)。③さらに血小板減少がないマウスで、衝撃波損傷で生じた広範な肺出血での検討では、受傷直後(プレホスピタルを想定)に H12-ADP-liposome を投与すると、止血促進とともに傷害局所において放出された ADP がアデノシンに代謝され、それが外傷によって惹起される TNF をはじめとする炎症性サイトカインや MIP-2 といった好中球誘導ケモカインの放出を軽減して、細胞保護効果を発揮する非常にユニークな機能を持つことを明らかにした<sup>(5)</sup>。

本シンポジウムではそれらの知見に基づき、今後の臨床適応について議論したい。

#### 【文献】

- 1) Smith IM, James RH, Dretzke J, Midwinter MJ. *Shock*. **2016**; 46: 3-16.
- 2) Holcomb JB, del Junco DJ, Fox EE, Wade CE, Cohen MJ, Schreiber MA, et al., *JAMA Surg*. **2013**; 148: 127-36.
- 3) Nishikawa K, Hagisawa K, Kinoshita M, Shono S, Katsuno S, Doi M, et al., *J Thromb Haemost*. **2012**; 10: 2137-48.
- 4) Hagisawa K, Nishikawa K, Yanagawa R, Kinoshita M, Doi M, Suzuki H, et al., *Transfusion*. **2015**; 55: 314-25.
- 5) Hagisawa K, Kinoshita M, Miyawaki H, Sato S, Miyazaki H, Takeoka S, et al., *Crit Care Med*. **2016**; 44: e827-37.

## シンポジウム2-S8

### 人工血小板 H12(ADP) リボソームの前臨床段階における体内動態特性と臨床試験にむけた課題

○丸山 徹<sup>1,2</sup>, 橋本麻衣<sup>1,3</sup>, 田口和明<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 熊本大学薬学部, <sup>2</sup> 熊本大薬・育薬フロンティアセンター, <sup>3</sup> 崇城大学薬学部

tomaru@gpo.kumamoto-u.ac.jp

フィブリンノーゲン $\gamma$ 鎖C末端ペプチド(H12)を担持し、血小板凝集能を有するADPを内封したH12(ADP)リボソームは、血小板のバイオミメティックナノ製剤として臨床開発が期待されている。既に、*in vitro*系での活性はもとより、種々の血小板減少状態を呈した病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ている。

医薬品の臨床開発に際しては、前臨床段階での体内動態の解明が必須であるが、リボソーム製剤の場合、ヒト初回投与試験に際しては、リボソーム製剤及び有効成分の非臨床薬物動態データ、予定される臨床使用法及び投与経路など、リボソーム製剤に特有の情報を考慮する必要がある。特に安全性の観点からも、血中滞留性、臓器分布、代謝性・代謝臓器、消失経路、生体内蓄積性に関する情報を様々な臨床使用を想定した条件下で構築することが必要不可欠である。

本シンポジウムでは、これまでの前臨床段階で得られた知見を総括して、①健常動物におけるH12(ADP)リボソームの体内動態特性<sup>1)</sup>、②体内動態に及ぼす血小板減少状態の影響<sup>2,3)</sup>、③単回及び繰り返し投与時の変動<sup>3,4)</sup>、を紹介するとともに、創薬開発のヒトPOC(Proof of Concept)を確保するための臨床試験における課題と対策について議論したいと考えている。

#### 【文献】

- 1) Taguchi K, Ujihira H, Ogaki S, Watanabe H, Fujiyama A, Doi M, Okamura Y, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, Otagiri M, Maruyama T, *Drug Metab Dispos*, 41, 1584-91 (2013).
- 2) Taguchi K, Ujihira H, Watanabe H, Fujiyama A, Doi M, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, Otagiri M, Maruyama T, *J Pharm Sci*, 102, 3852-9 (2013).
- 3) Taguchi K, Hashimoto M, Ogaki S, Watanabe H, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, Otagiri M, Maruyama T, *J Pharm Sci*, 104, 3084-91 (2015).
- 4) Hashimoto M, Taguchi K, Ogaki S, Watanabe H, Kinoshita M, Nishikawa K, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, Otagiri M, Maruyama T, *J Pharm Sci*, 104, 3968-76 (2015).

## Traumatic Bleeding Severity Score (TBSS) の開発：大量輸血療法の適応と血液代替物

小倉崇以

前橋赤十字病院 高度救命救急センター 集中治療科・救急科

alongthelongestway2003@yahoo.co.jp

【要約】 大量出血は、外傷における急性期死亡の主要因である。重症外傷では、出血性ショックに起因する凝固障害<sup>[1,2]</sup>や、外傷による組織損傷そのものによって発生する凝固障害<sup>[3]</sup>、大量の晶質液や赤血球濃厚液のみを使用した容量負荷に起因する希釈性凝固障害が発症しうる<sup>[4]</sup>。これら外傷起因性凝固障害の回避および補正のため、赤血球濃厚液や新鮮凍結血漿、血小板濃厚液、および凝固因子をバランス良く組み合わせて輸血を行う「大量輸血療法」が推奨されており、血行動態の不安定な重症外傷患者の診療においては、受傷早期からの大量輸血療法の施行が死亡率を低下させるとされる。大量輸血療法は一般的に、赤血球濃厚液に対して新鮮凍結血漿や血小板濃厚液の投与比率を高めた輸血療法をさすが、具体的な比率としては、赤血球濃厚液、新鮮凍結血漿、および血小板濃厚液の投与比率が1対1対1、もしくは、赤血球濃厚液と新鮮凍結血漿の投与比率が2対3以上となるような輸血が、重症外傷の予後を改善すると報告されている。

大量輸血療法の早期開始は、外傷患者の死亡率を低下させることが報告されているが、大量輸血療法プロトコルの発動基準に明確なものは提唱されていない。演者は、診断精度の高い新規の外傷性出血重症度スコア (Traumatic Bleeding Severity Score：TBSS) を開発し<sup>[5]</sup>、同スコアを用いて大量輸血療法開始基準を策定し<sup>[6]</sup>、迅速な大量輸血療法の開始と外傷患者の予後改善を達成してきた。しかしながら、血液製剤は限られた医療資源であり、またその合併症を無視できない。特に重症外傷における大量輸血療法では、患者の血液型が判明する以前に、O 型赤血球濃厚液 10 単位と AB 型新鮮凍結血漿 10 単位、O 型血小板濃厚液 10 単位を使用して輸血を開始するため、一定の確率で異型輸血が発生する。輸血の合併症は重篤化しうるため、大量輸血療法の適応には慎重を要すべきであり、また、輸血関連合併症回避の観点から、血液代替物の将来性が期待される。本演題では、外傷における凝固異常と大量輸血療法の現状について述べ、血液代替物の将来について考察する。

## 【文献】

- 1) Sauaia A, Moore FA, Moore EE, et al. Epidemiology of trauma death: a reassessment. J Trauma. 1995, 38, 185-93.
- 2) Callcutt RA, Cotton BA, Muskat P, et al; PROMMTT Study Group. Defining when to initiate massive transfusion: a validation study of individual massive transfusion triggers in PROMMTT patients. J Trauma Acute Care Surg. 2013, 74: 59-68.
- 3) Davenport R, Khan S. Management of major trauma haemorrhage: treatment priorities and controversies. Br J Haemat. 2011, 155: 537-548.
- 4) Ho AM, Karmakar MK, Dion PW. Are we giving enough coagulation factors during major trauma resuscitation? Am J Surg. 2005, 190, 479-84.
- 5) Ogura T, Nakamura Y, Nakano M, Izawa Y, et al. Predicting the need for massive transfusion in trauma patients: the Traumatic Bleeding Severity Score. J Trauma Acute Care Surg. 2014, 76, 1243-50.
- 6) Ogura T, Nakano M, Izawa Y, et al. Analysis of risk classification for massive transfusion in severe trauma using the gray zone approach. Am J Emerg Med. 2015, 33, 1146-51.

### 救急医における人工血小板への期待

○三池 徹<sup>1</sup>, 木下 学<sup>2</sup>, 萩沢康介<sup>2</sup>, 斉藤大蔵<sup>3</sup>, 阪本雄一郎<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 佐賀大学医学部附属病院高度救命救急センター, <sup>2</sup> 防衛医科大学校免疫微生物学講座, <sup>3</sup> 防衛医科大学校防衛医学研究センター外傷研究部門

hataketurimiike@gmail.com

#### 【序論】

救命センターには緊急で血小板輸血を必要とするような、重症患者が搬送されることが多い。しかし血小板は保存期間が極端に短い。佐賀県では通常予約制での運用を行っている。緊急で血小板輸血が必要な際には、近隣の福岡県赤十字血液センターに発注を行う事が多く、輸血開始までに約3時間を要するのが現状である。今回緊急で血小板輸血が必要であったが、輸血開始までに長時間を要し、地域の血小板輸血体制の限界を感じた症例を報告する。

また当センターで臨床と並行して行っている、人工血小板に関する実験結果も、この場を借りて報告させて頂く。

#### 【症例】

症例は妊娠22週の36歳女性。軽自動車助手席乗車中に普通車と正面衝突し受傷、複数傷病者事案のためドクターヘリ要請となる。フライトドクターによる現場での気管挿管と緊急輸液が行われたが、ショック状態の持続と腹腔内出血の増加が認められた。救急外来は経由せずに直接手術室に搬入し、緊急輸血を行いつつ Damage control surgery と緊急帝王切開術が行われた。術中に Pulseless electrical activity (PEA) となったため、開胸による用手的大動脈遮断術並びに動脈内バルーン閉鎖 (intra-aortic balloon occlusion (IABO)) を行い、心拍再開に至る。濃厚赤血球と新鮮凍結血漿の投与は継続的に行う事が出来たが、血小板製剤に関しては福岡赤十字血液センターからの取り寄せであり早急に投与することが出来なかった。IABO の部分遮断を行いつつ造影 CT を施行し、残存出血の止血処置並びに血小板製剤の投与をこの時点でようやく行うことが出来た。肝臓からの動脈性出血のコントロール目的に血管造影室に移動したが、血管造影室入室後より高度のアシデミアに起因する循環維持困難に陥り、受傷から約5時間後に死亡確認となった。

#### 【考察】

血液凝固異常の出現や血小板数が低下した症例では、止血のための外科的処置のみでは完全な止血を得ることは困難である。本症例は ISS:66 であり、救命が困難な外傷患者であった。しかし迅速な血小板輸血オーダーにも関わらず輸血までに3時間を要しており、血小板輸血供給体制の限界点が明確となった症例でもあった。血小板製剤の性質や地域の問題等を考慮すると、この現実を変えることは高齢化社会を迎えるなかで更に困難となることが予想される。

薬剤として安定している人工血小板が、救急外来・Prehospital の領域で使用可能となれば、このような重症外傷患者であっても救命できるチャンスが訪れるのかもしれない。

### 救命率向上を目指した重傷外傷患者に対する人工血小板の可能性

○石倉宏恭, 入江悠平, 星野耕大, 松本徳彦, 村西謙太郎, 泉谷義人, 喜多村泰輔

福岡大学病院 救命救急センター  
ishikurah@fukuoka-u.ac.jp

外傷死亡の30~40%は受傷後早期の大量出血に伴う失血死であり, このうち約60%が受傷後2~3時間に死亡する<sup>1)2)</sup>. この中で, 出血に対する初期対応の不備が原因で失血死する症例が少なからず存在する. このような『防ぎ得た外傷死(preventable trauma death (PTD))』を未然に防ぐ手立てとしては, まず何よりも迅速かつ的確な止血操作が実施されなければならないが, これに加えて, 近年, 外傷症例の救命率向上を目的とした, Damage Control Resuscitation (DCR)という新しい外傷初期蘇生の概念が提唱されている. DCRを実施する際の重要な要素の1つに「外傷性凝固・線溶障害の予防と是正」が挙げられており, PTDの減少には外傷初期からの適正な輸液と輸血を実施しなければならない.

現時点において, 重傷外傷患者に対する初期輸液は膠質液や晶質液の投与を出来る限り抑え, 速やかに輸血を開始し, RBC:FFP:血小板製剤の投与比率を1:1:1で投与することが推奨されている. この1:1:1投与による輸血は血管内容量, 組織酸素供給, 血液凝固因子, 血小板機能を保持し, 重傷外傷患者を対象とした前向き無作為化介入試験<sup>3)</sup>では, RBC:FFP:血小板製剤の投与比率を1:1:1で輸血を実施した群が2:1:1の群よりも受傷後24時間以内に失血死した症例の割合が有意に減少していた(9.2 vs. 14.6%; p=0.03). その一方で, 1:1:1投与が可能であった症例の割合は輸血開始後1時間で30%, 6時間経過した時点でも50%であった<sup>2)</sup>. 加えて, FFPよりも血小板製剤の供給が難しいという結果であった.

この現状を踏まえ, 重傷外傷患者のDCRにおける1:1:1輸血戦略では, 血小板製剤の確保が重要であり, これを解決する策として, 人工血小板は今後大いに期待出来る. 既に, H12-ADP-リボゾームが外傷性大量出血時の輸血に伴う血小板減少病態において, 出血部位に集積して血小板機能を代替し, 止血制御に直接貢献していることが動物実験で確認されており<sup>4)</sup>, 実臨床での早期試験開始が待たれる.

#### 【文献】

- 1) Johansson PI, Oliveri RS, Ostrowski SR. *J Emerg Trauma Shock*. 2012, 5, 120-125.
- 2) Holcomb JB, del Junco DJ, Fox EE, et al. *JAMA Surg*. 2013, 148, 127-136.
- 3) Holcomb JB, Tilley BC, Baraniuk S, et al. *JAMA*. 2015, 313, 471-482.
- 4) Hagisawa K, Kinoshita M, Miyawaki H, Sato S, Miyazaki H, Takeoka S, et al., *Crit Care Med*. 2016, 103, 2184.

## 酸応答性無機有機ハイブリッド型光増感剤デリバリーシステム

○野本貴大<sup>1</sup>, 福島重人<sup>2</sup>, 熊谷康顕<sup>2</sup>, 宮崎幸造<sup>3</sup>, 井上明季<sup>2</sup>, Mi Peng<sup>2</sup>, 前田芳周<sup>2</sup>, 篠 加珠子<sup>6</sup>, 松本 有<sup>4</sup>, 守本祐司<sup>3</sup>, 岸村顕広<sup>5</sup>, 西山伸宏<sup>1</sup>, 片岡一則<sup>2,4,6</sup>

<sup>1</sup> 東京工業大学化学生命科学研究所, <sup>2</sup> 東京大学工学系研究科, <sup>3</sup> 防衛医科大学校, <sup>4</sup> 東京大学医学系研究科, <sup>5</sup> 九州大学工学研究院, <sup>6</sup> 川崎市産学振興財団ナノ医療イノベーションセンター

nomoto@res.titech.ac.jp

**【緒言】** 疾患部に光増感剤を集積させ、光を照射して光増感剤を活性化することにより、疾患部で選択的に活性酸素を発生させて治療効果をもたらす光線力学療法(PDT)は、低侵襲的にがんを治療する方法として注目されている。近年、PDT効果をより高めるために、光増感剤をがんを選択的に送達するためのキャリアが開発されてきているが、キャリア化に伴う光増感剤の血中滞留性の長期化により、正常組織に対する光化学的傷害の増加が懸念される。したがって、全身的な副作用を抑えながらPDT効果を高めるためには、正常組織では光増感剤の活性を抑えつつ、疾患部位では光増感剤の活性が復活するような仕組みをキャリアに搭載することが有用であると考えられる。そこで、本研究ではこのような光活性のON/OFFをpHによって制御できるキャリアとして、内核が光増感剤を内包したリン酸カルシウム、外殻がpoly(ethylene glycol) (PEG)となる無機有機ハイブリッド型光増感剤デリバリーシステム(ハイブリッドキャリア)を開発した<sup>1</sup>。生理的環境では光増感剤はリン酸カルシウムに内包されて酸素が光増感剤にアクセスする効率が落ち活性酸素産生効率が低下するが、酸性環境ではリン酸カルシウムの溶解に伴い酸素のアクセスが復活して活性酸素産生効率が上昇するものと期待される。

**【実験・結果・考察】** ハイブリッドキャリアは、PEG(MW: 12,000)-poly(aspartic acid) (重合度: 42)とchlorin e6(光増感剤)を溶解したリン酸イオン含有バッファーに、同量のカルシウムイオン含有バッファーを加えて混合し、水熱合成にかけることにより調製した。DLSで粒径を測定した結果、数十～数百nmの粒径を示し、pH 7.4ではこの粒径を維持したが、pH 5.5では速やかにキャリアが崩壊した。また、活性酸素産生効率を、光照射下における酸素消費速度から評価したところ、pH 7.4ではフリーの光増感剤よりも効率が低下したが、pH 5.5ではフリーの光増感剤と同等の活性酸素産生効率を示した。ハイブリッドキャリアはヒト肺がん細胞(A549)に対してエンドサイトーシスで取り込まれることが共焦点顕微鏡観察から明らかとなり、細胞内におけるPDT効果を蛍光プローブのCellROXにより評価したところ、ハイブリッドキャリアはフリーの光増感剤と同等のPDT効果を示した。これは、リソソームの低pH環境に応答してPDT効果が復活したためであると考えられる。さらにA549マウス皮下腫瘍モデルに対するハイブリッドキャリアの活性を評価した結果、ハイブリッドキャリアは血中ではPDT効果を抑えて正常血管に対する傷害を抑制できることが生体内顕微鏡システムにより明らかとなり、フリーの光増感剤と同等の優れた抗腫瘍効果も示した。ハイブリッドキャリアは標的部位の環境に応答するキャリアを構築する有用なプラットフォームと期待される。

**【文献】**

- 1) Nomoto T, *et al.* Calcium phosphate-based organic-inorganic hybrid nanocarriers with pH-responsive on/off switch for photodynamic therapy. *Biomater. Sci.* **4**, 826-838 (2016).

## 血中タンパク質を捕捉して高い血中循環性を示す分子インプリントナノキャリア

○竹内俊文<sup>1</sup>, 笹尾玲雄<sup>1</sup>, 藤 加珠子<sup>2</sup>, 松本 有<sup>2</sup>, 片岡一則<sup>2,3</sup>, 北山雄己哉<sup>1</sup><sup>1</sup> 神戸大学工学研究科, <sup>2</sup> 東京大学医学系研究科, <sup>3</sup> 東京大学工学系研究科

takeuchi@gold.kobe-u.ac.jp

**【緒言】** ナノテクノロジーをベースにした薬物送達システム(DDS)は革新的技術として期待されている。特に DDS のための安定に長時間血中を循環するナノキャリアの開発は重要で、血中で異物とみなされるオプソニン化を回避するステルス性の付与は必要不可欠である。現在、ナノキャリアにステルス性を付与する方法として、生体適合性界面をナノキャリア上に形成させるといった方法が取られてきた。ポリエチレングリコール(PEG)などの親水性基を巧みに用いて表面設計を行うことで、高いステルス性が得られることが報告されている。

本発表では、従来の PEG などを用いる表面処理の手法とは一線を画す、新しいステルス性付与のための方法論を提案する。ナノ粒子を血中に投与した場合、種々の血中タンパク質がナノ粒子の周囲に吸着し、プロテインコロナと呼ばれるタンパク質の階層的集合体が形成される。このプロテインコロナ形成を制御することで、ナノ粒子にステルス性を付与することを着想した。本研究では、血中に最も高い濃度で存在する非オプソニン化タンパク質アルブミンに着目し、ナノ粒子がアルブミン中心のプロテインコロナ層を形成できれば、動的な非オプソニン化が達成され、ナノ粒子に対する免疫応答や肝細胞への取り込みが回避されることが考えられる。

我々はこれまで、分子インプリンティング技術を用いて全て人工材料を原料とした分子認識高分子材料を数多く報告してきた<sup>(1-4)</sup>。この分子インプリンティング技術を利用して、ヒト血清アルブミン(HSA)に対し、高い親和性と選択性をもつ 50 nm 以下のサイズの分子インプリントナノ粒子(MIP-NGs)を設計・合成し、その血中滞留性と肝細胞への取り込みについて、マウスを用いた *in vivo* 共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて評価したので報告する。

**【実験・結果・考察】** MIP-NGs は、HSA を添加した状態で pyrrolidyl acrylate(機能性モノマー)、N-isopropyl-acrylamide(コモノマー)、N,N'-methylenebisacrylamide(架橋剤)、fluorescein acrylate(蛍光モノマー)および 2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine(親水性モノマー)を無乳化剤沈殿重合により作製した(粒子径 20-30 nm)。表面プラズモン共鳴センサによる吸着実験により、MIP-NGs は、分子インプリンティングを施していない粒子(NIP-NGs)に比べて高い HSA 結合能を示し、また、IgG や Fibrinogen はほとんど吸着しなかった。すなわち、MIP-NGs は、HSA に対して高い親和性と選択性を獲得していること(インプリント効果)を確認した。

MIP-NGs および NIP-NGs をマウス尾静脈から注入し、耳毛細血管の超高速共焦点レーザー顕微鏡像の時間経過を観察することで血中循環性を評価したところ、MIP-NGs の血中半減期は 6-7 時間であったのに対し、NIP-NGs では 3.5 時間であった。また、肝細胞への蓄積性は MIP-NGs のほうが有意に低いことも示され、MIP-NGs は血中投与後速やかに HSA を吸着し、ステルス性を獲得することが示唆された。これは、ナノ粒子表面に形成されるプロテインコロナを HSA 優先的結合により制御することで後天的にステルス性を獲得したと考えられ、新たな DDS ナノキャリアとして期待される。

**【文献】**

- 1) *Chromatography* **2016**, 37, 43 (Review)
- 2) *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 12765
- 3) *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, in press (10.1002/anie.201605992 R)
- 4) *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 8833.

## シンポジウム3-S14

### 心血管疾患をターゲットとしたリポソーム製剤の開発

○鈴木 亮<sup>1</sup>, Dasa Siva<sup>2</sup>, Alexander Klibanov<sup>2</sup>, Brent French<sup>2</sup>, Kimberly Kelly<sup>2</sup>, 丸山一雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 帝京大学薬学部, <sup>2</sup>University of Virginia, Cardiovascular Research Center

r-suzuki@pharm.teikyo-u.ac.jp

#### 【緒言】

リン脂質2重層をもつリポソームは、水溶性や脂溶性薬物など様々な物質を搭載することができる。さらに、リポソーム表面には、生体内安定性を向上させるためのポリマーや標的組織へのターゲティング能を付与するためのペプチドや抗体などを修飾することが可能であるため、優れた薬物キャリアとして注目されている。実際に、抗がん剤などを封入したリポソーム製剤が臨床応用されており、様々な薬物への応用が期待されている。これまでに我々は、このリポソーム技術を駆使した薬物デリバリーの研究を進めてきた。そこで本発表では、我々が最近開発を進めている虚血再灌流後の心筋梗塞部位に集積するペプチドを修飾したリポソームについて紹介する。

#### 【実験】

ファージディスプレイ法により虚血再灌流後の心筋梗塞部位に集積するペプチドのスクリーニングを行った。ここで得られたペプチドを、蛍光ラベルしたリポソームに修飾した。このペプチド修飾リポソームを心筋梗塞モデルマウスの尾静脈から投与し、心筋梗塞部位への集積性を *in vivo* 蛍光イメージング装置を用いて検討した。また、心臓の組織切片を作製し、組織内のリポソームの分布を確認した。

#### 【結果と考察】

ファージディスプレイ法により、虚血再灌流後の心筋梗塞部位の血管内皮細胞、心筋細胞、筋線維芽細胞、心筋前駆細胞または細胞外マトリックスに結合する数種のペプチドを見出すことができた。これらペプチドのうち、心筋細胞に結合するペプチドに着目し、リポソーム表面に修飾した。このペプチド修飾リポソームを蛍光でラベルし、心筋梗塞モデルマウスに投与したところ、このリポソームが心筋梗塞部位に集積することが明らかとなった。このことから、本リポソームが心筋梗塞部位の心筋細胞への薬物キャリアとして利用可能になるものと期待される。今後は、心筋細胞保護薬などを搭載したリポソームを調製し、心筋梗塞における心筋保護作用などについて検討を行う予定である。

#### 【結論】

ファージディスプレイ法で見出した心筋細胞に結合するペプチドをリポソームに修飾することで、このリポソームが心筋梗塞モデルマウスの病変部位に集積することが明らかとなった。今後、本リポソームの心筋梗塞治療への応用が期待される。

#### 【文献】

1) Dasa SS, Suzuki R, Gutknecht M, et al., *J Control Release*. **2015**, 220, 556

### 工学的アプローチによる細胞ソーティング

○宮田昌悟

慶應義塾大学 理工学部機械工学科

miyata@mech.keio.ac.jp

再生医療に代表される細胞療法では、治療に適する機能を有する細胞を純化・精製するセルソーティングや治療に用いる細胞の品質を評価する手法が重要となる。セルソーティングには、細胞を蛍光標識や磁気標識した後に分画する FACS や MACS といった手法が主流であり、その精度は極めて高いが蛍光色素や磁気粒子による細胞の標識が不可避である点や細胞へのダメージが大きい点が臨床応用へ向けた障壁となっている。

そのような背景を鑑みて、著者らは細胞の電気的特性に基づいて微粒子を操作可能な誘電泳動現象に着目して、細胞の機能に応じた分画技術、すなわち誘電泳動によるセルソーティング技術を開発してきた。本講演では、特に多能性幹細胞の分画に着目し、誘電泳動型セルソーティング技術を用いたマウス ES 細胞のフィーダ細胞との分画や ES 細胞の多能性に応じた分画について報告する。

さらに、著者らは工学的アプローチによるもう一つの多能性幹細胞の機能評価法として、バイオマテリアルへの接着性に着目して技術開発を実施している。ES 細胞はその多能性の有無に応じて培養基材への接着性が異なる点に着目して、段階的に表面改質を施した培養基材上で多能性を有する ES 細胞と失活させた ES 細胞を培養することで、その基材への接着性の差異から多能性を判断することを試みたので併せて報告する。

以上、本研究では、誘電泳動および培養基材の表面改質という工学的手法を用いた多能性細胞の機能評価およびソーティング技術の開発を実施した。また、開発された技術を用いたマウス ES 細胞の多能性の評価、ソーティングが可能であることを示した。

## シンポジウム3-S16

### 血小板代替物研究から生まれた医療材料：医療用ナノシート(ナノ絆創膏)の開発

○藤枝俊宣<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 早稲田大学高等研究所, <sup>2</sup>JST さきがけ

t.fujie@aoni.waseda.jp

健康寿命の増進を支える医療デバイスの開発は、ライフイノベーションを推進する我が国において重要な課題であり、近年のナノバイオテクノロジーやICTの進展に伴い、ウェアラブルデバイス、バイオチップ、再生医療に代表される先進的な予防・診断・治療技術の開発が展開されている。一方で、これらのデバイスが生体に接触する界面において、直接的に生体機能を制御する、または、効率的に生体情報を取得するためには、生体組織の物性に調和する材料の開発が求められている。この点において、「柔らかさ」を特徴とする有機高分子や分子集合体からなるソフトマテリアルの有用性が謳われている。

このような背景のもと、我々のグループでは数平方センチメートル以上の面積に対して、数十～数百ナノメートルの膜厚からなる自己支持性高分子超薄膜(ナノシート)を創製し、超薄シート構造に由来する構造力学物性や機能化手法を研究している。特に、生体膜(細胞膜・基底膜)に類似した二次元構造から創発される柔軟性や密着性を利用することで、生体組織に貼付可能な医療用ナノシートの開発を進めてきた(Fig.1)<sup>1)</sup>。本講演では、血小板代替物の開発を通じて生まれた高分子ナノシートの特徴を概説すると共に、微細加工・印刷技術との融合により拓かれる医療・ヘルスケア分野への応用について、外科手術用材料<sup>2)-6)</sup>、再生医療向け細胞培養基材<sup>7-10)</sup>、および、生体センシング<sup>11-13)</sup>に関する最近の研究成果を紹介する。

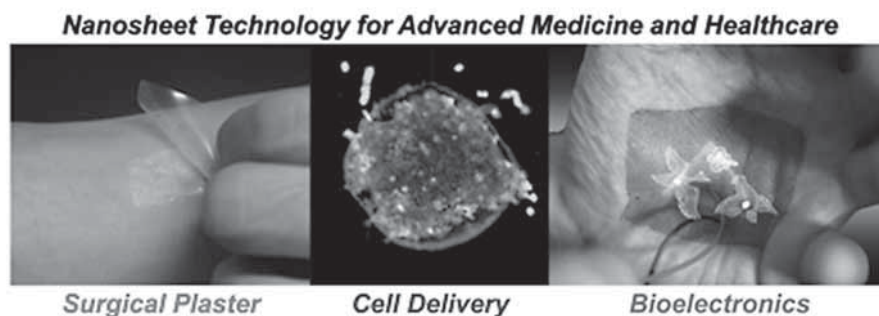


Figure1 Seminal feature of polymer nanosheets<sup>1)</sup>.

#### 【文献】

- 1) *Polymer J.* **2016**, 48, 773.
- 2) *Adv. Mater.* **2007**, 19, 3549
- 3) *Macromolecules* **2013**, 46, 395.
- 4) *Adv. Funct. Mater.* **2009**, 19, 2560.
- 5) *Surgery* **2010**, 148, 48.
- 6) *Biomaterials* **2010**, 31, 6269.
- 7) *Adv. Mater.* **2014**, 26, 1699.
- 8) *Nano Lett.* **2013**, 13, 3185.
- 9) *Adv. Mater.* **2014**, 26, 3290.
- 10) *Adv. Mater. Technol.* in press (DOI: 10.1002/admt.201600064).
- 11) *Soft Matter*, **2011**, 7, 10642.
- 12) *J. Mater. Chem. C* **2015**, 3, 6539.
- 13) *ACS Appl. Mater. Interfaces* in press (DOI: 10.1021/acsami.6b06075).

## がん治療用光増感剤としてのアルブミン-金属ポルフィリン錯体の開発

○秋山元英, 小松晃之

中央大学理工学部

moakiya@kc.chuo-u.ac.jp

【緒言】 光線力学療法 (Photodynamic Therapy: PDT) は, がん組織に集積させた光増感剤に低出力の光を照射することで活性酸素種を産生し, 標的細胞を選択的に死滅させる低侵襲ながん治療法である. PDT で用いられる光増感剤には, 生体適合性, がん集積性, 高い活性酸素生成能が求められる. 一方, ヒト血清アルブミン (HSA) は血漿蛋白質の約 60% を占める単純蛋白質であり, 様々な代謝産物や薬物と結合する. 近年, この HSA が薬物送達システムの有用な担体として注目されるようになってきた<sup>1)</sup>. 我々は, 天然のポルフィリンであるプロトポルフィリン IX の中心に Zn および Mg を有する Zn プロトポルフィリン IX (ZnPP), Mg プロトポルフィリン IX (MgPP) を結合させた HSA-金属ポルフィリン (HSA-MPP, M: Zn, Mg) 錯体を合成し, その光化学特性と光線力学活性を明らかにしている. 本報ではその成果の一端を紹介したい.

【実験】 HSA (wild type) [HSA (wt)] および HSA (I142H/Y161F) 変異体 [HSA (His)] の水溶液に, MPP の DMSO 溶液を混合し ([HSA]/[MPP]=1.0), 遠心限外ろ過により DMSO を除去することで HSA-MPP 水溶液を調製した. HSA-MPP の光化学特性は, 紫外可視吸収スペクトル, 蛍光スペクトル, レーザーフラッシュホトリシススペクトル測定により解析した. また, 光線力学活性およびその作用機序は, ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞を用いて評価した.

【結果と考察】 HSA (wt) に包接された MPP の中心金属には Tyr-161 が軸配位するが, HSA (His) では変異導入した His-142 が軸配位する<sup>2)</sup>. 得られた錯体の励起三重項寿命 ( $\tau T$ ) は, 軸配位子によらず 7.4~11 ms と長かった. 大きな  $\tau T$  を示す HSA-MPP は, がん組織内の低酸素領域においても効率高く活性酸素を生成するものと考えられる.

各錯体の共存下で光照射した HeLa 細胞の生存率は, 増感剤の濃度に依存して減少した. HSA (wt)-ZnPP が最も高い活性を示し, 細胞生存率の半数阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) は  $0.40 \mu M$  であった. 各錯体の活性を比較すると, HSA (wt)-ZnPP > HSA (His)-ZnPP > HSA (wt)-MgPP > HSA (His)-MgPP であった. また, HSA (wt)-ZnPP は錯体分子として細胞に取り込まれており, その取り込み量には中心金属による違いは見られなかった. 各錯体の一重項酸素生成効率 ( $\Phi \Delta$ ) の順序は光線力学活性と良い一致を示した. 以上の結果から,  $\Phi \Delta$  が光線力学活性を決定する重要な要因であることが明らかとなった.

【結論】 長い励起三重項寿命を有する HSA-MPP はがん細胞に取り込まれ, 一重項酸素生成効率に依存した光線力学活性を発揮する.

## 【文献】

- 1) F. Kratz, et al., *J. Controlled Release*, **2012**, 157, 4.
- 2) T. Komatsu, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 16297.

### 人工酸素運搬体 HemoAct™ を用いた脳虚血再灌流障害に対する脳保護療法

○月花正幸<sup>1</sup>, 鐙谷武雄<sup>1</sup>, 小松晃之<sup>2</sup>, 船木亮佑<sup>2</sup>, 栗栖宏太<sup>1</sup>, 中山若樹<sup>1</sup>, 数又 研<sup>1</sup>, 寶金清博<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 北海道大学医学部医学研究科 脳神経外科, <sup>2</sup> 中央大学理工学部 応用化学科

m.gekka@live.jp

**【背景】** 我々は以前より、人工酸素運搬体が脳虚血再灌流障害に有効であることを報告している<sup>1)</sup>。(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター(製剤名: HemoAct™)<sup>2)</sup>は、粒径 10nm の小さな人工酸素運搬体であり、またアルブミンによる循環血漿量増加作用もあると考えられるので、内径の小さい微小血管においても良好な灌流状態を維持する能力が高いと期待される。特に微小循環障害が本態である脳虚血再灌流障害において、より強い脳保護効果を発揮しうるものと期待される。

**【目的】** ラット一過性中大脳動脈閉塞モデル(tMCAO)において、再灌流時に HemoAct を再開通動脈に灌流し、虚血再灌流障害に対する脳保護効果、微小循環における HemoAct の局在・酸素運搬能を検討した。

**【対象・方法】** 雄 SD ラットで糸栓子による tMCAO モデル(2 時間虚血)を行い、通常灌流群(Control 群)、再開内頸動脈より 5% アルブミン溶液灌流群(HSA 群)、5% アルブミン溶液にて 2 倍希釈した HemoAct 灌流群(50%HemoAct 群)、HemoAct 灌流群(HemoAct 群)の 4 群を作成した。24 時間後に 18point scale で神経症状を評価、sacrifice して TTC 染色で脳梗塞、脳浮腫の範囲を評価、Western blotting にて MMP-9 の発現、活性酸素の産生(4-HNE)を検討した。また、再灌流後 0, 2, 6 時間の時点で sacrifice し、微小血管の経時的変化(vWF の免疫染色と電子顕微鏡による評価)、微小血管内における HemoAct の局在(ヒトアルブミン抗体による免疫染色による評価)を検討した。

**【結果】** 神経症状は HemoAct 群で他の 3 群に対して有意に軽かった( $p < 0.05$ )。脳梗塞/脳浮腫の範囲は、Control 群: 55.2%/26.4%・Vehicle 群: 53.2%/27.1%・50%HemoAct 群: 27.1%/15.2%・HemoAct 群: 20.2%/14.1%で、脳梗塞( $P < 0.01$ )脳浮腫( $P < 0.05$ )ともに HemoAct 群で Control 群に対して有意に小さかった。MMP-9 の発現・活性酸素の産生( $P < 0.05$ )も HemoAct 群で有意に抑制された。また、HemoAct 群で Control 群に対して、再灌流 6 時間の時点で微小血管の狭小化抑制( $P < 0.05$ )を認め、狭小化した微小血管内での HemoAct の局在が確認できた。

**【結論】** 脳虚血再灌流障害に対し、HemoAct は非常に強い脳保護効果を発揮した。臨床において、tPA 治療、血管内血栓除去治療との組み合わせにより脳梗塞治療に新たな可能性が期待される。

#### 【文献】

- 1) Shimbo D, Abumiya T, Shichinohe H, Nakayama N, Kazumata K, Houkin K, et al., *Brain Research*. **2014**, 1554:59-66.
- 2) Tomita D, Kimura H, Hosaka Y, Daijima R, Komatsu T, et al., *Biomacromolecules*. **2013**, 14:1816-1825.

### イヌ用・ネコ用人工酸素運搬体 (HemoAct-C™, HemoAct-F™) の開発

○横幕恭子<sup>1</sup>, 呉石萌佳<sup>1</sup>, 秋山元英<sup>1</sup>, 木平清人<sup>2</sup>, 小松晃之<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 中央大学理工学部, <sup>2</sup> 宇宙航空研究開発機構 (JAXA)

komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

**【緒言】** 日本は犬猫飼育頭数 1979 万頭のペット超大国であるが、輸血については未だ十分な体制が整っていないため、動物用人工血液の開発に大きな期待が集まっている。本研究では、まず人工血漿増量剤となる遺伝子組換えイヌ血清アルブミン (rCSA) およびネコ血清アルブミン (rFSA) を産生し、その構造を明らかにした。さらにウシヘモグロビン (Hb) を rCSA または rFSA で包み込んだ (ヘモグロビン-アルブミン) クラスタ (製剤名: HemoAct-C™, HemoAct-F™) を合成し、イヌ用およびネコ用人工酸素運搬体としての機能を評価したので報告する。

**【実験】** rCSA および rFSA は *Pichia* 酵母発現系を用いて産生した。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、物性を評価した。また Hb 溶液に Succinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) を加え<sup>1,2)</sup>、分子表面にマレイミド基を構築した後、rCSA または rFSA と反応させることにより HemoAct-C™, HemoAct-F™ を合成した。蛋白質/Hb 定量から平均アルブミン結合数を決定、等電点電気泳動から *pI* 値を測定した。HemoAnalyzer 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。

**【結果と考察】** rFSA の発現はこれまで前例がなく、今回初めて産生に成功した。rFSA の HPLC 曲線、Native-PAGE, SDS-PAGE, CD スペクトルは血漿由来の FSA とよく一致した。また rCSA の X 線結晶構造解析からその立体構造を初めて明らかにした。rCSA は 6 つのサブドメインからなり、ヒト血清アルブミン (HSA) に極めて類似した構造を持つ。HemoAct-F™ は Hb 1 分子に rFSA が平均 3 分子結合したコア-シェル型構造であり、*pI* 値 (4.8) は rFSA の値と同等であった。HemoAct-C™ および HemoAct-F™ の  $P_{50}$  (9 Torr),  $n$  (1.4~1.6) はヒト用 HemoAct™ と等しく、有効な人工酸素運搬体として機能することが示された。

**【結論】** 高純度 rCSA, rFSA を産生し、その物性と構造を明らかにした。新たに HemoAct-F™ を合成し、酸素結合能を解明した。rCSA, rFSA はイヌ用およびネコ用人工血漿増量剤として、HemoAct-C™, HemoAct-F™ は人工酸素運搬体として動物医療に大きな貢献をもたらすものと期待される。

#### 【文献】

- 1) D. Tomita, T. Kimura, H. Hosaka, Y. Daijima, R. Haruki, K. Ludwing, C. Böttcher, T. Komatsu, *Biomacromolecules*, **2013**, *14*, 1816.
- 2) K. Yamada, K. Yokomaku, R. Haruki, K. Taguchi, S. Nagao, T. Maruyama, M. Otagiri, T. Komatsu, *PLoS One*, **2016**, *11*, e149526.

### 柔軟性と密着性を有する高分子ナノシート型電極を用いた生体信号計測技術の開発

○山岸健人<sup>1</sup>, グレコ・フランチェスコ<sup>1,2</sup>, 武岡真司<sup>1</sup>, 藤枝俊宣<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> 早大院先進理工, <sup>2</sup> イタリア技術研究所 マイクロ・バイオロボティクスセンター, <sup>3</sup> 早大高等研, <sup>4</sup> JST さきがけ  
kento-yamagishi@ruri.waseda.jp

**【緒言】** 超高齢社会を迎えた我が国において、健康寿命の増進を支える生体計測技術の開発は喫緊の課題である。加えて、先端計測技術は、2020年の東京オリンピック・パラリンピック開催に向けたアスリートの「ハイパフォーマンスサポート事業」の一つに取り上げられており(文部科学省 スポーツ・青少年局 平成28年度概算要求主要事項〈スポーツ庁〉)、我が国独自のスポーツ文化を発展させる上でも極めて重要な課題と言える。我々はこれまでに、導電性高分子ポリ(3,4-エチレンジオキシチオフェン):ポリスチレンスルホン酸(PEDOT:PSS)からなる膜厚数十～数百 nm の自己支持性超薄膜(導電性ナノシート)を開発してきた<sup>[1-3]</sup>。本研究では、この導電性ナノシートの高い柔軟性と密着性を利用し、運動・発汗時にも安定に生体電気信号を検出可能な生体貼付型電極の開発を試みた。

**【実験】** マイクログラビア印刷機を用いたロール・ツー・ロール(R2R)方式にて、ポリ DL 乳酸(PDLLA)層および PEDOT:PSS 層からなる2層型導電性ナノシートを調製した。導電性ナノシートを前腕部に貼付し、高温多湿環境下(気温:26.5℃, 湿度:71%)で激しい運動を行った前後での形態変化および抵抗値を計測することで、発汗に対する耐久性を評価した。さらに、皮膚上に貼付した導電性ナノシートによって、筋収縮時に発生する表面筋電位の計測を試みた。

**【結果と考察】** 支持層(PDLLA)と導電層(PEDOT:PSS)からなる2層型の導電性ナノシート(膜厚:150-350 nm)は、R2R方式にて幅12 cm の PP 基板上に連続的(0.2 m/min)かつ大面積(12 cm×20 m)に調製できた(FI2015 A000065 Patent pending)。導電性ナノシートは、粘着テープからなる支持フレームを用いて基板から剥離後、空気中で安定に自己支持性を有し、粘着剤・接着剤を介さずに皮膚表面に追従性良く密着した。また、基板に塗布する前の PEDOT:PSS 溶液にブチレングリコールを5%添加し、製膜後に加熱処理(140℃, 15分)することで、PEDOT:PSS ナノシート表面にミクロな構造変化が生じ、導電率が3桁上昇(0.3→500 S/cm)することを見出した。手指・指などの関節部に貼付した導電性ナノシートは、連続的な屈曲運動に対して抵抗値をほぼ一定に保ち、皮膚に対する密着性を維持した。また、発汗を伴う激しい運動の前後でも皮膚から脱離することなく、シート抵抗の値も筋電測定に十分な2 kΩ以下を維持した。さらに、導電性ナノシートを電極として用いて上腕筋収縮時に発生する表面筋電位を計測したところ、市販の医療用生体電極パッドと同等のシグナル・ノイズ比にて計測可能であった。

**【結論】** 導電性ナノシートは、その超薄性に由来する柔軟性と密着力によって、生体組織表面にやさしくフィットするため、装着時の違和感がなく、剥がす際の組織へのダメージ(角質の剥がれ等)も最小限に抑えられる。したがって、アスリートの運動計測から幼児、高齢者、障がい者のヘルスケアにいたるまで幅広い応用が期待される。

#### 【文献】

- 1) F. Greco *et al.*, *Soft Matter*, **7**, 10642 (2011).
- 2) A. Zucca, K. Yamagishi *et al.*, *J. Mater. Chem. C*, **3**, 6539 (2015).
- 3) K. Yamagishi *et al.* in *Flexible and Stretchable Medical Devices* (eds K. Takei) (Wiley-VCH), in press.

### ヘモグロビンのメト化を抑制する機能を有する人工赤血球

○山田孫平, 久禮智子, 松平 崇, 山本恵三, 酒井宏水

奈良県立医科大学 化学教室

m-yamada@named-u.ac.jp

**【緒言】** 赤血球内に高濃度に存在するヘモグロ빈はメトヘモグロ빈に自動酸化(メト化)されるが, 赤血球内に存在する NAD(P)H を補酵素とするメトヘモグロ빈還元酵素, カタラーゼ, 或いはスーパーオキシドデスムターゼなどにより生体内ではメトヘモグロ빈の含量が低く抑えられている. しかし, 酵素系を一切排除した高純度 Hb 溶液を使用した人工赤血球においては, 酵素類によるメト化抑制効果が期待できないので, ヘモグロ빈のメト化は課題の一つであり, メチレンブルーおよびその類縁体等の検討が進められている. 我々は更に, メト化抑制可能な物質について検討を進め, 新しい知見が得られたので報告する<sup>1)</sup>.

**【実験】** ヒト期限切れ血液から高純度に精製したヘモグロ빈(HbO<sub>2</sub>, 約 10 g/dL)に対し, メト化抑制に期待できる抗酸化物質を添加し, 37℃の熱負荷により, メト化抑制の度合いを調べた. 期待できる抗酸化剤としては, 人体に毒性の少ない各種アミノ酸, アルブミンなどの蛋白質, 水溶性高分子, 生体内に存在する低分子化合物等を添加して, メト化抑制効果をスクリーニングした. その中で効果のあるものについて, リポソーム化した人工赤血球(Hb-V)とし, 至適条件について検討した.

**【結果と考察】** スクリーニングの結果より血液中にも存在する補酵素(1)が最も効果が見られ, 同じように Hb-V についても効果が確認できた.

**【結論】** 試験した他の抗酸化剤に比べ抑制率について優位に効果がみられ, その作用機序についてさらに検討を進め, 安定な人工赤血球の作製に貢献したい.

#### 【文献】

- 1) Sakai H. and Yamada M. (2016) Artificial red cells containing function to suppress methemoglobin formation. *Japanese Patent Application*. JP2016-040494

### 非アルコール性脂肪性肝疾患に対する一酸化炭素デリバリーの有用性評価

○柳澤洋輝<sup>1</sup>, 前田仁志<sup>1</sup>, 皆吉勇紀<sup>1</sup>, 永尾紗理<sup>1</sup>, 田口和明<sup>3</sup>, 渡邊博志<sup>1,2</sup>, 小田切優樹<sup>1,3</sup>, 丸山 徹<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 熊本大学薬学教育部, <sup>2</sup> 熊本大薬・育薬フロンティアセンター, <sup>3</sup> 崇城大学薬学部

164y1007@st.kumamoto-u.ac.jp

**【緒言】** 本邦では、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の罹患者数が急増し、肝硬変・肝癌への進展が懸念される。NASHは、肝臓への脂肪蓄積・サイトカイン・酸化ストレス等多様な因子の同時多発的な相互作用により発症するため、それらを包括的に制御可能な薬剤の開発が切望されている。生理活性ガスである一酸化炭素(CO)は、抗酸化・抗炎症作用を初めとした多面的な活性を介して強力な生体保護作用を発揮することから、近年創薬シーズとして注目されているが、利便性・安全性等の問題から未だ臨床応用には至っていない。我々は、赤血球(RBC)のCOに対する高い親和性を利用して臨床応用可能なCO放出製剤であるCO付加RBC(CO-RBC)を作成し、本剤が虚血再灌流障害に対して優れた肝保護効果を発揮することを見出している。本研究ではCO-RBCの新たな応用を探索すべく、NASHモデルマウスに対するCOデリバリーの有効性を評価した。

**【実験】** マウスにメチオニン・コリン欠損食餌(MCDD)を4週間負荷することでNASHモデルマウスを作成し、CO-RBCの有効性及び作用メカニズムを検討した。より実臨床に近い条件で検討を行うべく、肝脂質がプラトーに達したMCDD負荷2週間経過段階よりCO-RBCの投与(1400mg Hb/kg, i.v.)を開始し、残り2週間は週2回の投与を継続した。

**【結果・考察】** MCDD負荷により肝臓中トリグリセライド(TG)量及び肝障害マーカー(AST, ALT)の有意な上昇が見られたことから、モデルの妥当性が示された。CO-RBC投与群において、肝TG量及び血漿中AST, ALTが有意に減少し、治療効果が認められた。この結果は、HE染色による肝臓の組織学的評価の結果からも確認された。さらに、NASHの最終的な病態イベントである肝線維化の程度をマッソントリクローム染色、肝臓中ヒドロキシプロリンの定量及びRT-PCR法による線維化関連遺伝子発現解析にて評価したところ、CO-RBC投与群で著大な抑制が認められた。続いて、CO-RBCの肝保護作用メカニズム解明を目的に、脂質代謝に関わる遺伝子発現をRT-PCR法にて評価したところ、CO-RBC投与群では脂質代謝関連遺伝子(PPAR- $\alpha$ , L-FABP, PPAR- $\gamma$ )の発現が有意に上昇しており、 $\beta$ 酸化のバイオマーカーである血中ケトン体の上昇が認められた。さらに、肝組織における炎症及び酸化ストレスを評価した結果、CO-RBC投与により炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ )の産生が抑制され、脂質過酸化物質(マロンジアルデヒド, 4-ヒドロキシノネナール), 及びタンパク質の酸化代謝産物(ニトロチロシン)も著明に減少し、抗酸化・抗酸化作用も認められた。

**【結論】** CO-RBCより肝臓へと供給されたCOは、NASHモデルマウスの肝機能障害や肝線維化、肝臓の組織病理学的変化を著明に改善した。これはCOの脂質代謝亢進作用及び抗酸化・抗炎症作用など、多様な機序に起因する可能性が推察された。本研究から、NASHに対する包括的な治療戦略としてCO-RBCの有用性が示された。

## 皮膚欠損治療に向けた幹細胞担持多孔質ナノシートの開発

○西脇圭亮<sup>1</sup>, 青木伸峰<sup>2</sup>, 木下 学<sup>3</sup>, 齋藤大蔵<sup>4</sup>, 武岡真司<sup>1</sup>, 藤枝俊宣<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup> 早大院先進理工, <sup>2</sup> 防衛医科大学形成, <sup>3</sup> 防衛医科大学免疫微生物, <sup>4</sup> 防衛医学研究センター外科, <sup>5</sup> 早大高等研, <sup>6</sup> JST さきがけ  
fdltu-u75@asagi.waseda.jp

**【緒言】** 皮膚欠損や難治性潰瘍のような慢性的な皮膚欠損に対し, 近年, iPS 細胞や幹細胞などを用いた細胞移植療法が注目されている。しかし, これらの細胞を生体移植するための迅速かつ簡便な細胞移植基材の開発が求められる。本報では, 生体適合性を有する高分子超薄膜(ナノシート)の製膜・加工技術を利用し, 自己支持性を有する多孔質ナノシートを調製し, フィブロネクチン処理を施すことで, 迅速な細胞担持および集積を可能とした細胞足場材料の開発に関して報告する。また, 細胞担持した多孔質ナノシートを多層化することにより, 治癒能を高めた組織体の構築も試みた。

**【実験】** ポリビニルアルコール(PVA,  $M_w$ : 13-23 kDa)を塗布した PET フィルム上に, ポリ乳酸(PDLLA,  $M_w$ : 300-600 kDa)およびポリスチレン(PS,  $M_w$ : 280 kDa)からなる混合溶液を塗布し, 海・島構造を有する相分離ナノシートを調製した。これをシクロヘキサンに浸漬させて, PS 領域を選択的に除去することで多孔質ポリ乳酸ナノシート(厚さ: 150 nm, 開孔率: 40%)を得た<sup>[1,2]</sup>。次に, プラズマ処理(30 s, 35 mA)にてフィブロネクチン(5.0 mg/cm<sup>2</sup>)を塗布した多孔質ナノシート表面に脂肪由来幹細胞(Adipose-derived stem cells; ASCs)を播種することで細胞担持ナノシートを作製した。この細胞担持ナノシート(4.0 × 10<sup>4</sup> cells/sheet)を 3 層重ねた後, 細胞数を計測することで積層操作に伴う細胞成長への影響を検討した。

**【結果と考察】** 得られた多孔質ナノシートは膜厚 150 nm, 開孔率 40%, 平均孔径 4 μm であった。多孔質ナノシート上において培養された ASCs の増殖性は平滑なものと同程度のものではあった。また, 多孔質ナノシートまたは平滑なナノシートを ASCs 上に被覆して培養した結果, 多孔質ナノシートを被覆した群では, 被覆していない群と同様の増殖性が見られたのに対し, 平滑なナノシートを被覆した群ではその増殖性は約 0.7 倍に抑えられた。これは多孔質ナノシートと平滑なナノシートのタンパク透過能の違いによるものであると考えられる。次に, ASCs を担持した多孔質ナノシートを積層した結果, 2 層または 3 層からなる細胞組織体の作製に成功した。これは Cell Tracker Green または Cell Tracker Blue で下層と上層の ASCs を染め分けることで確認し, 積層による細胞数の増加も確認された。さらに, 積層数に従ってタンパク質の分泌量の増加が確認された。

**【結論】** 多孔質ナノシート上に ASCs を播種し, 積層することで最大 3 層からなる細胞組織体の作製に成功した。今後は in vivo 実験における皮膚欠損に対する有効性を証明する予定である。

### 【文献】

- 1) Zhang H., Takeoka S., *Macromolecules*, **45**, 4315 (2012).
- 2) Fujie T., *et al.*, *Adv. Mater. Tech.*, in press, DOI:10.1002/admt.201600064

### ラット 20%血液交換モデルを用いた HemoAct™ の安全性評価

○岩崎 瞳<sup>1</sup>, 呉石萌佳<sup>1</sup>, 橋本 諒<sup>2</sup>, 河野光智<sup>2</sup>, 岩崎正之<sup>2</sup>, 小松晃之<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 中央大学理工学部, <sup>2</sup> 東海大学医学部  
komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

**【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-HSA<sub>3</sub>, 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<sup>1-3)</sup>. 本報では, ラット 20% 血液交換モデルを用い, 呼吸・循環動態観察, 血液学的検査および血液生化学的検査から HemoAct™の安全性を評価したので報告する.

**【実験】** 高純度ウシ Hb と HSA を二官能性架橋剤 N-[β-maleimidopropoxy]succinimide ester (BMPS) で結合後, 陰イオン交換クロマトグラフィー (Q Sepharose Fast Flow) により未反応の HSA を除去し, Hb-HSA<sub>3</sub> (HemoAct™) を得た ([Hb]=5 g/dL). Wistar 系雄性ラットに対し, HemoAct™を用いて 20% 血液交換後, 平均動脈血圧 (MAP) および心拍数 (HR) の測定, 血液ガス分析, 血球数の測定を行った. 採血および測定時点は, 血液交換前, 血液交換直後, 1, 3, 6 時間後の計 5 時点とした. また, 6 時間経過後に採血した全血を遠心分離し, 得られた血清について血液生化学的検査を実施した.

**【結果と考察】** HemoAct™による 20% 血液交換後も, MAP, HR および呼吸数は安定して推移した. 動脈血酸素分圧 (PaO<sub>2</sub>), 静脈血酸素分圧 (PvO<sub>2</sub>) および pH は HSA 投与群と同様の挙動を示した. ヘマトクリット値および赤血球数については血液交換直後に交換前の約 70% まで減少し, その後一定となった. 予想より低値を示したのは, 膠質浸透圧の高い高濃度蛋白質溶液の投与により, 組織から血管内に水分が取り込まれ, 血漿量が若干増大したためと考えられる. また, 血液生化学的検査からも HemoAct™の安全性が確認できた.

**【結論】** ラット 20% 血液交換モデルにおける呼吸・循環動態観察, 血液学的検査および血液生化学的検査から HemoAct™の高い安全性が明らかとなった.

#### 【文献】

- 1) D. Tomita, T. Kimura, H. Hosaka, Y. Daijima, R. Haruki, K. Ludwig, C. Böttcher, T. Komatsu, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1816.
- 2) 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.
- 3) K. Yamada, K. Yokomaku, R. Haruki, K. Taguchi, S. Nagao, T. Maruyama, M. Otagiri, T. Komatsu, *PLoS One* **2016**, *11*, e149526.

### 腎線維化マウスに対するビタミン D 受容体活性化剤とビタミン A 誘導体の治療効果

○ビー・ジュン<sup>1</sup>, 西田健人<sup>1</sup>, 藤村留衣<sup>1</sup>, 今福匡司<sup>1</sup>, 富永結葉<sup>1</sup>, 渡邊博志<sup>1,2</sup>, 小田切優樹<sup>3,4</sup>, 丸山 徹<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 熊本大学薬学教育部, <sup>2</sup> 熊本大薬・育薬フロンティアセンター, <sup>3</sup> 崇城大学薬学部

bijing0418@hotmail.com

**【緒言】** 慢性腎臓病(CKD)は進行性かつ不可逆的な病態を呈する国民病であるが、未だ有効な治療薬が存在しない。CKDの原因疾患は多様であるが、末期腎不全に至る共通した経路として腎線維化過程がある。これまでの知見から、腎線維化には免疫異常と炎症が重要な役割を果たしているため、これらを制御できる薬剤の開発が切望されている。近年、ビタミンD受容体活性化剤及びビタミンA誘導体が、本来のビタミン作用に加えて、免疫調整効果や抗炎症作用などの多面的生物活性を有することが見出され、新たな創薬シーズとして注目されている。本研究では、腎線維化モデルに対する活性型ビタミンD[1,25(OH)<sub>2</sub>D]及び*all-trans* レチノイン酸(atRA)の治療効果と作用機序について検討した。

**【実験】** 常法に従い、ICRマウスの片側尿管を結紮(unilateral ureteral obstruction, UUO)することで腎線維化モデルを作製した。UUO処置をしたICRマウスに、1,25(OH)<sub>2</sub>DあるいはatRA(5mg/kg)を1週間投与した。

**【結果と考察】** ICRマウスの場合、UUO処置1週間後には、線維化マーカーであるα-SMA及びTGF-βのmRNAやタンパク質発現量あるいはヒドロキシプロリン量が増加していた。この病態モデルマウスに1,25(OH)<sub>2</sub>Dを連日経口投与(0.3μg/kg)したところ、1週間後にはα-SMA及びTGF-βのmRNA発現抑制が観察された。また、α-SMA発現タンパク量及びヒドロキシプロリン量も1,25(OH)<sub>2</sub>D処置により減少した。その反面、1,25(OH)<sub>2</sub>D投与群では、投与3日目よりミネラル代謝系の副作用である体重減少や高カルシウム血症が出現した。1,25(OH)<sub>2</sub>Dと同様、atRAの連日経口投与(5mg/kg)群でも、UUO処置マウスにおける線維化マーカーのmRNAおよびタンパク質発現量の低下が観察された。

**【結論】** 1,25(OH)<sub>2</sub>D及びatRAは腎線維化モデルマウスに対して抗線維化効果を発揮した。この効果には、1,25(OH)<sub>2</sub>D-VDR/RXR及びatRA-RAR/RXR経路を介した免疫調節能や抗炎症作用が関与しているかもしれない。

#### 【文献】

- 1) Mouthiers A, Mejdoubi N, Baillet A, et al., BBA-Gene Stru Exp, 2004, 1678 (2): 135-144.
- 2) Komori H, Watanabe H, Shuto T, et al., J Biol Chem, 2012, 287 (36): 30688-30700.
- 3) Gemelli C, Martello A, Montanari M, et al., Exp Cell Res, 2013, 319 (20): 3201-3213.

# 血中に存在する内因性 CO の選択的除去により引き起こされる生体内反応

○峯岸彩夏, 北岸宏亮

同志社大学理工学部

hkitagis@mail.doshisha.ac.jp

**【緒言】** 一酸化炭素(CO)は血中のヘモグロビン(Hb)と強く結合する有毒ガスとして知られている一方で, 生体内で常に微量生成している. CO はヘムがヘムオキシゲナーゼ(HO)によって代謝分解される際の代謝産物として産生しており, そのほとんどは血管内に移行し血中で Hb と結合して, CO-Hb として循環している. CO は細胞内においては抗炎症効果や血圧降下作用を示すことが報告されているが, 血中における CO の生理的役割の詳細は未だ検討されていない. 私たちはこれまでに血中 CO を選択的に捕捉する CO 除去剤 hemoCD の開発に成功している. そこで, hemoCD をマウスに投与し, 血中 CO 除去時における生体内反応の観測を行うことで, CO の血中における役割解明を試みた.

**【実験】** マウス腹腔に hemoCD(1 mM, 0.15 mL)を投与し, 投与後排出された尿を回収した. hemoCD 投与 30 分, 90 分, 180 分後にマウスを安楽死させ, 血液の採取および肝臓の摘出を行った.

**【結果と考察】** 尿の UV-vis スペクトルを測定し, 尿中に CO が結合した hemoCD(CO-hemoCD)が含まれていることを確認した. 血液のガスクロマトグラフィー測定により血中の CO-Hb 量を定量したところ, hemoCD 投与 30 分後に CO-Hb 量は著しく減少し, その後徐々に定常値まで回復した. 以上の結果より, マウス腹腔に投与した hemoCD は血中へ移行し, 血中の CO-Hb から CO を捕捉し, CO-hemoCD として尿中に排出されることがわかった. 次に肝臓内における CO 産生酵素, HO-1 の mRNA 発現量を real-time PCR により定量したところ, hemoCD 投与 90 分後に著しい発現誘導が観測された. hemoCD により生体内 CO 濃度が減少すると, その生成を促進するように CO 産生酵素 HO-1 の発現が誘導されるといったフィードバック機構が働くと考えられる<sup>1)</sup>.

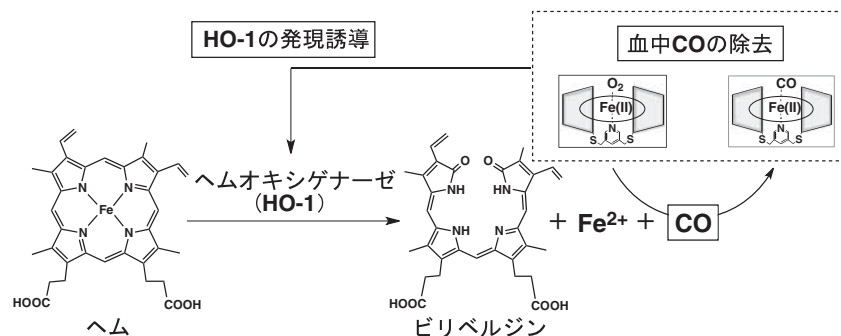


図1. 生体内 CO のフィードバック機構スキーム

**【結論】** CO 除去剤 hemoCD は, 血中の CO-Hb から CO を捕捉し, 尿中に CO 錯体として排出された. 生体内には CO 濃度を一定に保つしくみ, 恒常性維持機構が存在することが示唆された.

## 【文献】

- 1) H. Kitagishi, S. Minegishi, A. Yumura, S. Negi, S. Taketani, Y. Amagase, Y. Mizukawa, T. Urushidani, Y. Sugiura, and K. Kano, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5417–5425.

### 人工血小板 H12-(ADP)liposomes を用いた蘇生輸血の止血救命効果の評価

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

<sup>1</sup> 早稲田大学大学院先進理工学術院, <sup>2</sup> 防衛医科大学校生理学講座, <sup>3</sup> 同免疫微生物学講座, <sup>4</sup> 同救急部, <sup>5</sup> 防衛医科大学校・防衛医学研究センター外傷研究部門  
m.takikawa@akane.waseda.jp

#### 【緒言】

防ぎうる外傷死の主因は凝固障害, ショックを伴う大量出血であり, 治療には赤血球, 血漿, 血小板をバランスよく組み合わせた蘇生輸血が一義的とされる<sup>1)</sup>. 一方で血小板製剤は長期保存が難しく緊急時の大量使用に向かないため, これを人工血小板投与に置換した蘇生輸血が求められる. 本研究では, 大量調製, 長期保存が可能な人工血小板 H12-(ADP)liposomes<sup>2)</sup>を用いた蘇生輸血の止血救命効果を易出血病態の大量出血モデル動物にて評価した.

#### 【実験】

家兎(Ave. 2.4kg)を, 脱血, 洗浄赤血球返血を繰り返すことにより血小板減少病態にした. 開腹後生検パンチで肝損傷( $\phi=5$ mm)を作製して出血させ, 直後から5分間バルーンで損傷部を圧迫した. 圧迫中にPRP(Platelet-Rich Plasma, 濃厚血小板血漿)(n=8), PPP(Platelet-Poor Plasma, 乏血小板血漿)(n=4), H12-(ADP)liposomes(20mg/kg, PPPで希釈)(n=8)を30mL投与した. バルーン解放後10分間の出血量, および出血時間を最大120分間計測した. 止血を確認後, 赤血球([HB]  $\approx 16.2$ g/dL)を輸血し, 血行動態の改善を試みた. 生存率を術後48時間まで計測した.

#### 【結果と考察】

家兎は脱血・洗浄赤血球返血の繰り返しにより血小板値, 平均動脈圧がそれぞれ $38 \times 10^3/\mu\text{L}$ , 36mmHgへ低下した. PRP投与群が43分, H12-(ADP)liposomes投与群が66分で止血したのに対し, PPP投与群は全例止血不可により3時間以内に死亡した. また, 肝パンチから10分間の出血量はPRP投与群, H12-(ADP)liposomes投与群でそれぞれ17.5g, 16.0gであった. 止血完了後の赤血球輸血により血行動態が維持ないしは改善され, PRP投与群, H12-(ADP)liposomes投与群の生存率はそれぞれ63%, 50%であった. PRP投与群, H12-(ADP)liposomes投与群の止血時間には有意傾向があったが, 出血量, 赤血球輸血後平均動脈圧, 生存率に統計学上の有意差はなかった.

#### 【結論】

凝固障害を伴う大量出血モデル動物において, 人工血小板 H12-(ADP)liposomes と赤血球輸血を組み合わせた蘇生輸血は, 従来の蘇生輸血と同等の止血救命効果を示した.

#### 【文献】

- 1) Holcomb JB et al., *Annals of Surgery*. **2008**, 248, 447-458
- 2) Y. Okamura et al., *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **2009**, 7, 470-477

## 特別セッション‘Cutting Edge’-G1

### クラッシュ症候群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

○丸山 徹<sup>1,2</sup>, 大柿 滋<sup>1</sup>, 永崎太清<sup>1</sup>, 柳澤洋輝<sup>1</sup>, 永尾紗理<sup>1</sup>, 田口和明<sup>3</sup>, 渡邊博志<sup>1,2</sup>, 小田切優樹<sup>3</sup>

<sup>1</sup>熊本大学薬学部, <sup>2</sup>熊本大薬・育薬フロンティアセンター, <sup>3</sup>崇城大学薬学部  
tomaru@gpo.kumamoto-u.ac.jp

**【緒言】** クラッシュ症候群は、災害時などで生じる倒壊物の下敷きになることで、四肢が長時間圧迫を受けた後に、救助などの圧迫解除により急速に出現する骨格筋の損傷と、これによって引き起こされる全身症状を呈する症候群であり、阪神大震災や尼崎列車脱線事故など、災害時において認識されるようになってきた。先般の熊本地震でもクラッシュ症候群による死亡例が報告されている。本疾患に対する治療は、対処療法が主であり、未だ友好的治療法が確立しておらず、医療施設だけでなく、災害現場でも使用可能な薬剤の開発が切望されている。これまで我々は、一酸化炭素付加赤血球(CO-RBC)がグリセロール誘発の横紋筋融解症モデルに対して優れた治療効果を発揮することを明らかにしてきた。本研究では、クラッシュ症候群モデルラットに対する CO-RBC の有効性について検討した。

**【実験】** 既報に従い、2.0kg 荷重下でステンレスパイプに巻き付けたゴムバンドをラットの両後肢装着し、5時間圧迫することでクラッシュ症候群モデルを作成した。

**【結果・考察】** ゴムバンドの5時間圧迫によりラットの両後肢は紫色に変色し、外観からも筋障害が示唆された。ゴムバンド装着5時間後に圧迫を解除し、その3時間後に1)saline, 2)赤血球(RBC), 3)CO-RBCを後投与し、その後の生存率を観察した。その結果、1)saline投与群では、圧迫解除後3時間目より死亡例が認められ、9時間以内に全例が死亡した。また、2)RBC投与群でも、圧迫解除後6時間目より死亡例が出現し、18時間内に全例が死亡した。対照的に、3)CO-RBC投与群では、解除後24時間においても全例が生存していた。解除後6時間目(投与開始後3時間目)に、腎機能(BUN, Cr)、血液生化学パラメータ(CPK, 乳酸, カリウム)、下肢運動機能(ドレッドミル試験)を評価したところ、病態群ではいずれの項目も顕著な悪化が認められたが、これらの変化はCO-RBC投与群でのみ有意に抑制された。その際、CO-RBC投与群では、炎症性サイトカインの産生や酸化ストレスマーカーの蓄積が抑制されていた。このことから、CO-RBCの治療効果はCOの抗炎症・抗酸化作用に由来している可能性が強く示唆された。

**【結論】** CO-RBCはクラッシュ症候群モデルラットに対して優れた治療効果を発揮した。簡便に用事調整が可能なCO-RBCは、医療施設だけでなく、災害現場でも使用可能なため、クラッシュ症候群に対する応用が期待される。

## 特別セッション‘Cutting Edge’-G2

### 赤血球の解糖系が産生する電子エネルギーの活用による人工赤血球(ヘモグロビン ベシクル)の機能持続効果

伊賀弓佳<sup>1</sup>, Karin Kettisen<sup>2</sup>, Leif Bülow<sup>2</sup>, ○酒井宏水<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 奈良県立医科大学 化学教室, <sup>2</sup>Department of Biotechnology, Lund University  
hirosakai@naramed-u.ac.jp

**【緒言】** 人工赤血球(ヘモグロビンベシクル, Hb-V)は、輸血代替として体内における酸素運搬機能と安全性が実証されている<sup>1)</sup>。Hb-VはmetHb還元酵素系を持たないため、投与後metHbが漸増する。電子伝達物質メチレンブルー(MB)を投与すると、赤血球解糖系で産生される還元型NAD(P)Hの電子エネルギーがMBを介してHb-Vに移動し、効率よくmetHbを還元することが明らかになり、動物投与試験でも実証している<sup>2)</sup>。本研究では、電子伝達系として作動しうるMBの類縁体について検討した<sup>3)</sup>。

**【実験】** MBを含む15種類の電子伝達物質の候補として、酸化還元電位、溶解性などをもとに次の物質を選んだ。dimethyl methylene blue (DMB), methylene green, azure A, azure B, azure C, toluidine blue (TDB), thionin acetate, phenazine methosulfate, brilliant cresyl blue, cresyl violet, gallocyanine, toluylen blue, indigo carmine, indigotetrasulfonate, およびMBである。metHb含有量を50%程度に調節したHb-Vとラット洗浄赤血球を混合したのち、37℃において電子伝達物質を混合し、metHb含有量の変化を追跡した。また、電子伝達物質の脂質膜との親和性、電子伝達物質と電子供与体との反応性、還元型電子伝達物質の酸素酸化速度についても検討した。

**【結果と考察】** 15種類の電子伝達系のうち、6種類については、脂質膜との親和性が低いこと、またNADHとの反応性が著しく低い或いは高いこと、さらに、還元体の酸素酸化の速度が速いため、十分なmetHb還元効果を示さなかった。他方、9種類についてはmetHb還元効果を示した。特に、phenothiazine色素であるDMBとTDBがMBと同等のmetHb還元効果を示した。DMBとMBは、NAD(P)Hによる還元が速いが、酸素酸化が遅いという特徴があり、好氣的雰囲気でのmetHb還元に適していると考えられた。

**【結論】** 本研究により、MBの性能に匹敵する電子伝達物質を見出した。NAD(P)Hによる還元が速く、還元体の酸素酸化が遅い特徴が見出されたので、今後動物投与試験によりHb-V内のmetHb還元効果を検証する予定である。MBはメトヘモグロビン血症の治療薬として使用されているが、MBよりも効率の高い物質が見つかる可能性がある。

#### 【文献】

- 1) 酒井宏水, 堀之内宏久, 東寛, 小田切優樹, 小林紘一. 人工血液 **2013**, 21, 36-48
- 2) Sakai H, Li B, Lim W, Iga Y. *Bioconjugate Chem.* **2014**, 25, 1301-1310.
- 3) Kettisen K, Bülow L, Sakai H. *Bioconjugate Chem.* **2015**, 26, 746-754.

## 特別セッション‘Cutting Edge’-G3

### リボソームにより誘導される抑制マクロファージの機能解析

○東 寛<sup>1</sup>, 吉田陽一郎<sup>1</sup>, 石羽澤恵美<sup>1</sup>, 高橋弘典<sup>1</sup>, 酒井宏水<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 旭川医科大学小児科学講座, <sup>2</sup> 奈良県立医科大学化学講座

azuma5p@asahikawa-med.ac.jp

**【はじめに】** HbV はリボソーム製剤であり, 生体内に大量に投与すると, 細網内皮系細胞に補足され, 分解・排泄される. 我々は, HbV を捕捉したラットの脾マクロファージに着目し, その機能の変化を検討してきた. その結果, リボソームを補足した脾マクロファージは, 一過性に, 免疫応答を抑制する事を明らかにした. また, 形態が Monocyte 様である, 抑制機序に NO の産生増加が関与する, cell-to-cell コンタクトが必要である, Con A 刺激による T 細胞の増殖を抑制する等が示された. これらの結果は, 当該細胞が myeloid derived suppressor cell (MDSC) 見なせる事を示唆している. しかしながら, 厳密な意味では, Con A 刺激が T cell receptor のみを介した T 細胞の増殖を誘導しているのかどうかは定かではなく, ラットの MDSC に特徴的な細胞表面マーカーはいまだ特定されていない事から, 当該細胞が MDSC と見なせるか否かはさらなる検討が必要であった. そこで, Con A 刺激にかえて, 抗 CD3 抗体により T 細胞に増殖刺激を加え, MDSC 様細胞の抑制効果を検討した. さらに, 免疫応答の制御に関与し, ヒトの MDSC の一部で高発現している事が報告されている B7-H3 分子に着目し, この分子がリボソームを捕捉したマクロファージで高発現しているか否かを検討した.

**【方法】** WKAH ラットに, 循環血液量の 20% 相当の HbV (約 3 mL) をエーテル麻酔下, 尾静脈より輸注し, 対照群には生理食塩水を輸注した. 投与 24 時間後に脾臓を摘出し, 単一脾細胞を調製した (2x10<sup>6</sup>/ml). 抗 CD3 抗体をコートした 96 well microplate に細胞浮遊液 200 ul を加え, 72 時間培養した. 細胞増殖は BrdU による細胞増殖アッセイキットを用いて評価した. 細胞表面マーカーの検討は, FACS Diva を用いて, リボソーム投与後 24 時間後に摘出した脾細胞について行った.

**【結果】** 抗 CD3 抗体刺激による非特異的 T 細胞増殖もリボソーム投与後の脾細胞では抑制された. また, リボソームを補足した脾マクロファージの一部では B7-H3 分子が高発現していることが確認された.

**【考案】** リボソーム投与により誘導される抑制性細胞は非特異的な T 細胞レセプター刺激による T 細胞増殖を抑制しかつ, その一部において B7-H3 の発現増強が認められた事から, リボソームを補足したマクロファージが MDSC としての特徴を備えていると言える.

## 特別セッション‘Cutting Edge’-G4

### 人工酸素運搬体の心筋活動電位不均一性と致死性不整脈誘発に及ぼす影響：Optical mapping 法を用いた出血性ショック心臓蘇生後における実験的検討

○橋本賢一，東村悠子，高瀬凡平

防衛医科大学校集中治療部

hashimotok@ndmc.ac.jp

出血性ショックにより平均全身血圧 40mmHg 以下の状態が遷延すると，不可逆性心筋障害が発生し“出血性ショック心臓(SHS)”といわれる致死性の病態を呈するとされている。SHS は致死性不整脈(心室頻拍/心室細動=VT/VF)と関連しており予後不良である。Sprague-Dawley rat を用いた 30% 出血モデルにおいて，リポソーム封入ヒトヘモグロビン(HbV)は洗浄赤血球(wRBC)と比較し同等に予後を改善すること及び，Optical mapping システム(OP)を用いて解析した SHS において電気生理学的検査(EP)での頻回刺激法による VT/VF 誘発を HbV は抑制することを我々は以前に報告した。しかしながら，HbV で蘇生されたラットのうち約 20% は EP にて VT/VF が誘発された。HbV で蘇生されたラットの致死性不整脈源性の機序を検討するために，今回我々は OP にて伝導時間(CT)と伝導パターンと，さらに(最大活動電位持続時間—最小活動電位持続時間)で定義される活動電位不均一性(APDd)について SHS モデル(n=29)を用い左室/右室において計測を行い，正常ラット群(n=6)の CT, APDd と比較検討した。HbV で蘇生された SHS モデルは，EP による VT/VF 非誘発群(n=22)と VT/VF 誘発群 VF(n=7)に分けられた。コネキシン 43 免疫染色による病理学的検討も同様に両群において比較検討した。結果は CT と伝導パターンは 3 群間で変化がなかったのに対し，左室及び右室における APDd は，正常ラット群及び VT/VF 非誘発群に対して，VT/VF 誘発群で優位に延長していた(VT/VF 誘発群 vs. VT/VF 非誘発群 and 健常群：右室， $19 \pm 7$  vs.  $12 \pm 6$ ,  $12 \pm 2$  ms,  $p < 0.05$ ; 左室， $32 \pm 7$  vs.  $14 \pm 7$ ,  $13 \pm 7$  ms,  $p < 0.05$ )。心筋及びコネキシン 43 は VT/VF 誘発群においてより多くの障害を受けていた。

**【結語】** HbV にて蘇生した出血性ショック心臓において，再分極の特性として表現される APDd は VT/VF 誘発性及び心筋障害を識別するのに有用な指標である。本研究の結果は HbV の有効性の発展に寄与する可能性があると考えられた。

## 第 23 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 23rd Annual Meeting of the SBSJ is partially supported by the following companies and foundation.

帝人ファーマ株式会社

一般社団法人 日本血液製剤機構

(五十音順)

## リポソーム DDS を用いた脳梗塞治療薬の開発

# Development of Neuroprotective Agents with Liposomal Drug Delivery System for the Treatment of Ischemic Stroke

福田 達也<sup>(1)(2)</sup>, 奥 直人<sup>(1)</sup>

Tatsuya Fukuta<sup>(1)(2)</sup>, Naoto Oku<sup>(1)</sup>

### 和文抄録

脳血管障害は、我が国において死因別死亡率第4位、要介護患者数第1位の疾患であり、その約6割は虚血性の脳梗塞である。その標準治療として、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ているが、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、血流再開により虚血を脱しても、炎症性サイトカイン等の産生により脳虚血/再灌流障害が生じ、患者予後不良の一因となる。しかし、世界基準で用いられている治療薬はt-PAのみであり、新たな脳保護薬の開発が望まれている。筆者らは、脳梗塞後に生じる血液脳関門 (BBB) の透過性亢進に着目し、脳虚血時あるいは再灌流後の早期から、リポソームがBBBの間隙から脳梗塞部位へ集積することを見出した。また、脳保護薬搭載リポソームを開発し、虚血/再灌流障害治療に有効であることをラット脳梗塞モデルにおいて明らかとしてきた。さらに、虚血時からリポソームによって脳保護薬を送達することで、再灌流障害を効果的に抑制できるとともに、t-PAの投与可能時間を延長できる可能性も見出している。本稿では、リポソーム DDS 製剤を用いた脳梗塞治療の有用性について、筆者らが見出した知見を中心に紹介させて頂く。

### Abstract

Ischemic stroke is a high mortality disease and a leading cause of severe disability in the world. In clinical settings, thrombolytic therapy with tissue plasminogen activator (t-PA) is the only used therapeutic agent worldwide for acute ischemic stroke. However, due to the narrow therapeutic time window (TTW) and safety concerns such as a risk of cerebral hemorrhage, patients given t-PA treatment are very limited. Also, secondary ischemia/reperfusion (I/R) injury often leads to poor prognosis for the patients. Therefore, development of more widely applicable and effective therapies has been desired. Under ischemic stroke conditions, it has been reported that permeability increase in the blood-brain barrier (BBB) is induced around the ischemic core region. We previously revealed that drug delivery to ischemic brain tissue by using liposomes is possible at an early stage after reperfusion via the disintegrated BBB, and that treatment with liposomal neuroprotectants is useful for the suppression of cerebral I/R injury in a rat ischemic stroke model. Moreover, our recent study showed the possibility for extending the TTW of t-PA by the treatment with liposomal neuroprotectants. In this review, we introduce our recent findings on ischemic stroke treatment using liposomal drug delivery systems.

### Keywords

Ischemic stroke, Cerebral ischemia/reperfusion injury, Liposome, Blood-brain barrier, Neuroprotective agents, Thrombolytic therapy

(1) 静岡県立大学大学院 薬学研究院 医薬生命化学教室 〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田52-1 Department of Medical Biochemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan

(2) 日本学術振興会 〒102-0083 東京都千代田区麹町5-3-1 Japan Society for the Promotion of Science, 5-3-1 Kojimachi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0083

論文受付 2016年5月30日 論文受理 2016年6月13日

## 1. はじめに

脳血管障害は本邦において死因別死亡率第4位、要介護患者数第1位の疾患であり、世界的に見ても高い死亡率を占める(60歳以上で第2位, 15-59歳で第5位)<sup>1)</sup>。その約6割が虚血性の脳梗塞である。脳梗塞は、血栓形成により脳血流が遮断されることで、脳へのエネルギーや酸素の供給が途絶え、脳細胞が壊死、機能不全に陥る病態を示す。虚血巣中心部は重度の血流不全により不可逆的な細胞死に至るのに対し、その周辺部にはペナンプラ領域と呼ばれる領域が存在する<sup>2)</sup>。ペナンプラ領域は、発症後早期の血流再開や脳保護により細胞死から可逆的に救済可能であるとされ、脳梗塞治療において本領域の保護が重要視されている。現在臨床では、超急性期の標準治療として、組織プラスミノゲン活性化因子(Tissue plasminogen activator; t-PA)製剤による経静脈的血栓溶解療法が適応されている。しかし、t-PAの治療可能時間(Therapeutic time window; TTW)は発症後4.5時間以内と限定的であることに加え、投与時間の遅延に伴い副作用である脳出血が生じる確率が高まることから、その恩恵を受けられる患者は5%程度と極めて少ない<sup>1,3)</sup>。また、外科的処置や血管内デバイス<sup>4)</sup>を用いた血栓除去により血流を再開できたとしても、活性酸素種(Reactive oxygen species; ROS)や炎症性サイトカイン等の細胞傷害性因子の産生により、二次的な障害である脳虚血/再灌流障害が生じ、脳傷害領域の拡大、そして半身麻痺など患者予後の悪化につながる<sup>5)</sup>。そのため、t-PAに次ぐ新たな治療薬の開発が望まれている。我が国においては2001年よりラジカススカベンジャーであるエダラボンが世界初の脳保護薬として認可され、神経細胞や血管内皮細胞に対する保護効果が多数報告されている<sup>6)</sup>。しかし、世界で標準的に用いられている脳保護薬は未だ存在しない。こうした背景から、新規脳保護薬の創出に向け種々の候補化合物が開発されてきたものの、ヒトにおける低薬効や予期せぬ副作用等により認可まで至った脳保護薬は皆無である<sup>7)</sup>。我々は、薬効の向上や副作用の回避を達成する技術として、目的部位への選択的な薬物送達を可能とするリポソーム薬物送達技術(DDS; Drug Delivery System)に着目し、研究を行った。

## 2. 人工酸素運搬体から脳梗塞治療薬開発へ

リポソームDDSを用いた脳梗塞治療薬開発の研究のスタートは人工酸素運搬体、Liposome-encapsulated hemoglobin (LEH)の脳内挙動解析であった。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、我々は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<sup>8)</sup>。一方、東海大学医学部川口章らはLEHが脳梗塞ペナンプラ領域の傷害保護に有効であることを明らかにしていた。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<sup>9)</sup>。LEHの作用機構としては2つの可能性が考えられた。1つは血栓を越えて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。そこで我々は、リポソームDDSによる薬物送達の検討を開始した。

一般に薬物の脳への移行は、脳血管内皮細胞により構成され、種々の物質輸送機能を有する血液脳関門(Blood-brain barrier; BBB)により厳密に制御されている。そのため全身投与された薬物は、BBBに発現する様々なトランスポーターによりその移行が制御され、BBBは脳への薬物送達における最大の障壁となる<sup>10)</sup>。一方、脳虚血時および再灌流後の早期には、虚血巣周辺にてBBBの破綻が生じ、血管透過性が亢進することが知られている<sup>11,12)</sup>。筆者らはLEHの動態解析の結果も踏まえ、透過性が亢進したBBBを介してナノサイズのリポソームが脳実質へ移行することで、脳梗塞部位への薬物送達が可能なのではないかと考えた(図1A)。リポソームを用いたDDS製剤は、抗がん剤であるDoxil<sup>®</sup>を始めとして種々の製剤が上市されていることから、本治療戦略の実現は画期的な脳保護薬の開発に資することが期待される。

本稿では、脳虚血時や再灌流後に静脈内投与したリポソームの脳内挙動や、脳保護薬搭載リポソームによる脳梗塞治療に関して、筆者らが行ってきたリポソームDDSに関する研究を紹介する。

## 3. 脳虚血/再灌流後におけるBBBの透過性亢進とリポソームの脳内挙動

筆者らはまず、脳梗塞モデル動物として栓子法による一過性中大脳動脈閉塞(Transient middle cerebral artery occlusion; t-MCAO)ラットを用いて検討を進めた<sup>13)</sup>。本モデルは、ナイロン栓子を内頸動脈から中大脳動脈起始部へ挿入することで中大脳動脈への血流を遮断し、脳虚血を誘導する。そして、その栓子を引き抜くことで容易に再灌流を起こすことができる。以下に述べる検討は、虚血時間を1時間に設定して実施した。

まず、虚血/再灌流後の脳細胞死の経時的推移とBBBの透過性の関連について検討した。その結果、TTC(2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chloride)染色により判定された虚血側脳半球での明らかな脳細胞傷害は、再灌流2時間後までは認められず、その後は時間経過に伴う傷害域の拡大が観察された。一方、FITC標識デキストラン(M.W. 150kDa)を再灌流後各時間に静脈内投与したところ、TTC染色による脳細胞傷害が認められる以前の時間帯から、虚血側脳半球の脳実質への移行、すなわちBBBの破綻が認められた<sup>14)</sup>。そこで次に、粒子径約100nmに調整したポリエチレングリコール(Polyethylene glycol; PEG)修飾リポソームを再灌流後に静脈内投与し、投与1時間後の脳内挙動を*in vivo imaging system* (IVIS)により蛍光イメージングした。その結果、リポソームの集積は再灌流後早期から虚血巣を中心として観察され(図1B)、虚血/再灌流による顕著な脳細胞傷害が認められる以前からリポソームによる脳保護薬送達が可能であることが示唆された。また、リポソームの粒子径を約200nmにすると虚血部位への集積が顕著に減少し、約800nmでは集積が認められなかったことから、リポソームの粒子径がBBB破綻部位を介した脳実質への移行に

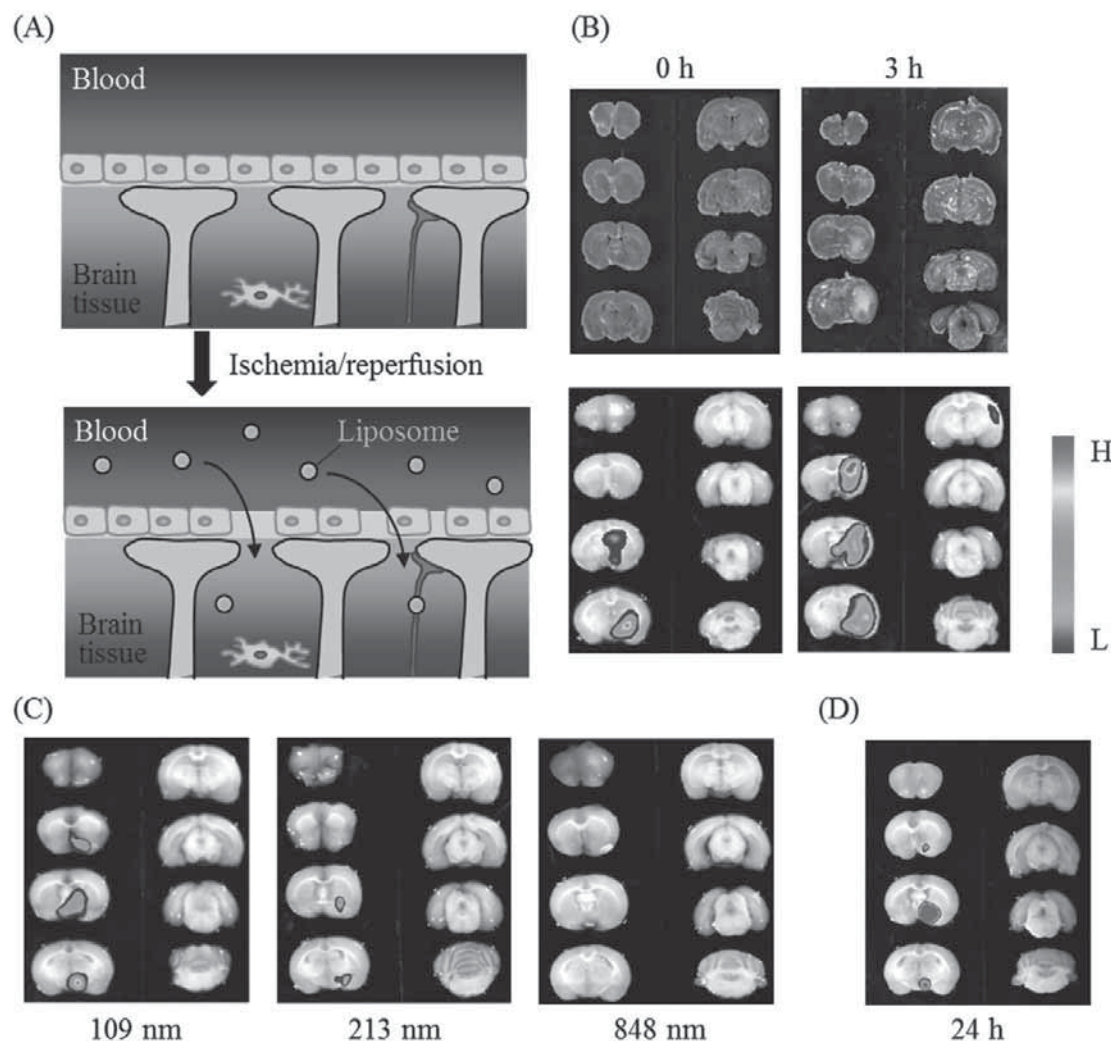


図1. 脳虚血 / 再灌流後における血液脳関門 (BBB) の破綻と虚血部位へのリボソームの集積

(A) 虚血 / 再灌流時の BBB の透過性亢進とリボソーム DDS による治療戦略の概略図. (B) t-MCAO ラットにおける 1 時間虚血後の再灌流直後, および 3 時間後の TTC 染色像 (上図白い領域が傷害領域を示す) と静脈内投与した PEG リボソームの脳内分布 (下図). リボソームは再灌流直後あるいは再灌流 3 時間後に投与し, それぞれ投与 1 時間後に脳を摘出した. (C) リボソームのサイズ依存的な脳への集積像. リボソームは再灌流 1 時間後に静脈内投与し, その 1 時間後に脳を摘出した. (D) 再灌流直後に投与した PEG リボソームの 24 時間後における脳への蓄積. (文献 15, 16 を一部改変)

重要な因子であることが示された (図 1C)<sup>15)</sup>. さらに, 再灌流直後に投与した約 100 nm 径の PEG リボソームはその 24 時間後においても虚血巣周辺に留まっており, Enhanced permeability and retention (EPR) 効果によるリボソームの蓄積が示唆された (図 1D). 以上の知見から, 脳虚血 / 再灌流障害の治療にリボソーム DDS が応用できる可能性が示された<sup>16)</sup>.

#### 4. リボソーム化脳保護薬による脳虚血 / 再灌流障害治療

上記までの検討から, 虚血 / 再灌流後の早期からリボソームによる病巣部位への薬物送達が可能であり, 脳保護薬の送達によってペナンプラ領域を保護できることが示唆された. そこで, 実際に脳保護薬を搭載したリボソームの脳虚血 / 再灌流障害治療に対する有効性を検討した. 脳保護薬として抗アポトー

シス効果をもつアシアロエリスロポエチン (Asialo-erythropoietin; AEPO) をリボソーム膜表面の PEG 先端に修飾し, その有効性を評価した (図 2A). AEPO は血中半減期が極めて短いことから, 高い脳保護効果を発揮するために頻回または高用量投与が必要である<sup>17)</sup>. AEPO をリボソーム化することで, 血中半減期の延長による脳梗塞部位への高効率な送達, 単回投与での高い細胞保護効果が期待される. そこで [<sup>125</sup>I] で標識した AEPO を用い, 再灌流直後に投与したりリボソーム化 AEPO (AEPO-Lip) の体内動態を観察したところ, 遊離の AEPO と比較して有意な血中滞留性の上昇, 虚血側脳半球への集積が認められた (図 2B, C). さらに詳細な分布を組織学的に観察したところ, 虚血側脳半球においてのみ AEPO-Lip の血管外漏出と血管内皮細胞への結合が認められ, 神経細胞周辺に顕

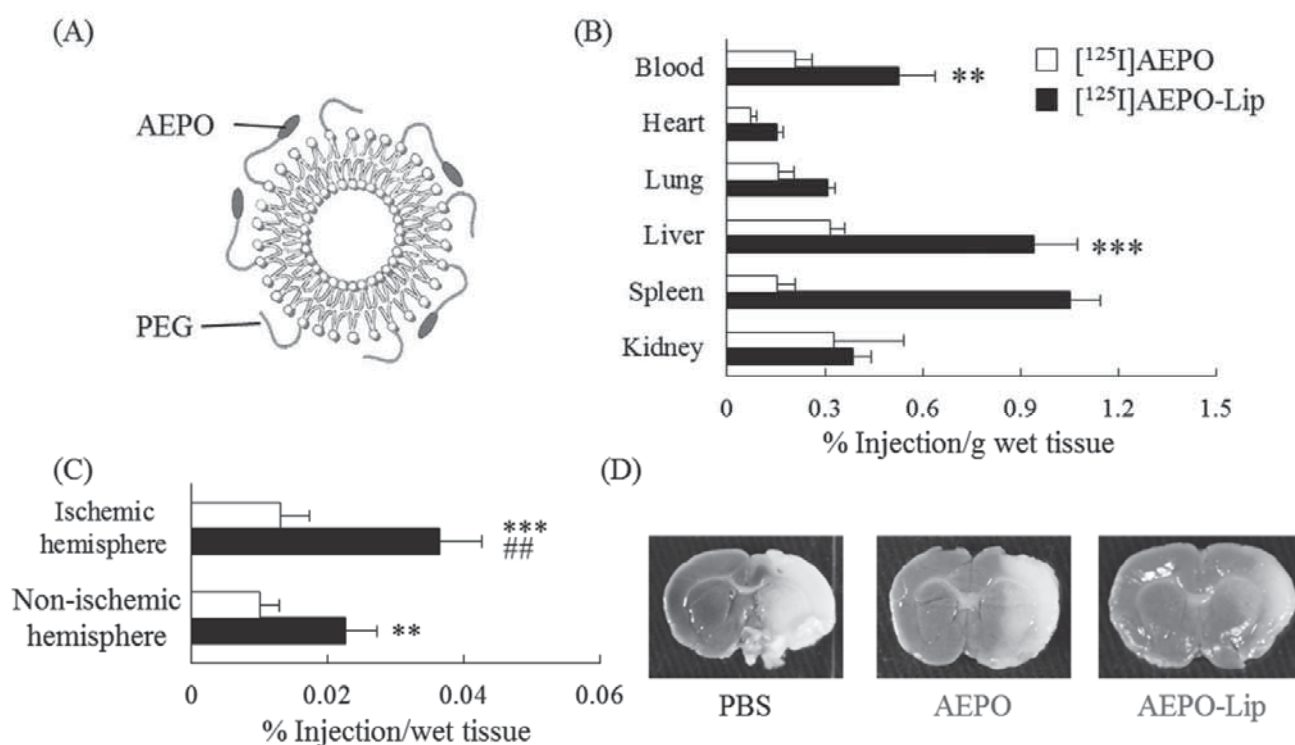


図2. AEPO 修飾 PEG リポソーム (AEPO-Lip) の体内分布と脳虚血 / 再灌流障害治療効果  
 (A) AEPO-Lip の模式図. (B, C) 再灌流直後に静脈内投与した [<sup>125</sup>I]AEPO (□) および [<sup>125</sup>I]AEPO-Lip (■) の t-MCAO ラットにおける 3 時間後の体内分布 (\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs. AEPO, ##  $P < 0.01$  vs. Non ischemic hemisphere). (D) 再灌流直後に投与した AEPO-Lip の 24 時間後における治療効果. 白い領域が傷害領域を示す. (文献 16 を一部改変)

著に集積している様子が観察された。脳虚血 / 再灌流後には神経細胞や脳血管内皮細胞上において EPO 受容体の発現が上昇することが報告されている<sup>18)</sup>。これらの知見から、リポソームへの AEPO 修飾は、虚血部位において発現が上昇した EPO 受容体を介した神経細胞や血管内皮細胞への標的性の付与にも繋がったと考えられる。最後に、t-MCAO ラットにおける AEPO-Lip の治療効果を評価した結果、AEPO-Lip は対照群と比較して有意に高い脳保護効果を発揮し (図 2D)、脳梗塞患者の QOL に大きく関与する運動機能低下の改善効果を示した<sup>16,19)</sup>。以上より、AEPO-Lip が脳虚血 / 再灌流障害の治療に有用であることが示されたとともに、リポソーム DDS による治療戦略が脳梗塞治療に有用であることが示唆された。

次に、実際の臨床応用も考慮し、リポソームを用いた治療戦略の低分子医薬品への応用を試みた。具体的には、免疫抑制剤として上市されており、脳保護効果を有することも多数報告されている FK506 (タクロリムス)、脳血管障害の 1 つであるくも膜下出血後の脳血管攣縮の治療薬として臨床適応があり、脳梗塞においても有効性・安全性が報告され、第 III 相臨床試験まで進んだ背景もある塩酸ファスジル (Fasudil; Rho キナーゼ阻害剤) である。本節ではこれら低分子医薬品の中で、Fasudil のリポソーム化製剤 (Fasudil-Lip) を用いた脳虚血 / 再灌流障害治療について解説する。Fasudil のリポソームへの内封は、リポソーム内外水相の硫酸アンモニウム濃度勾配を利用したり

モートローディング法により行った (図 3A)。はじめに、神経成長因子の添加により神経様細胞へと分化するラット副腎髄腫褐色細胞腫 PC12 細胞を用い、*in vitro* における Fasudil-Lip の細胞保護効果を確認し、t-MCAO ラットにおける検討を実施した。まず、Fasudil-Lip に蛍光標識を施し、再灌流直後に静脈内投与することでその脳内挙動を観察したところ、Fasudil-Lip は再灌流後早期から虚血部位へ集積し、24 時間後においてもその集積が IVIS にて観察された (図 3B)。さらに、脳における免疫細胞と考えられているミクログリアや神経細胞に局在する様子は特に認められず、脳実質の広範囲に分布している様子が観察された。また、我々は Fasudil のリポソームからの放出にアンモニアが駆動力として働くという結果を得ており、脳梗塞後には脳におけるアンモニア濃度が上昇するとの報告もある<sup>20)</sup>。これらの知見から、虚血部位へ集積した Fasudil-Lip は、脳細胞への取り込みよりかは、リポソームからの Fasudil の放出によりその効果を発揮することが考えられる。次に Fasudil-Lip の治療効果を検討したところ、虚血部位への好中球の浸潤抑制効果、すなわち抗炎症効果を示し、虚血 / 再灌流障害に対して高い脳保護効果を発揮した (図 3C, D)。さらに遊離の Fasudil と比較して高い治療効果を有していたことから、リポソーム化により虚血部位への高効率な薬物送達が実現できたことが示唆される<sup>15)</sup>。次節の検討で用いているリポソーム化 FK506 を用いた検討においても同様な結果が得られており、低分子化合物

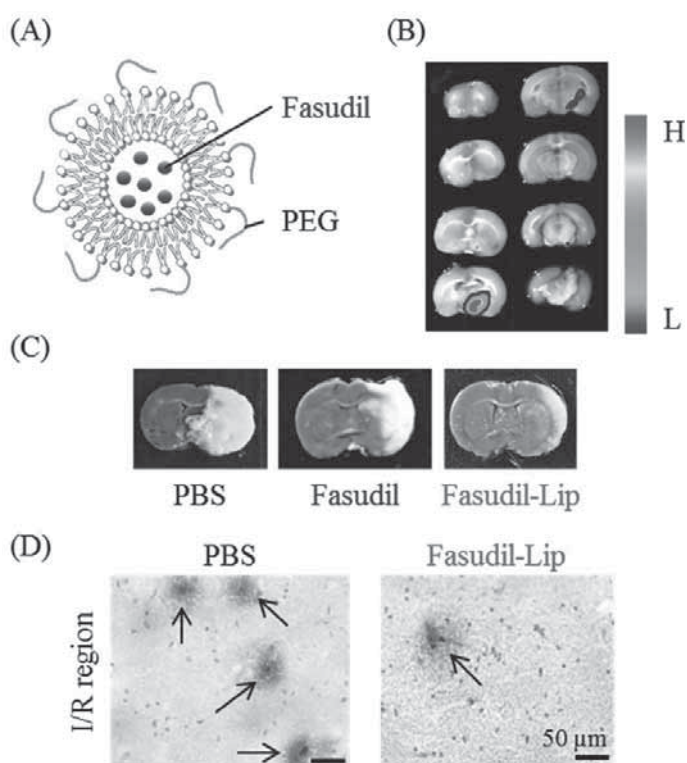


図3. 塩酸ファスジル内封リポソーム (Fasudil-Lip) による脳虚血/再灌流障害治療

(A) Fasudil-Lip の概略図. (B) 再灌流直後に静脈内投与した Fasudil-Lip の24時間後における脳内挙動. (C) TTC 染色による Fasudil-Lip の脳保護効果検討. (D) 好中球に対する免疫組織染色法による抗炎症効果検討. 矢印で示した褐色部位が好中球を示す. (文献15を一部改変)

のリポソーム化は治療効果の向上や投与量の低減につながることを期待される<sup>21)</sup>. また、先述したように、脳保護薬開発の際の問題点として、予期せぬ副作用が挙げられている<sup>7)</sup>. 筆者らが用いてきたFK506もそれに該当し、米国にて第Ⅲ相臨床試験まで進んだが、腎毒性などの副作用により試験中止となった. リポソーム製剤化は低分子化合物の体内動態を変化させることで副作用の回避にも貢献し得る. 以上より、リポソームを用いた脳虚血/再灌流部位へのDDSは、臨床試験中止に至った脳保護薬の実用化技術として有用であると考えられる.

また、脳虚血/再灌流障害による病態は、種々の因子によって短時間で劇的に変化することが報告されている<sup>22, 23)</sup>. リポソームDDSによる脳保護薬送達の利点として、リポソームからの薬物放出挙動を制御できることや、脂質膜表面への標的化リガンドの修飾といった機能性の付与等が挙げられる<sup>24)</sup>. これらを考慮しリポソームの高機能化を図ることによって、脳梗塞治療に適した、より高い脳保護効果を有するDDS製剤を開発できると考えられる.

## 5. リポソームの血流再開前投与による脳保護薬送達

これまで、脳梗塞からの血流再開に伴い生じる虚血/再灌流障害に対するリポソームDDS製剤の有用性について概説して

きた. 一方、冒頭でも述べたように、脳梗塞治療における臨床のニーズとして、虚血/再灌流障害に対する治療薬開発に加え、唯一の世界基準の治療薬である血栓溶解剤t-PAの脳出血リスクの軽減、短いTTWの延長による適応患者の増加が挙げられる<sup>25)</sup>. 脳梗塞によるBBBの透過性亢進は脳虚血時から生じることが知られている<sup>12, 26)</sup>. そこで筆者らは、血流再開前の虚血の段階からリポソームによる脳保護薬送達が可能であれば、再灌流障害の治療に加え、t-PAの副作用である脳出血の危険性の軽減、およびTTWの延長が可能になるのではないかと考えた.

そこでまず、栓子法によるMCAOラットを用い(図4A)、粒子径約100nmに調整した蛍光標識リポソームを虚血開始1時間後に静脈内投与し、IVISによってリポソームの脳内分布を観察した. リポソームの蛍光は、非虚血側半球と比較して虚血側半球において高い強度を示し、血管外へ漏出している様子が共焦点レーザースキャン顕微鏡より観察された<sup>27)</sup>. 次に、PEGリポソームを<sup>[18F]</sup>標識し、静脈内投与後の脳内挙動をポジトロン断層法(PET)により解析した. リポソームの<sup>[18F]</sup>標識は、当研究室で開発したSolid-phase transition法により行った<sup>8)</sup>. PETイメージングより、静脈内投与後初期は虚血部位において血流低下によるシグナルの減弱が観察されたものの、そのシグナルが時間経過に伴い増加し、リポソームが経時的に集積する様子が認められた(図4B)<sup>28)</sup>. また、<sup>[3H]</sup>標識PEGリポソームの脳内分布解析からも虚血部位への時間依存的なリポソーム集積が観察され(図4C)、脳虚血後の早期から虚血巣中心およびペナンプラ領域へリポソームによる薬物送達が可能であることが示された. また、虚血部位へのリポソームの集積に関しては、中大脳動脈由来の僅かな血流、あるいは虚血巣周辺にて形成された側副血行路を介してリポソームが移行し、BBB破綻部位から血管外へ漏出することによって脳実質へと集積していると考察している.

そこで次に、免疫抑制剤FK506のリポソーム化製剤(FK-Lip)を用い、血流再開前からの脳保護薬送達による治療効果を検討した. FK506は、脳虚血後に生じるカルシニューリンの活性化を阻害することで炎症等を抑制し、脳保護効果を発揮する<sup>29)</sup>. 以降の検討では、虚血時間を2時間とし、臨床の脳梗塞治療を模倣するため、栓子を引き抜き再灌流させた. また、リポソームの投与は虚血1時間後に行った. まず、ROSの一つであるスーパーオキシドアニオン( $O_2^-$ )の産生量を指標に、FK-Lipの酸化ストレス抑制効果を評価した. FK-Lipは投与1時間後において虚血巣近傍における $O_2^-$ の産生を抑制する傾向が認められ、再灌流3時間後では、虚血巣周辺部である皮質領域の $O_2^-$ の産生が有意に抑制された.  $O_2^-$ などROSは脳障害の拡大に加え、BBBの破綻への関与も知られる<sup>12)</sup>. 本結果より、血流再開前からのFK-Lip投与により、脳保護効果のみならず、t-PA等血栓溶解療法による再灌流後に誘発される脳出血も抑制できることが示唆される. 次に、FK-Lipの脳保護効果をTTC染色により評価したところ、梗塞開始24時間後において他の群と比較して有意に高い脳保護効果を示し(図4D)、1週間後におけ

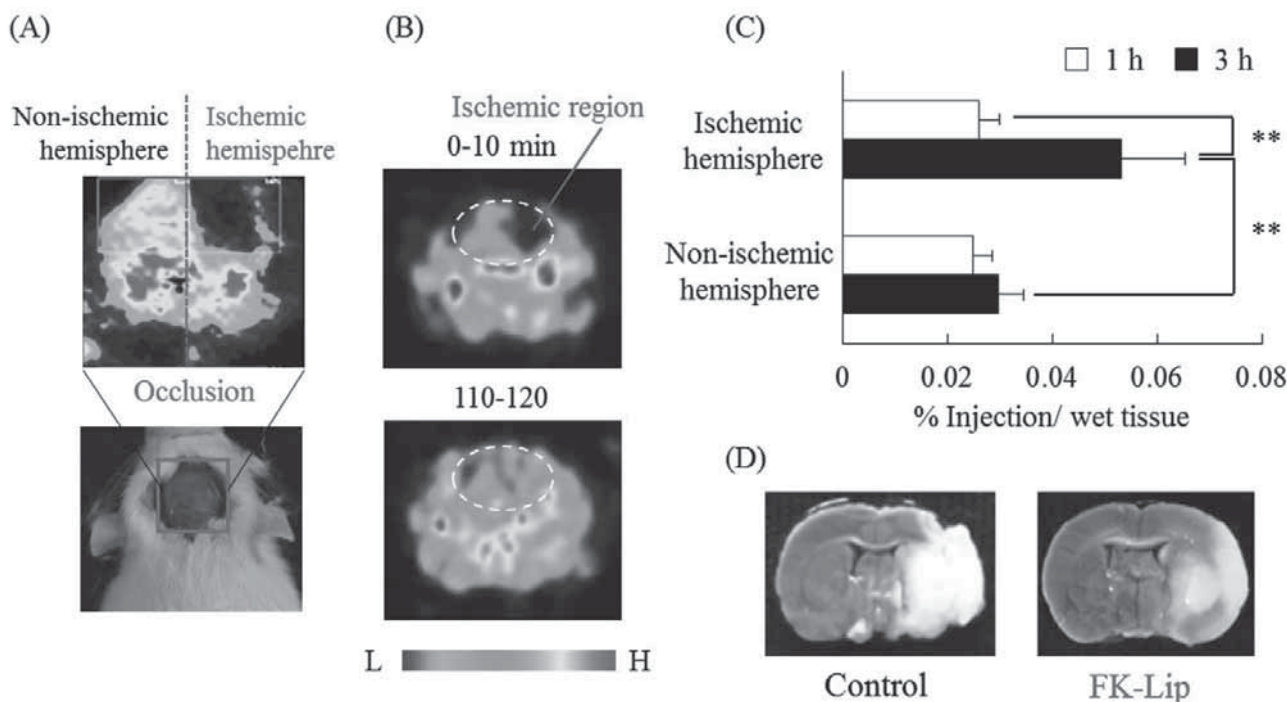


図4. 脳虚血時におけるリボソームを用いた脳保護薬送達

(A) レーザードップラー血流計による虚血側脳半球（右脳）における血流低下のイメージング像. (B) PET による $^{18}\text{F}$ 標識 PEG リボソームの脳内分布イメージング像. リボソームは虚血1時間後に静脈内投与し、画像は投与0-10分（上図）、および110-120分（下図）後の脳イメージング像を示している. (C) 梗塞1時間後に投与した $^3\text{H}$ 標識 PEG リボソームの1時間（□）、および3時間後（■）の虚血部位への集積量（\*\*  $P < 0.01$ ). (D) 虚血時間を2時間に設定したt-MCAO ラットにおける、再灌流1時間前（虚血1時間後）に投与したFK-Lipの脳保護効果.（文献28, 30を一部改変）

る運動機能不全改善効果も示した. 以上より、リボソームを用いた脳保護薬送達が再灌流後のみならず、血流再開前の虚血時から有効であることが示され、血栓溶解療法の補助療法として有用であることが示唆された<sup>30)</sup>.

## 6. リボソーム DDS 製剤と血栓溶解剤併用による脳梗塞治療

上記までの検討では、ナイロン栓子により物理的に中大脳動脈を閉塞する脳梗塞モデルを用いてリボソーム DDS の有用性を見出してきた. しかし、本モデルを用いた検討では、栓子の挿入と引き抜きにより容易に虚血 / 再灌流を誘導できる一方、t-PA による血流再開を再現できないという問題点がある. この過程を再現できる動物モデルとして、光増感反応を利用して脳血管内に血栓を形成可能な Photochemically induced thrombosis (PIT) 法による MCAO ラットが知られる<sup>31)</sup>. PIT 法によるモデルは、血栓の形成過程（血管内皮細胞の傷害、血小板の活性化・凝集など）がヒトの虚血性疾患の病態と類似しているという特徴も有しており、より臨床を反映した脳梗塞モデルと言え、血栓溶解剤の有効性を評価するための動物モデルとしても用いられている<sup>32)</sup>. そのため、PIT 法による MCAO モデルを用いることで、リボソーム DDS 製剤による処置が t-PA の TTW や脳出血の危険性に及ぼす影響についても検討できる. そこでまず筆者らは、PIT 法による MCAO ラットにおい

てもリボソームが虚血部位へ集積可能かどうか検討した. 蛍光標識を施した約 100nm 径の PEG リボソームを血栓形成後各時間に静脈内投与し、その1時間後の脳内分布を IVIS にて観察した. その結果、栓子法による MCAO モデルを用いた際と同様に、TTC 染色による明らかな脳細胞傷害が認められる以前の時間帯から虚血側脳半球へのリボソームの集積が認められ、t-PA 処置前から脳保護薬を送達可能であることが示された. そこで次に、PIT 法による MCAO ラットにおける t-PA の TTW を検討した. 血栓形成 24 時間後における脳細胞死を指標に評価したところ、梗塞 2 時間後までの t-PA 処置により無処置群と比較して有意に高い脳保護効果が得られた. このことから、本モデルにおける t-PA の TTW は 2 時間程度であることが示唆された. 次に、先に虚血 / 再灌流障害治療への有用性を示した Fasudil-Lip を脳保護薬として用い、t-PA との併用療法を実施した. 本検討では、リボソーム、t-PA の投与時間をそれぞれ梗塞 1, 3 時間後に設定し、梗塞 24 時間後に運動能評価を行った後、TTC 染色を行った. その結果、Fasudil-Lip/t-PA 併用群では、各単独処置群と比較して有意に高い脳保護効果が認められた. t-PA 処置による血管透過性の亢進や、出血の助長に対する Fasudil-Lip の効果についての検討はこれからであるが、これまで得られた結果から、t-PA 処置前からのリボソーム DDS 製剤投与によって、t-PA の TTW が延長できる可能性が示され

た。

これまで筆者らは、栓子法、PIT法による2種類の病態モデル動物を用いてリポソームDDSによる脳梗塞治療法の有用性を見出してきたが、脳梗塞によるBBBの透過性亢進は、ヒトにおいても生じることが知られている<sup>33)</sup>。したがって、本稿で紹介させて頂いたリポソームによる脳梗塞治療戦略はヒトにおいても有効であることが示唆される。また、脳保護薬を基礎から臨床への橋渡しをする際には、血栓溶解剤t-PAと併用した際の有効性評価の必要性が提唱されている<sup>34,35)</sup>。筆者らは、PIT法によるMCAOラットを用い、t-PAによる血流再開を再現した、より臨床に近い条件でリポソーム化脳保護薬の有用性検討を進めている。このことは脳梗塞治療を目的としたリポソームDDS製剤の臨床への実用化を志向した上で重要であると考えられる。本研究を通じて、t-PAのTTW延長、出血性の抑制がリポソームDDS製剤により実現できれば、t-PA血栓溶解療法の恩恵を受けられる患者の増加、すなわち患者QOLの向上に繋がることが期待される。

## 7. おわりに

我が国のみならず、世界的に死因別死亡率、そして要介護に至る原因疾患で上位を占める脳血管障害は、高齢化の進展に伴い、健康長寿社会を実現する上で克服が望まれる疾患の1つである。特に、世界に先駆けて超高齢社会を迎えている本邦においては、脳梗塞患者のQOLの向上、要介護人口の削減は、医療経済的な観点からも社会的貢献が大いに期待できる。本稿で紹介したリポソームDDSによる脳保護薬送達は、薬物の脂質膜への修飾、封入、親水相への内封が可能であるため、種々の候補化合物への適用可能性を有する。さらに、虚血に伴う血管透過性の亢進は脳疾患のみならず、虚血性心疾患においても生じることから<sup>36)</sup>、脳梗塞治療へのリポソームDDS製剤の有用性を解明することは、他の虚血性疾患治療薬の開発に向けての情報提供もできると考えている。また、人工酸素運搬体LEHや他の血液代替物との併用療法等も可能であり、より優れた機能を有する血液代替物製剤の開発にもつながると考えている。今後さらなる研究成果が蓄積することで、リポソームDDSを用いた脳梗塞治療戦略が、難航している世界基準の新規脳保護薬の創出に向けて貢献できることを期待する。

なお、本稿に記載の動物実験は、「静岡県立大学動物実験規程」に従って実施した。

## 謝辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金、日本学術振興会特別研究員奨励費を受けて実施した。

## 参考文献

1. Snow SJ. Stroke and t-PA—Triggering New Paradigms of Care. *N Engl J Med* 2016; 374, 809-11.
2. Lo EH. A new penumbra: transitioning from injury into

repair after stroke. *Nat Med* 2008; 14, 497-500.

3. Iadecola C, Anrather J. Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions. *Nat Neurosci* 2011; 14: 1363-8.
4. Holodinsky JK, Yu AY, Assis XA, AL Sultan AS, Menon BK, Demchuk AM, Goyal M, Hill MD. History, Evolution, and Importance of Emergency Endovascular Treatment of Acute Ischemic Stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2016; 16: 42.
5. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med* 2011; 17: 1391-1401.
6. Nakase T, Yoshioka S, Suzuki A. Free radical scavenger, edaravone, reduces the lesion size of lacunar infarction in human brain ischemic stroke. *BMC Neurol* 2011; 11: 39.
7. Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present, and future. *Neuropharmacology* 2008; 55: 363-389.
8. Urakami T, Akai S, Katayama Y, Harada N, Tsukada H, Oku N. Novel amphiphilic probes for [<sup>18</sup>F]-radiolabeling performed liposomes and determination of liposomal trafficking by positron emission tomography. *J Med Chem* 2007; 50: 6454-6457.
9. 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.
10. Chen Y, Liu L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64: 640-665.
11. Abbott NJ, Rönnebeck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 41-53.
12. Fagan SC, Hess DC, Hohnadel EJ, Pollock DM, Ergul A. Targets for vascular protection after acute ischemic stroke. *Stroke* 2004; 35: 2220-2225.
13. Hasegawa H, Kogure K. Correlation between cerebral blood flow and histologic changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1989; 20: 1037-1043.
14. Ishii T, Asai T, Urakami T, Oku N. Accumulation of macromolecules in brain parenchyma in acute phase of cerebral infarction/reperfusion. *Brain Res* 2010; 1321: 164-168.
15. Fukuta T, Asai T, Sato A, Namba M, Yanagida Y, Kikuchi T, Koide H, Shimizu K, Oku N. Neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by intravenous administration of liposomal fasudil. *Int J Pharm* 2016; 506: 129-137.
16. Ishii T, Asai T, Oyama D, Fukuta T, Yasuda N, Shimizu K, Minamino T, Oku N. Amelioration of cerebral ischemia-reperfusion injury based on liposomal drug delivery system

- with asialo-erythropoietin. *J Control Release* 2012; 160: 81-87.
17. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Frateli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LØ, Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6741-6746.
  18. Rabie T, Marti HH. Brain protection by erythropoietin: a manifold task. *Physiology (Bethesda)* 2008; 23: 263-274.
  19. Ishii T, Asai T, Fukuta T, Oyama D, Yasuda N, Agato Y, Shimizu K, Minamino T, Oku N. A single injection of liposomal asialo-erythropoietin improves motor function deficits caused by cerebral ischemia/reperfusion. *Int J Pharm* 2012; 439: 269-74.
  20. Panickar KS, Norenberg MD. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. *Glia* 2005; 50: 287-298.
  21. Ishii T, Asai T, Oyama D, Agato Y, Yasuda N, Fukuta T, Shimizu K, Minamino T, Oku N. Treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury with PEGylated liposomes encapsulating FK506. *FASEB J* 2013; 27: 1362-1370.
  22. Shichita T, Ago T, Kamouchi M, Kitazono T, Yoshimura A, Ooboshi H. Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke. *J Neurochem* 2012; 123: 29-38.
  23. Hayakawa K, Qiu J, Lo EH. Biphagic actions of HMGB1 signaling in inflammation and recovery after stroke. *Ann N Acad Sci* 2010; 1207: 50-57.
  24. Torchilin VP. Multifunctional nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 1532-55.
  25. Jickling GC, Liu D, Stmova B, Ande BP, Zhan X, Lu A, Sharp ER. Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014; 34: 185-199.
  26. Zehendner CM, Librizzi L, de Curtis M, Kuhlmann CR, Luhmann HJ. Caspase-3 contributes to ZO-1 and Cl-5 tight-junction disruption in rapid anoxic neurovascular unit damage. *PLoS One* 2011; 6: e16760.
  27. Ishii T, Fukuta T, Agato Y, Oyama D, Yasuda N, Shimizu K, Kawaguchi AT, Asai T, Oku N. Nanoparticles accumulate in ischemic core and penumbra region even when cerebral perfusion is reduced. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 430: 1201-1205.
  28. Fukuta T, Ishii T, Asai T, Nakamura G, Takeuchi Y, Sato A, Agato Y, Shimizu K, Akai S, Fukumoto D, Harada N, Tsukada H, Kawaguchi AT, Oku N. Real-time trafficking of PEGylated liposomes in the rodent focal brain ischemia analyzed by positron emission tomography. *Artif Organs* 2014; 38: 662-666.
  29. Zawadzka M, Dabrowski M, Gozdz A, Szadujkis B, Lipko M, Kaminska B. Early steps of microglial activation are directly affected by neuroprotectant FK506 in both in vitro inflammation and in rat model of stroke. *J Mol Med* 2012; 90: 1459-1471.
  30. Fukuta T, Ishii T, Sato A, Kikuchi T, Shimizu K, Minamino T, Oku N. Treatment of stroke with liposomal neuroprotective agents under cerebral ischemia conditions. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 97 (Pt A): 1-7.
  31. Umemura K, Higo K, Sakata T, Yuki S, Iwata K, Yamaguchi K. Effects of alteplase, a thrombolytic agent, in a rat photothrombotic middle cerebral artery occlusion model. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2008; 36: 245-250.
  32. Umemura K, Wada K, Uematsu T, Nakashima M. Evaluation of the combination of a tissue-type plasminogen activator, SUN9216, and a thromboxane A2 receptor antagonist, vapirost, in a rat middle cerebral artery thrombosis model. *Stroke* 1993; 24:1077-1081.
  33. Latour LL, Kang DW, Ezzeddine MA, Chalela JA, Warach S. Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia. *Ann Neurol* 2004; 56: 468-477.
  34. Sutherland BA, Minnerup J, Balami JS, Arba F, Buchan AM, Kleinschnitz C. Neuroprotection for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside. *Int J Stroke* 2012; 7: 407-418.
  35. O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Howells DW. Evaluation of combination therapy in animal models of cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32: 585-597.
  36. Takahama H, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Asai T, Wakeno M, Sasaki H, Kikuchi H, Hashimoto K, Oku N, Asakura M, Kim J, Takashima S, Komamura K, Sugimachi M, Mochizuki N, Kitakaze M. Prolonged targeting of ischemic/reperfused myocardium by liposomal adenosine augments cardioprotection in rats. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 709-717.

## 人工酸素運搬体製剤の適正粘度

### Optimal Viscosity of Artificial Oxygen Carrier

高折 益彦

Masuhiko Takaori

#### 和文抄録

血液の粘度は末梢組織の血液循環，そしてその部への酸素供給に影響する．過去においては末梢循環不全をともなう各種疾患・病態の治療に血液粘度を低下させて組織の酸素化を改善するために血液希釈治療が行われた．また赤血球の泥化現象をともなう赤血球の凝集解除の治療に低分子代用血漿剤が用いられた．しかし著しい血液希釈は末梢組織への酸素運搬量の低下のみならず末梢循環不全を来すことが認められる．現在我が国で開発中の人工酸素運搬体製剤は細胞型，非細胞型ともにその製剤の粘度は血液の粘度に比較して低値でありそれらの使用，特にその大量使用では血液粘度が低下し，上記の循環不全，末梢組織酸素代謝不全が懸念される．しかしながら著しい血液粘度の低下を来すような人工酸素運搬体製剤の大量使用は実際には止血機能維持のために行われない．したがってこれら人工酸素運搬体製剤自身の粘度が血液のそれよりは低値であっても臨床上安全に使用できると思われる．

#### Abstract

An adequate lowering in blood viscosity improves tissue perfusion and oxygenation. To obtain those effects, anitisludging drugs and hemodilution had been used in medical practice in the past. However an extreme hemodilution causes conversely deterioration of the tissue perfusion and oxygenation. Cabrales and his colleagues presented a concept that critically lowing blood viscosity would cause capillary collapse due to rapid transfer the blood from the arterial to venous side. We assumed additionally that lowing in arterial diastolic pressure associated with progressing hemodilution would impair myocardial perfusion, oxygenation and consequently contractility.

Viscosity of artificial oxygen carriers, either cellular or acellular type, developing in our country recently is slightly lower than that of the blood. Therefore use of those products in a large amount should induce lowering the blood viscosity and might cause the unfavorable results above mentioned. Nevertheless the severe hemodilution should be avoided actually in the practice for avoiding the hemostatic disorders, such as dilutional coagulopathy. The artificial oxygen carriers under development in our country, therefore, is safe for clinical use in view point of its viscosity.

#### Keywords

artificial oxygen carrier, blood viscosity, peripheral tissue perfusion, oxygenation, arterial pulse contour, hemodilution

---

川崎医科大学名誉教授 Professor Emeritus, Kawasaki Medical School

〒 659-0053 兵庫県芦屋市松浜町 9 番地 21 号 9-21 Matsuhama, Ashiya, Hyogo Japan 〒 659-0053

Tel: 0797-22-2544 E-mail : mtakaoriashiya@azaq.jp

論文受付 2016 年 5 月 18 日 論文受理 2016 年 6 月 21 日

## 背景

赤血球代替物、すなわち人工酸素運搬体は細胞型 (cellular type) と非細胞型 (acellular type) とに分けられる。前者は酸素運搬体、すなわちヘモグロビン (Hb) をリボソームのような脂質で包埋し、一定のサイズ ( $\phi = 200 \sim 400 \text{ nm}$ ) と形状 (球形) とを有するものである。一方、後者は Hb の表面を修飾し、あるいは Hb 分子を重合させそのサイズを Hb 分子サイズ、あるいはその数倍としたものである。そのため生体の循環系での滞留時間も前者よりは短い。しかし前者の細胞型赤血球代替物の作成には比較的複雑な工程を必要とし作製費用がかさむ。一方、後者非細胞型の赤血球代替物の作成は比較的単純であり、費用も抑えられる。前者は一時期アメリカ海軍が作成を試みたが中止されている。しかし我が国では 10 数年にわたり研究を重ね、現在その工業生産について模索中である。一方、後者はアメリカの数社が製品化を試みたが Biopure 社のみが Hemopure™ なる製品を開発し南アフリカで臨床使用にいたった。そして我が国でもその工業化に向っている。この両者はあらゆる面では対照的ではある。しかし両者ともその粘度は生理的な血液粘度に比較して低粘度である<sup>1)2)</sup>。本稿ではこれら製品の粘度の問題、とくにこれら製品投与後の循環機能への影響について過去における血液粘度と循環機能、末梢組織への酸素供給の研究とあわせて考察してみたい。

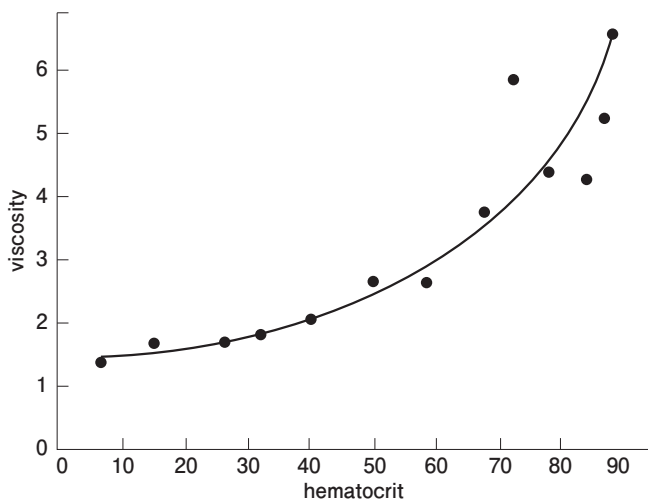


図-1 赤血球濃度 (Ht) と血液粘度

Ht 値が 50% 以上となると血液粘度は指数関数的に上昇する。一方、Ht 値が 20% 以下ではほとんど血漿の粘度を示す。

測定は 37°C で行われ、粘度の単位は centipoises  $\times \text{g}/\text{cm}^3$  で表している。Reemtsma K, Creech O.: Viscosity studies of blood, plasma, and plasma substitutes J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 1962; 44: 674-680 より引用、改変

## 血液の粘度

血液の粘度は種々の因子によって影響されるが最も大きな影響を受けるのは赤血球濃度 (ヘマトクリット値, hematocrit : Ht) である<sup>3)</sup> (図-1)。すなわち Ht が 40% 以上となると指数関数的に粘度が上昇する。また温度低下とともに上昇する<sup>3)</sup> (図-2)。そして血漿粘度によっても影響され図-2 にみられるごとく粘度が低い低分子デキストラン (Dx) よりも高分子 Dx で血液希釈が行われた場合には血液全体の粘度は上昇し、さらに低分子 Dx でも高濃度となれば血液粘度が上昇する。また赤血球の形状変化、たとえば鎌状赤血球症<sup>4)</sup>、球状赤血球症<sup>5)</sup>でも粘度が上昇する。とくに赤血球の凝集はその粘度を上昇させる。その典型例が Dx の使用で認められている。Gelin<sup>6)</sup> は Dx800 (以下 Dx, HES などの表示の suffix として付した 800 などの数値はその物質の分子量, kilo dalton を示す) を投与して生じた動物の下肢静脈系の鬱血を antisludging (抗血液泥化) 作用を有する Dx40 の投与によって治療できることを発表した。これは Dx800 での赤血球表面被覆による表面荷電の中性化が Dx40 の被覆により陰性化したためと Bernstein<sup>7)</sup> は説明した。そして Richter<sup>8)</sup> はこの antisludging 作用は 51,300 以下の分子量で生じると発表している。なお上記の Gelin の実験での動物の静脈鬱血は凝集した赤血球による静脈内腔の閉塞ではなく、このような凝集した赤血球が存在する血液の粘度が上昇して血流速度の低下が要因であるとしている。Gotoら<sup>9)</sup> は種々の代用血漿剤を血液と混合してその際の粘度の変化を観察した。その結果、図

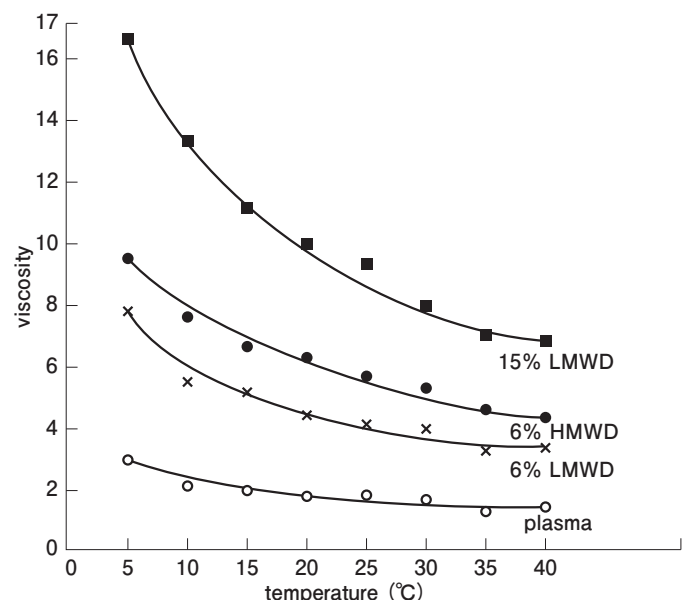


図-2 異なる分子量、異なる濃度のデキストランで血液希釈を行った際の血液粘度の変化

使用したデキストランの粘度が高い場合には希釈された血液粘度も高くなる。この図に示されるごとく低温となると血液粘度は上昇する。とくにその影響は使用したデキストランの粘度を大きく反映する。粘度の単位は centipoises  $\times \text{g}/\text{cm}^3$  で表している。

Reemtsma K, Creech O.: Viscosity studies of blood, plasma, and plasma substitutes J. thorac. cardiovasc. Surg. 1962; 44: 674-680 より引用、改変

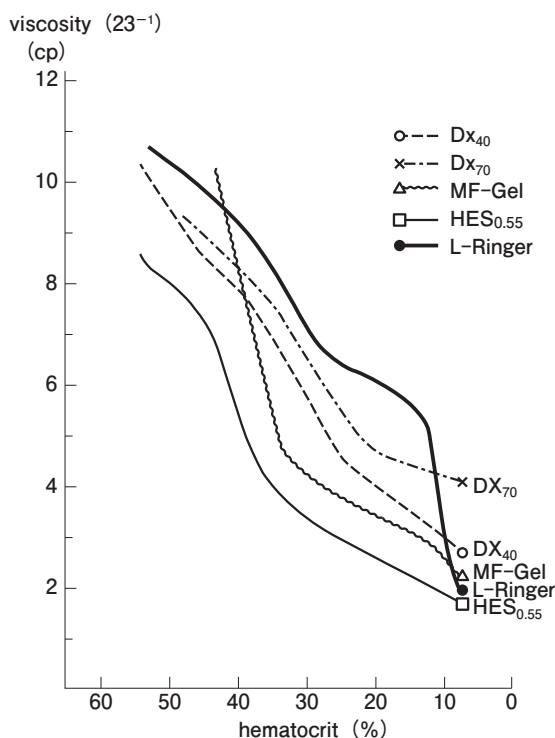


図-3 各種代用血漿剤を混合した際の血液粘度変化  
MF-Gel: modified fluid gelatin, L-Ringer: lactated Ringer solution  
Goto Y, Sakakura S, Hatta M, Sugiura Y, Kato T.: Hemorheological effects of colloid plasma substitutes infusion: A comparative study Acta anaesthesiol. Scand. 1985, 29: 217-223 より引用, 改変

図-3に示すごとくヘマトクリット値が40%ではDx70とDx40とに著明な差はなく、修正ゼラチン (MF-Gel) では著しい血液粘度の上昇があることを認めた。Lartigue ら<sup>10)</sup>は6%ヒドロキシ澱粉 200 (HES200) 液,あるいは Dx60 をそれぞれ 20ml/kg 投与した臨床例の血液について赤血球の凝集状態,血液粘度におよぼす影響を観察した。その結果は図-4(1), 図-4(2)にみられるごとく,赤血球の凝集が血液粘度に大きく影響することが認められた。さらに細胞型赤血球代替物でも種々の代用血漿剤との混合によって赤血球同様の凝集らしき現象が発生し粘度の上昇があることも酒井ら<sup>11)</sup>によって認められている。

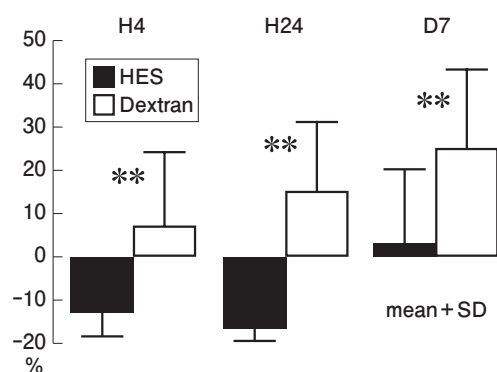
またこのような血液粘度変化は血漿の粘度の変化によっても生じる。Ht が 25% 以下では Ht の低下とともに血液粘度は線的に低下し, 10% 以下では図-1 のごとくほとんど血漿の粘度のみに影響される。また図-2 に示した粘度の高い代用血漿剤を負荷した際の血液粘度の変化であるが, 同様な現象は血漿中のガンマーグロブリンが上昇する Waldenström macroglobulinemia の際にみられる<sup>12)</sup>。

## 血液の粘度低下の臨床応用

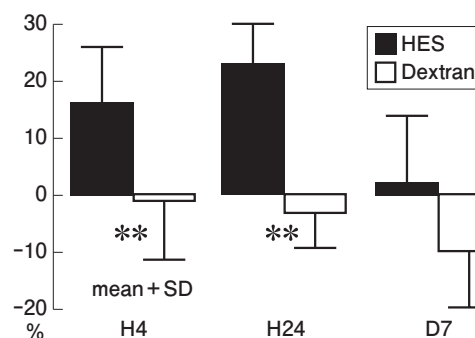
上記のごとく血液粘度の上昇は一般に末梢微小循環の不全をもたらす。そのため過去において antisludging 作用のある薬物の使用,あるいは血液希釈が各種病態治療に用いられてきた。すなわち虚血組織・臓器への血流改善<sup>13)-15)</sup>,あるいは体外循環時の末梢循環改善<sup>16)-17)</sup>,凍傷治療<sup>18)-19)</sup>,皮膚移植<sup>20)</sup>,難治性皮膚潰瘍治療<sup>21)-22)</sup>などが報告されている。このような血液希釈による末梢循環改善効果は血液希釈に伴う末梢血管抵抗の低下による心拍出量の増加<sup>23)</sup>,末梢組織灌流量の増加<sup>24)</sup>,さらに末梢血管血流速度上昇にともなう血管内皮細胞での NO 産生増加と血管拡張<sup>25)</sup>によっている。しかし血液希釈それ自身には酸素運搬に必要な赤血球濃度,すなわちヘモグロビン値 (Hb) の低下を来するので当然,血液希釈には限界がある。Takaori ら<sup>26)</sup>は動物実験でその安全限界は図-5に示すごとく oxygen consumption の低下, pH の低下, 乳酸値の上昇が生じる Hb 値=5.5 g/dl であるとした。そしてこれ以上の血液希釈では Hb 量の低下が比較的少ないのかかわらずそれまで増加していた心拍出量の増加が認められず,全ての組織への酸素供給が不足するためと思われた。また Viele, Weiskopf ら<sup>27)</sup>は輸血を拒否する貧血患者の予後調査から Hb 値で 5.0 g/dl であるとした。すなわち Hb 値が 5.0 g/dl 以上であった症例は全て生存したが,これ以下では死亡者が見られ, Hb 値 2.0 g/dl 以下では全ての症例が死亡していることを認めた。

## 血液の粘度低下は末梢循環に有益か

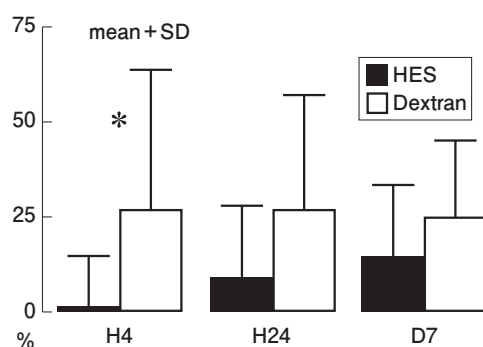
われわれが血液希釈の限界を研究する過程で注意をひかれた点は動脈波形 (大動脈圧) の変化で,あった。すなわち血液希釈の進行にともない図-6 のごとく動脈波形の anacrotic notch, diastolic notch が消失し,末梢血管抵抗の低下から拡張期圧の低下,脈圧が増大する変化であった。この変化は動脈拡張期圧に依存している心筋への血流量をある限界点から低下させると思われた。その限界点として考えられたのは上記の血液希釈の限界点 Hb=5.5 g/dl 近傍であった<sup>26)</sup>。すなわち血液希釈とともに増加していた心係数はこの時点を最高値とし,以後低下した。心係数の低下がそのまま心筋収縮力の低下になるとは云えないが,この変化を上述の機序による心筋への血流量低下,すなわち心筋への酸素供給の低下によるものと解釈した。Crystal<sup>28)</sup>は血液希釈によって Ht 値が 45% から 7% へ低下するまでは心係数も増加し心筋への血流量は増加することを認めている。しかし Wilkerson ら<sup>29)</sup>はこの限界を超えて Ht 値が 6% から 4% に低下した際に心筋酸素摂取率が増加していないことを図-7 のごとく認めた。これはわれわれの実験結果,および推論を立証するものと思われた。一方, Cabrales ら<sup>30)</sup>は高度血液希釈の限界を末梢循環不全の観点から検討した。すなわち Ht 値を 11% にまで低下させた血液希釈においては低粘度の Dx 使用では皮膚の functional capillary density の減少,組織酸素分圧の低下を認めたが,高分子のアルギネート (アルギン酸ソーダ) の使用,血漿粘度,ひいては血液の粘度の低下を少なくすることによって皮膚の functional capillary density 数の維持,



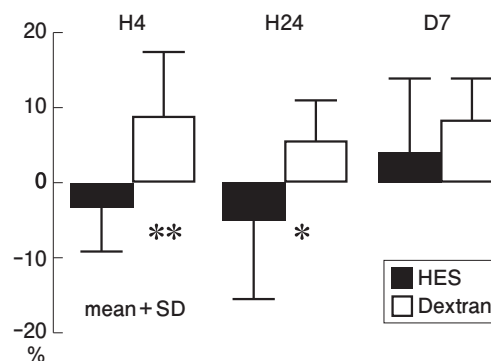
(a) Variations of erythrocyte aggregation index at 10 s compared to pre-operative values in hemodilution by two plasma substitutes during total hip replacement. (\*\*p<0.01 between groups)



(b) Variations of erythrocyte aggregation structure index compared to pre-operative values in hemodilution by two plasma substitutes during total hip replacement. (\*\*p<0.01 between groups)



(c) Variations of whole blood viscosity at low shear rate ( $0.87 \text{ s}^{-1}$ ) compared to pre-operative values in hemodilution by two plasma substitutes during total hip replacement. (\*p<0.05 between groups)



(d) Variations of whole blood viscosity at high shear rate ( $118.29 \text{ s}^{-1}$ ) compared to pre-operative values in hemodilution by two plasma substitutes during total hip replacement. (\*p<0.05 between groups ; \*\*p<0.01 between groups)

図-4(1), 図-4(2) 赤血球凝集が血液粘度におよぼす影響

股関節全置換手術時の出血に対して HES200/0.62, または Dx60 を使用し, 手術終了 4 時間, 24 時間, 7 日までの患者血液凝集性と血液粘度変化 (Shear rate =  $0.87 \text{ s}^{-1}$ , Shear rate =  $118.29 \text{ s}^{-1}$  で測定) とを観察した. そして赤血球の凝集と血液粘度変化との相関性を認めた. 赤血球の凝集性 [図-4 (1)] が大となれば血液粘度 [図-4 (2)] の上昇がみられる. なお HES 製剤投与後 24 時間中は抗凝集効果がみられる.

Lartigue B, Barre J, Nguyen P.H, Potron G.: Comparative study of hydroxyethylstarch 200/0.62 versus dextran 60 in hemodilution during total hip replacement: Influences on hemorheological parameters Clin. Hemorheol. 1993; 13 : 779-789 より引用, 改変

組織血流量, 組織酸素分圧の維持を観察した. その機序について彼らは血液粘度の低下は血液の流動性を高めて動脈側から静脈側への血液の移行を速やかにするため血管が組織圧によって圧迫されその内径の縮小, 一部の血管では閉塞を来すが, これに反して血液粘度が高い代用血漿剤を使用した血液希釈ではこのような変化を防止できると解釈した. 一方, 本稿の著者はこの Cabrales らの説明に加えて上記の動脈波形の変化から心筋への血流低下, 酸素供給不全による心臓からの血液拍出不全に

よると解釈している. すなわち一回拍出量の減少とその拍出型の変化が末梢血管の開存圧 (opening pressure) を低下させるためと解釈している.

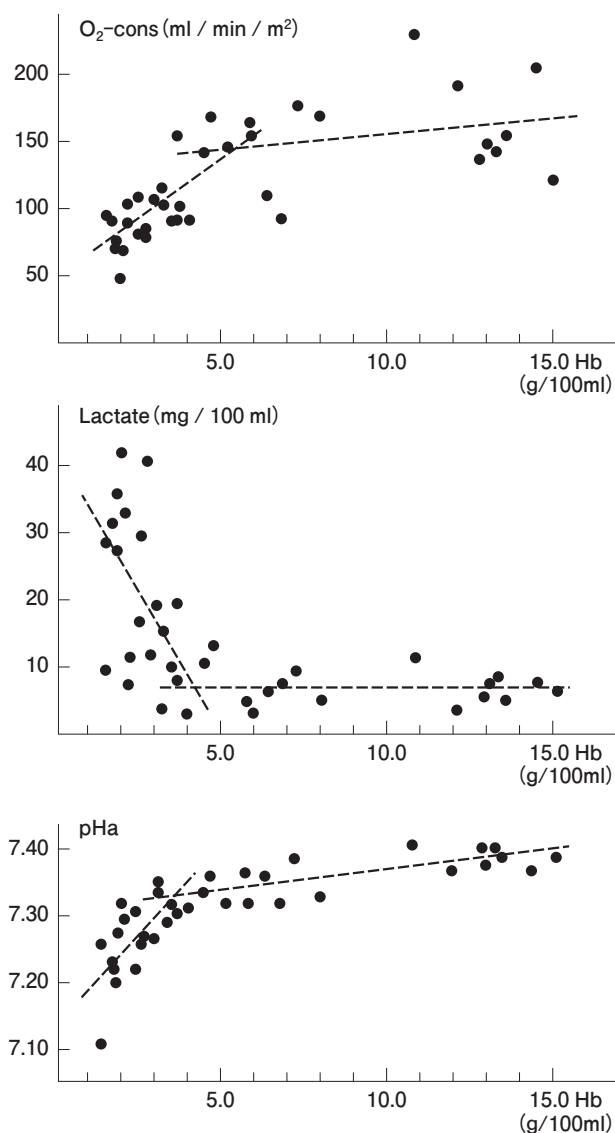


図-5 動物実験でみられた血液希釈の限界

Ht=5.5の時点から oxygen consumption の低下, pH の低下, arterial lactate 値の上昇がみられる

Takaori M, Safar P.: Critical point in progressive hemodilution with hydroxyethyl starch Kawasaki med. J. 1976; 2: 211-222 より引用, 改変

### 人工酸素運搬体製剤の適正粘度

以上のごとく考察すると出血に対して使用される人工酸素運搬体製剤の粘度は理想的には生理的な血液のそれに等しい,あるいは多少高いものであることが望まれる。現在我が国で開発されている人工酸素運搬体製剤の粘度は細胞型人工酸素運搬体製剤で 3.8 centipoise<sup>1)</sup> 非細胞型人工酸素運搬体製剤で 2.8 centipoise<sup>2)</sup> であって対照とした血液の粘度よりは低値である。したがってこれらの製品を大量に使用した場合には上述の末梢組織への血流不全を来す可能性がある。しかし実地臨床での人工酸素運搬体製剤の使用量は出血傾向発生の防止の面（主として希釈性凝固障害）から 20~25 ml/kg・day に制限されると思われる。したがって人工酸素運搬体製剤投与にともなう上記の

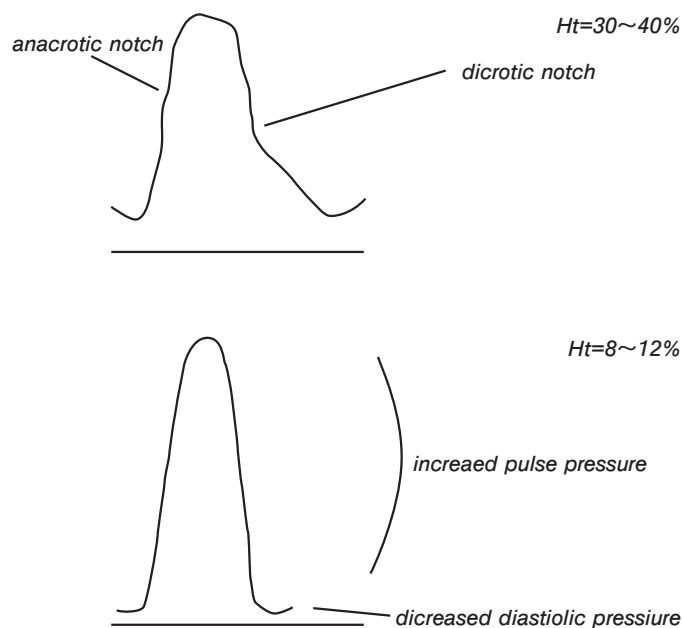


図-6 高度血液希釈 (Ht = 5 % 近傍) でみられる動脈圧波形の変化  
血液希釈の進行とともに拡張期圧の低下, 脈圧の増加がみられる

循環系への好ましからざる影響は生じないものと思われる。ただきわめて危機的な状況,たとえば輸血用血液の供給がなく,人工酸素運搬体製剤のみにたよらねばならない状況下では大量の人工酸素運搬体製剤の使用を余儀なくされる可能性もある。しかし前述した研究<sup>11),30)</sup>に示されるごとくある種の代用血漿剤の併用とともに血液粘度の低下を部分的にでも抑制することも可能である。また酸素運搬体粒子のサイズを大きくすることも一法であろう。とくに細胞型の場合は効果的と思われる。また非細胞型の場合であってもそれなり効果は期待される。いずれにしても現在我が国で開発が進められている細胞型人工酸素運搬体製剤,非細胞型人工酸素運搬体製剤ともにその使用は製剤の粘度の面から臨床的に安全であると思われる。

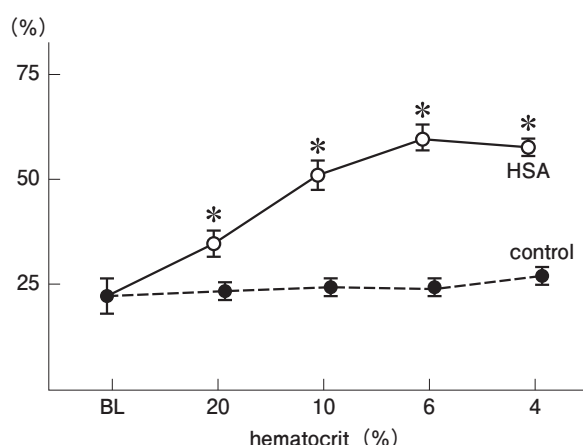


図-7 血液希釈にともなう心筋酸素摂取率の変化

心筋酸素摂取率は Ht=6%が限界でこれ以上の血液希釈では上昇がみられない。

Wilkerson D.K, Rosen A.L, Gould S.A, Sehgal L.R, Sehgal H.L, Moss G.S. Oxygen extraction ratio: A valid indicator of myocardial metabolism in anemia J Surg Res 1987; 42: 629-634 より引用, 改変

## 謝辞

本稿の作成にあたり引用論文の提供を頂いた県立奈良医科大学酒井宏水教授、ならびに中央大学工学部小松章之教授に深甚の感謝を捧げる。

## 参考文献

1. Sakai H, Sou K, Tsuchida E. Hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier. *Method Enzymol* 2009; 465: 364-378
2. Haruki R, Kimura T, Iwasaki H, Yamada K, Kamiyama I, Kohno M, Taguchi K, Nago S, Maruyama T, Odagiri M, Komatsu A. Safety evaluation of hemoglobin-albumin cluster "HemoAct" as red blood cell substitute *Sci Rep* 2015; 5: 12778; 1-9
3. Reemtsma K, Creech O. Viscosity studies of blood, plasma, and plasma substitutes. *J Thorac. Cardiovasc Surg* 1962; 44: 674-680
4. Watson-Williams EJ. Sick-cell treated with Rheomacrodex. *Lancet* 1963; 1: 1053
5. Riquelme BD, Foresio PC, Valverde JR. Alterations to complex viscoelasticity of erythrocytes during storage. *Clin Hemorheol Microcirc* 2000; 22: 181-188
6. Gelin L-E. Studies in anemia of injury. *Acta Chir Scand* 1956; Suppl. 216: 130
7. Bernstein EF, Emmings FG, Evans RL, Castaneda A, Varco R.L. Effect of low molecular weight dextran on red blood cell charge during clinical extracorporeal circulation. *Circulation* 1963; 26: 816-819
8. Richter W. Lowest molecular weight of dextran fractions with aggregating effect on human erythrocytes. *Acta Chir*

*Scand* 1965; 129: 457-461

9. Goto Y, Sakakura S, Hatta M, Sugiura Y, Kato T. Hemorheological effects of colloid plasma substitutes infusion : A comparative study. *Acta Anaesthesiol Scand* 1965; 29: 217-223
10. Lartigue Barre J, Nguyen PH, Potron G. Comparative study of hydroxyethyl starch 200/0.62 versus dextran 60 in hemodilution during total hip replacement : Influences on hemorheological parameters. *Clin Hemorheol* 1993; 13: 779-789
11. Sakai H, Sato A, Takeoka S, Tsuchid E. Rheological properties of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) suspended in a series of plasma-substitute solutions. *Langmuir* 2007; 23: 8121-8128
12. Kopp WL, Beirne GJ, Burns RO. Hyperviscosity syndrome in multiple myeloma. *Am J Med* 1967; 43: 141-146
13. Ratiff AHC. Low molecular weight dextran (Rheomacrodex) in the treatment of severe vascular insufficiency after trauma. *Lancet* 1963; 1: 1188-1189
14. Bergan JJ, Trippel OH, Kaupp HA, Kukral JC, Nowlin WF. Low molecular weight dextran in treatment of severe ischemia. *Arch Surg* 1965; 91: 338-341
15. Langsjoen H, Falconer SH, Sanchez A, Lynch JD. Observations in treatment of acute myocardial infarction with low molecular dextran. *Angiology* 1963; 14: 465-469
16. Long DM, Sanchez L, Varco RL, Lillehei CW. The use of low molecular weight dextran and serum albumin as plasma expanders in extracorporeal circulation. *Surgery* 1961; 50: 12-28
17. Hepps SA, Roe BB, Wright RR, Gardner RE. Amelioration of the pulmonary postperfusion syndrome with hemodilution and low molecular weight dextran. *Surgery* 1963; 54: 232-243
18. Kapur BML, Gulati SM, Talwar JR. Low molecular dextran in the management of frost bite in monkeys. *Ind J Med Res* 1968; 56: 1675-1681
19. Bolooki JH, Goldberg RI, Antell HI, Stuckey JH, Karlson KE. Comparison of the effect of low molecular weight dextran of blood flow and peripheral resistance during extracorporeal circulation and hypothermia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1967; 54: 216-221
20. McFarlane RM, Laird JL, Lamon L, Finlayson AJR, Johnson R. Evaluation of dextran and DMSO prevent necrosis in experimental pedicle flaps. *Plast Reconstr Surg* 1968; 41: 64-70
21. Powley PH. Rheomacrodex in peripheral ischemia. *Lancet* 1963; 1: 1189-1190
22. Bienenstock J, Harding ELT. Low-molecular-weight dextran (Reomacrodex) in ischemic ulceration of the skin. *Lancet* 1964; 1: 524-526

23. Marry JF, Escobar E. Circulatory effects of blood viscosity on hemodynamic responses in acute normovolemic anemia. *Am J Physiol* 1969; 216: 638-642
24. 吉川秀康, 山村秀夫, 山口吉晴, 小杉 功, 岡田和夫, 印南比呂志. 臓器血流分布におよぼす代用血漿剤による血液希釈の影響: HES と Dextran の比較 臨床生理 1975 ; 5 : 442-447
25. Plochl W, Liam BL, Cook DJ, Orszulak TA. Cerebral response to haemodilution during cardiopulmonary bypass in dogs : The role of nitric oxide synthase *Br J Anaesth* 1999; 82: 237-243
26. Takaori M, Safar P. Critical point in progressive hemodilution with hydroxyethyl starch. *Kawasaki Med J* 1976; 2 : 211-222
27. Viele MK, Weiskopf RB. What can we learn about the need for transfusion from patients who refuse blood? *Transfusion* 1994; 34: 396-401
28. Crystal GJ. Coronary hemodynamic responses during local hemodilution in canine hearts. *Am J Physiol* 1988; 254: H525-H531
29. Wilkerson DK, Rosen AL, Gould SA, Sehgal LR, Sehgal HL, Moss GS. Oxygen extraction ratio : A valid indicator of myocardial metabolism in anemia *J Surg Res* 1987; 42: 629-634
30. Cabrales P, Tsai A.G, Intaglietta M. Alginate plasma expander maintains perfusion and plasma viscosity during extreme hemodilution. *Am J Physiol* 2004; 288: H1708-H1716

# 人工酸素運搬体は妊娠高血圧症候群ラットモデルの胎盤低酸素・胎仔発育不全を治療する

## Artificial Oxygen Carriers Rescues Placental Hypoxia and Improves Fetal Development in the Rat Pre-Eclampsia Model

太田 英伸<sup>(1)</sup>, 加賀 麻衣子<sup>(2)</sup>, 李 コウ<sup>(3)</sup>, 酒井 宏水<sup>(4)</sup>, 岡村 州博<sup>(5)</sup>, 八重樫 伸生<sup>(5)</sup>

Hideonbu Ohta<sup>(1)</sup>, Maiko Kaga<sup>(2)</sup>, Heng Li<sup>(3)</sup>, Hiromi Sakai<sup>(4)</sup>, Kunihiro Okamura<sup>(5)</sup>, Nobuo Yaegashi<sup>(5)</sup>

### 和文抄録

本稿では妊娠げっ歯類を対象に人工赤血球（人工酸素運搬体 hemoglobin vesicle : HbV）の安全性と胎盤通過性に注目しながら、人工赤血球を使った妊娠高血圧症候群の新しい治療法を動物モデル（ラット）で検討した。妊娠高血圧症候群の病理機構は胎盤血管発生に役割を果たすトロホブラストの子宮への浸潤不全とそれに伴う胎盤血管の狭小化であることが最近明らかになってきた。これまで妊娠高血圧症候群モデル動物に対する Adrenomedullin および VEGF-121 投与では、母体高血圧を改善することは可能だったが、胎仔の体重減少を抑制することはできなかった。一方、AT1 受容体アンタゴニストである Losartan は、胎仔の体重減少を抑制することはできたが、残念ながら妊婦に投与することは一般的に禁忌である。本研究の目的は、妊娠高血圧症候群で狭小化した子宮螺旋動脈においても小型でスムーズに通過でき、かつ高い酸素運搬能をもつ人工赤血球を用いて、胎盤の低酸素状態を改善する新しい治療法を開発することである。本研究では人工赤血球により、妊娠高血圧症候群モデルラットの胎仔の低酸素状態を解除し、胎仔の発育が改善されることを証明した。将来的に、胎盤慢性低酸素症による重篤な胎児仮死及び発育遅延に起因した妊娠途絶症例に対し、有効な治療法を提供する。

### Abstract

The molecular mechanism of pre-eclampsia is being increasingly clarified and new therapy strategies using chronic infusion of adrenomedullin and VEGF-121 have been proposed. Such treatment has successfully treated maternal high blood pressure but failed to rescue decrease in fetal body weight gain in animal models. Losartan, an AT1 receptor antagonist, succeeded in rescuing fetal body weight gain in another preeclampsia model, although losartan is generally contraindicated for pregnant women in standard usage. In this study, we attempted developing a new therapy for pre-eclampsia by directly rescuing placental ischemia with artificial oxygen carriers(hemoglobin vesicles)since previous data suggest that placental ischemia/hypoxia may alone be sufficient to induce pre-eclampsia through up-regulation of sFlt-1, one of the main candidate molecules for the cause of pre-eclampsia. The present study demonstrated that a simple treatment using hemoglobin vesicles for placental ischemia rescues placental and fetal hypoxia, leading to appropriate fetal growth. The present study is the first to demonstrate hemoglobin vesicles successfully decreasing maternal plasma levels of sFlt-1 and ameliorating fetal growth restriction in the pre-eclampsia rat model. In future, chronic infusion of hemoglobin vesicles could be a potential effective and noninvasive therapy for delaying or even alleviating the need for Cesarean sections in pre-eclampsia.

### Keywords

Artificial oxygen carriers(hemoglobin vesicles), pre-eclampsia, sFlt-1, placental hypoxia, fetal growth

(1) 国立精神・神経センター 精神保健研究所 知的障害研究部 〒187-8553 東京都小平市小川東町 4-1-1 Department of Developmental Disorders, National Institute of Mental Health, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawa-Higashi, Kodaira, Tokyo 187-8553 Japan  
Tel. +81-42-341-2712 (ext.6274); Fax +81-42-346-2158 E-mail: hideohta@ncnp.go.jp

(2) 東北公済病院 小児科 〒980-0803 宮城県仙台市青葉区国分町 2-3-11 Department of Pediatrics, Tohoku Kosai Hospital, 2-3-11 Kokubun-Cho, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-0803 Japan

(3) 国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第2部 〒187-8553 東京都小平市小川東町 4-1-1 Department of Mental Retardation and Birth Defect Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawa-Higashi, Kodaira, Tokyo 187-8553 Japan

(4) 奈良県立医科大学 医学部 化学教室 〒634-8521 奈良県橿原市四条町 840 番地 Department of Chemistry, Faculty of Medicine, School of Medicine, Nara Medical University, 840 Shijo-Cho, Kashihara, Nara, 634-8521 Japan

論文受付 2016 年 5 月 29 日 論文受理 2016 年 9 月 1 日

(5) 東北大学病院 産婦人科 〒980-8574 宮城県仙台市青葉区星陵町 1-1 Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University Hospital, 1-1 Seiryō-Cho, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 980-8574 Japan

## 1. はじめに

妊娠高血圧症候群は5%の妊婦に発症し、重症例では母体死亡、胎児発育遅滞、胎児・新生児死亡を引き起し、出生後の新生児の発達予後を低下させる周産期医療において重篤かつ高率な疾患である<sup>1)</sup>。本疾患の治療では、胎盤娩出が治療の鍵となることが知られていた。実際、妊娠高血圧症候群では、児を娩出しても、胎盤の遺残により症状が続くことが確認され、胎盤由来の物質が全身を循環し、妊娠高血圧症候群を発症するという概念が提唱されている。そのメカニズムの一端として、胎盤血管発生に役割を果たすトロポブラストの子宮への浸潤不全とそれに伴う胎盤血管の狭小化であることが最近明らかになってきた。胎盤病理より妊娠高血圧症候群症例では、胎盤脱落膜・子宮筋層へのトロポブラストの浸潤が浅く、かつ胎盤脱落膜中の螺旋（らせん）動脈壁が肥厚し血管径が狭小化することが指摘されている。つまり、螺旋動脈の血行不全により胎盤に十分な血液循環が維持できず、母子間のガス交換、栄養物質運搬、老廃物の代謝が抑制され、胎児が低酸素状態・子宮内発育不良になることが本疾患の病態である<sup>2)</sup>。

近年、妊娠高血圧症候群のメカニズムとして、胎盤からsoluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) と soluble Endoglin (sEng) が過剰分泌され、VEGF と TGF- $\beta$ 1 が関わる血管形成シグナルを抑制することにより、母体血管機能障害を起こすことが報告された。加えて、angiotensin II type I receptor activating autoantibodies (AT1-AA)、免疫因子そして酸化ストレス等が胎盤機能障害を誘導し、胎盤由来の抗血管新生因子sFlt1, sEng および炎症因子が過剰分泌されることにより、妊娠高血圧症候群を悪化させることも確認された。しかし残念ながら明確な関連因子および病態の全体像を特定するには至っていない。今後とも関連因子の探索が長期に継続することが予想され、「妊娠高血圧症候群」に対する根本的な治療法は現在確立していない<sup>3), 4)</sup>。

そこで私達は視点を変え、関連因子を特定し胎盤形成期における螺旋動脈の狭小化を抑制しようとする、これまでの「予防治療」の開発でなく、胎盤形成過程で既に狭小化した螺旋動脈に対応する「対処治療」を開発する戦略を選択した。具体的には狭小化した螺旋動脈においても通過できる小型（ナノスケール・サイズ）で、かつ高い酸素運搬能をもつ「人工酸素運搬体」を用いて、胎盤組織の低酸素状態を改善する。最近、胎盤組織の低酸素状態により誘導されたsFlt-1の過剰分泌により妊娠高血圧症候群が発症する可能性が明らかになってきた<sup>3)</sup>。そのため、「人工酸素運搬体」で胎盤低酸素状態を直接解除することにより、妊娠高血圧症候群の病因を取り除き、胎盤低酸素と胎児の発育状態を改善することが期待できる。

げっ歯類の実験では、人工赤血球の立体構造と大きさは、血管攣縮や高血圧を誘導せず、安定した血液循環の維持に有利であることが明らかになっている<sup>5)</sup>。加えて、ポリエチレングリコール（PEG）による人工赤血球の表面加工は、人工赤血球の長時間の体内循環に有効であるだけでなく、長期貯蔵・静脈内注入において末梢組織の血漿で生じやすい人工赤血球の凝集抑制にも役立つことも明らかになった<sup>6), 7)</sup>。分解・排泄において

は、人工赤血球を臨床適用量よりも過度に投与しても、細網内皮系が血漿鉄・ビリルビン値を正常範囲内に保つ十分な処理能力をもつことが報告されている<sup>7-9)</sup>。

これまでの動物モデルの研究から、人工酸素運搬体は、脳梗塞といった局所血流障害の病態に有効であることが明らかになっている<sup>10), 11)</sup>。人工酸素運搬体の長所は、血液型が存在せず、高い酸素運搬能をもち、かつ通常の赤血球より小型なので、脳梗塞で形成された血栓で狭小化した血管においても通過可能な点である。私達の研究では脳梗塞の治療法開発に準じ、妊娠高血圧症候群により狭小化した胎盤螺旋動脈を通過できる人工酸素運搬体を利用し、胎児の低酸素状態を解除するかどうかを検討した。

以上の背景から本稿では、周産期における人工赤血球の臨床応用を目的として、人工赤血球が妊娠母体・胎児の生理機能に与える影響・副作用および胎盤通過性を検討した。その適用の1つとして、NO合成酵素阻害剤L-NAMEを持続投与して作成した妊娠高血圧症候群モデルラット<sup>12), 13)</sup>を用いて、妊娠高血圧症候群に認められる高血圧、血漿sFlt-1濃度の上昇、胎盤血管の狭小化、および胎児低酸素症に対する人工酸素運搬体(HbV)の効果を検討した。先行研究から、濃度200mg/kg/dayの人工酸素運搬体(HbV)がモデル動物の局所低酸素状態を改善するのに最も有効であることが確認されている<sup>10), 11), 14)</sup>。この結果に従い、本研究においても、同量のHbVを7日間連日投与した。

## 2. 人工酸素運搬体 (HbV) 溶液の薬理学的特徴<sup>5), 7), 15)</sup>

人工酸素運搬体の精製は期限切れ赤血球（北海道赤十字血液センターと日本赤十字社より供与）を用いて無菌条件にて調製した。被包したヘモグロビン(38g/dl)は14.7mM pyridoxal 5'-phosphate(Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI)を含み、Hbに対してpyridoxal 5'-phosphateを2.5倍mol添加した。HbVの膜成分には、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine, cholesterol, 1,5-O-di-hexadecyl-N-succinyl-L-glutamate, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-PEG5000を用い、組成比を5:4:1:0.03 (Mol比)とした。また、小胞体の表面はPEGチェーンで覆われている。このHbVを生理食塩水に分散して得られた多重層小胞体を孔径0.45 $\mu$ mのフィルターを透過させ、窒素ガス脱気装置で酸素を除去し保存した。人工酸素運搬体の物理化学的なパラメータは：粒子直径、 $252 \pm 53$ nm; [Hb], 10 g/dl; [lipids], 6-7 g/dl; 酸素親和力( $P_{50}$ ), 25-28 Torr.で、内毒素含有量は0.2unit/ml以下である。HbVの粒子径は250nmで赤血球の1/30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。更に人工酸素運搬体はウィルスが混入せず、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ことも確認されている。

### 3. 人工酸素運搬体 (HbV) 溶液の安全性と胎盤通過性<sup>14)</sup>

ラット胎盤関門の分化が終了する妊娠後期において、人工赤血球投与がラット妊娠母体・胎仔に与える影響・胎盤通過性を検討した。成体ラットモデルにて急性脳虚血の治療を検討した先行研究と同様に、連日 2ml/kg の人工赤血球投与を胎生 16 日 (E16) から E22 の 7 日間行った。この人工赤血球の連日投与においても、母体のバイタルサイン、血算・生化学所見は、正常範囲で、母体・胎児の体重および胎盤重量に影響はなかった (図 1a-c)。また、母体・胎仔間における人工赤血球の動態は、

胎盤に限定され、人工赤血球は胎仔に到達しなかった。実際、ヒトヘモグロビン抗体による病理組織学的検査では、母体の脾臓、肝臓、腎臓、胎盤における人工赤血球の蓄積を検出したが、胎仔組織における蓄積は認めなかった (図 1d-i)。また、<sup>125</sup>I 標識した人工赤血球を用いた薬物動態試験においても同様の結果が確認された (図 1j)。以上の結果より、人工赤血球の連日投与に対して、母体臓器の機能低下や胎仔の発育不全の兆候は認めず、人工赤血球の胎盤通過も確認できなかった。

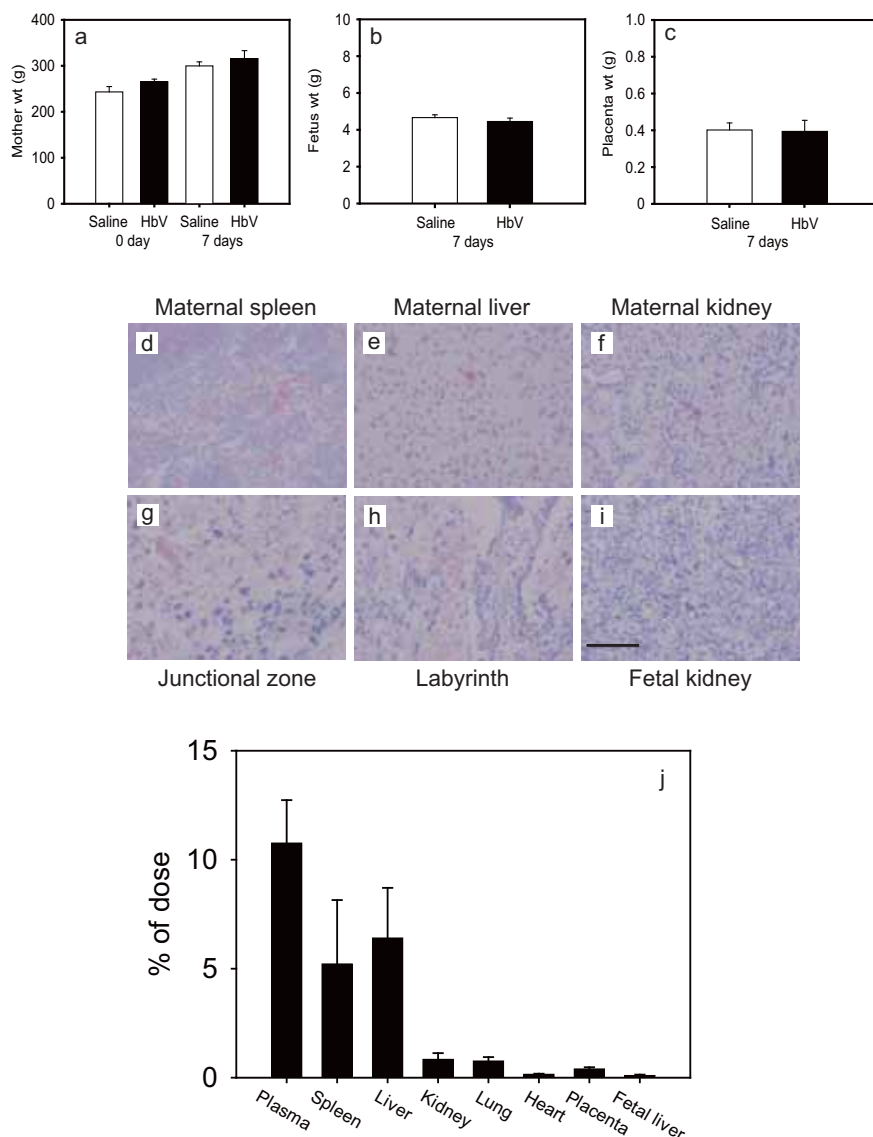


図1 人工酸素運搬体 (HbV) 溶液の胎盤通過性と安全性

(a)生理食塩水・HbV 投与群の妊娠母体の体重は、妊娠 16 日をベースライン (0 日目) として生理的食塩水投与群 243.2 ± 26.0g, HbV 投与群 265.6 ± 12.2g であったが、HbV 連日投与後の 7 日目 (妊娠 23 日) に生理的食塩水・HbV 投与群はそれぞれ 299.8 ± 19.8g, 315.8 ± 38.5g と増加していた。2 群間の統計学的有意差はなかった。HbV 連日投与後の 7 日目、(b)胎仔体重と (c)胎盤重量についても、2 群間の統計学的有意差はなかった。(d)HbV のヒトヘモグロビン (Hb) をピンクに染める抗ヒト Hb 抗体を使用した免疫染色では、HbV を 7 日間連続投与したところ、母体の (d)脾臓、(e)腎臓および (f)胎盤の (g)junctional zone (着床連結帯) および (h)labyrinth (胎盤迷路層) で、ヒト Hb が検出されたが、(i)胎仔肝臓などの胎仔臓器では HbV は検出されなかった。(j) <sup>125</sup>I-HbV を投与し、12 時間後の各臓器における組織分布を確認した。<sup>125</sup>I-HbV は、妊娠母体の血漿、脾臓、肝臓といった臓器に主に分布し、他のほとんどの臓器で有意に低かった。胎仔肝臓などの胎仔の臓器に <sup>125</sup>I-HbV の分布が極めて低いことから、母体から胎仔への HbV の胎盤移行性は否定された。

#### 4. 妊娠高血圧症候群モデルラットの胎盤・胎仔障害と人工酸素運搬体 (HbV) <sup>15), 16)</sup>

##### 4-1. 妊娠高血圧症候群モデルラットの作製について

9週齢で妊娠させた近交系 Wistar 雌ラット (日本クレア株式会社) を使用した。飼料及び飲料水は自由摂取とし、室温  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明暗12時間周期で飼育した。妊娠10日目に pentobarbital sodium を腹腔内投与し、麻酔下にて右鎖骨上部を切開し、右内頸静脈にカテーテルを挿入した。次に、妊娠14日目から妊娠20日まで、カテーテルより L-NAME 50mg/day 持続投与した。7日間の L-NAME 投与と同時に、2ml/kg の人工血液 (n=5) あるいは生理食塩水 (n=5) をカテーテルより7日間連日投与した。7日間投与した人工酸素運搬体の総量は 14ml/kg となり、ラットの推定循環血液量 (56ml/kg) の25%に相当した。人工赤血球の濃度を 10g/dl に調製したため、実験個体に7日間投与した人工赤血球の総量は 1400mg/kg になった。解剖はラットの妊娠21日目 (予定出産日の前日) に行った。カテーテルより生理食塩水だけを持続投与したラットをコントロール群とした。

##### 4-2. 妊娠高血圧症候群モデルラットの高血圧に対する人工酸素運搬体 (HbV) の効果

妊娠ラットの血圧測定は tail-cuff 法にて妊娠14~21日の連続7日間行った<sup>17)</sup>。収縮期血圧の結果を図2に示す。L-NAME 投与前の妊娠14日において、生食投与群ラットの血圧は  $107.3 \pm 2.9\text{mmHg}$  であり、他の2群 (L-NAME 投与群, L-NAME+HbV 投与群) の血圧  $106 \pm 6.8\text{mmHg}$  との間に有意差は認めなかった。その後 L-NAME 50mg/day 投与が開始されると、妊娠ラットの血圧は有意に上昇し、妊娠16日には  $143.3 \pm 5.1\text{mmHg}$  まで到達した。この上昇した血圧レベルは妊娠21日まで維持された。同様の血圧変化が L-NAME+HbV 投与群にも確認され、有意な差は認められなかった (図2a)。つまり、本研究では、人工酸素運搬体 (HbV) の投与により、L-NAME が誘導した妊娠母体の血圧上昇を抑制することはできなかった。これは、L-NAME が sFlt-1 と sEng のシグナルを介さず、血管内皮細胞における NO 合成酵素を直接阻害し、血管を収縮させることが原因と考えられる。

##### 4-3. 妊娠高血圧症候群モデルラットの血漿 sFlt-1・sEng に対する人工酸素運搬体 (HbV) の効果

次に私達は、妊娠高血圧症候群の原因と考えられる sFlt-1 と sEng に対して人工酸素運搬体が与える影響を検討した。sFlt-1 と sEng の計測は、妊娠21日目に3群 (生理食塩水投与群, L-NAME 投与群, L-NAME+HbV 投与群) から血漿を採集し、ELISA にて測定した<sup>18), 19)</sup>。その結果、L-NAME 投与群の血漿 sFlt-1 値 ( $265\text{pg/ml} \pm 12$ ) は、生理食塩水投与群 ( $122\text{pg/ml} \pm 11$ )、L-NAME+HbV 投与群 ( $207\text{pg/ml} \pm 12$ ) より有意に増加した (図2b)。一方、血漿 sEng 値は、3群間で有意な差を認めなかった (図2c)。以上の結果より、人工酸素運搬体 (HbV) はモデルラットの胎盤における低酸素状態を改善し、血漿 sFlt-1 値を低下させることが確認された。

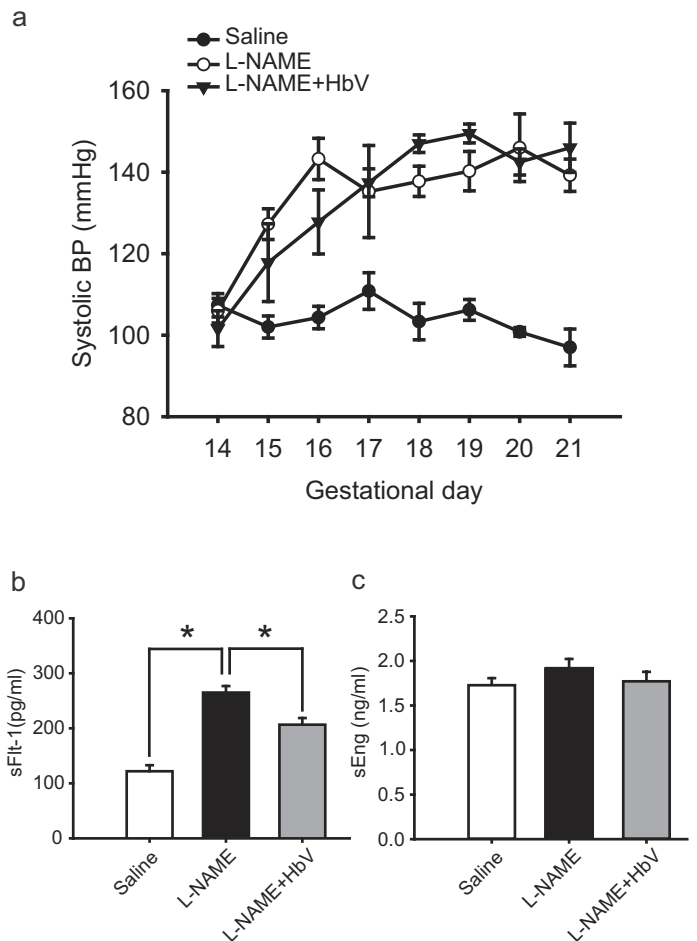


図2 L-NAME 及び人工酸素運搬体 (HbV) の投与による妊娠母体の血圧変化及び血漿 sFlt-1, sEng 濃度の変化

(a) L-NAME 及び人工酸素運搬体 (HbV) の投与による妊娠母体の血圧変化。白丸、生理食塩水投与群；黒丸、L-NAME 投与群；三角、L-NAME+HbV 投与群。L-NAME により妊娠ラットの血圧が上昇する。L-NAME による妊娠母体血圧上昇に対する人工血液の効果は認められなかった (\* $P < 0.05$ , two-way ANOVA, Dunette)。 (b) 血漿 sFlt-1 および (c) sEng 濃度の変化。L-NAME 投与群の血漿 sFlt-1 濃度は、生理食塩水投与群と L-NAME+HbV 投与群より有意に増加したが、血漿 sEng 濃度は3群で有意差を認めなかった。

##### 4-4. 妊娠高血圧症候群モデルラットの胎盤低酸素状態に対する人工酸素運搬体 (HbV) の効果

次に、低酸素バイオマーカーの一つである HIF-1 $\alpha$  蛋白質を指標として、人工酸素運搬体が胎盤の低酸素状態に与える影響を検討した。妊娠21日に3群 (生理食塩水投与群, L-NAME 投与群, L-NAME+HbV 投与群) から胎盤を採集し、免疫染色法にて胎盤 HIF-1 $\alpha$  蛋白を評価した。胎盤は胎仔側の labyrinth 層と母体側の spongiotrophoblast 層に大別される。labyrinth 層 (図3a-c) と spongiotrophoblast 層 (図3d-f) の HIF-1 $\alpha$  蛋白の免疫陽性所見を図3a-f に示す。その結果、labyrinth 層においては L-NAME 投与群の HIF-1 $\alpha$  陽性細胞数 ( $509.8\text{cells} \pm 31.1$ ) は、生理食塩水投与群 ( $255.8\text{cells} \pm 13.4$ )・L-NAME+HbV 投与群 ( $309.9\text{cells} \pm 20.6$ ) より有意に増加した (図3g)。また、spongiotrophoblast 層においては HIF-1 $\alpha$  陽性細胞の数も同様の

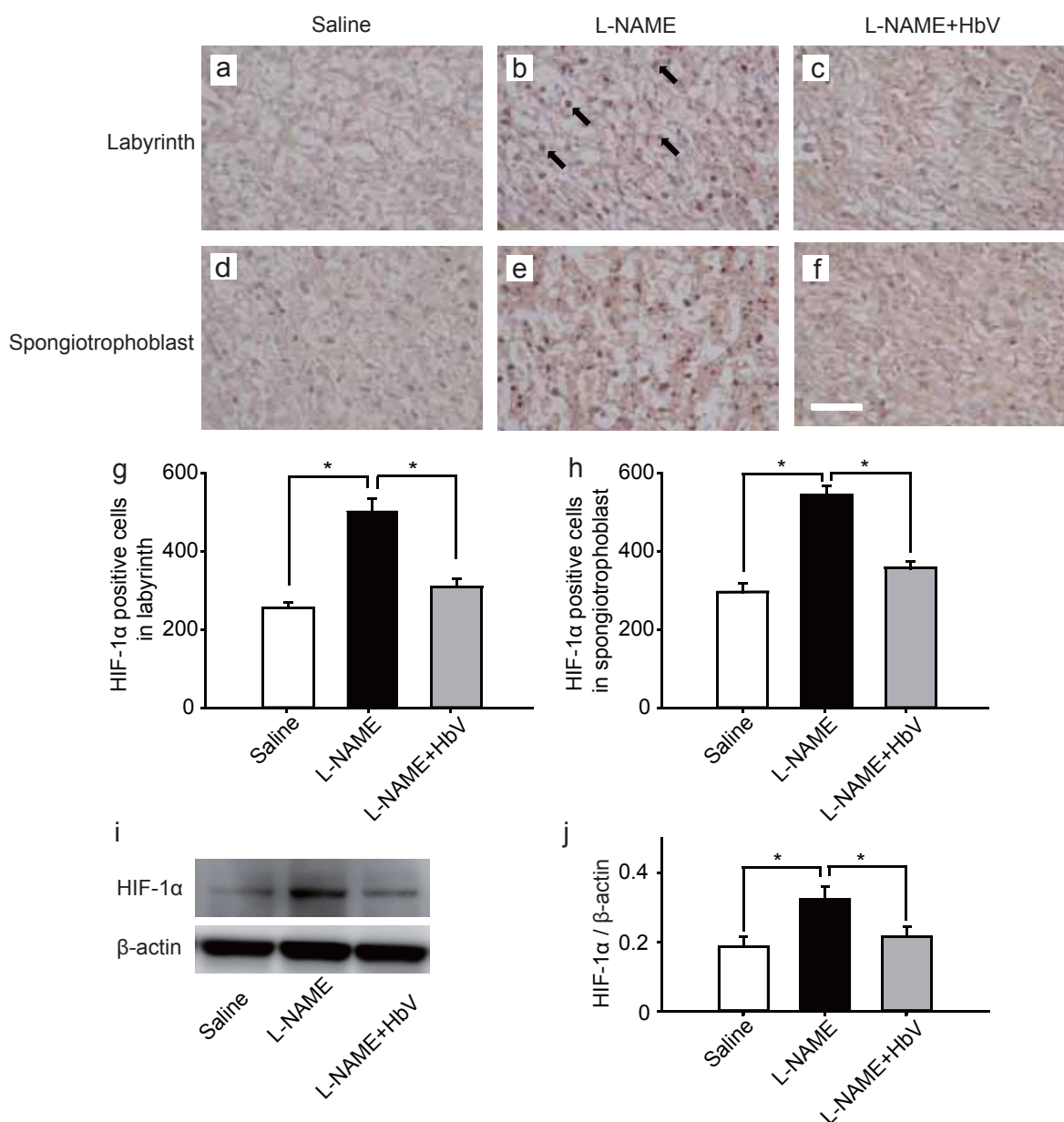


図3 妊娠ラットの胎盤度の低酸素状態に対する人工血液の影響

胎盤の labyrinth 層 (胎仔側胎盤)・spongiotrophoblast 層 (母体側胎盤) のそれぞれにおいて L-NAME 投与群 (b), (e) の Hif-1 $\alpha$  免疫陽性細胞の数は生理食塩水投与群 (a), (d) と L-NAME+HbV 投与群 (c), (f) より有意に増加した。Labyrinth 層 (g) と spongiotrophoblast 層 (h) に発現している Hif-1 $\alpha$  免疫陽性細胞を定量した結果を示す。 (i), (j) Western blot 法を用いた胎盤 Hif-1 $\alpha$  蛋白質発現量を示す。

変化を示し、L-NAME 投与群の陽性細胞数 ( $537.3 \text{ cells} \pm 22.8$ ) は、生理食塩水投与群 ( $289.3 \text{ cells} \pm 21.4$ )・L-NAME+HbV 投与群 ( $349.2 \text{ cells} \pm 16.8$ ) より有意に増加した (図 3h)。合わせて、胎盤における HIF-1 $\alpha$  蛋白量を western blot 法にて評価したところ、免疫染色の結果と同様に、L-NAME 投与群の胎盤 HIF-1 $\alpha$  蛋白は、生理食塩水投与群と L-NAME+HbV 投与群より増加していた (図 3i, j)。以上より人工酸素運搬体 (HbV) はモデルラットの胎盤における低酸素状態を改善することが確認された。

#### 4-5. 妊娠高血圧症候群モデルラットの胎仔低酸素状態と胎仔発育に対する人工酸素運搬体 (HbV) の効果

最後に、胎仔の低酸素状態と身体発育に対して人工酸素運搬体が与える影響を検討した。胎仔の低酸素状態を評価するため、子宮内 Rosa26::Luc ラット胎仔を使用した。Rosa26::Luc ラットは Rosa26 プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を結合したコンストラクトにて作成された<sup>20)</sup>。Rosa26 遺伝子は全細胞組織に発現するため、全身において生物発光を確認できる。そのため、Rosa26-luc ラットのホモのオスを野生型のメスと掛け合わせると、胎仔が Rosa26-luc のヘテロとなり、妊娠母体は生

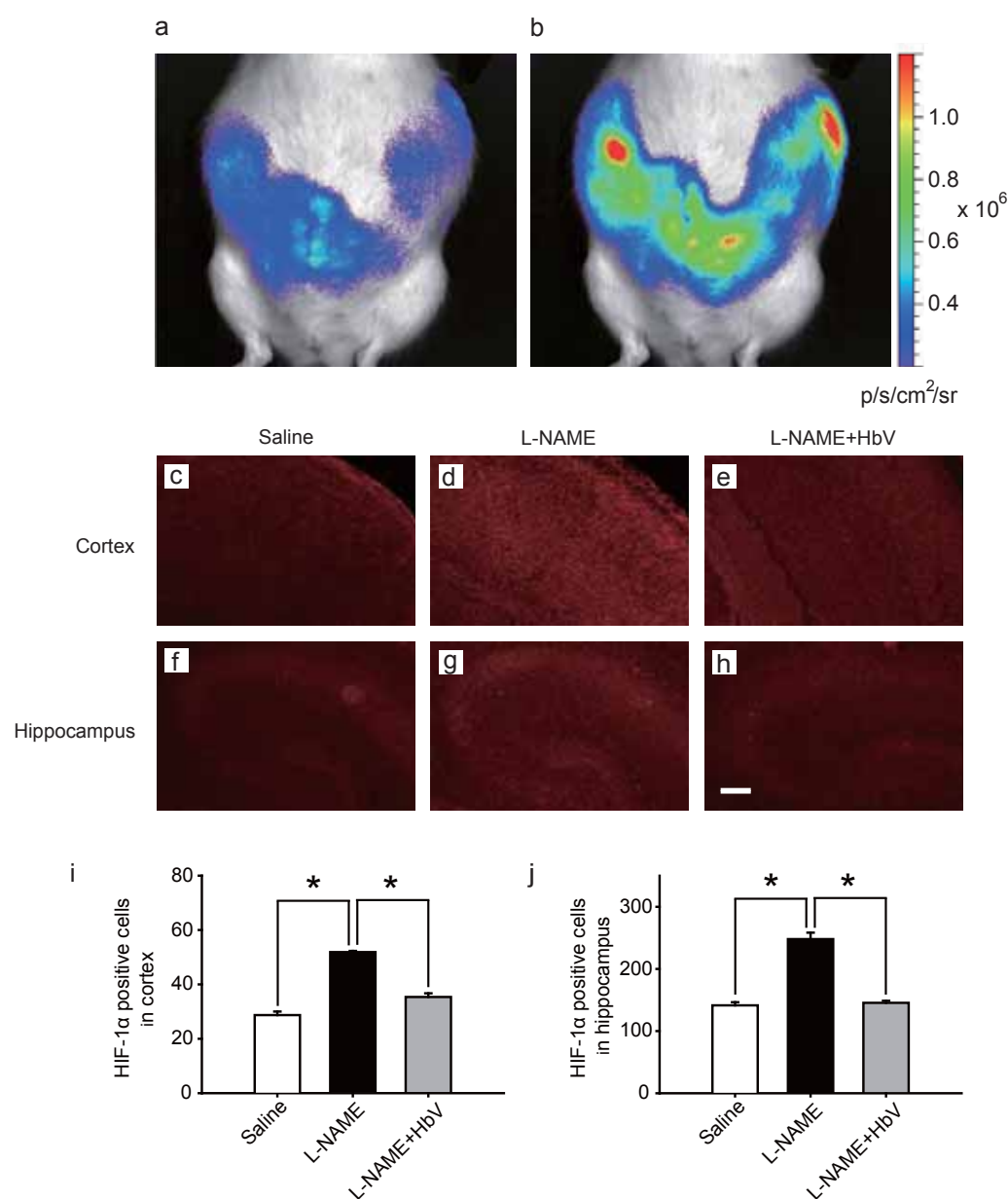


図4 胎仔の低酸素状態に対する人工血液の影響

(a), (b)胎生21日のRosa26::lucラット胎仔における生物発光を用いて胎仔の低酸素状態を評価した。ヘテロのRosa26::lucラット胎仔の生物発光レベル ( $p/s/cm^2/sr$ ) は右のスケールバーに対応している。(b)人工赤血球投与により、Rosa26::luc胎仔においては、(a)生理食塩水投与より発光レベルが上昇する。

(c-h)胎仔脳におけるHif-1 $\alpha$ 免疫陽性細胞。胎仔脳の脳皮質と海馬におけるL-NAME投与群(d), (g)のHif-1 $\alpha$ 免疫陽性細胞数は生理食塩水投与群(c), (f)とL-NAME+HbV投与群(e), (h)より有意に増加した。この結果はL-NAMEが誘導した胎仔脳の低酸素状態がHbV投与により改善することを示している。胎仔脳の(i)脳皮質と(j)海馬に発現したHif-1 $\alpha$ 免疫陽性細胞数のカウント結果を示す(\* $P < 0.05$ , one-way ANOVA, Dunette)。スケールバー：100  $\mu m$ 。

物発光せず胎仔のみが発光する妊娠モデルを作成できる<sup>21)</sup>。また、ルシフェリンの発光反応は酸素依存性であるため、低酸素状態では発光レベルが低下し、Rosa26::Lucラット胎仔の発光量は胎仔の低酸素状態の指標として使用できる。妊娠高血圧症候群モデル・ラットに人工赤血球0.6mlを投与したところ、Rosa26::luc胎仔の発光レベルが1.71倍上昇し、低酸素状態が解除されることが示された(図4a, b)。

また、胎仔脳におけるHIF-1 $\alpha$ 蛋白質の発現を調べ、胎仔の

低酸素状態を評価した。Fig3c-hは妊娠14~21日に母ラットに生理食塩水(図4c, f), L-NAME(図4d, g), L-NAME+HbV(図4e, h)を投与した際の胎仔脳皮質・海馬におけるHIF-1 $\alpha$ の発現を示している。皮質では、生理食塩水投与群(28.7 cells  $\pm$  1.3)・L-NAME+HbV投与群(35.4 cells  $\pm$  1.3)に比べ、L-NAME投与群でHIF-1 $\alpha$ 陽性細胞が有意に(51.9 cells  $\pm$  0.4)増加した。(図4i,  $P < 0.05$ , 一元配置分散分析, Dunette)。

また、海馬でも、生理食塩水投与群(141.1 cells  $\pm$  5.0)・

L-NAME+HbV 投与群 ( $145.5 \text{ cells} \pm 3.3$ ) と比べ、L-NAME 投与群 ( $248.0 \text{ cells} \pm 10.3$ ) で HIF-1 $\alpha$  陽性細胞が有意に増加した。(図 4j,  $P < 0.05$ , 一元配置分散分析, Dunette). この結果は、妊娠中の母親ラットに対する HbV 投与が、胎仔脳の低酸素状態を改善したことを示している。

低酸素症による胎仔脳の神経細胞死及び、損傷後に生き残り成熟した神経細胞を評価するため、GFAP および NeuN の免疫染色を行った。大脳皮質の GFAP 陽性領域は、生理食塩水 ( $5.0\% \pm 0.3$ , 図 5a), L-NAME ( $5.3\% \pm 0.3$ , 図 5b), L-NAME+HbV ( $5.0\% \pm 0.2$ , 図 5c) を投与した 3 群間で統計学的な有意差を示さなかった (一元配置分散分析, Dunette, 図 5g). 対照的に海馬歯状領域においては、L-NAME 投与群 ( $46.1\% \pm 1.7$ , 図 5e) では、生理食塩水投与群 ( $20.3\% \pm 0.9$ , 図 5d) 及び L-NAME+HbV ( $30.0\% \pm 0.6$ , 図 5f) に比べ、GFAP 発現が著しく増加し反応性アストログリオシスの所見を確認した (一元配置分散分析, Dunette  $P < 0.05$ , 図 5h). この結果は、L-NAME を投与した妊娠母ラットに HbV を投与すると、低酸素症による胎仔脳の神経細胞の損傷を改善したことを示している。また、大脳皮質 (図 5i, j, k) における NeuN 陽性細胞には、3 群間で組織学的差異は認められなかった (図 4o). 一方、海馬歯状領域では、L-NAME 投与群 ( $180.3 \text{ cells} \pm 12.7$ , 図 5m) は生理食塩水投与群 ( $198.2 \text{ cells} \pm 11.7$ , 図 5l) 及び L-NAME+HbV ( $200.6 \text{ cells} \pm 12.3$ , 図 5n) に比べ、神経細胞が低密度になっており (図 5p), 脳の神経細胞死を示唆する GFAP の所見と一致した。

次に、胎仔の身体成長に対する人工酸素運搬体 (HbV) の効果を調べた。L-NAME を投与した妊娠ラット・モデルにおける胎仔体重・胎盤重量に対する HbV の効果を検討した。その結果、L-NAME 投与群の胎仔体重 ( $3.5 \text{ g} \pm 0.1$ ) は、生理食塩水群の胎仔体重 ( $4.6 \text{ g} \pm 0.2$ ) より有意に少なかった (図 5q). また HbV 投与は、L-NAME により誘導された体重低下を抑制し、平均胎仔体重を  $4.1 \text{ g} \pm 0.1$  に回復させた。L-NAME 投与群の母ラットの胎盤重量 ( $0.34 \text{ g} \pm 0.02$ ) は生理食塩水投与群 ( $0.40 \text{ g} \pm 0.03$ ) または L-NAME+HbV 投与群 ( $0.43 \text{ g} \pm 0.01$ ) よりも有意に少なかった (図 5r). これらのデータは、L-NAME 投与群の妊娠ラットに HbV を投与することにより、胎仔発育不全を改善できることを示している。

## 5. 胎仔低酸素状態に対する人工酸素運搬体 (HbV) の保護効果とその作用機序

今回の研究で、妊娠高血圧症候群モデルラットにおいて人工酸素運搬体 (HbV: ヘモグロビン小胞体) の効果に関して 2 つのことが明らかになった。第一に、妊娠高血圧症候群モデルラットにおいて、これまでの胎仔の体重減少を抑制できなかったアドレノメデュリン<sup>22)</sup> 及び VEGF-121<sup>23)</sup> と対照的に、HbV は胎仔発育不全を改善し、脳の神経細胞死を抑制することを確認した。この違いは、胎仔低酸素症の原因となる胎盤低酸素を解除する効果が、アドレノメデュリン・VEGF-121 より HbV で大きい可能性を示している。図 4・図 5 で示したように、胎盤と胎仔

脳細胞における HIF-1 $\alpha$  の発現は HbV 投与により減少し、HbV が胎盤への酸素供給を増加させることにより胎仔低酸素症を解除したことを示している。この結果は、Rosa26::luc 胎仔の生物発光レベルが HbV 急性投与により上昇したインビボ・イメージングとも一致し、胎仔低酸素症は HbV 投与に伴う酸素供給により一時的に解除されることを示している (図 4a, b)。

さらに、本研究の結果は、低酸素が原因と考えられる胎仔脳細胞のアストログリオシスが HbV 投与により抑制されることを示した (図 5a-h). アストログリオシスは脳損傷を検出する高感度のマーカーであり、また乳児の脳における脳室周囲白質軟化症 (PVL) の特徴の一つである<sup>24-26)</sup>。アストログリオシスを GFAP 免疫染色にて確認したところ、生理食塩水投与群・L-NAME+HbV 投与群では胎仔海馬における GFAP 陽性細胞は、L-NAME 投与群より著しく少なかった。この結果は妊娠母ラットにおいて、L-NAME 依存性の低酸素症による胎仔脳の細胞死を HbV が有効に抑制したことを示している。GFAP の結果は、成熟ニューロンの指標である NeuN 免疫染色の結果でも確認され (図 5i-p), HbV 投与が L-NAME により誘導された胎仔の海馬損傷を抑制することを示唆している。

第二に、本研究で、L-NAME 投与群と比較して L-NAME+HbV 投与群では、血清 sFlt-1 値が減少することも確認した (図 2b). この結果は、胎盤における虚血・低酸素症が、循環血液中の sFlt-1 値を上昇させるとするこれまでの報告と一致している<sup>2)</sup>。すなわち、HbV 投与が胎盤低酸素症を直接解除し、血清 sFlt-1 値の上昇を抑制したと推測される。一方、本研究において sEng 値は HbV 投与の前後で不変だったが (図 2c), 同様に L-NAME 投与にて作成した妊娠高血圧症候群モデル・ラットにおいて血清 sFlt-1 値が増加した一方で、sEng 値に変化がなかったとする最近の報告と一致する<sup>18)</sup>。この結果は、胎盤から過剰に分泌された sFlt-1 及び sEng が、血管内皮における VEGF 及び TGF- $\beta$ 1 を介したシグナル伝達を阻害し NO 生産を減少させるという妊娠高血圧症候群のメカニズムに対して、HbV 投与が新しい有効な治療法となる可能性を示している。

## 6. 結語

人工酸素運搬体 (HbV: ヘモグロビン小胞) は、妊娠高血圧症候群モデル・ラットの狭小化した子宮螺旋動脈に対して有効に酸素を供給することにより、胎盤・胎仔低酸素症を解除し、血清 sFlt-1 値の上昇を抑制する。今後、ヒトを対象とした治療においても同様の効果が得られるか、確認を行うための臨床研究が求められる。興味深いことにヒトの毛細血管の最小直径は約  $8 \mu\text{m}$  であり、この血管径は種によらずほぼ同じであることが知られている<sup>27)</sup>。その理由として、組織と毛細血管との間におけるガス交換・栄養供給・代謝物運搬にはヒトと他の動物種との間で同一の生理学的特性が存在することが想定されている<sup>28)</sup>。このため、ラット・モデルで得られた今回の結果は、ヒトにも応用できる可能性がある。本研究は妊娠高血圧症候群モデルにおける胎盤・胎仔低酸素症に対する HbV 投与の効果を初めて確認した最初の報告であり、今後の HbV の臨床応用へ

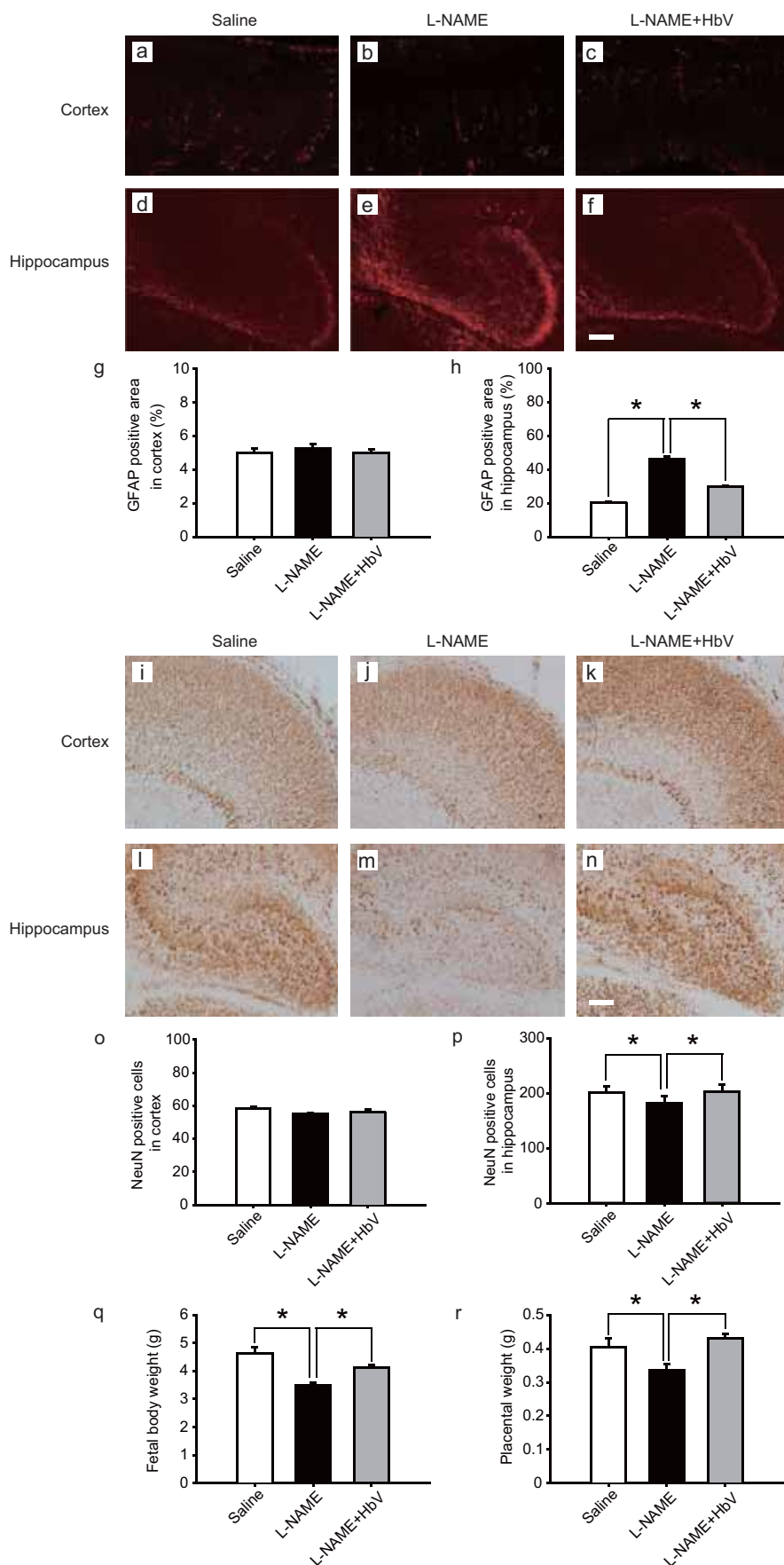


図5 胎仔の発育に対する人工血液の影響

(a-f)胎仔脳におけるGFAPの免疫陽性所見。胎仔脳の海馬における(e)L-NAME投与群のGFAP免疫陽性細胞数は、(d)生理食塩水投与群と(f)L-NAME+HbV投与群より有意に増加した。この結果はHbV投与がL-NAME誘導した胎仔脳のアポトーシスを抑制することを示している。(g)大脳皮質と(h)海馬に発現したGFAPの免疫陽性面積の結果を示す。(i-n)胎仔脳におけるNeuNの免疫陽性所見。L-NAME投与群(m)の海馬において、NeuNの免疫陽性細胞数が低下する(m, p)。

(q-s)胎仔体重・胎盤重量・胎仔数に対するL-NAME及び人工酸素運搬体(HbV)の影響。7日間のL-NAME投与群の(q)胎仔体重と胎盤重量(r)は、生理食塩水・L-NAME+HbV投与群に比較し有意に減少した。3群間で胎仔数の有意差は見られなかった(s)。この結果はL-NAMEによる胎仔・胎盤発育不良をHbV投与により改善したことを示している。(\* $P < 0.05$ , one-way ANOVA, Dunnett)。スケールバー：100  $\mu\text{m}$ 。

結びつく基礎的な情報を提供した。また本研究は、将来的には、妊娠高血圧症候群における帝王切開を回避し、HbV点滴療法にて治療する新しい可能性を示した。

## 引用文献

1. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005; 365: 785-799.
2. Myatt L, Webster RP. Vascular biology of preeclampsia. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 375-384.
3. Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation* 2011; 123: 2856-2869.
4. Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, Zhang H, Mi T, Popek EJ, Hicks MJ, Ramin SM, Kellems RE, Xia Y. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat Med* 2008; 14: 855-862.
5. Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Molecular dimensions of Hb-based O<sub>2</sub> carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension in conscious hamster model. *Am J Physiol* 2000a; 279: H908-15.
6. Sakai H, Tsai AG, Kerger H, Park SI, Takeoka S, Nishide H, Tsuchida E, Intaglietta M. Subcutaneous microvascular responses to hemodilution with a red cell substitute consisting of polyethyleneglycol-modified vesicles encapsulating hemoglobin. *J Biomed Mater Res* 1998; 40: 66-78.
7. Sakai H, Tomiyama KI, Sou K, Takeoka S, Tsuchida E. Polyethyleneglycol-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin vesicles as O<sub>2</sub> carriers in a liquid state. *Bioconjug Chem* 2000b; 11: 425-32.
8. Taguchi K, Maruyama T, Iwao Y, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Tsuchida E, Kai T, Otagiri M. Pharmacokinetics of single and repeated injection of hemoglobin-vesicles in hemorrhagic shock rat model. *J Control Release* 2009a; 136: 232-9.
9. Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Maruyama T, Watanabe H, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, Kai T, Otagiri M. Pharmacokinetic study of enclosed hemoglobin and outer lipid component after the administration of hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier. *Drug Metab Dispos* 2009b; 37: 1456-63.
10. Chang, T. M. Therapeutic applications of polymeric artificial cells. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 221-235.
11. 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.
12. Tsukimori K, Komatsu H, Fukushima K, Kaku T, Nakano H, Wake N. Inhibition of nitric oxide synthetase at mid-gestation in rats is associated with increases in arterial pressure, serum tumor necrosis factor-alpha, and placental apoptosis. *Am J Hypertens* 2008; 21: 477-481.
13. Verlohren S, Niehoff M, Hering L, Geusens N, Herse F, Tintu AN, Plagemann A, LeNoble F, Pijnenborg R, Muller DN, Luft FC, Dudenhausen JW, Gollasch M, Dechend R. Uterine vascular function in a transgenic preeclampsia rat model. *Hypertension* 2008; 51: 547-553.
14. Kaga M, Li H, Ohta H, Taguchi K, Ogaki S, Izumi H, Inagaki M, Tsuchiya S, Okamura K, Otagiri M, Sakai H, Yaegashi N. Liposome-encapsulated hemoglobin (hemoglobin-vesicle) is not transferred from mother to fetus at the late stage of pregnancy in the rat model. *Life Sci* 2012; 91: 420-428.
15. Li H, Ohta H, Tahara Y, Nakamura S, Taguchi K, Nakagawa M, Oishi Y, Goto Y, Wada K, Kaga M, Inagaki M, Otagiri M, Yokota H, Shibata S, Sakai H, Okamura K, Yaegashi N. Artificial oxygen carriers rescue placental hypoxia and improve fetal development in the rat pre-eclampsia model. *Sci Rep* 2015; 5: 15271.
16. Sou K, Naito Y, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. Effective encapsulation of proteins into size-controlled phospholipid vesicles using freeze-thawing and extrusion. *Biotechnol Prog* 2003; 19: 1547-1552.
17. Kubota Y, Umegaki K, Kagota S, Tanaka N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Evaluation of blood pressure measured by tail-cuff methods (without heating) in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 1756-1758.
18. Ramesar SV, Mackraj I, Gathiram P, Moodley J. Sildenafil citrate decreases sFlt-1 and sEng in pregnant l-NAME treated Sprague-Dawley rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 157: 136-140.
19. Bahtiyar MO, Buhimschi C, Ravishankar V, Copel J, Norwitz E, Julien S, Guller S, Buhimschi IA. Contrasting effects of chronic hypoxia and nitric oxide synthase inhibition on circulating angiogenic factors in a rat model of growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 196: 72.e71-76.
20. Hakamata Y, Murakami T, Kobayashi E. "Firefly rats" as an organ/cellular source for long-term in vivo bioluminescent imaging. *Transplantation* 2006; 81: 1179-1184.
21. Tahara Y, Kuroda H, Saito K, Nakajima Y, Kubo Y, Ohnishi N, Seo Y, Otsuka M, Fuse Y, Ohura Y, Komatsu T, Moriya Y, Okada S, Furutani N, Hirao A, Horikawa K, Kudo T, Shibata S. In vivo monitoring of peripheral circadian clocks in the mouse. *Curr Biol* 2012; 22: 1029-1034.
22. Witlin AG, Gangula PR, Wimalawansa SJ, Grafe M, Grady JJ, Yallampalli C. Adrenomedullin requires an intact nitric

- oxide system to function as an endogenous vasodilator in rat gestation. *Hypertens Pregnancy* 2003; 22: 9-24.
23. Gilbert JS, Verzwylt J, Colson D, Arany M, Karumanchi SA, Granger JP. Recombinant vascular endothelial growth factor 121 infusion lowers blood pressure and improves renal function in rats with placental ischemia-induced hypertension. *Hypertension* 2010; 55: 380-385.
  24. Deguchi K, Oguchi K, Takashima S. Characteristic neuropathology of leukomalacia in extremely low birth weight infants. *Pediatr Neurol* 1997; 16: 296-300.
  25. Back SA. Recent advances in human perinatal white matter injury. *Prog Brain Res* 2001; 132: 131-147.
  26. Cai Z, Pang Y, Lin S, Rhodes PG. Differential roles of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1  $\beta$  in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat. *Brain Res* 2003; 975: 37-47.
  27. Freitas, R. A., Jr. *Nanomedicine. Biocompatibility*, vol IIA (Landes Bioscience, Georgetown, TX, U.S.A) 1999; vol.I: 211. Date of access: 19/08/2015 <http://www.nanomedicine.com/NMIIA.htm>.
  28. Renkin EM. *Textbook of Physiology*. editor: Harry D. Patton AFF, Bertil Hille, (W.B. Saunders, Philadelphia) 1989; 860-878.

日本血液代替物学会 総会

1. 日 時：  
平成27年10月22日（木）12：40～

2. 場 所：  
熊本大学薬学部 宮本記念館コンベンションホール  
〒862-0973熊本市中央区大江本町 5-1
3. 議 題：① 第22回年次大会の報告  
② 会員動向  
③ 平成26年度事業報告  
④ 平成26年度会計報告  
⑤ 平成27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22回日本血液代替物学会年次大会  
(大会長 丸山徹)
- 2) 開催年月日 平成27年10月22日（木）・23日（金）
- 3) 開催場所 熊本市中央区大江本町 5-1 熊本大学薬学部 宮本記念館コンベンションホール、1階カンファレンスルーム
- 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、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：69名
- 3) 購読会員：3箇所

③ 平成26年度事業報告（平成26年4月1日～平成27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26年12月8日（月）中央大学理工学部（後楽園キャンパス）3号館3階小ホールにて開催。
- 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（後楽園キャンパス）3号館3階小ホール
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第22巻1号

④ 平成26年度収支決算報告が行なわれ承認された。

平成 26 年度会計報告  
収支決算表  
(自 平成26年 4 月 1 日 至 平成27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  | 8,404,995 | 会誌出版費     | 539,644   |
| 正会員会費  | 420,000   | 集会・委員会費   | 351,117   |
| 入会金    | 0         | 年会補助金     | 577,416   |
| 維持会員会費 | 0         | ホームページ維持費 | 324,000   |
| 賛助会員会費 | 800,000   | 謝金        | 368,500   |
| 購読会員会費 | 18,000    | 事務費(消耗費)  | 114,888   |
| 学生会員会費 | 0         | 事務費(通信費)  | 28,840    |
| 雑収入    | 1,944     | 雑役務費      | 27,121    |
| 利息     | 3,206     | 次期繰越金     | 7,316,619 |
| 計      | 9,648,145 | 計         | 9,648,145 |

※賛助会員（1社）からの平成25年度年会費（200,000円）の振込が、平成26年4月10日であったため、平成26年度会計に繰り入れた。また、同社からの平成26年度会費は年度内に振込があったので同社の入金は2件となっている。

⑤ 平成27年度事業（経過報告）

- 1) 定期総会の開催  
平成27年10月22日（木）12：40～  
於 熊本大学薬学部 宮本記念館コンベンションホール
- 2) 第22回年次大会の開催（大会長：丸山 徹）  
平成27年10月22日（木）・23日（金）  
於 熊本大学薬学部 宮本記念館コンベンションホール
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第23巻1号

# 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,  $\mu$  m, L, mL,  $\mu$  L, mol, g, mg,  $\mu$  g, ng, pg, fg, N/10.

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

12) References should be cited numerically in order of appearance in the text using superscript letters as follows: <sup>2)</sup>, <sup>3-5)</sup>, <sup>1, 4-6)</sup>, etc. References should be listed using the Vancouver style as follows: Names of all authors. Title of paper. Title of journal. Year of publication; volume number; inclusive page numbers.

Abbreviations of journal names should be in accordance with *Index Medicus*. References to books should be given as follows: Names of all authors. Title of paper. Name of editor(s). Book title. Place of publication: Publisher, year; inclusive page numbers.

References to electronic sources should be given as follows:

Name of website.

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

Examples:

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](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](mailto: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,  $\mu$ m, L, mL,  $\mu$ L, mol, g, mg,  $\mu$ g, ng, pg, fg, N/10などを用いる。

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

13) 文献：本文に引用した順序に番号を付け、文中では<sup>2)</sup>, <sup>35)</sup>, <sup>1, 46)</sup>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](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

# 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

## M E M O

[illegible]

# 新時代の医薬を考える帝人ファーマ

一人ひとりのQuality of Lifeの向上。それが帝人ファーマの使命です。

薬価基準収載

## 骨・関節

劇薬・処方箋医薬品<sup>注)</sup>

骨粗鬆症治療剤

〔アレンドロン酸ナトリウム水和物注射液〕

**ボナロン<sup>®</sup>** 点滴静注バッグ 900 $\mu$ g

劇薬・処方箋医薬品<sup>注)</sup>

骨粗鬆症治療剤

〔アレンドロン酸ナトリウム水和物経口ゼリー剤〕

**ボナロン<sup>®</sup>** 経口ゼリー 35mg

劇薬・処方箋医薬品<sup>注)</sup>

骨粗鬆症治療剤

日本薬局方 アレンドロン酸ナトリウム錠

**ボナロン<sup>®</sup>** 錠 35mg

劇薬・処方箋医薬品<sup>注)</sup>

骨粗鬆症治療剤

日本薬局方 アレンドロン酸ナトリウム錠

**ボナロン<sup>®</sup>** 錠 5mg

商標 ボナロン<sup>®</sup>/Bonadon<sup>®</sup> is the registered trademark of Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA.

劇薬

活性型ビタミンD<sub>3</sub>製剤

**ワンアルファ<sup>®</sup>**

〔アルファカルシドール製剤〕

錠 0.25 $\mu$ g  
錠 0.5 $\mu$ g  
錠 1.0 $\mu$ g  
内服液 0.5 $\mu$ g/mL

処方箋医薬品<sup>注)</sup>

ヒアルロン酸ナトリウム架橋体製剤

**サイビスグディスボ<sup>®</sup>** 関節注 2mL

〔ヒアルロン酸ナトリウム架橋処理ポリマー及び

ヒアルロン酸ナトリウム架橋処理ポリマー

ピニルスルホン架橋体 関節内注射剤〕

商標 サイビスグディスボ<sup>®</sup>/synvisc<sup>®</sup> is the registered trademark of Genzyme Corporation.

注) 注意—医師等の処方箋により使用すること

●効能・効果、用法・用量、禁忌・原則禁忌を含む  
使用上の注意等については添付文書をご参照  
ください。

## 代謝・循環器

処方箋医薬品<sup>注)</sup>

非プリン型選択的キサンチンオキシダーゼ阻害剤

高尿酸血症治療剤



**フェブリク<sup>®</sup>** 錠

10mg  
20mg  
40mg

〔フェブキソスタット製剤〕

劇薬・処方箋医薬品<sup>注)</sup>

持続性ソマトスタチンアナログ徐放性製剤



**ソマチュリン<sup>®</sup>** 皮下注

60mg  
90mg  
120mg

〔ランレオチド酢酸塩徐放性製剤〕

商標 ソマチュリン<sup>®</sup>/Somatulin<sup>®</sup> is the registered trademark of Ipsen Pharma, Paris, France.

処方箋医薬品<sup>注)</sup>

高脂血症治療剤



**トライコア<sup>®</sup>** 錠

53.3mg  
80mg

〔フェノフィブラート剤〕

pH依存崩壊型EPA製剤



**ソルミラン<sup>®</sup>** 顆粒状カプセル 600mg

〔イコサペント酸エチル・顆粒状軟カプセル剤〕

顆粒状カプセル 900mg

## 血液

処方箋医薬品<sup>注)</sup>・特定生物由来製品

血漿分画製剤・静注用免疫グロブリン製剤<sup>献血</sup>



**献血ベニロン-I<sup>®</sup>** 静注用

500mg  
1000mg  
2500mg  
5000mg

〔乾燥スルホ化人免疫グロブリン〕

生物学的製剤基準

## 呼吸器

処方箋医薬品<sup>注)</sup>

吸入ステロイド喘息治療剤



**オルベスコ<sup>®</sup>**

〔シクレソニド吸入剤〕

50 $\mu$ gインヘラー112吸入器  
100 $\mu$ gインヘラー56吸入器  
100 $\mu$ gインヘラー112吸入器  
200 $\mu$ gインヘラー56吸入器

徐放性気道潤滑去痰剤

**ムコソルバン<sup>®</sup>** Lカプセル 45mg

〔アムプロキソール塩酸塩製剤〕

気道潤滑去痰剤



**ムコソルバン<sup>®</sup>** 錠 15mg

内服液 0.75%  
DS 3%

**小児用ムコソルバン<sup>®</sup>** DS 1.5%

〔アムプロキソール塩酸塩製剤〕

## その他

緩下剤・錠

滴剤型緩下剤・大腸検査前処置用下剤：液



**ラキソベロン<sup>®</sup>** 錠 2.5mg

〔ピコスルファートナトリウム水和物製剤〕

劇薬・処方箋医薬品<sup>注)</sup>

活性型VD<sub>3</sub>尋常性乾癬治療剤

日本薬局方 タカルシトール軟膏

日本薬局方 タカルシトールローション



**ボンアルファ<sup>®</sup>** ハイ軟膏 20 $\mu$ g/g

〔タカルシトール水和物製剤〕

**TEIJIN** 帝人ファーマ株式会社

〒100-8585 東京都千代田区霞が関3丁目2番1号  
資料請求先：メディカル情報部 ☎ 0120-189-315

# MF登録低分子化合物

再生医療  
研究に

原薬等登録原簿(マスターファイル:MF)のその他(培地添加物)区分に登録されています。  
製造工程や分析法のバリデーション、変更管理を実施し、恒常的に安定した品質の製品を  
得られる体制で製造しています。

**MF登録済み\***

**Y-27632** **CKI-7 2HCl**

**高い品質安定性**  
連続複数ロット合格実績

**アニマルフリー**  
動物由来原料不使用の  
化学合成品

**SB431542**

**国産**  
合成〜包装までを全て日本国内で製造

| コードNo.                 | 品名                           | 登録番号       | 容量          |
|------------------------|------------------------------|------------|-------------|
| 259-00613<br>257-00614 | Y-27632, MF                  | 227MF40013 | 5mg<br>25mg |
| 038-24821<br>034-24823 | CKI-7<br>Dihydrochloride, MF | 228MF40005 | 5mg<br>25mg |
| 193-18031<br>199-18033 | SB431542, MF                 | 228MF40016 | 5mg<br>25mg |

※原薬等登録原簿(MF)への登録は、厚生労働省(独立行政法人医薬品医療機器総合機構)による、  
品質及び安全性に関する確認または評価が行われたことを意味するものではありません。  
掲載されている試薬は、試験・研究の目的にのみ使用されるものであり、「医薬品」、「食品」、  
「家庭用品」などとしては使用できません。

上記以外にも多数の関連製品を用意しています。



[http://www.wako-chem.co.jp/  
siyaku/product/life/  
ES\\_ips/index.htm](http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/ES_ips/index.htm)



## 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](mailto:labchem-tec@wako-chem.co.jp)

WAKENYAKU CO., LTD. ライフサイエンスの明日を担う

<http://www.wakenhd.co.jp>

## 研究機器オンラインが検索しやすくなって新登場!! (研究機器カタログ)

①HPトップバナーから

②研究機器オンライントップへ!

研究機器オンライン 2016-2017

研究機器カタログ

研究機器カタログも  
配布中です!

HPトップから  
一目でラクラク  
検索だワン!

◎研究用途に合わせた検索もラクラク!

◎予算申請の金額に合わせた検索もラクラク!

予算申請に便利.....指定範囲の金額で検索が可能!  
研究用途から機器検索.....細胞解析、有機合成、次世代シーケンサー  
などのカテゴリ検索!  
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!  
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!

WEBサイト随時更新中 URL <http://www.wakenyaku.co.jp/ctg/>

和研薬 研究機器



和研薬研究機器オンライン

技術と信頼でライフサイエンスの明日を担う  
**和研薬株式会社**  
WAKENYAKU CO., LTD.

本社営業部 〒606-8171 京都市左京区一乗寺西水戸町17番地  
TEL(075)721-8111/FAX(075)721-8189  
京阪営業部 〒610-0343 京都府京田辺市大住池ノ端6番地5  
TEL(0774)65-2521/FAX(0774)65-2557  
滋賀営業部 〒525-0029 滋賀県草津市下笠町945番地1  
TEL(077)568-2481/FAX(077)568-2410

神戸営業部 〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町5丁目2番5  
TEL(078)306-6060/FAX(078)306-6070  
大阪営業部 〒562-0035 大阪府箕面市船場東1丁目12-8  
TEL(072)749-5200/FAX(072)749-5230

Home page: <http://www.wakenhd.co.jp/>

---

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.24(1) 2016年10月31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

---



日本血液代替物学会  
<http://www.blood-sub.jp/>