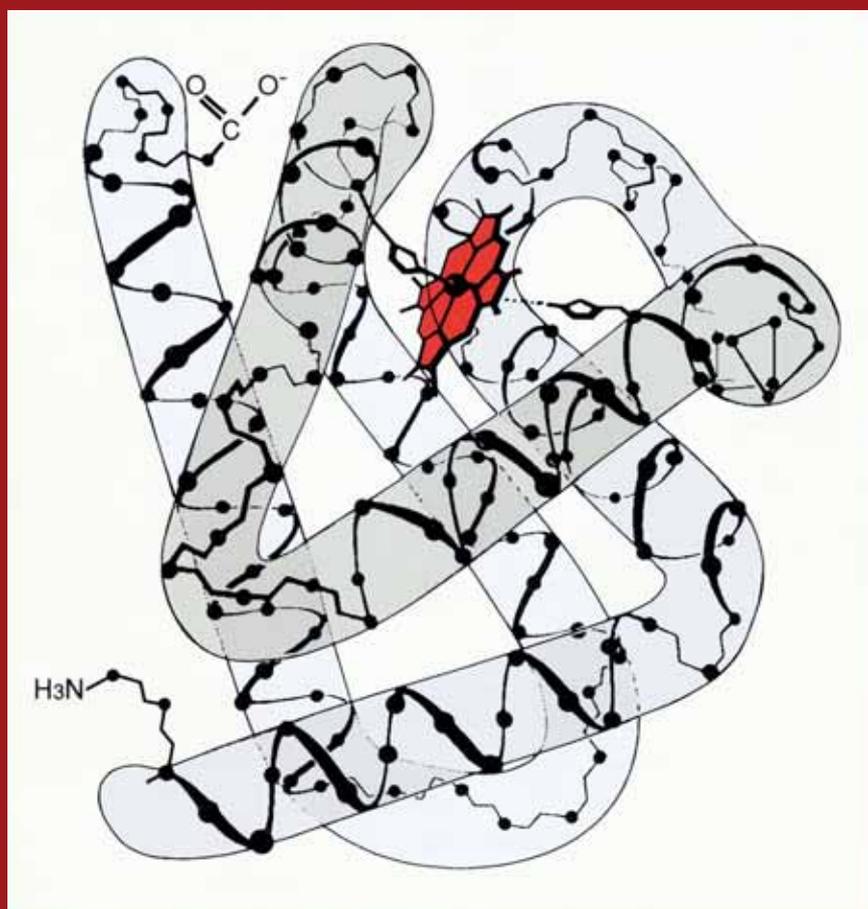


人工血液

VOLUME 25
NUMBER 1
2017

日本血液代替物学会 会誌

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



第24回年次大会プログラム

論説:人工酸素運搬体とその臨床利用

総説:出血性ショックなどの重篤な生体侵襲時の免疫応答不全について—人工血液投与時に留意すべき点—

事務局たより

The 24th Annual Meeting Program

Reader's Comment:

Artificial Oxygen Carrier and Its Clinical Use

Review:

Immunosuppression Following Severe Surgical Stress by Hemorrhagic Shock, Focusing on Host Responses to Transfusion with Blood Substitutes

Artificial Blood

The Society of Blood Substitutes, Japan

人工血液

第25巻 第1号 2017年11月

目次

第24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	12
論説：人工酸素運搬体とその臨床利用	
..... 高折 益彦	51
総説：出血性ショックなどの重篤な生体侵襲時の免疫応答不全について	
一人工血液投与時に留意すべき点—	
..... 木下 学	55
事務局たより	

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 25 No. 1 November, 2017

Contents

<i>The 24th Annual Meeting Program</i>	
<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>	12
<i>Reader's Comment: Artificial Oxygen Carrier and Its Clinical Use</i>	
..... Masuhiko Takaori	51
<i>Review : Immunosuppression Following Severe Surgical Stress by Hemorrhagic Shock, Focusing on Host Responses to Transfusion with Blood Substitutes</i>	
..... Manabu Kinoshita	55

第24回日本血液代替物学会年次大会

The 24th Annual Meeting of the Society of Blood Substitutes, Japan

『人工血液：マテリアルから医療へ、医療からマテリアルへ』

大会長：武岡 真司（早稲田大学先進理工学部生命医科学科）

会 期：2017年12月7日（木）、8日（金）

会 場：早稲田大学・西早稲田キャンパス63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24回日本血液代替物学会年次大会を担当させていただくことになりました。会期は2017年（平成29年）12月7日（木）、8日（金）の2日間、早稲田大学西早稲田キャンパスにて昨年度同様本年次大会を開催させていただきます。日本血液代替物学会は、人工血液、すなわち「人工赤血球（人工酸素運搬体）」、「人工血小板」、「血漿蛋白質」など血中に投与して血液成分の機能を代替するものを、マテリアル創製、製剤化、医療応用まで医工学そして産官学が連携しながら発展させる学会です。小さいながらも毎年ユニークかつ活発な年次大会が開かれております。

第24回年次大会は、「人工血液：マテリアルから医療へ、医療からマテリアルへ」をテーマといたしました。本学会の目的である「人工血液の実用化」は本学会が設立して四半世紀が経とうとしても未だできておりません。しかし、その間ナノテクノロジーやナノマテリアルは大きく進展しましたし、ゲノムに基づくテーラーメイド医療、再生医療、そしてイメージングを用いた診断治療技術など医療に関わる技術も大幅に変わりました。しかし、マテリアルと医療、シーズとニーズの間には大きなギャップが存在することも事実であります。そこで本年次大会では、新しい考え方やテクノロジーを取り入れたマテリアル、特にナノバイオマテリアルとそれを用いた医療（ナノメディシン）を取り上げて「ナノメディシンに向けた新たな展開」とのシンポジウムを2日間に亘って行うことにいたしました。本シンポジウムにリポソーム製剤である人工血小板も含めました。そして、教育講演として国立医薬品食品衛生研究所の加藤くみ子先生にナノメディシンの中でも中心的で、本学会でもメインなマテリアルである「リポソーム製剤」に関してその開発の現状と評価に関するご講演をお願いしております。

また、医療側からの2つの特別セッション「救急救命の現状から人工血液の登場まで。そのロードマップ」「なぜ、人工血液が必要か？救急救命医療への挑戦」にて、救急現場における人工血液の必要性について医療の最前線で指揮を執っておられる専門家の先生方から語って頂き、活発な討論の場にしたいと考えております。人工赤血球製剤、タンパク質製剤のシンポジウムに関してはより具体的なマテリアルと医療応用に関する最先端の報告の場を提供したいと考えております。二つ目の教育講演として、慶應義塾大学の松原由美子先生から最先端の再生医療技術を用いて皮下脂肪組織から血小板を創製する話題をご提供いただき、新しい人工血液のアプローチに関して本学会としても注目すべき内容と考えております。そして、特別講演として本学会の設立当初からご指導ご助言を賜りました川崎医科大学名誉教授高折益彦先生から本学会へのメッセージを頂く機会といたしました。

終わりに、ご多忙のなかご講演をご快諾頂きました先生方、本プログラムの作成において多大なるご尽力を頂きましたセッションオーガナイザーの先生方に心より御礼申し上げます。

皆様の学会のご参加を心よりお待ちしております。

第24回日本血液代替物学会年次大会
大会長 武岡 真司
(早稲田大学理工学術院)

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 63 号館
(東京都新宿区大久保 3 丁目 4-1)

●受付

平成 29 年 12 月 7 日 (木) 8:30 から
平成 29 年 12 月 8 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

事前参加登録は参加申込書 (http://www.blood-sub.jp/file/sanka_24.pdf) にご記入の上、学会アドレス (sbsjms@gmail.com) に 11 月末日までご送付ください。折り返し入金のご案内をいたします。入金確認後抄録集をご指定の住所にご送付いたします。ネームカードは当日お渡し致します。当日の混乱を避けるために事前参加登録をおすすめしておりますが、当日も参加登録を受け付けます。当日、年次大会予稿集をお持ちでない場合は 1,500 円でご購入も可能です。

当日の参加登録は参加申込書 (http://www.blood-sub.jp/file/sanka_24.pdf) をあらかじめダウンロード、印刷して頂き、必要事項を御記入の上、当日年次大会受付にお持ちください。参加登録費は、年次大会受付にて現金でお支払ください (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。会期中、ネームカードは会場内で必ず御着用ください。

●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。
年会費は、正会員 10,000 円、購読会員 3,000 円、学生会員 3,000 円です。

●年次大会予稿集

年次大会予稿集は、会員全員及び発表者 (非会員) に事前送付しています。当日お忘れなくご持参下さい。また、当日、受付にて 1 部 1,500 円で販売いたします。

●懇親会

参加費:4,000 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 29 年 12 月 7 日 (木) 18:00 から
場所:早稲田大学理工キャンパス 63 号館ロームスクエア

■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

大会長挨拶	10 分
特別講演	45 分
教育講演	50 分
シンポジウム講演	発表 10 分 + 質疑 5 分 計 15 分
特別セッション	発表 10 分 + 質疑 5 分 計 15 分、その後討論

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、優れた講演を顕彰します。

選考方法：審査委員の審査結果をもとに、審査委員会において選考・決定する。

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

授 与：賞状は本年次大会の閉会時に、審査委員長から本人に授与される。

■各種会議日程

理事会・評議員会	平成 29 年 12 月 7 日（木）12：10～12：40 （早稲田大学・西早稲田キャンパス 63 号館 03 会議室）
総 会	：平成 29 年 12 月 7 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 29 年 12 月 7 日 (木)		平成 29 年 12 月 8 日 (金)	
8:00		8:30 ~	受付
9:00		9:00 ~ 10:45	シンポジウム 3 「機能的蛋白質製剤の最前線」 座長：小松晃之(中央大学) 丸山 徹(熊本大学) 演者：S11 小松晃之(中央大学) S12 鎌谷武雄(北海道大学) S13 森田能次(中央大学) S14 船木亮佑(中央大学) S15 柳澤洋輝(熊本大学) S16 山田孫平(奈良県立医科大学) S17 皆吉勇紀(熊本大学)
9:30	9:20 ~ 9:30 大会長挨拶 武岡 真司(早稲田大学理工学術院) 9:30 ~ 10:30 シンポジウム 1 「ナノメディシンに向けた新たな展開 1」 座長：宗 慶太郎(早稲田大学) 岡村陽介(東海大学) 演者：S1 久保田恒平(早稲田大学) S2 大西浩平(早稲田大学) S3 宗 慶太郎(早稲田大学) S4 岡村陽介(東海大学)	10:45 ~ 10:55	休憩
10:00		10:55 ~ 11:40	特別講演 「本学会と私との四半世紀」 高折益彦(川崎医科大学) 座長：武岡真司(早稲田大学)
10:30	10:30 ~ 10:40 休憩 10:40 ~ 12:10 シンポジウム 2 「備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤」 座長：酒井宏水(奈良県立医科大学) 東 寛(旭川医科大学) 演者：S5 酒井宏水(奈良県立医科大学) S6 高瀬凡平(防衛医科大学) S7 河野光智(東海大学) S8 田口和明(崇城大学) S9 得能正裕(崇城大学) S10 東 寛(旭川医科大学)	11:40 ~ 12:40	昼食
11:00		12:40 ~ 14:10	シンポジウム 4 「ナノメディシンに向けた新たな展開 2」 座長：松田兼一(山梨大学) 武岡真司(早稲田大学) 演者：S18 Xiaoting Fu(東京大学) S19 佐藤啓斗(早稲田大学) S20 駒木根元気(早稲田大学) S21 Kon Son(早稲田大学) S22 Tianshu Li(早稲田大学) S23 久禮智子(奈良県立医科大学)
11:30		14:10 ~ 14:20	休憩
12:00	12:10 ~ 12:40 理事会・評議員会 12:40 ~ 13:10 昼食 総会	14:20 ~ 16:55	特別セッション 2 「なぜ、人工血液が必要か？ 救命救急医療への挑戦」 座長：木下 学(防衛医科大学校) 斎藤大蔵(防衛医科大学校) 演者：G6 照井克生(埼玉医科大学) G7 小倉崇以(前橋赤十字病院) G8 高須 修(久留米大学) G9 吉村有矢(防衛医科大学校) G10 梅村武寛(沖縄県立南部医療センター) G11 大浦由香子(埼玉医科大学) G12 萩沢康介(防衛医科大学校)
12:30		16:55	閉会の辞(会長賞発表)
13:00			
13:30	13:30 ~ 14:20 教育講演 1 「リボソーム製剤の開発と評価」 加藤くみ子(国立医薬品食品衛生研究所) 座長：武岡真司(早稲田大学)		
14:00	14:20 ~ 14:30 休憩 14:30 ~ 16:50 特別セッション 1 「救命救急の現状から人工血液の登場まで。そのロードマップ」 座長：木下 学(防衛医科大学校) 櫻井 淳(日本大学) 演者：G1 櫻井 淳(日本大学) G2 増野智彦(日本医科大学) G3 三池 徹(佐賀大学) G4 石田 治(防衛医科大学校) G5 木下 学(防衛医科大学校)		
15:00			
15:30			
16:00			
16:30			
17:00	17:00 ~ 17:50 教育講演 2 「皮下脂肪組織から血小板創製技術の医療応用」 松原由美子(慶應義塾大学) 座長：池田康夫(早稲田大学)		
17:30			
18:00	17:50 ~ 18:00 休憩 18:00 ~ 20:00 懇親会		

交通案内

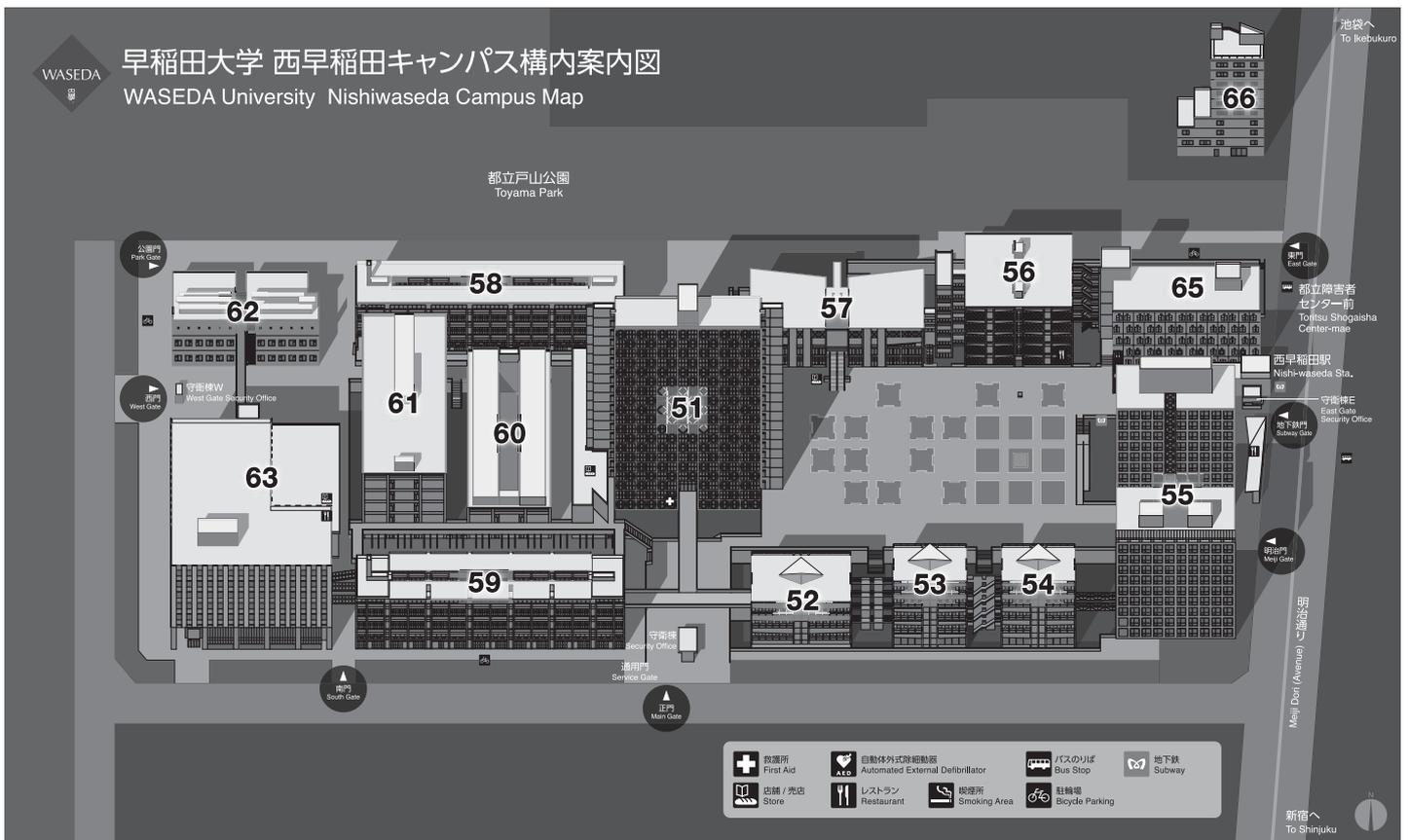
早稲田大学西早稲田キャンパス 63号館への交通アクセス

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29年12月7日(木)

9:20~9:30 大会長挨拶

9:30~10:30 シンポジウム1「ナノメディシンに向けた新たな展開1」

座長：宗 慶太郎（早稲田大学理工学術院総合研究所）、岡村陽介（東海大学大学院工学研究科）

S1. 「siRNA-脂質複合体の粒子構造が細胞内導入効率或いは免疫刺激性に与える影響評価」

久保田 恒平（早稲田大学先進理工学研究科）

S2. 「核酸脂質複合体の集合形態が核酸の細胞内への導入効率に与える影響」

大西 浩平（早稲田大学先進理工学研究科）

S3. 「細胞内薬物動態制御に向けた温度応答性リポソームの開発」

宗 慶太郎（早稲田大学理工学術院総合研究所）

S4. 「生体組織・浮遊細胞の超薄膜ラッピング法の確立と高解像度イメージングへの貢献」

岡村 陽介（東海大学大学院工学研究科）

10:30~10:40 休憩

10:40~12:10 シンポジウム2「備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤」

座長：酒井 宏水（奈良県立医科大学医学部）、東 寛（旭川医科大学小児科学講座）

S5. 「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（奈良県立医科大学医学部）

S6. 「人工酸素運搬体（HbV）の出血性ショック心臓蘇生後のラット心筋活動電と致死性不整脈誘発に及ぼす影響」

高瀬 凡平（防衛医科大学校集中治療部）

S7. 「ラット肺切除術期出血に対する高酸素親和性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）

S8. 「ヘモグロビン小胞体の難治性炎症疾患治療薬としての応用使用」

田口 和明（崇城大学薬学部）

S9. 「人工酸素運搬体（ヘモグロビン小胞体）大量投与がCytochrome P450肝代謝薬物の体内動態に与える影響」

得能 正裕（崇城大学薬学部）

S10. 「HbVに使用されているリポソーム粒子のマクロファージへの影響について」

東 寛（旭川医科大学小児科学講座）

12:10~12:40 理事会・評議員会（早稲田大学・西早稲田キャンパス63号館03会議室）

12:40~13:10 総会（大会会場）

13:30~14:20 教育講演1

「リポソーム製剤の開発と評価」

加藤 くみ子（国立医薬品食品衛生研究所薬品部）

座長：武岡 真司（早稲田大学理工学術院）

14:20~14:30 休憩

14:30~16:50 特別セッション1「救命救急の現状から人工血液の登場まで。そのロードマップ」

座長：木下 学（防衛医科大学校免疫微生物学講座）、櫻井 淳（日本大学医学部）

G1. 「産科救急での血液製剤の必要性 ―母体救命の立場から―」

櫻井 淳（日本大学医学部）

G2. 「臨床医が求める理想的な人工血液とは」

増野 智彦（日本医科大学高度救命救急センター）

- G3. 「溶血性蛇毒による血小板機能障害に対する H12(ADP)liposomes の治療効果の可能性」
三池 徹 (佐賀大学医学部附属病院)
- G4. 「人工血小板 H12-(ADP)-リボソームによる人工心肺後凝固障害の制御」
石田 治 (防衛医科大学校外科 2)
- G5. 「凝固障害を伴う家兎の肝大量出血モデルでの HbV による蘇生輸血効果と血小板輸血時の止血効果」
木下 学 (防衛医科大学校免疫微生物学講座)

16:50~17:00 休憩

17:00~17:50 教育講演 2

「皮下脂肪組織から血小板創製技術の医療応用」

松原 由美子 (慶應義塾大学医学部)

座長: 池田康夫 (早稲田大学理工学術院)

17:50~18:00 休憩

18:00~20:00 懇親会 (早稲田大学理工キャンパス 63 号館ロームスクエア)

第2日目 平成29年12月8日(金)

- 9:00~10:45 シンポジウム3 「機能性蛋白質製剤の最前線」
座長：小松 晃之（中央大学理工学部）、丸山 徹（熊本大学薬学部）
- S11. 「組換え蛋白質を用いた人工酸素運搬体「HemoAct™」の開発」
小松 晃之（中央大学理工学部）
- S12. 「脳梗塞治療薬としてのヘモアクト™の効果」
鏡谷 武雄（北海道大学脳神経外科）
- S13. 「遺伝子組換えイヌおよびネコ血清アルブミンの開発と動物用人工酸素運搬体の展開」
森田 能次（中央大学理工学部）
- S14. 「遺伝子組換え（ヘモグロビン-アルブミン）クラスターの合成」
船木 亮佑（中央大学理工学部）
- S15. 「ヘモグロビンを担体した一酸化炭素の肝臓デリバリーと NASH 病態改善機序」
柳澤 洋輝（熊本大学大学院・薬・薬剤学分野）
- S16. 「ヘモグロビンと NAD(P)H との共存により生じる抗酸化的な疑似酵素活性の作用機序」
山田 孫平（奈良県立医科大学医学部）
- S17. 「I 型インターフェロンのクッパー細胞デリバリーシステムと肝保護効果」
皆吉 勇紀（熊本大学薬学部）
- 10:45~10:55 休憩
- 10:55~11:40 特別講演
「本学会と私との四半世紀」
高折 益彦（川崎医科大学）
座長：武岡 真司（早稲田大学理工学術院）
- 11:40~12:40 昼食
- 12:40~14:10 シンポジウム4 「ナノメディシンに向けた新たな展開2」
座長：松田 兼一（山梨大学医学部附属病院救急部）、武岡 真司（早稲田大学理工学術院）
- S18. 「Preparation of perfluorocarbon micelles using SPG membrane emulsification」
Xiaoting Fu (Departemnt of Bioengineering, The University of Tokyo)
- S19. 「酸素マイクロ・ナノバブル分散液を用いた完全液体換気から気体換気への復帰」
佐藤 啓斗（早稲田大学先進理工学研究科）
- S20. 「エタノール注入法による血小板代替物（ADP）リボソームの調製」
駒木根 元気（早稲田大学先進理工学研究科）
- S21. 「Evasion of Accelerated Blood Clearance Phenomenon by Polysarcosine Coating of Liposomes」
Kon Son（早稲田大学先進理工学研究科）
- S22. 「Investigation of immunoactivities of arginine-containing cationic liposomes」
Tianshu Li (Research Organization for Nano & Life Innovation, Waseda University)
- S23. 「人工赤血球（高濃度 Hb 内包リボソーム）脂質膜の流動性」
久禮 智子（奈良県立医科大学医学部）
- 14:10~14:20 休憩
- 14:20~16:55 特別セッション2 「なぜ、人工血液が必要か？ 救命救急医療への挑戦」
座長：木下 学（防衛医科大学校免疫微生物学講座）、齋藤 大蔵（防衛医科大学校防衛医学研究センター）
- G6. 「産科出血対応の現状と人工赤血球の必要性」
照井 克生（埼玉医科大学総合医療センター産科麻酔科）
- G7. 「重症体幹部外傷における機能的&機械的止血戦略：外傷性凝固異常に対する大量輸血療法と迅速一時止血術（REBOA）」
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）
- G8. 「病院前救急診療、特に外傷診療における人工赤血球への期待」
高須 修（久留米大学医学部）

- G9. 「大量出血を伴う重症外傷に対する蘇生戦略の限界と人工血液に求めるもの」
吉村 有矢（防衛医科大学校病院救急部）
- G10. 「院内採血輸血（いわゆる生血輸血）を必要とする場面がまだ日本国内には存在するのか？」
梅村 武寛（沖縄県立南部医療センター）
- G11. 「人工酸素運搬体により産科危機的出血を制御する」
大浦 由香子（埼玉医科大学総合医療センター）
- G12. 「出血性ショックと凝固障害を人工血液で制御する」
萩沢 康介（防衛医科大学校生理学講座）

16:55 閉会の辞（会長賞発表）

本学会と私との四半世紀

高折益彦
川崎医科大学

本学会は平成5年に発足した。その際に演者は土田英俊先生からのご指名によって会員として参加させて頂いた。ただ演者は人工酸素運搬体(HbV)の研究、開発面で参画させて頂いたのであって人工血小板に関しては全く関係してこなかったことをお断りしたい。また演者自身の記録も不完全であり、記憶も次第に薄れてきたこともあって断片的にしか述べられないこともお許し願いたい。

私が研究面で関係したのは細菌混入の問題でそれは前臨床試験で資料の細菌培養で数種の細菌の混入を認め、現在のフィルター法による除去を採用して頂いた。またHbVの臨床諸検査成績への干渉についても参画させて頂いた。

一方、工業化、新薬としての開発面では平成13年に原材料となるヒトヘモグロビン(Hb)が日本赤十字社からの供給を必要量にまで増量することの貢献出来た。また新薬として承認を得るために具体的な治験計画も発表してきた。ただ平成20年頃には小林紘一先生と共にニプロ株式会社に、平成25年頃には酒井宏水先生と共に当時のベネシス株式会社と工業生産を依頼したがともに目的を達することなく現在にいたっている。

この間、我が国の輸血医療の進歩、輸血行政の変化から本学会機関誌平成29年度版に提示したごとく人工酸素運搬体は小規模生産に留め、政府管理下に即時使用しうる体制を整えるべき状態へと変化した。ただその中で科学としての人工酸素運搬体の開発は続けるべきことを強調した。

リポソーム製剤の開発と評価

加藤くみ子

国立医薬品食品衛生研究所薬品部

kumikato@nihs.go.jp

有効成分の生体内での吸収性や安定性、放出性、標的性等の改善を目的として、ナノテクノロジーを応用した製剤(ナノ医薬品)の開発が行われている。その代表例がリポソーム製剤である。

リポソームはリン脂質など一つの分子上に親水性部分と疎水性部分とを持たせた分子から作られる脂質二分子膜の小胞で、通常、内部に水性画分を有している。リポソーム製剤は有効成分をリポソームの脂質二分子膜又は内相に封入することにより作製される。我が国においては現時点で3製品のリポソーム製剤が承認されている。これらは、いずれも低分子化学合成品をリポソーム化した製剤であるが、今後は様々な機能を付加した脂質を用い、細胞内への送達を必須とする核酸(siRNA等)を封入したリポソーム製剤の開発も増えていくと思われる。さらに標的性の観点からは、製剤をナノサイズに制御し疾患部位への送達を制御する passive targeting に加え、抗体やリガンドでリポソーム表面を修飾し、標的組織や標的細胞へ能動的に送達させる active targeting の実用化研究も行われている。

マイクロメートルのサイズを有するリポソーム製剤も存在するが、本発表ではナノメートルサイズのリポソーム製剤で、有効成分の生体内安定性、組織移行性プロファイルをはじめとする薬物動態、細胞内動態等の向上を目的として設計された製剤について取り上げたい。リポソーム製剤は、循環血中に入った後も生体高分子と同等なナノメートルサイズの構造を有し、従来の低分子化学合成医薬品とは生体との相互作用や体内動態などが異なる。したがって、体内動態などのリポソーム製剤特有の特性に影響を与える品質特性を明らかにしていくことが重要である。本発表では、リポソーム製剤の特性やその評価法について述べたい。

【参考情報】

- 1) リポソーム製剤の開発に関するガイドライン(平成28年3月28日付 厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課長通知 薬生審査発0328第19号)

皮下脂肪組織から血小板創製技術の医療応用

松原由美子

慶應義塾大学 医学部 臨床研究推進センター
yumikoma@keio.jp

医療現場において血小板製剤は、血液疾患や抗がん剤治療時における血小板減少への輸血治療に用いられている。また、保険承認が得られた診療とはなっていないが PRP (platelet rich plasma) 療法として、形成外科領域や整形外科領域、歯科領域などで主に組織修復のため血小板が用いられている。しかし、輸血用血小板は現在 100% 献血に依存し保存期間が僅か 4 日間のため不安定在庫という問題が存在する。創傷治癒など組織修復目的では、血小板採取の標準化が極めて困難で一定の品質が確保できず、さらに採血量の限界があるため適用できる傷の大きさは限られる。これらの問題を解決するために、血小板の大量製造方法が各国で注目されている。血小板は、幹細胞から未成熟巨核球への分化を経て、成熟巨核球から産生される最終分化細胞である。1994 年に巨核球・血小板分化の最も重要サイトカインであるトロンボポエチン (TPO) がクローニングされたことや幹細胞研究をはじめとする再生医学研究の発展に伴い、*in vitro* 血小板分化誘導法が開発されている。血小板は造血幹細胞のみならず ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞やこれまでは血液細胞とは異なる分化系列であると考えられていた間葉系細胞である脂肪前駆細胞や間質細胞から遺伝子導入などを必要とせず、造血幹細胞や多能性幹細胞から *in vitro* 分化誘導で血小板を得る際に用いる培地で培養すると効率良く巨核球や血小板が産生されることを我々のグループが見出し、その後海外の研究グループも報告した。はじめに我々は、皮下脂肪由来の間葉系間質細胞が血小板分化に至るメカニズム解明研究を行った。ヒト成人皮膚線維芽細胞に p45NF-E2/Maf 遺伝子導入を行うことで直接プログラミングによる巨核球分化・血小板産生がおこることを見いだした¹⁾。間葉系間質細胞は p45NF-E2 を内在性に有しており、遺伝子導入の必要とせず、その発現量を細胞自身で増加させながら巨核球分化・血小板産生に至ることを見いだした。さらに間葉系間質細胞は TPO も内在し、刺激に応じて分泌していることを見いだした²⁾。これら基礎研究の成果に加え、間葉系間質細胞は少なくとも 2 ヶ月は安定増殖し、その染色体解析結果は正常であることを認めた。これら特性から間葉系間質細胞からの血小板創製技術はシンプルで安全性高く、血小板の安定供給を可能にするため医療応用(輸血用血小板の代替など)に適していると考え、検討を進めている。

【文献】

- 1) Ono Y, Wang Y, Suzuki H, Okamoto S, Ikeda Y, Murata M, Poncz M, Matsubara Y. Induction of functional platelets from mouse and human fibroblasts by p45 NF-E2/Maf. *Blood* 120 (18): 3812-21, 2012.
- 2) Ono-Uruga Y, Tozawa K, Horiuchi T, Murata M, Okamoto S, Ikeda Y, Suda T, Matsubara Y. Human adipose tissue-derived stromal cells can differentiate into megakaryocytes and platelets by secreting endogenous thrombopoietin. *J Thromb Haemost.* 14 (6): 1285-1297, 2016.

シンポジウム1-S1

siRNA-脂質複合体の粒子構造が細胞内導入効率或いは免疫刺激性に与える影響評価

○久保田恒平^{1,2}, 大西浩平¹, 澤木一晃¹, 李 天舒¹, 武岡真司¹

¹ 早稲田大学大学院, ² 協和発酵キリン株式会社 CMC 研究センター

kohei.kubota@kyowa-kirin.co.jp

【緒言】 臨床開発が進められている siRNA-脂質複合体は、その調製手法から lipoplexes と lipid-nanoparticles (LNPs) に大別される。用いるカチオン脂質の種類又は製剤の構成成分がどのように有効性或いは安全性に影響を与えるかを評価した研究は多いものの、製剤の調製手法の違いに着目した研究は報告例があまりない。そこで本研究は、同じ構成成分から異なる調製手法にて lipoplexes 及び LNPs を作り分け、細胞への siRNA の導入効率或いは免疫刺激性に与える影響を評価した。

【実験】 予め調製したカチオニックナノポソームにアニオンである siRNA を混ぜ合わせ、静電相互作用によって粒子形成を行う lipoplexes に対し、脂質のエタノール溶解液と siRNA 水溶液を混ぜ合わせることで、ワンステップで粒子形成を行う LNPs を同じ構成成分で作分け、両者を HeLa 細胞へ添加した際の経時的な細胞内導入効率を siRNA に化学修飾した Alexa647 の蛍光強度から比較した。また、両者をマクロファージに添加した際に産生される炎症性サイトカイン (TNF- α 及び IL-1 β) の産生量を ELISA 法にて評価した。

【結果と考察】 調製した lipoplexes 及び LNPs は、同程度の粒子サイズ及び表面電位であったにも関わらず、LNPs に含まれる siRNA は lipoplexes に含まれる siRNA に比べ細胞内の蛍光強度が大幅に高く、効率的に細胞内に siRNA が導入されることが観察された。siRNA を分解する酵素である RNase を両者に添加し、両製剤中に含まれる siRNA の残存率を評価したところ、LNPs に含まれる siRNA は 100% 近い残存率を示したが、lipoplexes に含まれる siRNA は約 20% が分解された。Lipoplexes は LNPs に比べ粒子表面に局在する siRNA の量が多く、RNase 添加による失活を受けやすいことが推察された。そのため、lipoplexes は細胞に添加した際に粒子表面に局在する siRNA が脂質複合体から解離しやすく、細胞内への siRNA の導入効率も低下したことが考えられた。マクロファージを用いた際も、lipoplexes に比べ LNPs で高い細胞内導入効率を確認されたが、TNF- α 及び IL-1 β は共に lipoplexes 添加時の方が高い産生量を示した。また、製剤の構成成分のうち、TNF- α は siRNA によってその産生が惹起されるが、IL-1 β はカチオン脂質によって産生が惹起され、両者異なる産生パターンを示すことを明らかとした。

【結論】 同じ構成成分から成る siRNA-脂質複合体は、その調製手法が異なるだけで細胞への siRNA の導入効率或いは免疫刺激性が大きく異なることを明らかとし、特に安全性に関して siRNA 及びカチオン脂質両者の免疫刺激性を考慮した製剤開発が必要であることを示した。

【文献】

1) Kubota K, Onishi K, Sawaki K, Li T, Takeoka S, et al., *Int. J. Nanomedicine*. 2017, 12, 5121.

核酸脂質複合体の集合形態が核酸の細胞内への導入効率に与える影響

○大西浩平¹, 久保田恒平², 李 天舒³, 武岡真司¹

¹ 早大先進理工, ² 早大共同先端生命医科学専攻, ³ 早大ナノ・ライフ創新研究機構

kou3541185@suou.waseda.jp

【緒言】 脂質分子集合体は DDS (Drug Delivery System) の分野において重要な薬物運搬体であり, 核酸やタンパク質のデリバリーへの利用に期待が高まっている。核酸を用いた脂質集合体はその調製法によって内包型の LNP 型¹ と複合型の Lipoplex 型² の二種類に大別されるが, 両者に関して同一条件での有効性や安全性の比較は行われていない。そこで本研究では同一の成分組成でそれぞれの脂質集合体を調製し, 細胞内への導入効率の相違を明らかにすることを目的とした。

【実験】 蛍光修飾 siRNA を用いて LNP 型と Lipoplex 型の脂質核酸複合体をそれぞれ調製した。調製した核酸脂質複合体をそれぞれ Hela 細胞に導入し, 共焦点レーザー顕微鏡を利用して蛍光観察を行った。また LNP 型と Lipoplex 型の両製剤において脂質に 1% の蛍光脂質 DiO を混合することで, 2 波長による蛍光観察から核酸と脂質の細胞導入量を評価した。さらに siRNA 単体および各製剤を核酸分解酵素 RNase に作用させることで, siRNA の保持安定性を評価した。

【結果と考察】 LNP および Lipoplex の導入後の細胞の蛍光画像を解析ソフトにて解析した結果, LNP 型の製剤は Lipoplex 型に比べて導入効率が 4~7 倍高いことが明らかになった。また核酸と脂質の細胞内動態を観察した結果, LNP 型では細胞添加後 1 時間で両者は細胞内に取り込まれ, またその局在が一致した。一方で, Lipoplex は主に脂質のみが取り込まれ, siRNA の取り込みはほとんど確認できなかった。従って LNP 型では複合体として細胞に導入されているのに対して, Lipoplex 型では siRNA が複合体から乖離しやすいことが示唆された。さらに核酸分解酵素 RNase に siRNA 単体と各製剤を反応させた結果, siRNA 単体は 90% 分解され, LNP 型はほとんど分解されなかったのに対して, Lipoplex 型は 20% の核酸が分解された。以上の結果から Lipoplex 型は LNP 型に比べて外部からの影響を受けやすく, 核酸の保持安定性が低いことが示唆された。

【結論】 本研究から核酸脂質複合体において LNP 型は Lipoplex 型に比べ, 培地中での安定性が高く, 細胞内への核酸の導入効率が高いため, 製剤として優れていることが示唆された。今後, in vivo にて血中投与における比較実験を行う予定である。

【文献】

- 1) David V Morrissey, et al., *nat biotechnol.* **2005**, 23, 1002-1007.
- 2) A. R. Thiery, et al., *Journal of Liposome Research.* **1997**, 7, 143-159.

細胞内薬物動態制御に向けた温度応答性リポソームの開発

○宗 慶太郎¹, 新井 敏¹, Li Yan Chan², Chi-Lik Ken Lee²

¹早稲田大学 理工学術院総合研究所, ²Department of Technology, Innovation and Enterprise, Singapore Polytechnic
soukei@aoni.waseda.jp

【緒言】 体内の薬物分布を時空間的に制御する薬物送達システムは、薬物の効果の増強に加え、副作用の軽減を可能にする技術として期待されている。脂質分子の自発的分子集合により形成されるナノ粒子(リポソーム)は生体適合性が高く、薬物送達システムのキャリアーとしての研究開発が進められている。本研究では、リポソームの諸物性を工学的に制御することで、細胞内薬物動態制御の基盤となるリポソーム技術の開発を目的としている。この目標達成のため、温度応答性、可視化、標的化機能をもつリポソームの開発を進めている。

【実験】 脂質膜組成と内包溶液の浸透圧の異なるリポソームを作成した。異なる温度でリポソーム分散液を加温した後、蛍光マーカーとして内包したカルセインの蛍光強度の変化から内包物の放出率を算出した。組成を最適化した温度応答性リポソームをがん細胞(HeLa細胞)に取り込ませ、近赤外レーザー(波長:980nm)照射による加温により、細胞内での温度応答性の内包物の放出を観測した。さらに、近赤外蛍光色素を温度応答性リポソームの膜に導入し、温度による蛍光強度の変化から温度可視化機能について検討した。

【結果と考察】 リポソームの脂質組成と内包溶液の浸透圧の調節により、40℃まで加温すると内包物を放出するリポソームを作成した。このリポソームに蛍光分子を内包してHeLa細胞に取り込ませ、近赤外光を照射して加温したところ、細胞内でリポソームから蛍光分子が放出される様子が観測できた。温度感受性蛍光色素による細胞内温度計測との併用により、細胞内温度が40℃付近に達したときに、リポソームから蛍光分子が放出されることを確認した¹⁾。体温(37℃付近)では安定に薬物を内包しているが、これより数度高い温度(40℃付近)で内包薬物を放出する温度応答性リポソームは、加温による細胞内薬物動態制御への応用が期待できる。この温度応答性リポソームに、脂質膜のゲル-液晶相転移にตอบสนองして蛍光強度が変化する蛍光色素を導入することで、温度にตอบสนองした可視化機能をもたせることもできた。可視化機能との併用により、精度の高い温度制御と薬物放出が可能となる。

【結論】 温度応答性リポソームへの近赤外光照射による加温により、細胞内での薬物放出を制御できる。

【文献】

1) Satoshi Arai, Chi-Lik Ken Lee, Young-Tae Chang, Hiroataka Sato, Keitaro Sou, "Thermosensitive nanoplatforams for photothermal release of cargo from liposomes under intracellular temperature monitoring" *RSC Advances*, 5 (113), 93530-93538 (2015).

生体組織・浮遊細胞の超薄膜ラッピング法の確立と高解像度イメージングへの貢献

○岡村陽介^{1,2}, 張 宏², 青木拓斗¹, 鎗野目健二¹, 波多野香奈枝³, 樺山一哉³, 川上良介⁴, 根本知己⁴

¹東海大学大学院工学研究科, ²東海大学マイクロ・ナノ研究開発センター, ³大阪大学大学院理学研究科, ⁴北海道大学電子科学研究所
y.okamura@tokai-u.jp

【緒言】 高分子を膜厚 100nm 以下の超薄膜に加工すると、ナノ厚特有の柔軟性と高い接着性が発現する^[1,2]。このため、反応性官能基や接着剤を使用せず物理吸着のみで種々の界面(生体組織等)に貼付できる。他方、生体組織をイメージングする際、ガラス基板に緩衝液を滴下した状態で観察するのが常套手段であるが、緩衝液の蒸発に伴う組織の乾燥やステージを移動するときのぶれが課題となる。血球を代表とする浮遊細胞では、ブラウン運動して焦点が定まらない他、ガラス基板上では活性化するため未活性状態からのイメージングは難しい。本研究では、生体組織や浮遊細胞を保定する「超薄膜ラッピング」法を提案^[3]し、新しい高解像度イメージングツールとしての応用を図る。

【結果と考察】

1. 生体組織のラッピング SiO₂ 基板上にポリビニルアルコール(PVA)水溶液、含フッ素高分子溶液(CYTOP, 旭硝子社製)の順にスピコートした。基板ごと純水に浸漬させたところ、PVA 犠牲層が瞬時に溶解し、基板の形状を維持した状態で超薄膜を回収できた。得られた撥水性超薄膜の水接触角は $111 \pm 1^\circ$ と計測され、その表面は確かに撥水性であった。ハイドロゲルを恒温恒湿下で静置したところ、約 10 時間後には完全に乾燥した。そこで、撥水性超薄膜でラッピングしたところ、膜厚の上昇と共にゲルの乾燥を抑制でき、保水効果が見られた。これは、超薄膜の撥水性を保水能に転換した結果であり、撥水性超薄膜のユニークな特徴を見出した。ガラス基板に乗せた透明化脳切片(神経細胞を eYFP 標識)を撥水性超薄膜でラッピングし、共焦点レーザー顕微鏡にてタイリング撮影した。この広範囲の撮影には、通常約 2 時間程度を要する。しかし、撥水性超薄膜のラッピングにより、x, y, z すべての方向で鮮明な画像が取得できた。従って撥水性超薄膜は、乾燥とブレを抑制する生体組織用イメージングツールへの応用例を実証できた。

2. 浮遊細胞のラッピング 熱ナノインプリント法を利用して多孔質超薄膜を調製した(膜厚: ca. 55nm)。得られた多孔質超薄膜を用いて浮遊細胞(血小板)をラッピングし、フローチャンバーにセットし緩衝液を流動させた。ラッピングしない群では流動方向に沿って移動するのに対し、ラッピング群では流動せずにその場に留まった。また、ラッピング固定された血小板は未活性状態であった。そこで、液性刺激因子(TRAP)を流動させたところ、90 秒以内に活性化、凝集する一連の現象を可視化できた。従って、多孔質超薄膜による浮遊細胞ラッピングに成功し、未活性状態から刺激反応を追跡できる新規ライブイメージングツールとして応用できる可能性を実証した。

【結論】 生体組織や浮遊細胞を保定する「超薄膜ラッピング」法を提案し、新しい高解像度イメージングツールとしての応用例を実証した。

【文献】

- 1) Okamura Y, Kabata K, Kinoshita M, Saitoh D, and Takeoka, S. *Adv. Mater.* **2009**, *21*, 4388.
- 2) Okamura Y, Kabata K, Kinoshita M, Miyazaki H, Saito A, Fujie T, Ohtsubo T, Saitoh D, and Takeoka S. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 545.
- 3) Zhang H, Masuda A, Kawakami R, Yarinome K, Saito R, Nagase Y, Nemoto T. and Okamura, Y. *Adv. Mater.* **2017**, doi:10.1002/adma.201703139, in press.

備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤の実用化を目指す研究

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

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

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 250-280 nm)である。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、他者の追従を許していない。

本研究課題は、平成 27 年度より日本医療研究開発機構(AMED)臨床研究・治験推進研究事業として推進されてきた。PMDA の戦略面談を受け、製造工程や GLP 安全性試験項目について助言を得て、繰り返し赤血球からの Hb の精製と人工赤血球の製造を行い、GMP 製造の SOP 作成をするとともに、ラット、ビーグル犬を用いた GLP 安全性試験を実施中である。また、アカデミアのコンソーシアムが中心となって、先見的安全性・有効性研究を進め、First-in-human のプロトコル原案を作成するなど、臨床への橋渡し研究を進めている。

人工酸素運搬体 (HbV) の出血性ショック心臓蘇生後のラット心筋活動電と致死性不整脈誘発に及ぼす影響

○高瀬凡平, 橋本賢一, 東村悠子

防衛医科大学校集中治療部

dui15772004@yahoo.co.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 誘発群で有意に延長していた(VT/VF 誘発群 vs. VT/VF 非誘発群 and 健常群: 右室, 19 ± 7 vs. 12 ± 6 , 12 ± 2 ms, $p < 0.05$; 左室, 32 ± 7 vs. 14 ± 7 , 13 ± 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。

ラット肺切除周術期出血に対する高酸素親和性ヘモグロビン小胞体投与の効果

○河野光智¹, 小野沢博登¹, 橋本 諒¹, 大岩加奈¹, 増田良太¹, 渡辺真純², 堀之内宏久³, 酒井宏水⁴, 小林紘一², 岩崎正之¹

¹東海大学医学部外科学系呼吸器外科学, ²慶應義塾大学医学部外科, ³さいたま市立病院呼吸器外科, ⁴奈良県立医科大学医学部化学教室
kohno@1993.jukuin.keio.ac.jp

【緒言】人工酸素運搬体のヘモグロビン小胞体(HbV)は、期限切れ輸血用ヒト赤血球からヘモグロビンを抽出精製し、リボソームに内包、膜表面をPEG修飾して粒径を250nmに調製した粒子である。血液型がなく、感染源が排除され、室温で2年以上の備蓄が可能である。血液中で酸素運搬体として機能することは様々な動物モデルで確認され、出血性ショックの蘇生にも良好な成績が得られた。手術中の大量出血に対する投与も想定され、我々は肺切除モデルを用い、HbVの有効性と安全性を検討してきた¹⁾。また、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。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)高酸素親和性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、脱血により血圧は30mmHgまで低下するが、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 ± 5.9, LowP50HbV群で72.5 ± 14.5, ratRBC群で62.0 ± 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)。また動脈血酸素含量はLowP50HbV群でAlb群と比較して有意に高値を示した(p<0.005)。腎皮質の組織酸素分圧も反復測定分散分析において、LowP50HbV群でratRBCと比較して有意に高値であった。(p<0.05)。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。特にLowP50HbVは酸素化の改善をもたらす可能性がある。

【文献】

- 1) Kohno M, Ikeda T, Hashimoto R, Izumi Y, Watanabe M, Horinouchi H, Sakai H, Kobayashi K, Iwazaki M. Acute 40% exchange-transfusion with hemoglobin-vesicles in a mouse pneumonectomy model. *PLoS One*. 2017;12:e0178724.

ヘモグロビン小胞体の難治性炎症疾患治療薬としての応用使用

○田口和明¹, 永尾紗理², 酒井宏水³, 山崎啓之¹, 丸山 徹², 小田切優樹¹

¹ 崇城大学薬学部, ² 熊本大学薬学部, ³ 奈良県立医科大
k-taguchi@ph.sojo-u.ac.jp

【緒言】 低濃度の一酸化炭素(CO)は, 抗炎症作用, 抗酸化作用, 抗アポトーシス作用等の多面的な機能を有する生理活性ガスである. 我々は, ヘモグロビンをリン脂質二重膜に高濃度に封入したヘモグロビン小胞体(HbV)にCOを担持させた一酸化炭素結合型HbV(CO-HbV)を作製し, これまでに様々な難治性炎症疾患に対するCO-HbVの新規治療薬としての可能性を検証してきた. 本講演では, これまで得られてきたCO-HbVの難治性炎症疾患に対する有効性について紹介する.

【実験】 ブレオマイシン誘発特発性肺線維症モデルマウス, デキストラン硫酸ナトリウム誘発潰瘍性大腸炎モデルマウス, コリン欠乏エチオニン添加食誘発急性膵炎モデルマウスに対するCO-HbVの治療効果および作用機序について評価した.

【結果と考察】 特発性肺線維症, 潰瘍性大腸炎, 急性膵炎の病態モデルマウスを用いてCO-HbVの有効性を評価した結果, CO-HbVはこれらの難治性炎症疾患に対して顕著な治療効果を示した. また, CO-HbVによる臓器保護効果には, COによる抗炎症・抗酸化・抗アポトーシス効果が関与していると考えられた.

【結論】 HbVはCO放出制御担体として利用でき, 炎症や酸化ストレスが病態の進展・増悪に関与する幅広い疾患に対して応用使用が期待できると思われる.

【文献】

- 1) Nagao S, Taguchi K, Sakai H, Tanaka R, Horinouchi H, Watanabe H, Kobayashi K, Otagiri M, Maruyama T. *Biomaterials*. 35 (24): 6553-62. (2014)
- 2) Nagao S, Taguchi K, Miyazaki Y, Wakayama T, Chuang VT, Yamasaki K, Watanabe H, Sakai H, Otagiri M, Maruyama T. *J Control Release*. 28; 234: 49-58. (2016)
- 3) Nagao S, Taguchi K, Sakai H, Yamasaki K, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T. *Int J Nanomedicine*. 11: 5611-5620. (2016)

人工酸素運搬体(ヘモグロビン小胞体)大量投与が Cytochrome P450 肝代謝薬物の体内動態に与える影響

○得能正裕¹, 田口和明¹, 山崎啓之^{1,2}, 酒井宏水³, 小田切優樹^{1,2}

¹ 崇城大学薬学部, ² 崇城大学 DDS 研究所, ³ 奈良県立医科大学

g1431d04@m.sojo-u.ac.jp

【緒言】人工酸素運搬体として研究開発が進められているヘモグロビン小胞体(HbV)は、外傷などによる大量出血患者に対する使用が期待されている。HbV 投与の適応となる患者においては、HbV 投与と同時あるいは投与後に、麻酔薬を始めとした種々の薬物治療の実施が想定される。従って、HbV 投与が併用薬物の体内動態に与える影響を評価することは、薬物相互作用の観点から極めて重要である。本研究では、肝臓における主要薬物代謝酵素である Cytochrome P450(CYP)に着目し、HbV 大量投与が CYP 代謝型薬物の体内動態に与える影響について検討した。

【実験】健常ラットに HbV、新鮮および保存赤血球、生理食塩水のいずれかを投与(1000mg Hemoglobin/kg)した後に、CYP4 分子種(CYP1A2, 2C11, 2E1, 3A2)特異的に代謝される各基質薬物(CYP cocktail)を静脈内投与した。その後、経時的に血漿中各薬物濃度を測定し、各薬物の薬物動態パラメータを算出した。さらに、輸血後の肝臓ミクロソームを用い、HbV が肝臓中 CYP の発現量及び代謝活性に及ぼす変化について Western blotting と *in vitro* 基質代謝試験にて評価した。

【結果と考察】輸血 24 時間後に CYP cocktail を投与した際の薬物動態パラメータを各投与群間で比較したところ、HbV 投与群において全基質薬物の消失半減期の延長傾向が観察された。そこで、輸血 24 時間後の肝臓中 CYP 各分子種のタンパク発現量及び代謝活性を評価した。その結果、CYP 各分子種のタンパク発現量は全投与群間で大きな変動は認められなかった。一方、HbV 投与群において CYP4 分子種の代謝活性に若干の低下が認められた。さらに、HbV 投与が薬物代謝に与える長期的な影響を評価するため、HbV 輸血の 1 週間後に同様の検討を行った結果、CYP cocktail の消失半減期の遷延と代謝活性の低下はいずれも回復傾向を示した。以上より、HbV 大量投与は肝臓 CYP 代謝活性を抑制することで CYP 代謝型薬物の体内動態に変化を及ぼすが、その影響は一過性であることが示唆された。

【結論】HbV と CYP 代謝型薬物の併用時においては一時的な薬物消失半減期の遷延が予測される為、特に血中濃度管理を必要とする薬物の投与には配慮を要するが、臨床的には薬物の投与量や投与間隔の調整によって対応出来ると考えられる。

HbV に使用されているリポソーム粒子のマクロファージへの影響について

○東 寛¹, 吉田陽一郎¹, 石羽澤恵美¹, 高橋弘典¹, 立石義隆¹, 酒井宏水²

¹ 旭川医科大学小児科学講座, ² 奈良県立医科大学化学講座

azuma5p@asahikawa-med.ac.jp

【緒言】 HbV はヒト Hb 分子を内包するリポソーム粒子であり, 生体内に投与すると細網内皮系の細胞に取り込まれ, 分解・排泄される。HbV を赤血球の代替物として使用する場合には, 既存のリポソーム製剤の投与量を越えた量のリポソームを投与する必要があるので, リポソームの細網内皮系の細胞への影響について rat を用いて検討を行ってきた。

【実験】 Hb 分子を内包しないリポソームの懸濁液を WKAH rat の尾静脈から静注し, 24 時間後に犠牲死したあと脾臓を摘出した。その後, 脾細胞の単細胞浮遊液を調製し, ConA 刺激下で 3 日間培養して, リンパ球の増殖能, 培養液中の NO を測定した。脾細胞中の iNOS の誘導, 刺激伝達に関わる蛋白のリン酸化も western blot 法を用いて解析した。また, リポソームを貪食した細胞の表面マーカの解析を FCM にて行った。

【結果】 リポソームを投与したラットの脾内に, リンパ球の増殖を抑制する機能を持つ, マクロファージが一過性に誘導されてきた。しかし, in vivo における抗体産生能には影響をあたえなかった。この機能を持つマクロファージはリポソームを捕捉したマクロファージであり, T 細胞の増殖を抑制する直接のエフェクター分子は, それらが産生する NO であると推測された。また, リポソームの投与によるサイトカイン産生動態を検討した結果, IL-10 の産生能が高まるが, IL-1b の産生には全く影響を与えていないことがわかった。さらに, リポソームを補足した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, B7-H3 高発現細胞が, リンパ球増殖抑制効果を持っている事を示す結果を得た。また, リポソーム投与により NFkB あるいは P38 の刺激伝達経路が活性化することを示唆する結果を得た。

【考察】 リポソームが, 細網内皮系に取り込まれる事はよく知られているが, その事による細網内皮系の細胞が如何なる影響を受けるかに関しては, 詳細な検討がなされて来なかった。一連の実験結果により, リポソームの投与後, ラットの脾マクロファージの機能の一部が変化する事が明らかになった。しかし, この変化は一過性であること, 少なくとも抗体産生能には影響を与えないと思われることから, HbV の臨床使用に当たって, 免疫学的に重大な問題を提起するものではないと思われる。一方で, リポソームを捕捉した細胞が免疫抑制効果をもつ myeloid derived suppressor cell (MDSC) に極めて類似した特徴を持つことがわかった。リポソームが直径 250nm の粒子であることから, 得られた結果は, ナノ粒子がマクロファージを MDSC 様細胞にコンバートしうる事を反映していると思われる。炎症の場では, 細胞由来のマイクロパーティクルや微生物が存在し, マクロファージがそれらを捕捉し, MDSC 様細胞に変化しながら過剰な免疫応答を制御するという過程があるのかもしれない。

組換え蛋白質を用いた人工酸素運搬体「HemoAct™」の開発

○小松晃之, 船木亮佑, 森田能次

中央大学 理工学部 応用化学科

komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

少子高齢化が進行し献血者層人口が減少すると、安定した輸血液の備蓄が難しくなる。日本赤十字社の推計によると、10年後の2027年には年間約89万人分の血液が不足すると予測されている¹⁾。血液型に関係なくいつでも投与できる人工酸素運搬体の実現が、輸血治療を補完するための医療対策の一環として、また危機管理の主要施策として望まれる状況になってきている。

我々はヘモグロビン(Hb)の分子表面にヒト血清アルブミン(HSA)を共有結合した人工酸素運搬体(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター[Hb-HSA₃, 製剤名“HemoAct™”]を開発し、その構造と酸素結合能を明らかにしてきた²⁻⁶⁾。原料はHb(ヒト, ウシ, ブタ由来), HSA(血清由来, 遺伝子組換え体), 市販の架橋剤のみ。製造工程は2ステップと少なく, 特殊な装置も必要ない。イオン交換カラムを用いて簡単に精製できる。シェルとなるHSAを遺伝子組換えイヌ血清アルブミン(rCSA)やネコ血清アルブミン(rFSA)に変えたペット用HemoAct-C™やHemoAct-F™は, 獣医療分野で大きな注目を集めている⁷⁾。

一方, HemoAct™のコアであるヒトHbAを組換え体(rHbA)にできれば, 血液由来のHbやHSAを一切必要としない工場生産可能なヒト用人工酸素運搬体が完成する。ごく最近, 我々はメタノール資化性ピキア酵母を用いたrHbAの発現系を樹立し, それと組換えヒト血清アルブミン(rHSA)からなる組換え(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター(rHbA-rHSA₃)を合成することに成功した。構造, 物性, 酸素結合能は, HbAおよびHSAからなる従来型と一致した。

人工酸素運搬体「HemoAct™」の実現が, せまりくる深刻な血液不足の危機を乗り越えるための切り札になることを目指し, 実用化に向けた研究展開を急ピッチで進めている。

【文献】

- 1) 平成26年度第2回血液事業部会献血推進調査会 (<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000067171.html>) 資料 2-1
- 2) D. Tomita, T. Kimura, H. Hosaka, Y. Daijima, R. Haruki, K. Ludwig, C. Böttcher, T. Komatsu, *Biomacromolecules* 2013, 14, 1816.
- 3) H. Hosaka, R. Haruki, K. Yamada, C. Böttcher, T. Komatsu, *PLoS One* 2014, 9, e110541
- 4) T. Kimura, R. Shinohara, C. Böttcher, T. Komatsu, *J. Mater. Chem. B* 2015, 3, 6157.
- 5) 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.
- 6) Structural Insights into a Hemoglobin-Albumin Cluster in Aqueous Medium. R. Shinohara, T. Yamada, B. Schade, C. Böttcher, T. Sato, N. Sugimura, T. Shibue, T. Komatsu, *J. Phys. Chem. Lett.* 2017, 8, 819.
- 7) Artificial Blood for Dogs. K. Yamada, K. Yokomaku, M. Kureishi, M. Akiyama, K. Kihira, T. Komatsu, *Sci. Rep.* 2016, 6, 36782:1-11.

脳梗塞治療薬としてのヘモアクト™ の効果

○鏡谷武雄¹, 月花正幸¹, 小松晃之², 船木亮佑², 川堀真人¹, 長内俊也¹, 中山若樹¹, 数又 研¹, 寶金清博¹

¹北海道大学 脳神経外科, ²中央大学理工学部 応用化学科

abumiya@med.hokudai.ac.jp

【緒言】脳梗塞急性期の再開通療法の有効性が近年の臨床研究で明らかにされた。しかし、再開通療法において虚血の時間が長引くと、再開通が得られても再梗塞化、浮腫、出血を生じて予後が不良になることがある。動物実験で同様なモデルを作成して検討すると、この病態の形成に微小循環障害が関わるということが分かってきた¹⁾。この微小循環障害を改善する目的で粒径が赤血球の1/1000のサイズのヘモアクト(HA)を投与し、脳梗塞に対する治療効果を検討し、さらにその治療効果の作用機序の解明を試みた。

【実験】ラット中大脳動脈閉塞脳虚血モデルを用い、2時間虚血後に中大脳動脈を再開通させ、その再開通動脈よりHAを投与し、HAの脳保護効果を検討した。さらにHAが脳循環、酸素運能、活性酸素産生にどのような影響を与えるのかを検討した。

【結果と考察】未治療群、溶媒投与群、50%HA投与群、HA投与群の4群で、24時間後の神経症状を比較すると、HA群が他群に対し有意に神経障害度が軽かった。脳梗塞/浮腫体積は、未治療群：55.2%/26.4%、溶媒投与群：53.2%/27.1%、50%HA投与群：27.1%/15.2%、HA投与群：20.2%/14.1%で、HA投与群で梗塞、浮腫が有意に軽減していた。24時間後の患側脳のMMP-9発現、活性酸素産生もHA投与群で有意に抑制された。再開通後早期の脳血流量、脳組織酸素飽和度を測定すると、再開通6時間後の時点で未治療群ではいずれも低下をも認めるが、HA投与群では低下はなく、2群間で有意差を認めた。脳切片の免疫染色にて微小血管内の酸素運搬体の灌流状況を検討(未治療群では赤血球を染色、HA群ではHAを染色)すると、未治療群は再開通6時間後の時点で灌流血管が減少するが、HA投与群ではその低下はなく、2群間で有意差を認めた。微小血管の血管径の検討では、再開通後に2群とも狭小化するが、再開通6時間後では未治療群よりHA投与群でその変化が軽度であり、2群間で有意差を認めた。培養ラット脳微小血管内皮細胞を用いて、低酸素再酸素化の負荷時の活性酸素産生に対するHAの効果調べてみると、ヘモグロビン投与に比べて、HA投与は活性酸素産生を抑え、その程度はアルブミン投与とほぼ同等の効果であった。

【結論】ラット中大脳動脈閉塞脳虚血モデルにおいて、再開通時に投与したHAは強力な脳保護効果を発揮した。この効果は、HAが微小循環でより良好に灌流して酸素を組織に運搬する事、またアルブミンと同様な抗酸化作用を持っている事が関与しているものと考えられた。

【文献】

1) Kurisu K, Abumiya T, Nakamura H, Shimbo D, Shichinohe H, Nakayama N, et al., Neurosurgery. 2016, 79:125-34

遺伝子組換えイヌおよびネコ血清アルブミンの開発と動物用人工酸素運搬体の展開

○森田能次¹, 五十嵐啓介¹, 秋山元英¹, 木平清人², 小松晃之¹

¹ 中央大学理工学部, ² 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 1973 万頭 (2016 年) を超えるペット超大国である。動物医療の需要も年々高まり続けているが、「輸血」については十分な動物用血液備蓄システムが整っていないため、ペット用人工血液の実現に大きな期待が寄せられている。そのような背景のもと、我々はイヌ用およびネコ用人工血漿増量剤として、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) の開発に取り組んでいる。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-遺伝子組換えアルブミン) クラスター (製剤名: HemoAct-CTM, HemoAct-FTM) を合成し、動物用人工酸素運搬体として応用展開を進めている。

【実験】 rCSA および rFSA の *Pichia* 酵母発現系を樹立し、各蛋白質を産生した。得られた蛋白質を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。さらに、国際宇宙ステーション「きぼう」日本実験棟の微小重力環境下で結晶を作成し、X 線結晶構造解析を行った。架橋剤 (Succinimidyl-4-[*N*-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate, SMCC) を用いて Hb の分子表面にマレイミド基を構築し、rCSA または rFSA と反応させることで、HemoAct-CTM, HemoAct-FTM を調製した。蛋白質/Hb 定量から平均アルブミン結合数を決定し、等電点電気泳動から *pI* 値を測定した。また、HemoAnalyzer を用いて酸素結合解離曲線を作成し (37°C)、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】 rCSA および rFSA の発現はこれまで前例がなく、効率高い産生に世界で初めて成功した。得られた蛋白質の HPLC 曲線、Native-PAGE, SDS-PAGE, CD スペクトルは、血漿由来の CSA, FSA のデータと完全に一致した。また、X 線結晶構造解析から立体構造を初めて明らかにした^{1,2)}。rCSA, rFSA はともに 6 つのサブドメインからなり、還元型 Cys-34 を持つなど、ヒト血清アルブミン (HSA) ときわめて類似した三次元構造を有することがわかった。それぞれの (ヘモグロビン-遺伝子組換えアルブミン) クラスターは Hb 1 分子に平均 3 分子のアルブミンが結合したコア-シェル型構造であり³⁾、*pI* 値は構成するアルブミンの値と同等であった。HemoAct-CTM および HemoAct-FTM の *P*₅₀ (9 Torr), *n* (1.4-1.6) はヒト用 HemoActTM 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^{1,2)}。

【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。Hb-rCSA₃ (HemoAct-CTM), Hb-rFSA₃ (HemoAct-FTM) を合成し、酸素結合能を明らかにした。rCSA, rFSA は人工血漿増量剤として、HemoAct-CTM, HemoAct-FTM は人工酸素運搬体 (赤血球代替物) 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) T. Komatsu *et al.*, *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 36782: 1-11.
- 2) T. Komatsu *et al.*, **2017**, in preparation.
- 3) T. Komatsu *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, 8, 819-824.

遺伝子組換え(ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの合成

○船木亮佑, 秋山元英, 森田能次, 小松晃之

中央大学理工学部

komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

【緒言】我々はヒトヘモグロビン(HbA)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(HbA-HSA₃, 製剤名“HemoAct™”)を合成し, 人工酸素運搬体制剤としての実用化を目指した研究を進めている¹⁻³⁾. 原料はヒト血液から精製したHbAとHSAであるが, 今後少子高齢化が進行すると安定した確保が難しい状況に陥る可能性もある. ごく最近, 我々は遺伝子組換えHbA(rHbA)の効率高い産生法を確立し, 遺伝子組換えHSA(rHSA)との組合せで, (ヘモグロビン-アルブミン)クラスター(rHbA-rHSA₃)を合成することに初めて成功した.

【実験】rHbAの*Pichia*酵母発現系を樹立し, 通常条件でHbAを産生した. 精製は陽イオン交換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行い, 構造と物性を明らかにした. また, 得られた高純度rHbA溶液にSuccinimidyl-4-[*N*-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate(SMCC)を加え¹⁾, 分子表面にマレイミド基を構築した後, rHSAと反応させることでrHbA-rHSA₃を合成した. 精製は陰イオン交換クロマトグラフィーにより行い, 蛋白質/Hb定量から平均アルブミン結合数を決定した.

【結果と考察】ヒトHb遺伝子配列を導入したプラスミドを用いて*Pichia*酵母を形質転換し, rHbA発現系を確立した. BMGY/BMMY培地で培養後, 精製して得たrHbAのNative PAGE, SDS PAGE, 円偏光二色性スペクトル, 酸素親和性(P_{50} , n)は, ヒト赤血球から精製したHbAの値とそれぞれ一致した. さらに, rHbAおよびrHSAを原料にしてrHbA-rHSA₃を合成し, rHbA1分子にrHSAが平均3分子結合したコア-シェル型構造であることを明らかにした. 酸素親和性の指標である P_{50} およびHill係数(n)はHbA-HSA₃の値(8 Torr, 1.4)¹⁾と等しく, 同等の酸素結合能を有することがわかった.

【結論】*Pichia*酵母を用いた高純度rHbAの産生法と精製法を確立した. さらに, rHbA-rHSA₃を合成し, 酸素結合能を評価した. ヒト献血液に全く依存しないrHbA-rHSA₃は, 安定供給可能な人工酸素運搬体として期待される.

【文献】

- 1) T. Kimura, R. Shinohara, C. Böttcher, T. Komatsu, *J. Mater. Chem. B*, **2015**, 3, 6157.
- 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.

ヘモグロビンを担体した一酸化炭素の肝臓デリバリーと NASH 病態改善機序

○柳澤洋輝¹, 前田仁志¹, 田口和明², 皆吉勇紀¹, 異島 優³, 渡邊博志¹, 田中基彦⁴, 佐々木裕⁴, 小田切優樹^{1,2}, 丸山 徹¹

¹熊本大院・薬・薬剤学分野, ²崇城大学 薬学部, ³徳島大院・医歯薬学研究部, ⁴熊本大学 医学部 消化器内科分野
164y1007@st.kumamoto-u.ac.jp

【緒言】 食事由来の脂質が肝臓へ蓄積することで発症する非アルコール性脂肪肝炎(NASH)は、先進国を中心に罹患者数が急増しているが、未だ有効な治療薬は開発されていない。我々は、抗ストレスタンパク質のヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)から産生される生理活性ガスである一酸化炭素(CO)に着目し、COを赤血球(RBC)中のヘモグロビンに結合させたCO enriched RBC(CO-RBC)がNASHモデルマウスに対して優れた予防及び治療効果を発揮することを、昨年(2016)の年次大会で報告した。しかしながら、CO-RBCによるNASH病態改善の作用機序に関しては不明な点が多く残されていた。これらの点を明らかにすべく、本研究では、1)NASH病態生理におけるHO-1/CO経路の役割、2)CO-RBCからのCO放出特性及びCOの肝臓移行性、3)肝臓に移行したCOによる脂質蓄積抑制効果及び抗炎症作用の分子機構について *in vitro* 及び *in vivo* の両面から解明を試みた。

【実験】 CO-RBCはマウス由来の精製RBCにCOガスを付加することで作成し、ガスクロマトグラフィーを用いてCO-RBCのCO放出特性及び体内動態を解析した。尚、NASHモデルマウスはメチオニン・コリン欠乏食餌を4週間給餌することで作製した。また、ヒト及びマウスの肝組織切片を用いて、肝HO-1発現レベルを免疫染色により評価した。

【結果・考察】 ヒトNASH患者及びNASHマウスでは、健常状態に比べ肝臓中HO-1発現が顕著に増加しており、NASH病態時にはHO-1/CO経路が内因的な適応応答系として機能している可能性が示唆された。このことから、CO-RBCによる病態改善は、CO-RBCから肝臓へCOが効率良く供給されているためと推察された。そこで、100%ウシ胎児血清中におけるCO-RBCのCO放出特性を、低分子CO供与体として汎用されているCORM-2と比較した結果、CO-RBCはCORM-2よりも約4.4倍のCOを血清中で放出することが判明した。また、CO-RBC投与後のCO動態を解析した結果、CO-RBCは血中で緩徐にCOを放出するCOリザーバーとして機能し、循環血中から消失したCOの多くが肝臓に分布することを見出した。次に、COによるNASH病態改善の作用機序を、脂質代謝及び抗炎症作用の観点から解析した。CO-RBC投与群では、NASHマウスの肝臓において、生体のエネルギー代謝を制御するAMPKの活性と、その下流で転写制御を受ける脂質代謝関連遺伝子群(PPAR- α , L-FABP)の発現が有意に増加していた。加えてCO-RBCは、肝臓のTLR4/I κ Baシグナルを著明に減弱化させる結果、炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-1 β)と酸化ストレスの亢進を抑制した。また興味深いことに、COは抗炎症サイトカインであるIL-10の産生を顕著に誘導した。

【結論】 CO-RBCによるNASHの優れた病態改善効果には、1)COの効率良い肝臓デリバリー、2)COによるAMPKの活性化を介した脂質代謝促進作用、3)TLR4経路の抑制とIL-10の誘導による抗炎症作用が大きく寄与していることを明らかにすることができた。

ヘモグロビンと NAD(P)H との共存により生じる抗酸化的な疑似酵素活性の作用機序

○山田孫平¹, 久禮智子¹, 松平 崇¹, 山本恵三¹, 酒井宏水¹

¹ 奈良県立医科大学医学部化学教室

m-yamada@naramed-u.ac.jp

【緒言】 高純度・高濃度ヘモグロビン(Hb)を含有する人工赤血球は、輸血代替としての効能と安全性の詳細が動物投与試験により実証されている。しかし、HbO₂は自動酸化により次第にメトヘモグロビン(metHb)が漸増し、酸素運搬機能が減少する[HbO₂(Fe²⁺)→metHb(Fe³⁺)+O₂^{•-}]。この課題を解決する方法の一つとして、NADHを含有させることにより自動酸化が遅延されることを、第23回血液代替物学会年次大会などで報告した。また、その効果が、NADHとHbの共存によって生じる抗酸化的な疑似酵素活性によるものであることが解ってきた¹⁾。そこで今回は、この疑似酵素活性の作用機序について検討した。また更に、NADHと類似のNADPHとの比較を行ったので報告する。

【実験】 HbO₂とNAD(P)Hが共存すると、疑似カタラーゼ(CAT)活性と疑似スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)活性が観測されるので、この活性値から酵素学的パラメーターの算出を試みた。また、Hbに結合するinositolhexaphosphate(IHP)と2,3-diphosphoglycerate(DPG)による、疑似酵素活性の阻害様式を観察した。更に、NAD(P)Hの蛍光を利用し、NAD(P)HのHbに対する結合定数を測定し、Hbとの相互作用について考察した。また、NADHとNADPHの溶液中における長期安定性についても評価した。

【結果と考察】 NADHおよびNADPHがHbO₂と共存するときに観測される疑似酵素活性は同等で、ミハエリス-メンテン型の反応を示し、K_m値もほぼ同等のmMオーダーの値を示した。IHPとDPGによる阻害様式が拮抗阻害であること、また蛍光法により求めた結合定数等から、IHPやDPGの結合サイトにNAD(P)HとHbが弱く結合していることが確認された。また、NADHはNADPHに比較して長期安定性に優れ、人工赤血球製剤への応用に適していると考えられた。

【結論】 NAD(P)Hの結合サイトは、IHPとDPGがHbO₂に結合するサイトであり、また極めて弱く結合することが推定された。今後、構造解析等でさらに検討を進め、疑似酵素活性の機序を解明したい。

【文献】

1) Yamada M and Sakai H, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 1820-1829.

1 型インターフェロンのクッパー細胞デリバリーシステムと肝保護効果

○皆吉勇紀¹, 前田仁志¹, 渡邊博志¹, 異島 優², 小田切優樹³, 丸山 徹¹

¹熊本大学薬学部, ²徳島大学薬学部, ³崇城大学薬学部
170y2003@st.kumamoto-u.ac.jp

【緒言】 肝障害の発症進展にはクッパー細胞の過剰免疫応答に由来する炎症が重要な役割を果たしている。近年、肝障害時に産生される 1 型インターフェロン (IFN) がクッパー細胞に作用すると、抗炎症性サイトカイン (IL-10) やインフラマソーム阻害因子の IL-1 受容体アンタゴニスト (IL-1Ra) の産生亢進や、免疫チェックポイント因子である PD-L1 の発現を上昇させる結果、肝保護作用を発揮することが明らかとなった。従って、クッパー細胞へ 1 型 IFN を効率良く送達することができれば、抗炎症・免疫調節作用を有する肝炎治療薬としての展開が期待される。本研究では、1 型 IFN のクッパー細胞利用率を向上すべく、糸球体濾過回避能とクッパー細胞指向性を有する高マンノース型糖鎖付加ヒト血清アルブミン (Man-HSA) と IFN α 2b との融合体 (Man-HSA-IFN α 2b) をアルブミン融合技術により作製し、その肝保護作用をコンカナバリン A (Con-A) 誘発急性肝障害モデルマウスを用いて検証した。

【実験】 Man-HSA の C 末と IFN α 2b の N 末端を遺伝子レベルで融合し、Man-HSA-IFN α 2b を作製した。Con-A を 12.5 mg/kg 尾静脈内投与することで急性肝障害マウスを作成した。

【結果と考察】 RAW264.7 細胞および初代培養クッパー細胞に対して、Man-HSA-IFN α 2b は IL-10, IL-1Ra および PD-L1 の mRNA 発現を誘導したことから、アルブミンと融合化しても IFN α 2b の活性は保持されていることが判明した。次に、健常マウスにおける放射性ヨウ素標識 Man-HSA-IFN α 2b の体内動態を解析したところ、融合体は HSA に比べて迅速かつ効率良く肝臓に移行することが示された。そこで、FITC 標識 Man-HSA-IFN α 2b を投与し、肝臓における融合体の局在を検証したところ、マンノース受容体発現細胞のうち、クッパー細胞と融合体は共局在するが、血管内皮細胞とは共局在しないことが確かめられた。また、この優れた肝移行性と 1 型 IFN の生物活性を反映して、Man-HSA-IFN α 2b は致死性の Con-A 誘発肝炎マウスの生存率を改善した。その際、Man-HSA-IFN α 2b は Con-A 誘発肝障害を顕著に抑制した。対照的に、本融合体の構成成分である IFN α 2b 及び Man-HSA は肝障害を抑制しなかった。In vivo における Man-HSA-IFN α 2b の薬理作用を検討したところ、IL-10, IL-1Ra, PD-L1 の誘導と、TNF- α の抑制が確かめられた。加えて、Con-A 投与後 2 時間後の後投与においても、Man-HSA-IFN α 2b は肝保護効果を発揮した。

【結論】 Man-HSA-IFN α 2b は、クッパー細胞に効率良く移行した後、1 型 IFN の多面的な抗炎症・免疫調節作用を誘導する結果、優れた肝保護効果を発揮したことから、新規肝疾患治療薬としての応用が期待される。

Preparation of perfluorocarbon micelles using SPG membrane emulsification

○ Xiaoting Fu¹, Seiichi Ohta², and Taichi Ito^{1,2}¹Department of Bioengineering, ²Center for Disease Biology and Integrative Medicine, The University of Tokyo

taichi@m.u-tokyo.ac.jp

Introduction Artificial oxygen carriers are expected to improve oxygen supply for 3D cell culture system that usually suffers from hypoxia in tissue engineering. Among them, perfluorocarbons (PFCs) are of promising due to the excellent oxygen carrying capacity and have thereby gained intensive attentions.¹⁾ We have, for the first time, prepared PFC micelles as oxygen carriers using Shirasu porous glass (SPG) membrane emulsification. This technique enables formation of micro size micelles with uniform size distribution. Effect of the type of surfactants, as well as their concentrations, on the size distribution and stability of formed PFC emulsions will be discussed.

Experiment Emulsion of perfluorodecalin (FDC), which is a member of PFCs, was fabricated using SPG membrane with the pore sizes of 4 μm. 2 mL of FDC was used as a disperse phase, while 20 mL of saline containing certain amount of surfactants were used as a continuous phase (Fig.1). As a surfactant, we separately used Pluronic F-68 and F-127, whose hydrophilic lipophilic balance (HLB) are 29 and 22, respectively. The obtained emulsions were observed using optical microscope, whereas their size distribution was measured by the laser scattering particle size distribution analyzer. Moreover, we examine the stability of formed FDC emulsions in both of static and dynamic manners by respectively preserving the samples at 4°C and circulated at 7 mL/min.

Results and Discussion As shown in Fig.2 we did control the size distribution by changing types of surfactants and their concentrations. FDC micelles prepared by SPG membrane emulsification appeared spherically with monodispersed size. Static stability test showed that narrow size variation during storage for more than 1 month, whereas dynamic stability test resulted in significant size variation for micelles with low surfactant concentration (0.5 wt%) circulated after 9 hours, giving rise to 2 times large in diameter due to the insufficient amount of surfactant and hereby emphasized its key role in maintaining stability. Size-control of micelles will be investigated in the future experiments.

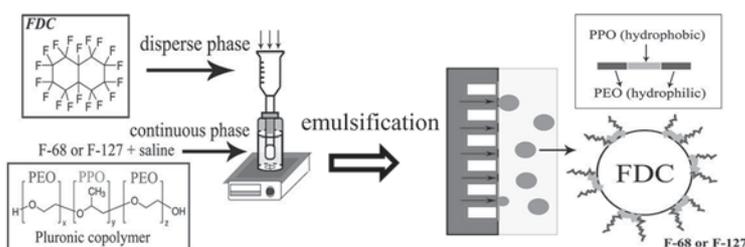


Fig.1 FDC micelles prepared using SPG membrane emulsification

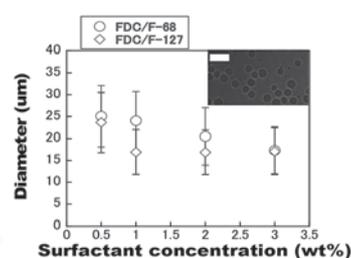


Fig.2 Effect of surfactant concentration on size distribution of micelles (scale bar 50 μm)

Conclusion We have successfully prepared PFC micelles as oxygen carriers using SPG membrane emulsification, and controlled their size distribution.

Reference1) Riess Jean G: *Chemical Reviews*, 2001, 101, 2797-2920.

酸素マイクロ・ナノバブル分散液を用いた完全液体換気から気体換気への復帰

○佐藤啓斗¹, 針井則一², 宮坂武寛³, 松田兼一², 武岡真司¹¹ 早稲田大学先進理工学研究科, ² 山梨大学・医学部, ³ 湘南工科大学・工学部
tk-mtaw.sthrt89@fuji.waseda.jp

【緒言】 急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) は低酸素血症によって特徴付けられる呼吸不全であるが, その有効な治療法は確立されていない¹⁾. ARDS では肺胞内に滲出液が溜まるため, 肺コンプライアンスが低下しており肺胞の虚脱が起りやすい. そのため, 虚脱肺拡張効果と肺洗浄効果を有する液体換気 (LV) が有効な治療法として期待される. 従来, 液体換気の溶液として, 酸素溶解度の高いパーフルオロカーボン (PFCs) が用いられていたが, 高価格であること, 生体内で代謝されず長期の安全性が保障されないことが課題とされている. そこで, 本研究室では PFCs に代わる安価で安全な高濃度酸素水として, 酸素マイクロ・ナノバブル (MNB) 分散液に着目し, 完全液体換気 (TLV) への応用を検討している²⁾. 本研究は, 酸素 MNB 分散液を用いた TLV 中の動物の生存時間測定と, 短時間の TLV から気体換気への復帰可能性を検討することを目的とした.

【実験】 MNB 発生装置 (ultrafineGALF; IDEC 社) を用いて酸素 MNB 分散液を調製し, 粒子径, ζ 電位, 酸素含有量を測定した. また, 雄ラット (Sprague-Dawley : 370-460 g) に酸素 MNB 分散液を用いた TLV を実施し, 生存時間の測定と血ガス分析, 血圧測定を行った. 加えて, ラットに 10 分間の TLV を実施した後に, 気体換気 (positive end-expiratory pressure, PEEP : 4 cmH₂O) に移行し, 気体換気復帰後の血液ガス分析と血圧の測定を行った.

【結果と考察】 酸素 MNB 分散液の平均粒子径は 208 ± 12 nm, ζ 電位は -10 ± 2 mV であった. 酸素 MNB 分散液の酸素含有量は 47 ± 2 mg/L であり, 生理食塩水の酸素含量 (7.0 ± 0.5 mg/L) より約 7 倍高かった. 酸素 MNB 分散液を用いて TLV を行った場合, ラットの平均生存時間は 39 ± 12 分 (n=6) であった. TLV を 10 分間実施した後に気体換気に復帰させたラットでは, 血液ガスは復帰 20 分後に正常値まで回復し, その値は 2 時間維持された. 血圧は, 復帰直後に TLV 前と同程度まで回復したが, その後に徐々に低下する個体が認められた. この主な原因として, PEEP に加えて, 気道内に残った液体の影響で排気が妨げられ, 肺に余分な圧が加わり血流を悪化したことが考えられる.

【結論】 酸素 MNB 分散液を用いた TLV では, 生理食塩水を用いた TLV と比べてラットの生存時間が約 7 倍大きかったことから, 酸素 MNB 分散液からラットへ酸素が供給されたと考えられる. また, 10 分間の TLV から気体換気への復帰が可能であることが示された.

【文献】

- 1) Fanelli et al., J Thorac Dis. 2013, 5 (3), 326-334
- 2) Kakiuchi et al., J Artif Organs, 2015, 18, 220-227

エタノール注入法による ADP 内包リポソームの調製

○駒木根元気¹, 武岡真司¹

¹ 早稲田大学大学院先進理工学研究科

gengoro@ruri.waseda.jp

【緒言】 当研究室では血小板代替物 H12-(ADP)リポソームの開発を行っている。表面に結合しているフィブリノーゲンγ鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)と内包されている血小板惹起物質アデノシン二リン酸(ADP)がその薬効成分であり、ウサギを用いた動物実験により止血能を有することが証明されている¹⁾。現在研究室では ADP 内包リポソームを、脂質を水溶媒に添加して攪拌する“水和法”により調製している。大量調製には、操作が簡便である“エタノール注入法”が注目されている。そこで本研究では、基本仕様を満たす ADP 内包リポソームがエタノール注入法で調製できることを検討する。

【実験】 DPPC/Cholesterol/DHSG/PEG-DSPE の 4 種類の脂質が 5/5/1/0.033 のモル比で混合された脂質をエタノールに溶解させた。この脂質-エタノール溶液を、ピペットマンを用いて ADP 溶液中に攪拌させながら注入し、リポソーム分散液を得た。得られた分散液に対してエクストルージョン(φ0.20μm x 2, φ0.10μm x 2)を行ってリポソームの粒径を調節し、ゲルろ過クロマトグラフィーによって未内包の ADP を除去して精製した。得られたリポソームに関して粒径、ADP 内包量を測定し、脂質損失量・ADP 回収効率を算出した。

【結果と考察】 脂質-エタノール溶液中の脂質濃度、脂質-エタノール溶液と ADP 溶液の混合割合が ADP 内包量や脂質・ADP 回収効率に与える影響を調べた。脂質濃度が高いほど、また、脂質-エタノール溶液の割合が高いほど、ADP 回収効率は高くなったが、脂質-エタノール溶液の割合が一定以上に高いと脂質の損失量が多くなった。その結果、例えば脂質-エタノール溶液の脂質濃度が 300mg/mL で脂質-エタノール溶液と ADP 溶液の混合割合が 3:7 の場合に脂質の損失量が 11mg と低く、ADP 溶液の回収効率は 18% と高かった。また、粒径は 186±55nm, ADP 内包量は 0.060mg/脂質 20mg であり、当研究室で水和法で設定した基本仕様を満たしていた。

【結論】 エタノール注入法を用い、水和法で調製したものと同等の仕様の ADP 内包リポソームを調製することができた。

【文献】

1) Hagsawa K et al., *Transfusion* 2014, 55, 314-325

Evasion of Accelerated Blood Clearance Phenomenon by Polysarcosine Coating of Liposomes

○ Kon Son¹, Motoki Ueda², Kazuaki Taguchi³, Toru Maruyama⁴, Yoshihiro Ito², Shinji Takeoka¹

¹Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, ²Nano Medical Engineering Lab, RIKEN, ³Faculty of Pharmaceutical Science, Sojo University. ⁴School of Pharmacy, Kumamoto University
konson@toki.waseda.jp

Introduction PEG, Polyethylene glycol applied on liposomes improves their stealth properties and stability in blood. PEG, however, is known to cause ABC (Accelerated Blood Clearance) phenomenon which occurs with multiple dosages due to IgM antibody production from immune recognition of PEG molecules¹⁾. Thus, as an alternative to PEG, polysarcosine (PSar) was selected for its dense chains with feasibility of length control like PEG. Here, we characterized morphological and chemical properties of PSar and PEG liposomes as well as their performance *in vivo*.

Experiments PSar and PEG liposomes were prepared with hydrogenated soy PC and cholesterol along with their respective hydrophilic polymers and characterized. Size control and zeta-potential were assessed as well as membrane polarity and fluidity with Laurdan and DPH tests for both liposomes. ELISA tests were conducted with PEG and PSar liposomes diluted to 0.0001, 0.01, 0.1, 1, 5, and 10 μmol phospholipid/kg for intravenous tail injection. Blood was collected after 1 through 7, 10 and 14 days to attain plasma to be applied to liposome plate coated well plates for ELISA assay to assess levels of IgM and IgG in blood after the first injection.

Results and Discussion

Size-controlled PSar liposomes had neutral charge showing no noticeable difference in membrane polarity and fluidity when compared with PEG liposomes. Surprisingly, however, ELISA results of PSar liposomes showed approximately half the IgM and IgG level seen in PEG liposomes. These levels also seemed to not depend on liposome concentration.

Conclusion IgM and IgG production trends of PSar-liposome were drastically different from those of PEG-liposome which suggests that PSar-liposomes may attenuate the ABC phenomenon.

References

1) Ishida T, Maeda R, Ichihara M, Irimura K and Kiwada H. *J. Controlled Release* **2003**, 88, 35-42

Investigation of immunoactivities of arginine-containing cationic liposomes

○Tianshu Li¹, Matthias Zehner², Sven Burgdorf², Shinji Takeoka³

¹Research Organization for Nano & Life Innovation, Waseda University

²Molecular Immunology and Cell Biology, Life and Medical Sciences Institute, University of Bonn

³Faculty of Science and Engineering, Waseda University

[Introduction]

Cationic lipids, which consist of arginine head group and ditetradecyl, dihexadecyl or dioctadecyl glutamate hydrophobic moieties with/without propyl, pentyl or heptyl spacers, were used to prepare arginine-containing cationic liposomes. These liposomes were originally designed as protein or gene delivery systems with relative low cytotoxicities [1-2]. Recently, it has been revealed that charged nanoparticles may have the potential of immune stimulation [3]. Therefore, we have investigated the lysine-containing cationic liposomes, which have lysine head groups instead of arginine, in the activation of NLRP3 inflammasome [4]. In this study, we continue to report the immunoactivities of arginine-containing cationic liposomes in terms of NLRP3 inflammasome activation in macrophages/monocytes and promotion of antigen presentation in dendritic cells.

[Methods]

Six types of arginine-containing liposomes (A0C14, A3C14, A5C14, A7C14, A0C16 and A0C18) were prepared by hydration of each type of cationic lipids followed by bath-type sonication for 30 min. The size distribution and zeta potential were measured, and the stimulation of immune cells was conducted by incubation of liposomes with LPS-primed human/murine macrophages and PMA-primed THP-1 monocytes; or murine dendritic cells after associating with chicken ovalbumin (OVA) to the liposome surface. The NLRP3 inflammasome activation was quantified by the release of IL-1 β using ELISA, while the antigen presentation was investigated after efficient antigen presenting to naïve T cells with respect of IL-2 secretion and T cell proliferation. The cellular uptake was evaluated and the mechanism of NLRP3 inflammasome activation was studied using flow cytometry and confocal microscope.

[Results and Conclusion]

All the liposomes showed similar zeta potentials (around 50 mV) but varied size distributions (50-250 nm). The capacity in NLRP3 inflammasome activation and promotion of antigen presentation were largely different among liposomes; however, similar trend was observed in different immune cells. A3C14 and A5C14 liposomes exhibited the most significant NLRP3 inflammasome activation as well as the promotion of both MHC-I and MHC-II mediated antigen presentation. These results suggested a structural effect of the cationic lipids composing cationic liposomes in the immune activation and indicated a promising application of A3C14 and A5C14 liposomes as advanced vaccine adjuvants.

References

- [1] Obata, Y., et al, *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 1055–1063. [2] Obata, Y., et al, *Nanomedicine* **2010**, 6, 70–77.
[3] Zhong, Z., et al, *Nat. Commun.* **2013**, 4, 1611. [4] Li, T., et al, *Nanomedicine* **2017**, in press.

人工赤血球(高濃度 Hb 内包リポソーム)脂質膜の流動性

○久禮智子¹, 酒井宏水¹¹ 奈良県立医科大学医学部化学教室

kure@naramed-u.ac.jp

【緒言】 高濃度ヘモグロビン(Hb)水溶液を内包したリポソーム(ヘモグロビンベシクル, Hb-V)は, 人工赤血球(赤血球代替物)としてその安全性と有効性が詳細に検討されている¹⁾. Hb-V に内包されている高濃度 Hb(35-40 g/dL)は, 非常に高い膠質浸透圧(COP, 200-300 Torr)を示し, 血液のそれ(20-25 Torr)と比較して極めて高い. そのため, Hb-V は脂質膜を介して常に高い膠質浸透圧差に晒されていることになる. しかし, Hb-V は非常に安定で長期保存中や血管内投与後の Hb 漏出は無い. そこで本研究では内包蛋白質溶液の濃度を変化させ, 膠質浸透圧が脂質膜の流動性に与える影響について比較した. 脂質膜に蛍光分子 DPH(1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene)を担持させ, その蛍光異方性から脂質膜の流動性を推定したので報告する²⁾.

【実験】 DPH の蛍光スペクトルは, Hb の吸収スペクトルと重複するため, Hb-V では十分な蛍光強度が得られない. そこで, ヒト血清アルブミン(Alb)溶液(0-40 g/dL)を Hb のモデル蛋白質とした. Alb 溶液は Hb 溶液と同様に濃度に応じて高い膠質浸透圧と粘度を示す. DPPC/cholesterol/DHSG/DSPE-PEG(5/4/0.9/0.03 モル比)の組成の脂質膜に各種濃度の Alb 溶液を内包させたりポソームを調製した. 得られたりポソーム脂質膜表面に DPH を担持させ, 蛍光異方性を 5-60℃の範囲で測定し, 得られた値から脂質膜の粘度を推定した.

【結果と考察】 リポソームに内包させた Alb 濃度が高くなるにつれて, DPH の蛍光異方性は低下する傾向が観測された. この傾向は低温領域(5-30℃)で顕著であった. 蛍光異方性から粘度を推定したところ, 空のリポソームに 40 g/dL の Alb 溶液を内包させると 949±8 cP から 607±10 cP まで低下した(25℃). このように, Alb 溶液の内包により脂質膜の粘度が低下したのは, 脂質膜を介する COP 較差によりリポソームが膨張・表面積増大する方向に働き, 流動性が上昇したためと考えられる. リポソーム分散液の温度を 60℃まで上昇させると, 脂質膜粘度は 377±10 cP まで低下したが, それでも DPPC 単独脂質から構成されるリポソームの液晶状態における粘度(40±2 cP)より十分に高い. したがって, 膠質浸透圧差によって生じる脂質膜の流動性の変動は軽微なものであると考える.

【結論】 人工赤血球は脂質膜内外の液質の違いから, 脂質膜に対して垂直方向の膠質浸透圧差を受ける. そのため脂質膜は張力を受け水平方向に広がりを持ち, 脂質分子の運動性が高くなると考えられる. しかし, その変化は軽微であり, 膠質浸透圧差に対して脂質膜の強度は十分に保たれており, 内包した高濃度 Hb を漏出することなく保持されていると結論付けた.

【文献】

- 1) Sakai H, *J. Funct. Biomater.* **2017**, 8, 10.
- 2) Kure T and Sakai H, *Langmuir.* **2017**, 33, 1533-1540.

特別セッション1-G1

産科救急での血液製剤の必要性 —母体救命の立場から—

○櫻井 淳^{1,2}, 池田智明^{1,3}, 関沢明彦^{1,4}, 奥富俊之^{1,5}, 照井克生^{1,6}, 三宅康史^{1,7}, 長谷川潤一^{1,8}, 松永茂剛^{1,9}, 田中博明^{1,3}, 岡井 崇^{1,10}

¹母体救命システム普及協議会, ²日本大学医学部救急医学系救急集中治療医学分野, ³三重大学医学部産婦人科学教室, ⁴昭和大学医学部産婦人科学講座, ⁵北里大学病院周産母子成育医療センター産科麻酔部門, ⁶埼玉医科大学総合医療センター麻酔科, ⁷帝京大学医学部救急医学講座, ⁸聖マリアンナ医学大学産婦人科学講座, ⁹埼玉医科大学総合医療センター産婦人科, ¹⁰愛育病院
Sakurai.atsushi@nihon-u.ac.jp

【背景】2010年に始まった妊産婦死亡症例検討評価委員会が妊産婦死亡の検討を行い母体安全への提言として毎年報告を行っている。この報告で母体死亡の原因として最も多かったのが産科危機的出血で有り、全検討数266例中61例(23%)であった¹⁾。未だに出血による母体死亡は産科領域では大きな問題である。現在、日本での母体救命では各科の連携の必要性がうたわれ、母体死亡を低下させることを目的として平成27年10月に日本母体救命システム普及協議会(J-CIMELS)が設立され、産婦人科、麻酔科、救急科の医師が参加し、母体の血液製剤使用に関しても様々な検討を行っている。

【産科危機的出血と血液製剤】産科危機的出血では大量出血による希釈性凝固障害の他に常位胎盤早期剥離や羊水塞栓症に伴う消費性凝固障害も加わる。よって、血液製剤としては赤血球製剤の他に凝固因子の補充が必要となる²⁾。妊産婦死亡症例検討評価委員会において提案された重要なポイントとして早急な輸血の決断や、早急に輸血を行えるシステムの必要があげられる¹⁾。日本の分娩の約半数は一次施設で行われているため、一次施設での輸血製剤の準備、一次施設からの救急搬送でのドクターカー・ドクターヘリで使用する適切な輸血製剤が必要とされる。理想的な輸血製剤として①常温で貯蔵できる②血液型を併せる必要が無い③長期間貯蔵できるといったものがあげられる。

【結語】多くの地域で適切な血液製剤が準備できることにより、適切な母体救命システムが構築出来る可能性が示唆される。

【文献】

- 1) 妊産婦死亡症例検討評価委員会, 母体安全への提言 2015, 2016, Vol.6, pp8-28.
- 2) 日本母体救命システム普及協議会, 母体救命アドバンスガイドブック, 2017, pp102-174

臨床医が求める理想的な人工血液とは

○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

重症外傷など大量出血をきたした出血性ショック患者の初期輸液療法として、これまで長年 crystalloid の大量投与が行われてきたが、近年では Damage Control Resuscitation の考えのもと、初期輸液を制限し低血圧を容認しつつ、凝固機能の改善を目的に massive transfusion protocol を活用した早期からの赤血球、新鮮凍結血漿、血小板の積極的投与が行われるようになってきている。しかし保存血輸血自体が生体に及ぼす炎症反応や免疫機能に与える影響は見過ごすことはできず、保存血輸血量は蘇生後に生じる臓器障害発生の独立した規定因子である。また、臓器障害の発生は輸血用血液の保存期間が長くなるほど増加することを我々は報告している。

我々は人工血液の生体への影響を確かめるため、ヒト重合型ヘモグロビンを用いた人工赤血球を使用した基礎研究ならびに臨床研究を行ってきた。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検討した結果では、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。ヒトへの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。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第三層臨床試験では、死亡率および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が、心筋梗塞の発症が人工赤血球群において増える結果となった。

人工血液が臨床応用されるためには、高齢者など様々な基礎疾患をもつ患者に投与しても血管攣縮などの早期副作用、臓器障害などの亜急性期副作用など、重篤な副作用を生じないことが求められる。人工血液により生じる可能性のある有害な生理活性を最小限に抑えることができれば、人工赤血球、濃縮血液凝固製剤および人工血小板の組み合わせにより、保存血のもつ有害作用を抑制した理想的な初期蘇生輸液が現実のものと考えると考えられる。待ったなしの救急現場において、適合性や感染の心配なくいつでもどこでも誰にでも投与ができる人工血液が一日も早く臨床使用可能となることを願ってやまない。

特別セッション1-G3

溶血性蛇毒による血小板機能障害に対する H12 (ADP) liposomes の治療効果の可能性

○三池 徹¹, 木下 学², 萩沢康介², 齋藤大蔵³, 阪本雄一郎¹

¹ 佐賀大学医学部附属病院高度救命救急センター, ² 防衛医科大学校免疫微生物学講座, ³ 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

【緒言】

アフリカやアジア, ラテンアメリカ, オセアニアの一部のへき地では, 蛇咬傷は深刻な健康問題である。そのため 2009 年に WHO は, 蛇咬傷を Dengue 熱やコレラと同様に neglected tropical diseases (NTDs) に追加した。蛇咬傷の致死率は他の NTDs と比較し非常に高く, 1 年間に数万人が死亡し, 40 万人が機能障害による後遺症で苦しんでいる。最も被害の多いクサリヘビ科の蛇毒は溶血性蛇毒であり, 局所や全身性の出血症状に特徴づけられる。

日本に生息するマムシやハブ・ヤマカガシもクサリヘビ科の溶血性蛇毒を有しており, マムシで毎年 1000 例(うち 10 人死亡), ハブで 100 例, ヤマカガシでは 40 年間で 34 例(うち 4 人死亡)が発生している。マムシ毒には, メタロプロテアーゼやホスホリパーゼ A2, LAO, ディスインテグリンなどの血小板や凝固機能を破綻させる様々な酵素を含んでおり, 重篤な場合には全身性の出血症状を来し血小板製剤や新鮮凍結血漿の輸血が必要となる。

【実験】

Point of care testing である ROTEM[®] と T-TAS[®] を用いて, 健常人の血液に種々の濃度の乾燥マムシ毒を添加し, 反応開始後より一定間隔で凝固機能の測定を繰り返し, 経時的变化を観察した。さらに蛇毒により凝固障害が出現した検体に, H12 (ADP) liposomes を添加し凝固機能の変化を測定した。

【結果】

蛇毒により, 健常人の血液の酵素凝固反応時間と血小板血栓形成時間は著しく延長した。また形成される血栓硬度も蛇毒により極端に低下した。経時的な観察により, 最終的には酵素凝固反応時間と血小板血栓形成時間の回復が認められた。しかし同時に経時的な線溶機能の亢進が観察された。蛇毒によるこのような凝固傷害に対して H12 (ADP) liposomes を添加したところ, 酵素凝固反応時間と血栓硬度が改善した。

【考察】

蛇毒による凝固系への影響としては, 様々な凝固因子の活性化とディスインテグリンによる血小板機能抑制が報告されている。フィブリノーゲンの不完全な活性化により形成される血栓は脆弱であり, さらに活性化に伴う消費により血液凝固系は破綻する。H12 (ADP) liposomes は機能不全に陥った血小板の機能を改善させ, さらに消費されたフィブリノーゲンの代替物質として働いた可能性がある。

【結論】

蛇毒による血栓形成能の変化を ROTEM[®] や T-TAS[®] により捉えることが出来た。その変化は H12 (ADP) liposomes の添加により改善が示唆された。以上より, H12 (ADP) liposomes が蛇毒咬傷により引き起こされる出血性事象に対して治療薬として有効である可能性が示された。

特別セッション1-G4

人工血小板 H12-(ADP)-リボソームによる人工心肺後凝固障害の制御

○石田 治¹, 萩沢康介², 木下 学³

¹ 防衛医科大学校外科², ² 同生理学, ³ 同免疫微生物学

oishida2000@gmail.com

【緒言】 人工心肺後凝固障害は血小板機能障害, 消費性凝固障害, 線溶系の亢進等が複雑に関与しあうことによって生じる。人工心肺を用いた心臓手術では術後大量出血がしばしば経験されるが, 有効な治療法は輸血の他にないため必然的に輸血製剤使用量が多くなる。我々は人工血小板 H12-(ADP)-リボソームは人工心肺後凝固障害の制御に有用であるのか, そして血液代替物として心臓外科手術後の輸血製剤使用量低減に寄与できるのかについて検討を行っている。

【実験】 NZW 家兎(2.5-3kg)を用いて人工心肺後凝固障害モデルを作成した。人工心肺回路は PVC 製(non-coating)回路に小児用人工肺(メラエクセライン TPC)を接続したもの(膜面積 0.6m², 充填量 250ml)を用い, 兎赤血球と 20% ヒトアルブミンを充填液に用いた。全身麻酔下に胸骨正中切開後ヘパリン投与し, 上行大動脈に 8Fr 送血管, 右房に 10Fr 脱血管を留置し回路に接続, 60 分間運転させた後に人工心肺を離脱, プロタミンを投与し 3 時間経過をみた。

【結果と考察】 人工心肺前後で血小板数は 17 ± 2 vs $6 \pm 1 \times 10^4/\mu\text{L}$ と減少し, 血液凝固能(Sonoclot ACT)は 103 ± 7 vs 396 ± 40 秒と延長, 血小板機能(Multiplate collagen test)も 89 ± 6 vs 15 ± 3 AUC と低下し, 人工心肺後の凝固障害が再現された。これに対し家兎の PRP(血小板分画)や PPP(血漿分画)を投与したが, PRP 群は PPP 群に比し, 血小板数の上昇と共に血液凝固能(Sonoclot ACT): 211 ± 18 vs 387 ± 102 秒, 血小板機能(Multiplate collagen test): 46 ± 9 vs 16 ± 4 AUC と凝固障害の有意な改善を認め, これらは治療効果判定に有用と考えられた。

【結論】 上記のように作成した人工心肺後凝固障害モデルを用いて H12-(ADP)-リボソーム投与実験を開始しており, 現在データを蓄積中である。

特別セッション1-G5

凝固障害を伴う家兔の肝大量出血モデルでの HbV による蘇生輸血効果と血小板輸血時の止血効果

○木下 学¹, 萩沢康介², 石田 治³, 齋藤大蔵⁴, 酒井宏水⁵

¹ 防衛医科大学校免疫微生物学講座, ² 同生理学講座, ³ 同外科学講座, ⁴ 防衛医科大学校・防衛医学研究センター外傷研究部門, ⁵ 奈良県立医科大学化学教室

manabu@ndmc.ac.jp

急性大量出血に対する HbV の救命蘇生効果は、動物実験レベルでは既に多くの報告がなされている。一方、臨床ではシンプルな実験モデルとは違い、凝固障害を伴うような難治性の出血性ショックの救命蘇生こそが、問題となっている。このような難治性ショック病態での HbV の救命蘇生効果を検討することが、臨床応用に向けて重要ではないだろうか。HbV は粒子径が小さいため、大量投与しても赤血球輸血とは違い、hematocrit(Ht)は上昇しない。この Ht は血小板の止血効果の発現に重要と言われているが、HbV 投与時の Ht 低下状態が血小板輸血時の止血効果に及ぼす影響を検討した。

【方法】 あらかじめ、急性血小板減少性の凝固障害モデルを作製し、これに肝臓器損傷による致死性の臓器出血を作製した。出血作成後、30 分間はいかなる止血処置も行わずに自由に出血させ、10 分毎に出血量と等量の HbV (Hb: 10g/dL)、家兔赤血球 (Hb: 10g/dL に調整)、血漿 (PPP: platelet poor plasma) を投与した。その後、止血のために、血小板を多く含む PRP (platelet rich plasma, $20 \pm 5 \times 10^4/\mu\text{L}$) を 30mL 輸血し、HbV 輸血がその後の血小板輸血に及ぼす影響を検討した。

【結果】 最初の 30 分間の自由出血時の出血量は 3 群間に差はなく、いずれも約 30mL 前後であり、これと等量の HbV、赤血球、PPP を投与した。PPP 投与群ではショックを表す血中乳酸値が有意に上昇し、血圧も 30mmHg 台に低下した。HbV 群では赤血球輸血群と同様な乳酸値上昇の抑制、血圧の維持が認められ、凝固障害下の出血性ショックでも赤血球輸血の代替としての有効性が示唆された。一方、hematocrit(Ht)は HbV 投与群では維持されず、赤血球輸血群に比べ有意に低かった (Ht: 23% vs 28%, $p < 0.05$)。その後の PRP 輸血による止血効果では、PPP 群で 8 例中 2 例しか止血できなかったが、HbV 群では赤血球輸血群と同様に顕著な止血効果が発揮できていた (HbV 群 8 例中 7 例、赤血球群全例止血)。

【結語】 HbV は凝固障害下の臓器大量出血でも、赤血球輸血と同様な救命蘇生効果が認められた。HbV の大量輸血では赤血球輸血のような Ht の上昇効果はないが、血小板輸血の止血効果を妨げるものではなかった¹⁾。

1) Hagiwara K, Kinoshita M, et al., *Shock*. in press.

産科出血対応の現状と人工赤血球の必要性

○照井克生¹, 大浦由香子², 入江祐子³, 松永茂剛⁴

¹ 埼玉医科大学総合医療センター産科麻酔科, ² 同麻酔科, ³ 同総合周産期母子医療センター母体胎児部門, ⁴ 同産婦人科
terui@saitama-med.ac.jp

【緒言】 厚生労働科学研究費補助金による妊産婦死亡症例検討評価委員会(主任研究者: 池田智明 三重大学産科婦人科学教室)によれば, 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. 総合周産期母子医療センターである当院では, 他院での出産後に大量出血となり搬送される例が後を絶たないが, 前医では輸血を開始できずに当院到着後に死亡する例もある. そこで分娩取り扱い施設での輸血用血液製剤常備の実態を調査し, 同時に当院産褥搬送例での輸血率について検討した.

【方法】 ①池田班の分担研究として「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」を平成24年3月に実施した. 対象は全国の分娩取り扱い施設2968施設とし, 郵送により行った. 調査内容は, 分娩施設の種類と産褥出血症例数, 搬送方針, 輸血用血液製剤常備状況, 輸血決定から輸血実施までの所要時間, 産褥搬送に要する時間などについてアンケート調査した. ②当院に2011年から2015年の間に産褥搬送された経陰分娩後の出血症例での輸血率を, 硬膜外無痛分娩併用の有無に分けて検討した.

【結果と考察】 ①回答率は48.1%だった. 1年間の輸血症例数は0人の施設が731施設と最も多く, 1人(207施設), 2人(99施設)と続き, 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%を占めた. 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%だった. 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%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.

②経陰分娩後の産褥出血による搬送101症例のうち, 硬膜外無痛分娩なし82例, 硬膜外無痛分娩あり19例であった. 陣痛促進剤の使用率は, 無痛分娩非施行群と比べ施行群で有意に多かった($P < 0.005$). 産褥搬送例での最終的な出血量は, 硬膜外無痛分娩併用により増加しなかった. 搬送前からの輸血開始率は, RBC・FFPのどちらかが輸血されていた症例が35.6%, RBCのみが輸血されていた症例が29.7%, FFPのみが輸血されている症例が27.7%であった. 産褥搬送例での輸血率の低さは, 多くの小規模産科施設で輸血用血液製剤が常備されていない実態を反映している可能性がある.

【結論】 小規模な分娩取り扱い施設においては, 輸血を要する出血例の発症頻度が少なく, 輸血用血液製剤を常備しにくい実態が明らかとなった. 産褥出血例での前医からの赤血球輸血開始率は29.7%と低かった. 保存期間の長い人工赤血球が実用化すれば, 小規模産科施設でも輸血用血液製剤の代わりに常備することができ, 産科出血例での母体予後改善と母体死亡減少が期待できる.

特別セッション2-G7

重症体幹部外傷における機能的 & 機械的止血戦略：外傷性凝固異常に対する大量輸血療法と迅速一時止血術 (REBOA)

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^[1,2]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^[3]、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^[4]。これら外傷起因性凝固障害の回避および補正のため(機能的止血)、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る輸血を行う「Massive Transfusion」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。

一方で大量輸血療法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^[5]、同スコアを用いて大量輸血療法開始基準を策定し^[6]、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、機械的止血なくして止血の完成はない。更には、機械的止血が機能的止血への第一歩となる。筆者はTBSSを用いた外傷性出血の重症度分類と、それに応じたResuscitative Endovascular Balloon Occlusion of the Aorta (REBOA)の適応を定め、REBOAによる迅速な機械的一時止血にも注力してきた^[7]。本演題では、外傷におけるMassive TransfusionとREBOAについて紹介し、血液代替物の将来についても考察する。

【文献】

- 1) Sauaia A, Moore FA, Moore EE, et al. Epidemiology of trauma death: a reassessment. *J Trauma*. 2005, 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.
- 7) Ogura T, Lefor AT, Nakano M, et al. Nonoperative management of hemodynamically unstable abdominal trauma patients with angioembolization and resuscitative endovascular balloon occlusion of the aorta. *J Trauma Acute Care Surg*. 2015, 78, 132-5.

病院前救急診療，特に外傷診療における人工赤血球への期待

○宇津秀晃^{1,2}，高須 修^{1,2}

¹ 久留米大学医学部救急医学，² 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】 人工血液の臨床応用を想定した場合，病院前救急診療，特に出血が問題となる外傷例はその良い適応と考えられる．病院前診療が行われた外傷例の後方視的検討から，病院前救急診療において人工赤血球へ期待する効果を検討した．

【対象と方法】 2008年以降にドクターヘリで現場に出動し当院救命センターへ搬送となった外傷患者(n=758, 15歳以下, 心肺停止・蘇生後等を除く)において, 収縮期血圧 ≥ 90 mm Hg かつ脈拍 ≤ 120 /分かつショック指数 < 1 を正常バイタルサインと定義し, これを満たさない異常バイタルサインに乳酸値上昇(2.5mmol/l以上)を伴った症例(以下S群, n=75)と, 正常バイタルサインであるが乳酸値上昇を伴った症例(occult hypoperfusion, 以下OHP群, n=186)を抽出. S群, OHP群の輸血率, 大量輸血率, 大量輸血死亡率を調査し, 両群の大量輸血生存例と死亡例の比較から, 大量輸血死亡例の特徴と凝固系破綻をきたす因子を検討した.

【結果】 ①輸血率, 大量輸血率, 大量輸血死亡率は, S群: 78.7%, 57.3%, 46.5%, OHP群: 37.1%, 17.2%, 34.4%. ②両群生存例と死亡例の比較では, 覚知から病院搬入までの時間と病院前輸液量に有意差は認めなかった. ③S群死亡例は生存例に比し乳酸値が高値であった. ④両群とも死亡例でfibrinogen(以下fib)が有意に低値で, PT-INRは有意に高値であった. ⑤血小板数とHt値はS群のみ死亡群で有意に低値であった. ⑥S群, OHP群両群での病院前輸液量とfib, PT-INR, 乳酸値とfib, PT-INR, pHとfib, PT-INRの関係の検討から, 病院前輸液量よりもアシドーシスの方がPT-INRとfib悪化に関与していると考えられた.

【考察・結語】 ひとたび大量輸血に陥ると死亡率は高くなる. 大量輸血死亡例では特徴的な凝固能破綻がみられ, 病院前輸液よりもむしろアシドーシスの関与が大きい可能性が考えられた. 病院前救急診療における人工赤血球の使用は, 微小循環障害に伴うアシドーシスの進行・悪化を早期より防止し, ひいては凝固能破綻の回避から救命に寄与することが期待される.

特別セッション2-G9

大量出血を伴う重症外傷に対する蘇生戦略の限界と人工血液に求めるもの

○吉村有矢¹, 東山大士¹, 瀬野宗一郎¹, 磯井直明¹, 関根康雅^{1,2}, 秋富慎司¹, 田中良弘¹, 齋藤大蔵^{1,2}, 池内尚司¹

¹防衛医科大学校病院 救急部, ²防衛医科大学校 防衛医学研究センター 外傷研究部門
yoshimura.yuya@gmail.com

【緒言】 不慮の事故, 外傷による致死的な大量出血は多くの若者の命を奪っている。出血性ショックの治療は近年, 確実に進歩してきた。しかし, どんなに手を尽くしても救命できない患者が存在する。

【目的】 新たな治療法として期待される人工血液に求めるものを, 重症外傷の蘇生に挑戦する救急医の立場から述べる。

【方法】 致死的な大量出血を伴う外傷患者, 出血性ショックに対する現在の蘇生戦略を総括する。また, 出血死を自験例と日本外傷データバンクから考察し, その限界を探る。

【結果】 現在の大量出血に対する蘇生戦略は下記の通りである。①ドクターカー, ドクターヘリによる病院前からの早期治療開始と搬送②救急救命士による心停止前輸液③止血帯④ Massive Transfusion Protocol ⑤急速加温輸血装置⑥トラネキサム酸⑦ Damage Control Surgery ⑧ Interventional Radiology ⑨低血圧の容認蘇生⑩外傷性凝固異常の認知と補正⑪大動脈遮断バルーン⑫外傷センターへの集約化。当院の過去3年間の来院時心停止を除く外傷死亡例32例のうち, 12例(38%)が出血死であり, 6例(50%)が Non-Preventable deathであった。これらは, 現在の標準的医療では死亡を回避することができないと判定された。

【考察】 出血性ショックの治療には, 迅速性と大量輸血が求められる。投与する輸血のスピードと量が, 出血のそれを超えることができないければ患者は出血死する。すなわち, 輸血開始の遅延, 輸血量の不足, 止血の遅延が死亡の原因である。また, 外傷性凝固異常の補正が重要視されている。日本では病院前から輸血を開始することはほとんど不可能であるし, 病院でも輸血が不足したり, すぐに手に入らなかったりすることがある。圧倒的な大量出血の前に, 現在の蘇生戦略はときに無力である。

【結語】 迅速かつ大量に使用でき, 凝固異常を補正できる人工血液を求める。救命不可能と思われる大量出血患者を, 現在の蘇生の限界を超えていつか救命したい。

特別セッション2-G10

院内採血輸血(いわゆる生血輸血)を必要とする場面がまだ日本国内には存在するのか？

○梅村武寛¹, 佐久本薫², 石倉宏恭³

¹ 沖縄県立南部医療センター・こども医療センター 救命救急センター, ² 産婦人科, ³ 福岡大学病院 救命救急センター
takeume777@gmail.com

【はじめに】

現在, 我が国では, 日本赤十字社の多大な功労で世界に類を見ない安全な血液製剤が供給されている。重症多発外傷, 分娩, 心血管系手術時の大量出血に対して緊急大量輸血が必要な場合でも, 院内の備蓄血液製剤を使用し, その備蓄量で不足する場合は地域内血液センターからの緊急供給を受ける体制が整備されている。このため, 現在では緊急輸血の際に院内で献血者を募り採血し, その新鮮血を直接輸血する(いわゆる生血輸血の)必要性はほとんど生じ無いことが厚生労働省より示されている。

一方で, 沖縄県の離島医療施設では, 離島という地理的環境から血液製剤の緊急供給は今なお空路による輸送に頼らざるを得ない状況がある。このため, 搬送には最短でも3~4時間を要し, 輸血開始までに5時間程度必要となることもある。台風などで気象条件が悪化した際には, 空路による輸送は不可能となり, 緊急の血液製剤供給が実施できない事が想定される。

つまり, 日本において整備されている血液製剤供給体制の恩恵にあずかれない地域が未だ存在し, これら地域では救命のための生血輸血に依存せざるを得ない状況である。

【方法】 日本国内で生血輸血が実際に行われている地域として沖縄の離島へき地医療施設の血液製剤備蓄量, 廃棄量(率), 生血輸血施行例を調査しその結果をまとめた。

【結果】 1医療施設で2006-2015年の9年間で生血輸血オーダーが31例, 実施20例であった。

【考察】 今回の調査から生血輸血を実施された症例は, 大量出血に対して救命を目的に緊急避難的に院内採血を行い, 生血輸血を実施した症例群であった。生血輸血には, 凝固因子補充などの医学的利点から生血輸血を選択された症例も存在した。ただし, 輸血後GVHD等の致命的な合併症もあり, 現在の輸血制度において推奨される療法ではない事も再認識した。以上より, 離島医療の血液製剤としては安定的供給が可能で, 製剤としても安定保存が可能な血液代替製剤の供給開始が待たれる。

人工酸素運搬体により産科危機的出血を制御する

○大浦由香子¹, 照井克生², 萩沢康介³, 木下 学⁴

¹ 埼玉医科大学総合医療センター麻酔科, ² 埼玉医科大学総合医療センター産科麻酔科, ³ 防衛医科大学校生理学講座, ⁴ 防衛医科大学校免疫微生物学講座

youra@saitama-med.ac.jp

【緒言】 産科出血は妊産婦死亡原因の第一位で, 毎年 60 人前後の妊産婦が死亡している. 危機的出血に陥った場合は早期から輸血が必要となるが, 日本では分娩の半数以上が産科一次施設で行われており輸血準備が十分とは言えず, 初期治療に困難を伴う場合がある. 本研究では妊娠末期のウサギに産科危機的出血を生起させ, 凝固障害, 血小板低値, 貧血を伴う出血性ショックの病態モデルを確立する. さらに赤血球輸血の代替として HbV を投与して, 急性期の救命効果を検証し, 産科一次施設における初期治療として HbV が赤血球(以下 RBC)輸血を代替しうるかを検討する.

【実験】 妊娠末期のウサギに脱血, 洗浄赤血球返血を繰り返し, 合計 180ml とウサギの循環血液量に相当する量を行う. その後, 子宮間膜の動静脈の根部付近を切離して危機的出血を起こす. 出血から 60 分間, 5 分毎に出血量と等量の HbV を投与して血行動態を維持させる. 陽性対象群として RBC と PPP を 1:1 で輸血する. 陰性対象群は 5% アルブミンを投与し, 各々の母体への影響の違いを経時的に観察する.

【結果と考察】 RBC 群(n=2)は術後 24 時間以上生存したが, アルブミン群(n=2)は実験終了 1 時間以内に死亡した. 出血中の平均動脈圧は RBC 群で 60mmHg, アルブミン群は 40mmHg, HbV 投与(n=1)は 50mmHg 前後であった. HbV 投与によって術中の動脈血 pH 値は 7.30 前後で乳酸値も 4-7mmo/L であった. アルブミン投与に比較して良好であり末梢循環の維持には期待が持てる. RBC 輸血に匹敵する血圧維持のためには膠質浸透圧を維持することも重要であり, 膠質浸透圧を維持できる HbV の開発に期待する.

【結論】 産科危機的出血のモデルを作成した. 今後, HbV 投与による救命が可能かさらに検討を進めたい.

出血性ショックと凝固障害を人工血液で制御する

○萩沢康介¹, 木下 学², 多喜川真人³, 武岡真司³, 酒井宏水⁴, 宮崎裕美⁵, 齋藤大蔵⁵

¹ 防衛医科大学校生理学講座, ² 同免疫微生物学講座, ³ 早稲田大学先進理工学部, ⁴ 奈良県立医科大学化学教室, ⁵ 防衛医科大学校・防衛医学研究センター外傷研究部門

hagisawa@ndmc.ac.jp

近年, 赤血球: 血小板: 血漿を 1:1:1 の単位比で大量出血の発症当初から投与することにより, 患者予後を改善できるとの臨床研究が報告されている. しかし, 各々の輸血を早期から使用することは保存方法や有効期限等の制約により実質的には不可能である. Hemoglobin Vesicles (HbV) は血液型を問わず使用可能な人工酸素運搬体(いわば赤血球代替物)であり, また H12-(ADP)-liposomes は血小板血栓形成を促進しながらも血栓症を生じさせない血小板代替物である. これまでに, 赤血球代替物投与による出血性ショックの救命や^(1,2), H12-(ADP)-liposomes 投与による急性血小板減少時の凝固障害を伴う致死性肝出血の止血救命を実験的に報告してきた⁽³⁾. 赤血球代替物である HbV はリポソーム内にヒトヘモグロビン(Hb)を含有し, 現製剤では Hb 値 10g/dl に相当する酸素運搬能を有しているが, 径が 300nm 弱と小さく, 大量投与しても血小板輸血時の止血能発現に影響を及ぼすとされる Ht は上昇しない. しかし, 易出血性の大量出血モデルでの HbV 投与は赤血球輸血と同様に, 血小板輸血と併用した際に, その止血効果を妨げることなく止血救命が可能であった⁽⁴⁾.

今回, 家兎の循環血液量の 2 倍に相当する量を脱血し, 赤血球成分のみを返血することで, 急性血小板減少による易出血性病態を作製した. その後, 肝に外傷性損傷を作り出血させ, Hb が 6g/dl 以下となる出血性ショックを誘導した. これに対して H12-(ADP)-liposomes と HbV, 血漿成分を投与することでショック病態と凝固障害を改善させ, 24 時間以上の生存をもたらすことができた.

【結語】 これらの人工血液は長期保存が可能でプレホスピタルでも使用でき, 大量出血の早期から投与することで外傷による出血性ショックと凝固障害を合併した治療困難な病態の救命率を向上させると期待される.

【文献】

- 1) Shono S, Kinoshita M, Takase B, et al., *Shock*. **2011**; 35: 45-52.
- 2) Nogami Y, Takase B, Kinoshita M, et al., *Shock*. **2012**; 38: 159-64.
- 3) Hagisawa K, Nishikawa K, Yanagawa R, et al., *Transfusion*. **2015**; 55: 314-25.
- 4) Hagisawa K, Kinoshita M, Takase B, et al., *Shock*. in press.

第 24 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、下記の財団法人、企業よりご支援、ご協力をいただいております。ここに法人名、社名を記して謝意を表します。

The 24th Annual Meeting of the SBSJ is partially supported by the following foundation and companies.

一般財団法人 化学及血清療法研究所

鈴木科学薬品株式会社

(五十音順)

人工酸素運搬体とその臨床利用

Artificial Oxygen Carrier and Its Clinical Use

高折 益彦

Masuhiko Takaori

和文抄録

我が国で開発されている人工酸素運搬体は厚生労働省の認可を得ていないが liposome encapsulated hemoglobin の生産は nonGMP レベルまで達している。本稿においてはもし我々医師が致命的貧血患者の治療に遭遇した場合このような人工酸素運搬体をいかなる条件が付帯すれば人道的な立場から緊急避難的に使用できるか検討し以下の結論に達した。すなわち、1) 急性出血により患者血液の Hb 値が 5g/dl 以下である；2) いかなる血液の輸血も 30～60 分以内に行えない；3) 患者自身、あるいは患者親族、親権者の同意 (informed consent) が得られている；以上である。しかしこのような条件に遭遇する頻度は信仰上の理由から輸血施行を拒否する症例を含めても 24.2/10¹⁰ 例に 1 例以下と想定される。しかしその 1 例の命を救うために政府はさらなる人工酸素運搬体の開発を進め、上記の条件に適合した場合には迅速に対処できる体制を整えるべきと考える。

Abstract

An artificial oxygen carrying substance developing in our country has not been justified as a new drug by the Ministry of Health, Labor and Welfare Department, as yet. However it should be used and be effective for resuscitation of patients who suffered of massive hemorrhage and faced on life-threatening situation. We assume, however, that its use would be limited in the actual practice for below conditions; (1) The patient's hemoglobin level will be dropped down less than 5 g/dl; (2) Blood for transfusion could not be available within 30～60 min or he refuses the transfusion absolutely; and (3) Informed consent will have been obtained from himself or his person in parental authority. Nevertheless it should be provided necessarily as administrative management even if the case adapted to the above situations would be experienced 1～2 cases per year

Keywords

artificial oxygen carrier, recent development, clinical use, prospective in the future, critical anemia, low hemoglobin level tolerance, administrative management

はじめに

人工酸素運搬体、すなわち人工赤血球の開発はその開始からすでに 20 有余年を経ている。この間、工業化、新薬としての商品化を目指して充実した基礎的研究はほぼその目的を達することが出来た。そして製品化への基礎となる non-GMP 段階まで達した。しかしいまだ治験への段階、商品化への道にまで達していない。

ただこの製品については医師指導型臨床治験への道は残されている。またもしこの製品を患者の生命維持のために救急避難的に医師として使用を望む、またはしなければならない場合も

ありうる。その際に我々医師として如何に対処すべきか考えておかねばならない。現在でも痛免疫療法としてのある種の治療法、薬物が患者の苦痛を和らげるため、生命延長のために厚生労働省の正式な許可なく用いられている。その多くは患者の informed consent が得られ、患者の希望として使用されている。この例をとればこの人工赤血球も患者の了解のもとに使用することも可能である。本稿ではこのような状況を想定してこの製品の臨床使用について以下の幾つかの視点から考えてみたい。

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 Matsushima, Ashiya, Hyogo 659-0053, Japan
Tel & Fax: 0797-22-2544 E-mail: mtakaoriashiya@azaq.jp
論文受付 2017 年 8 月 3 日 論文受理 2017 年 9 月 26 日

人工酸素運搬体投与の必要性

人工酸素運搬体の臨床使用が求められる場合は患者本人の酸素運搬体、すなわち赤血球が極度に少なくなり全身の臓器、組織が酸素不足に陥った状態である。

実際例としては外傷で大量の出血があり救急部は搬送されてきた患者、あるいは手術中に大量の出血に対してアルブミン、人工膠質液の投与により循環血液量は維持出来ても高度の貧血となっている場合である。Viel, Weiskopf¹⁾は宗教信条上の理由から輸血を拒否した症例で彼らのHb値が、2~5g/dlの症例ではその年齢にも関係するが60%が死亡し、5g/dl以上であった症例では全例が生きていると報告している。そしてこの報告にある最低2.0g/dl値についてはShanderら²⁾も危機的(critical)Hb値であると認めている。またCouldら³⁾⁴⁾は最低Hb値が3g/dlの症例を含む著しい低Hb症例にFDAが新薬として承認していない人工酸素運搬体、polymerized hemoglobin (Polyheme^{TR})を投与した場合、種々の死亡原因を含めてもその30日後の生存率は25%であったと報告している。すなわちこのような極度の低Hb症例には酸素運搬能を有する製品を患者に与えることが唯一の救命手段である。そのためもしもなんらかの理由で血液センターからの輸血用血液供給がただちに、推定で30~60分で得られない場合(註1)には上記の人工酸素運搬体の投与は救命の一助となろう。

(註1) 緊急手術の場合でそれに大量の出血が予想され、かつ対象患者が稀な血液型の持ち主であって、所轄の血液センター、あるいは我が国国内の血液センターから適合血液が入手できない場合にはO型血液で一時的に対処可能であるので対象から除外できると思われる。またこのような最低Hbレベルの持続時間と生命維持に関する具体的なデータを著者は得ていないが動物実験での心機能が悪化するデータ⁵⁾⁶⁾⁷⁾から推測すると30~60分と思われる。

患者、あるいはその親族への説明と承諾

厚生労働省の正式な許可なく行う医療行為、たとえば上述の癌免疫療法の例を取ればその施行に当り医師は患者にその治療法の効果、副作用などについて十分な説明を行い、書面として患者の承諾書を得ている。したがってこの例に従えば緊急手術であっても患者の意識があり、それなりの判断力があると判断され、術前に医師が患者に十分な説明を行い患者の承諾書を得れば厚生労働省の承認を得ていない人工酸素運搬体も使用可能となる。しかし患者が未成年者であり、上記の条件を満たさない場合が問題となる。たとえばある種の宗教信奉者の場合には親や親族の承諾では不十分とされる場合がある⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。同様な条件は患者が病的に、あるいは全身麻酔下にあり意識がなく、上記の説明と承諾(informed consent)が得られない場合にも発生する。ただ人工酸素運搬体の投与に関しては上記の宗教信奉者の場合とは異なり信条と云う精神的な要因がなく、担当医師の治療判断が中心となり親族への説明で人工酸素運搬体の投与は可能と考える。すなわち患者本人の自己判断を必要とする

場合に対して対象者の精神的な生活にも影響しないものであるために親族、家族、親権者への説明、そしてその承諾のみで許されるものとする。

これらの点については医療上の問題ではなく法的な問題であるので著者が個人的に相談が可能な弁護士各位に訊ねたところ総合的に以下のごとき指摘を得ることが出来た¹²⁾。

すなわち民法や刑法の観点からは患者自身の意志が明確に記載された書面があればそれに従った行為は処罰の対象とはならない。また判断能力を欠く未成年者であればその親権者の同意をもって患者の救命を目的とする未承認の医療行為が行われても処罰の対象とはならない。ただ注意すべきはその薬物の使用、医療行為がその時点で一般的に適切な医療行為と認定されている、あるいはされる必要があるとなる。

また当該医療機関の倫理委員会の承認をえること、少なくとも倫理委員会への緊急報告を行っておくことが必要である。

具体的な投与方法

大量出血が発生しても人工酸素運搬体を直ちに投与することは一般臨床の場ではありえない。まずは各施設内、あるいは近隣施設から供給されるアルブミン製剤、人工膠質液(デキストラン、ハイドロキシ澱粉製剤など)、新鮮凍結血漿が投与されるであろう。そして物理的手段、外科的止血法、あるいは局所圧迫法、または局所血流遮断法を行なわれるであろう。さらにこれらのすべての方法で効果が得られない場合にはpermissive hypotension¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾も選択されよう。しかし患者のHb値が5g/dl、あるいはそれ以下になった状態で、かつ輸血用血液の入手が30~60分以上となる場合には人工酸素運搬体の投与へ踏み切ることになるであろう。

臨床での出血症例の多くはすでにアルブミン、あるいは人工膠質液の投与を受けている。しかし現在我々が入手しうる人工酸素運搬体(liposome encapsulated hemoglobin)は生理食塩液に浮遊されたものであり、その投与は血漿膠質浸透圧の低下をもたらす。事実、過去の前臨床試験においてもこの人工酸素運搬体の投与は膠質液であるアルブミンの投与の併用により生体の血漿量、すなわち血液量を維持し循環動態の安定化を得ている¹⁶⁾¹⁷⁾。そのため必要とあれば患者血漿アルブミン値を測定の上で膠質液の投与が必要である。また出血機能の検査も必要である。すなわち人工酸素運搬体の使用量も希釈性出血傾向の発生に注意して¹⁸⁾、30ml/kgを越えないことに注意すべきである。

実地臨床での適応症例の発生頻度

上記の諸条件を考慮すれば実地臨床でこのような人工酸素運搬体を使用する可能性はある種の宗教信奉者症例を除き極めて少ないと思われる。術前から大量出血が予測される場合には適合血液の準備、それが不可能な場合にはO型赤血球製剤の使用、さらに貯血式・希釈式自己血で対処しうるし、手術中であれば回収式自己血輸血も施行しうる。一方、外傷に伴う出血に対して回収式自己血輸血は自己血輸血学会の指針では使用出来

ないが人命救済、緊急避難の原則に基付けば使用可能である。そして上記の特定宗教信奉者症例においても希釈式、回収式自己血輸血は認容されているのでこの人工酸素運搬体に依存する可能性が激減する。そのため対象者は結果的に特定宗教信奉者症例で上記の極度の低 Hb 値症例に限定されることとなる。すなわちその数は 24.2/10¹⁰ 例に 1 例 (※) 以下と予想される。

なお東宝塚さとう病院での 15 年間、56 例の輸血拒否手術症例では 8 例の死亡 (14%) を経験しているがそれらは心機能、あるいは大動脈の異常によるものであった。これら症例の手術中の最低 Hb 値は予定手術例で 6.6±1.6g/dl、緊急手術例で 5.1±1.2g/dl、術後の最低 Hb 値は前者で 7.2±1.9g/dl、後者で 6.3±1.2g/dl であって上記の危険レベルの Hb 値のために死亡したと思われる例はなかった。

(※) 福井ら¹⁹⁾の報告によれば、1985~1992 年、7 年間の手術症例で出血量 5,000ml 以上で術中の最低ヘマトクリット値が 10% 以下となった症例は全症例中 6 例 (0.15%) であった。したがってその後の手術手技の発達、止血技術の向上から Hb = 5g/dl 以下に達する頻度は全手術患者の 15/10⁴ 以下となる。一方、我が国の 1 億 3 千万人の人口中、輸血拒否を求める宗教信奉者数は約 21 万人である。したがってこの宗教信奉者を対象としても人工酸素運搬体の投与を必要とする手術患者は年間 15/10,000 × 21/13,000 = 24.2/10¹⁰ 例以下になる。

今後における人工酸素運搬体の開発と対応

上述のごとく人工酸素運搬体の実地臨床での使用が必要となる場合は極めて稀である。しかしその開発とその製品保有は必須である。それは悪性高熱治療におけるダントロレン、あるいは破傷風治療における抗血清のように使用頻度がいかに低いとは云っても我々医療界には不可欠なものである。そのため全国主要関係機関、たとえば赤十字基幹血液センターにその一定量を保管し必要時には出荷できるような体制を政府は取っておくべきであろう。今後、政府はこれらの製品、たとえば non-GMP レベルの製品でも orphan drug として緊急避難的に使用できるような体制を取るべきであろう。

一方、日本赤十字社が各医療機関に提供している輸血用血液は国民の善意によって提供されたものである。しかしその一部は使用有効期間を過ぎれば廃棄処分される。それをヘモグロビンベースの人工酸素運搬体、たとえば liposome encapsulated hemoglobin, hemoglobin-albumin cluster として活用することは国民の善意を生かす、有効利用法になる。ただ上述のごとくその量は限定されるので全ての廃棄血液の有効利用とはならないが少なくともその一部を活用することが出来る。このこともヘモグロビンベースの人工酸素運搬体作成、貯蔵は国策として必須である。

まとめ

現在我々が入手できる人工酸素運搬体を医師指導での臨床治

験として、あるいは人命救助の緊急避難的に使用する場合でも極めて限定された条件下に限定される。

すなわち

- 1) 急性出血により患者血液の Hb 値が 5g/dl 以下である。
- 2) いかなる血液の輸血も 30~60 分以内に行えない。
- 3) 患者自身、それが不可能な場合には患者親族の同意 (informed consent) が得られている。

である。

このような条件に該当する症例は我が国で年間に 1 例あるか無いかの状態かも知れない。しかし政府はその 1 例の命を守るための制度、人工酸素運搬体の全国基幹施設への配備を確立すべきと考える。

謝辞

本文中の東宝塚さとう病院における輸血拒否症例の手術予後のデータは同病院麻酔科安倍和夫先生のご厚意によるもので稿末ながら深甚の感謝を捧げる。

引用文献

1. Viel MK, Weiskopf RB. What can we learn about the need for transfusion from patients who refused blood? The experience with Jehovah's witness. *Transfusion* 1994; 34: 396-401.
2. Shander A, Javidroozi M, Naqvi S, Aregbeyen O, Caylan M, Demir S, Juhl A. An update on mortality and morbidity in patients with very low postoperative hemoglobin levels who decline blood transfusion. *Transfusion* 2014; 54: 2688-2695
3. Gould SA, Moore EE, Hoyt DB, Ness PM, Norris EJ, Carson JL, Hides GA, Freeman IH, DeWoskin R, Moss GS. The life-sustaining capacity of human polymerized hemoglobin when red cells might be unavailable. *J Am Coll Surgeons* 2002; 195: 445-452
4. Carson JL, Neveck H, Berlin JA, Gould SA. Mortality and morbidity in patients with very low postoperative Hb levels who decline blood transfusion. *Transfusion* 2002; 42: 812-818
5. 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
6. 高折益彦. 血液希釈. 循環制御 1990; 1: 93-106
7. 福井 明, 高折益彦. 自己血輸血における貧血認容限界—血液希釈の限界. *日本輸血学会雑誌* 1994; 40: 843-845
8. 日本医師会 (解説 吉田雅幸, 藍 真澄, 梶原道子). エホバの証人と輸血. *日本医師会報* 2010
9. 瀬尾憲正. 小児麻酔における輸血拒否: 「絶対的無輸血」から「相対的無輸血」へ. *日臨麻会誌* 2008; 28: 498-511
10. 朝日新聞社. 京大倫理委員会 エホバの証人 輸血拒否 未成年者も意志尊重. *朝日新聞* 5月27日 1995
11. Supreme Court of Canada. Appellant for children and their

- family. Document from Jehovah' Witness Medical Committee 2009
12. personal communication
 13. Sihler KC, Napolitano LM. Massive transfusion new insights. *Chest* 2009; 136: 1654-1667
 14. Li T, Lin XL, Zhu Y, Li LH, Liu LM. Short-term, mild hypothermia can increase the beneficial effect of permissive hypotension on uncontrolled hemorrhagic shock in rats. *Anesthesiology* 2012; 116: 1288-1298
 15. Peckham RM, Hndrigan MT, Bentley TB, Palabella MJ, Chrovian AD, Stahl GL, Tsokos GC. C5-blocking antibody reduces fluid requirements and improves responsiveness to fluid infusion in hemorrhagic shock managed with hypotensive resuscitation. *J Appl Physiol* 2007; 673-680,
 16. Sakai H, Horinouchiu H, Yamamoto M, Ikeda E, Takaoka S, Takaori M, Tsuchida E, Kobayashi K. Acute 40 % exchange-transfusion with Hb-vesicles (HbV) suspended in recombinant human serum albumin solution: Degradation of HbV and erythropoiesis in a rat spleen for 2 weeks. *Transfusion* 2006; 46: 339-347
 17. Nogami Y, Takase B, Kinoshita M, Shono S, Kaneda S, Tanaka Y, Kishimoto S, Hattori H, Ishihara M. Liposome-encapsulated hemoglobin attenuates cardiac dysfunction and systemic activity during hypohemoglobimic shock. *Shock* 2012; 38: 159-164
 18. 高折益彦. 人工酸素運搬体の適正粘度. *人工血液* 2016; 4: 56-62
 19. 福井 明, 木村健一, 藤田喜久, 高折益彦. 術中の極度の血液希釈からの回復. *日臨麻学誌* 1993; 3: 654-660

出血性ショックなどの重篤な生体侵襲時の免疫応答不全について —人工血液投与時に留意すべき点—

Immunosuppression Following Severe Surgical Stress by Hemorrhagic Shock, Focusing on Host Responses to Transfusion with Blood Substitutes

木下 学

Manabu Kinoshita

和文抄録

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への救命蘇生にこれらを輸血する場合が最も考えられる。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全く違う異物であり、従って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皮系により排除されてしまう。リポ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篤な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、著者ら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篤な侵襲が及ぼす影響を研究してきた。熱傷マウスでは受傷直後より IFN- γ 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。このように重篤な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的な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でも、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、将来、臨床で人工赤血球や人工血小板を投与する場合も、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。

Abstract

In the near future, substitutes of red blood cells (RBCs) or platelets will be transfused into the patients with hemorrhagic shock in order to rescue them from such a critical condition. These blood substitutes are distinct from nature RBCs or platelets, thereby eliminating from the bodies through the reticuloendothelial system, when the hosts have a normal immune function. However, once the hosts receive severe surgical stresses, such as hemorrhagic shock, multiple trauma, or burn injuries, their immune functions are markedly impaired. Not only cellular immunity but also humoral immunity simultaneously and critically dysfunction in the hosts suffering surgical stresses, leading them into comprehensive immunocompromised conditions. These immune dysfunctions may reflect clearance of blood substitutes in such immunocompromised hosts. We should be careful to such immunocompromised host-responses to blood substitutes, when we transfuse the blood substitutes into the patients with severe trauma hemorrhage.

Keywords

Immunosuppression, hemorrhagic shock, surgical stress, blood substitutes

防衛医科大学校 免疫・微生物学講座

〒359-8513 埼玉県所沢市並木3-2 Department of Immunology and Microbiology, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan.

Tel: +81-4-2995-1541; Fax: +81-4-2996-5194; E-mail: manabu@ndmc.ac.jp

はじめに

近い将来、ヒト臨床において人工赤血球や人工血小板が使用される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緊急に大量輸血する場合が最も考えられる。出血性ショックが単純に酸素運搬体である赤血球の物理的な減少によるだけの話であれば、人工の酸素運搬体でこれを補えば組織への酸素供給は維持でき、何の問題も起こらないはずである。しかしながら、ヒトをはじめとする哺乳類の生体応答は、我々の想像を超える複雑なものであり、実臨床で患者の救命救急に携わる臨床医であれば誰もがこれを経験的に肌で感じている。人工赤血球や人工血小板の開発に携わる研究者は、これらの人工物が生体の免疫系にどのような影響を与えるかだけでなく、これらを投与されるであろう出血性ショック患者がどのような免疫状態にあるかを正しく認識しておく必要があると考える。

生体侵襲とは

生体侵襲とは生体の恒常性を乱そうとする外部からの刺激である。大量出血や多発外傷、重度熱傷、外科手術といったものは物理的に外部から生体の恒常性を乱す「外科的な侵襲（外科侵襲）」と考えられる¹⁾。一方、近親者の死や大失恋などといった精神的に耐え難い苦痛も心理的側面から生体の恒常性を乱す点で侵襲と言える。このような生体の恒常性を乱す侵襲に対して、生体は必ず恒常性を保とうとする反応を起こす。これが生体防御応答であり、本応答には免疫系が深く関与している¹⁾(図1)。

生体防御応答の重要性

ショック状態に陥るような大量出血などの重篤な侵襲を被った病態では、生体は細胞性免疫や液性免疫が低下する複合的な免疫不全状態を呈することが分かりつつある^{1,2)}。一方、人工赤血球や人工血小板は当然ながら生体にとって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皮系によりこれらは容易に排除されてしまう。出血性ショック患者に人工血液を蘇生のために大量投与するといった状況は、ショックに伴う免疫不全状態と、このような病態に異物を大量投与するという免疫学的な刺激が複雑に絡み合う状態に生体をさらすことに他ならない(図2)。それゆえ、出血性ショックなどの重篤な侵襲を被った生体での生体防御応答を正しく理解することは人工血液を開発研究する上で重要と考えられる。

重度侵襲後の細胞性免疫不全

大量出血や多発外傷、重度熱傷、外科手術といった重度の外科侵襲では受傷直後ではなく、受傷後しばらくしてから(およそ1週間後)細胞性免疫が不全状態に陥るといった特徴がある^{2,3)}。著者らは細胞性免疫を司る最も代表的なサイトカインの1つである Interferon-gamma (IFN- γ) に着目し、胃癌手術後の末梢血単核球の IFN- γ 産生能を検討した³⁾。IFN- γ 産生能

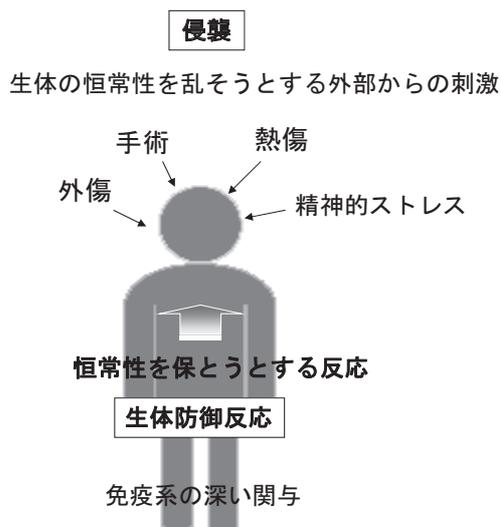


図1 生体侵襲と生体防御応答 文献1)より改



図2 出血性ショック時の人工血液投与による免疫状態

でみた細胞性免疫能は、術直後よりもむしろ5~7日後に最も低下し、その後回復していた(図3A, B)。これは生体の抵抗力と一致しているため、細胞性免疫能が最も低下する重急性期には術後感染を合併しやすく、術後患者の管理においてはこの時期が出血等の危険がある術直後と同様に注意を要する時期と考えられている¹⁾(図3C)。

侵襲後のマクロファージの貪食機能低下

侵襲後に細胞性免疫が不全状態に陥ると、マクロファージの貪食能や殺菌能が低下するが、著者らはこれを実験的に検討した⁴⁾。実験的な外科侵襲モデルとしては従来から熱傷モデルが頻用されているが、感染を伴わない出血性ショックや多発外傷、外科手術などの侵襲を被った生体では、熱傷を受傷した生体とほぼ同様な生体防御能の変化、すなわち免疫能の変化を来すとされている。通常は、無処置のマウスに大腸菌を静脈内投与すると、6時間後をピークに血中で IFN- γ が上昇し細胞性免疫が発動される(図4A)。この IFN- γ がマクロファージを活性化して貪食殺菌能を増強させ、菌の排除に働く。しかし、熱傷マウスでは IFN- γ の上昇が抑制され細胞性免疫応答が減弱し、マクロファージの貪食殺菌能が低下する^{1,4)}(図4A, B)。こ

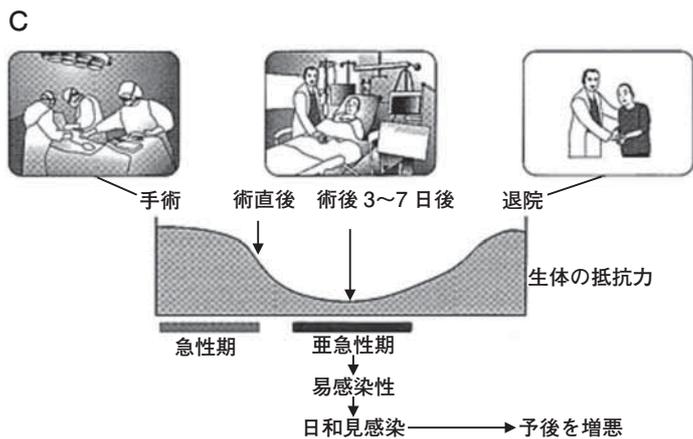
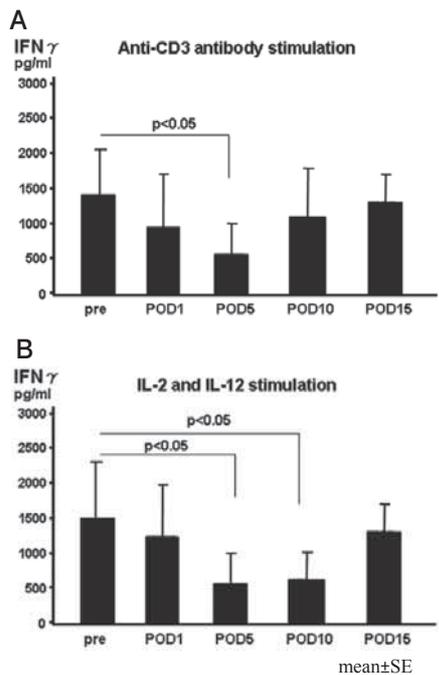


図3 外科手術とその後の細胞性免疫不全 文献1), 3) より

の結果、菌の排除がうまくいかず感染が増悪してしまう。重度の熱傷患者においても、このような感染の増悪はよく見受けられる。実際に熱傷患者の死亡例では、ほとんどが熱傷自体の侵襲ではなく、その後の敗血症で死に至っている⁵⁾。

侵襲後の肝臓での Natural Killer (NK) 細胞やクッパー細胞の機能低下

熱傷などの侵襲後に認められる IFN- γ 産生不全は、肝臓に多く存在する NK 細胞の IFN- γ 産生能の低下に因るところが大きい¹⁾(図5)。例えば、熱傷を施したマウスに IFN- γ 産生を強く誘導する Interleukin-18 (IL-18) などで NK 細胞の IFN- γ 産生を促すと、生体内で最も大量に存在するマクロファージである肝臓のクッパー細胞が貪食殺菌能を増し、熱傷で減弱した菌排除能を回復させることが出来る。この結果、マウスの実験モデルではあるが IL-18 の投与により熱傷後の感染予後を改善させることができた^{4,6)}(図6)。

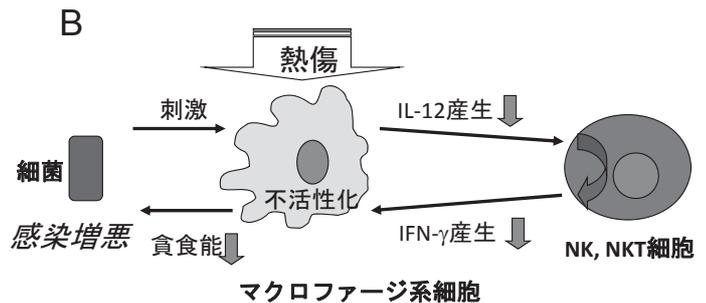
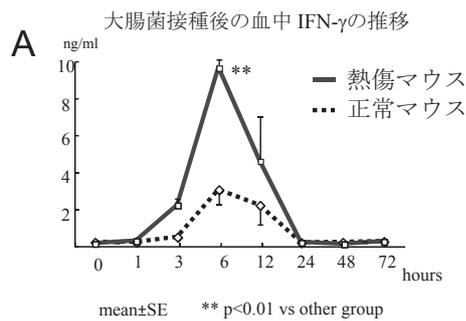


図4 熱傷後の IFN- γ 産生不全と貪食細胞機能低下 文献1), 4) より

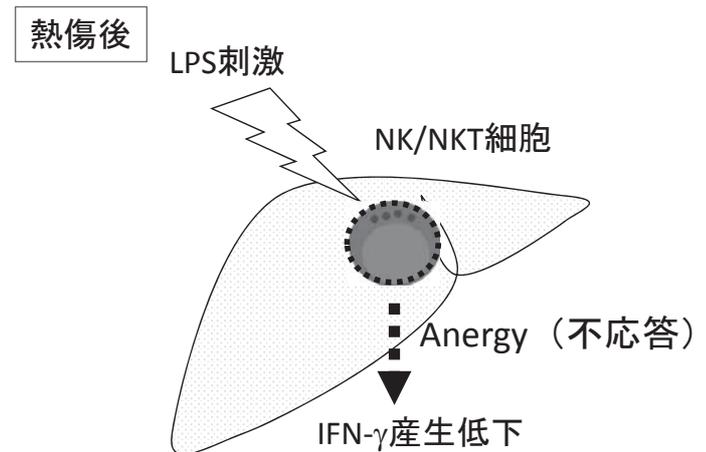


図5 熱傷後の肝臓での NK 細胞の IFN- γ 産生低下 文献1) より

侵襲後の液性免疫不全と好中球機能不全

生体では1つの機能が低下すると、これを代償するために他の機能が亢進・活性化することが多い。しかし、これはあくまで生体防御能が正常に働いている場合であり、侵襲後の生体では複数の生体防御機能が同時に低下してしまう状態となる²⁾。細胞性免疫と液性免疫は、Th1 (T helper 1) と Th2 (T helper 2) という互いに拮抗する2つの免疫反応によって誘導される。このため、感染初期には Th1 による細胞性免疫が発動し、マクロファージが殺菌貪食能を活性化させるが、生体では続いて Th2 反応が起こり、これは Th1 反応を抑制すると伴に液性免疫を活性化し、細菌抗原に特異的な抗体を大量に産生することで効率よく菌を排除することができる(図7)。ところが、重度熱傷や出血性ショックのような重篤な侵襲を被った生体では、本

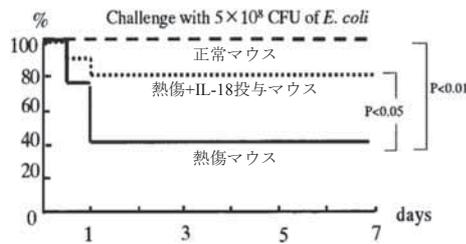
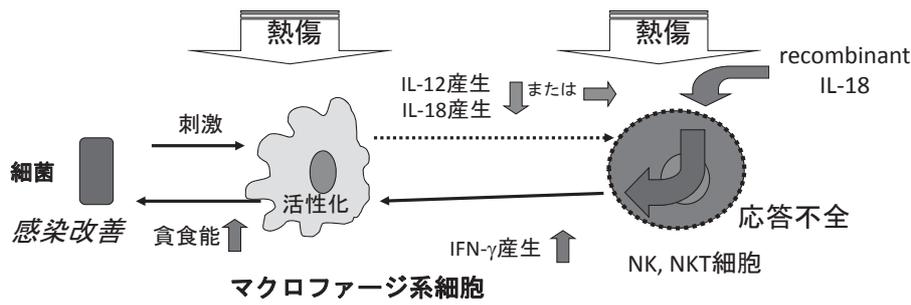


図6 熱傷後のIL-18投与による細胞性免疫賦活化と感染予後の改善 文献1), 4) より

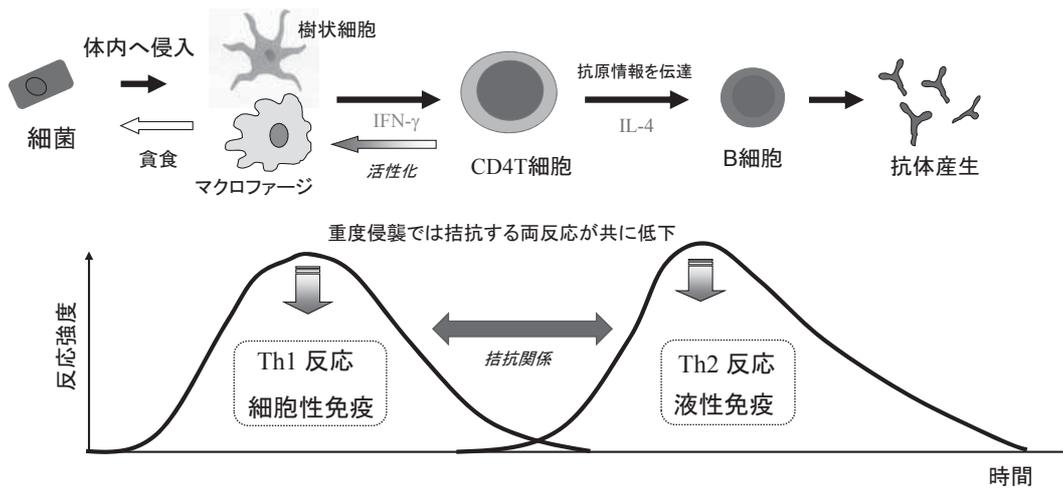


図7 細菌感染時のTh1反応とTh2反応

来互いに拮抗するはずの細胞性液性両免疫が同時に不全病態となる深刻な事態に陥ってしまう²⁾。さらには、異物の貪食処理に関してマクロファージと共に大きな役割を果たす好中球の機能も侵襲後は低下することが知られている^{2,7)}。このように侵襲を被ることで生体は幾重にも異物に対する防御能が破たんしていく状況に陥っていくと考えられる。

出血性ショック時の人工赤血球輸血と生体防御能

健常な実験動物に人工赤血球を大量投与すると細網内皮系での貪食処理が盛んに行われ、脾腫が生じる。また、肝臓ではクッパー細胞が著明に増加することから異物を盛んに貪食処理していることが伺える^{8,9)}。しかしながら、出血性ショックを来した生体では、前述のように異物に対する貪食処理能が低下するため、大量投与された人工赤血球はおそらくは細網内皮系

にトラップされることなく、健常な時より長く循環血中に留まっているのではないかと推察される。これは理論的には人工赤血球の寿命を延ばすことになるため、末梢組織への酸素運搬に支障を来している生体にとって有利に働くと期待される。しかしながら、本来の健常な生体であれば、異物であり貪食処理されるはずの物質が血中を漂っていることに何かしらの危険は生じないのであろうか。幸いにも、現在使用している人工赤血球ではその特性から血管内で溶血することはまず起こり得ないと言われている。さらに田口らは循環血液量の40%を脱血しショック状態とした後、人工赤血球を等量輸血したラットの出血性ショック蘇生モデルでは、人工赤血球の血中半減期に低下を認めなかったとの興味深い報告をしている¹⁰⁾。ただし、実際に人工赤血球の投与が予想される重度の外傷性出血によるショック状態では、生体侵襲の程度は実験的な血管内脱血によ

るショック病態より遥かに重篤であることが容易に想像される。重度侵襲時の生体内における人工赤血球の動態確認に関して今後さらに検討を重ねて行く必要があると考えている。酒井らは、フィルターによる膜ろ過の原理を用いた血中からの人工赤血球の安全な除去を報告している¹¹⁾。田口らは、先程と同様のラットの40%脱血と人工赤血球の等量輸血モデルで、通常の赤血球輸血と比べ人工赤血球の輸血では補体の活性化が認められたと別の論文で報告している¹²⁾。これは人工赤血球に対して生体が異物認識を正しく行ったことに他ならないが、ここでは活性化された補体が細菌の排除に貢献し、感染予後を改善したと報告している。このように液性免疫応答がある程度期待できるような生体防御能の状態であれば、人工赤血球がある種のimmuno-adjuvant的な効果を果たす可能性もあると考えられ注目される。しかしながら、液性免疫をも傷害するような重篤な侵襲を生体が被った時は、人工赤血球の輸血が感染時の生体防御システムの異物処理に更なる負担をかけるであろうことは想像に難くない。

おわりに

侵襲時の生体防御不全、すなわち免疫不全の現象は、日々これに遭遇している臨床医にとっては、ある意味、当然なものであるかも知れない。一方、臨床に直接携わる機会のない研究者、とくに工学系の研究者にとっては時に難解なものに映るかも知れない。しかし、人工血液を投与されるであろう出血性ショックを来した患者は、重篤な侵襲を被っている状態であり、侵襲後の免疫不全病態に陥っているはずである。冒頭にも述べたが、人工血液が惹起する免疫応答だけでなく、これを投与される患者自体の免疫状態を理解することは、今後、臨床治療へと進んでいく上でより一層重要になってくるであろうと考えられる。

本総説の内容は第23回日本血液代替物学会年次大会での大会長講演を基に執筆した。

参考文献

1. 木下 学. 組織傷害と免疫. 関 修司, 阿保 徹編. 病態のしくみがわかる免疫学. 東京: 医学書院, 2010; 208-217.
2. Kinoshita M, Miyazaki H, Ono S, Seki S. Immunoenhancing therapy with interleukin-18 against bacterial infection in immunocompromised hosts after severe surgical stress. *J Leukocyte Biol* 2013; 93: 689-698.
3. Hiraki S, Ono S, Kinoshita M, Tsujimoto H, Seki S, Mochizuki

- H. Interleukin-18 restores immune suppression in patients with nonseptic surgery, but not with sepsis. *Am J Surg* 2007; 193: 676-680.
4. Kinoshita M, Seki S, Ono S, Shinomiya N, Hiraide H. Paradoxical effect of IL-18 therapy on the severe and mild *Escherichia coli* infections in burn-injured mice. *Ann Surg* 2004; 240: 313-320.
5. Stone H. Review of pseudomonas sepsis in thermal burns: Verdoglobulin determination and gentamicin therapy. *Ann Surg* 1966; 163: 297-305.
6. Miyazaki H, Kinoshita M, Ono S, Nakashima M, Hara E, Ohno H, Seki S, Saitoh D. Augmented bacterial elimination by Kupffer cells after IL-18 pretreatment via IFN-gamma produced from NK cells in burn-injured mice. *BURNS* 2011; 37: 1208-1215.
7. Kinoshita M, Miyazaki H, Ono S, Inatsu A, Nakashima H, Tsujimoto H, Shinomiya N, Saitoh D, Seki S. Enhancement of neutrophil function by IL-18 therapy protects burn-injured mice from MRSA infection. *Infect Immun* 2011; 79: 2670-80.
8. Nogami Y, Kinoshita M, Takase B, Ogata Y, Saitoh D, Kikuchi M, Ishihara M, Maehara T. Liposome-encapsulated hemoglobin transfusion rescues rats undergoing progressive hemodilution from lethal organ hypoxia without scavenging nitric oxide. *Ann Surg* 2008; 248: 310-319.
9. Sakai H. Overview of potential clinical applications of hemoglobin vesicles (HbV) as artificial red cells, evidenced by preclinical studies of the academic research consortium. *J Funct Biomater*. 2017; 8: e10
10. Taguchi K, Maruyama T, Iwao Y, sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Tsuchida E, Kai T, Otagiri M. Pharmacokinetics of single and repeated injection of hemoglobin-vesicles in hemorrhagic shock rat model. *J Control Release* 2009; 136: 232-9.
11. Sakai H, Sou K, Horinouchi H, Tsuchida E, Kobayashi K. Removal of cellular-type hemoglobin-based oxygen carrier (Hemoglobin-Vesicles) from blood using centrifugation and ultrafiltration. *Artif Organs* 2012; 36: 202-9.
12. Taguchi K, Ogaki S, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Maruyama T, Otagiri M. Fluid resuscitation with hemoglobin vesicles prevents *Escherichia coli* growth via complement activation in a hemorrhagic shock rat model. *J Pharmacol Exp Therap* 2011; 337: 201-8.

日本血液代替物学会 総会

- | | |
|---|---|
| <p>1. 日 時：
平成28年11月24日（木）12：40～</p> <p>2. 場 所：
早稲田大学 西早稲田キャンパス
〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-4</p> | <p>3. 議 題：① 第23回年次大会の報告
② 会員動向
③ 平成27年度事業報告
④ 平成27年度会計報告
⑤ 平成28年度事業計画（経過報告）</p> |
|---|---|

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23回日本血液代替物学会年次大会
(大会長 木下 学)
- 2) 開催年月日 平成28年11月24日（木）・25日（金）
- 3) 開催場所 早稲田大学 西早稲田キャンパス
- 4) 参加範囲 日本血液代替物学会会員、臨床医学・理工学
研究者、国内の大学および医療機関臨床医、
血液センター関係者

② 会員状況は以下の通り

- 1) 施設会員：3社
- 2) 正会員：70名
- 3) 購読会員：3箇所

③ 平成27年度事業報告（平成27年4月1日～平成28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27年10月22日（木）熊本大学薬学部にて開催
- 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

④ 平成27年度収支決算報告が行なわれ承認された。

平成27年度会計報告
収支決算表
(自 平成27年4月1日 至 平成28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	7,365,209	会誌出版費	366,395
正会員会費	420,000	集会・委員会費	479,689
施設会員会費	600,000	年会補助金	517,012
購読会員会費	9,000	ホームページ維持費	324,000
学生会員会費	0	謝 金	280,500
雑 収 入	25,296	事務費(消耗費)	33,761
利 息	3,183	事務費(通信費)	12,470
		雑 役 務 費	4,976
		次期繰越金	6,403,885
計	8,422,688	計	8,422,688

⑤ 平成28年度事業計画（経過報告）（平成28年4月1日～平成29年3月31日）

- 1) 定期総会の開催
平成28年11月24日（木）12：40～
於 早稲田大学 西早稲田キャンパス
- 2) 第23回年次大会の開催（大会長：木下 学）
平成28年11月24日（木）・25日（金）
於 早稲田大学 西早稲田キャンパス
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第24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, μ m, L, mL, μ L, mol, g, mg, μ g, ng, pg, fg, N/10.

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

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

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

References to electronic sources should be given as follows:

Name of website.

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

Examples:

1. Wong NS, Chang TM. Polyhemoglobin-fibrinogen: a novel oxygen carrier with platelet-like properties in a hemodiluted setting. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007; 35: 481-489.
2. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *J Am Med Assoc* 2008; 299: 2304-2312.
3. Sakai H, Sou K, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin vesicles as a Molecular Assembly. Characteristics of Preparation Process and Performances or Artificial Oxygen Carriers. In: Winslow RM, ed. *Blood Substitutes*. London: Academic Press (Elsevier), 2006; 514-522.
4. Department of Chemistry, Nara Medical University, Japan. http://www.naramed-u.ac.jp/~chem/ENGLISH_PAGE/e_invest_blood.html (last accessed Nov. 2013)

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

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

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

16) Address for manuscripts to be sent:

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

投稿規定（平成25年11月20日改訂）

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

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

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

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

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

ii) ハードコピー4部を郵送する。

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

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

4) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著

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

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

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

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

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

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

9) 句読点はコンマ（,）ピリオド（.）とする。

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

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

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

13) 文献：本文に引用した順序に番号を付け、文中では²⁾, ³⁵⁾, ^{1, 46)}などとする。文献の記載法はthe Vancouver styleに従う。全著者名。論文題名。誌名 西暦発行年；巻数：頁～頁。とし、誌名の省略は医学中央雑誌またはIndex Medicusに準拠する。単行本の場合は全著者名。題名。編集者名。書名。発行地：発行書店、年号；頁～頁。の順とする。電子文献の場合は、ホームページ名。改行してアドレス（引用した西暦年月）とする。

(例)

1. 高折益彦. 人工酸素運搬体:その将来への期待. 人工血液 2007;15:90-98.
2. 橋本正晴. 単回投与毒性試験. 野村 護, 堀井郁夫, 吉田武美編. 非臨床試験マニュアル. 東京: エルアイシー, 2001;37-48.
3. Wong NS, Chang TM. Polyhemoglobin-fibrinogen: a novel oxygen carrier with platelet-like properties in a hemodiluted setting. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007; 35: 481-489.
4. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *J Am Med Assoc* 2008; 299: 2304-2312.
4. Sakai H, Sou K, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin vesicles as a Molecular Assembly. Characteristics of Preparation Process and Performances or Artificial Oxygen Carriers. In: Winslow RM, ed. *Blood Substitutes*. London: Academic Press (Elsevier), 2006; 514-522.
5. Department of Chemistry, Nara Medical University, Japan. http://www.naramed-u.ac.jp/~chem/ENGLISH_PAGE/e_invest_blood.html (last accessed Nov. 2013)

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

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

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

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

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

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

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

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

18) 原稿の送付先

〒634-8521

奈良県橿原市四条町840

奈良県立医科大学化学教室内

「人工血液」編集委員長 酒井宏水 宛

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

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@narmed-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@narmed-u.ac.jp

「熊本から世界へ」
健やかな未来をつくる

私たちは、ワクチンや血漿分画製剤などの
生物学的医薬品を、ここ熊本の地で
研究、製造、販売する「製薬企業」です。



健やかな未来をつくる



〒860-8568 熊本市北区大窪一丁目6番1号
<http://www.kaketsuken.or.jp>

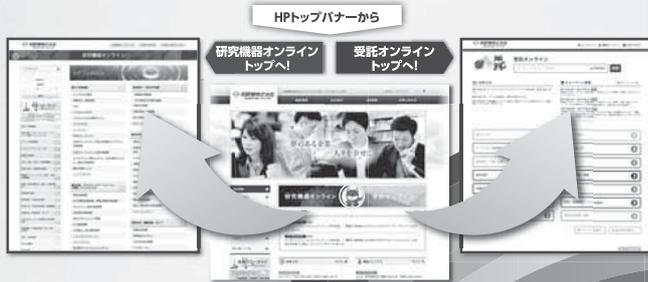
かけつけん 検索

あなたの研究をお手伝いします!

気になる
ワードで検索!

「研究機器オンライン」に続き
「受託オンライン」をオープン!!

製品情報の充実
随時、追加・更新を
行っております。



HPトップバナーから

研究機器オンライン
トップへ!

受託オンライン
トップへ!

HPトップから
一目でラクラク
検索だワン!



- 研究機器オンラインの特徴
- 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に!
 - あのメーカーの製品を
 - .. フリーワード検索やメーカーの絞り込み検索も可能!

- 受託オンラインの特徴
- 遺伝子発現解析や抗体作製からスクリーニング、
標本作製まで幅広い受託サービスを掲載。
 - 研究用途から受託サービス検索
 - .. 遺伝子工学、シーケンス解析、タンパク質工学などの
カテゴリー検索!
 - キャンペーン情報の確認も可能
 - あのメーカーの受託サービスを
 - .. フリーワード検索やメーカーの絞り込み検索も可能!

 **和研薬株式会社**
WAKENYAKU CO., LTD.

和研薬の研究機器オンライン・受託オンラインは、
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

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



和研薬ホームページ



鈴木科学薬品株式会社

一般試薬・工業薬品・高純度試薬・理化学機器・産業廃棄物収集運搬業（東京・神奈川）

< 取扱い試薬メーカー >

関東化学、純正化学、国産化学、東京化成、和光純薬、ナカライ、アクロス、メルク、アルドリッチ、タカラバイオ、フルカ、フナコシ、コスモバイオ、レアメタ、その他各社

< 取扱い理化学機器メーカー >

旭テクノ(イワキ)、柴田、アズワン、TGK、アルバック機工、その他各社

〒101-0036

東京都千代田区神田北乗物町18番地1 SKYビル1階

TEL 03-3258-6961 FAX 03-3258-6962

E-mail : suzukikagaku@dream.com

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.25(1) 2017年11月30日発行

〒162-8480 東京都新宿区若松町2-2 Twins 2F
早稲田大学先進理工学部生命医科学専攻
生体分子集合科学／ナノ医工学研究室内
TEL & FAX (03) 5369-7324

〒634-8521 奈良県橿原市四条町840
奈良県立医科大学化学教室内
TEL & FAX (0744) 29-8810

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7
TEL (03) 3265-8961 FAX (03) 3264-1995

日本血液代替物学会
<http://www.blood-sub.jp/>