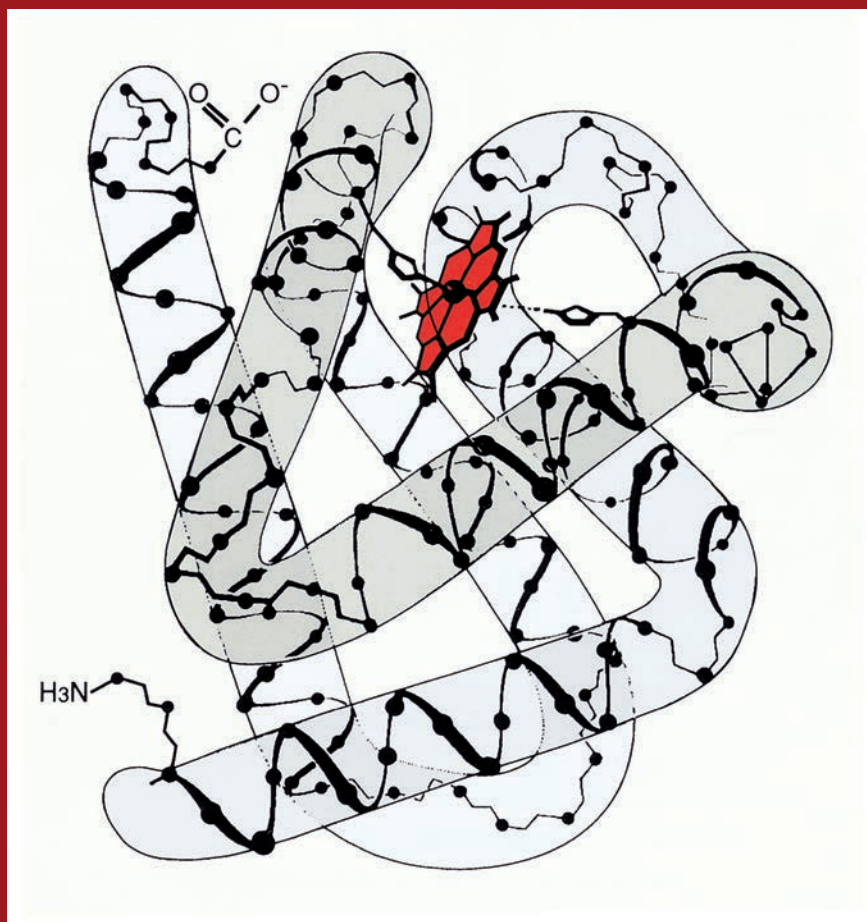


人工血液

VOLUME 29
NUMBER 1
2021

日本血液代替物学会 会誌

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



第28回年次大会プログラム

原著: Applicability of Hemoglobin Vesicles as Transplantable Liver Perfusion Preservation Solution

トピックス: 超分子重合を利用した人工酸素運搬体の構築

トピックス: 一酸化炭素製剤開発の最前線

事務局たより

The 28th Annual Meeting Program

Original Article:
Applicability of Hemoglobin Vesicles as Transplantable Liver Perfusion Preservation Solution

Topics:
Construction of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers Using Supramolecular Polymerization

Topics:
The Cutting Edge of The Development of Carbon Monoxide Therapeutic Modality

Artificial Blood

The Society of Blood Substitutes, Japan

血液ガス分析装置

ラピッドポイント500

Advance your blood gas testing with trusted technology that's easy to use.

www.siemens-healthineers.com/jp



ラピッドポイント500なら、臨床と検査室 両方の要求にお応えします。

簡単で使いやすい装置をお求めですか？

迅速な結果報告をお求めですか？

効率的な精度管理をお求めですか？

血液ガス分析装置ラピッドポイント500なら、応えられます。

臨床も検査室も。この1台で。

SIEMENS
Healthineers

人工血液

第29巻 第1号 2021年9月

第28回年次大会プログラム

大会長挨拶	3
大会日程表	6
プログラム	7
抄録	10

原著：*Applicability of Hemoglobin Vesicles as Transplantable Liver Perfusion Preservation Solution* 岩田 浩義 他 43

トピックス：超分子重合を利用した人工酸素運搬体の構築 松平 崇 他 50

トピックス：一酸化炭素製剤開発の最前線 田口 和明 他 57

事務局たより

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 29 No. 1 September, 2021

The 28th Annual Meeting Program

<i>Address from the President</i>	3
<i>Schedule</i>	6
<i>Program</i>	7
<i>Abstracts</i>	10

Original Article: Applicability of Hemoglobin Vesicles as Transplantable Liver Perfusion Preservation Solution

..... *Hiroyoshi Iwata, et al.* 43

Topics: Construction of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers Using

Supramolecular Polymerization *Takashi Matsuhira, et al.* 50

Topics: The Cutting Edge of The Development of Carbon Monoxide

Therapeutic Modality *Kazuaki Taguchi, et al.* 57

第28回日本血液代替物学会年次大会

The 28th Annual Meeting of the Society of Blood Substitutes, Japan

『血液代替物研究の未来図 ～ウィズコロナ・ポストコロナ時代に向けて～』

大会長：田口 和明（慶應義塾大学）

会 期：2021年10月14日（木）・15日（金）

【年次大会事務局】

慶應義塾大学薬学部薬効解析学講座内
〒105-8512 東京都港区芝公園 1-5-30
TEL/FAX：03-5400-2656

大会長挨拶

第28回日本血液代替物学会を開催させて頂くことになりました。新型コロナウイルス（COVID-19）感染の収束が見通せないことから、昨年につき本年度も Web での開催となります。

2020年は、国内初の人工赤血球製剤の治験として「輸血代替として用いるヘモグロビンベシクル製剤NMU-HbVの健康成人男性を対象とした第I相安全性試験 [jRCT2011200004]」が開始され、Made in Japanの人工血液の実現に向けた飛躍的な1年となりました。このような背景から、今後の人工血液の研究・開発ロードマップを討議すべく、第28回年次大会では「血液代替物研究の未来図 ～ウィズコロナ・ポストコロナ時代に向けて～」を大会テーマとさせていただきました。特別講演には、腸内細菌叢の基礎・臨床研究を幅広く展開されている長谷耕二教授（慶應義塾大学）と核磁気共鳴法やX線結晶解析などの解析手法を駆使することによりタンパク質の機能を明らかにされている大澤匡範教授（慶應義塾大学）の2人の著名な先生方をお招きし、最先端の研究成果についてご講演を賜ります。また、シンポジウムでは、「備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤の開発状況」と「実用化が近づく人工血小板」を企画し、人工赤血球と人工血小板の研究・開発の進展と展望の活発な議論の場にしたいと考えております。さらに、新しい概念や戦略により創薬研究を取り上げた「バイオミメティック製剤研究の新展開」、「生理活性ガス分子の創薬イノベーション」の2つの特別シンポジウムを開催します。

終わりに、ご多忙の中、特別講演やシンポジウムのご講演をご快諾いただきました先生方、またオーガナイザーの諸先生方に心より御礼申し上げます。Web開催になりますが、参加者各位の活発な議論により本大会が実り多きものになることを祈念いたします。

第28回 日本血液代替物学会年次大会
大会長 田口 和明
(慶應義塾大学薬学部薬効解析学講座)

お知らせとお願い

■会員・参加者の皆様へ

○参加方法

本年次大会はオンライン（ライブ配信）開催となります。

そのため、本年次大会の参加には参加登録が必須となります。本年次大会のHPよりダウンロードした参加登録用紙に必要事項を記載し、参加登録をお願いいたします。

また、以下の点を遵守いただきますようお願いいたします。

- ・ログイン情報を第三者に教えたり、SNS等で公開しないようお願いいたします。
- ・本年次大会中の発表内容のスクリーンショット、録音・録画などは一切禁止します。
- ・Zoomにログイン後に、表示名を「所属・お名前（フルネーム）」に変更をお願いします。

○参加登録受付期間

2021年10月12日（火）17：00まで（受付期間以降の登録はできません）

○参加登録

〈参加登録方法〉

本年次大会のHPよりダウンロードした参加登録用紙に必要事項を記載し、運営事務局にメール（28sbsj2021@gmail.com）にて送付ください。

〈参加登録費〉

一般：10,000円、学生：3,000円

※事前参加登録のみとなります。

※参加登録費は、学会事務局の指定口座への振り込みのみの決済となります。

※参加登録費の入金確認後、領収書、年次大会参加用のIDとパスワードを発行いたします。

○入会受付

入会を希望される方は、日本血液代替物学会ホームページの入会お申込みフォーム（<https://www.blood-sub.jp/nyuukainituite.php>）より、オンラインにてお申込み下さい。

※入会が承認されましたら、事務局より書類を送付しますので、入会金5000円と共に所定の年会費をお支払い願います。会費は、正会員10,000円、学生会員5,000円です。

○年次大会予稿集

第28回年次大会予稿集は、会員全員及び発表者の方に事前送付いたします。追加購入を希望される方には、一部1,500円で販売致しますので運営事務局（28sbsj2021@gmail.com）までお問い合わせください。

■座長・演者へのお願い

1. セッション参加方法

- ・任意の場所より、ご自身のPCでZoom（WEB会議システム）を使用してセッションに参加いただきます。
- ・ご参加いただくセッションのZoomのURLは、個別にメールでご案内しますので、当日はそちらからご参加ください。接続回線数に上限があります。お一人当たり1つのデバイスより接続をお願いいたします。
- ・インターネットにつながる通信環境がよい場所でご参加ください。
- ・極力静かな場所で雑音が入らないようお願いいたします。
- ・お持ちのPCにカメラ、スピーカー、マイクが付属されているかご確認ください。可能な限り、マイク付きイヤホンやヘッドセットマイクなどをご使用ください。
- ・ご参加の際は、カメラとオーディオを必ずオフとし、質疑応答などの発言をする際にはカメラとオーディオをオンにしてください。

2. 発表者の方へ

- ・発表内容は、PowerPoint を使用してご用意下さい。画面比率は 16 : 9、4 : 3 どちらでも結構です。
- ・発表時間を厳守していただき、プログラムのスムーズな進行にご協力をお願いします。
- ・作成した発表データをご自身が画面共有し、ご自身でスライドを進行いただくようになります。
- ・発表及び質疑応答の際は、オーディオをオンにしてください。
- ・動画ファイルをご使用される場合は、事前接続確認時に再生できるか必ずご確認下さい。
- ・発表 15 分前には、Zoom URL に接続をお願いいたします。

3. 座長の方へ

- ・演者の発表中は、カメラとオーディオをオフにしてください。
- ・ご発言の際は、カメラをオンにしてください。
- ・ご担当されるセッション開始時間の 15 分前には、Zoom URL に接続をお願いいたします。

4. 質疑応答

質疑はマイクを通じて発言いただきます。Zoom の挙手のボタンを押し、座長に指定された場合はミュートを解除してご発言ください（できればカメラも ON）。指定されていない方のマイクとカメラの使用はお断りします。

■講演発表時間

特別講演 50 分

シンポジウム講演各オーガナイザーに一任

一般演題 12 分（質疑応答も含む）

※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。

■優秀発表賞

本年次大会では、発表演題（筆頭発表者が大学院生または学部生）の中から最優秀演題 1 題、優秀演題 3 題を顕彰します。

選考方法：審査委員の審査結果をもとに選考・決定する。

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

授 与：賞状を授与する。

※受賞者は閉式の際に発表する。

■各種会議日程

総会：2021 年 10 月 14 日（木）12 : 30～12 : 40 ※ Zoom にて開催

■大会事務局

慶應義塾大学薬学部薬効解析学講座内

〒105-8512 東京都港区芝公園 1-5-30

TEL/FAX 03-5400-2656

28sbsj2021@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 <https://www.blood-sub.jp/kaikoku.php>

大会日程表

2021年10月14日(木)		2021年10月15日(金)	
8:00			
8:20	開場	8:30	開場
8:50	開会の辞		
9:00	9:00~11:00 シンポジウム1 「備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤の開発状況」 座長：酒井 宏水(奈良県立医科大学) 演者1：酒井 宏水(奈良県立医科大学) 演者2：東 寛(旭川医科大学) 演者3：萩沢 康介(防衛医科大学校) 演者4：大岩 加奈(東海大学) 演者5：岩田 浩義(旭川医科大学) 演者6：力久 直昭(おゆみの中央病院)	9:00~10:12	一般演題3 座長：北岸 宏亮(同志社大学) 演者1：臼井 朝音(中央大学) 演者2：安田 健吾(熊本大学) 演者3：橋本 麻衣(崇城大学) 演者4：北岸 宏亮(同志社大学) 演者5：三柴 智英(東京女子医科大学・早稲田大学) 演者6：傅 曉廷(東京大学)
9:30			
10:00		10:20~11:35	シンポジウム3 「バイオミメティック製剤研究の新展開」 座長：田口 和明(慶應義塾大学) 演者1：前田 仁志(熊本大学) 演者2：小出 裕之(静岡県立大学) 演者3：福田 達也(和歌山県立医科大学)
10:30			
11:00	11:15~12:15 一般演題1 座長：松平 崇(奈良県医科大学) 演者1：小野沢博登(東海大学) 演者2：渡部 佑樹(慶應義塾大学) 演者3：鈴木 悠斗(慶應義塾大学) 演者4：久禮 智子(奈良県立医科大学) 演者5：羽生 聡美(慶應義塾大学)		
11:30			
12:00			
12:30	12:30~12:40 総会		
13:00	13:00~13:50 特別講演1 「腸内共生と免疫」 座長：登美 斉俊(慶應義塾大学) 演者：長谷 耕二(慶應義塾大学)	13:00~13:50	特別講演2 「電位依存性K ⁺ チャネルの動作メカニズムとペプチドによる阻害メカニズム」 座長：花岡健二郎(慶應義塾大学) 演者：大澤 匡範(慶應義塾大学)
13:30			
14:00	14:10~15:25 シンポジウム2 「生理活性ガス分子の創薬イノベーション」 座長：田口 和明(慶應義塾大学) 演者1：異島 優(徳島大学) 演者2：本間康一郎(慶應義塾大学) 演者3：田口 和明(慶應義塾大学)	14:10~15:10	シンポジウム4 「実用化が近づく人工血小板」 座長：武岡 真司(早稲田大学) 木下 学(防衛医科大学校) 演者1：武岡 真司(早稲田大学) 演者2：金子 恒樹(埼玉医科大学) 演者3：萩沢 康介(防衛医科大学校) 演者4：松原由美子(慶應義塾大学)
14:30			
15:00		15:15	閉会の辞
15:30	15:45~16:45 一般演題2 座長：萩沢 康介(防衛医科大学校) 演者1：高瀬 凡平(防衛医科大学校/人間ハート病院) 演者2：岡本 航(中央大学) 演者3：長谷川 舞(中央大学) 演者4：松平 崇(奈良県立医科大学) 演者5：野口 勇夢(熊本大学)		
16:00			
16:30			
17:00			
17:30			

第1日目 2021年10月14日(木)

8:50~9:00 開会の辞

9:00~11:00 シンポジウム1「備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤の開発状況」

座長：酒井 宏水（奈良県立医科大学医学部化学教室）

SY1-1「人工赤血球（ヘモグロビン ベシクル）製剤の治験薬 GMP 製造」

酒井 宏水（奈良県立医科大学医学部化学教室）

SY1-2「人工赤血球（ヘモグロビン ベシクル）製剤の治験（First-in-human）の進捗状況について」

東 寛（旭川医科大学小児科学）

SY1-3「産科危機的出血モデルに対する人工酸素運搬体 HbV の効果」

萩沢 康介（防衛医科大学校生理学講座）

SY1-4「イヌ肺切除術後 30%出血モデルを用いたヘモグロビン小胞体投与の有効性の組織学的評価」

大岩 加奈（東海大学医学部外科学系呼吸器外科学）

SY1-5「HbV を用いた臓器保存技術の可能性」

岩田 浩義（旭川医科大学植医工学治療開発講座／肝胆膵移植外科）

SY1-6「光治療とヘモグロビン小胞体」

力久 直昭（おゆみの中央病院）

11:15~12:15 一般演題1

座長：松平 崇（奈良県立医科大学医学部化学教室）

O1-1「マウス気管移植モデルにおける上皮血管へのヘモグロビン小胞体による早期再灌流」

小野沢博登（東海大学医学部外科学系呼吸器外科学）

O1-2「一酸化炭素結合型ヘモグロビン小胞体の急性呼吸窮迫症候群に対する有用性評価」

渡部 佑樹（慶應義塾大学薬学部薬効解析学講座）

O1-3「メトヘモグロビン内包リポソームの長期安定性評価」

鈴木 悠斗（慶應義塾大学薬学部薬効解析学講座）

O1-4「メトヘモグロビン小胞体（metHbV）のシアン化物イオン（CN⁻）との結合挙動の解析」

久禮 智子（奈良県立医科大学医学部化学教室）

O1-5「メトヘモグロビン内包リポソームの新規アジド中毒解毒剤としての有効性評価」

羽生 聡美（慶應義塾大学薬学部薬効解析学講座）

12:30~12:40 総会

13:00~13:50 特別講演1

「腸内共生と免疫」

座長：登美 斉俊（慶應義塾大学薬学部薬剤学講座）

演者：長谷 耕二（慶應義塾大学薬学部生化学講座）

14:10~15:25 シンポジウム2

「生理活性ガス分子の創薬イノベーション」

座長：田口 和明（慶應義塾大学薬学部薬効解析学講座）

SY2-1「活性硫黄化が織りなすタンパク質の新たな生体防御機構」

異島 優（徳島大学大学院医歯薬学研究所）

SY2-2「水素ガス吸入療法の将来性」

本間康一郎（慶應義塾大学医学部救急医学／慶應義塾大学水素ガス治療開発センター）

SY2-3「ヘモグロビンを用いた一酸化炭素製剤の開発」

田口 和明（慶應義塾大学薬学部薬効解析学講座）

15:45~16:45 一般演題 2

座長：萩沢 康介（防衛医科大学校生理学講座）

- O2-1 「人工酸素運搬体（HbV）の重症出血性ショックモデル（85%血液交換）における慢性期抗不整脈効果；
Optical Mapping・心拍変動解析による検討」
高瀬 凡平（防衛医科大学校集中治療部／入間ハート病院）
- O2-2 「HemoAct™の安全性・有効性評価（50%出血性ショックラットの蘇生試験）」
岡本 航（中央大学理工学部）
- O2-3 「抗酸化能を有するストロマフリーヘモグロビンナノ粒子（SFHbNP）の合成」
長谷川 舞（中央大学理工学部）
- O2-4 「四分岐 PEG を用いたヘモグロビンハイドロゲルの構築」
松平 崇（奈良県立医科大学医学部化学教室）
- O2-5 「肝再生不全に対する一酸化炭素搭載型細胞療法の再生促進効果」
野口 勇夢（熊本大学薬学部薬剤学分野）

第2日目 2021年10月15日(金)

9:00~10:00 一般演題3

座長：北岸 宏亮 (同志社大学理工学部)

O3-1 「動物用人工血漿増量剤としてのポリオキサゾリン修飾血清アルブミン (Aloxa™) の合成」

臼井 朝音 (中央大学理工学部)

O3-2 「アルブミンを用いたエダラボンナノ DDS 戦略の構築と肝疾患治療への応用」

安田 健吾 (熊本大学薬学部薬剤学分野)

O3-3 「血小板代替リポソーム投与後の肝チトクローム P450 プロファイルの定量的および定性的評価」

橋本 麻衣 (崇城大学薬学部)

O3-4 「ポルフィリン鉄錯体とシクロデキストリン二量体から構成される人工ヘモグロビンの構築と生体内ガスの吸着試薬としての利用」

北岸 宏亮 (同志社大学理工学部)

O3-5 「COVID-19 感染拡大下での赤血球製剤の献血および医療機関への供給の実態に関する研究」

三柴 智英 (東京女子医科大学・早稲田大学 共同先端生命医科学専攻)

O3-6 「Development of bioinspired perfluorocarbon-based oxygen carriers with concave shape and deformable shell」

Xiaoting Fu (Departemnt of Bioengineering, The University of Tokyo)

10:20~11:35 シンポジウム3

「バイオミメティック製剤研究の新展開」

座長：田口 和明 (慶應義塾大学薬学部薬効解析学講座)

SY3-1 「がん間質細胞を標的とする DDS 担体の開発」

前田 仁志 (熊本大学薬学部薬剤学分野)

SY3-2 「血液中で標的分子を吸着して中和する多官能性リポソームの開発」

小出 裕之 (静岡県立大学薬学部医薬生命化学教室)

SY3-3 「白血球・細胞外小胞の特性を模倣した生体膜模倣微粒子の開発」

福田 達也 (和歌山県立医科大学薬学部薬剤学研究室)

13:00~13:50 特別講演2

「電位依存性 K⁺チャネルの動作メカニズムとペプチドによる阻害メカニズム」

座長：花岡健二郎 (慶應義塾大学薬学部創薬分析化学講座)

演者：大澤 匡範 (慶應義塾大学薬学部生命機能物理学講座)

14:10~15:10 シンポジウム4

「実用化が近づく人工血小板」

座長：武岡 真司 (早稲田大学理工学術院)

木下 学 (防衛医科大学校免疫微生物学講座)

SY4-0 「人工血小板 (H12-(ADP)リポソーム) の解説」

武岡 真司 (早稲田大学理工学術院)

SY4-1 「家兔における羊水塞栓症・産科出血モデルの開発と H12ADP リポソームの効果」

金子 恒樹 (埼玉医科大学総合医療センター産科麻酔科)

SY4-2 「エンドトキシン血症時の凝固障害に対する H12ADP リポソーム投与効果の検討」

萩沢 康介 (防衛医科大学校生理学講座)

SY4-3 「間葉系幹細胞から製造する血小板：メカニズムと再生医療等製品の開発」

松原由美子 (慶應義塾大学医学部臨床研究推進センター)

15:15 閉会の辞

S1 腸内共生と免疫

長谷耕二

慶應義塾大学薬学部
hase-kj@pha.keio.ac.jp

近年の研究から、腸内微生物の定着が腸管免疫系の成立と恒常性維持に関わることが明らかとなってきた。無菌マウスでは、孤立リンパ小節などの腸管関連リンパ組織の発達が悪い。また、無菌マウスでは、通常飼育マウスと比較して抗菌ペプチドや分泌型 IgA の産生が少なく、粘膜面のバリア機能が低下している。腸管粘膜固有層には、全身免疫系とは組成が異なる免疫細胞集団が多数存在しているが、これらの分化や機能にも腸内微生物が影響している。例えば、 $\gamma\delta$ T 細胞などの上皮内リンパ球、粘膜面の防御を担う Th17 細胞、さらには、過度の免疫応答を抑制する制御性 T (Treg) 細胞の数は無菌環境では著しく減少する。これら一連の免疫不全の大部分は、無菌マウスに通常マウス由来の腸内細菌叢を移植することで正常化する。

腸内微生物による免疫修飾作用の一部には、腸内微生物由来の代謝物が関与している。腸内微生物は短鎖脂肪酸、インドール-3-乳酸などの芳香属炭化水素受容体 (AhR) リガンド、ポリアミンなどの多様な生理活性代謝物を産生する。これらの代謝物は宿主に吸収され、様々な免疫細胞の分化や機能制御を行う。我々の研究グループはこれまでに、短鎖脂肪酸の一つである酪酸が Treg 細胞を誘導することを明らかにしている¹⁾。さらに、酪酸は、腸管リンパ組織において濾胞制御性 T (Tfr) 細胞の分化を促進することで、自己免疫応答を抑制することも判明している。また腸内細菌由来のポリアミンは腸上皮細胞の増殖を促すとともに、抗炎症性マクロファージを誘導し、大腸炎の発症を抑制することを見出した²⁾。このように、腸内細菌由来の代謝物は腸管免疫系の構築と免疫恒常性の維持に重要な役割を果たしている。

本講演では腸内細菌による免疫修飾を介した腸内共生の成立機構について考察すると共に、敗血症やショックと腸内細菌の関連についても議論したい。

【文献】

- 1) Furusawa Y, Hase K, et al., *Nature*. **2013**, *504*, 446.
- 2) Nakamura A, Hase K, et al., *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 2105.

特別講演 2

S2 電位依存性 K⁺チャネルの動作メカニズムとペプチドによる阻害メカニズム

大澤匡範

慶應義塾大学薬学部

osawa-ms@pha.keio.ac.jp

電位依存性 K⁺チャネル(K_v)は神経伝達や心臓の拍動の源となる活動電位の調節を担う。例えば、心臓や脳、がん細胞に発現する電位依存性 K⁺チャネル(K_v)である hERG (human ether-à-go-go-related gene)は、心臓の正常な拍動に必須であり、その機能低下は QT 延長症候群に伴う致命的な不整脈の原因となる。また、hERG の機能が統合失調症や発がんプロセスとも関与していることや、hERG 阻害剤が膠芽腫患者の生存率を向上させたことが報告されている。これらのことから、K_v の動作メカニズムやリガンドによる K_v の機能調節メカニズムを解明することは医学・薬学的に重要な課題である。

K_v は、4 量体を形成して K⁺チャネルとして機能する膜タンパク質である。4 量体の各サブユニットは、膜電位を感受する電位センサードメイン(VSD)と K⁺透過路を形成するポアドメイン(PD)からなり、VSD の S4 は正電荷を帯びており、膜電位の変化に応答して構造変化する。静止膜電位下では S4 は細胞内側に引き付けられた down conformation をとり、このとき PD のゲートが閉じた resting state をとる。一方で、膜電位が脱分極すると S4 が細胞外側に移動し up conformation をとり、ゲートが開くことで activated state をとる。これまでに、膜電位非存在下の開状態の K_v の立体構造は報告されているが、膜電位存在下での解析手法は存在せず、膜電位依存的な VSD の構造変化がどのようにして PD のゲート開閉につながるのかの構造メカニズムを明らかになっていない。

我々はこの K_v の動作メカニズムおよびリガンド結合による阻害メカニズムの解明を目的として、以下の二つのアプローチにより取り組んできた。

(1) VSD の中で膜電位依存的な構造変化に関わる S4 と隣接する S1 に 1 残基ずつ Cys を変異導入し、Cys 同士が近接して形成される SS 結合を検出する SS-locking 法

(2) 構造が未解明な hERG の resting state を認識するイソギンチャク由来ペプチド毒素による hERG 阻害機構の電気生理学的解析

(1)では、膜電位を感受してコンフォメーションを変化させる VSD の S4 にはどのような動きの自由度があるのかを、SS-locking 法により明らかにした。(2)では、リコンビナント作成技術により毒素の変異体作成が可能となったことから、変異体の電気生理学的解析により阻害に重要な毒素および hERG 上のアミノ酸残基を同定し、毒素が hERG に結合し阻害するメカニズムを推定した。

本講演では、これらのアプローチにより見えてきた K_v の動作・阻害機構、および、未知の機能構造を標的とする創薬の可能性について議論したい。

【文献】

1) Matsumura K, et al., *BMC Molecular and Cell Biology*. **2021**, 22, 1-16.

SY1-1 人工赤血球(ヘモグロビン ベシクル)製剤の治験薬 GMP 製造

○酒井宏水¹, 久禮智子¹, 小林直子¹, 松本雅則², 杉田 修³, 神山直也⁴, 竹原有史⁴, 東 寛⁵

¹ 奈良県立医科大学医学部化学教室, ² 奈良県立医科大学附属病院輸血部, ³ 北海道大学病院臨床研究開発センター,

⁴ 旭川医科大学病院臨床研究支援センター, ⁵ 旭川医科大学小児科学

hirosakai@naramed-u.ac.jp

【緒言】 輸血代替としての人工赤血球(ヘモグロビンベシクル, Hb-V)製剤の研究開発において, これまでに非臨床試験による有効性・安全性に関する膨大な知見を得た. また Hb 内包工程に混錬法を採用し効率的な製造法を確立するとともに²⁾, 臨床試験への移行を目指し PMDA 薬事戦略面談を経て GLP 非臨床安全性試験を進めてきた³⁾. 2018 年度からは AMED 革新的医療シーズ実用化研究事業の支援を受け, 健常男性を対象とする Phase 1 試験の実施を目指し, 治験薬 GMP 製造体制を奈良県立医科大学に構築し, 治験薬 Hb-V を製造することを目的とした.

【方法・結果】 奈良県立医科大学附属病院内の移植細胞培養センター(CPC)内で治験薬を製造することについて 2019 年に学内了承を得て, 体制(製造管理者, 製造管理部門, 品質部門など)を整え, CPC の改造と機器類の導入, サニテーションを進めた. 並行して一次文書(治験薬 GMP 総則, 試験薬標準書, 製造管理基準書, 品質管理基準書, 衛生管理基準書), 二次文書(出荷管理, 変更管理, 逸脱管理, 品質情報, 治験薬回収, 自己点検, 教育訓練, 文書管理などの手順書), 三次文書(製造指図記録書, 工程試験指図記録書, 品質試験指図記録書など)を整備した. 原料となる精製 Hb および脂質類の製造法を委託企業に技術導入し, 製造体制を整えた. 原料および治験薬の品質管理項目(Hb 濃度, 脂質濃度, 粒子径, エンドトキシン, 無菌性など)について, 外部検査機関に測定法を技術導入しバリデーションを経て, 品質管理体制を構築した. 2020 年より治験薬 Hb-V 製造のコールドランを 2 バッチ分を実施したのち, 本製造を 5 バッチ分行った. 品質確認の後, 製造物を治験薬として出荷することができた.

【結論】 人工赤血球(ヘモグロビンベシクル)の治験薬製造体制を, アカデミアが主体となって構築することができた. 製造された治験薬を用い, Phase 1 試験が 2020 年 10 月より北海道大学病院臨床研究開発センターにて開始されている.

【文献】

- 1) 東 寛, 酒井宏水. 人工赤血球(ヘモグロビンベシクル)製剤の臨床への橋渡し研究. 臨床血液 2019; 60(9): 1084-1091.
- 2) Kure T, Sakai H. Preparation of Artificial Red Blood Cells (Hemoglobin Vesicles) Using the Rotation-Revolution Mixer for High Encapsulation Efficiency. ACS Biomater Sci & Eng. 2021;7:2835-2844.
- 3) Sakai H, Kobayashi N, Kure T, Okuda N. Translational Research of Hemoglobin Vesicles as a Transfusion Alternative. Curr Med Chem. 2021;28: (in press).

シンポジウム 1

SY1-2 人工赤血球(ヘモグロビン ベシクル) 製剤の治験(First-in-human)の進捗状況について

○東 寛¹, 天野虎次², 酒井宏水³, 杉田 修², 神山直也⁴, 竹原有史⁴

¹ 旭川医科大学小児科学, ² 北海道大学病院臨床研究開発センター, ³ 奈良県立医科大学医学部化学教室,

⁴ 旭川医科大学病院臨床研究支援センター

azma5p@asahikawa-med.ac.jp

【緒言】 リボソームでヘモグロビン(Hb)分子をカプセル化した人工赤血球 (Hemoglobin vesicle; HbV)の開発研究は1980年代後半に始まり1993-1995年の厚生省血液研究事業「代替血液製剤に関する研究」の一つとして支援を受けた。その後、膨大な動物実験データの蓄積と製造法の改良を経て、遂に、2018年度よりAMEDの研究開発費を得て、治験(Phase I, First-in-human: FIH)を実施するためのプロジェクトが始まった。プロジェクトは、旭川医科大学臨床研究支援センター及び北海道大学病院臨床研究開発センターを橋渡し支援拠点とし、両施設のARO機能を活用しつつ進められている。2019年度早期に、残されていた非臨床試験が終了し、その後、FIH試験プロトコルのPMDAのRS戦略相談での合意と治験実施施設である北海道大学病院の治験審査委員会の承認を得て、2020年10月からFIH試験がスタートした。

【HbV製剤の製造とPhase I試験 プロトコル】 ヒトへ投与するためのGMP製剤は奈良県立医科大学のCPCにて製造した。最終産物は、非臨床試験で使用されたHbV製剤(Hb濃度10g/dl)のデータに基づいて設定した暫定規格値を満たしていることを治験薬GMPに基づき確認した。被験者は健康成人男性。治験は3つのコホート(それぞれについて被験者4名)に分けてられた。HbVの投与量はコホート1, 2, 3でそれぞれ10ml(0.2ml/kg;投与時間30min), 50ml(1.0ml/kg;投与時間70min), 100ml(2ml/kg;投与時間90min)とし、安全性(有害事象の発生;投与後の自覚・他覚症状,血液生化学検査値の変動等)および治験薬の薬物動態について評価する事とした。最大投与速度はコホート1では1ml/min,コホート2,3では2.5ml/minの経静脈投与とした。

【結果】 現時点で、コホート1および2まで終了した。コホート3は、コロナウイルス感染症蔓延の影響で、順延となっていたが2021年7月に再開している。

【考察】 HbV製剤は、Hb分子を内包するリボソーム粒子の分散液(Hb濃度10g/dl)である。血液代替物としての使用を想定すると、数百mlの本剤を輸注する必要がある。Phase Iでは、最大100mlまでの投与を予定しているが、現時点では、少なくとも本製剤50mlは、重篤な副作用なく投与できる事が示され、コホート3を実施することになった。100mlの投与となるコホート3の結果が待たれる。

SY1-3 産科危機的出血モデルに対する人工酸素運搬体 HbV の効果

○萩沢康介¹, 木下 学², 結城由香子³, 石橋弘樹⁴, 金子恒樹³, 照井克生³, 酒井宏水⁵

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

⁴ 防衛医科大学校産婦人科学講座, ⁵ 奈良県立医科大学化学教室

hagisawa@ndmc.ac.jp

【緒言】 産科大量出血は、依然として予測不可能な分娩時合併症であり、高リスク妊婦と低リスク妊婦の両方で突然発生する。本邦で分娩の半数以上を扱っている産科一次施設 78% が輸血製剤を備蓄しておらず、予期せぬ産科危機的出血が生じた場合の対処の遅れにより転院搬送中に心停止に至る例が依然として散見される。これに対して、人工酸素運搬体 HbV は、産科大量出血患者治療の最初の蘇生液として有用である可能性がある。

【方法】 実験には妊娠 28 日目のニュージーランド白ウサギを使用した。

「産科危機的出血予防の検討」：静脈麻酔下に腹部正中切開を行い、右側の子宮動静脈を切離し自由出血させた。出血開始と同時に 5 分毎に出血量と等量の輸液投与を行った。輸液（輸血）内容を以下の 3 群に分けた。①赤血球と血漿を 1:1 の単位比で投与した群（陽性対照群）、② HbV とアルブミンの混合液を投与した群、③アルブミン投与群（陰性対照群）である。出血開始から 60 分後、または総出血量が 200ml に達した時点で外科的に止血した¹。

「産科危機的出血治療の検討」：静脈麻酔下に帝王切開術を行った後に、右側の子宮動静脈を切離し自由出血させた。出血開始から最初の 30 分間は 5 分毎に出血量と等量の膠質液投与を行った。30 分後に産科危機的出血に至ったことを確認し、以下の 3 群に割り振った。①赤血球と血漿を 1:1 の単位比で投与した群（陽性対照群）、② HbV とアルブミンの混合液を投与した群、③膠質液投与群（陰性対照群）である。出血開始から 60 分後、または総出血量が 200ml に達した時点で外科的に止血を行った²。

いずれの検討においても母体の生命予後や血行動態等について比較した。

【結果と考察】 「予防効果」：各群の 10 時間後の生存率は、アルブミン投与群が 0% で、HbV とアルブミンの混合液投与群と、赤血球 + 血漿輸血群が 100% であった。「治療効果」：各群の 6 時間後の生存率は、膠質液投与群が 0% で、HbV とアルブミンの混合液投与群が 80%、赤血球 + 血漿輸血群が 100% であった。HbV 投与は産科一次施設から病院に後送して通常の輸血治療ができるまでの数時間をブリッジするかたちで輸血の代替ができた。

【結論】 HbV 投与は産科危機的出血の新しい救命戦略につながると期待される。

【文献】

- 1) Yuki Y, Hagisawa K, Kinoshita M, et al., *Am J Obstet Gynecol.* **2021** 224, 398.e1-398.e11.
- 2) Ishibashi H, Hagisawa K, Kinoshita M, et al., *Sci Rep* revising.

SY1-4 イヌ肺切除周術期 30%出血モデルを用いたヘモグロビン小胞体投与の有効性の組織学的評価

○大岩加奈¹, 河野光智², 小野沢博登¹, 橋本 諒¹, 増田良太¹, 渡辺真純³, 堀之内宏久⁴, 酒井 宏水⁵, 小林紘一³, 岩崎正之¹

¹東海大学医学部外科学系呼吸器外科学, ²埼玉医科大学総合医療センター呼吸器外科³慶應義塾大学医学部外科,

⁴さいたま市立病院呼吸器外科, ⁵奈良県立医科大学医学部化学教室

ohiwakana@gmail.com

【緒言】呼吸器外科領域の手術において肺切除での血管損傷は出血量が数分で数リットルに達することがあり、輸血用血液製剤は臨床の現場において必要不可欠である。ヘモグロビン小胞体(HbV)は、赤血球からヘモグロビンを抽出精製し、リポソームに内包、膜表面をPEG修飾して粒径を250nmに調製した粒子である。出血性ショックに対する蘇生液としての臨床応用が期待されているが、輸血頻度の高い外科手術時の大量出血に対する使用も想定される。血液型がなく、ウイルスなどの感染源を排除され、室温で2年以上の備蓄が可能であるため、手術室に常備でき、いつでも遅滞なく投与が可能になると考えられる。イヌに肺切除術を行い、同時に脱血する周術期出血モデルを作成し、ヘモグロビン小胞体投与の有効性を検討した。

【方法】イヌ(ビーグル犬, 体重約10kg)に対して全身麻酔, 人工呼吸器管理下に手術を行った。スワンガンツカテーテルの挿入留置と大腿動脈ラインの確保を行い、血行動態のモニタリングと血液ガス分析で血液の酸素化を評価した。左肺全摘後に循環血液量の30%(約250ml)を50mL/minの速さで脱血し、5%アルブミンにヘモグロビン小胞体を分散させた溶液(ヘモグロビン濃度8.6g/dl)を同量投与した。コントロール群には5%アルブミン溶液を投与した。肺切除前後と脱血後、各輸液後に血圧、心拍出量等の循環動態の指標の測定、血液ガス分析を行った。全身麻酔を維持したまま、1時間ごとに5時間までデータ採取を行った。犠牲死後、臓器虚血の組織学的検討を行った。

【結果と考察】脱血後、動脈血圧は有意に低下してショックを呈したが、ヘモグロビン小胞体溶液の投与後の血圧はベースラインレベルに戻り安定した。5%アルブミンの投与だけではベースラインまで回復しなかった。ヘモグロビン小胞体投与群の動脈血酸素含有量と酸素運搬量は、5%アルブミン投与群よりも有意に高かった。ヘモグロビン小胞体投与群の心拍出量は脱血前と同等であったが、5%アルブミン投与群でのみ有意に増加した。組織学的検討では血液の循環動態の影響を受けやすい肝細胞で評価した。ヘモグロビン小胞体投与群と比較し5%アルブミン投与群において虚血の所見を認めた。

【結論】左肺全摘後の低肺機能の状態においても、5%アルブミンに分散したヘモグロビン小胞体溶液の投与は30%脱血を代償して血液や組織の酸素化に寄与し、循環動態を安定させることができたと考えられた。外科手術時の大量出血に対して、ヘモグロビン小胞体の有効である可能性が示唆された。

SY1-5 HbV を用いた臓器保存技術の可能性

○岩田浩義^{1,2}, 石井大介¹, 鳥海飛鳥¹, 庄中達也¹, 佐藤 樹³, 高橋裕之², 萩原正弘², 今井浩二², 横尾英樹², 小原弘道³, 西川祐司⁴, 酒井宏水⁵, 松野直徒^{1,2}

¹ 旭川医科大学移植医工学治療開発講座, ² 旭川医科大学肝胆膵, 移植外科, ³ 東京都立大学機械システム工学,

⁴ 旭川医科大学腫瘍病理学, ⁵ 奈良県立医科大学医学部化学教室

hiro-gun@asahikawa-med.ac.jp

【緒言】 欧米では慢性的なドナー不足のため心停止ドナーなどの移植可能限界のマージナルドナーの有効活用が盛んに叫ばれる中、重篤な虚血再灌流障害を抑制する技術として機械灌流保存方法が各種臓器において導入されている。肝臓においては保存温度、酸素化、灌流液などに課題がある。我々のグループは 22~25 度の酸素化室温灌流保存を提唱しその有効性を報告してきた。今回、我々は、HbV 含有機械灌流保存液を作成し、ブタ肝臓を摘出した後、体外にて 75% 肝切除した過少肝グラフトを機械灌流保存し有効性を検討した。

【方法】 約 30kg の雑種ブタを使用した。肝臓を摘出し体外にて 75% 肝切除を行い、これを灌流保存装置 (CMP.X04W, 中央精工社) および専用回路 (泉工医科工業社) を用い、4 時間室温灌流保存ののちに、2 時間、自己血で再灌流 (isolated liver perfusion model) して評価した。実験群は過少肝を変法 HTK 液 (Group1) およびこれに HbV500ml を加えた 2 群 (Group2) を比較した。

【結果と考察】 灌流保存中の Group 1 に比較し Group2 の門脈圧および肝動脈圧抵抗は経時的に低下し、保存液中の AST [3363, 0 v 230 IU/L], LDH (314, vs 200 IU) はいずれも Group2 において低値であった。再灌流後の酸素消費量は Group2 において高値を示し、活発な代謝機能があると考えられた。しかしながら 2 時間の再灌流後の AST, LDH に関しては有意差は見られなかった。組織学的には肝細胞の壊死、類洞内日障害は Group1 に強い傾向が示された。

【結論】 マージナルグラフトである過少肝の保存に対して HbV を含有した臓器灌流保存液による過少肝の室温機械灌流保存は良好な保存環境を構築し虚血再灌流障害を抑制する可能性が示唆された。

SY1-6 光治療とヘモグロビン小胞体

○力久直昭¹, 酒井宏水², 三川信之³

¹おゆみの中央病院, ²奈良県立医科大学化学教室, ³千葉大学医学部形成外科
rikihisa@faculty.chiba-u.jp

【緒言】ヘモグロビン小胞体(HbVs)は酸素運搬体として開発され, その臨床応用が期待されている. われわれは, HbVs のヘモグロビンを chromophore (特定波長の光を選択的に吸収する生体色素体)と認識しなおし, 異常な毛細血管拡張が本態である単純性血管腫のレーザー治療にこれを応用する動物実験を行ってきた. レーザー光自体は熱を持っていないが, 物質に当たると分子格子振動が起こり熱が発生する. 選択的光熱融解理論では, 「波長, 照射持続時間, 単位面積当たりのエネルギーを適正化して照射すると, 特定の色素, 細胞を選択的に融解できる」とされ, レーザー治療の原理となっている. 一方で, HbVs の一酸化炭素運搬機能も近年注目され, 一酸化炭素のもつ強い細胞保護作用を疾患治療に用いる基礎研究が進んでいる. 一酸化炭素と結合した HbVs を投与した動物実験についても, 一部を含めて報告する.

【方法】吸入麻酔下に循環血液量の5~10%量の HbVs をニワトリ・ウサギなどに投与した後に, 臨床で用いられる色素レーザーを体表血管に照射した. 照射4日後に血管や血管周囲組織の損傷度を病理学的に判定し, 統計学的手法を用いて解析した. また, 基礎実験のデータをもとにモンテカルロシミュレーションを行い, 皮膚内の光子の散乱・吸収・透過が HbVs 投与前後でどのように変化するのか解析した.

【結果と考察】HbVs の前投与によって, 皮膚表層の細い血管・皮膚深層の深い血管・動脈・静脈の熱損傷が増強し, 血管周囲の軟部組織の熱損傷が減少した. シミュレーションでは, 血管の光子吸収量がわずかに増加し, その増加した分だけ血管周囲組織の光吸収量が減少した.

【結論】HbVs によってレーザー光の選択的光熱融解が増強されることが病理学的に示された. シミュレーションによる光子吸収量の変化は皮膚内の各深さで1~8%程度の増減ではあったが, そのもたらす影響は大変大きいものであり, 生体工学のダイナミックさを印象付けた. 生体赤血球は血管内に均一に分布しておらず, 血管の軸部に集中して流れる. HbVs はこれを補うように血管壁に沿って流れるため, HbVs で作られる熱が効率的に血管を損傷すると考えられた. 一酸化炭素と結合した HbVs の投与は, さらに選択的光熱融解を強化する結果となった.

【文献】

- 1) Shimanouchi K, et al., Artificial red blood cells increase large vessel wall damage and decrease surrounding dermal tissue damage in a rabbit auricle model after subsequent flash lamp-pumped pulsed-dye laser treatment. *J Dermatol* **2021**, 48, 600-612.

SY2-1 活性硫黄化が織りなすタンパク質の新たな生体防御機構

○異島 優¹, 丸山 徹², 小田切優樹³, 石田竜弘¹¹ 徳島大学大学院医歯薬学研究部, ² 熊本大学薬学部, ³ 崇城大学薬学部
ishima.yuu@tokushima-u.ac.jp

近年、システイン(Cys)へ過剰にイオウが結合した Cys-SSH に代表される『活性硫黄分子種』が、細胞内外問わず、生体内に広範囲かつ多量に存在していることが明らかになってきている。この活性硫黄分子種は強力な酸化ストレス消去活性を有することや、様々なシグナル伝達・変換を介した生体恒常性維持に重要な因子であることが相次いで報告されている。これまでに我々は、アルカリ条件下にてアスコルビン酸により活性硫黄分子種から過剰に結合している硫黄を選択的に追い出し、定量化することに成功しており、生体成分中の血清アルブミンに多量の活性硫黄分子種が存在していることやその量が病態より変動することなどを明らかにしてきた。さらに、活性硫黄分子種の投与により、急性腎障害モデルマウスの病態が改善することも確認した。これらの知見は、循環血中において血清アルブミンが内因的な活性硫黄運搬体として機能し、酸化ストレス関連疾患により上昇した酸化ストレスに応答するシステムを担っていることを示唆するものであり、新たな循環血中の恒常維持メカニズムの解明に繋がるものと考えている。さらに最近、循環血中のみならず、毛髪や皮膚など生体表面に広く発現するケラチンタンパク質などにも活性イオウ分子種が付加していることを示唆する知見を得た。毛髪に含まれるケラチンタンパク質は血清アルブミン同様、Cys 残基を非常に多く含むタンパク質であり、これまで Cys-SS-Cys 架橋形成により毛髪の形状あるいは強靭さに寄与していると考えられてきた。しかしながら我々の活性イオウ分子種測定法を用いた解析の結果から、大変興味深いことに、ケラチンタンパク質の Cys 間の架橋形成は、ジスルフィド結合ではなくポリスルフィド結合を介したものであることや紫外線によりポリスルフィド結合が減少することなど、ケラチンタンパク質の真の姿を徐々に捉えつつある状況である。本シンポジウムでは、これらタンパク質に付加している活性イオウ分子種の生物活性の理解を通し、紫外線や環境中の様々な酸化物質に対する生体防御系の解明のみならず、様々な酸化ストレス疾患に対する全く新しい予防・治療戦略をご紹介したい。

【文献】

- 1) Ikeda M, Ishima Y, Chuang VTG, Sakai M, Osafune H, Ando H, Shimizu T, Okuhira K, Watanabe H, Maruyama T, Otagiri M, Akaike T, Ishida T. *Molecules*. **2019**, 24, 1689.
- 2) Ikeda M, Ishima Y, Kinoshita R, Chuang VTG, Tasaka N, Matsuo N, Watanabe H, Shimizu T, Ishida T, Otagiri M, Maruyama T. *Redox Biol*. **2018**, 14, 354-360.
- 3) Ikeda M, Ishima Y, Shibata A, Chuang VTG, Sawa T, Ihara H, Watanabe H, Xian M, Ouchi Y, Shimizu T, Ando H, Ukawa M, Ishida T, Akaike T, Otagiri M, Maruyama T. *Anal Chim Acta*. **2017**, 969, 18-25.
- 4) Shibata A, Ishima Y, Ikeda M, Sato H, Imafuku T, Chuang VTG, Ouchi Y, Abe T, Watanabe H, Ishida T, Otagiri M, Maruyama T. *Biochem Biophys Res Commun*. **2016**, 479, 578-583.

SY2-2 水素ガス吸入療法の将来性

○本間康一郎^{1,3}, 佐野元昭^{2,3}, 佐々木淳一^{1,3}

¹ 慶應義塾大学医学部 救急医学, ² 慶應義塾大学医学部 循環器内科, ³ 慶應義塾大学水素ガス治療開発センター
homma@keio.jp

水素ガスは近年、活性酸素種除去による抗炎症、抗酸化作用から、種々の治療効果を有すると報告され、医療用ガスとしての期待が高まっている。水素ガス吸入療法に関する様々な動物および臨床研究が行われており、種々の疾患・病態に対して治療効果を持つことが示唆され、人に対する安全性が示されている。当院では急性心筋梗塞や心肺停止蘇生後症候群に対する臨床研究が実施されており、心肺停止蘇生後症候群に関しては、二重盲検下ランダム化比較試験が複数の医療機関において現在進行中である¹⁾。また最近では、中国の研究グループが新型コロナウイルス感染症に罹患した呼吸苦を伴う患者に対して水素ガス吸入療法を行い、疾患重症度の軽減との関連性を報告した²⁾。これらを踏まえて本シンポジウムでは、水素ガスの治療的側面と将来の新規薬剤としての可能性を紹介する。

【文献】

- 1) Tamura T, *et al.*, *Trials*, **18**, 488 (2017).
- 2) Guan WJ, *et al.*, *J. Thorac. Dis.*, **12**, 3448–3452 (2020).

SY2-3 ヘモグロビンを用いた一酸化炭素製剤の開発

○田口和明¹, 小田切優樹², 松元一明¹

¹ 慶應義塾大学薬学部, ² 崇城大学薬学部

taguchi-kz@pha.keio.ac.jp

抗酸化作用や抗炎症作用などの多彩な生理活性作用を有する一酸化炭素(CO)を低濃度で生体に暴露すると多種多様な疾患の発症と進展が抑制される。そのため、COは酸素や一酸化窒素に続く医療ガスとしての臨床応用を目指した創薬研究が世界中で試みられている。実際にCO吸入療法においては、慢性閉塞性肺疾患(NCT00122694)や特発性肺線維症(NCT01214187)を対象とした治療に関する臨床試験が欧米を中心に進行している。これまでに我々も、内因性COの生体内動態に着目した独創的な創薬戦略によるCOを基盤とした創剤研究を展開してきた。具体的には、ヘムが代謝される過程に産生された内因性のCOは赤血球中に存在するヘモグロビンに結合して生体内を循環し、生理環境に応じてCOを放出すると言われている。そのため、赤血球がCOの理想的なキャリアになると考え、単離・精製した赤血球や赤血球と同様の機能を付与した赤血球のバイオミメティック製剤であるヘモグロビン小胞体(HbV)を用いてCOのデリバリーシステムを構築してきた。本講演では、COを基盤とした製剤開発の現状を概説するとともに、我々が展開しているヘモグロビンを基盤としたCO製剤の創製と難治性疾患治療薬としての可能性について紹介する。

【文献】

Taguchi K, et al., *J Pharm Sci.*106 (9): 2392-2400. (2017)

Taguchi K, et al., *Curr Med Chem.* 27 (18): 2949-2963. (2020)

Taguchi K, et al., *J Pharmacol Exp Ther.* 372 (3): 355-365. (2020)

SY3-1 がん間質細胞を標的とする DDS 担体の開発

○前田仁志¹, 水田夕稀¹, 異島 優¹, 渡邊博志¹, 小田切優樹², 丸山 徹¹

¹熊本大学 薬学部 薬剤学分野, ²崇城大学 薬学部 DDS 研究所
maeda-h@kumamoto-u.ac.jp

【緒言】 がん微小環境を構成する腫瘍関連マクロファージ(TAM)やがん関連線維芽細胞(CAF)は, がんの増殖や転移, さらには悪性化や薬剤耐性化で重要な役割を果たしていることから, 難治性がんに対する新たな治療標的として注目を集めている. しかしながら, TAMとCAFの両者を同時に標的可能な薬物送達(DDS)担体の開発には至っていない. 興味深いことに, TAMとCAFの細胞表面上には, それぞれマンノース受容体CD206とCD280が高発現している. 本研究では, TAM/CAFの両者を包括的に標的可能な dual targeting 担体の開発を目的として, CD206/CD280を *in vivo* で同時に認識可能な高マンノース含有アルブミン(Man-HSA)にポリエチレングリコール(PEG)を1分子修飾した monoPEG-Man-HSAs を作製し, その有用性を評価した.

【方法】 分子量 5, 20, 40kDa の PEG を Man-HSA の Cys34 に化学修飾し, monoPEG-Man-HSAs を作製した. マウス由来皮膚がん細胞(B16F10)を C57BL/6 マウスに皮下移植して担がんマウスを作成した.

【結果と考察】 monoPEG-Man-HSAs の体内動態を解析した結果, PEG 修飾は Man-HSA が有する肝移行性を減少させ, 40kDa の PEG 修飾では血中滞留性及び腫瘍移行性の向上に伴い, TAM や CAF への移行性も有意に上昇した. これらの動態特性を反映して, 抗がん剤のパクリタキセル(PTX)を搭載した PTX-monoPEG_{40k}-Man-HSA は, TAM/CAF 両者を効率良く減少させる結果, PTX-monoPEG_{40k}-HSA よりも高い抗腫瘍効果をもたらしたことから, 自身の高マンノース糖鎖を介した TAM/CAF に対する二重標的能が関与しているものと推察された.

【結論】 今回作製した monoPEG_{40k}-Man-HSA は TAM/CAF を包括的に標的可能な新規 DDS 担体としてのポテンシャルを秘めている.

SY3-2 血液中で標的分子を吸着して中和する多官能性リポソームの開発

○小出裕之¹, 平野覚士¹, 濱島義隆², 奥 直人^{1,3}, 浅井知浩¹

¹ 静岡県立大学薬学部医薬生命化学教室, ² 静岡県立大学薬学部医薬品創製化学教室, ³ 帝京大学薬学部医薬品分析学教室
hkoide@u-shizuoka-ken.ac.jp

【緒言】 リポソームは、生体構成成分と類似成分から構成されているため、生体適合性の高い薬剤運搬キャリアとして、現在までに多くのリポソーム製剤が臨床で用いられている。ところで、抗原抗体間など生体高分子間の結合は、静電的相互作用、水素結合、疎水性相互作用など多くの弱い結合の多点結合により、強く特異的な結合が形成されている。我々は、様々な弱い相互作用を生み出す官能基を付与した機能性脂質を用いてリポソームを調製することで、リポソームの表面に露出した官能基により抗体のように血液中で標的分子と強く特異的に結合し、その機能を中和可能な多官能性リポソーム(MF-Lip)の創製が可能ではないかと考えた。

【方法】 本研究では蜜蜂由来の毒素であるメリチンを標的分子とし、リポソームによるメリチンの吸着に向けて負電荷、疎水性もしくは中性のアミノ酸誘導体を付与した機能性脂質を用いてMF-Lipを調製した。MF-Lipとメリチンとの結合親和性は水晶振動子マイクロバランス法にて解析した。メリチンの溶血活性および細胞毒性に対するMF-Lipの阻害効果は、それぞれHemolysis assay, WST-8 assayにて評価した。放射標識したMF-Lipをマウスの尾静脈から投与し、3時間後に各臓器の放射活性を測定することでMF-Lipの体内動態を解析した。In vivoにおけるメリチンの毒性阻害効果を明らかにするため、マウスに致死量のメリチンとMF-Lipを尾静脈内投与し生存率を算出した。

【結果と考察】 MF-Lipを構成する機能性脂質の割合を変えることで、メリチンに対する親和性は大きく変化した。また、MF-Lipの溶血活性阻害効果や細胞毒性阻害効果は、その結合親和性とは必ずしも相関しなかった。これは、メリチンによる毒性がメリチン分子全体によって引き起こされているのではなく、一部のドメインによって引き起こされているため、高い結合親和性を示したとしても、そのドメインに結合しない限りメリチン毒性阻害効果を示さなかったと考えられる。MF-Lipの体内動態を評価した結果、MF-Lipは静脈内投与から3時間後においても10%程度血中に存在していた。メリチンを投与後にPBSを投与したマウスの生存率は30%程度であったのに対し、in vitroにおいて高いメリチン毒性阻害効果を示したMF-Lipを投与することで全てのマウスが生存した^{1,2)}。

【結論】 機能性脂質の割合を最適化したMF-Lipは、マウス血液中で標的分子を吸着し無毒化することが明らかとなり、MF-Lipの毒素中和剤としての有用性が示された。

【文献】

- 1) Koide H, et al., *Adv Funct Mater.* **2020**, 2005641.
- 2) Koide H, et al., *Biochem Biophys Res Commun.* **2021**, 555, 32-39.

SY3-3 白血球・細胞外小胞の特性を模倣した生体膜模倣微粒子の開発

福田達也

和歌山県立医科大学薬学部薬剤学研究室

fukuta@wakayama-med.ac.jp

リポソーム等のナノ粒子型 DDS を利用した薬物送達が多様な疾患治療に向けて応用されている。しかし生体内には、脳の恒常性維持を担う血液脳関門 (BBB) を始めとする血管内皮層や、がん組織内に形成される腫瘍微小環境が、脳実質やがん細胞への効率的な薬物送達を実現する上で障壁として存在する。演者らはこれまでに、脳梗塞部位周辺において生じる BBB の破綻と血管透過性の亢進を利用したリポソームによる脳保護薬送達が、脳虚血 / 再灌流障害に治療に有効であることを報告してきた¹⁾。しかし、BBB 間隙を介したリポソームの受動的な脳実質への移行は、虚血 / 再灌流後の早期に限定されること等があり、患部への薬物送達向上には脳梗塞部位の BBB を能動的に突破可能な技術が求められる。

そこで演者らは、生体内に存在する BBB 等の薬物送達の障壁を克服する手段として、白血球や細胞外小胞エクソソーム (Exo) の有する特性に着目し、生体膜を模倣したバイオミメティック DDS の開発に取り組んでいる。血液中を循環し炎症部位へ集積する白血球は、膜タンパク質機能を利用して炎症性の腫瘍新生血管や脳梗塞部位 BBB へ接着・浸潤する。そこで、リポソームへ白血球膜タンパク質を搭載することで、白血球のように炎症血管、さらには脳梗塞部位 BBB を突破可能な白血球模倣リポソーム (Leukocyte-mimetic liposome; LM-Lipo) を開発すべく検討を行ってきた。膜タンパク質を活性・配向性を保持したままリポソーム膜へ再構成可能な脂質膜簡移行法により、ヒト白血球細胞上の白血球膜タンパク質を修飾した LM-Lipo を構築した。in vitro における機能解析の結果、LM-Lipo が炎症血管内皮細胞へ接着するとともに、細胞間接着を変化させることで血管内皮層を突破可能であることが示唆された²⁾。また白血球は、がん組織深部へ浸潤する性質を有するが、LM-Lipo はその機能を模倣しがんスフェロイドへの浸透性を発揮するとともに、内封抗がん剤によりその成長を顕著に抑制した³⁾。さらに担がんマウスに対して全身投与した LM-Lipo は、対照群と比較して有意に高い腫瘍集積性を示し、がん治療応用も期待できる。一方 Exo は、由来細胞によって膜表面に発現する膜タンパク質組成が異なり、それにより特定の組織・細胞指向性を示すとされる。特に、BBB を透過可能な Exo も報告されていることから、その性質を模倣した DDS の開発は、脳への薬物送達を実現する技術となり得る。演者らは、Exo の膜脂質組成を利用したリポソームと Exo の融合に成功しており、マウスメラノーマ B16F1 細胞由来の Exo を用いて作製したリポソーム / Exo 融合ナノ粒子が、ドナー細胞である B16F1 細胞に対し高い取り込み能を発揮すること、すなわち Exo 上の膜タンパク質を機能を保持した状態でリポソーム膜へ移行できることが示唆された。

本発表では、リポソーム DDS による脳梗塞治療、そして生体バリアの突破を目的とした白血球、Exo を利用した生体膜模倣 DDS の開発について紹介させて頂く。

【文献】

- 1) Fukuta T, Asai T, Yanagida Y. et al., *FASEB J.* **2017**, 31, 1879-1890.
- 2) Fukuta T, Yoshimi Y, Kogure K, *Int J Pharm.* **2019**, 563, 314-323.
- 3) Fukuta T, Yoshimi Y, Kogure K, *J Pharm Sci.* **2021**, 110, 1701-1709.

SY4-1 家兔における羊水塞栓症・産科出血モデルの開発と H12ADP リボソームの効果

○金子恒樹¹, 萩沢康介², 木下 学³, 照井克生¹, 武岡真司⁴

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

⁴ 早稲田大学先進理工学研究科

anesth.k@gmail.com

【緒言】 産科 DIC の原因疾患のひとつに羊水塞栓症がある。発症は予測不可能であり、死亡率は 20~40% と高率である。羊水は夫抗原由来の異種蛋白を含むため母体血中に流入すると自然免疫系の応答によりアナフィラクトイド反応が生じて凝固線溶系に異常をきたすとされ、病理学的検討では血小板血栓やフィブリン血栓を肺胞に認めることも多い。今回、羊水塞栓症による産科出血動物モデルを確立し、H12ADP リボソームの効果を検討した。

【方法】 実験には妊娠 28 日目のニュージーランド白ウサギ(平均体重 3.6kg)を使用した。静脈麻酔下に腹部正中切開を行い、帝王切開で全ての胎仔を取り出し羊水を採取し、遠心により血液成分を除去して、計 3mL を静脈内投与した。羊水投与から 15 分後に右側の子宮静脈を切離し自由出血させた。出血開始と同時に以下の輸液投与を行った。①多血小板血漿 (PRP) を 5 分毎に出血量と等量投与した群、② H12ADP リボソーム (1mL/kg) を単回投与後に、血漿 (PPP) を 5 分毎に出血量と等量投与した群、③血漿 (PPP) のみ 5 分毎に出血量と等量投与した群である。出血開始から 60 分後に結紮止血し、血小板凝集機能や凝固機能とともに血行動態等について比較した。

【結果と考察】 羊水投与により、血小板値は $200 \pm 55 \times 10^3 / \mu\text{L}$ から $62 \pm 11 \times 10^3 / \mu\text{L}$ と著減し、Multiplate による血小板機能評価では凝集能が実験開始前の 19% に低下し、Sonoclot による凝固機能評価 (活性化凝固時間) は 1.9 倍に延長した。子宮静脈からの出血後に PPP 投与のみでは血小板凝集機能と凝固機能は低下したままであったのに対して、H12ADP リボソーム + PPP 投与した群は PRP 投与群と同様に血小板凝集機能や凝固機能が正常範囲に回復した。

【結論】 H12ADP リボソーム投与は羊水塞栓症に伴う産科危機的出血の止血治療につながると期待される。

【文献】

- 1) Kanayama, N., Tamura, N., Amniotic fluid embolism: pathophysiology and new strategies for management. J. Obstet. Gynaecol. Res. 40, 1507–1517. (2014)
- 2) Yang RL, Lang MZ, Li H, Qiao XM. Immune storm and coagulation storm in the pathogenesis of amniotic fluid embolism. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 25: 1796-1803. (2021)

シンポジウム 4

SY4-2 エンドトキシン血症時の凝固障害に対する H12ADP リポソーム投与効果の検討

○萩沢康介¹, 木下 学², 武岡真司³

¹防衛医科大学校生理学講座, ²防衛医科大学校免疫微生物学講座, ³早稲田大学先進理工学研究科
hagisawa@ndmc.ac.jp

【緒言】 感染症に伴う凝固障害は、炎症により活性化した好中球と血小板の相互作用により惹起される全身性の臓器傷害の関与が指摘される難治性病態である。いっぽう、H12ADP リポソームは、傷害(出血)局所に集まり、そこで放出された ADP がアデノシンに代謝され、傷害部位における炎症抑制作用や臓器保護作用を発揮することが示されている¹⁾。今回我々は LPS 投与による凝固障害モデルにおいて、H12ADP リポソームの後投与が血小板機能不全を解消し、同時に血小板を介して全身的な炎症惹起を抑制しうるか検討を行った。

【方法】 雄性 SD ラット(400-500g)に LPS(10mg/kg)を腹腔内投与し、4 時間後に尾静脈より H12ADP リポソーム(40mg/kg)ないし生理食塩水(2ml/kg)を後投与した。「急性期予後の比較」: 18 時間の生存率を比較した。これとは別個体で、以下の検討を行った。「凝固障害の検討」: LPS 投与から 4, 6, 8, 12 時間後に下大静脈より採血を行い、血算測定・Multiplate による血小板機能評価・Sonoclot による凝固機能評価・生化学検査や各種サイトカインの測定を実施した。「臓器障害の検討」: LPS 投与から 4, 6, 8, 12 時間後に犠死させ、気管支肺胞洗浄液を採取し、各種サイトカインの測定を行うとともに、肺、腎臓、肝臓等を採取し病理学的検討を行った。

【結果と考察】 急性期予後: LPS 投与後の生存率は、H12ADP リポソーム群で生食群に比し有意に改善した(79 vs. 38%, $p < 0.05$)。凝固障害: 生食群では LPS 投与から 8-12 時間後に、血小板数の低下と Sonoclot の活性化凝固時間の延長が認められ、LPS 投与 6 時間後の血小板凝集能も 10%に低下した。一方、H12ADP リポソーム群では血小板数の減少には変化がないものの、活性化凝固時間の短縮と血小板凝集能の改善(20%)が認められた。臓器障害: H12ADP リポソーム群では LPS 投与 6 時間後の急性肺傷害スコアが生食群に比し有意に改善していた(66 vs. 80, $p < 0.05$)。同様に気管支肺胞洗浄液中の好中球エラスターゼ濃度も H12ADP リポソーム群で生食群に比し有意に低値であった。

【結論】 H12ADP リポソームの後投与は LPS 誘導性の凝固障害に対して、好中球と血小板の炎症惹起を抑制し、血小板機能などを改善して臓器傷害を抑制することが示唆され、LPS 血症時の難治性凝固障害に対する治療手段の 1 つとして有用性が期待された。

【文献】

1) Hagisawa K, Kinoshita M, et al., *Critical Care Medicine* 44 (9), pp. e827-e837 2016

SY4-3 間葉系幹細胞から製造する血小板：メカニズムと再生医療等製品の開発

松原由美子

慶應義塾大学 医学部 臨床研究推進センター

血小板は輸血や組織修復で医療応用され、それら有用性は広く知られているが、輸血はドナー献血 100% 依存で 4 日間保存から不安定供給や感染リスクが問題視され、自己血を用いる組織修復は採血量に限りがあり使用量が限られる。これらドナー依存故に生じる量的な問題解決に向けて、ドナーに依存しない血小板を製造する研究が世界的に行なわれている。製造のスタート細胞として造血幹細胞や ES 細胞、iPS 細胞といった多能性幹細胞を用いた研究成果が報告されている。私たちの研究グループは、間葉系幹細胞から *in vitro* で巨核球や血小板が産生できることを報告した。間葉系幹細胞は、血液細胞とは明確に分化系列が異なる細胞である。しかし、間葉系幹細胞は巨核球・血小板の分化決定の転写因子 p45NF-E2 を内在し、生体内鉄輸送体であるトランスフェリンを添加すると容易に血小板に分化する。このメカニズムを詳細に解明し、科学的根拠に基づいた間葉系幹細胞由来血小板の作製法を確立した(2016 JTH, 2019 Blood)。特徴は、(1)皮下脂肪から得られる細胞ソースが拡大培養可能のため、大量・安定な作製、(2)遺伝子導入が不要でシンプルな製法、(3)ヒト投与可能な物質のみで作製できることである。これら特徴を有する技術により作製された血小板の医療応用を着想し、実用化に向けた非臨床、臨床研究を遂行中である。

一般演題 1

O1-1 マウス気管移植モデルにおける上皮血管へのヘモグロビン小胞体による早期再灌流

○小野沢博登¹, 橋本 諒¹, 大岩加奈¹, 中川知己¹, 増田良太¹, 渡辺真純², 堀之内宏久³, 酒井宏水⁴, 小林絃一², 河野光智⁵, 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, ⁵埼玉医科大学総合医療センター呼吸器外科

hirotoonozawa1225@yahoo.co.jp

【緒言】 輸血代替として開発されたヘモグロビン小胞体(Hemoglobin vesicle; 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, リポソームに内包, 膜表面を PEG 修飾した径 250nm の微粒子である. 血液中での酸素運搬体としての機能や, 出血性ショックの蘇生における有効性, 安全性が様々な動物モデルで確認された. 血液型に関係なく使用でき, 感染のおそれがなく, 室温で2年以上の備蓄が可能であり, 救急医療や大規模災害時, 或いは離島やへき地で赤血球輸血の代替としての使用が見込まれ, AMED の支援を受け臨床試験が開始された. 外科手術中の大量出血に対しても遅滞なく投与出来ると考えられ, 我々は肺切除動物モデルで, HbV の投与が急性期では呼吸循環動態を安定させ, 長期的には術後回復に重篤な影響を及ぼさないことを確認した. 一方, 赤血球より粒径が小さい HbV は虚血に陥った組織の微小血管をいち早く灌流して微小循環を改善させる効果を有し, 虚血性疾患に対する有効性も示唆されている. また, P50 を 9Torr に低下させた高酸素親和型 HbV や, 強力な抗酸化, 抗炎症作用を発揮する一酸化炭素結合型 HbV (CO-HbV) も作成出来る. このような HbV は微小循環不全に陥った移植組織の酸素化に有効である上, 付加的な効果も得られる可能性がある.

【実験】 マウス気管並走移植モデルで HbV を投与し, 移植された気管の上皮血管(Subepithelial capillaries; SEC)の血流を観察した. ドナー, レシピエント共に C57BL6J, 7 週齢を使用した. まず全身麻酔下にドナーの輪状軟骨下から分岐部までの気管を摘出し, 生食に浸漬して 4℃ で冷保存する. その後, レシピエントの気管にドナー気管を 2 カ所で端側吻合を行う. 移植後に尾静脈から HbV 液 (Hb 濃度 10g/dL) 0.3ml を投与し覚醒させる. 所定の時間で犠牲死させ, 気管を摘出し組織学的に評価を行った. 本実験では投与後 1, 4, 6, 8 時間で評価した.

【結果と考察】 摘出検体を HE 染色して観察した. 術後 4 時間で移植された気管の SEC 内に多量の微粒子が観察され始めた. この粒子を電子顕微鏡で観察すると形態上 HbV であることが確認された. また 8h 経過後も SEC 内に HbV 粒子が観察されていた. 血管吻合を行わない気管移植モデルにおいて HbV は移植後早期に微小血管を再灌流し, 組織の酸素化に寄与する可能性が示唆された.

一般演題 1

O1-2 一酸化炭素結合型ヘモグロビン小胞体の急性呼吸窮迫症候群に対する有用性評価

○渡部佑樹¹, 田口和明¹, 榎木裕紀¹, 酒井宏水², 小田切優樹³, 松元一明¹

¹ 慶應義塾大学薬学部, ² 奈良県立医科大学, ³ 崇城大学薬学部
yw.for.622@gmail.com

【緒言】 急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) は敗血症や肺炎などの基礎疾患に起因して発症する致死性の呼吸不全の総称である。本疾患の死亡率は約 40% に上るものの、有効な治療法は外科的な酸素療法に留まるため、革新的な薬物療法の確立が喫緊の課題とされる。生理活性ガスである一酸化炭素 (CO) は抗炎症作用に基づく組織保護効果を有するため、ARDS に対する新規治療薬シーズとして期待できる。そこで我々は、ガス分子である CO の体内動態を制御するためにヘモグロビン小胞体 (HbV) に CO を担持させた CO 結合型 HbV (CO-HbV) を CO 供与体として利用し、ARDS に対する CO の有用性を検討した。

【方法】 C57BL/6 マウスに LPS を咽頭吸引させることで ARDS モデルマウスを作製した。LPS 投与の 30 分前に生理食塩水、HbV、CO-HbV をそれぞれ投与し、LPS 処置から 24 時間後の肺組織と肺胞洗浄液 (BALF) を用いて CO の肺保護効果を解析した。

【結果と考察】 LPS の咽頭吸引により BALF 中の総細胞数・タンパク濃度が増加したことや組織形態学的評価により急性肺傷害の発症が観察された。一方、CO-HbV 治療群ではこれら LPS 投与により惹起された肺組織傷害が有意に抑制されたが、HbV 治療群では十分な肺保護効果が観察されず、CO-HbV により放出された CO による肺保護効果が示された。更に、CO-HbV 治療により LPS 投与に起因する肺組織に対する好中球の集積や炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6, IL-1 β) の発現が有意に抑制された。

【結論】 本研究より CO-HbV による肺保護効果は生体内に送達された CO が抗炎症作用を発揮した結果として得られたと考えられた。そのため、CO を基盤とした薬物療法は ARDS に対して肺保護効果を示すため有効であることが期待され、CO-HbV は CO 製剤として非常に有望であると結論付けた。

O1-3 メトヘモグロビン内包リポソームの長期安定性評価

鈴木悠斗¹, 田口和明¹, 久禮智子², 酒井宏水², 榎木裕紀¹, 小田切優樹³, 松元一明¹

¹慶應義塾大学 薬学部, ²奈良県立医科大学 医学部, ³崇城大学 薬学部
awacsyuto@keio.jp

【緒言】 シアン中毒はシアンイオンがミトコンドリア中シトクロムcオキシダーゼと結合し、細胞の酸素代謝が阻害されることで引き起こされる。症状の進行は非常に早く、迅速な治療開始が求められるが、現在臨床で使用されている亜硝酸ナトリウムとチオ硫酸ナトリウムの併用療法は即効性の解毒作用が期待できないことやヒドロキシコバラミンは生体内で解毒能が低下するといった課題が存在する。我々はこれまでにメトヘモグロビンをリポソームに内包したメトヘモグロビン小胞体(MetHbV)を創製し、シアン中毒に対して強力な解毒能を有するとともに、高い安全性を備えた製剤であることを見出している(Suzuki Y et al. *Journal of Controlled Release* (2021) in press)。そこで、本検討ではMetHbVのシアン中毒解毒剤としての有効性と安全性を維持するために必要な長期安定性について評価した。

【方法】 MetHbVはヘモグロビン小胞体に亜硝酸ナトリウムを添加することで内部ヘモグロビンをメト化して作製し、冷蔵(4℃)、室温(23℃)、温暖(37℃)の3つの異なる温度条件下で一年間保存した。保存したMetHbVの物理化学特性や内部に封入したメトヘモグロビンの構造を動的光散乱法(DLS)、円偏光二色性(CD)スペクトル及びNative-PAGEから評価した。また、シアン中毒マウスを用いた生存率の評価から有効性についても検討した。さらに、臓器障害を含めた安全性についても評価した。

【結果と考察】 保存したMetHbVの粒子径、ゼータ電位、多分散指数、粒度分布を評価したところ、すべての保存条件において物理化学特性は保存前のMetHbVと変わらなかった。また、リポソームからのメトヘモグロビンの漏出も確認されなかった。そこで、リポソーム内部に封入されたメトヘモグロビンの構造をCDスペクトル及びNative-PAGEにより評価した結果、リポソームに封入していないメトヘモグロビンと同一の結果が得られ、内封されたメトヘモグロビンの凝集や断片化など大幅な構造変化は確認されなかった。さらに、シアン中毒モデルマウスに対する冷蔵、室温、温暖で保存したMetHbVの解毒作用を評価したところ、生存率はそれぞれ90%、100%、100%であり、優れた解毒能が確認された。加えて、保存MetHbV投与による臓器への傷害性や蓄積は確認されず高い安全性が担保されていた。

【結論】 本研究において、シアン中毒に対し優れた有効性及び高い安全性を備えたMetHbVは厳格な保存条件を必要とせずに長期保存可能であることが示された。以上の知見から、MetHbVは潜在的にシアン中毒が発生する可能性のある場所に保存でき、速やかな治療開始に繋げられる実用性の高い“Ready-to-Use”な新規シアン中毒解毒剤となる可能性が示された。

一般演題 1

O1-4 メトヘモグロビン小胞体 (metHbV) のシアン化物イオン (CN⁻) との結合挙動の解析

○久禮智子¹, 鈴木悠斗², 田口和明², 酒井宏水¹

¹ 奈良県立医科大学医学部化学教室, ² 慶應義塾大学薬学部薬効解析学

kure@naramed-u.ac.jp

【緒言】 シアン中毒の対処法としては、ヒドロキソコバラミン (OHCbl, Cyanokit[®]) を投与し CN⁻ を捕捉させ腎臓から排泄させる方法と、亜硝酸化合物 (亜硝酸ナトリウム (NaNO₂), 亜硝酸アミル) を投与して赤血球内のヘモグロビンを酸化させて metHb とし CN⁻ を捕捉させたあと、チオ硫酸ナトリウムの投与でチオシアン酸に変化させる方法がある。後者の方法の代わりとして、metHb 小胞体 (metHbV) をシアン中毒モデルマウスに投与することで優れた解毒作用を示すことが明らかになってきた¹。本研究では、血漿タンパク質を含まない系 (PBS 溶液中) において metHbV, metHb, および OHCbl について、CN⁻ の結合挙動について比較することを目的とした。

【方法】 混錬法² を用いて調製した deoxyHbV を過剰量の NaNO₂ で酸化した後、超遠心分離により上清の未反応 NaNO₂ を除去し、metHbV を得た。metHb 溶液は、HbO₂ と等量の NaNO₂ と反応させて調製した。OHCbl は、急性シアン中毒解毒剤として使用されるシアノキット[®] 注射用を PBS に溶解させて用いた。これら 3 つの試料と CN⁻ との結合挙動は、stopped-flow rapid scan 分光光度計 (RSP-1000, ユニソク) を用いて分析した。試料濃度は [metHbV] = 4.7 × 10⁻⁶ M, [metHb] = 6.7 × 10⁻⁶ M, [OHCbl] = 3.7 × 10⁻⁵ M, [NaCN] = 5.8 × 10⁻⁵ ~ 5.8 × 10⁻⁴ M とした。また、サンプリング間隔と露光時間: 1 ms, 測定時間: 300 ms, 測定波長範囲: 385 ~ 593 nm とした。CN⁻ 結合体の最大吸収波長 (metHbV: 424 nm, metHb: 422 nm, OHCbl: 363 nm) における吸光度変化を時間の関数としてプロットし、疑一次反応に基づく見かけの結合速度定数 (k_{obs} , s⁻¹) を NaCN 濃度を変えて測定した。[NaCN] に対する k_{obs} のプロットの傾きから結合速度定数 k_{on} (M⁻¹s⁻¹) を得た。結合平衡定数 K (M⁻¹) ($K = [\text{metHb-CN}]/([\text{CN}^-][\text{metHb}])$) は、キュベット内の試料溶液に NaCN を段階的に添加した後の吸光度変化から算出した。解離定数 k_{off} (s⁻¹) は、式 $k_{\text{off}} = k_{\text{on}}/K$ から算出した³。

【結果と考察】 CN⁻ の結合速度定数 k_{on} は、metHbV と metHb で差は殆ど無かった (それぞれ 173, 187 M⁻¹s⁻¹) ことから、負に帯電した脂質膜は CN⁻ アニオンの透過性に影響しなかった。OHCbl の k_{on} は 44 M⁻¹s⁻¹ と低値を示した。CN⁻ に対する結合平衡定数 K は、metHbV: 0.86, metHb: 1.9, OHCbl: 1.3 (10⁶ · M⁻¹) であり、metHbV の K は metHb に比べて低い値を示した。CN⁻ に対する解離定数 k_{off} はそれぞれ metHbV: 202, metHb: 98, OHCbl: 33 (10⁻⁶ · s⁻¹) であった。metHbV の K が metHb より小さいのは、脂質膜を介して濃度勾配が生じていることが影響していると考えられた。

【文献】

- 1) Suzuki Y, Taguchi K, Kure T, Sakai H, Enoki Y, Otagiri M, Matsumoto K, *J. Control. Release In Press.*
- 2) Kure T, Sakai H, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, 7 (6), 2835.
- 3) Watanabe K, Kitagishi H, Kano K, *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, 2, 943.

一般演題 1

O1-5 メトヘモグロビン内包リポソームの新規アジド中毒解毒剤としての有効性評価

羽生聡美¹, 鈴木悠斗¹, 田口和明¹, 久禮智子², 酒井宏水², 榎木裕紀¹, 小田切優樹³, 松元一明¹

¹慶應義塾大学 薬学部, ²奈良県立医科大学 医学部, ³崇城大学 薬学部
awacsyuto@keio.jp

【緒言】 アジドは防腐剤や殺菌剤に用いられているが、急性毒性の高い毒物として誤飲事故や混入事件も度々発生しており、その中毒発生機序はシアン中毒と類似している。具体的には、経口での服用後、粘膜からの吸収に加え肺からの侵入が起こることで、体内で急速にアジドイオンがミトコンドリア中シトクロム c オキシダーゼと結合し、細胞の酸素代謝を阻害することで中毒を引き起こす。症状の進行は非常に早く、迅速な治療開始が必要とされるが、現在アジド中毒に対する治療薬として承認されている治療薬は存在せず、新規解毒剤の創製は急務である。当研究室では、これまでにシアン中毒解毒に対する強力な解毒剤としてメトヘモグロビン内包リポソーム (MetHbV) を新たに創製し、シアン中毒に対する優れた有効性と高い安全性を報告している (Suzuki Y et al. *Journal of Controlled Release* (2021) in press)。そのため、シアン中毒と毒性発現の機序が同様であるアジド中毒に着目し、MetHbV のアジド中毒に対する解毒剤としての有効性を検討した。

【方法】 MetHbV のアジドイオンとの結合性をストップフローにより評価した。また、生体内における MetHbV の有効性について検討するため、アジド中毒モデルマウスに MetHbV を投与し、生存率、血液ガスパラメータ及び臓器中の酸化ストレスマーカーであるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) について評価した。

【結果と考察】 ストップフローにより MetHbV のアジド結合性を評価したところ、アジド添加によりメトヘモグロビン由来のピークからアジド結合型メトヘモグロビン由来のピークへ速やかなスペクトル変化が確認された。致死性アジド中毒モデルマウスを用いて MetHbV の解毒作用を評価した結果、MetHbV 投与により臓器中シトクロム c オキシダーゼ活性が回復し、アジド中毒時に惹起されるアシドーシス症状 (血中 pH の低下やラクテートの上昇) も改善した。また、これらの結果に伴い、MetHbV を投与した群では生存率が劇的に上昇した。さらに、MetHbV の投与によりアジド中毒モデルマウスの臓器中 SOD は維持されるとともに、TBARS は減少しており、MetHbV はアジド中毒により進行する酸化ストレスを抑制した。

【結論】 本検討において、MetHbV はアジド中毒に対して優れた解毒作用を有していることが示され、新規アジド中毒解毒剤として使用できる可能性が示唆された。

一般演題 2

O2-1 人工酸素運搬体 (HbV) の重症出血性ショックモデル (85%血液交換) における慢性期抗不整脈効果 ; Optical Mapping ・ 心拍変動解析による検討

○高瀬凡平^{1,4}, 東村悠子¹, 真崎暢之¹, 木下学², 酒井宏水³

防衛医科大学校 集中治療部¹, 免疫微生物学², 奈良県立医大³, 入間ハート病院⁴

Dui15772004@yahoo.co.jp

【緒言】人工酸素運搬体(Liposome-encapsulated hemoglobin vesicles [HbV])の出血性ショックモデルにおける抗不整脈効果をこれまで発表してきた。しかし慢性期の効果とその機序に関しては十分明らかにされていない。重症出血性モデルである85%血液交換ラットモデルでの慢性期の抗不整脈機序を心臓自律神経活動(Heart Rate Variability [HRV]), 心機能, 血中ヘモグロビン濃度(Hb)及びOptical Mapping解析(OMP)から検討した。

【方法】SDラットの骨髄輸血と大腿動脈脱血による85%血液交換モデルを, HbV投与群(HbV群), 洗浄赤血球投与群(washed RBC群)及び5% albumin投与群(ALB群)で作成し, 生存ラットを4週間後まで観察した。4週間後に覚醒時のHRVと不整脈を24時間測定するとともに, 心機能を心臓超音波法にて左室駆出率(LVEF)として検討し, 貧血の程度をHb濃度にて確認した。さらに, 不整脈誘発法(EPS)を含むOMPを実施した。HRVはLF, HF, LF/HFを求めた。慢性期のALB群としては30%脱血ラットを代用使用した。

【結果】慢性期においてHbV群・washed RBC群では, ALB群に比較して有意に心室性不整脈が抑制されており, LF/HFの上昇抑制も認めた(HbV群, washed RBC群 vs. ALB群: $0.3 \pm 0.5, 0.3 \pm 0.2$ vs. $1.5 \pm 1.1, P < 0.05$)。LVEFとHbはHbV群でwashed RBC群と同程度に保たれ, OMPで求めたAction potential duration dispersion (APDd)とEPSによる致死性不整脈抑制度はHbV群とwashed RBC群では同定度であった。EPSによる致死性不整脈誘発率もHbV群・washed RBC群で抑制されていた。

【結論】HbVは致死性の出血性ショック(85%血液交換モデル)の慢性期において抗不整脈効果の維持が認められた。その機序として, 心臓自律神経調整機能・心機能保持効果・貧血改善効果及び電気的リモデリング改善効果の継続が示唆された。

一般演題 2

O2-2 HemoAct™ の安全性・有効性評価(50%出血性ショックラットの蘇生試験)

○岡本 航¹, 長谷川舞¹, 白井朝音¹, 橋本 諒², 小野沢博登², 岩崎正之², 河野光智³, 小松晃之¹

¹中央大学理工学部, ²東海大学医学部, ³埼玉医科大学医学部
komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

【緒言】 HemoAct™はヒトヘモグロビン(HbA)に平均3分子のヒト血清アルブミン(HSA)を結合した人工酸素運搬体である(Fig. 1)¹。これまで、血液適合性試験、血中滞留性試験、安全性試験を行い、本製剤が人工酸素運搬体として十分な機能を兼ね備えていることを明らかにしてきた^{2,3}。さらに50%出血性ショックラットにHemoAct™を投与すると循環動態、血液ガスパラメーターが初期値まで回復することを明らかにした。一方、投与6時間後の生化学的試験より、肝臓へのわずかな負担が懸念された。そこで本研究では、50%出血性ショックラットにHemoAct™を投与し、7日後の血球数測定、生化学的検査から人工酸素運搬体としての安全性と有効性を評価することを目的とした。



Fig. 1 Structure of HemoAct™

【方法】 Wister系雄性ラット(約206g)にセボフルラン吸入麻酔下でカテーテルを左大腿動静脈に導入した。動脈カテーテルより全血液量の50%を脱血することで出血性ショック状態とし、15分後に静脈カテーテルより同体積のHemoAct™溶液([Hb]=5g/dL)を投与することにより蘇生した。蘇生後すぐに結紮、覚醒させ、7日間観察した。7日後に動脈血5mLを採血し、血球数測定、血液ガス分析、血液生化学検査を行った。

【結果と考察】 HemoAct™溶液で蘇生したラットは、7日後まで全例が生存し、一般状態に異常は認められなかった。50%脱血により初期値の半分に減少した赤血球数、ヘマトクリット値、Hb値は初期値と同程度まで回復した。腎機能の指標である血中尿素窒素はHemoAct™溶液投与6時間後に上昇したが、返血群と同程度であり、投与7日後には脱血前と同程度まで低下した。さらに肝機能の指標であるAST、ALT値はHemoAct™溶液投与6時間後に返血群よりわずかに上昇したが、投与7日後には脱血前と同程度まで低下し、肝臓への負荷は一時的であることがわかった。

【結論】 出血性ショックラットにHemoAct™溶液を投与し、7日後の血球数測定、生化学的検査からその人工酸素運搬体としての安全性と有効性を明らかにした。

【文献】

- 1) T. Komatsu, *et al.*, *ACS Omega* **2019**, *4*, 3228.
- 2) T. Komatsu, *et al.*, *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12778.
- 3) T. Komatsu, *et al.*, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2018**, *46*, S621.

一般演題 2

O2-3 抗酸化能を有するストロマフリーヘモグロビンナノ粒子(SFHbNP)の合成

○長谷川舞, 岡本 航, 小松晃之

中央大学理工学部

komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

【緒言】人工酸素運搬体の活性部位であるヘモグロビン(Hb)は自動酸化により徐々に酸素結合能を失う。さらに、出血性ショック後の再灌流時には活性酸素種(過酸化水素(H_2O_2), スーパーオキシドアニオンラジカル($O_2^{\cdot-}$))による再灌流障害が起こるため、Hbの酸化が促進される懸念がある。一方、赤血球からストロマ(赤血球膜)成分のみを除去したストロマフリーヘモグロビン(SFHb)溶液は、活性酸素種を不均化する内因性抗酸化酵素(カタラーゼ(Cat), スーパーオキシドディスムターゼ(SOD))を含有している。もし、SFHbを主成分とする粒径100nm程度の球状粒子を量産することができれば、抗酸化能を有する新しい人工酸素運搬体になると期待される。本研究は、SFHb微粒子の表面にヒト血清アルブミン(HSA)を結合したストロマフリーヘモグロビンナノ粒子(SFHbNP, Fig. 1)を合成し、その構造、酸素結合能、抗酸化能を明らかにすることを目的とした。

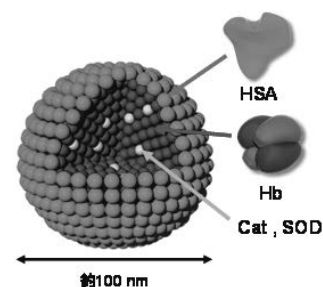


Fig. 1 Structure of HemoAct™

【方法】SFHb溶液に*N*-succinimidyl 3-maleimidopropionateを加え、タンパク質分子表面にマレイミド基を構築した後、架橋剤Dithiothreitolと反応させることによりSFHbを重合し、SFHbの微粒子を得た。微粒子の表面に残ったマレイミド基とHSAのCys-34を結合することでコア-シェル型のSFHbNPを合成した。得られたSFHbNPの構造解析を行うとともに、酸素結合能を評価した。また、 H_2O_2 水溶液中におけるoxySFHbNPのUV-Vis. スペクトル変化から2時間後のHb酸化率を算出し、安定性を評価した。

【結果と考察】動的光散乱法による粒径測定から、SFHbNPの粒径が約90nmであることを明らかにした。また、走査型電子顕微鏡観察からSFHbNPの球状構造を確認した。酸素親和性の指標である P_{50} は8Torr(pH7.4, 37°C), 協同性の指標であるHill係数(n)は1.4であり、ヒト血液(25Torr, 2.5)に比べ高い酸素親和性を示した。出血性ショック状態における低酸素組織への酸素輸送などに有効であると考えられる。

oxySFHbNPの H_2O_2 水溶液中(20 μ M, 25°C)における2時間後のHb酸化率は5%であり、HbコアからなるHbNP(51%)と比較して高い抗酸化能を示した。さらに再灌流時にみられる厳しい条件($[H_2O_2]=100\mu$ M)においても2時間後のHb酸化率は7%であり、酸素運搬能が維持されることがわかった。

【結論】粒径約90nmのSFHbNPを合成し、その構造と酸素結合能を明らかにした。SFHbNPは H_2O_2 水溶液中においても酸素運搬能を維持されることがわかった。SFHbNPは、きわめて高い抗酸化能を有する人工酸素運搬体である。

一般演題 2

O2-4 四分岐 PEG を用いたヘモグロビンハイドロゲルの構築

○松平 崇, 酒井宏水

奈良県立医科大学医学部化学教室

mattu@naramed-u.ac.jp

【緒言】 ヘモグロビン(Hb)をグルタルアルデヒドなどの低分子架橋剤でランダム重合して得られる重合 Hb を人工酸素運搬体として利用する研究が欧米を中心に行われているが、臨床試験において心血管性の重篤な副作用が発生した。この副作用は、低重合度の成分が内因性の NO を捕捉することが原因の一つと考えられており、Hb を高効率に重合する方法が実現すれば、副作用の低減が期待できる。私たちはこれまでの研究で、安定な $\alpha_2\beta_2$ 四量体構造を形成する Hb の β 鎖同士を両末端官能性の PEG で結合して、Hb がループ状に PEG 修飾された環状モノマーを合成し、開環重合させることで Hb と PEG が交互に結合した超分子ポリマーが得られることを見いだした^{1),2)}。さらに続いて、Lys-82(β) 同士を選択的に分子内架橋する試薬 bis-(3,5-dibromosalicyl) fumarate (DBBF) を用いて β サブユニット間を架橋することで、超分子ポリマーの Hb ユニットの共有結合で固定し、 $\beta\beta$ 架橋 Hb と PEG が交互重合した鎖状ポリマーを合成した^{1),2)}。本研究では、Hb の β 鎖間を結合する PEG リンカーに分岐構造を導入することで、鎖状の Hb-PEG ポリマー同士を架橋し、網目構造を有するヘモグロビンハイドロゲルを構築した。

【実験】 ヒト赤血球から単離された Hb に、架橋剤(DBBF)を反応させ、 $\beta\beta$ 架橋された Hb (xIHb)を合成した。末端にマレイミド基を有する分子量 10kDa の四分岐 PEG に対し、2 当量の Native Hb または xIHb を反応させ、(xI)Hb を介し PEG が網目状に架橋されたハイドロゲルを得た。

【結果と考察】 Hb または xIHb の濃度を変えて 10kDa の四分岐 PEG と反応させたところ、いずれも低濃度では溶液状態であったが、高濃度ではハイドロゲルが形成された。Native Hb から得られたゲル(Hb-PEG-gel)はリン酸緩衝溶液(PBS, pH 7.4)に溶解したのに対し、xIHb を原料として得られたゲル(xIHb-PEG-gel)は溶解せず、形状を保った。サイズ排除クロマトグラフィーおよび電気泳動法による分析の結果、Hb-PEG-gel は四分岐 PEG 同士が Hb ユニットの $\alpha\beta$ サブユニット間相互作用で可逆的に結合した、超分子ゲルであることが明らかになった。一方、xIHb-PEG-gel では高分子量化した β 鎖の成分の存在から、共有結合で架橋された化学架橋ゲルであることが確認された。本発表では、超分子ゲルである Hb-PEG-gel と、化学架橋ゲルである xIHb-PEG-gel の物理化学的性質について議論する。

【謝辞】 本研究は科研費(基盤 C, 課題番号 21 K12688)の補助を受けて進められた。

【文献】

- 1) Matsuhira, T., Yamamoto, K., and Sakai, H., *Biomacromolecules* **2019**, 20 (4), 1592-1602.
- 2) Matsuhira, T. and Sakai, H., *Biomacromolecules* **2021**, 22 (5), 1944-1954.

O2-5 肝再生不全に対する一酸化炭素搭載型細胞療法の再生促進効果

○野口勇夢¹, 前田仁志¹, 和田直樹¹, 田口和明², 柳澤洋輝¹, 金澤雅緯¹, 木下 学³, 酒井宏水⁴, 渡邊博志¹, 小田切優樹⁵, 丸山 徹¹

¹熊本大学薬学部薬剤学分野, ²慶應義塾大学薬学部薬効解析学講座, ³防衛医科大学免疫微生物学講座,

⁴奈良県立医科大学医学部化学教室, ⁵崇城大学薬学部

162p1042@st.kumamoto-u.ac.jp

【緒言】 肝臓は、肝障害や外科手術等による肝細胞喪失に対して強力な再生能を有している。しかしながら脂肪肝では、肝再生シグナルである Akt が抑制されることから、Akt シグナルの減弱に伴う肝再生能の低下が脂肪肝を進展させる要因として問題視されている。一方、一酸化炭素(CO)の吸入は Akt の活性化を介して健常肝切除後の肝再生を促進する¹⁾。そこで本研究では、赤血球(RBC)中のヘモグロビンに Akt シグナル活性化能を有する CO を結合させた CO-RBC を作成し、70%肝切除術(PH)を施術した健常及び脂肪肝モデルマウスに対する肝再生能を評価した。

【方法】 マウス精製赤血球に CO ガスをバブリングすることで、100%のヘモグロビンに CO が結合した CO-RBC を作製した。ICR マウスにおける 2 週間の高脂肪食(HFD)給餌により脂肪肝モデルを作成した。過剰量(200 μ M)のパルミチン酸をヒト肝癌由来細胞株(HepG2)に処置することで、脂肪肝を模倣した *in vitro* 評価系を確立した。

【結果と考察】 CO-RBC による肝臓への CO 送達能を評価したところ、CO-RBC を投与したマウスで健常肝、脂肪肝における CO 濃度が有意に増加した。70% PH を施術した健常マウスに CO-RBC を単回投与したところ、48 時間後における肝重量の増加、すなわち肝再生の促進が認められた。この時、CO-RBC 投与による Akt シグナルの亢進を認めたことから、CO-RBC は既報¹⁾の通り、CO による肝再生能を発揮することが確かめられた。脂肪肝で観察された肝重量の低下に対しても、CO-RBC の投与はその低下を有意に抑制したが、健常肝とは異なり Akt の活性化は認めなかった。肝再生は、その過程で膨大なエネルギーを必要とする。そこで、エネルギー産生系に着目し、70% PH 後の脂肪肝を解析したところ、エネルギー産生を司る AMP 活性化プロテインキナーゼ(AMPK)活性の低下による ATP レベルの減少を認めた。*in vivo* を模倣して HepG2 細胞に過剰量のパルミチン酸を添加したところ、脂肪肝と同様に AMPK の活性低下ならびに ATP レベルの減少を認めたことから、脂肪肝で蓄積した過剰量の脂質がこれらエネルギー産生系に影響を与えることが示された。一方、CO-RBC は上述した *in vitro*, *in vivo* の両評価系において、AMPK を活性化し、ATP レベルを回復させたことから、CO-RBC は脂肪肝再生時に低下したエネルギー産生系の正常化を介して、脂肪肝の再生を促進することが示された。

【結論】 肝再生の過程で必要なエネルギー供給を調節可能な CO-RBC は、肝再生不全に対する新規細胞療法としての可能性を秘めている。

【文献】

1) Kuramitsu K, et al., *Hepatology*. 2011 Jun; 53 (6): 2016-26.

一般演題 3

O3-1 動物用人工血漿増量剤としてのポリオキサゾリン修飾血清アルブミン (Aloxa™) の合成

○白井朝音¹, 岡本 航¹, 橋本 諒², 小野沢博登², 岩崎正之², 河野光智³, 田口和明⁴, 小松晃之¹

¹中央大学理工学部, ²東海大学医学部, ³埼玉医科大学医学部, ⁴慶応義塾大学薬学部
komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

【緒言】多くの先進国はペット大国であり, 例えば日本のイヌ・ネコ飼育頭数(1813万頭)は人間の子供(15歳未満)の人口(1493万人)をはるかに上回る。動物医療の現場では血漿増量剤としてヒドロキシエチルスターチ(HES)水溶液が使われている。しかし, HESは血中滞留時間が短く, 副作用(血液凝固障害, 腎機能障害, ショック, 血清アミラーゼ増加など)があるため, 新たな動物用人工血漿増量剤の開発に大きな期待が寄せられている。ポリオキサゾリン(POx)はポリエチレングリコール(PEG)よりも優れた免疫学的ストレス性を持ち, 体内に蓄積しない生体適合性の高い水溶性高分子である。本研究は, 入手が容易なブタ血清アルブミン(PSA)の分子表面にPOxを結合したPOx修飾PSA(製剤名“Aloxa™”, Fig. 1)を合成し, その安全性と有効性を明らかにすることを目的とした。

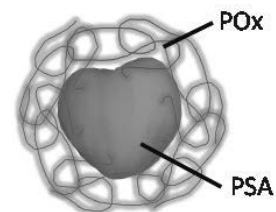


Fig. 1 Structure of Aloxa™.

【方法】PSAと末端スルフヒドリル基を有するPOx(POx-SH)を架橋剤*N*-Succinimidyl 3-maleimidopropionateで結合し, Aloxa™を合成した。ラット血液とAloxa™溶液を混合し, 経時的に血球数を測定することで血液適合性を評価した。Cy5.5で蛍光標識したAloxa™をラットに投与し, 血漿層の蛍光強度の減衰から血中滞留性を評価した。Aloxa™を投与したラットの血清に対してELISA測定を行い, 抗体産生の有無を評価した。ラット出血性ショックモデル(循環血液量の50%を脱血)を作成し, Aloxa™溶液投与による蘇生を行った。2時間後まで循環パラメーターを測定し, 動物用人工血漿増量剤としての有効性を評価した。

【結果と考察】Aloxa™を高収率(95%以上)で合成する方法を確立した。Aloxa™のサイズ排除クロマトグラムがPSAよりも高分子量側に現れ, 動的光散乱法により求めた粒径(13.4nm)がPSA(7.8nm)よりも増大したことから, PSAにPOxが導入されていることを確認した(POx結合数:約6本)。Aloxa™の膠質浸透圧は36mmHgであり, 5% HSA溶液(20mmHg)の1.8倍となった。血液とAloxa™を混合しても6時間後まで血球数の変化はなかった。血中消失半減期は15時間であり, PSAの2倍に延長された。ラットにAloxa™を投与しても抗PSA抗体の産生はごくわずかで, POxの高い免疫学的ストレス性が明らかとなった。ラットの平均動脈血圧(MAP)は50%脱血により30mmHg程度まで低下したが, Aloxa™溶液の投与により初期値と同程度まで回復し, HES群と比較して有意に高い値を推移した。

【結論】PSAの分子表面に約6本のPOxを結合したAloxa™を合成した。ラットを用いた動物実験からAloxa™の優れた血液適合性, 血中滞留性, 安全性, 有効性を明らかにした。Aloxa™は動物用人工血漿増量剤として実用可能な製剤であり, 今後イヌを用いた安全性・有効性試験に進む。

一般演題 3

O3-2 アルブミンを用いたエダラボンナノ DDS 戦略の構築と肝疾患治療への応用

○安田健吾¹, 木下 遼¹, 前田仁志¹, 皆吉勇紀¹, 櫻木美菜², 山崎啓之³, 水田夕稀¹, 異島 優⁴, 石田竜弘⁴, 渡邊博志¹, 丸山 徹¹

¹熊本大学大学院 薬学教育部 薬剤学分野, ²崇城大学 工学部 ナノサイエンス学科, ³崇城大学 薬学部 薬学動態研究室,

⁴徳島大学 医歯薬学研究部 薬物動態制御学分野

208y1008@st.kumamoto-u.ac.jp

【緒言】 ヒト血清アルブミン(HSA)は生体内に豊富に存在する生理活性タンパク質である。HSA を基盤としたナノ DDS キャリアの一つに HSA ナノ粒子が挙げられ、Abraxane[®] に代表されるアルブミン製剤は生体適合性の高いナノキャリアとして広く用いられている。本研究では、HSA ナノ粒子にフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンを搭載した HSA ナノ粒子(EeNA: Edaravone-encapsulated Nano-spherical Albumin)の作製を試み、その動態特性と酸化ストレス疾患に対する有用性を評価した。

【方法】 還元型グルタチオン(GSH)を用いて分子内ジスルフィド結合を解離した HSA に対してエダラボンを添加し EeNA を作製した。Concanavalin-A (Con-A, 12.5 mg/kg)を尾静脈投与して急性肝障害モデルマウスを作成した。

【結果と考察】 透過型電子顕微鏡により、EeNA 粒子の球状形態を確認した。細胞内還元環境を模倣した GSH 存在下で、EeNA は自身の粒子構造を崩壊させ、搭載したエダラボンを放出した。ROS の蛍光プローブである CM-H₂DCF を用いた検討から、マクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞に過酸化水素を処理し生じた細胞内 ROS に対し、EeNA は高い ROS 除去活性を確認した。EeNA は投与後速やかに血中から消失し肝臓へ移行した後、肝マクロファージであるクッパー細胞へ移行した。さらに、Con-A 投与により作成した急性肝障害マウスにおいて認められる血漿中 ALT 及び AST 値の上昇を、EeNA は有意に抑制した。この優れた肝保護効果は、EeNA がクッパー細胞へ移行し、細胞内還元環境によりエダラボンを放出した結果であると推察される。

【結論】 EeNA は細胞内還元環境に依存してエダラボンを放出し、崩壊したレドックスバランスを改善可能な新規ナノ抗酸化剤である。今回作成した HSA ナノ粒子は様々な低分子化合物を搭載可能であるため、多種多様な疾患に対するナノ DDS 戦略のプラットフォームとなりうる。

一般演題 3

O3-3 血小板代替リポソーム投与後の肝チトクローム P450 プロファイルの定量的および定性的評価

○橋本麻衣¹, 田口和明², 武岡真司³, 丸山 徹⁴, 山崎啓之¹, 小田切優樹¹

¹ 崇城大学薬学部, ² 慶應義塾大学薬学部, ³ 早稲田大学先進理工学研究科, ⁴ 熊本大学薬学部
mhashi@ph.sojo-u.ac.jp

【緒言】 H12-(ADP)-liposome は、リン脂質二重膜表面にフィブリノーゲン γ 鎖 C 末端 (H12) を担持し、内部に ADP を内包した血小板代替物であり、血小板輸血に匹敵する止血効果を有することが報告されている。これまでに我々は H12-(ADP)-liposome が良好な薬物動態特性を有していることを明らかにしてきたが、H12-(ADP)-liposome が投与される状況下では、H12-(ADP)-liposome 同時もしくは投与後に他の治療薬も使用すると考えられる。そのため薬物動態特性に加え、薬物相互作用についても検討する必要がある。近年、ポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソームの投与が一部の肝チトクローム P450 (CYP) 分子種の発現や活性に影響を与えるという報告があり、PEG 修飾リポソームである H12-(ADP)-liposome 投与時においても同様に CYP の発現及び活性に影響を与える可能性がある。これらの背景のもと、H12-(ADP)-liposome 投与時の肝 CYP の定量的及び定性的な変化について評価を行った。

【方法】 健常ラットに生理食塩水及び H12-(ADP)-liposome (10mg lipids/kg) を投与後 24 時間に肝臓を採取した。採取した肝臓より肝ミクロソームを調製し、western blotting により CYP (CYP1A2, CYP2C11 及び CYP3A4) のタンパク質発現を、ex vivo 代謝活性アッセイにより CYP (CYP1A2, CYP2C11 及び CYP3A4) の代謝活性を評価した。

【結果と考察】 western blotting の結果、生理食塩水投与群と H12-(ADP)-liposome 投与群において、CYP (CYP1A2, CYP2C11 及び CYP3A4) のバンド強度に変化はなく、CYP3 分子種のタンパク質発現に影響を与えないことが示された。また、CYP (CYP1A2, CYP2C11 及び CYP3A4) の代謝活性についても生理食塩水投与群と H12-(ADP)-liposome 投与群に違いは認められなかった。以上の結果より、H12-(ADP)-liposome 投与 24 時間後までは少なくとも CYP1A2, CYP2C11 及び CYP3A4 の発現量及び活性に変化はなく、上記 CYP で代謝される薬物との同時投与に H12-(ADP)-liposome 投与しても薬物間相互作用は起こらないと考えられる。しかしながら、H12-(ADP)-liposome の反復投与などが CYP の発現や活性に影響を与える可能性は否定できないことから、今後、さらなる検討が必要である。

【結論】 健常ラットにおいて、H12-(ADP)-liposome 投与 24 時間後の CYP (CYP1A2, CYP2C11 及び CYP3A4) に定量的及び定性的変化は認められなかった。

一般演題 3

O3-4 ポルフィリン鉄錯体とシクロデキストリン二量体から構成される人工ヘモグロビンの構築と生体内ガスの吸着試薬としての利用

○北岸宏亮, 毛 齊悦

同志社大学理工学部

hkitagis@mail.doshisha.ac.jp

生体内には様々な種類のヘムタンパク質が存在する。補因子であるヘム自体(フリーヘム)は生体機能を示さず、活性酸素の産生などむしろ生体毒として作用するが、タンパク質に内包されることで適切な環境が用意されてはじめてヘムタンパク質としての機能を果たす。すなわち、ヘムの機能発現のためには適切な周辺環境を提供することが肝要である。我々はこのようなタンパク質部分が提供する環境について、メチル化シクロデキストリン二量体を用いることで再現するバイオミメティック化学に取り組んできた^{1,2)}。2つのメチル化シクロデキストリンをピリジンやイミダゾールなどの適切な配位子で連結した二量体は、水中でポルフィリン鉄錯体と安定な包接錯体を形成し、超分子ヘモグロビンモデル錯体として機能する。我々はこの超分子錯体を hemoCD と総称し、シクロデキストリンの構造を様々に変えることによって、生体内 CO 除去剤²⁾や、シアンガスの選択的除去方法について詳細に研究してきた¹⁾。本講演では、我々の研究室において開発した超分子ヘモグロビンモデル錯体 hemoCD の生体内ガスの吸着試薬としての基礎物性および現在取り組んでいる医薬学分野における応用展開について述べる。

【文献】

- (1) H. Kitagishi, K. Kano, Synthetic heme protein models that function in aqueous solution. *Chem. Commun. (Feature Article)* **2021**, 57, 148-173.
- (2) Q. Mao, A. T. Kawaguchi, S. Mizobata, R. Motterlini, R. Foresti, H. Kitagishi, Sensitive quantification of carbon monoxide (CO) in vivo reveals a protective role of circulating hemoglobin in CO intoxication. *Commun. Biol.* **2021**, 4, 425 (15 pages).

一般演題 3

03-5 COVID-19 感染拡大下での赤血球製剤の献血および医療機関への供給の実態に関する研究

○三柴智英, 武岡真司

東京女子医科大学・早稲田大学 共同先端生命医科学専攻
tomo348@akane.waseda.jp

【緒言】 COVID-19 の感染拡大に伴い、献血イベントは中止を余儀なくされ、2020年2月下旬より献血者数の減少が懸念された(1)。血液製剤の中で最も多く使用され、保存期間から COVID-19 感染拡大下での影響を反映しやすく、全血献血血液により製造される赤血球製剤に着目し、COVID-19 感染拡大下での日本赤十字社での全血献血量、赤血球製剤の製造および供給について調査することで、COVID-19 感染拡大下での赤血球製剤の輸血が関係する医療にどのような影響があったかを評価する。

【方法】 2020年1月から2020年9月までの日本赤十字社のホームページ上に掲載されている、および日本赤十字社からご提供いただいた、全血献血および赤血球製剤の製造および供給のデータをもとに、COVID-19 感染拡大下での全血献血および赤血球製剤の輸血の現状を調査した(2)。

【結果と考察】 全国の全血献血者数および全血献血推計量は、2020年1月と比較して、2020年2月に減少、2020年3月に増加、2020年4-7月に減少し、2020年8月には2020年1月と同程度まで回復していた。全国の医療機関の赤血球製剤の供給量は、2020年1月と比較して、2020年2月に減少、2020年3月に同程度まで回復、2020年4-5月に減少し、2020年6月には再び同程度まで回復していた。全国の赤血球製剤のブロック間の授受の総本数は、2020年1月と比較して、2020年3月、2020年5-6月に増加していることがわかった。

【結論】 COVID-19 感染拡大下で、全血献血者数および全血献血推計量が時々刻々と変化する状況であったが、医療機関での赤血球製剤の使用量の調整、およびそれに伴う日本赤十字社の各ブロックでの赤血球製剤の在庫量の調整が行われた。その結果、COVID-19 感染拡大下でも赤血球製剤の在庫が枯渇することなく、安定的に医療提供を行うことができたと考えられる。

【文献】

- 1) 新型コロナウイルス感染拡大に伴う血液製剤供給不足に対する緊急提言 令和2年4月17日
- 2) 日本赤十字社 <http://www.jrc.or.jp/activity/blood/data/> 2021年6月26日時点

O3-6 Development of bioinspired perfluorocarbon-based oxygen carriers with concave shape and deformable shell

○ Xiaoting Fu¹, Seiichi Ohta¹, Takahiro Kawakatsu³, Masamichi Kamihira⁴, Yasuyuki Sakai¹ and Taichi Ito^{1,2}

¹Departemnt of Bioengineering, ²Center for Disease Biology and Integrative Medicine, The University of Tokyo

³Kurita Water Industries Ltd. ⁴Department of Chemical Engineering, Kyushu University

taichi@m.u-tokyo.ac.jp

[Introduction] Human red blood cells (hRBCs) possess a unique biconcave structure with a highly deformable cell membrane and condensed cytosol hemoglobin for oxygen delivery. As an alternative of hRBCs, perfluorocarbon (PFC)-based artificial oxygen carriers (OCs) have gained attentions and intensive studies. Inspired by hRBCs, we have, for the first time, developed concave-shaped, deformable PFC-based OCs (cDFCs) using the Shirasu porous glass (SPG) membrane emulsification. cDFCs have a perfluorooctyl bromide (PFOB) core of high oxygen solubility and poly(lactide-co-caprolactone) (PLC) shell with high deformability. Their properties as OCs were examined.

[Experiments] 61 μ L PFOB and 30 mg PLC were dissolved in 2 mL dichloromethane (DCM) as a dispersed phase, and then emulsified in 20 mL 2% polyvinyl alcohol (PVA) aqueous solution by SPG membrane. The obtained (O-F)/W emulsions (O-F: PFC dissolved in oil) were stirred at room temperature for 4 h to completely remove DCM. The obtained particles (DFCs) were then immersed in a mixture of isopropanol (IPA) and pure water, and slowly stirred for 12 h to induce the shape change to obtain cDFCs.

[Results and Discussion] cDFCs were successfully fabricated by batch-to-batch processes of SPG membrane emulsification, evaporation, and solvent immersion. Similar to the structure of hRBCs, cDFC had a unique concave shape with size around 8 μ m, constructed by a PFOB-core and deformable PLC-shell. Owing to their deformable shell and concave structure, cDFCs successfully passed through a 4.5- μ m-gap silicon microchannel as a blood capillary model. Enhanced oxygen supply to multiple layered cells was also demonstrated, indicating their efficiency as OCs.

[Conclusion] We have successfully prepared PFC-based OCs with concave shape and deformable shell. The obtained OCs were highly deformable with efficient oxygen supply to cultured cells.

Applicability of Hemoglobin Vesicles as Transplantable Liver Perfusion Preservation Solution

Hiroyoshi Iwata^{1,2)}, Asuka Toriumi²⁾, Daisuke Ishii²⁾, Akinori Yamamoto³⁾,
Yuki Sato³⁾, Hiroyuki Takahashi¹⁾, Hideki Yokoo¹⁾, Hiromichi Obara³⁾,
Yuji Nishikawa⁴⁾, Hiromi Sakai⁵⁾, Naoto Matsuno*^{1,2)}

Abstract

We herein report the application of hemoglobin vesicles (HbVs) contained with organ preservation solution, as an artificial oxygen carrier (AOC) solution for split-liver grafts. The aim of this study was to clarify whether or not the use of HbVs-containing preservation solution during machine perfusion (MP) improves the split-liver graft function. Porcine split-liver grafts were created via 75% liver resection. MP system (CMP-X04W; Chuo Seiko, Asahikawa, Japan) experimental groups were divided as two groups. 1. Subnormothermic machine perfusion (SNMP) group: liver grafts were perfused with SNMP (n = 3). 2. SNMP+AOC group: liver grafts were perfused with SNMP using HbVs-containing solution. After four hours of preservation, the liver function was evaluated using an isolated liver reperfusion model. During MP, the changes of hepatic artery (HA) and portal vein (PV) resistance in the SNMP+AOC group were decreased and maintained at low levels than the SNMP group. The liver enzyme levels aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) during MP were lower than the SNMP group. Histological findings showed edema and aggregation around the sinusoid was worsened in the SNMP group. In conclusion, SNMP with AOC solution could alleviate hepatocellular reperfusion injury in the donor liver. Oxygenated SNMP using AOC appears to be a promising preservation method that may improve the functional recovery of marginal split-liver.

Key words

Subnormothermic machine perfusion, machine perfusion preservation, liver preservation, human derived hemoglobin vesicles, artificial oxygen carrier, isolated liver reperfusion model

Introduction

Hemoglobin vesicles (HbVs) are artificial oxygen carriers (AOC) encapsulating a purified and concentrated hemoglobin solution in phospholipid vesicles, like red blood cells (RBCs)¹⁾. The characteristics of HbVs included no blood type, protection against infection due to pasteurization and nanofiltration, protection against the toxic effects of molecular hemoglobin, and stability and biocompatibility²⁾. On the other hand, with

the increasing number of patients waiting for liver transplantation, donor shortage has become a serious problem. Split-liver transplantation is an important method that can increase the available donor pool; however, this can create two extended-criteria grafts and increase the risk of transplant failure³⁾. Split-liver grafts may be regarded as marginal grafts because of their small size and the degree of incurred injury due to liver splitting, particularly when utilizing the *ex*

1) Department of Hepato-Biliary-Pancreatic and Transplantation Surgery, Asahikawa Medical University

2) Department of Transplantation Technology and Therapeutic Development, Asahikawa Medical University

3) Department of Mechanical System Engineering, Tokyo Metropolitan University

4) Department of Pathology, Asahikawa Medical University

5) Department of Chemistry, School of Medicine, Nara Medical University

*Corresponding Author: Asahikawa Medical University

2-1-1 Midorigaoka Higashi, Asahikawa City, Hokkaido, 078-8510 Japan

論文受付 2021年7月30日 論文受理 2021年8月3日

vivo split procedure⁴). Thus, the use of marginal donor livers is associated with a high risk of primary graft dysfunction or severe ischemic injury and can lead to poor outcomes. We reported higher hepatocyte injury and vascular resistance during reperfusion with split-liver grafts as compared to those with whole liver grafts⁵.

Over the past 10 years, it has become clear that machine perfusion (MP) preservation is a more useful and beneficial than simple cold storage (CS)⁶⁻⁹. In MP, oxygen, electrolytes, and nutritional elements are continuously provided and harmful metabolites are washed out. Therefore, MP can help maintain, recover, and evaluate graft functions instead of conventional static CS¹⁰. In fact, in exposure of ischemic tissue to oxygen under any temperature, oxygen delivery even under cold conditions turned out to be very effective in increasing cellular energy with only minor oxidative stress¹¹. On the other hand, normothermic machine perfusion (NMP) requires high level of oxygen and continuous control of anticoagulant. Subnormothermic machine perfusion (SNMP) at around 22°C–25°C needs lower level of oxygen carrier compared to NMP.

We herein report the application of HbVs contained to commercially available organ preservation solution, as an oxygen carrier solution for split-liver grafts in SNMP. The aim of this study was to clarify whether or not the use of HbVs-containing preservation solution during MP at room temperature improves the split-liver graft function.

Materials and Methods

Animals

Domestic female cross-bred Large-Yorkshire, Landrace, and Duroc pigs (approximately 25 kg, 2–3 months of age) were purchased from Daisetsusanrokusya (Asahikawa, Japan). Pigs were brought into the gauge 3–4 days before the experiment and fed 1.2–1.5 kg of food each day. The gauge was equipped with an automatic water supply system. The floor was made of wire mesh, and excrement was cleaned out twice a day. Starting at 12 hours before the experiment, fasting management was performed in order to ensure the safe administration of general anesthesia. Excision procedures were conducted under inhalation anesthesia with isoflurane (Forane VR; Abbot Japan, Tokyo, Japan). All efforts were made to minimize suffering. After confirming that sedation had been sufficiently achieved, a midline abdominal incision was made, and the animal was prepared for liver exposing. Surgical procedure was done as follows⁵.

i. The right common iliac artery was isolated, and a 14-Fr Nelaton catheter (Terumo, Tokyo, Japan) was inserted into the vein to procure approximately 1000 mL of autologous whole blood.

- ii. In preparation for liver exposure, the hepatic artery (HA), portal vein (PV), bile duct, and both upper and lower parts of the hepatic inferior vena cava were dissected and taped.
- iii. The abdominal aorta was cross-clamped to start the period of warm ischemia. At the same time, cardiac arrest was induced with intravenous potassium chloride (2 mEq/kg). No heparin was administered prior to cardiac arrest.
- iv. Standard bench preparation was performed. Cannulation of the portal and arterial systems was accomplished using our original plastic perfusion cannulas of appropriate size. The isolated liver was washed with 1000 mL of Euro-Collins solution (Kyowa CritiCare, Atsugi, Japan) at 4°C.
- v. Porcine split-liver grafts were created via 75% liver resection.

All animal experiments were conducted according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals at Asahikawa Medical University. All animal studies and procedures were approved by Asahikawa Medical University Animal Research Committee (permit no. 14172).

Perfusion preservation machine (Fig. 1)

MP system (CMP-X04W; Chuo Seiko, Asahikawa, Japan) (Fig. 1) was developed in our institute. The perfusion pressure was controlled at 5–8 mmHg for the PV and 30–50 mmHg for the HA by adjusting the flow rate. The perfusion fluid was a histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) base solution at 8°C–10°C. The partial pressure of oxygen in the perfusate was controlled at 250 mmHg (FiO₂ of 0.4 at 2 L/min). The perfu-



Figure 1 Perfusion preservation machine
Machine perfusion system (CMP-X04W; Chuo Seiko, Asahikawa, Japan) was developed in our institute.

sion time was set at four hours.

An oxygenator (HP0-06 H-C; Senko Medical Instrument, Tokyo, Japan) was installed in the circuit for the PV and HA. Two optical oxygen sensors (NeoFox; Ocean Optics, Seattle, FL, USA) were installed to measure the oxygen concentration of the perfusate in the PV circuit. The temperature of the perfusate was controlled by a heat exchanger. The blending of oxygen and air was controlled with using the air blender of the oxygenator. The oxygen concentration was maintained to hold the minimum dissolved oxygen concentration for the calculation of the oxygen consumption at the outlet port.

Isolated liver perfusion (ILP)

After preservation, the liver function was evaluated using an isolated liver reperfusion model¹²⁾ for two hours. This system consisted of PV and HA perfusion circuits, with each circuit comprising a roller-type pump (Masterflex 7520-40; Cole-Parmer, Bunker Court, IL, USA), electrical flow meter (VN05; Aichi Tokei, Aichi, Japan for the PV; FD-SS02; Keyence, Osaka, Japan for the HA), ceramic capacitive pressure sensor (KL76; Nagano Keiki, Nagano, Japan), and an air trap that was developed in-house. An oxygenator (HP0-06 H-C; Senko Medical Instrument, Tokyo, Japan) was installed in the circuit for the PV and HA. PV reperfusion was set at 5–8 mmHg and HA reperfusion was set at 80 mmHg, which are automatically maintained by a roller pump connected to a pressure sensor placed in the inflow line immediately before the arterial cannula. The reperfusion fluid was autologous whole blood containing 30 mL of calcium gluconate hydrate (8.5%) and heparin. The livers were subsequently re-perfused with oxygenated diluted autologous blood at 38°C. The hematocrit was maintained at approximately 10%–12%. The oxygenator was regulated to achieve physiological blood gas values (pO₂, approximately 150–200 mmHg; pCO₂, approximately 30–50 mmHg) for the ILP using a blood gas analyzer (ABL800 FLEX; Radiometer, Tokyo, Japan).

Viability assessment during MP

i. Machine perfusion preservation phase

The blood gas and lactate concentrations in perfusate were measured using the iStat program (Abbott, Chicago, NJ, USA). To assess tissue damage, aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) were analyzed. A blood gas analysis was performed to assess the electrolyte (Na, K, Ca and Cl), lactate and glucose concentrations, and acid/base physiology (pH, pO₂, pCO₂, HCO₃⁻ and base excess). Lactate was measured as a marker of metabolic disorders. The PV and HA pressure were monitored.

ii. Reperfusion phase in ILP

AST and LDH and alkaline phosphatase (ALP) in the perfusate were measured at every 60 min for the ILP for two hours to determine the viability of preserved liver grafts using standard biochemical methods (clinical grade).

iii. Histology

Tissue samples were collected to assess hepatocellular injury after reperfusion. Liver biopsy was performed at the end of the study. All liver samples were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned (5 mm) and stained with hematoxylin and eosin for histological evaluation after preservation and reperfusion.

Experimental design

Two experimental groups were performed in the present study.

- i. SNMP group: liver grafts were perfused with SNMP for four hours (n = 3).
- ii. SNMP+AOC group: liver grafts were perfused with SNMP using HbVs-containing solution for four hours (n = 3). HbVs was prepared from a purified human hemoglobin solution and four kinds of lipids as reported previously¹⁾. Human hemoglobin was purified, via pasteurization and nanofiltration for virus inactivation and removal, from nucleic acid amplification testing-inspected RBCs provided by the Japanese Red Cross. We utilized HbVs which were stored in a deoxygenated condition for 18–20 months in a refrigerator¹³⁾. HbVs were contained into 500 mL of HTK solution (Dr. Franz Köhler Chemie GMBH, Bensheim, Germany), 250 mL of 5% albumin (Nihon Pharmaceutical, Tokyo, Japan), vitamin (Vitaject®; Terumo, Tokyo, Japan), 200 mL of amino acid (Hikarilevan®; Nihon Pharmaceutical, Tokyo, Japan), 1000 mg of glutathione (Choseido Pharmaceutical, Tokushima, Japan), 50 units of fast-acting insulin human (Novo Nordisk Pharma, Tokyo, Japan), 250 mg of methylprednisolone sodium succinate (Pfizer, Tokyo, Japan) and 20 mL of 8.4% sodium bicarbonate (Otsuka Pharmaceutical Factory, Naruto, Japan).

Result

i. PV and HA resistance during MP (Fig. 2a, 2b)

In the SNMP group, the PV resistance was 0.018 ± 0.01 mmHg/ml/min/100g at 120 min and 0.017 ± 0.01 mmHg/ml/min/100g at 240 min. The value in the SNMP+AOC group was 0.044 ± 0.02 mmHg/ml/min/100g at 120 min and 0.047 ± 0.02 mmHg/ml/min/100g at 240 min. In the SNMP group, the HA resistance was 0.57 ± 0.27 mmHg/ml/min/100g at 120 min and 0.59 ± 0.28 mmHg/ml/min/100g at 240 min. In the SNMP+AOC group, the HA

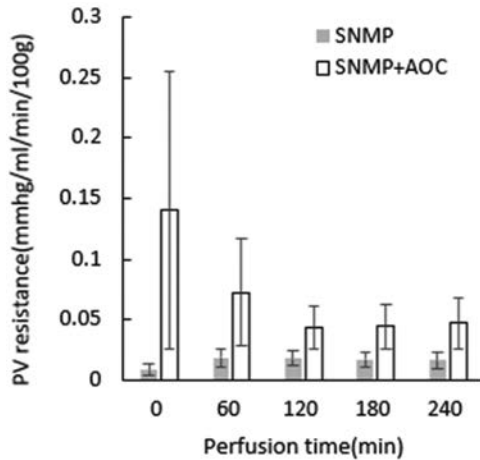


Figure 2a PV resistance

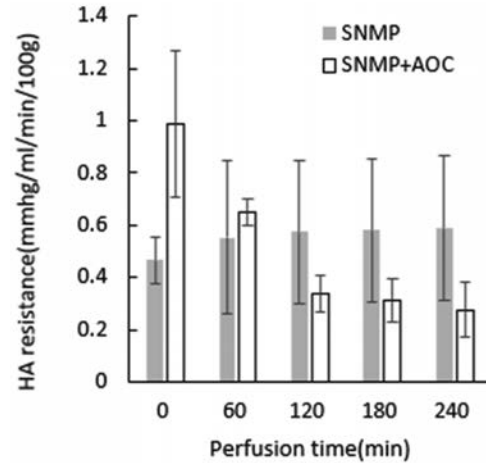


Figure 2b HA resistance

Figure 2 Vascular resistance during MP

(2a) Portal vein (PV) resistance (mg/min/100g liver) and (2b) hepatic artery (HA) resistance (mg/min/100g liver) value (mean \pm standard deviation) during machine perfusion. SNMP, Subnormothermic machine perfusion; AOC, artificial oxygen carrier.

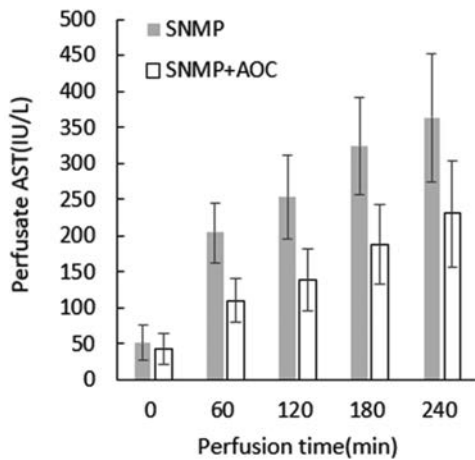


Figure 3a AST

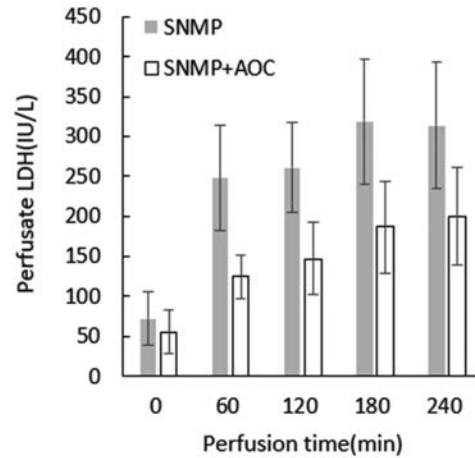


Figure 3b LDH

Figure 3 The liver enzyme levels in perfusate after MP

(3a) Aspartate aminotransferase (AST) (IU/L) and (3b) lactate dehydrogenase (LDH) (IU/L) value (mean \pm standard deviation) after machine perfusion. SNMP, Subnormothermic machine perfusion; AOC, artificial oxygen carrier.

resistance was 0.34 ± 0.07 mmHg/ml/min/100g at 120 min and 0.27 ± 0.11 mmHg/ml/min/100g at 240 min. However, the changes of these resistance were decreased in SNMP+AOC group. These results showed that the SNMP+AOC group was hemodynamically stable during MP. But there was no significant difference between the two groups.

ii. The liver enzyme levels in perfusate after MP (Fig. 3a, 3b)

In the SNMP group, the AST level after 120 and 240 minutes of perfusion preservation was 253 ± 57.9 IU/L and 363 ± 89.2 IU/L, respectively. In the SNMP+AOC group, the AST level after 120 and 240 minutes of perfusion preservation was 139 ± 43.9 IU/L and 230 ± 73.3 IU/L,

respectively. In the SNMP group, the LDH level after 120 and 240 minutes of perfusion preservation was 260 ± 56.5 IU/L and 314 ± 79.7 IU/L, respectively. In the SNMP+AOC group, the LDH level after 120 and 240 minutes of perfusion preservation was 147 ± 45.4 IU/L and 200 ± 61.0 IU/L, respectively, which was lower than that of the SNMP group.

iii. Oxygen consumption during ILP (Fig. 4)

In the SNMP+AOC group, the oxygen consumption at 120 minutes of reperfusion preservation was 198.5 ± 189.7 mg/min/100g liver compared to 97.7 ± 3.3 mg/min/100g liver in SNMP group. Oxygen consumption during reperfusion was higher in the SNMP+AOC group compared to the

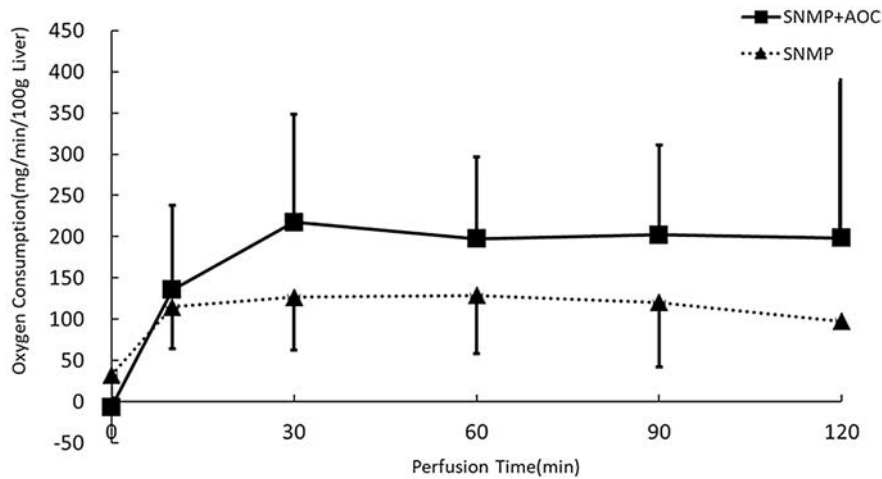


Figure 4 Oxygen consumption during ILP
Oxygen consumption (mg/min/100g liver) during isolated liver reperfusion model. SNMP, Subnormothermic machine perfusion; AOC, artificial oxygen carrier.

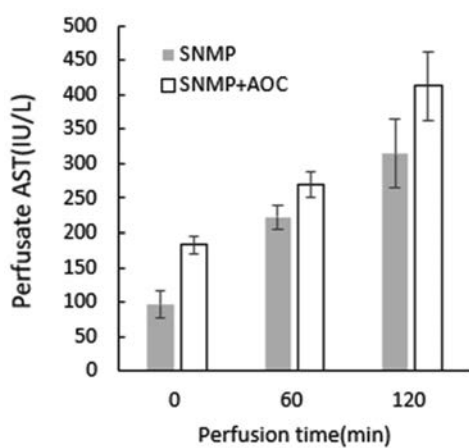


Figure 5a AST

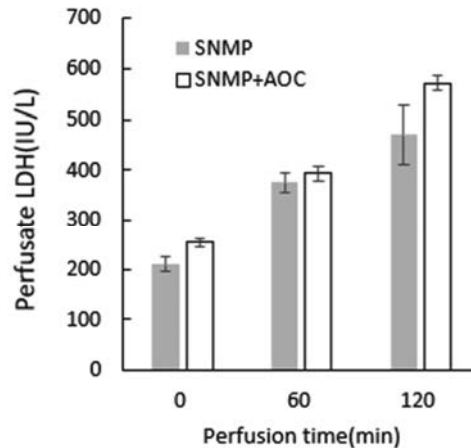


Figure 5b LDH

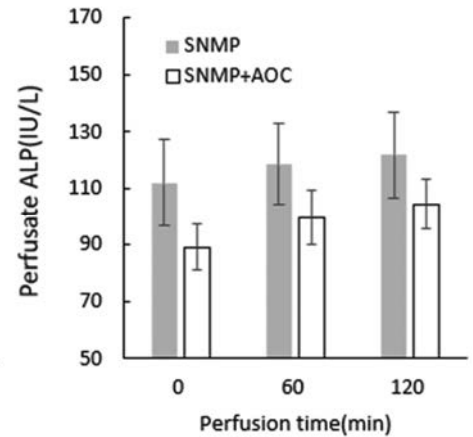


Figure 5c ALP

Figure 5 The liver enzyme levels in perfusate after reperfusion in ILP

(5a) Aspartate aminotransferase (AST) (IU/L), (5b) lactate dehydrogenase (LDH) (IU/L) and alkaline phosphatase (ALP) (IU/L) value (mean \pm standard deviation) after isolated liver reperfusion model. SNMP, Subnormothermic machine perfusion; AOC, artificial oxygen carrier.

SNMP group.

iv. The liver enzyme levels after reperfusion in ILP (Fig. 5a, 5b)

In the SNMP+AOC group, the AST level was 412 ± 49.1 IU/L after 120 minutes of reperfusion. In the SNMP group, the AST level was 315 ± 50 IU/L after 120 minutes of reperfusion was lower than SNMP+AOC. In the SNMP+AOC group, the LDH was 572 ± 14.6 IU/L after 120 minutes of reperfusion. In the SNMP group, the LDH level was 470 ± 57.2 IU/L after 120 minutes of reperfusion, which was lower than that of the SNMP+AOC group. However, there was no significantly difference. But, the ALP level was 105 ± 9.0 IU/L after 120 minutes of reperfusion in SNMP+AOC group was lower than that of the SNMP group which was

122 ± 15.0 IU/L.

v. Histology (Fig. 6a, 6b)

The comparison of the SNMP group revealed that disorder around the central vein were suppressed in the SNMP+AOC group. Edema and aggregation around the sinusoid were worsened in the SNMP group. In the SNMP+AOC group, no HbVs remained at the end of reperfusion.

Discussion

In this study, organ preservation solution contained HbVs was demonstrated the beneficial effects, particularly during MP. The characteristics of HbVs include no blood type and a long storage life. HbVs are 250 nm in size, which means they

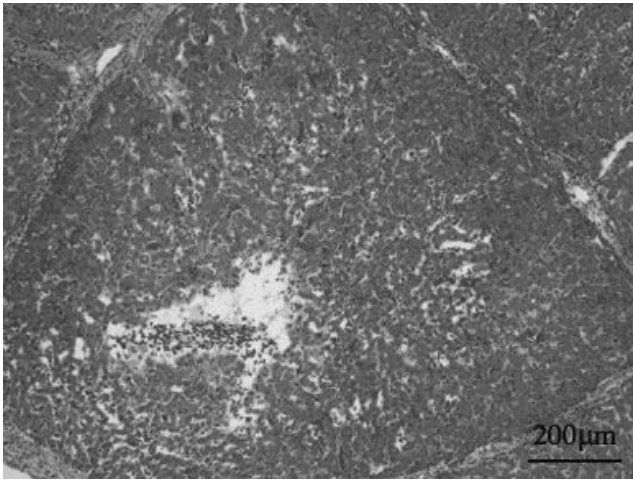


Figure 6a SNMP group

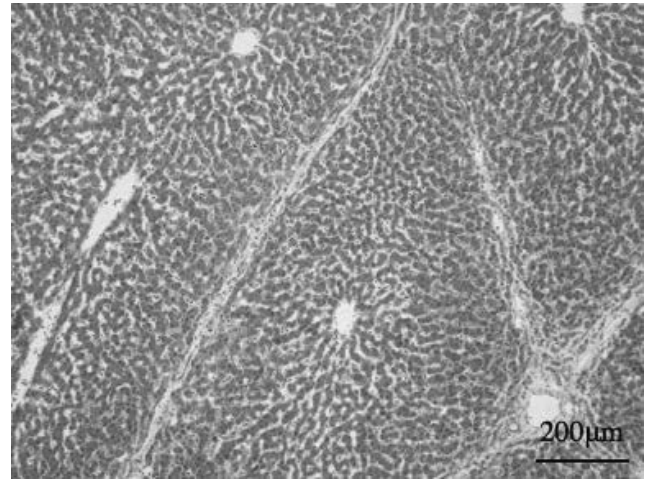


Figure 6b SNMP+AOC group

Figure 6 Histological findings

In the SNMP+AOC group (6b), disorder around the central vein and, edema and aggregation around the sinusoid were suppressed compared to the SNMP group. SNMP, Subnormothermic machine perfusion; AOC, artificial oxygen carrier.

cannot pass through the liver sinusoid. The additional advantages of the HbVs had unlimited availability, a long storage period, and low risk of disease dissemination^{14, 15}. HbVs are AOC created using expired RBCs¹, and they have demonstrated stability, encapsulation efficiency, and biocompatibility².

As shown in Fig. 2, the changes of PV and HA resistance in the SNMP+AOC group were decreased compared to the SNMP group. AST and LDH levels in the SNMP+AOC group during MP showed relatively lower than the SNMP group. ALP after reperfusion demonstrated lower in the SNMP+AOC group which may protect bile duct injury as shown Fig. 5c. As shown in Fig. 4, higher oxygen consumption after reperfusion demonstrated in SNMP+AOC group. Additionally, the histological findings, as shown in Fig. 6 revealed that hepatocyte integrity was well maintained and less lipid form in the SNMP+AOC group. From these results, AOC may support the active metabolism for liver preservation in the room temperature condition.

Traditional methods of preservation based on hypothermia may not be best for marginal liver grafts because organs from such a marginal graft have already suffered from tissue damage secondary to hypoxia. Additional cold storage damage to the organ caused by hypothermic conditions may limit the ability to improve cellular function because metabolic activity is decreased in the cold. Cold-induced preservation injury makes insufficiently normal cellular metabolic function or induces the depletion of energy stores or the deleterious direct effects of cooling^{16, 17}. On the other hand, the principle of normothermic perfusion is to recreate the physiological environment by maintaining a normal temperature and

providing the essential substrates for cellular metabolism, oxygenation, and nutrition. In addition to a reduction in ischemia-reperfusion injury, a further potential advantage of normothermic perfusion is the assessment of viability: because the organ is metabolically active, it is possible to measure its function and to predict the post-transplant outcome. However, the use of blood-based perfusates may increase the risk of microvascular failure and sinusoidal plugging and bacterial growth. Achieving normothermic organ preservation therefore remains a challenging problem.

Our previous study showed that the oxygen consumption was related to the preservation graft temperature and associated with liver injury¹⁸. Therefore, oxygen should be added effectively to be used by the liver grafts during MP. SNMP itself, may be effective for reducing the rates of reperfusion injury and shear stress. However, SNMP without any oxygen carrier cannot support metabolic disorders. In recent years, there have been some reports on the use of oxygen carriers for perfusion of the donor liver. Fontes et al.¹⁹ performed liver transplantation after SNMP with Hemopure 1 in a pig model. This artificial hemoglobin was demonstrated to improve the oxygen carrying ability. In the present study, we investigated the influence of SNMP with AOC as oxygen carrier during MP and isolated liver reperfusion model. SNMP using AOC produced better preconditioning effect for marginal liver grafts.

However, these findings had limitations regarding the optimized oxygenated SNMP. In addition, the protective effect was limited because of the short period of observation. Further studies are needed to investigate the mechanisms through which SNMP using AOC protects the bile duct blood

supply and protects against injury after transplantation.

In conclusion, SNMP with AOC solution could alleviate hepatocellular reperfusion injury in the donor liver. Oxygenated SNMP using AOC appears to be a promising preservation method that may improve the functional recovery of marginal split-liver.

Acknowledgment

This work was supported in part by a grant-in-aid for Regional R&B Proposal Based Program from Northam Advancement Center for Science & Technology of Hokkaido Japan to H.I.

References

- 1) 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:
- 2) Sakai H, Sou K, Tsuchida E. Hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier. *Methods Enzymol* 2009; 465: 363-384.
- 3) Pichlmayr R, Ringe B, Gubernatis G, Hauss J, Bunzendahl H. Transplantation of a donor liver to 2 recipients (splitting transplantation)-a new method in the further development of segmental liver transplantation. *Langenbecks Arch Chir* 1988; 373: 127-130.
- 4) Spada M, Angelico R, Grimaldi C, Francalanci P, Saffioti MC, Rigamonti A, Pariante R, Bianchi R, Vici CD, Candusso M, Maggiore G. The New Horizon of Split-Liver Transplantation: Ex Situ Liver Splitting During Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion. *Liver Transpl* 2020; 26: 1363-1367.
- 5) Ishii D, Matsuno N, Gochi M, Otani M, Shonaka T, Takahashi H, Nishikawa Y, Yoshikawa R, Obara H, Miyamoto K, Furukawa H. Applicability of Hypothermic Oxygenate Machine Perfusion Preservation for Split-Liver Transplantation in a Porcine Model: An Experimental Study. *Ann Transplant* 2020; 25: e919920-1- e919920-8.
- 6) Minor T, Paul A. Hypothermic reconditioning in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2013; 18: 161-167.
- 7) Dutkowski P, de Rougemont O, Clavien PA. Machine perfusion for 'marginal' liver grafts. *Am J Transplant* 2008; 8: 917-924.
- 8) Fuller BJ, Lee CY. Hypothermic perfusion preservation: the future of organ preservation revisited? *Cryobiology* 2007; 54: 129-145.
- 9) Koetting M, Luer B, Efferz P, Paul A, Minor T. Optimal time for hypothermic reconditioning of liver grafts by venous systemic oxygen persufflation in a large animal model. *Transplantation* 2011; 91: 42-47.
- 10) de Vera ME, Lopez-Solis R, Dvorchik I, Campos S, Morris W, Demetris AJ, Fontes P, Marsh JW. Liver transplantation using donation after cardiac death donors: long-term follow-up from a single center. *Am J Transplant* 2009; 9: 773-781.
- 11) Schlegel A, Kron P, Graf R, Dutkowski P, Clavien P-A. Warm vs. cold perfusion techniques to rescue rodent liver grafts. *J Hepatol* 2014; 61: 1267-1275.
- 12) Yoshikawa R, Obara H, Matsuno N, Morito N, Gouchi M, Otani M, Shonaka T, Takahashi H, Enosawa S, Hirano T, Furukawa H. Ex Vivo Reperfusion Model to Evaluate Utility of Machine Preservation for Porcine Liver Donated After Cardiac Death. *Transplant Proc* 2018; 50: 2826-2829.
- 13) Shonaka T, Matsuno N, Obara H, Yoshikawa R, Nishikawa Y, Gouchi M, Otani M, Takahashi H, Azuma H, Sakai H, Furukawa H. Application of Perfusate With Human-Derived Oxygen Carrier Solution Under Subnormothermic Machine Perfusion for Donation After Cardiac Death Liver Grafts in Pigs. *Transplant Proc* 2018; 50: 2821-2825.
- 14) Patel MJ, Webb EJ, Shelbourn TE, Mattia-Goldberg C, George AJ, Zhang F, Moore EG, Nelson DJ. Absence of immunogenicity of diaspirin cross-linked hemoglobin in humans. *Blood* 1998; 91: 710-716.
- 15) Ueki S, Dhupar R, Cardinal J, Tsung A, Yoshida J, Ozaki KS, Klune JR, Murase N, Geller DA. Critical role of interferon regulatory factor-1 in murine liver transplant ischemia reperfusion injury. *Hepatology* 2010; 51: 1692-1701.
- 16) Luer B, Koetting M, Efferz P, Minor T. Role of oxygen during hypothermic machine perfusion preservation of the liver. *Transpl Int* 2010; 23: 944-950.
- 17) Bruinsma BG, Yeh H, Ozer S, Martins PN, Farmer A, Wu W, Saeidi N, Op den Dries S, Berendsen TA, Smith RN, Markmann JF, Porte RJ, Yarmush ML, Uygun K, Izamis M-L. Subnormothermic machine perfusion for ex vivo preservation and recovery of the human liver for transplantation. *Am J Transplant* 2014; 14: 1400-1449.
- 18) Morito N, Obara H, Matsuno N, Enosawa S, Furukawa H. Oxygen consumption during hypothermic and subnormothermic machine perfusions of porcine liver grafts after cardiac death. *J Artif Organs* 2018; 21: 450-457.
- 19) Fontes P, Lopez R, van der Plaats A, Vodovotz Y, Minervini M, Scott V, Soltys K, Shiva S, Paranjpe S, Sadowsky D, Barclay D, Zamora R, Stolz D, Demetris A, Michalopoulos G, Marsh JW. Liver preservation with machine perfusion and a newly developed cell-free oxygen carrier solution under subnormothermic conditions. *Am J Transplant* 2015; 15: 381-394.

超分子重合を利用した人工酸素運搬体の構築

Construction of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers Using Supramolecular Polymerization

松平 崇, 山本 恵三, 酒井 宏水

Takashi Matsuhira, Keizo Yamamoto, Hiromi Sakai

和文抄録

タンパク質の特異的相互作用をモノマーユニット同士の会合に利用して超分子ポリマーを構築する研究が、近年盛んに行われている。著者らは安定な $\alpha_2\beta_2$ 四量体構造を形成するヘモグロビン (Hb) のサブユニット間相互作用が超分子ポリマーの構築に利用できると着想し、Hb の β サブユニット同士を長く柔軟な PEG 鎖を介して結合することにより環状モノマーを合成し、高濃度で開環重合させることで Hb と PEG が交互に配列された鎖状の超分子ポリマーを構築した。Hb-PEG 環状モノマーと Hb-PEG 超分子ポリマーは濃度に応じて交換が可能な平衡状態にある。部位選択的に β サブユニット間を架橋する架橋剤を用いることで $\alpha_2\beta_2$ 四量体構造を固定し、分子量が約 1MDa (重合度 13) の鎖状 Hb-PEG 交互重合ポリマーを構築することに成功した。これは、超分子重合を利用して構造制御された重合 Hb を合成する新しいアプローチ法である。本稿では、Hb を構成単位に持つ超分子ポリマーを合成するための設計戦略、Hb-PEG 超分子ポリマーの構築、共有結合により固定された Hb-PEG ポリマーの人工酸素運搬体としての性質、および超分子開環重合平衡の熱力学的解析の結果を紹介する。

Abstract

Recently, many studies have actively investigated the construction of supramolecular polymers using specific interactions of proteins for associating monomer units. After conceiving that interaction between two $\alpha\beta$ subunits of hemoglobin (Hb), which forms a stable $\alpha_2\beta_2$ tetramer, can be used to construct a supramolecular polymer, we synthesized a cyclic monomer by connecting two β subunits of Hb via a long flexible PEG chain. The Hb-PEG cyclic monomer proceeded to reversible supramolecular ring-opening polymerization at a higher concentration to construct an alternating Hb-PEG supramolecular polymer. The Hb-PEG cyclic monomer and the Hb-PEG supramolecular polymer were in a concentration-dependent equilibrium. Using a well-known cross-linker that selectively cross-links two β subunits, all $\alpha_2\beta_2$ units in both the monomer and the polymer were fixed. Thereby, we obtained a covalently fixed Hb-PEG alternating polymer with molecular weight of about 1 MDa (degree of polymerization = 13). This new approach can synthesize structurally regulated polymerized-Hb based on supramolecular polymerization. This paper introduces a strategy for Hb-based supramolecular polymer synthesis, describes Hb-PEG supramolecular polymer construction, evaluates properties of a covalently fixed Hb-PEG polymer as an artificial oxygen carrier, and presents a thermodynamic mechanism of supramolecular ring-opening polymerization.

Keywords

supramolecular chemistry, ring-opening polymerization, cross-linking, hemoglobin-PEG alternating polymer, subunit exchange equilibrium, thermodynamic analysis

1. 緒言

超分子化学¹⁾は非共有相互作用によって結合された複数の分子からなる秩序だった集合体を扱う学問分野である。共有結合よりも弱い、だが一方で可逆的な結合を実現するこのような相互作用は、超分子材料のユニークな三次元構造や、刺激応答性などの機能、および共有結合ポリマーでは見られないような物理化学的な特性を実現している。超分子化学は、人工合成された自己集合体だけでなく、生体分子の自己組織化、分子認識、タンパク質のフォールディング、および酵素などのホスト-ゲスト化学をも網羅し、故に、生物学との学際的な領域が含まれている。実際、脂質二重膜で覆われている細胞や、二重らせん構造を持つDNA、複数の構成成分からなるタンパク質など、天然に存在する生体分子は、特異的機能を有する超分子で満ちあふれている。ヘモグロビン (Hb) 分子も例に漏れず、2つの α サブユニット、2つの β サブユニット、4つのポルフィリン環、および4つの鉄 (II) イオンから成る、超分子集合体の1種である。Hbを構築するこれらのパーツは、金属-配位子結合、水素結合、疎水性相互作用、ファンデルワールス力、および静電効果などの非共有相互作用の組み合わせによって組み立てられ、折りたたまれ、ボーア効果を示しながら酸素を伝達するために驚くべき緻密さで連携して機能している。

生体模倣性の超分子材料の研究は、生体分子の高次構造構築の機序や、その特異的相互作用と密接に関連して進められてきた^{2,3)}。この考え方に倣えば、確立された超分子化学の技術は、血液代替物として使用するための新しい人工酸素運搬体の作成に役立てることができると期待される。実際、ミセル⁴⁾、ポリマーソーム⁵⁾、そしてリポソーム⁶⁾といった超分子構造体を人工酸素運搬体 (Hb-based Oxygen Carrier, HBOCs) の構築に応用する研究が報告されている。また、巨大な超分子錯体 (分子量 36MDa, 粒子径約 30nm) を形成する、エリスロクルオリンと呼ばれるゴカイやミミズの Hb を利用する研究も欧米で進められている⁷⁾。

超分子化学という学問分野を提唱した、ノーベル化学賞受賞者 (1987年) の Jean-Marie Lehn 氏により、相補的水素結合を

介してモノマー同士が会合している超分子ポリマーと呼ばれる人工的な自己集合体が、1990年に初めて報告された⁸⁾。以降、今日に至るまでわずか30余年の間に、金属-リガンドの配位結合やホスト-ゲスト相互作用など、実に様々な非共有結合性相互作用を利用した超分子ポリマーが合成されてきた⁹⁾。さらに、タンパク質をモノマーユニットに導入した超分子ポリマー (Protein-Based Supramolecular Polymer) を構築する研究も行われてきた¹⁰⁾。本稿では、先人たちにより確立された超分子ポリマーを構築する手法を Hb の重合に応用するための設計戦略、Hb と PEG を構成単位に持つ超分子ポリマーの合成方法、HBOCs として利用するために必要な共有結合による固定化、合成された Hb-PEG 交互重合型ポリマーの物性、そして超分子開環重合の熱力学的メカニズムについて概説する¹¹⁻¹⁵⁾。

2. Hb-PEG 超分子ポリマーの設計戦略

タンパク質を構成要素とする超分子ポリマーを構築する手法は、2種類に大別できる。1つは既存の超分子錯体を用いてタンパク質同士を結合する方法 (Figure 1A)、もう1つはタンパク質自体の超分子相互作用を使用した方法である (Figure 1B)。数多く行われている研究のうちいくつかの例を挙げれば、前者としてはホスト-ゲスト相互作用¹⁶⁾、金属-配位子結合¹⁷⁾、芳香族 π - π スタッキング¹⁸⁾ などの非共有結合性の相互作用でタンパク質同士を会合させた超分子ポリマーが報告されている。また2020年には中央大学の小松研究室より、アルブミンまたは Hb を金属-配位子結合を利用して会合させた超分子ポリマーの構築が報告された¹⁹⁾。一方、後者としては、タンパク質のヘム-ヘムポケット相互作用²⁰⁾、コイルドコイル相互作用²¹⁾、抗原-抗体の複合体形成²²⁾ を使用したものなどが報告されている。この原理を用いた超分子ポリマーとしては、酸素結合解離能を有するミオグロビンの超分子重合体が大阪大学の林研究室より報告されている^{23,24)}。

超分子ポリマーにおいて、重合度は結合に用いられる超分子錯体の会合定数 (K_a) とモノマーの仕込み濃度 ($[M]_0$) に強く依存することが知られている²⁵⁾。これまでに報告されている、

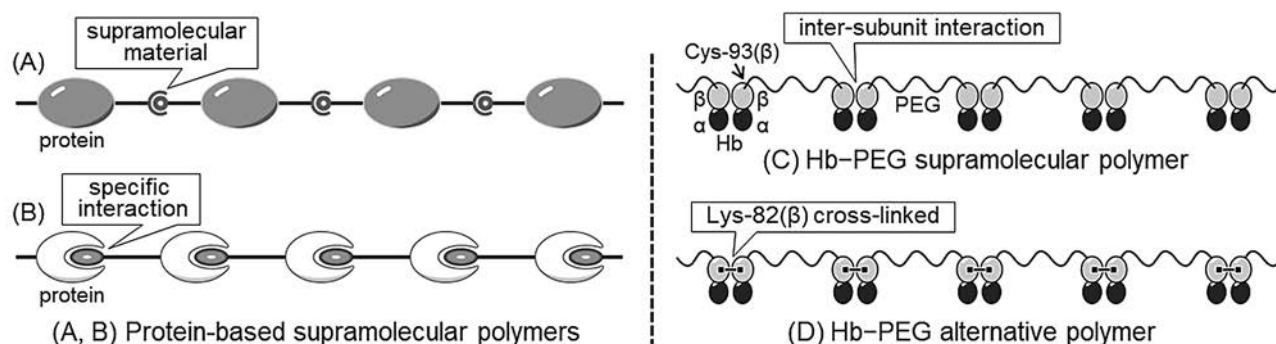


Figure 1 Strategy to construct protein-based supramolecular polymers: (A) non-covalent linkage of proteins using artificial supramolecular materials, (B) supramolecular polymerization of proteins using their own specific non-covalent interactions, (C) Hb-PEG supramolecular polymer using inter-subunit interactions between $\alpha\beta$ dimers of Hb, and (D) covalently fixed Hb-PEG alternative polymer by intramolecular cross-linking via two Lys-82 (β). Cited and partially modified from reference 14.

タンパク質のサブユニット間相互作用を用いた Figure 1B の戦略に基づく超分子ポリマー構築の一例において、その K_a 値は $7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ と報告されている²⁶⁾。一方、Hb の場合、 $\alpha\beta$ ダイマーから $\alpha_2\beta_2$ テトラマーへの会合定数 K_a は $10^5 \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ と報告されており^{27,28)}、Hb の $\alpha\beta$ サブユニット間相互作用は超分子ポリマー構築に十分適用可能な強さを持つことがわかる。私たちは、Hb の 2 つの Cys-93 (β) のメルカプト基を生体適合性の高い PEG 鎖により接続すれば、Hb の $\alpha_2\beta_2$ 四量体構造の形成を駆動力としてモノマーユニットが直線的に自己会合した、Hb-PEG 交互重合型の超分子ポリマーが構築されると考えた (Figure 1C)^{12,14,15)}。

この超分子 Hb-PEG ポリマーを HBOC として利用することを考えた場合、先に述べたとおり、超分子重合はモノマー濃度 ($[M]_0$) に強く依存する平衡状態にあるため、ポリマーが循環血液に注入されると血漿中で希釈されて解重合が進行してしまうと考えられる。この解重合を抑制するためには、Figure 1D に示すように、構築された超分子 Hb-PEG ポリマーの Hb ユニットの、架橋により固定することが有効と考えられる。私たちは、Walder らによって開発された架橋剤 (bis-(3,5-dibromosalicyl) fumarate: DBBF)²⁹⁾ を用いて、 $\alpha_2\beta_2$ テトラマーの 2 つの Lys-82 (β) のアミノ基間を共有結合で架橋した。

3. Hb-PEG 環状モノマーの開環重合と、続く架橋による超分子ポリマーの固定

Hb の 2 つの Cys-93 (β) のメルカプト基は、マレイミド基と選択的に反応することが知られている³⁰⁾。Figure 1C に示した Hb-PEG 交互重合型の超分子ポリマーは、両末端にマレイミド基が導入された PEG 鎖を Hb と 1:1 で反応させることで合成される。合成に長くて柔軟な 10kDa の PEG を使用すると、回り込みによる安定な環状モノマーの形成が可能となり、したがっ

て、Hb-PEG 環状モノマー (Cyclic Monomer, CM-10k) と Hb-PEG 超分子ポリマー (Supramolecular Polymer, SP-10k) がサブユニットの結合解離を介した交換平衡の状態で存在する (Figure 2)。1990 年の Acker らの研究によれば、Hb のサブユニット交換反応はエネルギー障壁が小さいため常温での定量が困難であり、 -25°C に冷却することで初めてサブユニット交換体が個別に分離検出されることが報告されている³¹⁾。私たちも、安定した $\alpha_2\beta_2$ テトラマーを保持する条件下 (常温, sub-mM の高い Hb 濃度, pH 7.4 の水溶液中) において、Cys-93 (β) を PEG 化した Hb と未修飾の Hb との間に $\alpha\beta$ ダイマーの交換反応が容易に進行することを、分子内架橋反応を用いて確認している^{11,13)}。

Figure 2 に示す CM-10k と SP-10k の超分子開環重合の化学平衡は、ルシャトリエの原理に基づき低濃度では環状モノマー側に、高濃度では超分子ポリマー側に移動する。この化学平衡の存在は、動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering, DLS) で測定される平均粒子径が、Hb 濃度と共に増大したことにより直接的に確認された (Table 1)¹²⁾。また、CM-10k の膠質浸透圧 (Colloid Osmotic Pressure, COP) を、閉環体を分子内 $\beta\beta$ 架橋反応で固定した xl-CM-10k と比較することでも明らかにされた (Figure 3)¹⁵⁾。CM-10k は開環して分子間会合し、高濃度で SP-10k を可逆的に形成することができるが、xl-CM-10k はもはや $\alpha\beta$ サブユニット交換反応をしないので、濃度によらずモノマー構造が固定される。xl-CM-10k の COP は、CM-10k と比較して約 2 倍に増大した。この結果は、CM-10k では SP-10k を形成することにより、xl-CM-10k と比較して粒子数がほぼ半分減少したことを示唆している。

超分子開環重合の平衡状態にある CM-10k と SP-10k は、DBBF と反応させて分子内 $\beta\beta$ 架橋を行うと、交換反応をしない xl-CM-10k と xl-SP-10k に変換することができる (Figure 2,

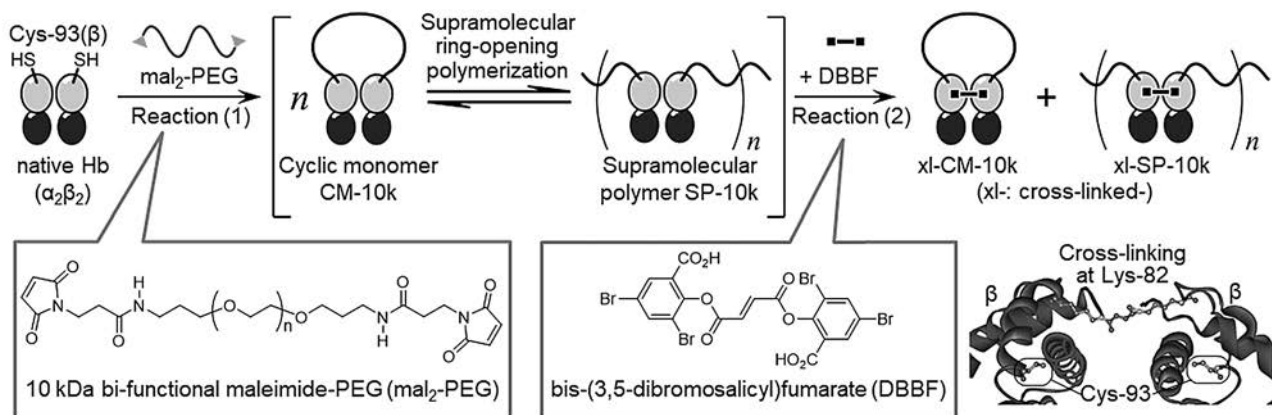


Figure 2 Synthesis of Hb-PEG cyclic monomer (CM-10k) by reacting 10 kDa bi-functional maleimide-PEG with native Hb (reaction (1)), and subsequent cross-linking of two β subunits in $\alpha_2\beta_2$ Hb units using bis-(3,5-dibromosalicyl) fumarate (DBBF) (reaction (2)). CM-10k proceeds concentration-dependent reversible supramolecular ring-opening polymerization to produce Hb-PEG supramolecular polymer (SP-10k). $\beta\beta$ -cross-linking of enubilated CM-10k and SP-10k produces corresponding fixed monomer and polymer: xl-CM-10k and xl-SP-10k. The X-ray crystal structure (PDB ID: 1BIJ) of the $\beta\beta$ -cross-linked Hb is shown, particularly presenting the binding sites for maleimide (Cys-93 (β)) and DBBF (Lys-82 (β)). Reproduced with permission from references 12 and 15. Copyright 2019 and 2021 American Chemical Society.

reaction (2)¹¹⁻¹⁵). モノマーの仕込み濃度 ($[M]_0$) を変えて CM-10k を DBBF と反応させ、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析による生成物の定量を行ったところ、 $[M]_0$ の増加とともに xl-CM-10k の比率は減少し、代わりに xl-SP-10k の比率が増加した。最も高濃度の $[M]_0 = 3.01 \text{ mM}$ で架橋を行った結果、生成物のうち残存している環状モノマー xl-CM-10k は 8% であり、架橋直前の平衡状態では CM-10k の 92% が SP-10k の構築に使用されていることがわかった (Figure 4)。

この xl-SP-10k のうち、特に高分子量の成分を分取カラムクロマトグラフィーで精製し、HBOCs としての特性評価を行った。得られた xl-SP-10k の重合度、粒子径、酸素親和性を、未修飾 Hb、Hb ベシクル、赤血球と比較して Table 2 に示す^{12, 32}。電気泳動 (SDS-PAGE) および SEC 分析より、xl-SP-10k が架橋 Hb と PEG の交互構造を持ち、平均分子量が約 1MDa、重合度は約 13 であることが確認された。また DLS 測定の結果、xl-SP-10k の平均粒子径は約 97nm であり、未修飾 Hb の 10 倍以上の大きさを持ち、Hb ベシクルよりもやや小さい分子サイズを示した。1 粒子あたり約 2-3 万の Hb を内包する Hb ベシクルに比べて粒子あたりの Hb 数が 13 と少ないにもかかわらず、xl-SP-10k が比較的大きな粒子径を示したのは、球状の架橋 Hb と長く柔軟な PEG 鎖の交互重合体である xl-SP-10k が、水溶液中でランダムコイル構造を形成しているためと考えられる。一般的にランダムコイル構造をとる高分子は外力により自由に形状が変化するため、Hb と PEG の交互重合ポリマーには赤血球のように形を変えて毛細血管を通過する機能が期待される。酸素親和性を比較すると、xl-SP-10k は Cys-93 (β) の PEG 化と Lys-82 (β) の $\beta\beta$ 架橋に起因して、赤血球より酸素を結合しやすい未

修飾 Hb よりも、さらに高い酸素親和性を示した ($P_{50} = 5.2 \text{ Torr}$)。一方、四量体構造の固定により協同性は低下した (ヒル定数 1.1)。高い酸素親和性を有する Hb ベシクルは低酸素組織を標的とした酸素送達に効果的であることが報告されており^{33, 34}、xl-SP-10k も同様の用途での利用が期待できる。

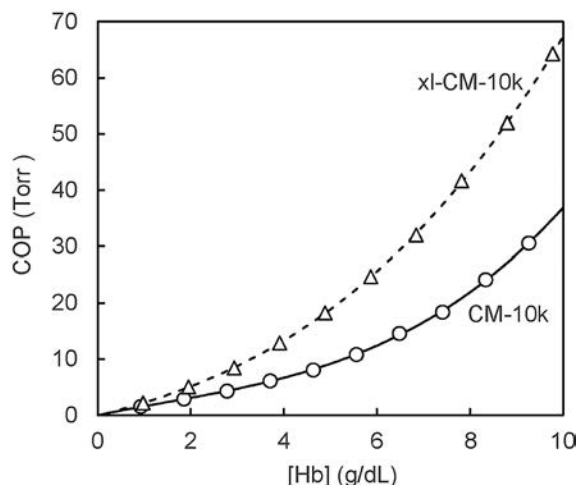


Figure 3 Colloid osmotic pressure (COP) of CM-10k (circle) and xl-CM-10k (triangle) as a function of the concentration of Hb units, [Hb]. The COP of xl-CM-10k was increased considerably, almost doubled, compared to that of CM-10k. The result indicates an almost half decrease in number of particles of CM-10 compared with xl-CM-10 by forming a supramolecular Hb polymer, SP-10k. Reproduced with permission from reference 15. Copyright 2021 American Chemical Society.

Table 1 Average particle diameters of CM-10k at different concentrations. Reproduced with permission from reference 12. Copyright 2019 American Chemical Society.

Concentration of CM-10k (mM)	Particle diameter (avg. \pm S.D., nm)
0.02	10.6 \pm 3.6
0.08	12.7 \pm 5.3
0.16	15.0 \pm 6.1
0.31	20.6 \pm 11.8
0.62	20.4 \pm 13.7

Table 2 Comparison of particle size and oxygen affinity parameters of xl-SP-10k with native Hb, Hb-vesicles, and Human red blood cells

Parameters	xl-SP-10k ¹²⁾	Native Hb ¹²⁾	Hb-vesicles ³²⁾	Human red blood cells ³²⁾
No. of Hbs par one particle (Molecular weight (kDa))	13 (1,000)	1 (65)	2-3 $\times 10^4$	3 $\times 10^8$
Particle diameter (nm)	97	7.7	224	8,000
P_{50} (Torr)	5.2	8.2	18	28
Hill coefficient	1.1	2.2	2.1	2.7-3.0

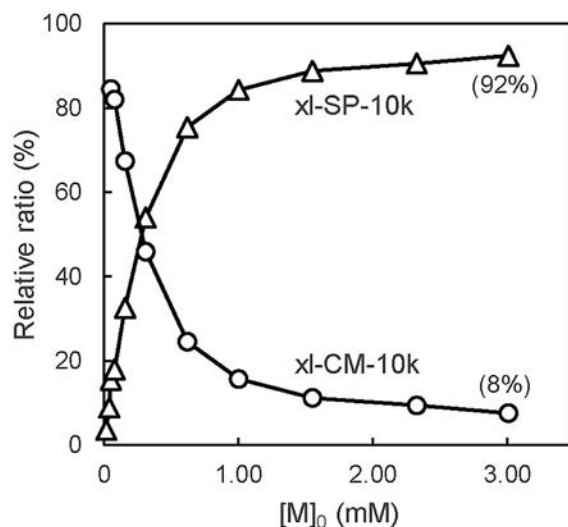


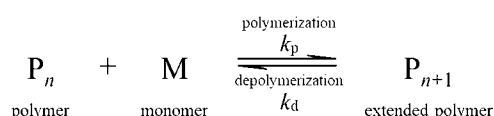
Figure 4 Relation between relative ratio (%) of xl-CM-10k or xl-SP-10k and initial monomer concentration $[M]_0$, where relative ratio was obtained based on SEC analysis after $\beta\beta$ -cross-linking of equivalated CM-10k and SP-10k at different $[M]_0$. Reproduced with permission from reference 15. Copyright 2021 American Chemical Society.

4. 超分子開環重合の熱力学的解析

低分子量の環状モノマー、たとえばラクトン、ラクタム、ラクチド、シクロアルカン、環状エーテル、環状ホスフェート、環状シロキサン等の、共有結合ポリマーを生成する開環重合においては、熱力学的解析の手法が確立されている^{35,36)}。私たちは、CM-10kの超分子開環重合平衡においても、この熱力学的解析の手法が適用できると考えた。

一般的な低分子量の環状モノマーの開環重合においては、重合度 n の高分子鎖 (P_n) に対し、モノマー1単位分の伸長反応 (重合) と分解反応 (解重合) が同時に進行し、Scheme 1 の平衡状態とみなすことができる。

Scheme 1 Macromolecular chain extension and monomer decomposition equilibrium on general ring-opening polymerization



重合反応 (k_p) と解重合反応 (k_d) の速度定数の比率である平衡定数 K_{eq} は、ポリマーの濃度 $[P_n]$ 、1単位伸張したポリマーの濃度 $[P_{n+1}]$ 、および平衡モノマー濃度 $[M]_{eq}$ を用いて式 (1) で定義される。

$$K_{eq} = \frac{k_p}{k_d} = \frac{[P_{n+1}]}{[P_n][M]_{eq}} \quad \dots\dots\dots (1)$$

十分にポリマーが伸張している場合、 $[P_n]$ と $[P_{n+1}]$ はほぼ等しいとみなすことができ、 K_{eq} は式 (2) で表される。

$$K_{eq} \approx \frac{1}{[M]_{eq} \quad (n \gg 1)} \quad \dots\dots\dots (2)$$

開環重合のエンタルピー変化 ΔH_p とエン트로ピー変化 ΔS_p は、van't Hoff の式に従い、絶対温度 T の関係式として、気体定数 R を用いて式 (3) で表される。

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta H_p}{RT} + \frac{\Delta S_p}{R} \quad \dots\dots\dots (3)$$

式 (2) を式 (3) に代入すると、開環重合の熱力学的解析に広く用いられている Dainton の式と呼ばれる式 (4) が導かれる³⁷⁾。

$$\ln[M]_{eq} = \frac{\Delta H_p}{RT} - \frac{\Delta S_p}{R} \quad \dots\dots\dots (4)$$

先に述べたとおり、Dainton の式を用いた熱力学的解析は主に共有結合で構築される合成高分子が形成される開環重合に適用されてきたが、最近になって金属配位結合を用いたエンタルピー駆動型の超分子開環重合への適用が報告された³⁸⁾。私たちはこれをさらに拡張し、分子量 64,500 のタンパク質である Hb と分子量約 10,000 の PEG をモノマー単位に持つ、巨大な環状モノマー CM-10k の超分子開環重合に適用した¹⁵⁾。

仕込み濃度 $[M]_0$ を 1mM に調整し、4~45°C の異なる温度で

Table 3 Thermodynamic parameters of supramolecular ring-opening polymerization equilibria of 1.00 mM Hb-PEG cyclic monomers (CMs). Adopted with permission from reference 15. Copyright 2021 American Chemical Society.

monomer	M_n of PEG linker (kDa)	ΔH_p ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	ΔS_p ($\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$)	$T\Delta S_p$ at 298 K ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
CM-2k	2.0	-0.0	27	8.0
CM-5k	4.4	-0.3	27	8.1
CM-10k	10.5	-1.0	29	8.5
CM-20k	20.8	-0.2	33	9.9

平衡状態にある CM-10k と SP-10k を架橋し、架橋されたモノマー xl-CM-10k の濃度から $[M]_{eq}$ をそれぞれ算出した。Dainton の式 (4) に従い、 $\ln[M]_{eq}$ を $1/T$ に対しプロットして線形回帰分析を行った結果、 ΔH_p と ΔS_p はそれぞれ $-1.0\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ および $29\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ と算出された (Table 3)。この開環重合の常温 (298K) におけるエン트로ピー変化 ($T\Delta S_p$) は $8.5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ と、エンタルピー変化 ΔH_p に比べて著しく大きく、CM-10k の超分子開環重合がエン트로ピー駆動で進行していることが明らかになった。また、PEG の分子量を 10kDa から 2, 5, および 20kDa に変えて Hb-PEG 環状モノマーを合成し、同様の実験を行ったところ、PEG の分子量の増大に伴い ΔS_p が増大する一方、 ΔH_p はほぼ無視できるほど小さく、いずれもエン트로ピー駆動で重合が進行し、モノマーの環サイズが大きい方が重合しやすいことが明らかとなった (Table 3)。

5. 結語

非共有結合性の $\alpha\beta$ サブユニット間相互作用を利用した、Hb-PEG 環状モノマーの超分子開環重合による超分子ポリマーの構築と、続く共有結合による固定によって交互重合型の鎖状 Hb-PEG ポリマーを合成する最近の研究を紹介した。二官能性 PEG を Hb の Cys-93 (β) に選択的に結合させて合成される Hb-PEG 環状モノマーは、分子間で $\alpha\beta$ サブユニット交換反応することにより超分子開環重合し、高濃度で Hb-PEG 超分子ポリマーを形成する。平衡状態にある環状モノマーと超分子ポリマーは、Hb の $\alpha_2\beta_2$ 四量体構造を架橋することで固定され、人工酸素運搬体としての利用可能性を有する Hb-PEG 交互重合型ポリマーが構築された。また、架橋生成物の定量に基づく平衡状態の熱力学的解析によって、超分子開環重合がエン트로ピー駆動で進行することが明らかになった。今回紹介した超分子重合を用いて Hb を重合する方法は規則的に Hb とリンカーを配列させられるため、ランダムに重合する方法と比べ重合 Hb の構造を正確に制御できる利点がある。本研究を発展させれば、一次元に配列した鎖状の Hb ポリマーだけでなく、固有の三次元構造を有する Hb ポリマーを構築することも可能であると考えられる。今後の研究展開が期待される。

謝 辞

本研究は科学研究費補助金（若手 B：26750149，基盤 C：17K01367，21K12688）の助成を受けて推進されました。また、本研究にあたりご協力とご助言を頂きました，奈良県立医科大学化学教室の皆様にご心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Lehn JM. Perspectives in supramolecular chemistry – from molecular recognition towards molecular information processing and self-organization. *Angew Chem Int Ed* 1990; 27 (1): 89-112.
- 2) Van Dun S, Ottmann C, Milroy LG, Brunsveld L. Supramolecular chemistry targeting proteins. *J Am Chem Soc* 2017; 139 (40): 13960-13968.
- 3) Fathalla M, Lawrence CM, Zhang N, Sessler JL, Jayawickramarajah J. Base-pairing mediated non-covalent polymers. *Chem Soc Rev* 2009; 38 (6): 1608-1620.
- 4) Bin L, Taihang L, Gao C, Xiaoyuan L, Lesan Y, Zhigang X, Xiabin J, Yubin H. Regulation of conjugated hemoglobin on micelles through copolymer chain sequences and the protein's isoelectric aggregation. *Macromol Biosci* 2013; 13 (7): 893-902.
- 5) Rameez S, Banerjee U, Fontes J, Roth A, Palmer AF. Reactivity of polymersome encapsulated hemoglobin with physiologically important gaseous ligands: Oxygen, carbon monoxide, and nitric oxide. *Macromolecules* 2012; 45 (5): 2385-2389.
- 6) Sakai H, Sou K, Tsuchida E. Hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier. *Methods Enzymol* 2009; 465: 363-384.
- 7) Le Meur Y, Badet L, Essig M, Thierry A, Büchler M, Drouin S, Deruelle C, Morelon E, Pesteil F, Delpech PO, Boutin JM, Renard F, Barrou B. First-in-human use of a marine oxygen carrier (M101) for organ preservation: A safety and proof-of-principle study. *Am J Transplant* 2020; 20 (6): 1729-1738.
- 8) Fouquey C, Lehn JM, Levelut AM. Molecular recognition directed self-assembly of supramolecular liquid crystalline polymers from complementary chiral components. *Adv Mater* 1990; 2 (5): 254-257.
- 9) 灰野岳晴. 超分子ポリマーとは. 日本化学会編. 超分子ポリマー. 京都：化学同人，2019；20-27.
- 10) Luo Q, Dong Z, Hou C, Liu J. Protein-based supramolecular polymers: progress and prospect. *Chem Commun* 2014; 50 (70): 9997-10007.
- 11) Matsuhira T, Kure T, Yamamoto K, Sakai H. Analysis of dimeric $\alpha\beta$ subunit exchange between PEGylated and native hemoglobins ($\alpha_2\beta_2$ tetramer) in an equilibrated state by intramolecular $\beta\beta$ -crosslinking. *Biomacromolecules* 2018; 19 (8): 3412-3420.
- 12) Matsuhira T, Yamamoto K, Sakai H. Ring-opening polymerization of hemoglobin. *Biomacromolecules* 2019; 20 (4): 1592-1602.
- 13) Matsuhira T, Yamamoto K, Sakai H. Analysis of dimeric $\alpha\beta$ subunit exchange between bis-PEGylated and native hemoglobins. In: Chang TMS, Jahr J, Sakai H, Eds. *Nanobiotherapeutics Based Blood Substitutes (Regenerative Medicine, Artificial Cells and Nanomedicine)*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., (in press).
- 14) Matsuhira T, Yamamoto K, Sakai H. Ring-opening polymerization of hemoglobin based on supramolecular chemistry. In: Chang TMS, Jahr J, Sakai H, Eds. *Nanobiotherapeutics Based Blood Substitutes (Regenerative Medicine, Artificial Cells and Nanomedicine)*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., (in press).
- 15) Matsuhira T, Sakai H. Entropy-driven supramolecular ring-opening polymerization of cyclic hemoglobin monomer for constructing hemoglobin-PEG alternating polymer with structural regularity. *Biomacromolecules* 2021; 22 (5): 1944-1954.
- 16) Hou C, Li J, Zhao L, Zhang W, Luo Q, Dong Z, Xu J, Liu J. Construction of protein nanowires through cucurbit [8] uril-based highly specific host-guest interactions: an approach to the assembly of functional proteins. *Angew Chem Int Ed* 2013; 52 (21): 5590-5593.
- 17) Zhang W, Luo Q, Miao L, Hou C, Bai Y, Dong Z, Xu K, Liu J. Self-assembly of glutathione S-transferase into nanowires. *Nanoscale* 2012; 4 (19): 5847-5851.
- 18) Petkau-Milroy K, Uhlenheuer DA, Spiering AJH, Vekemans JAJM, Brunsveld L. Dynamic and bio-orthogonal protein-assembly along a supramolecular polymer. *Chem Sci* 2013; 4: 2886-2891.
- 19) Adachi R, Suzuki S, Mitsuda T, Morita Y, Komatsu T. Supramolecular linear coordination polymers of human serum albumin and haemoglobin. *Chem Commun* 2020; 56: 11585-11588.
- 20) Oohora K, Kajihara R, Fujimaki N, Uchihashi T, Hayashi T. A ring-shaped hemoprotein trimer thermodynamically controlled by the supramolecular heme-heme pocket interaction. *Chem Commun* 2019; 55 (11): 1544-1547.
- 21) Staples JK, Oshabena KM, Horne WS. A modular synthetic platform for the construction of protein-based supramolecular polymers via coiled-coil self-assembly. *Chem Sci* 2012; 3: 3387-3392.
- 22) Bilgiçer B, Thomas SW 3rd, Shaw BF, Kaufman GK, Krishnamurthy VM, Estroff LA, Yang J, Whitesides GM. A non-chromatographic method for the purification of a bivalently active monoclonal IgG antibody from biological fluids. *J Am Chem Soc* 2009; 131 (26): 9361-9367.
- 23) Oohora K, Onoda A, Kitagishi H, Yamaguchi H, Harada A, Hayashi T. A chemically-controlled supramolecular protein-

- polymer formed by a myoglobin-based self-assembly system. *Chem Sci* 2011; 2: 1033-1038.
- 24) Ono T, Hisaoka Y, Onoda A, Oohora K, Hayashi T. Oxygen-binding protein fiber and microgel: Supramolecular myoglobin-poly (acrylate) conjugates. *Chem Asian J* 2016; 11 (7): 1036-1042.
- 25) Bastings MMC, De Greef, TFA, Van Dongen JLJ, Merckx M, Meijer EW. Macrocyclization of enzyme-based supramolecular polymers. *Chem Sci* 2010; 1: 79-88.
- 26) De Greef TFA, Smulders MMJ, Wolffs M, Schenning APHJ, Sijbesma RP, Meijer EW. Supramolecular polymerization. *Chem Rev* 2009; 109 (11): 5687-5754.
- 27) Valdes R Jr. Modification of human haemoglobin with glucose 6-phosphate enhances tetramer-dimer subunit dissociation. *Biochem J* 1986; 239 (3): 769-772.
- 28) Arisaka F, Nagai Y, Nagai M. Dimer-tetramer association equilibria of human adult hemoglobin and its mutants as observed by analytical ultracentrifugation. *Methods* 2011; 54 (1): 175-180.
- 29) Walder JA, Walder RY, Arnone A. Development of antisickling compounds that chemically modify hemoglobin S specifically within the 2,3-diphosphoglycerate binding-site. *J Mol Biol* 1980; 141 (2): 195-216.
- 30) Manjula BN, Tsai A, Upadhy R, Perumalsamy K, Smith PK, Malavalli A, Vandegriff K, Winslow RM, Intaglietta M, Prabhakaran M, Friedman JM, Acharya SA. Site-specific PEGylation of hemoglobin at Cys-93 (β): correlation between the colligative properties of the PEGylated protein and the length of the conjugated PEG chain. *Bioconjugate Chem* 2003; 14 (2): 464-472.
- 31) LiCata VJ, Speros PC, Rovida E, Ackers GK. Direct and indirect pathways of functional coupling in human hemoglobin are revealed by quantitative low-temperature isoelectric focusing of mutant hybrids. *Biochemistry* 1990; 29 (42): 9771-9783.
- 32) Sakai H, Yuasa M, Onuma H, Takeoka S, Tsuchida E. Synthesis and physicochemical characterization of a series of hemoglobin-based oxygen carriers: objective comparison between cellular and acellular types. *Bioconjugate Chem* 2000; 11 (1): 56-64.
- 33) 酒井宏水, ペドロカブラレス, エミ G. ツァイ, 土田英俊, マルコスインタリエッタ. ハムスター皮下の細動脈血流を一過性に遮断するモデルを用いた P_{50} 値が異なる Hb 小胞体の酸素放出挙動. *人工血液* 2006; 14(4) : 130-137.
- 34) Plock JA, Rafatmehr N, Sinovcic D, Schnider J, Sakai H, Tsuchida E, Banic A, Erni D. Hemoglobin vesicles improve wound healing and tissue survival in critically ischemic skin in mice. *Am J Phys, Heart Circ Physiol* 2009; 297: H905-909.
- 35) Duda A, Kawalski A. Thermodynamics and Kinetics of Ring-Opening Polymerization. In: Dubois P, Coulembier O, Raquez JM, eds. *Handbook of Ring-Opening Polymerization*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009; 1-52.
- 36) McGrath JE. Ring-Opening Polymerization: Introduction. In: McGrath JE, Ed. *Ring-Opening Polymerization, Kinetics, Mechanisms, and Synthesis*. Washington DC: American Chemical Society, 1985; 1-22.
- 37) Dainton FS, Ivin KJ. Some thermodynamic and kinetic aspects of addition polymerization. *Q Rev, Chem Soc* 1958; 12: 61-92.
- 38) Musgrave RA, Russell AD, Hayward DW, Whittell GR, Lawrence PG, Gates PJ, Green JC, Manners I. Main-chain metallopolymers at the static-dynamic boundary based on nickelocene. *Nature Chem* 2017; 9: 743-750.

一酸化炭素製剤開発の最前線

The Cutting Edge of The Development of Carbon Monoxide Therapeutic Modality

田口 和明^{1*}, 小田切 優樹², 松元 一明¹

Kazuaki Taguchi, Masaki Otagiri, Kazuaki Matsumoto

和文抄録

生体で恒常的に産生されている一酸化炭素 (CO) は、様々な生理機能を有し生命体の生命活動において重要な役割を担う生理活性ガスである。生体に CO を外因的に供給すると多様な疾患の病態進展を抑制することから、CO を基盤とした新たな医薬品の研究開発が盛んに行われ、これまでに高気圧酸素療法を応用した CO 吸入療法や、低分子一酸化窒素供与体であるニトログリセリンの供給原理を利用した低分子 CO 供与体、さらには CO と可逆的に結合するヘモグロビンを用いた CO 製剤が開発されてきた。本稿では、新規医療ガスとしての魅力を秘めた CO について概説するとともに、国内外で試みられている CO 製剤開発の現状や筆者らが実際に創製している CO 製剤について紹介する。

Abstract

Endogenous carbon monoxide (CO) has various physiological functions and plays a central role in maintaining homeostasis in a wide variety of living organisms. Since CO, when supplied exogenously, suppresses the progression of various diseases, research and development of new CO-based drugs have been actively carried out. Several types of CO preparations have been developed such as CO inhalation and CO-releasing molecules that were designed based on hyperbaric oxygen therapy and nitroglycerin, respectively. Furthermore, hemoglobin-based CO preparations were also developed by virtues of the reversible binding capacity of hemoglobin with CO. In this review, we introduce an overview of basic knowledge of CO, and introduces the current status of CO formulation development that is being attempted in Japan and overseas and the CO formulation that the authors developed.

Keywords

Carbon monoxide, CO-releasing molecules, Hemoglobin, Red blood cell, Hemoglobin-vesicles

1. 緒論

一酸化炭素 (CO) は無色・無臭のガス分子であり、炭素含有物質が不完全燃焼する際に発生する。また、CO を高濃度かつ長時間で吸入すると、吐き気・めまい・意識障害を初めとした中毒症状を引き起こし、最悪の場合は死に至る。実際に、本邦においても火災現場や化学工場における CO 中毒事故が毎年発生している。そのため、CO は別名“silent killer gas”と呼ばれ、

有毒ガスとして広く認識されている。一方で CO は、生体内においてヘムがヘムオキシゲナーゼで代謝される過程で恒常的に産生されており、その産生量 16.4 mmol/hr と言われている^{1,2)}。1990 年代に内因性 CO が血管作動因子³⁾や神経伝達物質⁴⁾として働く生理活性ガスであることが相次いで報告され、CO は一酸化窒素と同様に生体の生命活動を維持する上で重要な生理活性ガスとして認識されるようになった。さらに、CO を外因的

¹ 慶應義塾大学薬学部薬効解析学講座

〒105-8512 東京都港区芝公園 1-5-30 Faculty of Pharmacy, Keio University, 1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan

² 崇城大学 DDS 研究所

〒860-0082 熊本市西区池田 4-22-1 DDS Research Institute, Sojo University, 4-22-1 Ikeda, Nishi-ku, Kumamoto City, Kumamoto 860-0082, Japan.

論文受付 2021 年 7 月 26 日 論文受理 2021 年 7 月 29 日

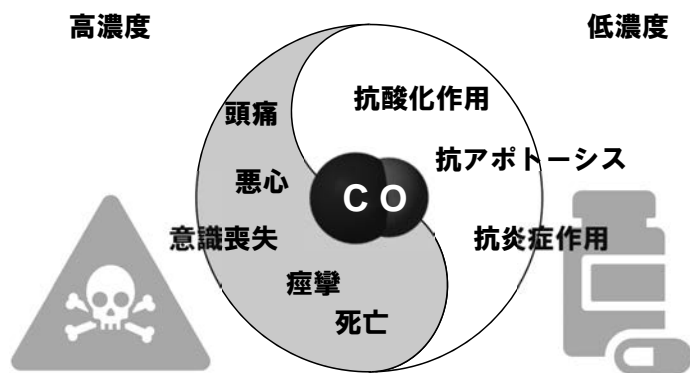


図1 COの二面性

に生体に供給すると強力な抗アポトーシス作用，抗炎症作用，抗酸化作用などの多彩な薬理作用を示し，難治性疾患の発症や進展を抑制することが明らかとなった^{5,6)}。このようにCOは，有毒ガスと医療ガスの二面性を持ち，その作用は曝露濃度に依存すると考えられている。つまり，COの毒性閾値は500ppm（1時間以内）と考えられており⁷⁾，これより高濃度のCOは生体に有毒で有り，一方で500ppm以下の低濃度COは不治の病の治療を可能にする医療ガスとしてのポテンシャルを有する（図1）。そのため低濃度のCOを用いた医療の確立が期待されるが，不溶性ガスであるCO（溶解度：354mL/dL⁸⁾）を直接生体へ投与することは困難であるため，COを基盤とした医療の実現にはCO供与体の開発が不可欠である。これらの事実を受け，高気圧酸素療法を応用したCO吸入療法や，低分子一酸化窒素供与体であるニトログリセリンの供給原理を利用した低分子CO供与体（CORMs; CO-releasing molecules）が開発されてきた。また，ヘモグロビンがCOと可逆的に結合することに着目し，ヘモグロビンを基盤とするCO輸送システムの構築やCO供与体の開発も行われてきた。本総説では，これらCO供与体の最新の研究動向について概説する。

2. CORMs

2002年にMotterliniらによりdimanganese decacarbonyl ($[\text{Mn}_2(\text{CO})_{10}]$; CORM-1, 図2A)とtricarbonyldichlororuthenium (II) dimer ($[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$; CORM-2, 図2B)の2種類のCORMが報告された⁹⁾。CORM-1は光刺激によりCOを放出するのに対して，CORM-2は濃度依存的に溶液中でCOを放出する。そのため，CORM-2の開発はCOの生理活性の探索研究を劇的に進捗させたが，水溶性が低い（DMSOまたはエタノールに溶解）上に半減期が短く（<1分；ミオグロビン存在下で化学構造中にCO保持できる半減期），in vivo実験には不向きであった。この問題点を克服するために，CORM-2誘導体であるtricarbonylchloro (glycinato) ruthenium (II) ($[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})]$; CORM-3, 図2C)が合成され¹⁰⁾，水溶性の問題点を克服したが，依然としてCORM-3は半減期が短く（<1分；ミオグロビン存在下で化学構造中にCO保持できる半減期），疾患治療への使用は困難であった。また，CORM-2やCORM-3は遷

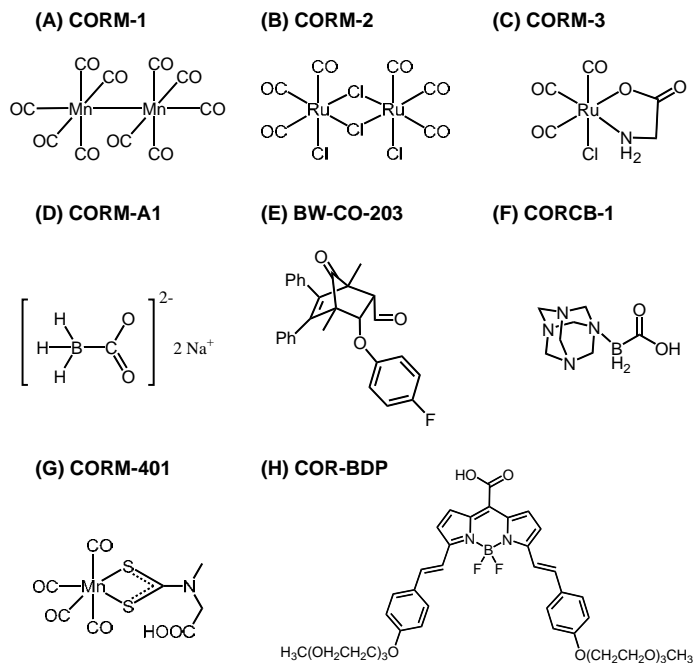


図2 これまでに開発された代表的なCORMs

移金属であるルテニウムを含有していることから，頻回投与時にはルテニウムの生体内蓄積による毒性も懸念された。そこでCORMsの疾患治療への使用を目指し，これまでに様々なCORMsが開発されている。例えば，sodium boranocarbonate ($\text{Na}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$, CORM-A1, 図2D)は，遷移金属を含まない水溶性CORMであることに加え，半減期が約21分（ミオグロビン存在下で化学構造中にCO保持できる半減期）とCORM-2やCORM-3より長い特性を有している¹¹⁾。また，生体環境や外部刺激に応じてCOを放出するCORMsの研究も盛んに展開されており，pH応答性CORMであるBW-CO-203や活性酸素（過酸化水素）応答性CORMであるCORCB-1（図2F），CORM-401（図2G），さらには，近赤外線に応答してCOを放出するCOR-BDPs（図2H）などが開発されている¹²⁻¹⁵⁾。近年では，CORMsをリポソームの脂質膜やミセルの疎水コアに封入することでCOを送達する創薬戦略も展開されている^{16,17)}。これらのCORMsを基盤としたCO製剤は，肝疾患や臓器移植，敗血症，リウマチ，ガンなどの様々な疾患モデル動物に対して高い治療効果を示すことが報告されているが¹⁸⁾，未だ臨床試験に移行した事例は無く，今後，ヒトにおける安全性及び有効性の評価が待たれる。

3. 赤血球を利用したCO製剤

赤血球は，肺から取り込んだ酸素を全身に送り届ける役割に加え，生体内で産生されたCOや呼気中より吸入したCOのリザーバーでありキャリアとしても機能している。これは，赤血球中のヘモグロビンがCOと可逆的に結合する固有特性を有するためである。この赤血球（ヘモグロビン）の生理機能を活用したCO製剤として「CO吸入療法」と「CO結合型赤血球製剤」の開発が行われている（図3A, B）。

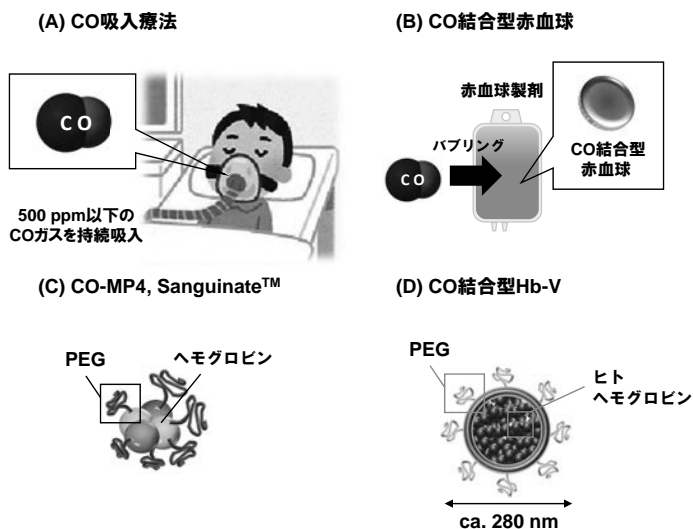


図3 赤血球を利用したCO製剤とヘモグロビンを基盤としたCO製剤
 (A) CO吸入療法; 500ppm以下のCOガスを持続吸入させる。吸入したCOは内因性赤血球に結合することで体内循環し、標的部へと輸送される。(B) CO結合型赤血球; 単離精製した赤血球にCOガスをバブリングすることで作製し、生体へ投与する。(C) CO-MP4, Sanguinate[®]; ウシまたはヒトカルボキシヘモグロビンを分子量5000DaのPEGで覆った構造を有する。COを放出後には酸素運搬体としても機能する。(D) CO結合型Hb-V; ヒトヘモグロビンを脂質膜で被覆したヘモグロビン内封リボソームにCOを担持させたナノCO放出制御担体として開発された。COを放出した後には酸素運搬体としても機能する。

3.1. CO吸入療法

医療ガスの吸入療法は一般的な医療として行われている。例えば、高気圧酸素療法はガス壊疽や火傷などの治療に用いられおり、一酸化窒素や Heliox (ヘリウムと酸素の混合ガス)、吸入麻酔薬なども医療現場で使用されている。1970年代にCO吸入による有毒作用の閾値研究が健康男性で行われ、100ppmで8時間吸入した場合においても有害作用は確認されなかったことが報告されている¹⁹⁾。このヒトにおける結果と蓄積された動物実験の結果を加味して、現時点では、500ppmまでの低濃度のCO吸入は哺乳動物に対して安全に使用できると言われている⁷⁾。これらの事実より、CO吸入療法は最も臨床使用に近いCO製剤であると考えられ、これまでに低濃度のCO吸入療法(20-400ppm)の疾患治療に対する有効性に関する検討が数多く行われている。紙面の都合上、詳細は割愛するが、低濃度のCO吸入により肝疾患や潰瘍性大腸炎、臓器移植(肝臓、腎臓、肺など)、敗血症、急性肺傷害、特発性肺線維症など多種多様な疾患モデル動物の病態の発症と進展が抑制されることが報告されている⁵⁾。また、これらのCOの有益な作用はCOの強力な抗アポトーシス作用、抗炎症作用、抗酸化作用などの多彩な生理活性に起因していることも明らかとなっている。これらの結果を受け、これまでにCO吸入療法の慢性閉塞性肺疾患、特発性肺線維症、急性呼吸窮迫症候群

などに対する臨床試験が国内外で行われている(表1)。本稿では、文献として試験結果の報告がなされている慢性閉塞性肺疾患と特発性肺線維症について簡単に紹介する。

Bathoornらは、慢性閉塞性肺疾患患者に100-125ppmのCOまたはプラセボ(空気)を1日2時間、4日間連日吸入させ、喀痰中好酸球数、努力肺活量、慢性閉塞性肺疾患症状に関する質問票、気管支反応性を比較した²⁰⁾。その結果、CO吸入群において気管支反応性と喀痰中好酸球数は改善傾向を示した。しかしながら、その他の評価項目はCO吸入群とプラセボ吸入群で差は無く、慢性閉塞性肺疾患に対するCO吸入療法の顕著な治療効果は見られなかった。また、CO吸入群とプラセボ吸入群で血圧や心拍数に差は見られず、CO吸入の安全性が確認された。また、特発性肺線維症患者に100ppmまたは200ppmのCOまたはプラセボ(空気)を週2日1回2時間の吸入療法を施行し、12週間後に疾患の進行度を評価した臨床試験結果が報告された²¹⁾。その結果、CO吸入群で特発性肺線維症のバイオマーカーである血清中マトリックスメタロプロテアーゼ7濃度の減少は見られなかった。また、努力肺活量と6分間歩行距離も両群間で有意な差は無く、CO吸入療法の特発性肺線維症に対する治療効果は認められなかった。このように、CO吸入療法は慢性閉塞性肺疾患患者や特発性肺線維症患者に対する顕著な治療効果はなかったが、動物実験モデルにおいては劇的な治療効果を示している。よって、種差間においてCOに対する感受性やCOの病態病理に対する寄与が異なっているのかもしれない。今後、急性呼吸窮迫症候群やイレウスなどに対する臨床試験結果の報告を待ち、CO吸入療法の動物試験と臨床試験結果の乖離について議論する必要があると考えられる。

3.2. CO結合型赤血球製剤

赤血球は大量出血時における蘇生のゴールドスタンダードとして使用されている。しかしながら、赤血球輸血は大量出血により虚血状態にある臓器に急激に酸素を供給するため臓器の虚血再灌流傷害を惹起する。虚血再灌流傷害の発症機序は活性酸素種による酸化傷害や炎症、アポトーシス、オートファジーなどが複雑に関与しており、虚血再灌流傷害の惹起を防ぐには、これら同時多発的に発生する虚血再灌流傷害の発症要因を包括的に封じ込める必要がある。そのため、多彩な生理活性を有するCOを赤血球に担持させたCO結合型赤血球で輸血すること

表1 CO吸入療法の臨床試験状況

対象疾患	登録試験番号	試験段階	国	状況
慢性閉塞性肺疾患	NCT00122694	Phase 2	オランダ	Completed
特発性肺線維症	NCT01214187	Phase 2	アメリカ	Completed
急性呼吸窮迫症候群	NCT02425579	Phase 1	アメリカ	Completed
	NCT03799874	Phase 2	アメリカ	Recruiting
イレウス	NCT01050712	Phase 2	カナダ	Terminated
内臓機能障害	NCT03067701	Phase 1	アメリカ	Completed
二次性肺高血圧症合併慢性閉塞性肺疾患	UMIN000002080	Phase 1	日本	Completed

で大量出血に伴う虚血再灌流傷害の発症を包括的に抑制できると期待される。一方、CO 結合型赤血球は赤血球中のほぼ 100% のヘモグロビンに CO を担持させるため酸素運搬ができなくなる結果、赤血球輸血の本来の目的である蘇生（酸素供給）を果たせなくなることが懸念される。しかしながら、出血性ショックモデル動物を用いた CO 結合型赤血球の蘇生実験で、CO 結合型赤血球輸血は赤血球輸血と同等の蘇生効果（生存率の向上、血圧の回復、アシドーシスの改善）を有することが報告されており²²⁻²⁴、CO を担持させても赤血球の輸血製剤としての有効性は担保されると考えられる。加えて、期待した通りに出血性ショックモデル動物における CO 結合型赤血球輸血は各臓器において抗アポトーシス作用、オートファジーの抑制、抗酸化作用、さらには全身性の抗炎症作用を発揮し、赤血球輸血で惹起される全身性の虚血再灌流傷害を改善している²⁴⁻²⁶。好都合なことに、CO 結合型赤血球は CO ガスを赤血球液に短時間バブリングすることで簡便に作製できる。よって、CO 結合型赤血球は虚血再灌流傷害を抑制できる用時調製可能な輸血製剤としての臨床使用が期待される。また近年、我々は CO 結合型赤血球製剤を外因的に投与することでクラッシュシンドロームや横紋筋融解症の治療が可能であることを見出した²⁷。この事実は、CO 結合型赤血球製剤が輸血製剤としてだけでなく疾患治療薬としても利用できることを意味しており、今後、疾患治療を目的とした CO 結合型赤血球の幅広い研究が期待される。

4. ヘモグロビンを基盤とした CO 製剤

これまでに、ヒト由来または動物由来ヘモグロビンを用いた非細胞型および細胞型ヘモグロビン製剤 (HBOCs; Hemoglobin-based oxygen carriers) の開発が行われてきた²⁸。本来、これらの HBOCs は酸素運搬体（人工赤血球製剤）として開発されてきたが、上述したようにヘモグロビンは CO と可逆的に結合するため、非細胞型および細胞型 HBOCs を基盤とした CO 製剤の開発も展開されている（図 3C, D）。

4.1. ポリエチレングリコール (PEG) 修飾ヘモグロビン

ヒトヘモグロビンを PEG 修飾した非細胞型 HBOCs 製剤である MP4 に CO 担持させた CO-MP4 が開発された。CO-MP4 は、平均 6 本の 5000Da の PEG でヘモグロビンを覆っており、またほぼ 100% のヘモグロビンに CO が付加している。これまでに、CO と酸素のデュアルガス輸送体としての有効性が検討され、心筋梗塞や鎌状赤血球症に対する治療効果が動物実験により示された^{29,30}。これらの結果を受け、鎌状赤血球症患者における CO-MP4 の Phase 1b 試験が実施され、CO-MP4 を投与後に β 2-マイクログロブリンと N-アセチルグルコサミンダーゼの一時的な上昇がみられるものの、その他の安全性指標に異常は確認されなかった³¹。しかしながら、CO-MP4 の鎌状赤血球症に対する Phase 2 試験の実施は現在のところ見送られている（表 2）。

Prolong Pharmaceuticals 社は PEG 修飾ウシヘモグロビン中のほぼ 100% のヘモグロビンに CO を 100% 結合させた Sanguinate[®]を開発した。Sanguinate[®] は、PEG (MW: 5000Da) 末端のスクシンイミジル基とウシヘモグロビン表面のリジン残基を結合させることで PEG 修飾を施している。これまでに、その高い安全性がラット・ブタ・サルを用いた検討で実証され³²、その後、多くの臨床試験が実施されている（表 2）。健常被験者³³、鎌状赤血球症患者³⁴、末期腎不全患者³⁵を対象とした Phase 1 試験において、Sanguinate[®]（最大投与量：320mg/kg）を投与してもバイタルや生化学パラメーター、血算、尿検査に異常を示さなかった。また、投与数日中に Sanguinate[®] は血中から完全に消失していた。このような高い安全性と適切な体内動態特性（血中非蓄積性）より、Sanguinate[®] のクモ膜下出血による脳虚血に対する Phase 2 試験が実施された³⁶。12 人のクモ膜下出血による脳虚血患者に Sanguinate[®]（160-320mg/kg）を投与した結果、投与直後に一部の虚血部位における血流量の改善は見られた。この結果は、Sanguinate[®] から放出された CO による血管弛緩作用が脳血流量を改善している可能性を示唆している。しかしながら、脳全体の虚血に対して顕著な改善は確認されず、Sanguinate[®] の脳虚血に対する治療効果は限定的であると考えられた。脳虚血の他にも、下肢潰瘍を伴う鎌状赤血球症や血管閉塞を伴う鎌状赤血球症、腎移植に対する Sanguinate[®] の Phase 2 試験も進行しており、これらの結果報告が待たれる。

4.2. ヘモグロビン小胞体 (Hb-V; Hemoglobin-vesicles)

Hb-V は期限切れヒト赤血球製剤より単離精製したヘモグロビンをリン脂質膜に封入した直径約 280nm の細胞型 HBOCs 製剤である³⁷。Hb-V は、アロステリック因子をヘモグロビンと共封入することで酸素運搬能 (P50) を赤血球と同等になるように調整されている。また、PEG を粒子表面へ導入することにより、Hb-V 粒子間の凝集抑制と分散安定性により溶液状態で 2 年以上の室温保存が可能であるだけでなく、細網内皮系細胞による捕捉を抑制することで長い血中半減期を実現している。このように、Hb-V の構造と機能は粒子径を除き赤血球と同様に設計されており、Hb-V は赤血球のバイオミメティック製剤と言える。現在、Hb-V は人工赤血球製剤として開発が進められ

表 2 ヘモグロビンを基盤とした CO 製剤の臨床試験状況

製品	対象疾患	登録試験番号	試験段階	状況
CO-MP4	鎌状赤血球症	NCT01356485	Phase 1	Completed
Sanguinate [®]	健常	NCT02754999	Phase 1	Completed
Sanguinate [®]	脳虚血	NCT02323685	Phase 2	Completed
Sanguinate [®]	鎌状赤血球症	NCT01848925	Phase 1	Completed
Sanguinate [®]	末期腎不全	NCT02437422	Phase 1	Completed
Sanguinate [®]	血管閉塞を伴う鎌状赤血球症	NCT02672540	Phase 2	Completed
Sanguinate [®]		NCT02411708	Phase 2	Completed
Sanguinate [®]	下肢潰瘍を伴う鎌状赤血球症	NCT02600390	Phase 2	Completed
Sanguinate [®]	腎移植	NCT02490202	Phase 2/3	Completed

ており、令和2年10月より「輸血代替として用いるヘモグロビンベシクル製剤NMU-HbVの健康成人男性を対象とした第I相安全性試験(jRCT2011200004)」が開始されている。本稿の“3. 赤血球を利用したCO製剤”で概説したように赤血球がCO輸送担体として利用されている事実より、我々は赤血球のバイオミメティック製剤であるHb-VをCO輸送担体として活用する研究を展開している³⁸⁾。好都合なことに、CO結合型Hb-Vは、Hb-Vを調製する過程において得ることも可能であるためHb-Vと同一の製造ラインで得ることが出来る。また、赤血球と同様にHb-V懸濁液にCOガスをバブリングすることによって調製することも可能である。このようにして作製したCO結合型Hb-Vは内封されたヘモグロビンのほとんどにCOが結合しており、特発性肺線維症³⁹⁾や潰瘍性大腸炎⁴⁰⁾、急性膵炎⁴¹⁾、全身炎症反応症候群⁴²⁾に対して高い治療効果を示した。さらに紙面の都合上、詳細は割愛するが、CO結合型Hb-Vの治療効果には、CO結合型Hb-Vから放出されたCOによる好中球やNADPHオキシダーゼの活性を抑制することによる抗酸化作用、マクロファージの可塑性の制御によるM1マクロファージからの炎症性サイトカインの産生抑制とM2マクロファージからの抗炎症性サイトカインの産生促進などが包括的に作用することに起因していることも明らかとなっている。現行の赤血球輸血システムでは赤血球輸血による感染リスクや医療過誤などの可能性を完全に排除することが出来ず、また、日本の将来人口の減少と少子高齢化社会により今後、献血血液が減少すると言われている。一方、Hb-Vはウイルス感染や血液型不適合などの危険性もなく、長期保存や廃棄赤血球を再利用することで安定供給が期待できる。そのため、安全性や安定供給の面で不安が残されている赤血球の代わりにHb-VをCO輸送担体として活用した疾患治療薬の開発が期待される。

5. 結語

多彩な生理活性を有するCOは新規医療ガスとして様々な疾患に対する治療薬シーズとしてポテンシャルを有する。特に現代医療においても治療が困難な活性酸素や炎症が発症の原因となっている難治性疾患のモデル動物に対して劇的な治療効果を示していることから、これら疾患の新たな治療薬開発の突破口となることが期待される。残念なことに、本稿で記したように現在開発中のCO製剤の多くが動物実験で高い有効性を示しているにも関わらず、臨床研究に進んだ例はごくわずかである。今後、更なるCO製剤の有効性や安全性のデータが蓄積され、COを基盤とした医療の実現が待たれる。

謝辞

本稿で紹介した一部の事例は、JSPS科研費の助成を受けて推進された。また、英文校正を行っていただいたCurtin UniversityのVictor Tuan Giam Chuang博士に心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Coburn RF. The carbon monoxide body stores. *Ann N Y Acad Sci.* 1970; 174: 11-22.
- 2) Coburn RF, Williams WJ, Forster RE. Effect of erythrocyte destruction on carbon monoxide production in man. *J Clin Invest.* 1964; 43: 1098-1103.
- 3) Rattan S, Chakder S. Inhibitory effect of CO on internal anal sphincter: heme oxygenase inhibitor inhibits NANC relaxation. *Am J Physiol.* 1993; 265: G799-804.
- 4) Verma A, Hirsch DJ, Glatt CE, Ronnett G V, Snyder SH. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science.* 1993; 259: 381-384.
- 5) Motterlini R, Otterbein LE. The therapeutic potential of carbon monoxide. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9: 728-743.
- 6) Naito Y, Uchiyama K, Takagi T, Yoshikawa T. Therapeutic potential of carbon monoxide (CO) for intestinal inflammation. *Curr Med Chem.* 2012; 19: 70-76.
- 7) Otterbein LE, Choi AM. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000; 279: L1029-1037.
- 8) Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev.* 2005; 57: 585-630.
- 9) Motterlini R, Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Mann BE, Green CJ. Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities. *Circ Res.* 2002; 90: E17-24.
- 10) Clark JE, Naughton P, Shurey S, Green CJ, Johnson TR, Mann BE, et al. Cardioprotective actions by a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Circ Res.* 2003; 93: e2-8.
- 11) Motterlini R, Sawle P, Hammad J, Bains S, Alberto R, Foresti R, et al. CORM-A1: a new pharmacologically active carbon monoxide-releasing molecule. *FASEB J.* 2005; 19: 284-286.
- 12) Ji X, Cruz LKCD La, Pan Z, Chittavong V, Wang B. pH-Sensitive metal-free carbon monoxide prodrugs with tunable and predictable release rates. *Chem Commun (Camb).* 2017; 53: 9628-9631.
- 13) Ayudhya T, Pellechia PJ, Nin D. ROS-mediated carbon monoxide and drug release from drug-conjugated carboxyboranes. *Dalton Trans.* 2018; 47: 538-543.
- 14) Fayad-Kobeissi S, Ratovonantenaina J, Dabiré H, Wilson JL, Rodriguez AM, Berdeaux A, et al. Vascular and angiogenic activities of CORM-401, an oxidant-sensitive CO-releasing molecule. *Biochem Pharmacol.* 2016; 102: 64-77.
- 15) Palao E, Slanina T, Muchová L, Šolomek T, Vítek L, Klán P. Transition-Metal-Free CO-Releasing BODIPY Derivatives Activatable by Visible to NIR Light as Promising Bioactive Molecules. *J Am Chem Soc.* 2016; 138: 126-133.

- 16) Lee G-Y, Zeb A, Kim E-H, Suh B, Shin Y-J, Kim D, et al. CORM-2-entrapped ultradeformable liposomes ameliorate acute skin inflammation in an ear edema model via effective CO delivery. *Acta Pharm Sin B*. 2020; 10: 2362-2373.
- 17) Nguyen D, Adnan NNM, Oliver S, Boyer C. The Interaction of CORM-2 with Block Copolymers Containing Poly(4-vinylpyridine): Macromolecular Scaffolds for Carbon Monoxide Delivery in Biological Systems. *Macromol Rapid Commun*. 2016; 37: 739-744.
- 18) Ling K, Men F, Wang W-C, Zhou Y-Q, Zhang H-W, Ye D-W. Carbon Monoxide and Its Controlled Release: Therapeutic Application, Detection, and Development of Carbon Monoxide Releasing Molecules (CORMs). *J Med Chem*. 2018; 61: 2611-2635.
- 19) Stewart RD, Peterson JE, Baretta ED, Bachand RT, Hosko MJ, Herrmann AA. Experimental human exposure to carbon monoxide. *Arch Environ Health*. 1970; 21: 154-164.
- 20) Bathoorn E, Slebos D-J, Postma DS, Koeter GH, van Oosterhout AJM, van der Toorn M, et al. Anti-inflammatory effects of inhaled carbon monoxide in patients with COPD: a pilot study. *Eur Respir J*. 2007; 30: 1131-1137.
- 21) Rosas IO, Goldberg HJ, Collard HR, El-Chemaly S, Flaherty K, Hunninghake GM, et al. A Phase II Clinical Trial of Low-Dose Inhaled Carbon Monoxide in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest*. 2018; 153: 94-104.
- 22) Cabrales P, Tsai AG, Intaglietta M. Hemorrhagic shock resuscitation with carbon monoxide saturated blood. *Resuscitation*. 2007; 72: 306-318.
- 23) Sakai H, Horinouchi H, Tsuchida E, Kobayashi K. Hemoglobin vesicles and red blood cells as carriers of carbon monoxide prior to oxygen for resuscitation after hemorrhagic shock in a rat model. *Shock*. 2009; 31: 507-514.
- 24) Ogaki S, Taguchi K, Maeda H, Watanabe H, Ishima Y, Otagiri M, et al. Kupffer cell inactivation by carbon monoxide bound to red blood cells preserves hepatic cytochrome P450 via anti-oxidant and anti-inflammatory effects exerted through the HMGB1/TLR-4 pathway during resuscitation from hemorrhagic shock. *Biochem Pharmacol*. 2015; 97: 310-319.
- 25) Liu H, Yu S, Peng Y, Chang X, Yu X. The protective effects of carboxyhemoglobin during the resuscitation from hemorrhagic shock in rats. *Oncotarget*. 2017; 8: 83619-83625.
- 26) Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Ishima Y, Otagiri M, Maruyama T. Carbon monoxide-bound red blood cell resuscitation ameliorates hepatic injury induced by massive hemorrhage and red blood cell resuscitation via hepatic cytochrome P450 protection in hemorrhagic shock rats. *J Pharm Sci*. 2014;103: 2199-2206.
- 27) Taguchi K, Ogaki S, Nagasaki T, Yanagisawa H, Nishida K, Maeda H, et al. Carbon monoxide rescues the developmental lethality of experimental rat models of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *J Pharmacol Exp Ther*. 2020; 372: 355-365.
- 28) Keipert PE. Hemoglobin-Based Oxygen Carrier (HBOC) Development in Trauma: Previous Regulatory Challenges, Lessons Learned, and a Path Forward. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017 p. 343-50.
- 29) Vandegriff KD, Young MA, Lohman J, Bellelli A, Samaja M, Malavalli A, et al. CO-MP4, a polyethylene glycol-conjugated haemoglobin derivative and carbon monoxide carrier that reduces myocardial infarct size in rats. *Br J Pharmacol*. 2008; 154: 1649-1661.
- 30) Belcher JD, Young M, Chen C, Nguyen J, Burhop K, Tran P, et al. MP4CO, a pegylated hemoglobin saturated with carbon monoxide, is a modulator of HO-1, inflammation, and vaso-occlusion in transgenic sickle mice. *Blood*. 2013; 122: 2757-2764.
- 31) Keipert PE, MP4CO-SCD-105 Study Investigators. Clinical Evaluation of MP4CO: A Phase 1b Escalating-Dose, Safety and Tolerability Study in Stable Adult Patients with Sickle Cell Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 923: 23-29.
- 32) Misra H, Kazo F, Newmark JA. Toxicology and Safety Determination for a Novel Therapeutic Dual Carbon Monoxide and Oxygen Delivery Agent. *J Clin Toxicol*. 2014; 04.
- 33) Misra H, Lickliter J, Kazo F, Abuchowski A. PEGylated Carboxyhemoglobin Bovine (SANGUINATE): Results of a Phase I Clinical Trial. *Artif Organs*. 2014; 38: 702-707.
- 34) Misra H, Bainbridge J, Berryman J, Abuchowski A, Galvez KM, Uribe LF, et al. A Phase Ib open label, randomized, safety study of SANGUINATE™ in patients with sickle cell anemia. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2017; 39: 20-27.
- 35) Abu Jawdeh BG, Woodle ES, Leino AD, Brailey P, Tremblay S, Dorst T, et al. A phase Ib, open-label, single arm study to assess the safety, pharmacokinetics, and impact on humoral sensitization of SANGUINATE infusion in patients with end-stage renal disease. *Clin Transplant*. 2018; 32: e13155.
- 36) Dhar R, Misra H, Diringer MN. SANGUINATE™ (PEGylated Carboxyhemoglobin Bovine) Improves Cerebral Blood Flow to Vulnerable Brain Regions at Risk of Delayed Cerebral Ischemia After Subarachnoid Hemorrhage. *Neurocrit Care*. 2017; 27: 341-349.
- 37) 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: 10.
- 38) Taguchi K, Yamasaki K, Sakai H, Maruyama T, Otagiri M. The Use of Hemoglobin Vesicles for Delivering Medicinal Gas for the Treatment of Intractable Disorders. *J Pharm*

- Sci. 2017; 106: 2392-2400.
- 39) Nagao S, Taguchi K, Sakai H, Tanaka R, Horinouchi H, Watanabe H, et al. Carbon monoxide-bound hemoglobin-vesicles for the treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Biomaterials*. 2014; 35: 6553-6562.
- 40) Nagao S, Taguchi K, Miyazaki Y, Wakayama T, Chuang VTG, Yamasaki K, et al. Evaluation of a new type of nano-sized carbon monoxide donor on treating mice with experimentally induced colitis. *J Control Release*. 2016; 234: 49-58.
- 41) Taguchi K, Nagao S, Maeda H, Yanagisawa H, Sakai H, Yamasaki K, et al. Biomimetic carbon monoxide delivery based on hemoglobin vesicles ameliorates acute pancreatitis in mice via the regulation of macrophage and neutrophil activity. *Drug Deliv*. 2018; 25: 1266-1274.
- 42) Nagao S, Taguchi K, Sakai H, Yamasaki K, Watanabe H, Otagiri M, et al. Carbon monoxide-bound hemoglobin vesicles ameliorate multiorgan injuries induced by severe acute pancreatitis in mice by their anti-inflammatory and antioxidant properties. *Int J Nanomedicine*. 2016; 11: 5611-5620.

日本血液代替物学会 総会

- | | |
|---|---|
| <p>1. 日 時：
令和2年（2020年）12月3日（木）12：20～</p> <p>2. 場 所：
WEB開催</p> | <p>3. 議 題：</p> <p>① 第27回年次大会の報告</p> <p>② 会員動向</p> <p>③ 平成31年度（令和元年度）度事業報告</p> <p>④ 平成31年度（令和元年度）会計報告</p> <p>⑤ 令和2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27回日本血液代替物学会年次大会
(大会長 河野 光智)
- 2) 開催年月日 令和2年12月3日（木）～4日（金）
- 3) 開催場所 WEB開催
- 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、製薬企業等

② 会員状況は以下の通り

- 1) 施設会員：2社
- 2) 正会員：75名
- 3) 購読会員：2箇所

③ 平成31年度（令和元年度）事業報告（平成31年4月1日～令和2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
令和2年12月3日（木）WEB開催
- 2) 第26回年次大会の開催（大会長：酒井 宏水）
(第17回血液代替物国際会議との同時開催)
令和元年11月21日（木）～23日（土） 於 奈良春日野国際フォーラム薨
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第27巻1号

④ 平成31年度（令和元年）収支決算報告が行なわれ承認された。

平成31年度（令和元年度）会計報告
収支決算表
(自 平成31年4月1日 至 令和2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	4,133,737	会誌出版費	446,030
正会員会費	460,000	集会・委員会費	64,955
施設会員会費	400,000	年会補助金	0
購読会員会費	6,000	ホームページ維持費	326,500
学生会員会費	0	謝金	36,500
雑収入	1,320	事務費（消耗費）	34,508
国際会議（17 th -ISBS-2019）残金	1,170,058	雑役務費	6,560
利息	643	次期繰越金	5,256,705
計	6,171,758	計	6,171,758

⑤ 令和2年度事業計画（経過報告）（令和2年4月1日～令和3年3月31日）

- 1) 定期総会の開催
令和2年12月3日（木）12：20～
於 WEB開催
- 2) 第27回年次大会の開催（大会長：河野 光智）
令和2年12月3日（木）～4日（土）
於 WEB開催
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第28巻1号

日本血液代替物学会 会則

第1章 総則

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

第2条：(事務局) 本会の事務局は当分の間、会長の所属機関内に置く。

2. 事務局は会長の統括のもと本会の事業および会計に関する一般事務を司る。

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

第4条：(事業) 本会は前条の目的達成のため、次の事業を行う。

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

第2章 会員

第5条：(種別) 本会会員は次の分類とする。

- 1) 正会員 本会の目的に賛同する個人で所定の手続きを行い、会費を納入した者とする。
- 2) 購読会員 本会の会誌を購読する団体または個人とする。
- 3) 学生会員 本会の目的に賛同する学生で所定の手続きを行い、会費を納入した者とする。
- 4) 施設会員 本会の目的に賛同する施設とする。

第6条：(会費) 会員は、つぎの種別に従って会費を納めなければならない。

- 1) 年会費 (年額)
 - 1) 正会員 1万円
 - 2) 購読会員 3千円
 - 3) 学生会員 3千円
 - 4) 施設会員 1口以上 (1口5万円)
- 2) 既納の会費はいかなる理由があっても、これを返還しない。

第7条：(入会) 本会に入会希望者は、所定の入会申込書を事務局宛に提出し、入会審査を経なければならない。

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

第9条：(未納者) 年会費未納の会員には、年度末に催促する。2年間未納の場合には会誌の送付を停止する。入金確認後会誌の送付を再開する。

第10条：(除名) 本会の目的に反する行為あるいは本会の名誉を損なう行為のあった会員は、評議員会の議決によってこれを除名することができる。

第3章 役員、顧問、評議員および職員

第11条：(設置および定数) 本会に次の役員を置く。

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

第12条：(役員を選任) 役員は、正会員の内から評議員会で選出し、監事は正会員の中から総会で選出する。

2. 顧問は、会長が委嘱し、その任期は役員任期に準ずる。

第13条：(任期) 役員および監事の任期は2年とし、再任を妨げない。

第14条：(会長) 会長は、各事業を司り本会を代表統括する。

第15条：(副会長) 会長を補佐し会長に事故があるときはその代理となる。

第16条：(理事) 理事は理事会を組織して、この会則に定められた事項のほか、評議員会および総会の権限に属する事項以外の事項を評議し、施行する。

第17条：(監事) 監事は、資産の状況および理事の会務執行状況を監査する。

第18条：(顧問) 顧問は、理事会および評議員会に出席して、意見を述べることができる。

第19条：(評議員) 評議員は正会員、施設会員の中から総会で選出し、任期は2年とする。ただし再任を妨げない。

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

第20条：(事務局および職員) 本会の事務を処理するため、事務局および職員を置く。

2. 職員人事は会長が任命権者となり、有給とする。

第4章・年次大会長

第21条：(大会長と職務) 本会に年次大会を主宰する大会長1名をおく。また、大会長を補佐し、大会長に事故があったとき、または欠けたときには、その職務を代行する副大会長1名をおくことができる。

第22条：(選任) 大会長および副大会長は、評議員の中から、理事会の議決によって選任される。

2. 理事会の議決によって、副大会長を次年度の大会長とすることができる。

第23条：(任期) 大会長および副大会長の任期は、選任された日に始まり、学会年次大会が終了した日に終わる。

第5章 会議

第24条：(会議) 本会の会議は、つぎの3種とする。

- 1) 理事会
- 2) 総会
- 3) 評議員会

第25条：(理事会) 理事会は、理事をもって構成する。

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

第26条：(総会) 総会は、通常総会、臨時総会の2種とし、会長が召集する。

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

第27条：(総会議長) 通常総会の議長は会長とし、臨時総会の議長は、会議の都度会員の互選で定める。

第28条：(総会の通知) 総会の召集は、その開会期日1週間前までに、総会に付すべき事項、日時および場所を記録した書面

または会誌で、会員に通知しなければならない。

2. 出席会員の3分の2以上の同意があったときは、あらかじめ通知しなかった事項について審議し、議決することができる。

第29条：(審議事項) 次の事項は、通常総会の承認を求めなければならない。

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

第30条：(総会の定足数) 総会は、正会員現在数の5分の1以上出席しなければ、議事を開き、議決することができない。ただし、当該議事について、あらかじめ書面をもって意志を表示したものは出席者と見なす。

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

第31条：(総会議事録の通知) 総会の議事の要領および議決した事項は、会誌および学会ホームページに掲載する。

第32条：(評議員会) 評議員会は、評議員で組織し、必要がある場合に会長が召集する。

2. 会長は評議員会の議長となる。

第33条：(審議事項) 評議員会は、この会則に定めるもののほか、理事会で必要と認めた事項を審議する。

第34条：(評議員会の定足数) 評議員会は、評議員現在数の2分の1以上の出席がなければ、議事を開き、議決することができない。ただし、当該議事について、あらかじめ書面をもって意志を表示したものは出席者と見なす。

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

第35条：(議事録の保存) 全ての会議には議事録を作成し、これを事務局に保存する。

第6章 資産及び会計

第36条：(資産) 本会の資産は次の通りとする。

- 1) 会費
- 2) 寄付金

- 3) 事業にともなう収入
- 4) 資産から生じる果実
- 5) その他の収入

第37条：(資産の管理) 本会の資産は、会長が管理し、現金は理事会の議決によって、確実な有価証券を購入するか、または定期郵便貯金とするか、もしくは確実な信託銀行に信託するか、あるいは定期預金として会長が保管する。

第38条：(寄付の受領) 寄付金品は、理事会の議決を経てこれを受領する。

第39条：(経費) 本会の経費は、会費、刊行物に対する購読料、寄付金、資産から生じる果実などの運用資産をもって支弁する。

第40条：(事業計画および収支予算) 本会の事業計画およびこれにともなう収支予算は、毎年会計年度開始前に会長が編成し、理事会、評議員会の議決を経て、総会の承認を受けなければならない。

第41条：(収支決算) 会計報告は会長が毎年一回、会計報告書を作成し、監事の監査を経て、評議員会および総会の承認を得る。

第42条：(会計年度) 本会の会計年度は4月1日より翌年3月31日までとする。

第7章 会則の変更ならびに解散

第43条：(会則の変更) 本会の会則の変更には理事会の発議と総会の議決を要する。

第44条：(解散) 本会の解散は、理事会、評議員会および総会の各々において出席会員の4分の3以上の同意を得なければならない。

第45条：本会の解散にともなう残余財産は、理事会、評議員会および総会の各々において出席会員の4分の3以上の議決を経て、本会の目的と同種または類似の公益事業に寄付するものとする。

第8章 補則

第46条：この会則を施行するために必要とされる細則は、理事会および評議員会の議決を経て、別に定める。

第47条：(専門委員会の設置と委員の選任) 学会運営に伴う専門委員会の設置ならびに委員の選任は理事会の承認を経て行うことができる。

委員には会員の他に非会員の学識経験者もなることができる。

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

平成16年10月15日改定

平成26年12月8日改定

令和3年度 日本血液代替物学会役員名簿

顧問	高久史磨	地域医療振興協会 会長
会長	酒井宏水	奈良県立医科大学医学部 教授
副会長	堀之内宏久	さいたま市立病院 院長
理事	東 寛	旭川医科大学 名誉教授
	池田康夫	早稲田大学 特任教授
	河野光智	埼玉医科大学医学部 教授
	小松晃之	中央大学理工学部 教授
	武岡真司	早稲田大学理工学術院 教授
	丸山 徹	熊本大学薬学部 教授
監事	小林紘一	慶應義塾大学 名誉教授
	小田切優樹	崇城大学薬学部 特任教授

歴代会長：

土田 英俊（早稲田大学 名誉教授）	1993年7月～1999年3月
小林 紘一（慶應義塾大学 名誉教授）	1999年4月～2013年3月
武岡 真司（早稲田大学 教授）	2013年4月～2018年3月
酒井 宏水（奈良県立医科大学 教授）	2018年4月～

日本血液代替物学会 評議員名簿

(五十音順)

東 寛	旭川医科大学 名誉教授	佐竹 正博	日本赤十字社血液事業本部 中央血液研究所 所長
阿部喜代司	筑波大学 名誉教授	高久 史磨	地域医療振興協会 会長
池田 康夫	早稲田大学 特任教授	高橋 英嗣	佐賀大学大学院 教授
池淵 研二	埼玉医科大学 教授	田口 和明	慶應義塾大学薬学部 准教授
石田 竜弘	徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授	武岡 真司	早稲田大学理工学術院 教授
伊藤 俊之	京都府赤十字血液センター	照井 克生	埼玉医科大学医学部 教授
大柳 治正	近大姫路大学 副学長	長澤 俊郎	筑波記念病院 院長
奥 直人	帝京大学薬学部 特任教授	西出 宏之	早稲田大学 名誉教授
小田切優樹	崇城大学薬学部 特任教授	萩沢 康介	防衛医科大学校 助教
北岸 宏亮	同志社大学理工学部 准教授	福島 昭二	神戸学院大学薬学部薬学科 教授
木下 学	防衛医科大学校 教授	堀之内宏久	さいたま市立病院 院長
河野 光智	埼玉医科大学医学部 教授	丸山 徹	熊本大学薬学部 教授
小林 紘一	慶應義塾大学 名誉教授	村田 満	慶應義塾大学医学部 教授
小松 晃之	中央大学理工学部 教授		
酒井 宏水	奈良県立医科大学医学部 教授		

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):

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

ii) Submission by post of four sets of hardcopies.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

References to electronic sources should be given as follows:

Name of website.

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

Examples:

1. Wong NS, Chang TM. Polyhemoglobin-fibrinogen: a novel oxygen carrier with platelet-like properties in a hemodiluted setting. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007; 35: 481-489.
2. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *J Am Med Assoc* 2008; 299: 2304-2312.
3. Sakai H, Sou K, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin vesicles as a Molecular Assembly. Characteristics of Preparation Process and Performances of 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、原稿の修正を求められる場合がある。修正論文（Revised Manuscript）の投稿に際しては、送付状に「査読意見に対する回答」を添え、意見に対して一つ一つ回答をするとともに、修正箇所がある場合にはこれを明記する。

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

4) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著

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

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

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

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

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

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

9) 句読点はコンマ（,）ピリオド（.）とする。

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

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

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

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

(例)

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

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

18) 原稿の送付先

〒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 酒井 宏水 殿

To: Dr. Hiromi Sakai

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.

令和 年 月 日

Date:

代表著者（署名）

Corresponding Author (Signature) _____

連絡先

Contact Address:

(本用紙はコピーしたものを使用されても結構です。)

This form may be photocopied for use.

日本血液代替物学会 会誌「人工血液」編集部
〒634-8521 奈良県橿原市四条町840 奈良県立医科大学医学部化学教室内
E-mail: artificial-blood@naramed-u.ac.jp

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

生命のリレー

善意の献血に支えられた、生命のお薬。

皆さまの温かい想いが込められた大切なバトンを、
必要とされる人たちへ、私たちがしっかりとつなぎます。



善意と医療のかけ橋

JB 一般社団法人
日本血液製剤機構

東京都港区芝浦3-1-1

<https://www.jbpo.or.jp>

謝辞

第28回日本血液代替物学会年次大会の開催に際し
ご援助を受け賜りました企業に謝意を表します。

〈賛助〉

株式会社オキシキャリア
ネオメディカル

〈広告掲載〉

株式会社 センシュール科学
シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社

(50音順、2021年10月11日現在)

編集委員

●酒井 宏水(委員長), 東 寛, 武岡 真司, 堀之内 宏久, 杉山 直樹, 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.29(1) 2021年9月24日発行

〒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

〒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

低コストと高いパフォーマンスの両立

HPLC / 高速液体クロマトグラフィー Schambeck SFD GmbH HPLC SYSTEM

➤ ドイツ製

➤ デュアル波長検出可能

2つの異なる波長での同時測定が可能にします。

➤ PDA検出器対応

4つの異なる波長で同時に測定。

分析する物質ごとに最適な波長を選択できます。

➤ オートサンプラー

デュアルニードルデザイン

ガイドニードルがセプタムを貫通し、注射針の汚染を防ぎます。

➤ 多彩なインターフェイスで幅広いデータ収集・解析



くわしくは、弊社ホームページまたは下記までお問合せください。

センシュ科学

検索

をクリック。

一歩進んだ仕事をしたい

SSC 株式会社 センシュ科学
<http://www.ssc-jp.com>

東京本社 TEL(03)3395-3251(代) FAX(03)3395-3268

E-mail: tokyo@ssc-jp.com

埼玉営業所 TEL(049)297-9807 FAX(049)297-9803

E-mail: saitama@ssc-jp.com

日本血液代替物学会
<http://www.blood-sub.jp/>