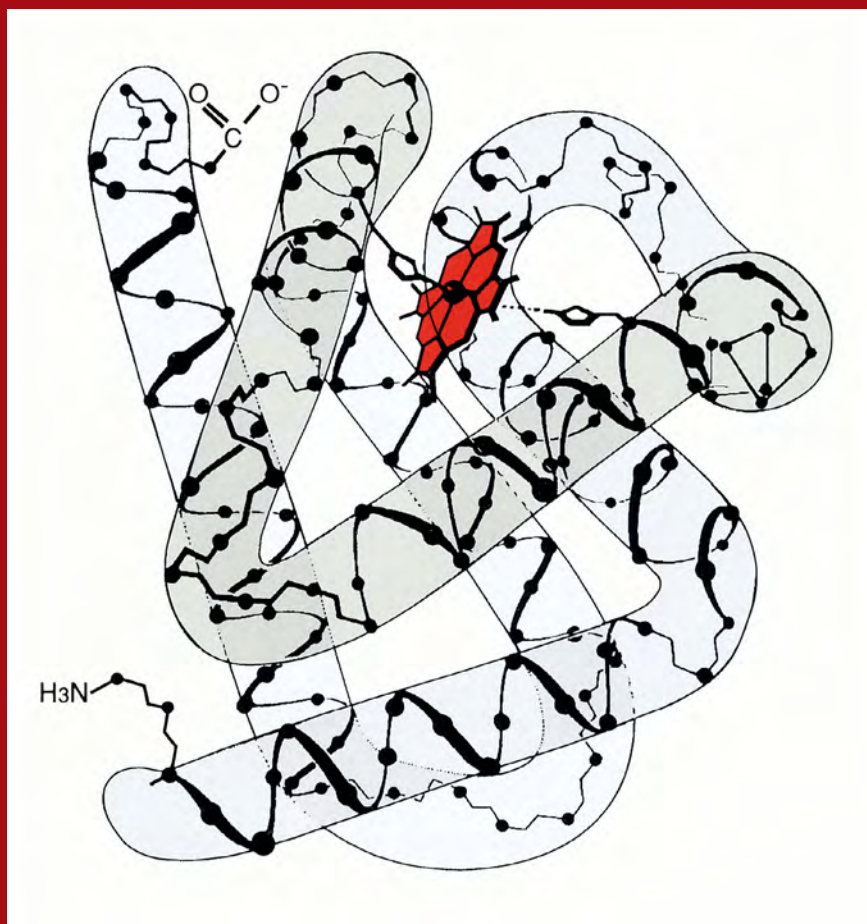


人工血液

VOLUME 30
NUMBER 1
2022

日本血液代替物学会 会誌

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



追悼 高久史麿先生 (1931-2022)

第29回年次大会プログラム

二次投稿論文:

軟体動物ヘモシアニンの構造と機能

トピックス:

アルブミンのポリスルフィドによる新たな生体恒常性維持機構

トピックス:

水素ガス吸入療法への期待

事務局たより

Obituary: Dr. Fumimaro Takaku (1931-2022)

The 29th Annual Meeting Program

Secondary Publication:

Structure and Function of Molluscan Hemocyanins

Topics:

A Novel Homeostatic Mechanism via Albumin Polysulfides

Topics:

Expectations for Hydrogen Gas Inhalation Therapy

Artificial Blood

The Society of Blood Substitutes, Japan

実験動物麻酔装置 SN-487-OT Air 回収機能付

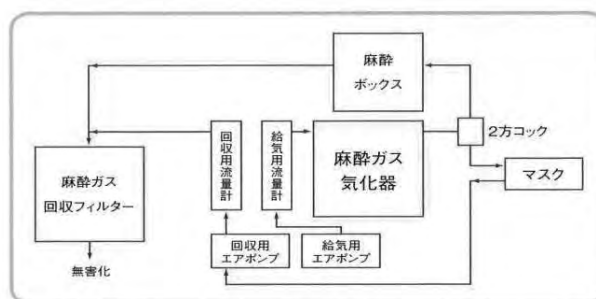


マスクの排気側を麻酔ガス回収フィルターへ接続するだけでは、フィルターの抵抗により回収することができません。SN-487-OT回収機能付きでは、マスクの排気側へエアポンプと流量計が搭載され、マスクからのガス漏れを最小限に抑えます。

特に画像診断装置や顕微鏡のステージ上、脳固定器での麻酔に最適です。

SN-487-OT Air+O₂ 回収機能付もございます。

W315xD255xH220mm 約11.5kg



実験動物人工呼吸器 SN-480-7型



発売以来45年以上のロングセラー！

換気不足にならないから安心。

「閉鎖式」なので動物の体重により換気容量を設定。定められた換気容量を正確に送気・換気できます。

肺内の残存空気量によって送気量調節し、呼吸容量が不明確となる「開放式」の問題を解決しました。

SN-480-7	モルモット・ラット・マウス用		コンスタント型
	3	10	30
呼吸可変容量	0～3cc	0～10cc	0～30cc
呼吸可変回数	20～150/min		
電動機	直流ギヤモーター(100V 60W)		
寸法	W320xD230xH270mm		
重量	約11kg		

マウス・ラットなどの小動物向けに設計された閉鎖式人工呼吸器です。換気容量が1cc以下の動物でも、正確に送気・換気が行えます。

株式会社 シナノ 製作所

人工血液

第30巻 第1号 2022年11月

追悼 高久史麿先生 (1931-2022)	3
第29回年次大会プログラム	
大会長挨拶.....	5
大会日程表.....	8
プログラム.....	10
抄録.....	12
二次投稿論文：軟体動物ヘモシアニンの構造と機能..... 加藤 早苗 他	45
トピックス：アルブミンのポリスルフィドによる新たな生体恒常性維持機構 異島 優 他	59
トピックス：水素ガス吸入療法への期待..... 本間 康一郎	65
事務局たより	

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 30 No. 1 November, 2021

<i>Obituary: Dr. Fumimaro Takaku (1931-2022)</i>	3
<i>The 29th Annual Meeting Program</i>	
<i>Address from the President</i>	5
<i>Schedule</i>	8
<i>Program</i>	10
<i>Abstracts</i>	12
<i>Secondary Publication: Structure and Function of Molluscan Hemocyanins</i> Sanae Kato, et al.	45
<i>Topics: A Novel Homeostatic Mechanism via Albumin Polysulfides</i> Yu Ishima, et al.	59
<i>Topics: Expectations for Hydrogen Gas Inhalation Therapy</i> Koichiro Homma	65

故高久史磨先生 ご逝去を追悼して

本学会の顧問、高久史磨先生が令和4年3月24日に日にご逝去されました。高久先生は、日本血液代替物学会の設立（1993年）以来、これまで本学会の顧問として学会活動を支えてくださいました。日本血液代替物学会の設立当時、高久先生にご執筆いただきました下記「巻頭言」には、輸血治療における感染症や血液事業の歴史と課題、そして人工血液実用化への大きな期待を記されております。本学会の設立から29年が経ち、この間、日本から幾つもの候補物質が挙がっており、臨床試験に到達したのもございます。高久先生のご期待に添えるよう、学会会員一同、我が国の医療技術の向上に貢献することを今後も目指してゆきたいと思えます。本学会にご貢献くださいました高久史磨先生に対し、感謝申し上げますとともに、心よりご冥福をお祈り致します。

日本血液代替物学会 会長 酒井宏水

【高久先生のご略歴】 1954年 東京大学医学部卒。1960年 東京大学医学博士。群馬大学医学部助手、東京大学医学部助手、シカゴ大学留学などを経て、1972年 自治医科大学内科教授。1982年 東京大学医学部第三内科教授。1990年 国立病院医療センター病院長。1993年 国立国際医療センター初代総長。1996-2012年 自治医科大学学長。2004-2017年 日本医学会第6代会長。2018年 地域医療振興協会会長。

人工血液 第1巻1号（1993年）3頁

巻頭言 「人工血液完成への大きな期待」 高久史磨

輸血は近代医療特に外科や救急の場合では不可欠な治療法となっているが、現在行われている血液型を一致させた同種間の輸血は、今世紀の始め頃からは行われるようになった。わが国でも大正8年（1919年）に輸血が始まったと記載されている。第2次大戦前の輸血は医療の現場で供血者から直接血液をとり、その場で患者に輸血する事が行われていたが、第2次大戦後の1949年に血液銀行による保存血輸血が開始された。その後売血を基本とする商業血液銀行全盛の時代を経て、現在の日本赤十字社による献血からの輸血へと発展してきた事は、周知のごとくである。

この様に輸血の体制が整備され、献血血液に対する検査の範囲が広がるに従って輸血に伴う副作用、特に感染症の危険が減少してきた。それでも輸血による肝炎ウイルスの感染は、極く最近まで輸血の副作用として最も恐れられていたし、アメリカでは輸血によってAIDSに感染した患者が少なくないこともよく知られた事実である。また、最近では輸血液中に混入したリンパ球によるGVHD（移植片対宿主病）が頻度は稀であるが、致死性の疾患として恐れられている。この他AIDSの原因ウイルスの場合にみられた様な、今迄未知のウイルスによる感染が輸血によって、今後起きる可能性も否定できない。

一方、輸血は現在の医療にとって必須の治療法であり、ヒトの赤血球に代わり得る安全な人工血液が出来れば、医療に対する貢献は計り知れないものがある。そのような人工血液の完成と実用化を目指した今回の日本血液代替物学会の設立は誠に喜ばしいことで、本学会の発展と学会員による研究の成果を大いに期待するものである。

第29回日本血液代替物学会年次大会

The 29th Annual Meeting of the Society of Blood Substitutes, Japan

『人工血液開発の最新動向と将来展望』

大会長：小松 晃之（中央大学）

会 期：2022年12月5日（月）・6日（火）

会 場：中央大学理工学部（後楽園キャンパス）3号館3階小ホール

東京都文京区春日 1-13-27

【年次大会事務局】

中央大学理工学部 応用化学科 小松研究室内

〒112-8551 東京都文京区春日 1-13-27

TEL/FAX：03-3817-1910

E-mail: 29sbsj@gmail.com

大会長挨拶

この度、中央大学理工学部（後楽園キャンパス）において、第29回日本血液代替物学会年次大会を開催させて頂くこととなりました。日本血液代替物学会は、明年創立30周年を迎える歴史と伝統ある学会です。あらためてその長い時間軸をたどりながら展望してみると、いま我々が次の一步を踏み出す大事な地点にいることがわかります。

現在、日本では輸血用血液の85%が50歳以上の患者さんに使用されています。今後少子高齢化が進行し、輸血を必要とする高齢者の数が増え続け、献血者層（若年層）人口が減少すると、2025年には“年間約65万人分の血液が不足する”とも予測されています（厚生労働省推計）。さらに新型コロナウイルス感染症蔓延による献血者数の低減がこれに拍車をかけ、人工血液（血液代替物）の実現はますます強く望まれる状況になってきました。

我国における人工赤血球の開発は、安全性と有効性の確認されたヘモグロビン小胞体制剤が臨床試験に入っています。上述したように、日本血液代替物学会は次の10年の扉を開く重要な時期にあるといえます。そこで本大会の主題を『人工血液開発の最新動向と将来展望』とし、研究最前線の状況、用途展開の拡充、新規製剤の紹介に焦点をあてながら、本分野の裾野を拡げる企画も盛り込みました。産官学の研究者・医師たちが横断的に実用化の具体策や次世代物質に関する意見交換を行うことにより、血液代替物の現状と今後を展望したいと思います。過去2回の年次大会はオンライン開催でしたので、3年ぶりの対面開催となります。是非皆様方の活発な討論により、本大会が実り多きものになるよう願っております。

第29回日本血液代替物学会年次大会
大会長 小松 晃之
(中央大学理工学部 教授)

お知らせとお願い

■会員・参加者の皆様へ

●会場

中央大学理工学部（後楽園キャンパス）3号館3階小ホール（東京都文京区春日1-13-27）

●受付

2022年12月5日（月） AM 8:15 より

2022年12月6日（火） AM 8:15 より

クロークは受付と同じフロア（3階）にあります。

●参加登録

一般：10,000円、学生：3,000円

本年次大会ホームページ（<http://www.blood-sub.jp/kaikoku.php>）の事前参加登録サイトより事前参加登録（参加者の情報入力）の上、ご来場ください。

参加登録費は、当日、年次大会受付にて現金でお支払ください（クレジットカードは使用できません）。年次大会受付にて参加登録費をお支払いいただいた方に、ネームカードをお渡しますので、所属・氏名をご記入ください。会期中、ネームカードは会場内で必ずご着用ください。

●入会受付

受付にて日本血液代替物学会の入会手続きも行っております。年会費は、正会員10,000円、購読会員6,000円、学生会員5,000円です。

●年次大会予稿集

第29回年次大会の予稿集（会誌「人工血液」2022年号に含まれる）は、発表者の方には事務局より事前送付しております。当日はお忘れなくお持ちください。また、年次大会受付にて一部1,500円で販売しております。

■発表者の皆様へ

●発表時間

特別講演、教育講演		50分
トピックス		40分
シンポジウム講演	発表15分+討論4分（交代1分）	計20分
一般演題	発表10分+討論4分（交代1分）	計15分

発表は時間厳守をお願いいたします。

発表と討論における使用言語は日本語または英語とします。

■発表者へのお願い

1. 発表形式は、液晶プロジェクターを用いたプレゼンテーションのみとします。発表内容は、PowerPoint 等のプレゼンテーションソフトを使用してご用意ください。
2. 発表時に使用するパーソナルコンピューター (PC) は各自でご準備ください。発表者は、事前の休憩時間にご自分の PC を指定された端末に接続し、液晶プロジェクターから問題なく投影されることを確認願います。
3. 念のため事務局で PC (Windows 10、PowerPoint 対応) を用意しますが、あくまでも予備となります。
4. PC のトラブルに備えて、発表原稿ファイルを USB メモリ等の一般的なメディアにバックアップしてご持参ください。
5. 動画ファイルは事前に再生できるかご確認ください。
6. ご使用いただく PC は HDMI または VGA (D-sub 15pin) のモニター出力端子が必要です。これら端子がない PC をご使用の場合は、必ず別途変換コネクタを持参ください。
7. Mac を使用される発表者は必ず外付けのコネクタを持参ください。
8. スクリーンセーバー、ならびに省電力設定は予め解除してください。

■学生講演賞について

本年次大会では「学生講演賞」を設けて、優れた講演を顕彰します。

選考方法：審査委員の審査結果をもとに、審査委員会において選考・決定する。

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

授与：賞状を授与。賞状は本年次大会の閉会式（2022年12月6日（火））において大会長から本人に授与する。

■各種会議日程

理事会・評議員会：2022年12月5日（月） 12：10～13：10 3号館10階31000会議室

総会：2022年12月5日（月） 13：20～13：40 3号館3階小ホール

■大会事務局

〒112-8551 東京都文京区春日1-13-27

中央大学工学部 応用化学科 小松研究室内

TEL & FAX 03-3817-1910

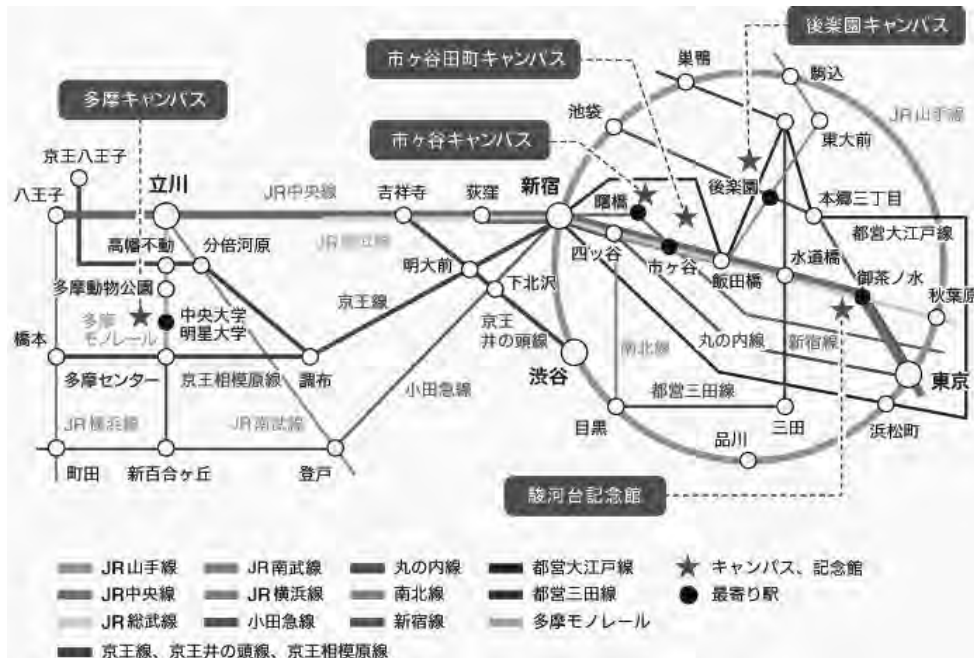
E-mail 29sbsj@gmail.com

大会日程表

	2022年12月5日(月)	2022年12月6日(火)
	8:15~ 受付	8:15~ 受付
	8:55-9:00 開会の辞 小松晃之	
9:00	9:00-11:00 シンポジウム1 人工赤血球製剤(ヘモグロビン小胞体)の最新開発状況	
9:30	9:00-9:20 (酒井宏水) S1-1 酒井宏水(奈良医大)	9:30-10:45 一般演題2
	9:20-9:40 (東 寛) S1-2 東 寛(旭川医大)	9:30-9:45 (加藤 遼) G-6 長森恒久(旭川医大)
10:00	9:40-10:00 S1-3 石橋弘樹(防衛医大)	9:45-10:00 (伊藤大知) G-7 堀田盛弘(早稲田大)
	10:00-10:20 S1-4 大岩加奈(東海大)	10:00-10:15 G-8 渡部祐樹(慶應義塾大)
10:30	10:20-10:40 S1-5 百武 徹(横浜国大)	10:15-10:30 G-9 鈴木悠斗(慶應義塾大)
	10:40-11:00 S1-6 田口和明(慶應義塾大)	10:30-10:45 G-10 小林樹広(中央大)
11:00	休憩(10分)	10:45-11:00 G-11 臼井朝音(中央大)
	11:10-12:00 特別講演 藤村 幹(北海道大) (小林紘一) 脳卒中に関する最近のエビデンス: 脳梗塞ならびにくも膜下出血に対する急性期治療の現状と人工酸素運搬体への期待	休憩(10分)
		11:10-12:00 教育講演 柴山修哉(自治医大) (小松晃之) 「ヘモグロビンの構造・機能・動態研究の最前線」
12:00	12:00-13:20 昼休み	12:00-13:20 昼休み
12:30	12:10-12:55 理事会・評議員会 (10階 31000会議室)	
13:00		13:20-14:50 シンポジウム3 人工血小板製剤の実用化に向けて
		13:20-13:30 (武岡真司) OR 武岡真司(早稲田大)
13:30	13:20-13:40 総会(20分)	13:30-13:50 (石田 治) S3-1 佐々瑠花(防衛医大)
	休憩(5分)	13:50-14:10 S3-2 金子恒樹(埼玉医大)
14:00	13:45-15:15 シンポジウム2 ヘモアクト型人工酸素運搬体製剤の開発と応用展開 (小松晃之)	14:10-14:30 S3-3 石田 治(防衛医大)
	13:45-13:55 (鏡谷武雄) S2-1 小松晃之(中央大)	14:30-14:50 S3-4 松原由美子(慶應義塾大)
	13:55-14:15 S2-2 鏡谷武雄(宮の森記念病院)	休憩(10分)
14:30	14:15-14:35 S2-3 田口和明(慶應義塾大)	15:00-15:40 トピック 富安博隆(東京大院)
	14:35-14:55 S2-4 山田大雅(中央大)	(小松晃之) 獣医領域における人工血液製剤の必要性と今後の展望
15:00	14:55-15:15 S2-5 岡本 航(中央大)	休憩(10分)
	休憩(10分)	15:50-16:35 一般演題3
15:30	15:25-16:40 一般演題1	15:50-16:05 (田口和明) G-12 松平 崇(奈良医大)
	15:25-15:40 (松平 崇) G-1 伊藤康裕(柏葉脳外病院)	16:05-16:20 G-13 毛 斉悦(同志社大)
	15:40-15:55 (河野光智) G-2 伊藤千尋(慶應義塾大)	16:20-16:35 G-14 垣内健太(早稲田大)
16:00	15:55-16:10 G-3 吉田瑠佳(中央大)	準備(5分)
	16:10-16:25 G-4 Zhang Qiming(東京大院)	16:40 学生講演賞発表 小松晃之
	16:25-16:40 G-5 高山夏実(中央大)	閉会の辞
17:00		

交通案内

中央大学への交通アクセス



中央大学工学部（後楽園キャンパス）へのアクセス



- 東京メトロ丸ノ内線・南北線
『後楽園駅』出口4から徒歩5分
- 都営三田線・大江戸線
『春日駅』出口6から徒歩7分
- JR 総武線『水道橋駅』から徒歩15分

住所：〒112-8551
東京都文京区春日1-13-27
TEL：03-3817-1711



- キャンパスへは春日通り（正門）からお入りください（東門は工事車両専用）。
- 2号館、1号館を通り抜けて、3号館に入りましたら奥（南側）のエレベーターで3階までお上がりください。

第29回日本血液代替物学会
年次大会会場：3号館3階 小ホール
理事会・評議員会：3号館10階 31000室

第1日目 2022年12月5日(月)

- 8:55 開会の辞
- 9:00-11:00 シンポジウム1「人工赤血球製剤(ヘモグロビン小胞体)の最新開発状況」
[司会:酒井 宏水(奈良県立医科大学)、東 寛(旭川医科大学)]
- 9:00-9:20 S1-1 備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤の実用化を目指す研究
酒井 宏水(奈良県立医科大学)
- 9:20-9:40 S1-2 人工赤血球(ヘモグロビン ベシクル)製剤の治験(First-in-human)結果の最終報告
東 寛(旭川医科大学)
- 9:40-10:00 S1-3 産科危機的出血動物モデルの確立と人工赤血球の蘇生効果についての検証
石橋 弘樹(防衛医科大学)
- 10:00-10:20 S1-4 ヘモグロビン小胞体の気管移植片における上皮血管再灌流の検討演
大岩 加奈(東海大学)
- 10:20-10:40 S1-5 微小血管における人工赤血球の流動特性と酸素供給のシミュレーション
百武 徹(横浜国立大学)
- 10:40-11:00 S1-6 一酸化炭素結合型ヘモグロビン小胞体の薬剤誘発性臓器傷害に対する抑制効果
田口 和明(慶應義塾大学)
=休憩10分=
- 11:10-12:00 特別講演[司会:小林 紘一(慶應義塾大学)]
脳卒中に関する最近のエビデンス:脳梗塞ならびにくも膜下出血に対する急性期治療の現状と人工酸素運搬体への期待
藤村 幹(北海道大学)
- 12:00-13:20 =昼休み=
- 12:10-13:10 理事会・評議員会(10階 31000会議室)
- 13:20-13:40 総会
=休憩5分=
- 13:45-15:15 シンポジウム2「ヘモアクト型人工酸素運搬体制剤の開発と応用展開」
[司会:小松 晃之(中央大学)、鏡谷 武雄(宮の森記念病院)]
- 13:45-13:55 S2-1 ヘモアクト型人工酸素運搬体制剤の最新動向
小松 晃之(中央大学)
- 13:55-14:15 S2-2 人工酸素運搬体による脳梗塞治療研究の現状—HemoAct と他の製剤の比較から—
鏡谷 武雄(宮の森記念病院)
- 14:15-14:35 S2-3 長期備蓄を目指した凍結乾燥粉末末化メトヘモグロビン-アルブミンクラスター
田口 和明(慶應義塾大学)
- 14:35-14:55 S2-4 プロトポルフィリン IX 結合 HemoAct™ 製剤の合成と光線力学療法への応用
山田 大雅(中央大学)
- 14:55-15:15 S2-5 ポリオキサゾリン修飾ヘモグロビン“Hemoxa™”の有効性評価(50%出血性ショックラットの蘇生試験)
岡本 航(中央大学)
=休憩10分=
- 15:25-16:40 一般演題1[司会:松平 崇(奈良県立医科大学)、河野光智(埼玉医科大学)]
- 15:25-15:40 G-1 局所冷却灌流と人工酸素運搬体併用療法のラット虚血再灌流障害モデルに対する神経保護効果の検討
伊藤 康裕(柏葉脳外科病院)
- 15:40-15:55 G-2 ドキソルピシン担持一酸化炭素結合型ヘモグロビン-アルブミンクラスターの創製と抗腫瘍効果の評価
伊藤 千尋(慶應義塾大学)
- 15:55-16:10 G-3 ポリオキサゾリン修飾赤血球の開発
吉田 瑠佳(中央大学)
- 16:10-16:25 G-4 Development of Erythrocyte-mimetic PDMS Thermoplastic Elastomer/PFOB Core-shell Microparticles as Artificial Oxygen Carriers
Zhang Qimin(東京大学大学院)
- 16:25-16:40 G-5 抗酸化能を有する人工酸素運搬体“ストロマフリーヘモグロビンナノ粒子(SFHbNP)”の開発
高山 夏実(中央大学)

第2日目 2022年12月6日(火)

- 9:30-11:00 一般演題2 [司会:伊藤大知(東京大学大学院)、加藤 遼(中央大学)]
- 9:30-9:45 G-6 リポソームによるマクロファージのMDSC様細胞変容プロセスにおける小胞体ストレス反応の関与の可能性について
長森 恒久(旭川医科大学)
- 9:45-10:00 G-7 カルシウムイメージングによるリポソームと細胞との相互作用観察
堀田 盛弘(早稲田大学)
- 10:00-10:15 G-8 一酸化炭素を基盤とした急性呼吸窮迫症候群に対する新規治療法の検討
渡部 祐樹(慶應義塾大学)
- 10:15-10:30 G-9 メトヘモグロビン-アルブミンクラスターの硫化水素中毒解毒剤としての有用性評価
鈴木 悠斗(慶應義塾大学)
- 10:30-10:45 G-10 ポリオキサゾリン修飾ヘモグロビン“Hemoxa™”の合成と酸素結合能
小林 樹広(中央大学)
- 10:45-11:00 G-11 動物用人工血漿増量剤“Aloxa™”の安全性および有効性評価
白井 朝音(中央大学)
=休憩10分=
- 11:10-12:00 教育講演 [司会:小松 晃之(中央大学)]
ヘモグロビンの構造・機能・動態研究の最前線
柴山 修哉(自治医科大学)
=昼休み=
- 12:00-13:20
- 13:20-14:50 シンポジウム3「人工血小板製剤の実用化に向けて」
[司会:武岡 真司(早稲田大学)、石田 治(防衛医科大学)]
- 13:20-13:30 Opening Remarks
武岡 真司(早稲田大学)
- 13:30-13:50 S3-1 血小板数と機能が正常なラットの動脈出血に対するH12-(ADP)リポソーム止血効果
佐々 瑠花(防衛医科大学)
- 13:50-14:10 S3-2 産科危機的出血モデル家兎におけるH12-(ADP)-リポソームの効果
金子 恒樹(埼玉医科大学)
- 14:10-14:30 S3-3 臨床試験にむけたH12-(ADP)-リポソームの*in vitro*安全性評価
石田 治(防衛医科大学)
- 14:30-14:50 S3-4 間葉系幹細胞から製造する血小板の医療応用
松原由美子(慶應義塾大学)
=休憩10分=
- 15:00-15:40 トピック [司会:小松 晃之(中央大学)]
獣医領域における人工血液製剤の必要性和今後の展望
富安 博隆(東京大学大学院)
=休憩10分=
- 15:50-16:35 一般演題3 [司会:田口 和明(慶應義塾大学)]
- 15:50-16:05 G-12 二個のヘモグロビンが四分岐PEGに結合した二環式モノマーの合成と超分子開環重合による可逆的な自己組織化
松平 崇(奈良県立医科大学)
- 16:05-16:20 G-13 COとHCN同時ガス中毒に対する人工ヘモグロビンモデル錯体の解毒有効性の評価
毛 齊悦(同志社大学)
- 16:20-16:35 G-14 酸素ファインバブルの酸素運搬体としての物性評価
垣内 健太(早稲田大学)
=準備5分=
- 16:40 学生講演賞発表
閉会の辞

脳卒中に関する最近のエビデンス：脳梗塞ならびにくも膜下出血に対する急性期治療の現状と人工酸素運搬体への期待

○藤村 幹¹, 鐘谷武雄²

¹北海道大学医学研究院 脳神経外科学教室, ²宮の森記念病院 脳神経外科
fujimur@med.hokudai.ac.jp

脳卒中は我が国における死亡原因の第4位であり、要介護の原因疾患として重要な疾患である。脳卒中は脳梗塞、脳出血、くも膜下出血から構成されるが、いずれの病型においても急性期治療が患者の生命予後、機能予後に大きな影響を及ぼす。

脳梗塞に対する急性期治療に関しては、歴史的に抗酸化剤などの脳保護療法が大きな期待を集めたが実臨床における効果は限定的であった一方、発症後4.5時間以内のtissue plasminogen activator (tPA) 静注療法ならびに6時間以内の機械的血栓回収療法 (mechanical thrombectomy; MT) が有効な治療法として確立するに至った¹⁾。特にMTについては最新のMRI、脳循環画像に基づく患者層別化によりその適応が発症後16~24時間まで拡大し、脳梗塞急性期治療における脳血管内治療の役割が高まっている^{2,3)}。一方で発症直後から脳末梢循環を介した側副血行路の発達が少ない場合や発症後24時間以上経過した患者に対する治療法は限定されているのが実情である。人工酸素運搬体により発症後超急性期から脳末梢循環を保持し乏しい脳血流においても組織への酸素運搬効率を向上させることにより、MTなどの急性期血行再建の適応を広げることにより脳梗塞全体の転帰を改善できる可能性が期待される⁴⁾。

くも膜下出血は脳卒中の10%程度であるが、日本脳卒中データベースの急性期脳卒中患者データからも過去20年間で転帰改善が得られておらず、いまだに35%が死亡、29%が後遺症を患う予後不良な疾患である⁵⁾。発症後4~14日目の脳血管攣縮による遅発性脳虚血が転帰不良の主因であると考えられてきたがくも膜下出血の病態は複雑であり、エンドセリン受容体拮抗薬などの脳血管攣縮治療薬が導入された現在でもいまだ課題は多く残されている。このような複雑な病態下でも確実に組織への酸素運搬効率を高め、末梢循環を維持する観点から人工酸素運搬体の応用はくも膜下出血の急性期治療においてもその効果が期待される。

文献

- 1) M. Goyal, B. K. Menon, van W. H. Zwam et al. *Lancet* **2016**, 387:1723-1731.
- 2) R. G. Nogueira, A. P. Jadhav, D. C. Haussen et al. *N. Engl. J. Med.* **2018**, 378:11-21.
- 3) G. W. Albers, M. P. Marks, S. Kemp et al. *N. Engl. J. Med.* **2018**, 378:708-718.
- 4) M. Gekka, T. Abumiya, T. Komatsu et al. *Stroke* **2018**, 49:1960-1968.
- 5) K. Toyoda, S. Yoshimura, M. Nakai et al. *JAMA Neurol.* **2022**, 79:61-69.

ヘモグロビンの構造・機能・動態研究の最前線

柴山修哉

自治医科大学医学部

shibayam@jichi.ac.jp

生命の秩序はタンパク質分子の機能が目的に応じて調節されることで維持されている。タンパク質分子が配位子やイオンの結合によりその高次構造を変化させ、分子上の別の部位の活性を大幅に変えることで実現されている調節法がある。これをアロステリック調節またはアロステリーと呼ぶ。

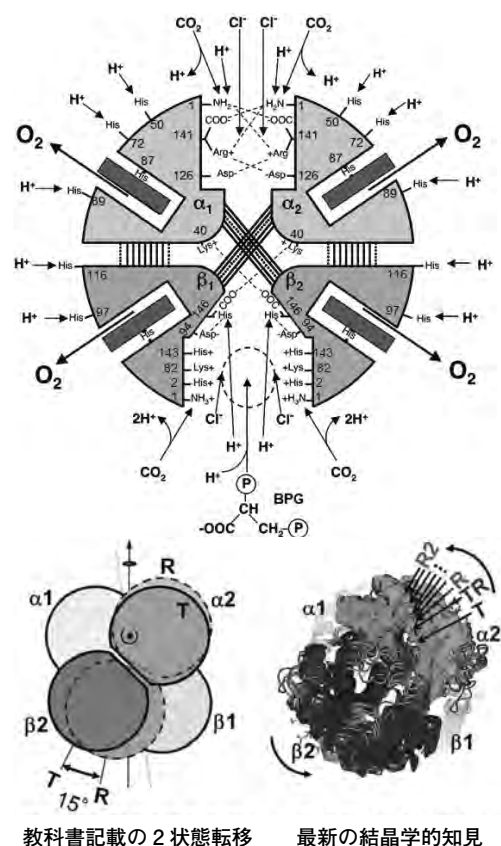
ヘモグロビン(Hb)はアロステリーを示すタンパク質の代表格であり、X線結晶構造解析法が最初に適用されたタンパク質の一つでもある。 $\alpha_2\beta_2$ 型四量体のヒトHbは分子全体の構造を変化させて、4個の O_2 結合間の正のアロステリック調節(ヘム間相互作用)や、ヘムとは別の部位に結合する水素イオン、有機リン酸、 CO_2 との負のアロステリック調節(ヘテロトロピック相互作用)を絶妙なバランスで実現している(図上)。Hbのアロステリーの構造的基盤は、教科書的には、X線結晶構造解析で明らかにされた O_2 の結合していないデオキシT(tense)構造と O_2 の4個結合したオキシR(relaxed)構造の間の2状態アロステリック転移(図左下)で説明されている。

しかし、話はそれほど単純ではない。最近、2状態転移では説明できない観測事例や計算結果が相次いで報告されている。一例を挙げると、我々は、独自に開発したHbの中間段階分子(O_2 が1~3個結合したHb)のモデルを用いたX線構造解析を行い、Hbの四次構造変化は単純な2状態転移ではなく、多状態の間を行き来する複雑な過程(図右下)であることを、単一結晶型中の9種類の異なる四次構造を解くことで示した¹⁾。この結晶構造学的知見は、Hbの配位子結合と連動するアロステリック転移がこれまで考えられていたよりもはるかに複雑な過程であることを示唆している。10Å以上の大きさを持ち、0.1Åの桁で原子の位置を精密にコントロールしているタンパク質構造変化のメカニズムを理解するためには、Hbでもまだ構造変化の中間状態の知見が決定的に不足していると言わざるを得ない。

講演では、Hbの構造、機能、動態に関する最新の研究成果を紹介するとともに、今後の展望についても言及したい。

文献

1) N. Shibayama, K. Sugiyama, J. R. H. Tame, S.-Y. Park *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5097.



教科書記載の2状態転移

最新の結晶学的知見

獣医領域における人工血液製剤の必要性と今後の展望

富安博隆

東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医学専攻
atomi@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

犬や猫などの伴侶動物(ペット)に向けた医療に対する社会的要求が高まるとともに、その高度化と細分化が進んでいる。本学においても二次診療施設および教育病院として附属動物医療センターが機能しており、全血輸血や血漿輸注は当センターにおいて重要な処置の一つとして実施されている。このような処置は犬や猫に特有の血液型やその分布、さらには同種自然抗体の存在も考慮しながら実施する必要がある。しかしながら、現状では日本のどこでもいつでも輸血が実施できるような状況には至っていない。また、特殊な血液型に関しては当センターにおいても実施が困難な状況は少なくない。

その大きな要因の一つとして、全国的な動物血液バンクが実現できていないという点が挙げられる。この実現には法的整備も含めて多くの課題が存在するため、長期的な取り組みが必要である。

その他の解決策として第一に挙げられるのが、当然ではあるが輸血が必要となる各種疾患の詳細な病態解明と新規治療法の確立である。我々は本邦で特に発生頻度の高い骨髄疾患に関してその臨床的特徴や分子生物学的病態の解析に取り組んでおり¹⁾、細胞内シグナル伝達経路の一つである Wnt- β catenin 経路における異常を見出した。今後はこの経路を標的とした分子標的治療の開発を目指している。

このような取り組みは重要ではあるものの、手術や外傷による大量出血や血漿成分の不足など、全血輸血や血漿輸注が必要不可欠な処置となる状況も存在する。そのため、人工血液製剤の開発および臨床応用が急務となっている。現在我々は中央大学理工学部応用化学科生命分子化学研究室との共同研究の中で、犬に応用可能な人工アルブミン製剤の評価を行っており、その安全性を確認している。この製剤は、犬にしばしば発生する低アルブミン血症を引き起こす疾患や大量出血に伴う低血圧に対する治療薬として有用なものになると期待している。

本講演を通して、獣医療における輸血処置に関する解決すべき課題、さらには人医療だけでなく獣医療においても人工血液製剤の必要性が高いことをお伝えできればこの上なく幸いである。

文献

1) A. Tani, H. Tomiyasu, A. Ohmi, K. Ohno, H. Tsujimoto *J. Vet. Med. Sci.* **2020**, 82, 771.

S1-1 備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤の実用化を目指す研究

○酒井宏水¹, 東 寛²¹ 奈良県立医科大学化学教室, ² 旭川医科大学小児科学

hirosakai@naramed-u.ac.jp

輸血治療は現行の医療に不可欠であり、国民の医療と健康福祉に多大の貢献をしている。しかし、危機的出血にある傷病者に対し輸血が出来ない状況が今なお存在する。我々は輸血治療を「補完」する役割が期待される人工赤血球製剤(ヘモグロビンベシクル, HbV)を開発し、その性能を多角的に研究してきた。献血由来の非使用赤血球からウイルス不活化・除去工程を経てヘモグロビン(Hb)を精製単離し、これをリポソームでカプセル化し、ガス反応の工程等を経て、備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤に「再生」できる^[1]。使われずに廃棄される献血血液を有効利用し、献血者の善意を無駄にしないこと、これが本製剤の研究開発の契機である。また現場医師からの本製剤に対する切実な思いが研究開発の Driving force である。2015年から日本医療研究開発機構(AMED)の支援を受け、輸血の代替物としてHbVの安全性・有効性について先見的研究を継続するとともに、医薬品医療機器総合機構(PMDA)の薬事戦略面談を重ね、製造工程の確立とGLP非臨床安全性試験を順次進めた^[2]。そして2020-21年度に治験薬NMU-HbVのGMPの製造とPhase 1(First-in-human, FIH)試験を実施した^[3]。FIHの結果から、例えば出血性ショックに対して本製剤を投与する事で、循環ボリュームの確保と酸素運搬体の供給を同時に行うことができ、その結果、既存の血液製剤が届くまで重要臓器の機能を温存し、質の高い救命ができるものと期待される。これらの成果を踏まえて、2021年度からはAMED橋渡し研究プログラム(シーズB)として次相に向けた準備が進行中である。他方、輸血の代替としての利用のみならず、本製剤の物理化学的利点を活かし酸素治療薬として、虚血性疾患、腫瘍酸素化、臓器灌流液などへの利用、血管腫レーザー治療の標的としての利用、一酸化炭素(CO)キャリア治療薬として様々な炎症性疾患への利用、さらにはHbVのメト体はシアン中毒などの解毒剤にも利用できることが動物実験から明らかになり、本製剤の有用性は開発当初に予測していたものよりも遥かに大きくなるものと考えられる。

文献

1. 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;7:2835-44.
2. Sakai H, Kobayashi N, Kure T, Okuda C. Translational Research of Hemoglobin Vesicles as a Transfusion Alternative. *Curr Med Chem.* 2022; 29(3):591-606.
3. Azuma H, Amano T, Kamiyama N, Takehara N, Jingu M, Takagi H, Sugita O, Kobayashi N, Kure T, Shimizu T, Ishida T, Matsumoto M, Sakai H. First-in-human phase 1 trial of artificial red blood cells and hemoglobin vesicles developed as a transfusion alternative. *Blood Adv.* 2022;(in press)

S1-2 人工赤血球(ヘモグロビン ベシクル)製剤の治験(First-in-human)結果の最終報告

○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講座, 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

人工赤血球(Hemoglobin vesicle; HbV)の治験(Phase I, First-in-human: FIH)プロジェクトが, AMED の研究開発費を得て 2018 年度にスタートした. 本プロジェクトは, 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の ARO 機能を活用して進められ, 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 試験が開始され 2021 年 9 月に終了した^[1].

HbV 製剤の製造と Phase I 試験プロトコル

GMP 製剤は奈良県立医科大学の CPC にて製造した. 被験者は健康成人男性. 治験は 3 つの Cohort (各被験者 4 名)に分けられた. HbV の投与量は Cohort 1, 2, 3 でそれぞれ 10ml i.v.(0.2ml/kg; 投与時間 30min), 50ml i.v.(1.0ml/kg; 投与時間 70min), 100ml i.v.(2ml/kg; 投与時間 90min)とし, 安全性(有害事象, 血液生化学検査値の変動, 血圧の変動等)および治験薬の血中薬物動態について評価した. 最大投与速度は Cohort 1 が 1ml/min, Cohort 2, 3 は 2.5ml/min とした. Cohort 3 では, 治験薬投与前に前投薬(dexamethasone, famotidine, acetaminophen)を行った.

結果

重篤な有害事象は観察されなかった. Infusion reaction (IR) (Cohort 1: 3 例, Cohort 3: 1 例), 発熱(Cohort 1: 3 例, Cohort 2: 2 例), 結膜炎(Cohort 2: 1 例)が観察された. Cohort 3 の 3 例目は, 投与開始直後に前胸部の蕁麻疹様発疹(IR)が出現したため投与が中止されたが, 特段の医学的介入無しで自然軽快した. いずれの Cohort においても血圧の有意な変動はなかった. CRP 検査を実施した Cohort 3 の 3 例で day2~day4 に軽度の上昇(最大値: 0.89mg/dl)があった. 血液・生化学検査, バイタルサインの変動は, 関連する自他覚症状もなく全て正常値に回復した. 容量依存性も認めなかった. 前投薬を行なった Cohort 3 では発熱反応は観察されなかった. Cohort 3 の 2 例(100ml 投与)における HbV の血中半減期は, 7.5h 及び 8.9h であった. HbV の構成成分に PEG 脂質が含まれることから, Cohort 3 の 3 例で事前に血中抗 PEG 抗体を測定した. IgG 抗体は, 蕁麻疹様発疹の出現した被験者で陽性であったが, 有害事象の発症がなかった被験者でも 1 例で陽性であった. IgM 抗体は全て陰性と判断された. 尚, Cohort 3 の 4 例目への投与は, コロナ感染拡大による度重なる実施延期のため治験薬が有効期限切れとなり, 実施できなかった.

考察

観察された IR あるいは発熱反応等は, 自然に症状の消失を見ており, 重篤な有害事象には当たらないと判断されたが, 被験者の安全性確保の観点から, 前投薬の考慮が望ましい. 収縮期血圧にも有意な変動はなく, 修飾 Hb を用いた人工酸素運搬体で指摘された血管収縮作用は, あったとしてもより軽微と考えられる. 一部の血液・生化学検査の変動も軽微であり関連する症状も無く回復し, 許容範囲と判断された. 100ml 投与後の血中半減期は約 8h で, 投与後数時間は HbV が血液中を循環し, 酸素運搬体として機能する事を示している. 有害事象への抗 PEG 抗体の関与は今後の検討が必要である. これらの結果を踏まえ, 前投薬を前提とし, より大量の HbV を投与し, その安全性を評価するための治験(Phase II)を計画中である.

文献

[1] Azuma H, Amano T, Kamiyama N, Takehara N, Jingu M, Takagi H, Sugita O, Kobayashi N, Kure T, Shimizu T, Ishida T, Matsumoto M, Sakai H. First-in-human phase 1 trial of hemoglobin vesicles as artificial red blood cells developed for use as a transfusion alternative. *Blood Adv.* (in press)

シンポジウム 1

S1-3 産科危機的出血動物モデルの確立と人工赤血球の蘇生効果についての検証

○石橋弘樹¹, 萩沢康介², 木下 学³, 結城由香子⁴, 金子恒樹⁴, 宮本守員¹, 酒井宏水⁵, 久禮智子⁵, 齊藤大蔵⁶, 照井克生⁴, 高野政志¹

¹ 防衛医科大学校病院 産科婦人科学講座, 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 埼玉医科大学総合医療センター 麻酔科, ⁵ 奈良県立医科大学 化学教室, ⁶ 防衛医科大学校病院 防衛医学研究センター
ishibashi19840528@gmail.com

緒言

産科危機的出血は母体死亡原因の第一位であり、輸血不足は喫緊の課題となっている。輸血代替治療として人工赤血球(HbV)が注目されており、既に出血性ショックに対するHbVの有効性は示されているが、産科危機的出血に対する有効性の検証はされていない。そこで我々は新たに産科危機的出血動物モデルを確立し、HbVの有効性の検証を行った。

実験

まず妊娠ウサギの帝王切開を行い胎仔娩出後、子宮動脈を切離し出血を惹起させた。初期治療として輸液(代用血漿剤)投与を全例行った。出血量が100 mL又は出血後30分を超えた時点を産科危機的出血状態と定義し、以後の治療はHES群(代用血漿剤, n=7), HbV群(HbV+25%アルブミン, n=10), 輸血群(赤血球+血漿, n=8)の3群に分類し、救命治療を開始した。出血後60分又は出血量が200mLに達した時点で止血し、各群の生存時間や血行動態等を比較検討した。

結果と考察

出血開始後30分で、全例がHb 6g/dL以下となり産科危機的出血の状態に達していた。HES群が止血後6時間で全例死亡したが、輸血群は全例生存していた。救命治療後、HbV群は平均動脈圧が45mmHg以上、Hb 6g/dL以上となっており、6時間後の時点では8例(80%)が生存することができた。全生存期間はHbV群が輸血群より予後不良だったが(p<0.01), HES群と比較し有意に予後良好であった(p=0.01)。これはHbV投与でHb, CtO₂を維持できたことが要因と考えられ、改めてHbVの酸素運搬能を実証することができ輸血治療までの「繋ぎ」の役割が期待される結果となった。一方、輸血製剤よりも生存期間が短縮した要因としては、HbV製剤のHb濃度、半減期及びHbV群における凝固因子未補充が挙げられ、今後のこれらの課題を克服し人工血小板製剤等を併用したさらなる検証が必要と示唆された。

結論

新たな産科危機的出血モデルを確立することができた。致死的出血性ショックに至る産科危機的出血の輸血の代替治療として、HbVは有効な手段となり得る。

文献

- 1) Ishibashi H, Hagsawa K, Kinoshita M, Yuki Y, Miyamoto M, Kure T, Sakai H, Saitoh D, Terui K, Takano M. *Sci Rep.* **2021**, 16;11(1):22367.
- 2) Jansen AJ, van Rhenen DJ, Steegers EA, Duvekot JJ. *Obstet Gynecol Surv.* **2005**, 60(10):663-71.
- 3) Moon PF, Bliss SP, Posner LP, Erb HN, Nathanielsz PW. *Anesth Analg.* **2001**, 93(1):142-50.
- 4) Taguchi K, Watanabe H. *J Drug Metab Toxicol.* **2012**, 3(4):1000128.
- 5) Wigger O, Bloechlinger S, Berger D, Häner J, Zanchin T, Windecker S, Räber L, Schefold JC. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.* **2018**, 7(1):45-52.
- 6) Hagsawa K, Kinoshita M, Takikawa M, Takeoka S, Saitoh D, Seki S, Sakai H. *Transfusion.* **2019**, 59(10):3186-96.
- 7) Sakai H, Seishi Y, Obata Y, Takeoka S, Horinouichi H, Tsuchida E, Kobayashi K. *Shock.* **2009**, 31(2):192-200.
- 8) Yuki Y, Hagsawa K, Kinoshita M, Ishibashi H, Kaneko K, Ishida O, Saitoh D, Sakai H, Terui K. *Am J Obstet Gynecol.* **2021**, 224(4):398.e1-398.e11.

S1-4 ヘモグロビン小胞体の気管移植片における上皮血管再灌流の検討

○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

呼吸器外科手術において、脆弱な肺動脈の切除を行う肺切除は大量出血の危険性がある。また、酸素交換を行う肺血管床減少下での大量出血は組織の虚血を悪化させるため、臨床の現場においては循環動態と酸素運搬能を安定化させる輸血用血液製剤は必要不可欠である。肺切除周術期動物モデルにおいてヘモグロビン小胞体(Hemoglobin vesicle; HbV)の投与が急性期では呼吸循環動態を安定させ、長期的には手術侵襲からの回復にも明らかな有害事象を認めないことを確認している。組織の低酸素は組織壊死の誘因となるが、もともと血流の乏しい気管支を切除する肺切除では術後合併症に気管支断端の縫合不全がある。医療が発達した現在も悩まされる合併症の一つである。粒径 250nm の HbV は微小血管を効率的に灌流でき、組織の酸素化が期待できる。血管融合を行わない気管移植モデルにおいて HbV と赤血球の毛細血管の再灌流を比較検討した。

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下毛細血管(Subepithelial capillaries; SEC)の血流を観察した。モデルには 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 溶液 (Hb 濃度 10g/dL) 0.3ml を投与し覚醒させる。所定の時間 (1, 4, 6, 8 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。

結果

移植気管の SEC には赤血球は認めなかったが HbV 投与 4 時間後に、電子顕微鏡で HbV 粒子が観察された。その数は 6 時間で最大となり 8 時間後まで観察された。HbV は赤血球より早く移植片の毛細血管に再灌流していた。

結論

微小な HbV は赤血球よりも早く毛細血管に再灌流し、移植組織の酸素化に寄与する可能性が示唆され、創傷治癒に影響を及ぼす因子として期待される。

S1-5 微小血管における人工赤血球の流動特性と酸素供給のシミュレーション

○百武 徹, 堤 友也, 北野圭佑, 水野智輝

横浜国立大学工学研究院

hyaku@ynu.ac.jp

緒言

急速な少子高齢化の到来に伴う輸血用血液製剤不足の解消, また現行の血液製剤に対する様々なリスクの軽減を目指し, 現在, 赤血球製剤の代替物として, 様々なタイプの人工赤血球が開発中である. このような人工赤血球の循環器疾患に対する効果に関する研究は, 主に医学的観点から多くの研究が行われているものの, 血管内における各血球挙動の流体力学的な考察はあまりされていない. 微小循環系における人工赤血球の酸素輸送プロセスをより詳細に記述し, その作用機序を解明するためには, 流体力学的観点に基づいた研究も重要であると考えられる. ここでは, 主に数値流体力学(CFD)に基づいた微小血管における人工赤血球の流動特性や組織への酸素供給に関する研究例について紹介する.

解析方法

3次元微小血管モデルを作成し, 変形を伴う赤血球と人工赤血球の混在する流れ場のシミュレーションを行った. 流体の解析には格子ボルツマン法を適用した. 赤血球膜には neo-Hookean モデルを適用し, 赤血球と流体の連成解析には Immersed boundary 法を用いた. 酸素供給モデルでは, 組織領域を含む3次元の微小血管モデルを構築し, 人工赤血球内のヘモグロビンと酸素の反応, および組織への酸素拡散現象をシミュレーションし, 人工赤血球の酸素供給過程について調査を行った. 人工赤血球の性能を評価するためのパラメータとして, 解離速度係数, 酸素親和力, 拡散係数などを考慮した.

結果と考察

3次元微小血管モデルの場合, 赤血球と人工赤血球が混在することで, 赤血球は軸集中により中心付近に, 一方で人工赤血球は血しょう層に多く分布する. 結果として, 人工赤血球の一部は赤血球の行き届かない血管部位へと分配され, 酸素分配の偏りが解消された. これらの結果は, 人工赤血球への置換が微小循環系における酸素供給の不均一性改善へ貢献していることを示唆している. 酸素供給モデルの場合, 人工赤血球から解離した酸素が組織領域まで拡散することが示された. 結果として, 人工赤血球の各パラメータによって, 下流域の酸素飽和度や酸素分圧が変化することがわかった. シミュレーション結果と既存の in-vitro 実験データを比較したところ良好な一致が見られた. これらの結果は, 病態に応じて人工赤血球を効果的に設計するための重要な情報を提供するであろう.

S1-6 一酸化炭素結合型ヘモグロビン小胞体の薬剤誘発性臓器傷害に対する抑制効果

○田口和明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

taguchi-kz@pha.keio.ac.jp

一酸化炭素(CO)は、生体内でヘムがヘムオキシゲナーゼで代謝される過程において恒常的に産生されている。この内因性COは、シグナル伝達物質として機能しており、生体恒常性を維持する上で非常に重要な役割を担っている。また、低濃度のCOを外因的に生体に供給することで、多様な急性および慢性疾患の発症と進展を抑制できることが多くの動物実験によって明らかとされている。この事実より、CO吸入療法や低分子CO供与体であるCO-releasing molecules(CORMs)を用いたCO療法の確立が試みられ、その一部においては臨床試験が進行している。我々もCOを基盤とした創剤研究の一環として、赤血球代替物製剤として開発が進められているヘモグロビン小胞体(HbV)をCO担体として利用したCO送達システムを構築し、CO結合型HbVが特発性肺線維症や閉塞性細気管支炎などの様々な疾患の治療薬として高い潜在性を有することを明らかとしてきた。本シンポジウムでは、CO結合型HbVの開発経緯に加え、CO結合型HbVが薬剤性臓器傷害に対して高い予防(治療)効果を示すことを最近明らかとしたため、これらについてシスプラチン誘発性腎傷害における結果を中心に紹介する。

文献

- 1) Nagao S, Taguchi K, Sakai H, Tanaka R, Horinouchi H, Watanabe H, Kobayashi K, Otagiri M, Maruyama T. *Biomaterials*. 35(24):6553-62(2014)
- 2) Taguchi K, Yamasaki K, Sakai H, Maruyama T, Otagiri M. *J Pharm Sci*. 106(9):2392-2400.(2017)
- 3) Watabe Y, Taguchi K, Sakai H, Enoki Y, Maruyama T, Otagiri M, Kohno M, Matsumoto K. *Eur J Pharm Biopharm*. 170: 43-51 (2022)
- 4) Taguchi K, Suzuki Y, Tsutsuura M, Hiraoka K, Watabe Y, Enoki Y, Otagiri M, Sakai H, Matsumoto K. *Pharmaceutics*. 14(1):57(2021)

S2-1 ヘモアクト型人工酸素運搬体制剤の最新動向

小松晃之

中央大学理工学部

komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

赤血球代替物としての修飾ヘモグロビン(修飾 Hb)の歴史は古く、これまで様々な人工酸素運搬体制剤が開発されてきている。非細胞型と呼ばれるこの種の製剤は、赤血球の分散液とは本質的に異なり、いわゆるタンパク質の水溶液であるが、容易な製造法、低コスト、単純な組成など魅力は多い。実際、現在研究が進んでいる人工酸素運搬体のほとんどが修飾 Hb 製剤である。細胞型と非細胞型の人工酸素運搬体はそれぞれの利点を生かし、各適応において使い分けができると考えられる。

我々はヒト血清アルブミン(HSA)を人工血液に活用するという理念から、様々な化合物を開発してきている。Hb に3分子の HSA を結合した人工酸素運搬体“(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター”(製剤名:HemoAct™)は、合成が簡便で、保存安定性に優れ、実用性の高い製剤である^{1,2)}。現在、安全性・有効性試験を継続している^{3,5)}。出血ショックの蘇生液としてはもちろん、虚血性脳血管障害の治療に有効である^{6,7)}。ごく最近、metHemoAct™ が硫化水素中毒の治療に役立つことも明らかにした⁸⁾。組換え Hb と組換え HSA を用いれば、原料血液を一切必要としない完全合成型 HemoAct™ ができる⁹⁾。変異導入の位置、HSA の結合位置を厳選することで、酸素結合の協同性(アロステリック効果)を保持した製剤の調製にも成功した¹⁰⁾。また、Hb の周囲に結合する HSA を組換えイヌ血清アルブミン、組換えネコ血清アルブミンに変換すると、犬・猫用の HemoAct™ になる^{11,12)}。カタラーゼをコアとしたクラスターはがん光線力学療法の増感剤として作用する¹³⁾。

HemoAct™ の粒径は 15nm と小さいため、Hb を重合した球状微粒子をつくり、その表面を HSA で被覆したコア-シェル型の Hb ナノ粒子(HbNP)を合成した¹⁴⁾。ストロマフリー Hb を用いると、残存するカタラーゼの酵素活性によりヘムの自動酸化は劇的に抑制された。一方、ポリエチレングリコール(PEG)修飾 Hb は、依然として人工酸素運搬体開発の中核にある。しかし近年、抗 PEG 抗体の産生が危惧されるようになってきた。そこで我々は PEG の代替物としてポリオキサゾリン(POx)に注目した。PEG 同様、免疫学的ステルス性を示すうえ、合成の容易さ、化学修飾のしやすさは PEG よりも優れる。Hb を POx (Mw: 5kDa) で被覆した製剤 Hemoxa™ は HemoAct™ と同等の安全性・有効性を発揮した¹⁵⁾。さらに、ブタ血清アルブミンを POx で被覆した製剤 Aloxa™ を合成し、犬・猫用の人工血漿増量剤としての実用化を進めている¹⁶⁾。面白いことに、これらの製剤はすべて HemoAct™ と同じ方法で製造できる。

我々が開発しているヘモアクト型人工酸素運搬体制剤の概要と最新動向について紹介したい。

文献 T. Komatsu et al.

- 1) *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1816.
- 2) *ACS Omega* **2019**, *4*, 3228.
- 3) *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12778.
- 4) *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2018**, *46*, S621.
- 5) *J. Biomed. Mater. Res.* **2022**, *110*, 1827.
- 6) *Stroke* **2018**, *49*, 1960.
- 7) *Brain Res.* **2020**, *1746*, 147012.
- 8) *J. Control. Release* **2022**, *349*, 304.
- 9) *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 1139.
- 10) *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 9144.
- 11) *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36782.
- 12) *J. Mater. Chem. B* **2017**, *6*, 2417.
- 13) *Mater. Adv.* **2022**, *3*, 6451.
- 14) submitted **2022**.
- 15) in preparation **2022**.
- 16) in preparation **2022**.

S2-2 人工酸素運搬体による脳梗塞治療研究の現状—HemoAct と他の製剤の比較から—

○鏡谷武雄^{1,2}, 月花正幸², 伊藤康裕², 館澤諒大², 藤村 幹², 小松晃之³

¹ 宮の森記念病院, ² 北海道大学脳神経外科, ³ 中央大学理工学部
abumiya@miyanomori.or.jp

緒言

脳梗塞に対する脳保護療法は数多く研究されてきたが、臨床応用が来ているものは少ない。本発表では、人工酸素運搬体を用いた脳梗塞治療研究の現状を HemoAct と他の製剤の比較から概説したい。

本論

脳梗塞の虚血再灌流傷害の病態には multi-factor が関与しているが、微小血管の狭小化による灌流障害も病態悪化に関わる重要な factor である。人工酸素運搬体は、赤血球より粒径が小さく、赤血球に比較して微小血管での良好な灌流、酸素供給が期待され、脳梗塞治療薬としての研究がなされてきた。現在まで以下の 5 群の人工酸素運搬体(1)Cross-linked Hb: Diaspirin cross-linked Hb(DCLHb), (2)Polymerized Hb: Recombinant hybrid Hb polymers, Zero-link Bovine Hb polymers(ZL-HbBv), (3)PEGylated Hb: PEGylated carboxyHb bovine(Sanguinate), PEGylated Hb in the carboxy state(PEG-COHb), Polynitroxylated pegylated Hb(PNPH), (4)Encapsulated Hb: Hb vesicle(HbV), Liposome-encapsulated Hb(LEH), (5)Albumin conjugated Hb: Hb-albumin cluster(HemoAct)について研究報告を認めている。このうち、多くの研究が糸栓子によるラット中大脳動脈閉塞モデルを使用しており、2 時間虚血 24 時間再灌流の条件で行われていたが、投与量、投与タイミングなど実臨床に即した形の実験は少なかった。PNPH¹⁾と HemoAct^{2,3)}は、循環負荷を来さない容量で再灌流後に投与するという実臨床に即した実験プロトコルで良好な脳保護効果を示した。虚血再灌流傷害の病態の中で微小循環障害については、人工酸素運搬体が唯一治療可能な製剤といえる。しかし、multi-factor がその病態に関与している事を考え合わせると、人工酸素運搬体に微小循環以外の multi-target の作用を付加すれば脳保護効果はより高まると期待される。PNPH と HemoAct の二つの製剤は抗酸化作用、もしくは抗炎症作用を有していたため、良好な脳保護効果を示せたものと考えられた。

結論

HemoAct は実臨床に即した実験プロトコルで良好な脳保護効果を示した。人工酸素運搬体は単に微小循環改善作用だけではなく、抗酸化、抗炎症、抗アポトーシスなど multi-target の作用を付加する事で脳梗塞治療の臨床応用への可能性が広がるものと考えられた。

文献

- 1) Cao S, Koehler RC, et al. *J. Am. Heart Assoc.* **2017**, 6, e006505
- 2) Gekka M, Abumiya T, Komatsu T, et al. *Stroke* **2018**, 49, 1960-1968
- 3) Ito Y, Abumiya T, Komatsu T, et al. *Brain Res.* **2020**, 1746, 147012

S2-3 長期備蓄を目指した凍結乾燥粉末化メトヘモグロビン-アルブミンクラスター

○田口和明¹, 鈴木悠斗¹, 岡本 航², 小松晃之², 松元一明¹

¹ 慶應義塾大学薬学部, ² 中央大学理工学部

taguchi-kz@pha.keio.ac.jp

緒言

我々は、これまでにヘモアクト™中のヘモグロビンをメト化させたメトヘモグロビン-アルブミンクラスターが硫化水素中毒解毒剤として高い潜在性を有することを明らかにしてきた⁽¹⁾。今後、本製剤を中毒解毒剤として使用する条件として長期備蓄性が挙げられる。そこで本研究では、凍結乾燥粉末化によるメトヘモグロビン-アルブミンクラスターの長期備蓄を目指して、凍結粉末化を行う前後におけるメトヘモグロビン-アルブミンクラスターの構造及び硫化水素中毒解毒能を比較した。

実験

メトヘモグロビン-アルブミンクラスターを凍結乾燥し、冷蔵下で1週間保存した。PBS、生理食塩水、5% グルコース溶液で溶解し、動的光散乱法、サイズ排除クロマトグラフィー、Native-PAGE、円二色性スペクトルを用いて凍結粉末化前後におけるメトヘモグロビン-アルブミンクラスターの構造を評価した。また、硫化水素結合能の変化も評価した。さらに、致死性硫化水素中毒マウスを用いて、凍結乾燥メトヘモグロビン-アルブミンクラスターの解毒能を評価した。

結果と考察

PBS と生理食塩水で溶解した凍結乾燥メトヘモグロビン-アルブミンクラスターの構造は凍結乾燥前と一致した。一方、5% グルコース溶液で溶解した凍結乾燥メトヘモグロビン-アルブミンクラスターは、凍結乾燥前と比較して粒子分布の広がりが見られた。また、各溶媒で溶解したメトヘモグロビン-アルブミンクラスターは、凍結乾燥前と同等の硫化水素結合性を維持していた。さらに、致死性硫化水素中毒モデルマウスに各溶媒で溶解したメトヘモグロビン-アルブミンクラスターを投与した結果、生存率の上昇が確認された。

結論

メトヘモグロビン-アルブミンクラスターは凍結乾燥化が可能であり、凍結乾燥化による長期備蓄が期待できる。

文献

1) Suzuki Y, Taguchi K, Okamoto W, Enoki Y, Komatsu T, Matsumoto K. *J. Control. Release.* 349, 304–314. (2022)

S2-4 プロトポルフィリン IX 結合 HemoAct™ 製剤の合成と光線力学療法への応用

○山田大雅, 勝見真帆, 小松晃之

中央大学大理工学部

komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

緒言

光線力学療法(PDT)は、腫瘍組織に送達した増感剤を光励起し、生成した一重項酸素($^1\text{O}_2$)を用いてがん細胞を死滅させる治療法である。しかし、一般に低酸素環境($\text{O}_2 \leq 2.5 \text{ Torr}$)にあるがん組織においては、 $^1\text{O}_2$ の産生効率が低い¹⁾。一方、腫瘍への O_2 輸送と内因性過酸化水素(H_2O_2)の不均化($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$)は PDT 活性の向上に有効である¹⁾。我々はヘモグロビン(Hb)にヒト血清アルブミン(HSA)を結合した人工 O_2 運搬体 HemoAct™ を合成し、それが赤血球代替物として機能することを明らかにしてきた^{2,3)}。酸化型 HemoAct (metHemoAct)は O_2 輸送能を持たないが、弱い H_2O_2 不均化能を発揮する。本研究では、HemoAct の HSA 部位にプロトポルフィリン IX (PP)を結合した O_2 供給能を有するタンパク質増感剤(HemoAct-PP, metHemoAct-PP)、さらにはコアとなる Hb をカタラーゼ (Cat, H_2O_2 不均化酵素)に置き換えた CatAct-PP を合成し、それらの PDT 効果を明らかにしたので報告する^{4,5)}。

実験

HemoAct と PP を混合し、HemoAct-PP を合成した。PP の結合は、蛍光スペクトル、過渡吸収スペクトルにより確認した。次に、励起三重項寿命(τ_T)、光照射による $^1\text{O}_2$ 生成能を明らかにした。さらに、ヒト子宮頸がん(HeLa)細胞を用いて PDT 活性を評価した。HeLa 細胞を播種し、24 時間培養後、HemoAct-PP ($[\text{PP}] = 0 \sim 3 \mu\text{M}$)を添加した。4 時間培養後、LED ランプ ($\lambda > 620 \text{ nm}$, 25 mW/cm^2 at 630 nm)を 5 分間照射し、20 時間培養後に細胞生存率を算出した。同様の実験を metHemoAct-PP, CatAct-PP, HSA に PP を結合した HSA-PP を用いて行った。

結果と考察

HemoAct-PP の蛍光スペクトルと過渡吸収スペクトルは、HSA-PP のスペクトルパターンとほぼ一致し、HSA 部位に PP が結合していることを確認した。4 種類のタンパク質増感剤の τ_T 値および $^1\text{O}_2$ 生成能に差はなく、 O_2 供給能の違いが PDT 活性を支配すると考えられる。何れのタンパク質を用いた場合も光非照射では細胞生存率の低下は見られなかった。一方、光照射すると PP 濃度依存的に生存率が低下した。半数阻害濃度(IC_{50})は HSA-PP が $2.4 \mu\text{M}$ 、HemoAct-PP は $1.8 \mu\text{M}$ となり、 O_2 輸送により PDT 活性が向上したと推察される。さらに、 H_2O_2 不均化能をもつ metHemoAct-PP の IC_{50} は $1.2 \mu\text{M}$ であり、細胞内 H_2O_2 の不均化が O_2 輸送よりも PDT に有効であることがわかった。また期待通り、 H_2O_2 不均化能が最も高い CatAct-PP の IC_{50} は $0.7 \mu\text{M}$ まで低下し、PDT 活性は HSA-PP の 3.4 倍に向上した。

結論

O_2 供給能の異なるタンパク質増感剤 HSA-PP, HemoAct-PP, metHemoAct-PP, CatAct-PP を合成し、その PDT 活性を明らかにした。PP 結合 HemoAct 製剤は、 O_2 供給能を持たない HSA-PP に比べ最大 3.4 倍高い PDT 活性を示した。

文献

- 1) J. Song *et al.*, *ACS Nano* **2019**, *13*, 10887.
- 2) W. Okamoto, T. Komatsu *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* **2022**, *110*, 1827.
- 3) T. Komatsu *et al.*, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2018**, *46*, S621.
- 4) T. Yamada, T. Komatsu, *ChemBioChem* **2021**, *22*, 2526.
- 5) T. Yamada, T. Komatsu *et al.*, *Mater. Adv.* **2022**, *3*, 6451.

シンポジウム 2

S2-5 ポリオキサゾリン修飾ヘモグロビン“Hemoxa™”の有効性評価(50%出血性ショックラットの蘇生試験)

○岡本 航¹, 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埼玉医科大学総合医療センター
komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

緒言

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テルス性を持ち、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¹⁾。そこで我々は人工酸素運搬体としてヘモグロビン(Hb)の分子表面にPOxを結合したPOx修飾Hb(製剤名“Hemoxa™”, Fig. 1)を開発し、その高い血液適合性と血中滞留性を明らかにしてきた。本研究では、ラット出血性ショックモデルへHemoxa™溶液を投与することにより蘇生を行い、人工酸素運搬体としての有効性を評価したので報告する。

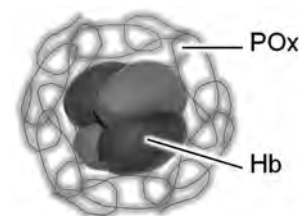


Fig. 1 Structure of Hemoxa™.

実験

[有効性評価Ⅰ] 麻酔下のラットの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た。15分後に静脈カテーテルより同体積のHemoxa™溶液([Hb]=5g/dL)を投与し蘇生を行った。試料投与2時間後まで、循環動態観察、血球数測定、血液ガス分析を含む経過観察を実施した。2時間後に動脈血5mLを採血し、血液生化学検査を行った。臓器(心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓)はホルマリン固定し、パラフィン切片をHE染色した。参照群は、自己血(SAB)群、乳酸リンゲル液(RL)群とした。

[有効性評価Ⅱ] Hemoxa™溶液投与による蘇生後すぐに結紮、覚醒し、7日間観察した。7日後に動脈血5mLを採血し、血球数測定、血液生化学検査を行った。臓器はホルマリン固定し、パラフィン切片をHE染色した。

結果と考察

[有効性評価Ⅰ] RL群では5例中3例のラットが2時間以内に死亡したのに対し、Hemoxa™およびSAB群ではすべてのラットが2時間後まで生存した。50%脱血により30mmHg程度まで低下した平均動脈血圧(MAP)はHemoxa™溶液の投与により初期値と同程度まで回復し、RL群よりも有意に高い値を推移した。また、アシドーシスと乳酸値の上昇もHemoxa™溶液投与により改善された。血液生化学的試験においても肝臓および腎機能に異常は見られなかった。病理検査では脱血と再灌流に伴う変化が見られたが、返血群と同程度であった。

[有効性評価Ⅱ] Hemoxa™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、ヘマトクリット値は初期値と同程度まで回復した。病理検査においても血行動態異常に起因する変化からの回復が認められた。

以上の結果から、Hemoxa™が出血性ショック状態に対する蘇生液として有効であることが明らかとなった。

文献

1) T. X. Viegas *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 22, 976.

S3-1 血小板数と機能が正常なラットの動脈出血に対する H12-(ADP) リポソーム止血効果

○佐々瑠花¹, 萩沢康介², 木下 学³, 武岡真司⁴

¹ 防衛医科大学校防衛医学研究センター外傷研究部門, 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

sasa33@ndmc.ac.jp

緒言

H12-(ADP)リポソームは外傷部位に存在する活性化血小板に標的性を有しており, 出血局所に集積して血小板血栓の形成を促進する¹⁾。これまでの研究において, 外傷性凝固障害を想定した血小板減少状態における H12-(ADP)リポソームの投与効果が検討されており, 血小板減少性の易出血状態でも止血効果を得られることが示されてきた²⁾³⁾。しかしながら, 血小板数や機能が正常な状態での止血効果については詳細には検討されておらず, 今回, 我々は正常ラットにおける動脈出血に対する H12-(ADP)リポソームの止血効果について検討した。

実験

雄性 SD ラット (500-700g) の尾部 (遠位 1/4 長) を切断し自由出血させた。5 分後に H12-(ADP)リポソーム (20mg/kg), 抗線溶効果を有するトラネキサム酸 (20mg/kg), 生理食塩水 (1ml/kg), または H12-(ADP)リポソーム (20mg/kg) + トラネキサム酸 (20mg/kg) のいずれかを大腿動脈内に留置したルートから動脈内投与した。切断部を生理食塩水に浸して 60 分間, 自然止血の有無について検討した。切断前および切断 60 分後に採血を行い, 血算および動脈血液ガスを測定し, Sonoclot システムによる血液凝固機能評価を行った。

結果

H12-(ADP)リポソーム単独投与群は 10 例中 4 例 (40%) で自然止血し, H12-(ADP)リポソーム + トラネキサム酸投与群も 10 例中 4 例が自然止血した。トラネキサム酸単独投与群, および生理食塩水投与群では止血例が認められなかった (各々 9 例中 0 例, 6 例中 0 例)。

結論

血小板数や機能が正常状態の動脈出血モデルにおいて, H12-(ADP)リポソームは一定の止血効果を有することが示唆された。

文献

- 1) Y. Okamura, et al., *J. Thromb. Haemost.* **2009**, 7, 470-477.
- 2) K. Nishikawa, et al., *J. Thromb. Haemost.* **2012**, 10, 2137-2148.
- 3) K. Hagsawa, et al., *Res. Pract. Thromb. Haemost.* **2022**, 6, e12659.

S3-2 産科危機的出血モデル家兎における H12-(ADP)-リボソームの効果

○金子恒樹¹, 萩沢康介², 大塚由花³, 佐々瑠花⁴, 木下 学⁵, 照井克生¹, 武岡真司⁶

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防衛医科大学産婦人科,
⁴防衛医学研究センター外傷研究部門, ⁵防衛医科大学校免疫微生物学講座, ⁶早稲田大学理工学術院先進理工学部
anesth.k@gmail.com

緒言

産科危機的出血は本邦の妊産婦死亡原因の第一位であり、発症が突発で急激、低リスク妊婦でも起こり予測が困難である。また日本の分娩の半数以上は一次小規模施設で行われている背景があり、産科危機的出血時の対応で改善すべき余地の多いものとして、輸血の遅れが挙げられている。今回、産科危機的出血の原因として最も多い、羊水塞栓症による産科危機的出血動物モデルにおいて、血小板代替物である H12-(ADP)-リボソームの効果を検討した。

実験

実験には、妊娠 28 日のニュージーランド白ウサギ(平均体重 3.6kg)を使用した。静脈麻酔下に帝王切開を行い、羊水を採取した。羊水を遠心して血球成分を除去して、計 3ml を静脈内投与した。羊水投与から 15 分後に右側の子宮動静脈を切断し自由出血させた。出血と同時に以下の 3 群で輸液投与を行った。① H12-(ADP)-リボソーム (1ml/kg) を単回投与後に乏血小板血漿 (PPP) を 5 分毎に出血量と等量投与した群 (以下 H12 群), ② 多血小板血漿 (PRP) を 5 分毎に出血量と等量投与した群 (以下 PRP 群), ③ 乏血小板血漿 (PPP) のみ 5 分毎に出血量と等量投与した群 (以下 PPP 群) について、止血達成率と総出血量 (出血開始から 60 分以内に止血しない場合は血管切断部位を結紮止血した) ならびに、凝固機能、血小板凝集能や血行動態等について比較した。

結果と考察

① H12 群 8 匹, ② PRP 群 8 匹, ③ PPP 群 8 匹で実験を行った。羊水投与により血小板数は $171 \pm 42 \times 10^3 / \mu\text{L}$ から $59 \pm 17 \times 10^3 / \mu\text{L}$ に減少し、活性化凝固時間 (ACT) は 130 ± 15 秒から 171 ± 24 秒に延長し、血小板凝集能 (Multiplate collagen test) は 38 ± 20 AUC から 25 ± 17 AUC に低下し、軽度～中等度の凝固障害を呈した。止血率は① H12 群 50% (4/8), ② PRP 群 50% (4/8), ③ PPP 群 0% (0/8) であり、総出血量の平均は① H12 群 58.9mL, ② PRP 群 73.1mL, ③ PPP 群 124.2mL となった。H12-(ADP)-リボソームは、血小板輸血と同様に止血を誘導し、出血量を減少させた。

結論

H12-(ADP)-リボソームは、羊水塞栓症による産科危機的出血に対して有用性が示唆された。

S3-3 臨床試験にむけた H12-(ADP)-リポソームの *in vitro* 安全性評価

○石田 治¹, 萩沢康介², 木下 学³, 武岡真司⁴

¹ 防衛医科大学校外科, ² 同生理学, ³ 同免疫微生物学, ⁴ 早稲田大学先進理工学研究科
oishida2000@gmail.com

緒言

人工血小板 H12-(ADP)-リポソームは、これまで薬剤誘導性血小板減少モデルや肝損傷出血性ショックモデル等においてその有用性が示されてきた。将来の臨床応用を視野に入れ、より安定した投与計画が立てられる心臓血管外科手術後の人工心肺後凝固障害に着目し、ウサギ人工心肺モデルを用いた前臨床実験において H12-(ADP)-リポソーム投与の有用性を示した。今回、H12-ADP-リポソーム投与の安全性につき、患者血液検体を用いて *in vitro* で検討した。

実験

人工心肺を使用した心臓血管外科手術患者 10 症例を対象に、①人工心肺前②人工心肺後③血小板輸血後、の 3 点で全血検体を採取した。H12-ADP-リポソーム(H12 群)または PBS(コントロール群)を加え反応させて後、血液凝固能、血小板機能、血小板活性化、および血小板-白血球凝集体(PLA)形成について評価した。

結果と考察

H12 群の患者血液は、どの時点においても、血液凝固能(TEG; CK-R, CRT-MA)、血小板機能(TEG; AA-MA)、血小板活性化の程度(FACS; CD62P/CD61)、PLA 形成(FACS; CD45/CD41a)に関してコントロール群と差がなかった。

結論

H12-ADP-リポソームは異常凝固、血小板活性化、PLA 形成を引き起こさなかったことから、人工心肺使用心臓血管外科手術患者に安全に使用でき、重大な副作用を引き起こすことなく出血部位の止血に貢献できることが示唆された。

S3-4 間葉系幹細胞から製造する血小板の医療応用

松原由美子

慶應義塾大学医学部 臨床研究推進センター

yumikoma@keio.jp

末梢血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。輸血は他家由来、組織修復には自己由来の血小板が用いられているが、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。そこで、ドナーに依存しない血小板を製造する研究を基礎研究、臨床研究ともに続けている。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が、私たちの研究グループは、皮下脂肪から間葉系幹細胞を精製株化する独自技術を活かし、その精製株化間葉系幹細胞である ASCL から血小板を製造している。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

G-1 局所冷却灌流と人工酸素運搬体併用療法のラット虚血再灌流障害モデルに対する神経保護効果の検討

○伊藤康裕¹, 鏡谷武雄², 藤村 幹², 小松晃之³

¹ 柏葉脳神経外科病院, ² 北海道大学脳神経外科, ³ 中央大学理工学部応用化学科
Yasuhiro.ito1028@gmail.com

緒言

我々はこれまで局所冷却灌流と人工酸素運搬体投与の各々の治療法が虚血再灌流傷害に対し神経保護効果を持つことを示してきた (Kurusu et al. 2016, Gekka et al. 2018). 今回はこの2つの治療法の併用がより強い神経保護効果を示すか否かを検討することを目的とした.

実験

併用療法は10度に冷却した人工酸素運搬体 HemoAct をラット一過性中大脳動脈閉塞モデルの再開通時に経動脈的に投与し, 二つの単独療法(10度生理食塩水投与, 37度 HemoAct 投与), 未治療コントロールと比較検討した. 2時間虚血/24時間再灌流での検討では, 神経障害度スコアは3つの治療群ともコントロール群に対して有意に改善したが, 3治療群間で差が無かった. 一方, CBF 低下, 梗塞および浮腫体積, 血漿蛋白の血管外漏出は併用療法で最も抑制されていた. 特に梗塞体積は併用療法で72%縮小しており, 脳保護効果が大きいことが示された. 併用療法の神経保護効果の持続性を100分虚血/7日再灌流モデルを用い, 神経障害度スコア(連日), 脳梗塞体積にて検討したが, 7日後にも効果は持続していた. さらに虚血時間を延長した4, 5, 6時間虚血/24時間再灌流モデルの検討では, 4, 5時間虚血においては神経障害度, 傷害脳の出血性変化の改善を認めた.

結論

併用療法は虚血時間が5時間に及んでも治療効果が期待でき, therapeutic time window の延長が図られた. 冷却 HemoAct の経動脈投与は虚血再灌流傷害の有効な治療法になりうる可能性を示した.

文献

- 1) Kurisu K, Abumiya T, Nakamura H, Shimbo D, Shichinohe H, Nakayama N, Kazumata K, Shimizu H, Houkin K. *Neurosurgery*. **2016**, 79(1), 125-34.
- 2) Gekka M, Abumiya T, Komatsu T, Funaki R, Kurisu K, Shimbo D, Kawabori M, Osanai T, Nakayama N, Kazumata K, Houkin K. *STROKEAHA*. **2018**, 118, 021467.

一般演題 1

G-2 ドキソルビシン担持一酸化炭素結合型ヘモグロビン-アルブミンクラスターの創製と抗腫瘍効果の評価

○伊藤千尋¹, 田口和明¹, 山田大雅², 榎木裕紀¹, 小松晃之², 松元一明¹

¹慶應義塾大学薬学部, ²中央大学理工学部

ci1416e@keio.jp

緒言

生理活性ガスである一酸化炭素(CO)は細胞保護効果を有することから, COと抗がん剤の併用により, 抗がん剤の正常組織に対する毒性を軽減する作用が期待できる. 本研究では, COとドキソルビシン(DOX)のデュアル輸送担体としてヘモグロビン-アルブミンクラスターを用いて創製した酸応答性DOX担持ヘモグロビン-アルブミンクラスターCO体の構造および抗腫瘍効果を検討した.

実験

ヘモグロビンCO体の表面を*N*-succinimidyl 3-maleimidopropionateを介してアルブミンで被覆したヘモグロビン-アルブミンクラスターCO体にチオール基を導入し, 酸応答性DOXプロドラッグであるアルドキソルビシンを結合させることでDOX担持ヘモグロビン-アルブミンクラスターCO体を作製した. 動的光散乱法, UV-VISスペクトル, 蛍光スペクトルおよびCDスペクトルを用いて物理化学特性を評価した. DOX放出性は, サイズ排除クロマトグラフィーにより評価した. また, 乳がん細胞(MCF-7)に対する抗腫瘍効果を*in vitro*で評価した.

結果と考察

DOX担持ヘモグロビン-アルブミンクラスターCO体は, ヘモグロビンCO体1分子にアルブミン平均3分子, DOX平均2.6分子が結合した約12nmのクラスターであり, 高い生体適合性とEPR効果を期待できる構造を有していた. また, 異なるpH条件下におけるDOX放出性を検討した結果, pH依存的にDOXが放出された. さらに, 2次元および3次元培養したMCF-7に対する抗腫瘍効果を細胞生存率, スフェロイド形態, 酸性ホスファターゼ活性より評価したところ, DOX担持ヘモグロビン-アルブミンクラスターCO体は濃度かつ時間依存的にMCF-7の増殖を抑制し, スフェロイド深部の細胞に対しても殺細胞効果を示した.

結論

DOX担持ヘモグロビン-アルブミンクラスターCO体は, 腫瘍集積性の観点から理想的な構造及び薬物放出能を有し, *in vitro*薬効評価において優れた細胞増殖抑制効果を示した.

G-3 ポリオキサゾリン修飾赤血球の開発

○吉田瑠佳, 岡本 航, 小松晃之

中央大学理工学部

komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

緒言

血液型は、主に赤血球(RBC)表面に存在する血液型抗原(ABO血液型とRh血液型)の種類の違いによって決まる。患者に異型製剤を投与すると強い免疫反応を惹起することから、輸血前のクロスマッチは必須である。中でもRh血液型のD抗原は免疫原性が高く、世界人口の約94%はRhD陽性の血液を持っているため、希少なRhD陰性の血液は災害などの緊急時に不足すると考えられる。そこで、血液型を持たないユニバーサル赤血球(URBC)として、RhD抗原をポリエチレングリコール(PEG)で遮蔽したPEG修飾RBCが報告された¹⁾。しかし近年、PEGは体内に蓄積し、抗PEG抗体を産生することがわかってきている。一方、PEGに代わる生体適合性の高い水溶性高分子としてポリオキサゾリン(POx)が注目されている。本研究は、RBCの表面をPOxで被覆したPOx修飾RBCを合成し、それが新しいURBCとなることを明らかにすることを目的とした。

実験

RBC(O型, Rh+)溶液にN-[(4-maleimidomethyl) cyclohexylcarbonyloxy] sulfosuccinimide, sodium saltを加え、RBC表面にマレイミド基を構築した後、末端にメルカプト基を有するPOx(POx-SH)を反応させることにより、POx修飾RBCを合成した。抗A, B, D抗体を用いて血液型検査を行い、免疫原性を評価した。また酸素親和性および保存安定性を評価した。

結果と考察

得られたPOx修飾RBCを抗D抗体と混合しても凝集を生じなかったことから、D抗原はPOxの被覆により完全に遮蔽されていることを明らかにした。O型のRBCを使用しているため、全ての血液型検査は陰性を示した。つまり、POx修飾RBCはURBCといえる。酸素親和性の指標である P_{50} は24 Torr (pH7.4, 37°C)であり、ヒト血液(25 Torr)の値と同等であった。POxによる表面修飾がRBCの酸素結合能に影響しないことがわかった。SDS-PAGEの結果から、POxが赤血球膜貫通タンパク質(Band 4.5)に結合していることを見出した。POx修飾RBCの8日後における溶血率の増加はわずか1%であり、保存安定性も優れると考えられる。

結論

RBCの膜表面にPOxを結合したPOx修飾RBCを合成した。抗A, B, D抗体を用いた血液型検査は陰性を示し、POx修飾RBCが血液型を持たないURBCとなることを明らかにした。また、酸素親和性はヒト血液と同等であった。誰にでも投与可能なURBCとして、POx修飾RBCの応用が期待される。

文献

1) A. Acharya *et al*, *Transfusion* **2005**, 45, 374-383.

G-4 Development of Erythrocyte-mimetic PDMS Thermoplastic Elastomer/PFOB Core-shell Microparticles as Artificial Oxygen Carriers

○ Zhang Qiming¹, 吉田宏美², Arvind Chandel², 稲垣奈都子², 伊藤大知^{1,2}

¹ 東京大学大学院工学系研究科, ² 東京大学大学院医学系研究科

qzhang0622@m.u-tokyo.ac.jp

緒言

In tissue engineering, perfluorocarbon-based oxygen carriers (PFOC) are potential for cells or tissue with high oxygen demands. Micro-sized core-shell PFOC have advantages in sustainable oxygen release, biocompatibility, and stability due to its protective shell. New PDMS-based thermoplastic elastomer, Super-PDMS¹⁾, was recently developed and studied for optic fibers etc. Based on our previous research about concave deformable PFOCs (cDFCs)²⁾, we have fabricated advanced erythrocyte-mimic cDFCs based on this PDMS-thermoplastic elastomer (PDMS-TPE). PDMS-TPE shell would contribute to high oxygen permeability of the shell.

実験

Shirasu porous glass membrane emulsification (SPG ME) was applied to prepare PDMS-thermoplastic elastomer (TPE)/ perflubron (PFOB) microcapsules. The generated microcapsules were analyzed and characterized by FT-IR, NMR, SEM, confocal microscopy and micro-compression test. The oxygen carrying capacity was evaluated by HeLa cells expressing EGFP under hypoxia conditions.

結果と考察

PDMS-TPE/PFOB particles formed core-shell structure showing spontaneous concave morphology. They showed similar size and morphology to hRBCs when dispersed in saline. Cell culture experiment revealed that PDMS-TPE/PFOB delivered oxygen to GFP-HeLa cells.

結論

We have for the first-time developed mono-dispersed PDMS-TPE/PFOB core-shell microparticles as oxygen carriers. The morphology and size were precisely controlled to mimic hRBCs by SPG ME technique. Improved oxygen concentration to cell environment were achieved by those microparticles.

文献

- 1) Nakakubo, K., Inoue, H., Yoshioka, H., Morita, K., Kotani, T., et al. *PROCEEDINGS OF SPIE* **2022**, 116820J.
- 2) X. Fu, S. Ohta, T. Kawakatsu, M. Kamihira, Y. Sakai, T. Ito *Adv. Mater. Technol.* **2021**, 7, 2100573.

一般演題 1

G-5 抗酸化能を有する人工酸素運搬体 “ストロマフリーヘモグロビンナノ粒子(SFHbNP)” の開発

○高山夏実, 岡本 航, 小松晃之

中央大学理工学部

komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

緒言

我々はヘモグロビン(Hb)の分子表面に平均3個のヒト血清アルブミン(HSA)を結合した(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター(製剤名:HemoAct™)を開発し,それが人工酸素運搬体として十分な機能を発揮することを明らかにした¹。Hbを用いた人工酸素運搬体の本質的な課題は,(1)自動酸化に伴う酸素輸送能の低下,(2)虚血再灌流時に生成する活性酸素種(過酸化水素(H₂O₂),スーパーオキシドアニオンラジカル(O₂^{•-}))によるさらなる酸化の促進である。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)は,活性酸素を不均化する酵素(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を主成分とした粒径30nm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となり得る。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)を合成し,その構造,酸素結合能,抗酸化能を明らかにしたので報告する。

実験

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。さらに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,酸素結合能測定を行うとともに,酵素(Cat,SOD)活性を評価した。また,H₂O₂水溶液中におけるoxySFHbNPのUV-Vis.スペクトル変化から,metHbの割合を算出し,oxy体の安定性を評価した。

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30nmに調整できていることを確認した。酸素親和性の指標であるP₅₀は8Torr(pH7.4,37℃),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。SFHbを重合すると,そのSOD活性は低下したものの,Cat活性は保持されることがわかった。驚いたことに,oxySFHbNPのH₂O₂水溶液中(20μM,25℃)におけるHb酸化率はわずか3%(2hr後)であり,酸化を促進する条件下においても酸素運搬能が維持されることが明らかとなった。以上の結果より,SFHbNPは粒子内部に含まれるCatの作用により,高い抗酸化能を持った人工酸素運搬体となることが示された。

結論

SFHbNPを合成し,その構造,酸素結合能,抗酸化能を明らかにした。SFHbNPは高い抗酸化能を有する新しい人工酸素運搬体である。

文献

1) W. Okamoto, T. Komatsu, *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* **2022**, *110*, 1827.

一般演題 2

G-6 リポソームによるマクロファージの MDSC 様細胞変容プロセスにおける小胞体ストレス反応の関与の可能性について

○長森恒久¹, 青山藍子¹, 吉田陽一郎¹, 酒井宏水², 東 寛¹

¹ 旭川医科大学小児科学講座, ² 奈良県立医科大学化学教室
ntsune5p@asahikawa-med.ac.jp

緒言

リポソームの生体適合性を検証する中で, 現在開発中のヘモグロビン小胞体に使用するリポソームをラットに静注した際の免疫修飾作用として, ①マイトジェンに対する脾臓リンパ球の増殖反応が抑制されること, ②この現象が, リポソームを捕捉した脾臓マクロファージが骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC: myeloid-derived suppressor cell) 様に変容し起こること, ③この MDSC 誘導は, リポソーム捕捉後に生起する NF- κ B 活性化, induced NO synthetase (iNOS) 産生, 免疫チェックポイント分子 B7-H3 発現の増大等により起こること, 等を明らかにしてきた^[1]. しかしリポソームが捕捉されたマクロファージでどのような細胞内変化を引き起こし MDSC 誘導に至るのか, 詳細は明らかになっていない. そこで in vitro でこの点を解析した.

実験

マウスマクロファージ系細胞 RAW264.7 の培養上清にリポソームを添加し反応を見た. コントロール刺激として LPS1 μ g/ml と比較し以下を検討した; ①培養上清中のサイトカイン (IL-6, TNF, IL-1 β) 産生を測定した②リポソーム投与による NF- κ B 活性化の再評価 (定量) と, その上流シグナルの同定を行った. NF- κ B 活性の定量評価は NF- κ B 反応性に Secreted Alkaline phosphatase (SEAP) 産生する細胞系を用いた. NF- κ B 活性化に至る上流シグナルの同定を BAY-11-0782 (I κ B α リン酸化阻害), IMD0354 (IKKcomplex 阻害), pepin-MYD (MyD88 阻害), および小胞体ストレス反応に関連する STF02810 (IRE1 α 阻害) の存在下に刺激を行い, 各阻害剤での抑制パターンを LPS と比較した.

結果

①サイトカインは刺激直後のみ IL-6, TNF の軽度上昇を見たが, 経時的に増加する傾向は認めなかった. ②リポソーム捕捉後 NF- κ B は活性化した. しかし LPS 刺激と比較し 1/4 程度であった. ③各種阻害剤による抑制パターンでは, LPS では既知のごとく MyD88, IKK complex, I κ B α 分解から NF- κ B に至るが, リポソームでは MyD88 の関与が薄くむしろ小胞体ストレスに関連する IRE1 α の活性が NF- κ B を担っていることを示す結果を得た.

考察

生体内においても, リポソーム投与により一過性に炎症性サイトカインの分泌が誘導される可能性が示唆された. リポソームの捕捉により NF- κ B は活性化されるが, LPS に比してその活性は弱く, 大量の炎症性サイトカイン産生を誘導するほど強く無いと思われる. NF- κ B 活性化に至る経路に関しても, MyD88, IKK complex, I κ B α 分解から NF- κ B に至る経路が主体ではなく, 小胞体ストレスに始まる経路が主体であることが示唆された. この経路を介する弱い NF- κ B 活性化シグナルが MDSC の誘導に関与している可能性がある.

既に臨床応用されているリポソーム製剤あるいは開発中のヘモグロビン小胞体では免疫抑制の副作用は報告されておらず, 実際の生体では重篤な変化を来さない可能性が高いが, 得られた結果はリポソームの薬理作用として重要な知見であり引き続き検討を要する.

文献

- 1) Yoshida Y, et al. Contribution of long-chain fatty acid to induction of myeloid-derived suppressor cell (MDSC)-like cells - induction of MDSC by lipid vesicles (liposome) *Immunopharm Immunot.* 42:614-624, 2020

G-7 カルシウムイメージングによるリポソームと細胞との相互作用観察

○堀田盛弘¹, 早瀬賢吾², 武岡真司³

¹ 早稲田大学先進理工学研究科, ² 早稲田大学先進理工学部, ³ 早稲田大学理工学術院

hottamori@moegi.waseda.jp

緒言

リポソームは人工的な直径数百 nm の脂質小胞体であり, エンドサイトーシスにより細胞に取り込まれる。従来は, 蛍光脂質で修飾したリポソームにより細胞内の動態を, 蛍光顕微鏡を用いて観察されていた。しかし蛍光物質は疎水性であるため, リポソームの蛍光修飾がリポソームと細胞との相互作用干渉する懸念があった¹。当研究室では, マクロファージの IL-1 β 放出を誘導する 2 種類のリポソーム (K3C14 と K3C16) が, エンドサイトーシスと膜融合といった, 異なる経路で細胞に導入されることを顕微鏡観察により報告した²。IL-1 β 放出に関与するシグナルにカルシウムイオン (Ca²⁺) があることから, リポソームが細胞と相互作用する際に Ca²⁺ シグナルが変化すると考え, 蛍光修飾せずにリポソームの導入経路の推定が可能ではないかと考えた。

実験

PMA (100 nM, 18 h) 刺激しマクロファージ様に分化させた THP-1 細胞に Ca²⁺ 指示薬 Fura2-AM を導入し, 2 波長で 3 秒おきに蛍光画像を撮影した (1 h)。測定開始 10 分経過後, 蛍光修飾無しリポソーム (K3C14 (196 \pm 3 nm) または K3C16 (204 \pm 10 nm), 終濃度 100 μ M) を添加し, Ca²⁺ を経時的に測定した。2 波長の比を取得し, 画像から個々の細胞の Ca²⁺ 応答波形を出力した。Python によりピークを検出し, リポソーム添加からの時間および強度を取得した。また, 蛍光修飾したリポソーム (Alexa fluor[®] 488, 5 mol%) を, マクロファージ様 THP-1 細胞に加えた (終濃度 100 μ M, 刺激時間: 5, 10, 30 min)。添加後へパリンで洗浄, 固定し, DAPI 染色後に共焦点顕微鏡により細胞内の蛍光脂質の動態を観察した。

結果と考察

K3C16 リポソームでは添加直後に一過性の大きな Ca²⁺ 応答ピークが現れたのに対し, K3C14 リポソームではしばらく経過後に小規模な応答が複数回認められた。これは, リポソームの細胞導入に伴って培地からの Ca²⁺ 流入, あるいは小胞体からの Ca²⁺ 放出が起こったものと考えられる。また, 蛍光修飾リポソームの観察において, K3C16 リポソームを添加した細胞は添加後 5 分で細胞膜が染色され膜融合を示した。他方, K3C14 リポソームを添加した細胞は添加数分では蛍光染色は認められず, 10 分後にエンドサイトーシスで取り込まれた像が認められた。

結論

Ca²⁺ 応答特性とリポソームの細胞への取り込み経路が対応していることが明らかとなった。本手法を用いることで, 蛍光染色せずにリポソームと細胞の相互作用を簡便に解析できることが期待される。

文献

- 1) R. Kolašinac, C. Kleusch, T. Braun, R. Merkel, and A. Csiszár, *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, 19(2), 346.
- 2) J. He, T. Li, T. Próchnicki, G. Horvath, E. Latz, and S. Takeoka, *Biochem. Biophys. Rep.*, **2019**, 18, 100623.

G-8 一酸化炭素を基盤とした急性呼吸窮迫症候群に対する新規治療法の検討

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

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

緒言

急性呼吸窮迫症候群(ARDS)は様々な基礎疾患に併発し, 急性に肺組織の炎症や呼吸不全を呈する疾患である. 本疾患に対する治療法として外科的な呼吸管理療法の技術が進歩しつつあるものの, その死亡率は約 40%程度と未だに高い水準であるため, 革新的な治療法の開発が望まれる. 我々は新たな治療シーズとして多彩な生理活性作用を有するガス分子である一酸化炭素(CO)に着目した. 本研究では, CO 供与体として CO 結合型ヘモグロビン小胞体(CO-HbV)を利用して, ARDS に対する CO の有用性を検討した.

方法

ARDS モデルは, C57BL/6(C57BL/6^{Hmox1+/+}) マウスまたはヘムオキシゲナーゼ -1(HO-1) 遺伝子(*Hmox1*) のヘテロ型ノックアウト(C57BL/6^{Hmox1+/-}) マウスにリポポリサッカライド(LPS)3.5mg/kg を経気道投与させることにより作製した. LPS 投与の 30 分前に生理食塩水, HbV, CO-HbV を尾静脈より投与した. LPS 処置から 24 時間後に肺組織と気管支-肺胞洗浄液(BALF)を回収し, 肺組織の傷害度と炎症性サイトカイン量を評価した. また, 肺組織における好中球浸潤, ミエロペルオキシダーゼ(MPO)活性, NADPH オキシダーゼ -2(Nox2)活性も評価した.

結果と考察

C57BL/6^{Hmox1+/+} ARDS モデルマウスにおいて, BALF 中の細胞数・タンパク質濃度の増加や顕著な肺の組織傷害, 炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-1 β , IL-6)の上昇が確認された. 興味深いことに, C57BL/6^{Hmox1+/-} ARDS モデルマウスと比較して C57BL/6^{Hmox1+/+} ARDS モデルマウスではこれらの症状が重症化しており, HO-1 が ARDS の発症と進展に重要な生体防御因子であることが推察された. そこで, HO-1 による生体防御機構の本質が CO であると仮定し, CO の ARDS に対する有用性を評価するために CO-HbV を投与して同様の検討を行った. その結果, CO-HbV 治療群では C57BL/6^{Hmox1+/-} ARDS モデルマウスにおける肺組織傷害や炎症が有意に改善された. 一方, HbV 治療群では抑制されなかった. さらに, CO は肺組織に対する好中球浸潤を抑制し, BALF 中の細胞より抽出された MPO や Nox2 の活性化を抑制した. 以上の結果より, CO は炎症や酸化による組織傷害を抑制した結果として ARDS の進展を抑制したと推察された.

結論

CO は ARDS の進展を抑制することが期待されるとともに, CO-HbV を利用した CO 供給療法は新たな ARDS 治療法として有用である可能性を秘めている.

一般演題 2

G-9 メトヘモグロビン-アルブミンクラスターの硫化水素中毒解毒剤としての有用性評価

○鈴木悠斗¹, 田口和明¹, 岡本 航², 榎木裕紀¹, 小松晃之², 松元一明¹

¹ 慶應義塾大学薬学部, ² 中央大学理工学部

awacsyuto@keio.jp

緒言

硫化水素はミトコンドリア中シトクロム c オキシダーゼと結合し, 電子伝達を直接阻害することで致死的な急性中毒を引き起こす。例年, 硫化水素による中毒事故が発生しているものの, 承認を得た有効な解毒剤や治療法は存在しない。そこで, メトヘモグロビンが硫化水素と迅速に結合することに着目し, 硫化水素中毒解毒剤としてメトヘモグロビンをアルブミンで被覆したメトヘモグロビン-アルブミンクラスターを創製した。本検討では, メトヘモグロビン-アルブミンクラスターの構造特性及び硫化水素中毒解毒能の評価を行った。

実験

動的光散乱法, サイズ排除クロマトグラフィー, Native-PAGE, 紫外可視分光光度計により, メトヘモグロビン-アルブミンクラスターの構造特性と硫化水素結合能を評価した。また, 硫化水素曝露した H9c2 細胞及び致死硫化水素中毒マウスを用いて, メトヘモグロビン-アルブミンクラスターの硫化水素中毒に対する解毒能を評価した。

結果と考察

メトヘモグロビン-アルブミンクラスターはヘモグロビン 1 分子に平均 3 分子のアルブミンが結合した約 15nm の均一な粒子であった。また, 硫化水素添加によりメトヘモグロビン由来のピークが硫化水素結合型メトヘモグロビン由来のピークにシフトしたことが確認されたことから, 硫化水素結合性を有することが示された。さらに, メトヘモグロビン-アルブミンクラスター添加により硫化水素曝露した H9c2 細胞の細胞生存率の上昇とミトコンドリア機能の維持が確認された。そこで, 硫化水素投与 15 分以内に死亡する致死硫化水素中毒モデルマウスにメトヘモグロビン-アルブミンクラスターを投与した結果, 硫化水素投与 24 時間後まで全例が生存するとともに, 臓器中シトクロム c オキシダーゼ活性を速く回復させた。

結論

メトヘモグロビン-アルブミンクラスターが硫化水素中毒解毒剤として十分に使用できると考えられた。

文献

- 1) Suzuki, Y., Taguchi, K., Okamoto, W., Enoki, Y., Komatsu, T., Matsumoto, K., 2022. Methemoglobin-albumin clusters for the treatment of hydrogen sulfide intoxication. *J. Control. Release* 349, 304–314.

一般演題 2

G-10 ポリオキサゾリン修飾ヘモグロビン “Hemoxa™” の合成と酸素結合能

○小林樹広, 岡本 航, 加藤 遼, 小松晃之

中央大学理工学部

komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

緒言

ポリオキサゾリン(POx)は生体適合性と免疫学的ステルス性に優れた合成高分子であり, 体内に蓄積しないことからポリエチレングリコール(PEG)の代替物として近年注目を集めている¹⁾. 我々はヘモグロビン(Hb)の分子表面にPOxを結合した人工酸素運搬体, ポリオキサゾリン修飾ヘモグロビン(製剤名 Hemoxa™)を合成し, その有効性を明らかにした. 現在, 市販のPOx(平均分子量 5000, Aldrich社)を使用しているが, 今後 Hemoxa™ の量産, 多種類製造, 機能付与, コスト低減を考えると, 分子量の制御されたPOxの合成法を確立することが不可欠となる. 本研究では, 2-ethyl-2-oxazoline のカチオン開環重合により poly(2-ethyl-2-oxazoline) (POx, 平均分子量 5000)を合成し, 得られたPOxを用いて Hemoxa™ を調製するとともに, その酸素結合能を評価したので報告する.

実験

2-Ethyl-2-oxazoline と methyl *p*-toluenesulfonate を acetonitrile 溶媒中で 24 時間加熱還流(100℃)した後, tetramethylammonium hydroxide を加えることで重合を停止し, 末端にヒドロキシ基を有する POx(POx-OH)を得た. POx-OH の構造は¹H-NMR 測定により確認し, 分子量はサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いて算出した. さらに, POx-OH の末端ヒドロキシ基に 3,3'-dithiodipropionic acid を用いてメルカプトプロピオネート基を導入し, 末端にメルカプト基を有する POx(POx-SH)へ誘導した.

ブタヘモグロビン(Hb)に *N*-succinimidyl 3-maleimidopropionate を反応させ, Hb 分子表面にマレイミド基を構築した後, 上記 POx-SH を結合することにより Hemoxa™ を合成した. 得られた Hemoxa™ の POx 結合数と酸素結合能を測定した.

結果と考察

POx-OH の¹H-NMR スペクトル(化学シフト値とプロトンの積分値)は, 市販のPOx(分子量 5000, Aldrich社)と一致し, SECにより算出した分子量は 5053 g/mol であった(収率 79%). 2-Ethyl-2-oxazoline を原料として, 市販品と同等の構造, 分子量を有するPOxを合成することができた.

本研究で調製した Hemoxa™ の SEC は, 市販のPOxを用いて合成した従来の Hemoxa™ と等しく, Hb にPOxが導入されていることがわかった. 乾燥重量から求めたPOxの平均結合数は 6 本/Hb であった. 酸素親和性の指標である P_{50} は 9 Torr (37℃, pH7.4), 協同性の指標である Hill 係数(n)は 1.4 であり, RBC(25 Torr, 2.5)に比べて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優れた効果を発揮すると期待される.

結論

Poly(2-ethyl-2-oxazoline) (平均分子量 5000)の合成法を確立し, その構造を確認した. 得られたPOxを用いて合成した Hemoxa™ は, 市販のPOxを用いて合成した Hemoxa™ と同様の構造, 酸素結合能を有することが明らかとなった.

文献

1) T. X. Viegas *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 22, 976.

一般演題 2

G-11 動物用人工血漿増量剤“Aloxa™”の安全性および有効性評価

○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埼玉医科大学総合医療センター, ⁴慶応義塾大学薬学部
komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

緒言

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(腎機能障害、ショックなど)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。ごく最近、我々はブタ血清アルブミン(PSA)の分子表面に約6本の生体適合性高分子ポリオキサゾリン(POx)を結合した動物用人工血漿増量剤“Aloxa™”を開発し、その高い血液適合性と優れた血中滞留性を明らかにした。本研究では、ラットを用いた免疫原性試験によりAloxa™の安全性を評価するとともに、50%出血性ショックラットの蘇生試験から製剤の有効性を評価したので報告する。

実験

[安全性評価] Wister系ラット(約230g)の尾静脈からAloxa™溶液([PSA]=5g/dL, 200mg/kg-rat)を投与し、投与前(0日)、投与7, 14, 21, 28日後に尾静脈から採血した。投与28日後に同量の同試料を再び投与し、その7, 14, 21, 28日後に尾静脈から採血した。得られた血液を遠心分離し、上清を-80℃で保存した。各ラット血清に対してELISA測定を行い、PSAに対するIgG抗体の産生量を定量した。参照群はPSA投与群とした。

[有効性評価] Wister系ラット(約230g)にセボフルラン吸入麻酔下でカテーテルを右頸動静脈に導入した。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30%量のAloxa™溶液([PSA]=5g/dL)を投与することで蘇生した。試料投与2時間後まで、循環動態観察、血球数測定、血液ガス分析を含む経過観察を行った。さらに動脈血5mLを採血し、血液生化学検査を行った。参照群はHES投与群とした。

結果と考察

[安全性評価] ラットにAloxa™溶液を投与しても抗PSA抗体の産生はごくわずかであり、POxの高い免疫学的ストレス性とAloxa™の高い免疫学的安全性が明らかとなった。

[有効性評価] ラットの平均動脈血圧(MAP)、心拍数は50%脱血により低下したが、Aloxa™溶液投与により初期値と同程度まで回復し、HES投与群と比較して有意に高い値を推移した。出血性ショックに伴い、動脈血酸素分圧は上昇し、動脈血二酸化炭素分圧は低下したが、Aloxa™溶液投与によりそれぞれ初期値まで回復した。また、アシドーシスと高い乳酸値もAloxa™溶液投与により改善された。血液生化学検査では、肝機能、腎機能等に異常は見られなかった。Aloxa™が出血性ショック状態における蘇生液として有効であることがわかった。

結論

ラットを用いた動物実験からAloxa™の優れた安全性と有効性を明らかにした。Aloxa™は肝臓、腎臓に負担をかけない動物用人工血漿増量剤として実用可能な製剤である。今後イヌを用いた安全性・有効性試験に進む。

一般演題 3

G-12 二個のヘモグロビンが四分岐 PEG に結合した二環式モノマーの合成と超分子開環重合による可逆的な自己組織化

○松平 崇, 酒井宏水

奈良県立医科大学医学部化学教室

mattu@narmed-u.ac.jp

緒言

ヘモグロビン(Hb)を低分子架橋剤でランダムに重合させた重合 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¹⁾. この副作用の原因の一つとして, 低重合度の成分による内因性 NO の捕捉が考えられており, Hb の配置を制御しながら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. 私たちはこれまでに, Hb の β 鎖同士を直鎖 PEG で結合して, 環状モノマー(Hb-PEG, 図 1)を合成した^{2),3)}. さらに, モノマー間の $\alpha\beta$ サブユニット交換反応により Hb-PEG が開環重合し, Hb と PEG が交互に並んだ鎖状の超分子ポリマーが生成することを見いだした^{2),3)}. 今回の研究では, 直鎖 PEG を四分岐 PEG (tetra-branched PEG; *t*PEG)に変更して, 2 個の Hb が *t*PEG で結合された二環式構造を持つモノマー(Hb₂-*t*PEG, 図 1)を合成し, 開環重合により構築される超分子ポリマーの構造と物理化学的性質を調べた.

実験

末端にマレイミド基を有する *t*PEG をヒト由来のカルボニル Hb と反応させて Cys-93(β) を選択的に修飾し, 二環式モノマー(Hb₂-*t*PEG)を合成した. 合成の確認はカラムクロマトグラフィー, 電気泳動法, 乾燥重量測定により行った. また, 限外ろ過膜を用いて Hb₂-*t*PEG を濃縮し, 超分子ポリマーを得た.

結果と考察

合成した Hb₂-*t*PEG を, [Hb] = 1.3mM から 3.3mM に濃縮すると, 開環重合に伴いゲル化が進行した. 一方, 得られたゲルを溶解して 1.3mM まで希釈すると, 解重合により再び Hb₂-*t*PEG が生成した. この結果は Hb₂-*t*PEG が濃度に依存して可逆的に, 網目構造を持つ超分子集合体(超分子ゲル)へと自己組織化されていることを示唆しており, Hb を配列・集積する方法として今後の応用が期待される.

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. and Sakai, H., *Particuology* **2022**, *64*, 43–55.
- 2) Matsuhira, T. and Sakai, H., *Biomacromolecules* **2021**, *22*(5), 1944–1954.
- 3) Matsuhira, T., Yamamoto, K., and Sakai, H., *Biomacromolecules* **2019**, *20*(4), 1592–1602.

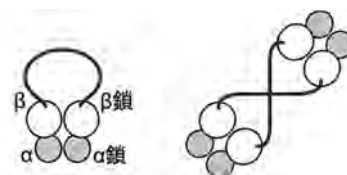


図 1. (左) 環状モノマー(Hb-PEG)と, (右) 二環式モノマー(Hb₂-*t*PEG)の模式図.

一般演題 3

G-13 CO と HCN 同時ガス中毒に対する人工ヘモグロビンモデル錯体の解毒有効性の評価

○毛 齊悦, 北岸宏亮

同志社大学理工学部

hkitagis@mail.doshisha.ac.jp

緒言

建物火災で発する毒ガスの中で、特に毒性の高い成分は CO と HCN である。CO および HCN はいずれも生体内へムに結合して毒性を発揮するガスであり、同時に吸入すると相加的に作用して低濃度でも致命的毒性を示す。これら 2 種のガス中毒に対する解毒法はそれぞれ開発されているが、CO と HCN の同時中毒に対する解毒効果を示す薬は存在しない。我々はシクロデキストリン二量体とポルフィリン鉄錯体を用いて、人工ヘモグロビンモデル錯体である hemoCD¹⁾ を構築してきた。今回、2 種類の hemoCD を混合して、CO / HCN の同時中毒の解毒剤 (hemoCD-Twins) を開発した。hemoCD-Twins の CO やシアンに対する解毒効果を動物実験による検証したので、報告する。

実験

動物へ投与する hemoCD-Twins 溶液は還元剤 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) で鉄(III)の hemoCD-Twins 溶液を鉄(II)へと還元することで準備した。次に、シアン化ナトリウム (NaCN) および CO ガスを用いて、CO / HCN 同時中毒モデルマウスを作成し、CO / HCN 同時中毒になったマウスに hemoCD-Twins 溶液を腹腔投与し、その解毒効果を評価した。さらに、アクリルクロスの燃焼ガスをマウスに吸わせて、毒ガス中毒になったマウスに hemoCD-Twins 溶液を腹腔投与し、解毒剤としての有効性を評価した。

結果と考察

CO/HCN 同時中毒マウスに hemoCD-Twins を腹腔投与したところ、非投与群では全てが 1 時間以内に死亡したのに対し、投与群では約 85% の生存が見られた。さらにアクリルクロスの燃焼ガスを用いたマウス中毒モデルでも、hemoCD-Twins の投与により、マウスの生存率および回復率を著しく改善したことがわかった。

結論

上記の実験から hemoCD-Twins は CO やシアンを速やかに捕捉して尿中に排出されることから、CO および HCN 同時中毒に対する解毒効果があることを判明した。

文献

1) Kitagishi, H.; Kano, K. *Chem. Commun.*, **2021**, 57, 148–173.

一般演題 3

G-14 酸素ファインバブルの酸素運搬体としての物性評価

○垣内健太¹, 小塚智貴², 間瀬暢之², 宮坂武寛³, 針井則一⁴, 武岡真司¹

¹早稲田大学理工学術院, ²静岡大学工学部, ³湘南工科大学工学部, ⁴山梨大学医学部
k.kakiuchi@aoni.waseda.jp

緒言

ファインバブル(FB)は100 μm 以下の微小気泡であり, 1-100 μm のマイクロバブル(MB)と1 μm 以下のウルトラファインバブル(UFB)に分類される。FBは小さな粒子径に由来する特徴(高い滞留性, 表面負電荷, 等)を有することから通常の泡とは異なる材料として注目されている。また, FB分散水は飽和溶存酸素量を超えた酸素量(過飽和酸素)を含有していることから, 農業・水産業・医療分野において, 酸素運搬体としての応用が期待されている^{1,2}。しかし, FB分散水中の酸素量を正確かつ簡便に測定する方法が存在しないため, FB分散水が過飽和量の酸素を有している理由は解明されていない。

実験

(A) 酸素FB分散水中の酸素含量測定方法の開発: 特殊な形状の酸素計を用いて, 酸素FB分散水を脱酸素水で希釈することでFB分散水中の酸素量を測定する方法を考案した。本酸素計を用いることで, 電極部へのFBの付着および(希釈後の)大気中の酸素の混入を防ぐことができ, 正確な測定が可能となった。開発した方法の測定精度は化学滴定法(ウィンクラー法)によって得られた結果との比較により評価した。

(B) 酸素FBの酸素運搬体としての物性評価: 酸素FBに内包された酸素が過飽和酸素である場合, 酸素FB濃度と過飽和酸素量に相関関係があると仮説を立て, 両因子の相関関係を評価した。また, 短期保存安定性を評価し両因子の変化における相関性も評価した。

結果と考察

(A) 開発した測定方法はウィンクラー法により得られた結果と有意な差はなく, 正確にFB分散水中の酸素量を測定できることがわかった。また, 1回の測定時間は8分以内であり, ウィンクラー法(30分以上)と比較して①簡便性, ②迅速性, ③サンプル量(50-500 μL)において優位性がある。

(B) 調製直後のFB分散水におけるFB濃度と過飽和酸素量に相関性はなかった($R^2=0.157$)。また, FB分散水の短期保存実験において, FB濃度は1日後も変化が無かったのに対して, 酸素含量は経時的に減少し, 1日後には明白に減少していた($p<0.01$, day 0 vs. day 1)ことから両因子の経時変化にも相関性は確認されなかった。一方, FB分散水の酸素量の低下速度は, FBを含まない過飽和溶存酸素水の低下速度と類似していたことから, FB分散水中の過飽和酸素は, FBに内包された酸素ではなく溶存酸素として存在している酸素であることが示唆された。

結論

(A)FB分散水中の酸素量を正確かつ簡便に測定する方法を開発した。(B)酸素FB分散水中の過飽和酸素はFB自体に由来するものではなく, FBを調製する過程において形成された溶存酸素であり, FB自体は酸素運搬体として機能していないことがわかった。

文献

- 1) K. Ebina, K. Shi, *et al.*, *PLoS ONE*, **2013**, 8(6), e65339
- 2) DP. Ntentakis, AM. Ntentaki, *et al.*, *Wound Repair and Regen.*, **2021**, 29(6), 1062.

謝辞

第 29 回日本血液代替物学会年次大会の開催につきましては、多くの企業・団体よりご支援、ご協力をいただいております。

The 29th Annual Meeting of the SBSJ is partially supported by the following companies and foundation.

アドバンテック東洋株式会社

シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社

株式会社シナノ製作所

鳥津サイエンス東日本株式会社

ジャスコサポート株式会社

株式会社高長

日京テクノス株式会社

ヤマト科学株式会社

株式会社ユニソク

後援：中央大学

軟体動物ヘモシアニンの構造と機能

Structure and Function of Molluscan Hemocyanins

加藤 早苗^{1,2*}, 松井 崇³, 田中 良和⁴Sanae Kato^{1,2*}, Takashi Matsui³, Yoshikazu Tanaka⁴

和文抄録

脊椎動物の血液は赤いが、軟体動物の血液は青い。これは、軟体動物の酸素運搬タンパク質がヘモグロビン (Hb) ではなくヘモシアニン (Hc) であることに起因する。Hc は、血球成分としてではなく、血リンパ液に直接溶解した状態で存在するタイプ3銅含有タンパク質で、還元型は無色透明であるが、酸素と結合すると青色を呈する。軟体動物の Hc 分子は巨大なシリンダー形の会合体分子で、その分子量は 330 万から 1,000 万以上にも及び、自然界で最大のタンパク質分子の一つに挙げられる。あまりにも巨大な分子であることが軟体動物 Hc 分子の構造解析を困難にしてきたが、近年、X線結晶解析とクライオ電子顕微鏡 (クライオ EM) を組み合わせた構造解析手法により、頭足類スルメイカ Hc の高分解能分子構造が発表された。本総説では、軟体動物 Hc の分類、分子構造、分子進化、生理機能に関する最新情報を解説する。

Abstract

Instead of the red blood of vertebrates, most molluscs have blue hemolymph containing hemocyanin, a type-3 copper-containing protein. The hemoglobin of vertebrate blood is replaced in most molluscs with hemocyanin, which plays the role of oxygen transporter. Oxygen-binding in hemocyanin changes its hue from colorless deoxygenated hemocyanin into blue oxygenated hemocyanin. Molecules of molluscan hemocyanin are huge, cylindrical multimeric proteins—one of the largest protein molecules in the natural world. Their huge molecular weight (from 3.3 MDa to more than 10 MDa) are the defining characteristic of molluscan hemocyanin, a property that has complicated structural analysis of the molecules for a long time. Recently, a structural analysis of cephalopod squid hemocyanin has succeeded using a hybrid method employing both X-ray crystallography and cryo-EM. In a biochemical breakthrough for molluscan hemocyanin, the first quaternary structure with atomic resolution is on the verge of solving the mystery of molluscan hemocyanin. Here we describe the latest information about the molecular structure, classification, and evolution of the molecule, and the physiology of molluscan hemocyanin.

Keywords

Molluscan hemocyanins, Oxygen transporter, Molecular structure, X-ray crystallography, Cryo-Electron microscopy, Subunit assembly

¹ 鹿児島大学大学院水産学部 Faculty of Fisheries, Kagoshima University

*〒 890-0056 鹿児島市下荒田 4 丁目 50-20 4-50-20, Shimoarata Kagoshima 890-0056, Japan.

² 鹿児島大学大学院連合農学研究科 Course of Biological Science and Technology, The United Graduate School of Agricultural Sciences Kagoshima University

³ 北里大学理学部 School of Science, Kitasato University

⁴ 東北大学大学院生命科学研究所 Graduate School of Life Sciences, Tohoku University

この総説は Molluscan hemocyanins. Vertebrate and invertebrate respiratory proteins, lipoproteins and other body fluid proteins. Subcellular Biochemistry 94, Springer, 2020;195-218. に最初に報告された研究に基づくものである。

論文受付 2022 年 7 月 30 日 論文受理 2022 年 8 月 8 日

はじめに

無脊椎動物の体液は血液とリンパ液、および細胞間液がはっきりと区別できないため、血液は血リンパ液と総称される。ほとんどの無脊椎動物の血リンパ液には赤血球はなく、酸素運搬タンパク質は細胞外タンパク質として血リンパ液に直接溶解した状態で存在する。無脊椎動物の酸素運搬タンパク質には、Hc, Hb, ヘモエリスリン, クロクロオリンなどがあり、このうち、最も多くの無脊椎動物に見られる酸素運搬タンパク質はHcである。無脊椎動物のHbは脊椎動物の4量体分子とは異なり、数十以上のサブユニットからなる会合体分子で、環形動物のマシコヒゲムシの巨大Hb(24量体, 分子量約40万)の結晶構造解析研究がよく知られている¹⁻³⁾。

無脊椎動物の主要な酸素運搬タンパク質であるHcの特徴を4点挙げる。1点目は上述したように、血球成分ではなく細胞外タンパク質である点である。2点目は酸素結合部位に配位する金属の種類で、Hcには鉄ではなく銅が配位している。3点目はHcが呈する色である。酸素結合部位には、2つの銅原子と6つのヒスチジン残基が存在し、酸素分子がこれらの銅原子と結合してCu₂O₂クラスターを形成した酸化Hcは青色を呈し、還元型は無色透明である。4点目は巨大な分子量である。無脊椎動物Hcは軟体動物の分子と節足動物の分子に分けることができ、それぞれの分子構造と分子量は全く異なる。節足動物Hcの場合、酸素結合部位を含む最小構成単位はサブユニットであり、その大きさは約70kDaで、1つのサブユニットあたり1つの酸素結合部位を含んでいる。サブユニットは6量体を形成し、さらに6量体が偶数個集合して1分子を構成する。一方、軟体動物Hcの場合、酸素結合部位を含む最小単位は機能ユニット(Functional unit, FU)で、FUの大きさは約50kDaである。FUが7あるいは8個連結されて330kDa~550kDaのサブユニットを構成する。さらに、この巨大なサブユニットが互いに会合してシリンダー型の10量体、20量体、あるいは30量体の分子を形成する⁴⁾。つまり、軟体動物Hcは少なくとも70の活性部位を含み、分子量は約3.3MDaから13.5MDaであるため、自然界で最も大きなタンパク質の1つに挙げられる。なぜ、軟体動物はこの超巨大なタンパク質会合体を酸素運搬体として選んだのだろうか? Hc分子あたりの酸素結合部位数が多いことは酸素運搬能に有利に働くのだろうか? これらの謎を解くためには、軟体動物Hcの分子構造の理解が必要である。

軟体動物Hcの分子構造解析は、その巨大な分子量や複雑な分子構造から長い間困難を極めてきた。一部の軟体動物Hcでは*in vitro*において会合体分子からサブユニットへの解離が認められ、その構造の不安定さも構造解析を難しくしていた。さらに、1,000万を超える巨大分子や、約400kDaのサブユニットを扱うには一般的な生化学的手法は適しておらず、会合体分子と解離したサブユニットの分離は困難であった。このため、Hc分子が解離しないように慎重に扱うことが、構造解析の第一歩となった。

軟体動物Hcの構造解析研究は会合体分子のクライオEM解析⁴⁻¹¹⁾、およびFUの高分解能X線結晶解析¹²⁻¹⁵⁾によって進め

られた。これらの解析はすべてのFUが共通の構造を持つという前提で、一部のFUの高分解能結晶構造をクライオEMの電子密度マップに重ね合わせることによって行われたが、低解像度の構造しか得られず、それぞれのFUの構造の違いは考慮されていなかった。

近年、軟体動物Hcの構造解析に進展があった。Zhangらは腹足類のトコブシのHcのクライオEM解析で得られた電子密度のみに基づいてCモデルを構築することにより、ほぼ原子分解能の分子構造を報告した¹⁶⁾。さらにGaiらは世界初となる軟体動物Hc分子のX線結晶構造として、スルメイカ*Todarodes pacificus*の分子構造を報告した^{17,18)}。この結晶構造により、シリンダー型分子のうちD₅対称構造を成す外壁領域のアミノ酸側鎖と糖鎖を含む原子構造モデルが3.0Åの分解能で明らかにされた。しかし、結晶中には上下反転したHc分子が50%の割合で混在し、それに由来する疑似のD₅対称を持った電子密度が観測されたため、内部領域の詳細な構造決定は困難であった。そこで、TanakaらはクライオEMによる単粒子構造解析により内部領域が非対称構造である事を明らかにし、非対称性複合体の単粒子解析のための精密化プロトコルを用いて、内部領域の構造決定に成功した¹⁹⁾。このスルメイカHcの最新の構造は、軟体動物Hcとしては最初の原子分解能の分子構造である。

これらの近年のブレイクスルーにより、Hcの分子構造に関する多くの情報が得られてきた。本総説では、軟体動物Hcの分子構造に焦点をあて、構造による分類、分子構造、分子進化、生理機能を網羅的に解説する。

構造による分類

軟体動物Hc分子は構成サブユニット数が10個か、あるいはそれ以上かによって大別できる。頭足類Hc分子は前者、腹足類Hc分子は後者である。サブユニットは7個以上のFUから構成されている。さらに、FUはアミノ酸配列の相同性により、基本となるFU(FU-a, -b, -c, -d, -e, -f, -g, -h)とadditional FU(FU-d*, -f1, -f2, -f3, -f4, -f5, and -f6)に分類できる。基本となるFUのうち、FU-a, -b, -c, -d, -e, -fはシリンダー型分子の外壁領域に位置し、FU-gとFU-hは内部領域に位置する。Additional FUは内部領域に位置する。すべてのサブユニットにはFU-a, -b, -c, -d, -e, -f, -gの7個のFUが共通して含まれており、多くのサブユニットには加えてFU-hやadditional FUが含まれている。基本となるFUのうち、FU-hはC末端にcupredoxin様ドメインを持つため、他のFUよりも分子量が大き¹³⁾、腹足類Hcのサブユニット、すなわち、20量体および30量体分子のサブユニットにのみ含まれる。さらに、構成FUの数によって、腹足類と頭足類のHcはそれぞれ2つのサブグループに分類することができる。すなわち、軟体動物Hc分子は、サブユニットの数およびその組成から、(1)タイプ1、(2)タイプ2、(3)タイプ3、(4)タイプ4の4種類に分類することができる(Fig. 1)。

タイプ1は腹足類Hcであり、ワクチンや抗体作成時のキャリアタンパク質としてよく使用されるキーホールリンペットHc(KLH)はこのタイプである。タイプ1はサブユニットの20量

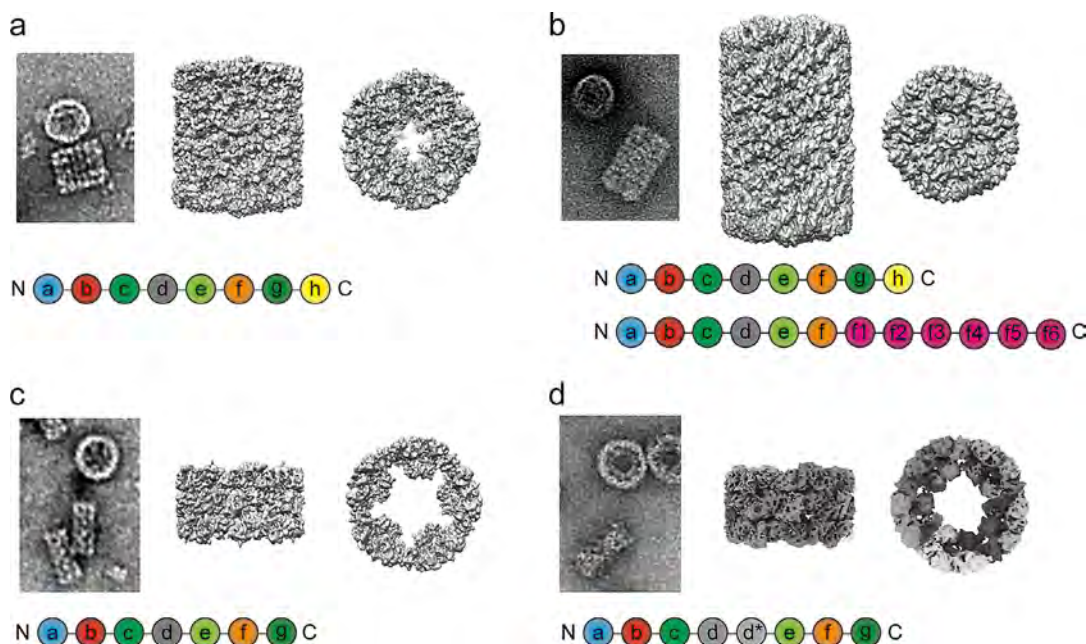


Fig. 1 Structure of molluscan hemocyanin and its subunit. **a-d** Representative area of negatively stained transmission electron microscopy (TEM) image (left), scheme of hemocyanin subunit (bottom), and three-dimensional (3D) model of four molluscan hemocyanin types (right) are shown. **a** Type 1 hemocyanin (Keyhole limpet-type). (TEM image: *Nordotis discus hannai* hemocyanin; 3D structure: cryo-electron microscopy (cryo-EM) structure of keyhole limpet hemocyanin.) **b** Type 2 hemocyanin (Mega-hemocyanin, *Melanoides tuberculata*). **c** Type 3 hemocyanin (Nautilus-type). (TEM image: *Enterooctopus dofleini* hemocyanin; 3D structure: Nautilus hemocyanin). **d** Type 4 hemocyanin (Squid-type). (*Todarodes pacificus* hemocyanin; 3D structure: cryo-EM structure, side-view and top view). C C-terminus, N N-terminus. Scheme of hemocyanin subunits: a, b, c, d, e, f, g, h basal functional units (FUs) of molluscan hemocyanins, d*, f1, f2, f3, f4, f5, f6 relative FUs. Created based upon figure from Kato et al.³⁰⁾

体で、中央部に空洞を持つシリンダー型の10量体分子が2個上下に積み重なり、分子を形成している (Fig. 1a)。このため、この分子を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察すると、側面から見た像は長方形に、上から見た像は中心に空洞をもつ円形に見える。1つのサブユニットにはFUが8個含まれ、N末端側からFU-a, -b, -c, -d, -e, -f, -g, -hの順に配列している (Fig. 1a)。このうち、N末端側から6個目までのFU-a, -b, -c, -d, -e, -fは分子の外壁領域に配置し、C末端側のFU-gと-hは分子の内部領域に配置する^{4, 7, 20-22)}。例外的な分子として polyplacophora Hcがあり、サブユニットを構成するFU組成は同じであるにも関わらず、20量体ではなく10量体分子を形成する^{23, 24)}。

タイプ2も腹足類Hcであるが、その構造は特殊で、サブユニットの30量体で、分子量は1,350万 (13.5MDa) と特に巨大であり、このためメガヘモシアニンと呼ばれる。このタイプの分子は10量体が上下に3個積み重なった構造をしており、分子側面の像はタイプ1の分子より1.5倍高い (Fig. 1b)。分子の内部領域は完全に埋まっており、上から見た像には空洞は認められない。分子を構成するサブユニットは2種類あり、1つはタイプ1と同様のFU組成 (FU数8) の通常のサブユニット (400kDa) で、もう1つは分子量550kDaのメガサブユニットである。通常のサブユニット20個とメガサブユニット10個が会合して分子を形成している。メガサブユニットは12個のFU

(FU-a, -b, -c, -d, -e, -f, -f1, -f2, -f3, -f4, -f5, -f6) からなり、このうちN末端側から6個目までのFUは通常のサブユニットと共通し、これらのFUは外壁領域に配置する。C末端側にはFU-gと-hの代わりにFU-fとの相関性が高い6個のadditional FU (FU-f1 ~f6) が配列し、これらのFUは分子の内部領域に折りたたまれるように配置し、空間部分を埋めている^{6, 25)} (Fig. 1b)。

タイプ3は頭足類のオウムガイおよびタコのHcである。このタイプの分子は10量体であり、分子量は約3.5MDaである。10個のサブユニットが会合してシリンダー形の10量体分子を形成し、内部領域には襟のようなドメインを5つ形成する^{4, 8, 26, 27)} (Fig. 1c)。このため、分子の高さはタイプ1の約半分となっている。サブユニットは7つのFU (FU-a, -b, -c, -d, -e, -f, -g) から構成され、FU-hを欠損している (Fig. 1c)。タイプ1およびタイプ2と同様に、外壁領域にはFU-a, -b, -c, -d, -e, -fが配置し、内部領域に配置するFUはFU-gのみであるため、タイプ1よりも空洞部分が広い²⁸⁾。

タイプ4は、頭足類のイカのHcである。このタイプの分子は10量体で、分子量は3.8MDaである (Fig. 1d)。サブユニットは8個のFUを含むが、FUの組成はタイプ1とは異なり、FU-a, -b, -c, -d, -d*, -e, -f, -gからなる (Fig. 1d)。すなわち、このサブユニットはタイプ3のサブユニットと同様にFU-hを欠損し、さらにN末端側から5番目のFUとしてFU-d*が追加さ

れている。FU-d*はFU-dの遺伝子重複によるものと考えられている^{5,9,17,29}。外壁領域には他のタイプと同様にFU-a, -b, -c, -d, -e, -fが配置し、内部領域には5番目に位置するFU-d*とC末端のFU-gが配置する。分子全体はタイプ3とよく似たシリンダー形をしているが、内部領域にはFU-gに加えてFU-d*が存在するため、タイプ3よりも空洞部分が狭いことがわかる (Fig. 1d)。

分子構造

FU構造

スルメイカ Hc 分子の結晶構造から、FU-h 以外の FU は、外壁領域あるいは内部領域の位置に関わらず、類似した構造を持っていることが明らかになった^{17,30}。つまり、Hc 分子は類似したブロックが集合して構築されていると言える。単離した FU-e, FU-g, FU-h の結晶構造解析により、FU の高分解能構造が決定されている¹²⁻¹⁵。それによると、FU は主に α -helix から成る N 末端側のコアドメイン (NTD) と C 末端側の β -sandwich ドメイン (CTD) の 2 つのドメインからなる (Fig. 2a)。FU-h の場合は、NTD と CTD に加えて、C 末端に cupredoxin 様ドメインが付加されている (Fig. 2b)。

FU の NTD には酸素結合のための 2 個の銅原子 (Cu1 および Cu2) がおり、酸素分子はこれら銅原子の間に結合して Cu₂O₂ クラスターを形成する (Fig. 2c)。銅原子の周囲には 6 個の His 残基が配置し、すなわち、Cu1 の周囲には His41, His60, His69 が、Cu2 の周囲には His179, His183, His210 が配置しており、これらの His 残基はすべての FU で保存されている。さらに重

要なのは、His60 の C 原子と Cys58 の S 原子の間にチオエーテル架橋が形成されていることである (Fig. 2c)。これら酸素結合部位の周囲の構造はすべての FU でよく保存されている。各 FU には 1 つの酸素結合部位があるため、Hc 分子あたりの FU 数は酸素結合部位数に等しい。つまり、160 個の FU からなるタイプ 1 分子は 160 個の酸素結合部位を持ち、80 個の FU からなるタイプ 4 分子は 80 個の酸素結合部位を持つ。

外壁領域の構造

分子の外壁領域の構造と構築について説明する。すべての軟体動物 Hc 分子はシリンダー形の 10 量体構造を基本構造とし、その外壁領域の構造は共通している。腹足類 Hc のタイプ 1 およびタイプ 2 の分子の外壁領域は同一の外壁構造をそれぞれ 2 個および 3 個積み重ねられることで形成されている^{5-9,16,23,25,31}。外壁領域の構造の詳細はトコブシ Hc の高分解能クライオ EM 構造¹⁶、スルメイカ Hc の 3.0 Å 分解能での結晶構造¹⁷によって解明された。

外壁領域は 10 個のサブユニットが D₅ 対称に集合して形成されている。まず、2 個のサブユニットが集合して 2 回対称のプレート状サブユニット 2 量体を形成し、次いで 5 個のプレート状サブユニット 2 量体が 5 回対称に配列して D₅ 対称形のシリンダー構造を構築する (Fig. 3)。外壁領域を構成する FU は FU-a, -b, -c, -d, -e, -f で、プレート状サブユニット 2 量体においてすべての FU は 2 量体 (FU ダイマー) を形成している。すなわち、FU-a と -b (FU-(a-b))、FU-c と -f (FU-(c-f))、FU-d と -e (FU-(d-

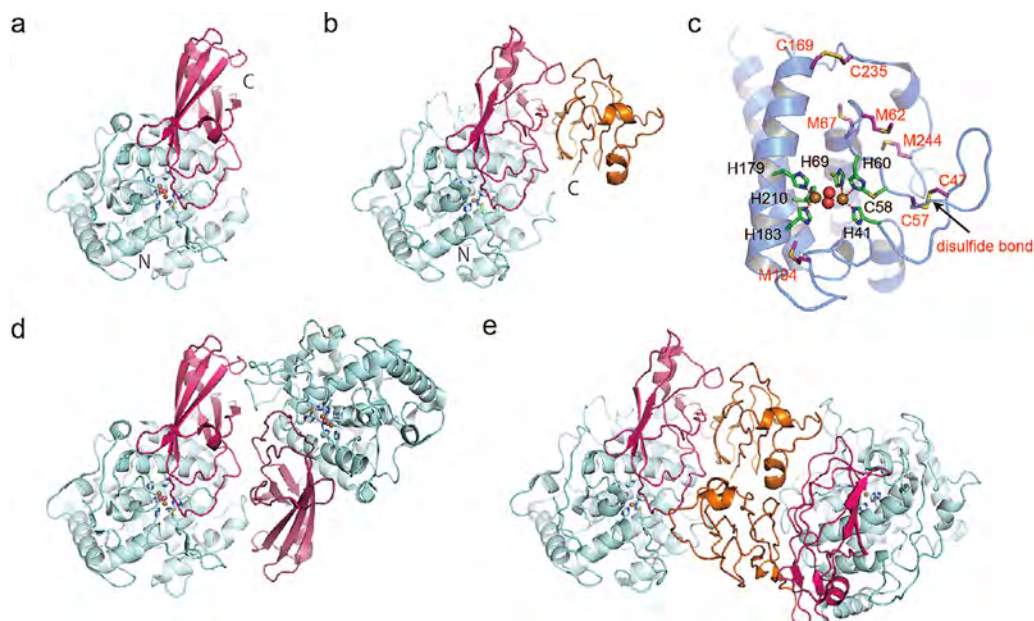


Fig. 2 Structures of the functional units. **a** Ribbon diagrams of FU-g. **b** Ribbon diagram of FU-h. **c** Active sites of FU. His coordinating with coppers and Cys58 forming a thioether linkage to His60 are shown as green sticks. Highly conserved sulfur-containing residues surrounding the Cu₂O₂-binding site (pink sticks). **d** Structure of FU-g dimer. **e** Structure of FU-h dimer. Cu and O atoms are shown as red and orange spheres, respectively. C C-terminus, N N-terminus. The N-terminal core domain (NTD), C-terminal β -sandwich domain (CTD), and cupredoxin domain are shown in cyan, magenta, and orange, respectively. Created based upon figures from Kato et al.³⁰ and Gai et al.¹⁷.

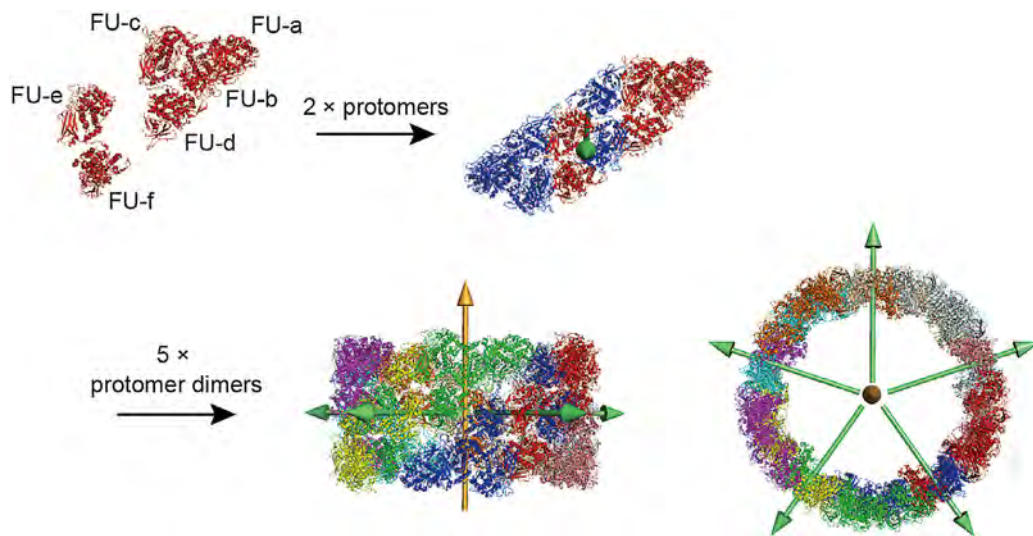


Fig. 3 Architecture of the wall region. Two subunits assemble into one plate-like subunit dimer with a two-fold symmetry, shown as a green arrow. Five subunit dimers assemble to form a decamer with a five-fold symmetry, shown as an orange arrow, which generates D_5 symmetry. Each subunit is represented by a separate color. Reprinted from Kato et al.³⁰⁾, with permission.

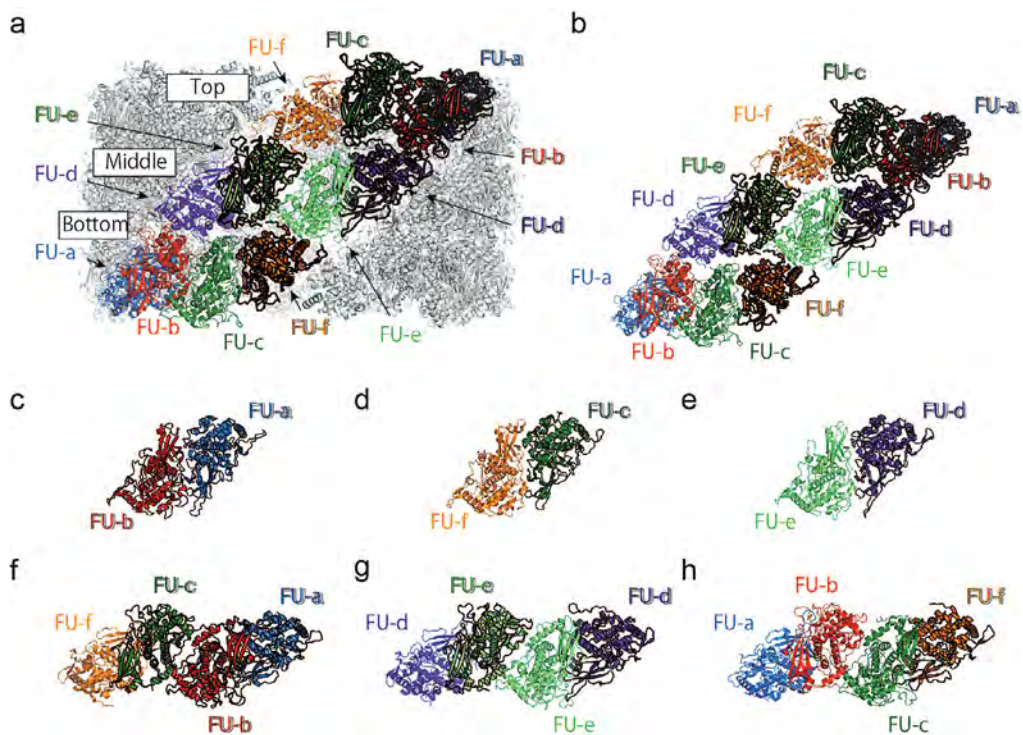


Fig. 4 Architecture of the plate-like dimer. **a** FUs in one plate-like dimer are highlighted in separate colors. Outline of one the subunit is highlighted. **b** Architecture of plate-like dimer. **c-e** Three types of FU dimers comprising the plate-like dimer. **f-h** Relative orientation of the four FUs in the top (**f**), middle (**g**), and bottom regions (**h**) are shown. Each subunits in one plate-like dimer are represented by light and shade colors, respectively. Reprinted from Kato et al.³⁰⁾, with permission.

e))はそれぞれ対称構造を持つFUダイマーを形成し、これらFUダイマーの構造は共通している (Fig. 4a-e)。つまり、プレート状サブユニット2量体は6個のFUダイマーで構築されている (Fig. 4b)。プレート状サブユニット2量体におけるFUダイマーの形成は外壁領域の構築に必須であり、言い換えると、

FUダイマーは外壁領域の構造単位である。興味深いことに、これらFUダイマーのうちFU-eと-fを含むもの、すなわちFU-(c-f)とFU-(d-e)は、隣接するサブユニット間でドメインスワップし、プレート状サブユニット2量体を構築していた (Fig. 3)。つまり、プレート状サブユニット2量体にある6個のFUダイ

マーのうち4個がサブユニット間の相互作用によって形成されていることになる。

プレート状サブユニット2量体の構造はさらに3つの領域、すなわち上部、中央部、下部に分けられる (Fig. 4a)。上部と下部は、種類の異なる2個のFUダイマー、すなわちFU-(a-b)とFU-(c-f)からなる (Fig. 4f, h)。中央部は、同じFUダイマーが2個、すなわち2個のFU-(d-e)から構成されている (Fig. 4g)。中央部にはFUが4個配置しているわけだが、それらFUの相対的な位置関係は、上部および下部領域に位置するFUの位置関係とよく似ている。これらのことから、2個のFUダイマーが互いに会合したFUダイマー2量体がユニットとなり、3つのユニットが積み重なることでプレート状サブユニット2量体を構築している。

外壁領域の構造についてまとめると、FUダイマーはシリンダー形の外壁構造の構築に必須な構造単位である。FUダイマーがさらに会合したFUダイマー2量体がユニットとなり、3個のユニットが上下に積み重なることでプレート状サブユニット2量体を形成する。続いて、プレート状サブユニット2量体が5個会合して5回対称の外壁領域を構築し、 D_5 対称のシリンダー形分子を形成する。このような階層的な分子構築は、既知のすべてのHc分子に共通している。

タイプ1 (キーホールリンペット-タイプ)

KLHを代表とするタイプ1は、典型的な腹足類Hcである。タイプ1に関する研究例は多く、KLHや*H. diversicolor* Hc (PDB ID: 3J32)のクライオEM構造が報告されている¹⁶⁾(Fig. 5)。タイプ1は20量体分子であり、基本となるFUのすべて、すなわちFU-a, -b, -c, -d, -e, -f, -g, -hを含んでいる。20量体分子は同じ10量体が2個逆向きに積み重なることによって構築される。N末端側の6つのFU, FU-a, -b, -c, -d, -e, -fは外壁領域を形成している。外壁領域では、2個の10量体の外壁領域が D_5 対称で積み重なっている。前述したように、外壁領域の構造はすべてのHcに共通しているが、内部領域の構造はタイプによって異なる。ここではタイプ1分子の内部領域の構造に焦点をあ

てることとする。

内部領域に配置するFUはC末端側のFU-gと-hである。これらはそれぞれFU-g どうし、FU-h どうしでFUダイマーを形成している (Fig. 2d, e)。FU-gダイマーは、外壁領域の隣接するプレート状サブユニット2量体に位置する2つのサブユニット間で形成されている。つまり、隣接するプレート状サブユニット2量体間でFU-gダイマーが形成されており、このことは10量体構造を構築する上で重要である。FU-gダイマーは外壁領域に D_5 構造を持つ10量体分子の内腔の片側に形成され、5つのプレート状サブユニット2量体間を繋いでいる。すなわち、20量体分子の上部および下部には、それぞれ5個のFU-gダイマーが配置している (Fig. 5a)。

FU-hダイマーもまたプレート状サブユニット2量体間を繋ぐように形成されている。20量体分子の上部および下部にそれぞれ5個のFU-hダイマーがFU-gダイマーを覆うように、5回対称に配置している (Fig. 5)。FU-hはC末端にcupredoxin様ドメインが付加されており、他のFUより大きいため、FU-hダイマーの構築は他のFUダイマーの場合と異なっている (Fig. 2e)。そのため、FU-gとFU-hは他のFUの様なヘテロダイマーではなく、それぞれホモダイマーを形成する。FU-gダイマーとFU-hダイマーを形成するサブユニットの組み合わせは同じであり、2つのプレート状サブユニット2量体はFU-gダイマーとFU-hダイマーの両方で繋がっている。したがって、このように組み立てられた10量体は、 C_5 対称性を持つ。続いて、同一の C_5 対称構造の10量体が2個会合して20量体を形成するが、このときFU-gダイマーおよびFU-hダイマーが配置していない面どうしで会合し、2回対称の20量体分子が形成される。この結果、サブユニット間で形成されるFU-gダイマーとFU-hダイマーで形成される内部領域構造は、シリンダー形分子の上下両面に位置することとなる。つまり、 C_5 構造の10量体の2回対称な会合の結果として、20量体分子は D_5 対称性を持つ。

タイプ2 (メガヘモシアニン-タイプ)

タイプ2はcerithioid snailという巻貝から発見されたメガヘモシアニンと呼ばれるユニークなHc分子である。この分子は30量体で、2種類のサブユニットからなる。1つは基本となるFU (FU-a, -b, -c, -d, -e, -f, -g, -h) から成る400kDaの通常のサブユニットで、もう1つはFU-a, -b, -c, -d, -e, -f, -f1, -f2, -f3, -f4, -f5, -f6から成る550kDaの巨大なサブユニット (メガサブユニット) である。外壁領域の構造はタイプ1と共通しており、内部領域にはFU-g, -h, -f1, -f2, -f3, -f4, -f5, -f6が配置して、シリンダー形の30量体分子の内部構造を形成している。通常のサブユニットはタイプ1と同じく C_5 対称の典型的な10量体を形成する (Fig. 6d)。この10量体の外壁領域は D_5 対称構造で、内部領域は5回対称のプレート状サブユニット2量体間で形成されるFU-gダイマーおよびFU-hダイマーで構成されている。一方、メガサブユニットは特徴的な10量体 (メガデカマー) を形成する。メガデカマーの外壁領域は通常の10量体同様にFU-a, -b, -c, -d, -e, -fが配置した D_5 対称構造であるが、内部領域には

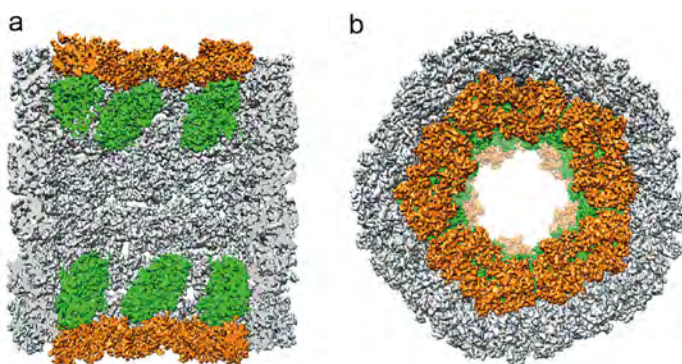


Fig. 5 Type 1 hemocyanin. Conformation of type 1 hemocyanin illustrated from lateral (a) and top views (b). Wall region, FU-g, and FU-h are shown as gray, green, and orange surfaces, respectively. Reprinted from Kato et al.³⁰⁾, with permission.

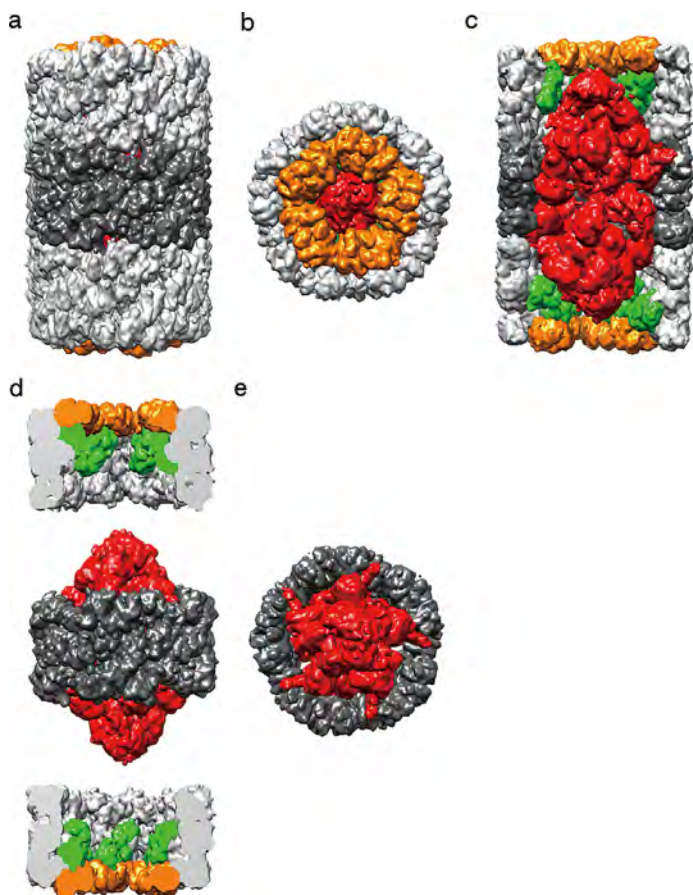


Fig. 6 Type 2 hemocyanin, mega-hemocyanin. **a-c** Architecture of mega-hemocyanin viewed from lateral (**a**) and top (**b**) and as a sectional view (**c**). **d** Composition of each decamer of mega-hemocyanin. Decamer of type 1 and rhombus-shaped cylindrical core are shown. For clarity, the sectional representation of a decamer of type 1 is also shown. **e** Top view of rhombus-shaped cylindrical core. Reprinted from Kato et al.³⁰⁾, with permission.

additional FUであるFU-f1, -f2, -f3, -f4, -f5, -f6が配置し、メガデカマーの空洞部分を完全に埋めるとともに、メガデカマーの上下から山形に突出している。(Fig. 6d, e). 10個のメガサブユニットの配列は同じであるが、additional FUの相対的な配置は同じではなく、これらのFUは複雑に折り畳まれ、上半分と下半分の2回対称性を持つひし形のような内部領域構造を構築している。その結果、メガデカマーは上下対称構造の内部領域を D_5 の外壁領域が包んだ、2回対称構造となる^{6,25)}。30量体分子はメガデカマーの両側に典型的な10量体が1個ずつ会合し、メガデカマーの内部領域構造が両側の10量体の空洞部分を埋める様にして形成される⁶⁾(Fig. 6b, c)。この内部領域の複雑なコンフォメーションは“protein ORIGAMI (折り紙)”と呼ばれている。メガデカマーは5回対称性を持たないので、30量体分子は2回対称構造である。

タイプ3 (オウムガイ-タイプ)

タイプ3は頭足類のオウムガイおよびタコのHcで、このタイプのサブユニットは7個のFU、すなわちFU-a, -b, -c, -d, -e,

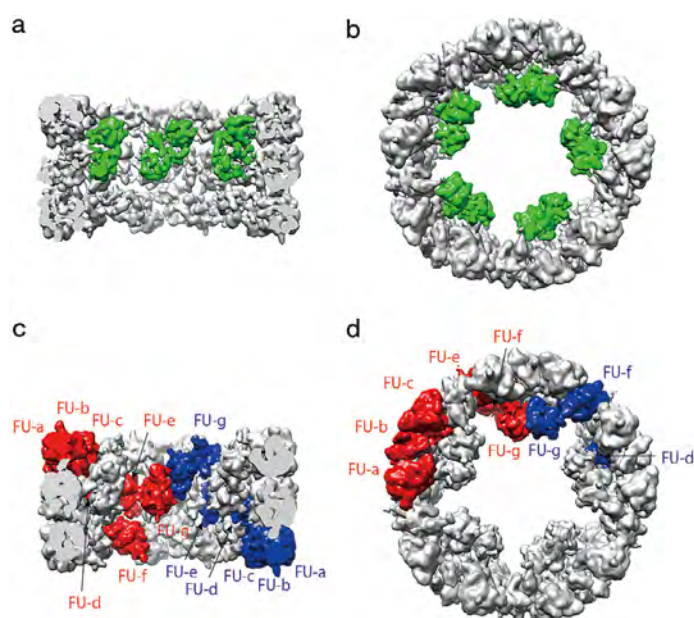


Fig. 7 Type 3 hemocyanin. Conformation of type 3 hemocyanin illustrated from lateral (**a**, **c**) and top views (**b**, **d**). **a**, **b** Wall region and FU-g are shown as gray and green surfaces, respectively. **c**, **d** Subunits A and D, which cooperatively form an inner collar domain, are shown in red and blue, respectively. Reprinted from Kato et al.³⁰⁾, with permission.

-f, -gを含むが、FU-hを欠損している。オウムガイHcのクライオEM構造が報告されており(EMDB-ID: 1434)⁸⁾、これを見ると分子は10量体で、外壁領域と、内部領域に襟のようなドメインを5つ持つ(Fig. 7)。

タイプ3の外壁領域はタイプ1の20量体分子の外壁領域の半分に相当し、前述のとおり D_5 対称の構造を持つ。内部領域に位置する襟様のドメインにはFU-gダイマーが配置し、タイプ1と同様の方法で構築する。FU-gダイマーは外壁領域に位置するFUダイマーの構造とよく類似していることから、タイプ3の分子はFUダイマーが構造単位となって構築されていることとなる。タコHcの10量体分子をプロテアーゼ処理することによって単離したFU-gの結晶においても、FU-gダイマーが観察されることから、FU-gはホモダイマーを形成しやすい性質を持っていると思われる。FU-gダイマーは隣接するプレート状サブユニット2量体に位置する2つのサブユニット間で形成され、例えば、サブユニットAはサブユニットBと、サブユニットDはサブユニットCと、それぞれプレート状サブユニット2量体を形成し、サブユニットAとサブユニットDのFU-gがサブユニット間でFU-gダイマーを形成する(Fig. 7c, d)。したがって、内部領域の襟様ドメインは隣接するプレート状サブユニット2量体間の相互作用を強くしていると考えられる。分子あたり10個のFU-gが5つのプレート状サブユニット2量体の間でFU-gダイマーを5個形成し、シリンダー状分子の内腔の片側に偏り、 C_5 対称性を持って配置している⁸⁾(Fig. 7a)。以上のことから、タイプ3分子は D_5 対称性の外壁構造と、シリンダーの一方の端に C_5 対称性で配列した5つの襟様ドメインを持つ。

タイプ4 (イカ-タイプ)

タイプ4は頭足類のイカのHcである。タイプ4分子は10量体で、そのサブユニットは7個のFU (FU-a, -b, -c, -d, -e, -f, -g) と、additional FUであるFU-d*を含んでいる。FU-d*はN末端側から5番目に位置しており、サブユニット内のFU配列はFU-a, -b, -c, -d, -d*, -e, -f, -gである (Fig. 1d)。すなわち、サブユニットのうち外壁領域に位置するFU-a, -b, -c, -d, -e, -fの中にFU-d*が追加されており、タイプ1~3のようにN末端のFU-a~fまでの連続したFUが外壁領域に、C末端に位置するFUが内部領域に位置するのは異なる配列となっている。

このような例外的なFU配列とFU-d*の追加が10量体分子の構造にどのように影響しているのかを明らかにするためには、タイプ4分子の構造解析研究は極めて重要な意味を持つ。タイプ4のスルメイカHcの構造は3.0Å分解能のX線結晶構造解析によって決定した (PDB ID: 4YD9)¹⁷⁾。この結晶構造により、FU-a, -b, -c, -d, -e, -fからなるD₅対称の外壁領域の詳細な構造を明らかにすることができた。一方、この結晶構造においてFU-d*と-gからなる内部領域には疑似D₅の対称性が見られたものの分解能が低く、後にD₅構造は誤りであることに気づいた。そ

こで、内部領域構造を決定するために、クライオEM観察を行い、プログラムSPHIRE³²⁾ (高分解能電子顕微鏡用スパークス) のユーザーファンクションを用いた非対称性複合体の単粒子解析のための精密化プロトコルによって、スルメイカHcの10量体分子全体の詳細構造解明に成功した¹⁹⁾。

この構造によると、外壁領域は他のタイプと同じD₅対称性の構造で、内部領域は特徴的な非対称構造をとっている (Fig. 8)。内部領域の構造に注目すると、10個のFU-gはFU-gダイマーを形成するが、特徴的なことに、5個のFU-gダイマーは内腔の上下にジグザグに配置しているため、1番目と5番目のFU-gダイマーは上下の同じ側に隣接して配置することとなり、結果として内部領域は非対称構造をとる (Fig. 8b, c)。このタイプに特徴的なadditional FUであるFU-d*も内部領域に配置しているが、FU-d*はFUダイマーを形成せず、FU-gダイマーの位置とは反対側にできた空間を埋めるように配置している (Fig. 8b, c)。

次に、10個あるサブユニットの構造を比較すると、それらは同一ではないことがわかった。サブユニット内のFU-gとFU-d*はそれぞれ2種類のコンフォメーションをとるため、結果とし

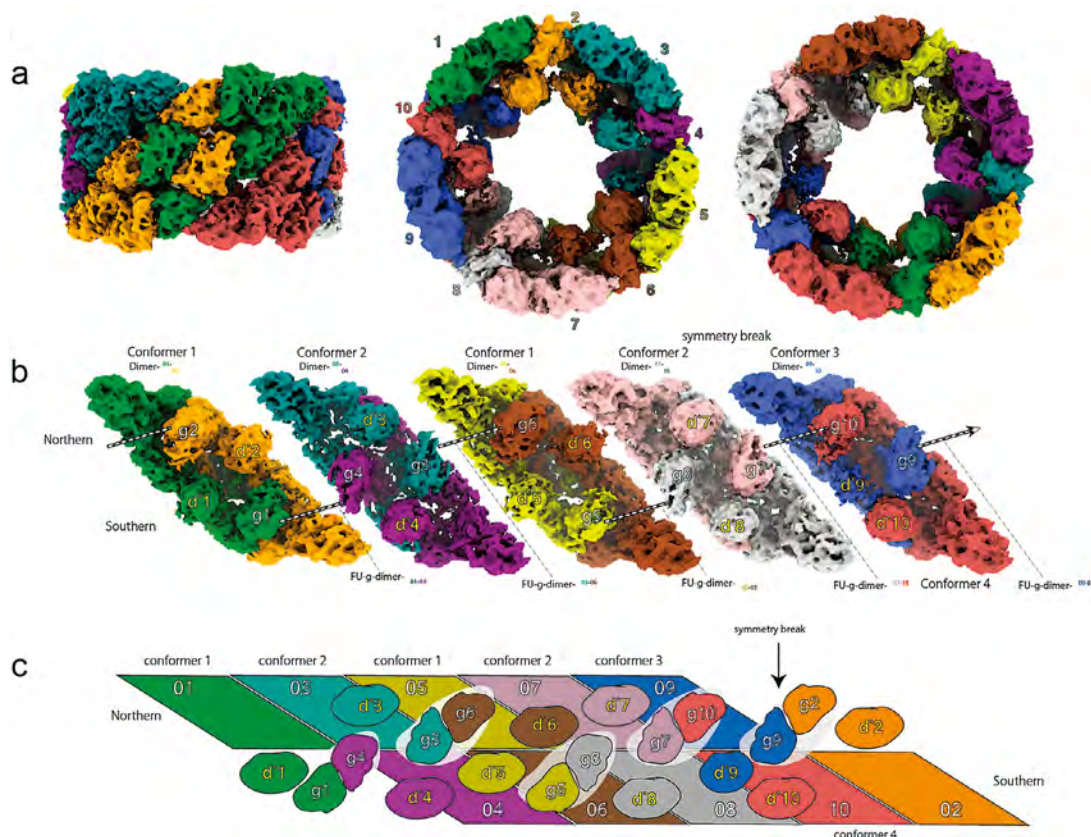


Fig. 8 Type 4 hemocyanin. **a** Cryo-EM structure of squid hemocyanin in lateral, top, and bottom views. The ten subunits are highlighted in color. **b** Five subunit dimers viewed from inside the cylinder. Colors correspond to those of **(a)**. FUs of the inner collar (g and d*) are indicated. FU-gs forming FU-g dimers are indicated. **c** Schematic of the decameric assembly shown with the cylinder unrolled and shown from the inside. FU-g dimers are highlighted by the surrounding white background. Colors of each subunit correspond to those of **(a)** and **(b)**. The arrow indicates the region of the symmetry break. Reprinted from Tanaka et al.¹⁹⁾, with permission.

てサブユニットには4種類のコンフォーマーが存在する。4種のコンフォーマーの一次配列は同じであるものの、FU-d*とFU-gの位置が異なる (Fig. 8b, c)。コンフォーマーの分類をFig. 8cに示すが、サブユニット1, 2, 5, 6はコンフォーマー1, サブユニット3, 4, 7, 8はコンフォーマー2に分類される。サブユニット9と10は特徴的なコンフォメーションをしており、それぞれコンフォーマー3とコンフォーマー4に分類される。10量体には、コンフォーマー1が4個、コンフォーマー2が4個、コンフォーマー3と4がそれぞれ1個ずつ含まれている。コンフォーマー1および2のサブユニットは同じコンフォーマーどうしでホモダイマーを形成するが、コンフォーマー3と4は互いに会合しヘテロダイマーを形成する (Fig. 8b)。すなわち、分子は [コンフォーマー1のホモダイマー] - [コンフォーマー2のホモダイマー] - [コンフォーマー1のホモダイマー] - [コンフォーマー2のホモダイマー] - [コンフォーマー3と4のヘテロダイマー] の順番で配置して、10量体を構築している。このため、タイプ4分子は非対称で複雑な内部領域構造と、それを取り囲むD₅外壁領域から成る特徴的なシリンダー形10量体となる。

結合糖鎖

軟体動物 Hc には結合糖鎖が存在する。いくつかのFUの1次配列にはN-型糖鎖結合のコンセンサス配列 - すなわち Asn-X-Ser または Thr (XはPではない) が見られる^{17, 29, 30, 33, 34}。タイプ4のスルメイカ Hc の1次配列を見ると、FU-a, -b, -d, -d*, -eに7つのコンセンサス配列が存在し、このうちFU-dおよびFU-d*にはコンセンサス配列が2箇所存在する。この分子の結晶構造において糖鎖結合位置を同定したところ、1次配列上に見られるコンセンサス配列のうちFU-a, -b, -d, -eにある5つの配列には糖鎖が結合していること、分子あたりの結合糖鎖数は50であることが明らかとなった。糖鎖結合したFUはすべて外壁領域に位置しており、結晶構造においてもすべての糖鎖は外壁の表面に存在している。糖鎖結合したFUはCTDの同一位置に糖鎖が結合しており、FU-dは加えてNTD上にも糖鎖が結合している (Fig. 9a)。一方、FU-d*もまたFU-dと同様の部位に2つのコンセンサス配列を持つが、結晶構造では内部領域に

糖鎖は観察されなかったため、FU-d*には糖鎖は結合していないと考えられる^{29, 35}。10量体分子上の糖鎖結合部位を見ると、外壁領域において3つのサブユニットの境界部分にすべての糖鎖は位置し、糖鎖クラスターを形成していた (Fig. 9b)。このことから、結合糖鎖は外壁領域を介してプレート状サブユニット2量体間の相互作用を強化していることが示唆される。頭足類 Hc において、ほとんどの糖鎖結合部位は保存されており、タイプ3のタク Hc はタイプ4と同じ5つの糖鎖結合部位が保存され、同じくタイプ3のオウムガイ Hc は4つの糖鎖結合部位が保存されている。腹足類 Hc は2つの糖鎖結合部位を持ち、タイプ1のKLHのクライオEM構造では、外壁領域の表面だけでなく、シリンダー構造の周縁部にも結合糖鎖が確認されている⁷。タイプ1分子において、結合糖鎖は10量体が2個以上積み重ならないための立体障害として働くのかもしれない。

生化学実験において、サブユニットから結合糖鎖を除去すると10量体分子の会合が阻害されることが示されている。スルメイカ Hc から単離したサブユニットはCa²⁺などの2価カチオン存在下で10量体に再会合するが、グリコシダーゼ処理を施した脱グリコシルサブユニットは再会合できなかった^{17, 30}。この脱グリコシル化による10量体形成阻害は、結合糖鎖が分子会合に重要な役割を果たすことを示唆している。また、スルメイカ Hc にグルコースを添加すると10量体分子の解離が認められた¹⁷。これは、添加したグルコースが外壁領域における結合糖鎖どうしの相互作用を競合阻害するためかもしれない。同様の現象は、環形動物の巨大Hbでも報告されており、GalNAcの存在下で巨大Hbはより小さなユニットに解離し、巨大Hbの脱グリコシル化によって再会合は抑制された³⁶。細胞外酸素運搬タンパク質である軟体動物 Hc と巨大Hbに共通する「carbohydrate gluing」があることは大変興味深い。

糖鎖結合はサブユニット間相互作用のみならず、酸素の結合解離におけるアロステリック効果にも寄与すると考えられている。Zhangらは、タイプ1分子であるトコブシ Hc の外壁領域上にある3つのサブユニットの界面面に位置する4つのFUに注目し、これらFUがアロステリック効果に参与する「コミュニケーションクラスター」を形成していることを報告した¹⁶。スルメイカ Hc の結晶構造では、これら4つのFUの間におい

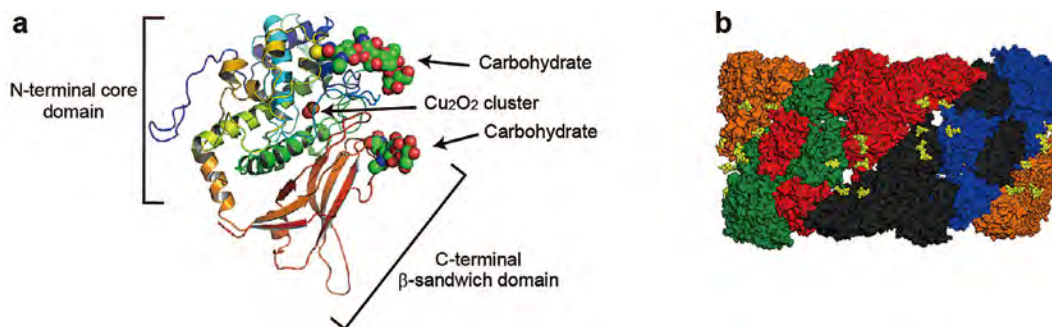


Fig. 9 Glycosylation of type 4 hemocyanin. **a** Representative ribbon diagram of FU-d with two carbohydrate chains. Reprinted from Gai et al.¹⁷. **b** Carbohydrate clusters. Carbohydrate chains are represented as yellow spheres. Each protomer is illustrated as an individual color.

糖鎖クラスターが形成されており、さらに2つの結合糖鎖がコミュニケーションクラスター中に配置していることが明らかになった¹⁷⁾。これらの情報は、Hcの結合糖鎖が分子構造の安定化とともに、アロステリック効果においても重要な役割を担っていることを示唆している。

分子進化

Hcは、腹足類、頭足類、多板類など、軟体動物の幅広い種に存在する。系統分類上、多板類は腹足類や頭足類の上流に位置する³⁷⁻⁴⁰⁾。腹足類の出現はカンブリア紀初期であり、メガヘモシアニンを持つ生物、例えば *Melanoides tuberculata* はタイプ1Hcを持つ生物よりも後に出現したと考えられている²⁵⁾。頭足類はオウムガイ亜綱と蛸形亜綱に分岐し、このうち前者に属するオウムガイは生きた化石と呼ばれ、系統図上は最も原始的な頭足類であるアンモナイト亜綱に近い。蛸形亜綱の十腕形上目(イカ類)は八腕形上目(タコ類)から分岐している⁴¹⁾。

軟体動物Hcをサブユニット組成と分子構造によって、タイプ1(KLHタイプ)、タイプ2(メガヘモシアニン)、タイプ3(オウムガイタイプ)、タイプ4(イカタイプ)に分類した。また、例外的なHcとして、polyplacophora Hcはタイプ1と同じFUで構成されたサブユニットであるにも関わらず、20量体ではなく10量体分子を形成することを前述した²³⁾。この分子構造の詳細は決定されていないものの、10量体構造はタイプ1の20量体を構成する10量体部分と同一であり、典型的な腹足類Hcの仲間と考えられている。

腹足類Hcの進化において、主にサブユニットとFUの会合が起こったものと考えられる。もっとも原始的なHcからタイプ1Hcが出現する際には、FUの構造に変化を伴わずに、20量体への会合が起こった。その後出現したタイプ2のメガヘモシ

アニンは、さらにサブユニットの多量化が起きて30量体への会合が起こった。メガヘモシアニンは、タイプ1のサブユニットのFU-gと-hの代わりにadditional FU(FU-f1, -f2, -f3, -f4, -f5, -f6)を6つ持つメガサブユニットを獲得し、進化したものと考えられる。Additional FU-f1-6からなる内部領域はシリンダー分子の空洞部分を完全に塞ぐことで10量体どうしの相互作用を強くしたと考えられる。興味深いことに、原始型、タイプ1、タイプ2のHcはいずれも基本的な8個のFUを構成要素として分子構築している。つまり、腹足類Hcの進化過程でFUの欠損は起きていない。

頭足類のHcの進化において、原始型Hcからタイプ3(オウムガイタイプ)にかけて基本的なFUのうちFU-hが欠損し、次いで、タイプ3からタイプ4(イカタイプ)にかけてFU-d*を獲得した。頭足類Hcの進化過程では、腹足類の進化で見られたようなサブユニットの多量化は起きていない。サブユニットのアミノ酸配列に基づいた、4つのタイプの軟体動物Hc分子の系統樹をFig. 10に示す(Fig. 10)。系統樹はまず3つに分岐し、第1枝はタイプ1、第2枝はタイプ2、第3枝は頭足類Hcが入る。第3枝はさらに分岐し、タイプ3のオウムガイHcとタコHcに分かれ、タコHcはさらにタイプ4に分岐する。タイプ3は、原始型HcからFU-hを欠損して進化し、FU-hがないため、内部領域構造はシリンダーの内腔に収まることとなった。続いて、FU-d*の獲得によってタイプ3からタイプ4への進化がもたらされた。新規に獲得したFU-d*はサブユニットのC末端ではなく、外壁領域を構成するFU配列の中に、すなわちFU-dとFU-eの間に配置している⁴²⁾。FU-d*の獲得は内部領域の構造再編と最適化に大きな影響を与えたが、一方、外壁領域の構造には影響しなかった。

ここで、C₅対称構造のタイプ3分子から非対称構造のタイプ

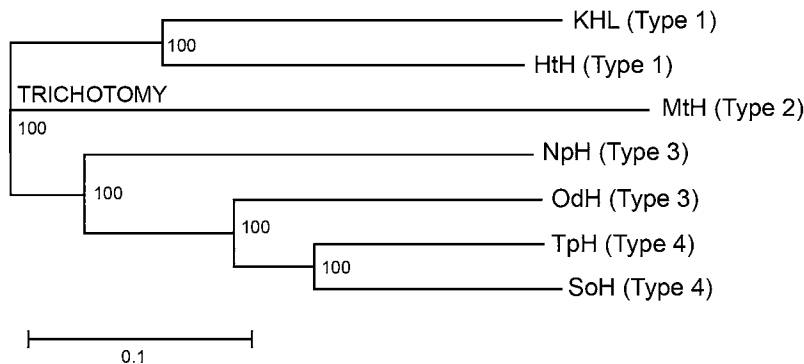


Fig. 10 Phylogenetic tree of molluscan hemocyanins. The phylogram was constructed with ClustalW2.1 using the neighbor-joining method based on the amino acid sequences. KLH (Keyhole limpet hemocyanin [DDBJ: AJ698341]) and HtH (*Haliotis tuberculata* hemocyanin [DDBJ: AJ252741]) are type 1, MtH (*Melanoides tuberculata* hemocyanin [DDBJ: KC405576]) is type 2, NpH (*Nautilus pompilius* hemocyanin [DDBJ: AJ619741]) and OdH (*Enterocotopus dofleini* hemocyanin [DDBJ: AY751301]) are type 3, and TpH (*Todarodes pacificus* hemocyanin [DDBJ: AB897790]) and SoH (*Sepia officinalis* hemocyanin [DDBJ: DQ388569]) are type 4. Bootstrap values are given at the nodes. Scale bar, 0.1 expected changes per site. Reprinted from supporting figure of Tanaka et al.¹⁹⁾, with permission.

4分子への進化モデルを提案する (Fig. 11). ステップ (i) において, タイプ3分子が遺伝子重複によってFU-d*を獲得する. 獲得したFU-d*はコンフォーマー1および2の熱力学的に安定な部位に取り込まれる. ステップ (ii) において, FU-d* どうし

の立体反発により, サブユニット2量体はそれぞれのサブユニットに解離する. ステップ (iii) において, 解離した各サブユニットが自発的に再会合することで, コンフォーマー1とコンフォーマー2がそれぞれホモダイマーを形成し, 立体反発を避けるた

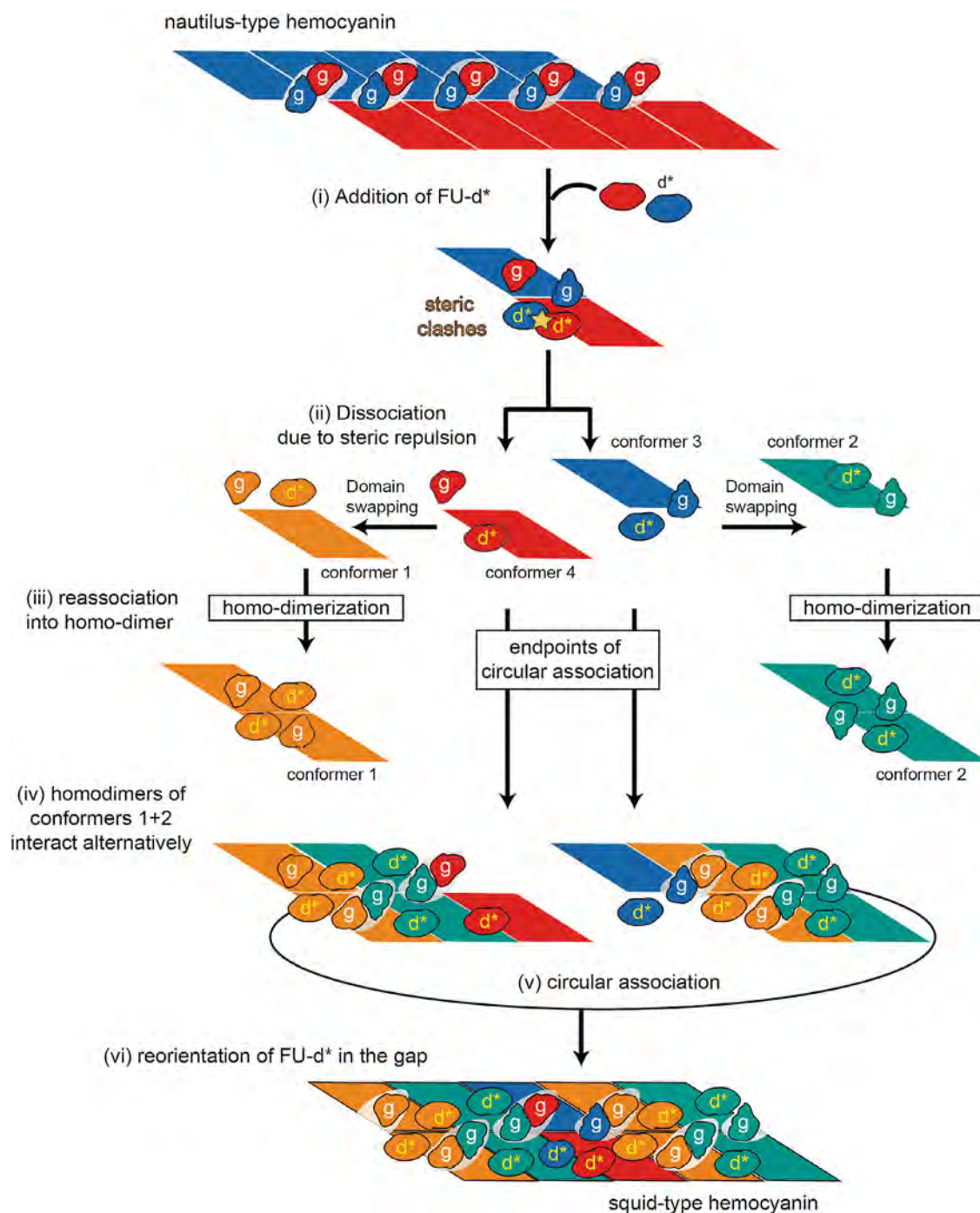


Fig. 11 Model for the evolution from type 3 to type 4 hemocyanin. Step (i) type 3 hemocyanin acquired FU-d* by gene duplication during evolution. FU-d* are entrapped on the sites that are thermodynamically stable, which correspond to FU-d* sites of conformers 1 and 2. Step (ii) Due to steric repulsion between FU-d*s, subunit dimers favor dissociation to monomers. Step (iii) Each dissociated monomer re-associates to form a homodimer, wherein domain swapping occurs to avoid steric repulsion. Step (iv): Homodimers assemble circularly. Step (v) The dissociated monomers bind between the terminal subunits to close the circular association. Step (vi) FU-d*s rearrange to avoid steric repulsions and a hetero-subunit dimer is formed, which closes the circle. Reprinted from Tanaka et al. ¹⁹⁾, with permission.

めにドメインスワップが行われる。ステップ (iv) において、コンフォーマー1のホモダイマーとコンフォーマー2のホモダイマーが交互に2つずつ配列する。ステップ (v) において、(ii)で解離したモノマーのサブユニットが (iv) の両端のサブユニットに結合し、シリンダー形の会合が完成する。最後のステップの (vi) において、FU-d* が立体反発を避けるように再配置し、コンフォーマー3と4でヘテロサブユニット2量体を形成し、シリンダーの両端を完全に閉じる。

生理機能

イカは飼育が難しい生物で、人工的な飼育環境で長生きすることが難しい。水温と水質を一定に保ち、溶存酸素を飽和レベルに保ち、老廃物を除去した水質管理下においても、スルメイカの生存期間は数日間にすぎない。スルメイカが飼育中にどのように衰弱して死亡するのか、その病態を調べたところ、血リンパ液中の Hc 分子の生体内解離がその死亡原因に関与していることが明らかになった^{30,43}。飼育中に衰弱した個体の血リンパ液を TEM で観察すると、Hc の 10 量体分子のサブユニットオリゴマーあるいはサブユニットへの解離が認められた (Fig. 12b)。また、飼育前後で血リンパ液中の Hc 濃度を比較したと

ころ、飼育個体では血リンパ液中の Hc 濃度が低下していることが確認された (Fig. 12c)。生体内で Hc の 10 量体分子構造が崩壊すると、タンパク質分解が促進され、血リンパ液中 Hc 濃度の低下を引き起こすことが推察された。さらに Hc 濃度低下が原因となり、酸素運搬能に障害をきたし、循環不全を引き起こし死に至ったものと推測した。このことから、軟体動物では、Hc の生体内分解を防ぐ、つまり生体内で Hc 分子構造を保持することが健康維持に重要だと考えられる。節足動物である大西洋カブトガニ *Limulus polyphemus* においても、飼育中に血リンパ液中の Hc 濃度の低下が起こることが報告されている⁴⁴。

軟体動物 Hc の生理機能について、酸素結合能に関する詳細な情報は限られており、巻貝の1種のロコガイ *Concholepas concholepas* の Hc の酸素結合の協同性と親和性に関する報告がある⁴⁵。

おわりに

軟体動物の Hc が発見されたのは約 130 年前であり、その生化学的、構造生物学的研究は長い問困難を極めていたが、ここ 10 年ほどの間に、構造生物学的に大きな進展があった。Zhang らは、タイプ 1 分子のクライオ EM 構造を高分解能で解析し

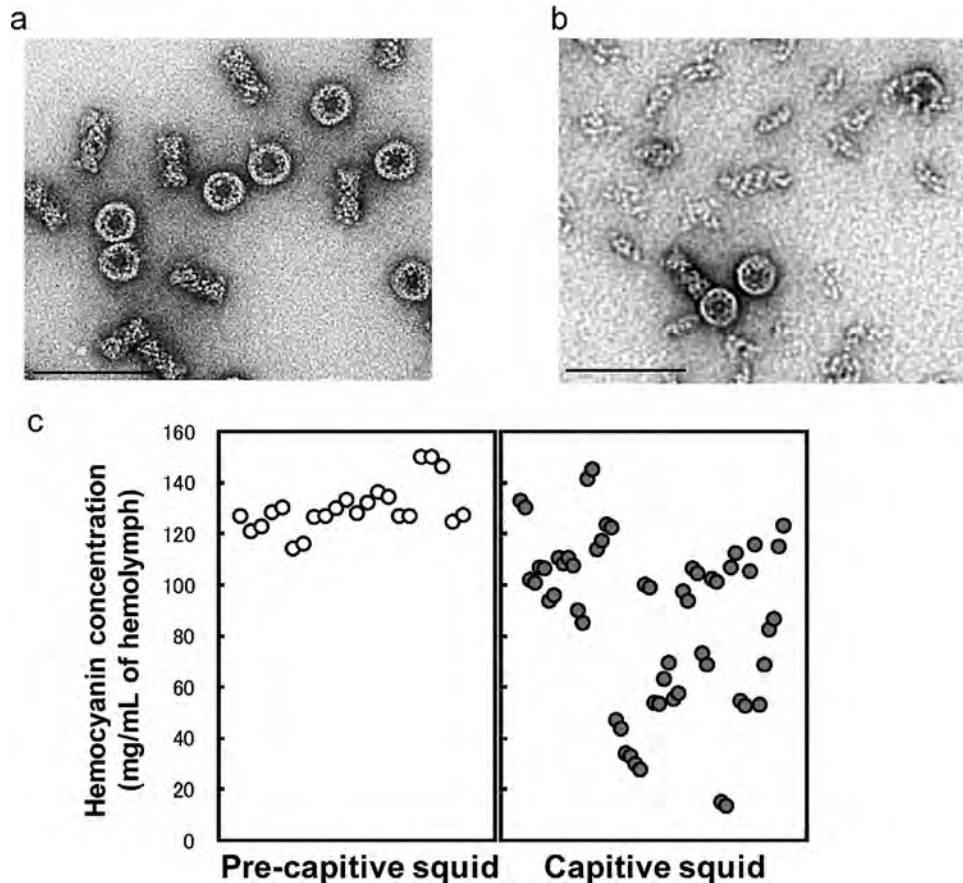


Fig. 12 *In vivo* dissociation and reduction of hemolymph hemocyanin of squid *T. pacificus*. **a, b** TEM image of hemocyanin in hemolymph from **(a)** healthy animal and **(b)** weakened animal after captive test. **c** hemolymph collected from pre-captive animal (54 animals) and captive animal for three days (42 animals).

た¹⁶⁾。Gaiらは、軟体動物 Hc として初の結晶構造となるタイプ 4 分子の結晶構造解析に成功した¹⁷⁾。この高分解能の結晶構造から、シリンダー形分子の外壁領域の構造を明らかにすることができたが、内部領域の構造は不明瞭で、FU-g と FU-d* のトポロジーも不明であった。Tanaka らは、非対称複合体の構造を精密化するために設計されたプロトコルを用いて、内部領域構造の解明に取り組み、タイプ 4 分子の非対称な内部領域と 10 量体分子全体の構造解明に成功した¹⁹⁾。これらの構造研究は、軟体動物 Hc の生化学的研究にブレークスルーをもたらしたといえる。現在、筆者は軟体動物 Hc の生理機能研究を進めており、本稿で述べた分子構造情報をもとに、Hc の機能と構造に関する知見が得られることが期待される。

謝辞

スルメイカ Hc のクライオ EM 構造解析にご協力頂きましたマックスプランク分子生理学研究所 Christos Gatsogiannis 博士に心より感謝致します。

引用文献

- 1) 沼本修孝, 中川太郎, 福本義宏, 三木邦夫. 巨大ヘモグロビンの構造と機能. 人工血液 2009; 16: 188-199.
- 2) Numoto N, Nakagawa T, Kita A, Sasayama Y, Fukumori Y, Miki K. Structure of an extracellular giant hemoglobin of the gutless beard worm *Oligobranchia mashikoi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005; 102: 14521-14526.
- 3) Numoto N, Nakagawa T, Kita A, Sasayama Y, Fukumori Y. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of extracellular giant hemoglobin from pogonophoran *Oligobranchia mashikoi*. Biochim. Biophys. Acta. 2005; 1750: 103-117.
- 4) Markl J. Evolution of molluscan hemocyanin structures. Biochimica et biophysica acta. 2013; 1834: 1840-1852.
- 5) Boisset N, Mouche F. *Sepia officinalis* hemocyanin: A refined 3D structure from field emission gun cryoelectron microscopy. Journal of molecular biology 2000; 296 (2): 459-472.
- 6) Gatsogiannis C, Hofnagel O, Markl J, Raunser S. Structure of mega-hemocyanin reveals protein origami in snails. Structure 2015; 23: 93-103.
- 7) Gatsogiannis C, Markl J. Keyhole limpet hemocyanin: 9-A CryoEM structure and molecular model of the KLH1 dodecamer reveal the interfaces and intricate topology of the 160 functional units. Journal of molecular biology 2009; 385 (3): 963-983.
- 8) Gatsogiannis C, Moeller A, Depoix F, Meissner U, Markl J. *Nautilus pompilius* Hemocyanin: 9 Å Cryo-EM Structure and Molecular Model Reveal the Subunit Pathway and the Interfaces between the 70 Functional Units. Journal of molecular biology 2007; 374 (2): 465-486.
- 9) Lamy J, You V, Taveau JC, Boisset N, Lamy JN. Intramolecular localization of the functional units of *Sepia officinalis* hemocyanin by immunoelectron microscopy. Journal of molecular biology 1998; 284 (4): 1051-1074.
- 10) Meissner U, Dube P, Harris JR, Stark H, Markl J. Structure of a molluscan hemocyanin dodecamer (HtH1 from *Haliothis tuberculata*) at 12 Å resolution by cryoelectron microscopy. Journal of molecular biology 2000; 298 (1): 21-34.
- 11) Zhu H, Zhuang J, Feng H, Liang R, Wang J, Xie L, Zhu P. Cryo-EM structure of isomeric molluscan hemocyanin triggered by viral infection. PLoS One 2014; 9: e98766.
- 12) Cuff ME, Miller KI, van Holde KE, Hendrickson WA. Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin. Journal of molecular biology 1998; 278 (4): 855-870.
- 13) Jaenicke E, Büchler K, Markl J, Decker H, Barends TRM. Cupredoxin-like domains in haemocyanins. Biochemical Journal 2010; 426 (3): 373-378.
- 14) Jaenicke E, Buchler K, Decker H, Markl J, Schroder GF. The refined structure of functional unit h of keyhole limpet hemocyanin (KLH1-h) reveals disulfide bridges. IUBMB life 2011; 63 (3): 183-187.
- 15) Perbandt M, Guthöhrlein EW, Rypniewski W, Idakieva K, Stoeva S, Voelter W, Genov N, Betzel C. The structure of a functional unit from the wall of a gastropod hemocyanin offers a possible mechanism for cooperativity. Biochemistry 2003; 42 (21): 6341-6346.
- 16) Zhang Q, Dai X, Cong Y, Zhang J, Chen DH, Dougherty MT, Wang J, Ludtke SJ, Schmid MF, Chiu W. Cryo-EM structure of a molluscan hemocyanin suggests its allosteric mechanism. Structure 2013; 21 (4): 604-613.
- 17) Gai Z, Matsuno A, Kato K, Kato S, Khan M, Shimizu T, Yoshioka T, Kato Y, Kishimura H, Kannno G, Miyabe Y, Terada T, Tanaka Y, Yao M. Crystal structure of the 3.8 MDa respiratory supermolecule hemocyanin at 3.0 Å resolution. Structure 2015; 23: 2204-2212.
- 18) Matsuno A, Gai Z, Tanaka M, Kato K, Kato S, Katoh T, Shimizu T, Yoshioka T, Kishimura H, Tanaka Y, Yao M. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of a 3.8-MDa respiratory supermolecule hemocyanin. Journal of structural biology 2015; 190: 379-382.
- 19) Tanaka Y, Kato S, Stabrin M, Raunse S, Matsui T, Christos G. Cryo-EM reveals the asymmetric assembly of squid hemocyanin. IUCrJ 2019; 6: 426-437.
- 20) Lieb B, Altenhein B, Markl J. The sequence of a gastropod hemocyanin (HtH1 from *Haliothis tuberculata*). The Journal of biological chemistry 2000; 275 (8): 5675-5681.
- 21) Lieb B, Markl J. Evolution of molluscan hemocyanins as deduced from DNA sequencing. Micron 2004; 35 (1-2): 117-119.
- 22) Altenhein B, Markl J, Lieb B. Gene structure and hemocyanin

- isoform HtH2 from the mollusc *Haliotis tuberculata* indicate early and late intron hot spots. *Gene* 2002; 301 (1-2): 53-60.
- 23) Harris JR, Meissner U, Gebauer W, Markl J. 3D reconstruction of the hemocyanin subunit dimer from the chiton *Acanthochiton fascicularis*. *Micron* 2004; 35 (1-2): 23-26.
 - 24) Lambert O, Boisset N, Taveau JC, Lamy JN. Three-dimensional reconstruction from a frozen-hydrated specimen of the chiton *Lepidochiton sp.* hemocyanin. *Journal of molecular biology* 1994; 244 (5): 640-647.
 - 25) Lieb B, Gebauer W, Gatsogiannis C, Depoix F, Hellmann N, Harasewych MG, Strong EE, Markl J. Molluscan mega-hemocyanin: an ancient oxygen carrier tuned by a ~550 kDa polypeptide. *Frontiers in zoology* 2010; 7: 14.
 - 26) Miller KI, Van Holde KE, Toumadje A, Johnson Jr WC, Lamy J. Structure and function of the carboxyl-terminal oxygen-binding domain from the subunit of *Octopus dofleini* hemocyanin. *Biochemistry* 1988; 27 (19): 7282-7288.
 - 27) Bergmann S, Lieb B, Ruth P, Markl J. The hemocyanin from a living fossil, the cephalopod *Nautilus pompilius*: protein structure, gene organization, and evolution. *Journal of molecular evolution* 2006; 62 (3): 362-374.
 - 28) Miller KI, Schabtach E, van Holde KE. Arrangement of subunits and domains within the *Octopus dofleini* hemocyanin molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 87 (4): 1496-1500.
 - 29) Thonig A, Oellermann M, Lieb B, Mark F. A new haemocyanin in cuttlefish (*Sepia officinalis*) eggs: sequence analysis and relevance during ontogeny. *Evodevo* 2014; 6.
 - 30) Kato S, Matsui T, Gatsogiannis C, Tanaka Y. Molluscan hemocyanin: structure, evolution, and physiology. *Biophysical Reviews* 2018; 10: 191-202.
 - 31) Meissner U, Gatsogiannis C, Moeller A, Depoix F, Harris JR, Markl J. Comparative 11 Å structure of two molluscan hemocyanins from 3D cryo-electron microscopy. *Micron* 2007; 38 (7): 754-765.
 - 32) Moriya T, Saur M, Stabrin M, Merino F, Voicu H, Huang Z, Penczek PA, Raunser S, Gatsogiannis C. High-resolution single particle analysis from electron cryo-microscopy images using SPHIRE. *J Vis Exp.* 2017; 123: e55448.
 - 33) Stoeva S, Idakieva K, Betzel C, Genov N, Voelter W. Amino acid sequence and glycosylation of functional unit Rth2-e from *Rapana thomasiana* (gastropod) hemocyanin. *Archives of biochemistry and biophysics* 2002; 399: 149-158.
 - 34) Stoeva S, Schutz J, Gebauer W, Hunds dorfer T, Manz C, Markl J, Voelter W. Primary structure and unusual carbohydrate moiety of functional unit 2-c of keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Biochimica et biophysica acta* 1999; 1435 (1-2): 94-109.
 - 35) Gielens C, De Geest N, Compennolle F, Préaux G. Glycosylation sites of hemocyanins of *Helix pomatia* and *Sepia officinalis*. *Micron* 2004; 35 (1): 99-100.
 - 36) Ebina S, Matsubara K, Nagayama K, Yamaki M, Gotoh T. Carbohydrate gluing, an architectural mechanism in the supramolecular structure of an annelid giant hemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 92: 7367-7371.
 - 37) Scheltema A. *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca*. Oxford Univ. Press, Oxford 1996; 53-85.
 - 38) Salvini-Plawen L, Steiner G. *Origin and Evolutionary Radiation of the Mollusca*. Oxford Univ. Press, Oxford 1996; 29-51.
 - 39) Waller T. *Bivalves: An Eon of Evolution*. Univ. Calgary Press 1998; 1-45.
 - 40) Smith S, Wilson N, Goetz F, Feehery C, Andrade S, Rouse G, Giribet G, Dunn C. Resolving the evolutionary relationships of molluscs with phylogenomic tools. *Nature* 2011; 480: 364-367.
 - 41) Kröger B, Vinther J, Fuchs D. Cephalopod origin and evolution: a congruent picture emerging from fossils, development and molecules. *Bioessays* 2011; 33: 602-613.
 - 42) Mouche F, Boisset N, Lamy J, Zal F, Lamy JN. Structural comparison of cephalopod hemocyanins: Phylogenetic significance. *Journal of structural biology* 1999; 127 (3): 199-212.
 - 43) 吉岡武也, 加藤早苗, 岡本昭. III-3. イカ類の活魚出荷を目的とした短期蓄養技術. 福田裕, 渡部終五編. 沿岸漁獲物の高品質化—短期蓄養と流通システム—水産学シリーズ No. 173 東京: 恒星社厚生閣, 2012; 114-119.
 - 44) Coates CJ, Bradford E, Krom C, Nair J. Effect of temperature on biochemical and cellular properties of captive *Limulus polyphemus*. *Aquaculture* 2012; 334-337: 30-38.
 - 45) González A, Nova E, Del Campo M, Manubens A, De Ioannes A, Ferreira J. The oxygen-binding properties of hemocyanin from the mollusc *Concholepas concholepas*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2017; 1865 (12): 1746-1757.

アルブミンのポリスルフィドによる新たな生体恒常性維持機構

A Novel Homeostatic Mechanism via Albumin Polysulfides

異島 優^{1,*}, 小田切 優樹², 石田 竜弘¹

Yu Ishima, Masaki Otagiri, Tatsuhiro Ishida

和文抄録

近年、R-SSS-HやR-SSS-R'といった硫黄カテナーション（硫黄が鎖状に連結した）構造を有する分子である「超硫黄分子」が注目されている。この超硫黄分子はヒト生体内にも存在し、システイン tRNA 合成酵素によりタンパク質翻訳時に硫黄カテナーション構造（ポリスルフィド）が導入される。興味深いことにこの超硫黄分子は、求核性と求電子性を併せ持ち、抗酸化活性やシグナル伝達活性などの多彩な生理作用を示す。細胞内の還元環境下では、主にR-SSS-Hのような「還元型」ポリスルフィドとして存在しており、アルキル還元法などによりその検出が行われてきた。一方で、R-SSS-R'のような「酸化型」ポリスルフィドはその検出法の欠如が研究の足枷になっていた。そのような中、我々は「酸化型」ポリスルフィド定量法を開発し、アルブミンなどの血清タンパク質中に「酸化型」ポリスルフィドが含まれていることを世界に先駆けて明らかにした。アルブミンのシステイン残基数とその位置は、多くの動物種間で高度に保存されており、17対のCys-Cys架橋構造は全てジスルフィド結合を形成していると長年信じられていたが、我々の報告はこの17対のジスルフィド架橋構造の中にポリスルフィド架橋構造が存在することを意味している。本稿では、このポリスルフィド架橋によるユニークな抗酸化作用機序や酸化ストレス関連疾患との関連性について概説する。

Abstract

Recently, supersulfide, which contains a catenated sulfur structure, such as R-SSS-H and R-SSS-R', have received a lot of attention. The supersulfide exists in the human body and is synthesized during protein translation by cysteine tRNA synthetase. Interestingly, supersulfide has both nucleophilicity and electrophilicity, and exhibits various physiological effects such as antioxidant and signal transduction activities. At the GSH-rich intracellular environment, it exists mainly as a "reduced" supersulfide such as R-SSS-H, and its detection has been performed by methods such as protein persulfide detection protocol. On the other hand, detection methods for "oxidized" supersulfide such as R-SSS-R' were not well established. Thus, we have developed a method for quantifying "oxidized" supersulfide and have clarified that Cys-Cys bridges in albumin molecule contain "oxidized" supersulfide, forming a polysulfide bridge. Previously, some Cys-Cys bridges structures of albumin have been reported to have redox action, and if this crosslinked structure is a polysulfide bridge, it can be fully understood. In this review, we will review the unique mechanism of antioxidant action by this polysulfide bridge and its relationship with pathology like oxidative stress-related disease. (179 words)

Keywords

Albumin, Supersulfide, Antioxidative, Cysteine, Polysulfide

¹ 徳島大学 大学院医歯薬学研究部

〒770-8505 徳島市庄町1-78-1 Department of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University, 1-78-1, Sho-machi, Tokushima 770-8505, Japan.

*E-mail: ishima.yuu@tokushima-u.ac.jp

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, Kumamoto 860-0082, Japan

論文受付 2022年7月31日 論文受理 2022年8月8日

1. 諸論 アルブミンの構造・生理機能と超硫黄化

ヒト血清に最も多く存在するアルブミンは、585個のアミノ酸残基からなる約66.5kDaの単純タンパク質であり、35個のシステイン(Cys)残基を有する。これらCys残基の大部分は還元型SH基ではなく酸化型として存在しており、17対のCys-Cys架橋構造を形成している(図1A)。この高度なCys-Cys架橋構造は、9つのループ構造を作り出し、アルブミンのリガンド結合ポケットの形成や構造安定化に大きく関与している。また、このアルブミンの生理機能としては、膠質浸透圧の維持やリガンド結合作用、抗酸化作用、エステラーゼ様作用など、マルチ機能タンパク質として古くから知られている。その生理機能の一つである抗酸化作用は、アルブミンの唯一の還元型Cys残基である³⁴Cysの寄与が多数報告されている一方で、³⁴Cys欠損変異体においてもアルブミンの抗酸化作用を完全に消失しないことから、他の残基の関与も示唆されていた¹⁾。加えて、³⁹²Cysと⁴³⁸CysのCys-Cys架橋構造に酸化還元触媒活性があること²⁾や、⁵⁵⁸Cysと⁵⁶⁷CysのCys-Cys架橋構造はシアンとの反応性を有すること³⁾など、通常のジスルフィド架橋構造では理解できない報告が相次いでいる。そこで我々は、アルブミンのCys-Cys架橋構造のレドックス制御機構に「酸化型ポリスルフィド架橋構造」が含まれるのではないかと仮説を立てた。

酸化型ポリスルフィドとは、R-SSnS-R'(n>1)の硫黄カテナーション(硫黄が鎖状に連結した)構造を有する「超硫黄分子」に分類される。この超硫黄分子はヒト生体内にも存在し、シス

테인 tRNA 合成酵素によりタンパク質翻訳時に硫黄カテナーション構造の導入が発見されて以降、求核性と求電子性を併せ持ち、抗酸化活性やシグナル伝達活性などの多彩な生理作用を示すことが、特に「還元型」ポリスルフィドにおいて相次いで報告されている⁴⁾。これには、細胞内の還元環境下では、主にR-SSS-Hのような「還元型」ポリスルフィドとして存在し、アルキル還元法などによりその検出が比較的容易であったことが考えられる。一方、「酸化型」ポリスルフィドの検出法はほぼ皆無であり、生体内の「酸化型」ポリスルフィドの存在すらほぼ不明なままであった。

2. 酸化型ポリスルフィドの測定系の構築とアルブミンの酸化型ポリスルフィド化の発見

硫化水素(H₂S)および硫化物イオン(S²⁻)の測定系に関しては、メチレンブルー法⁵⁾をはじめ、電極法、ビマン法、NEM法⁶⁾など、さまざまな定量法が確立されている。そのため、酸化型ポリスルフィドに含まれるサルフェン硫黄(S原子に挟まれた硫黄)を効率的かつ安定にS²⁻として溶媒中へ追い出すことができれば、H₂S測定法を用いて酸化型ポリスルフィドの定量が可能となる。我々は、酸化型ポリスルフィドが塩基性条件下で加水分解する特性を活かし、S²⁻の安定化剤としてアスコルビン酸を含むアルカリ還元法による酸化型ポリスルフィドの測定方法を世界に先駆けて開発し、Elimination Method for Sulfide from Polysulfide (EMSP)と命名した。

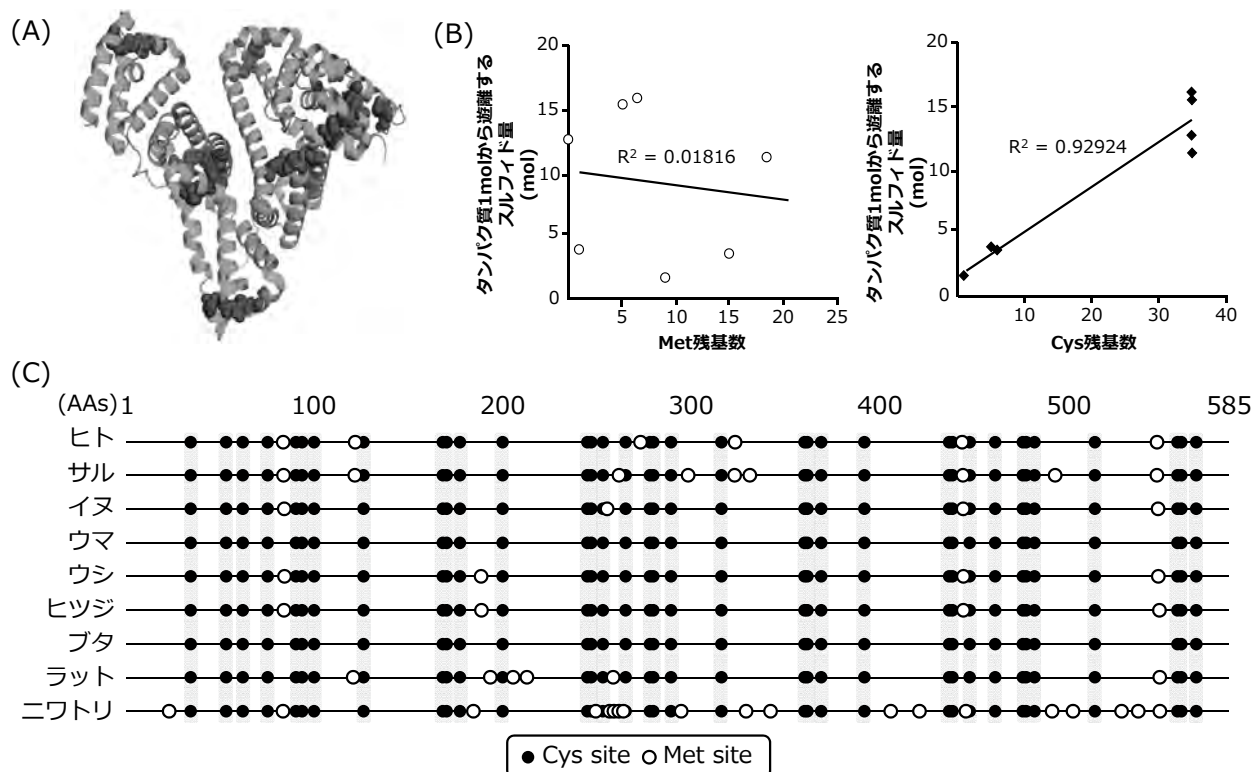


図1 EMSPによる様々なタンパク質の酸化型超硫黄定量と含硫黄アミノ酸残基数との相関 (A) アルブミンのX線結晶構造(PDB: 1BM0)。赤色はCys-Cys架橋構造、黄色は還元型Cys残基を示す。(B) 様々なタンパク質の含硫黄アミノ酸(MetおよびCys)残基数と酸化型超硫黄定量との相関。(C) 動物種アルブミンにおけるCys残基とMet残基の位置。

まずヒト血清から精製したアルブミンの酸化型ポリスルフィドを EMSP にて定量したところ、アルブミン1分子から約15分子ものスルフィドが遊離したことから、アルブミンは内因的に酸化型超硫黄を多量に保持していることが示唆された⁷⁾。未発表のデータではあるが、我々は質量分析 (MS) 解析からも複数の Cys-Cys 架橋構造がポリスルフィド結合を形成していることを突き止めている。含硫黄アミノ酸として Cys 以外にメチオニン (Met) が存在するが、様々なタンパク質中の酸化型ポリスルフィドの測定をした結果、酸化型ポリスルフィド含量は Met 残基数ではなく、Cys 残基数と高い相関があったことから、酸化型ポリスルフィドは主に Cys 側鎖に存在することが示唆された (図 1 B)。加えて、アルブミンのアミノ酸配列を様々な動物種間で比較してみると、Met 残基の位置と数は実に多様である一方で、Cys 残基の位置と数は完全に保存されていた (図 1 C)。このアルブミン分子上の Cys-Cys 架橋構造が動物種間で高度に保存されている進化論的な意味合いとして、アルブミン分子内に酸化型ポリスルフィドを効率的かつ安定に形成させるためであるならば、酸化型ポリスルフィドの生理学的意義の解明は極めて興味深い。

3. アルブミンの酸化型ポリスルフィド化とその生理学的意義

アルブミンにおける酸化型ポリスルフィド化の生理学的意義を解明するため、酸化型ポリスルフィドを特異的に除去したアルブミンの作製が必須であった。そこで、ポリスルフィド検出蛍光プローブである Sulfane Sulfur Probe (SSP) をポリスルフィド除去剤として用い、平均3分子の酸化型ポリスルフィドが減少したアルブミンを作製した。実際、酸化型ポリスルフィドのさらなる除去は可能であったが、同時にアルブミンの凝集化が認められたため、以後の実験には平均3分子の酸化型ポリスルフィドが減少したアルブミンをポリスルフィド除去アルブミンとした。まず、アルブミンの構造変化を円二色性スペクトルにて測定したところ、二次構造および三次構造に変化が観察され、ポリスルフィド除去により α ヘリックス含量の減少と Cys-Cys 架橋構造の変化が認められた (図 2 A, B)。データに

は示さないが、疎水領域探索プローブ Sypro orange を用いたタンパク表面の疎水性評価の結果、ポリスルフィド除去によりタンパク質分子表面に疎水面がより露出していることも明らかとなった。

上述したようなアルブミンの構造変化は、アルブミンのリガンド結合作用に影響を与える可能性がある。そこで、代表的な薬物結合サイトである Site I と Site II の結合活性を蛍光プローブ法で評価した結果、わずか3分子の酸化型ポリスルフィドを除去しただけにもかかわらず、Site II の薬物結合能が1/3まで低下していた (図 3 A)。興味深いことに、Site II の薬物結合能低下は、酸化や糖化反応時、また敗血症や肝疾患時にも認められており、「アルブミンに結合している酸化型ポリスルフィド」と「病態時に引き起こされるアルブミンの酸化や糖化」の間に密接な関連があることが示唆された^{8,9)}。そこで、酸化型ポリスルフィド除去アルブミンの抗酸化作用を評価したところ、アルブミンに結合している約15分子の酸化型超硫黄のうち、わずか3分子 (全体の20%程度) の酸化型ポリスルフィドを取り除いただけで過酸化水素 (H_2O_2) 消去活性は約50%、2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル消去活性は約65%にまで減少していた (図 3 B)。従来、アルブミンの抗酸化作用には唯一の還元型 SH 基を有する ³⁴Cys の関与が示唆されていたが、今回の結果は、アルブミンに結合している酸化型ポリスルフィドによる抗酸化作用の関与を初めて明らかにするものである。また、アルブミンに結合している酸化型ポリスルフィド15分子のうち、均一に抗酸化作用があるわけではなく、ごく一部の酸化型ポリスルフィドによって抗酸化作用を発揮している点は、非常に興味深い。現在、そのポリスルフィド結合部位の同定や抗酸化作用に寄与している酸化型ポリスルフィドの選択的測定系の構築を行っている。

ここまで述べてきたように、アルブミンに結合している酸化型ポリスルフィドは、アルブミンの構造やその安定性に影響を及ぼすとともに、生理機能である薬物結合作用、特に Site II の薬物結合作用と抗酸化作用にも大きな影響を与えることが明らかとなった。

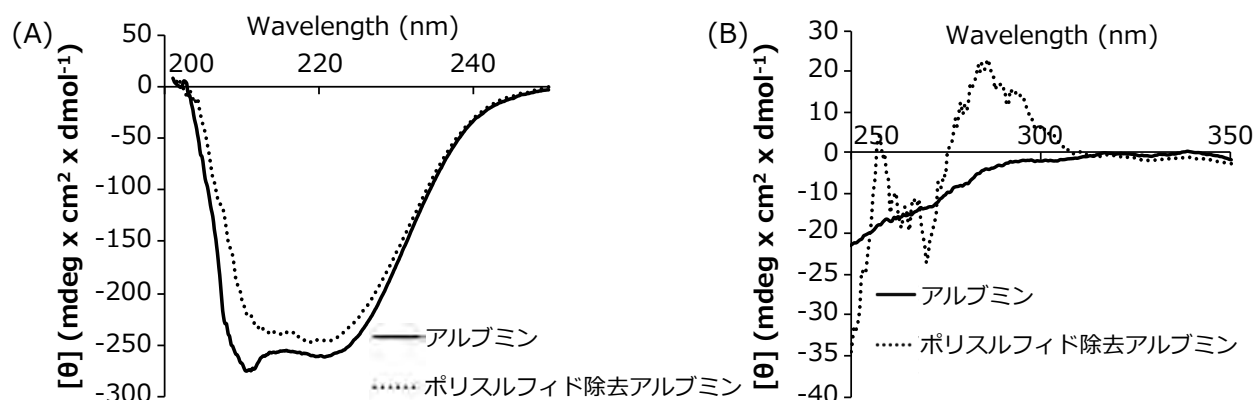


図2 酸化型超硫黄除去アルブミンの構造評価
(A) 遠紫外外および (B) 近紫外領域の CD スペクトル解析。

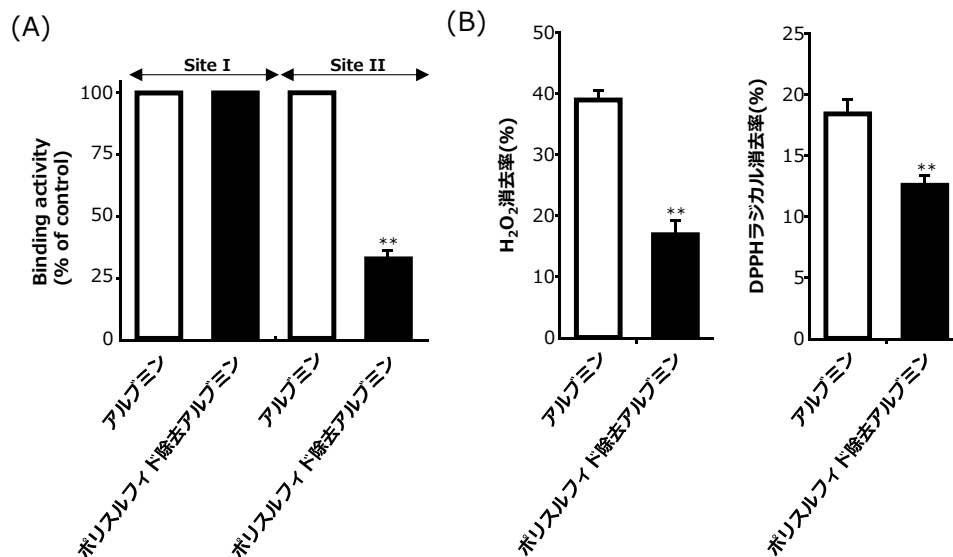


図3 酸化型超硫黄除去アルブミンの機能評価
 (A) 薬物結合活性および (B) H_2O_2 消去活性, DPPH ラジカル消去活性評価, ** $p < 0.01$ vs. アルブミン. データは, 平均値 \pm 標準偏差として示す. (n=5)

4. 臨床検体を用いたアルブミンのポリスルフィド化の変動

先述したように, タンパク質の超硫黄化, 特に「還元型」ポリスルフィド化 (R-SSn-H(n>1)) が, 酸化・還元レドックスバランスに関わることは多く報告されている. その背景には細胞内という還元環境下に存在するタンパク質が主たる研究対象であったことも一因であると思われるが, 実はヒト循環血中という比較的酸化的環境下においても「還元型」ポリスルフィドが存在し, 酸化ストレス病態との関連性を我々は報告している¹⁰⁾. ここでは, 特に慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) 疾患の患者血清を用いたアルブミンの「還元型」ポリスルフィドと酸化ストレスの関連性に関してご紹介したい.

2020年現在, 本邦のCKD患者数は予備軍も含め, 2000万人以上と推定されており, この人数は成人約5人に1人に相当し, 今や新たな国民病として位置づけられている. CKDの場合, 腎機能を改善する有効な治療薬が存在しないこと, 進行すると末期腎不全から血液透析療法の導入となること, 心血管疾患の発症リスクが上昇することの3点が早急に解決すべき問題として取り上げられており, 本邦のヘルスケア対策の緊急的課題として, 厚生労働省は元より自治体レベルでの取り組みも活発化している. CKDや死因第1位の合併症である心血管疾患は, 病態の進展に伴い酸化ストレスが亢進する. 特に, 維持血液透析患者では, 最も酸化ストレスが亢進している. また, 血圧や血糖を十分管理してもCKDや心血管疾患の進行を阻止できないことも多く, 近年では, 新たな病態進展因子として, 酸化ストレスの関与が注目されるようになってきた¹¹⁾.

さて, 先述したアルブミンに唯一還元型で存在する³⁴CysのSH基は血中のSH基含量の約80%を占めている上, 血中の酸化ストレスに応じて³⁴CysのSH基が酸化修飾を受けることから, 血清タンパク質の主たるレドックス反応性Cys残基として位置づけられてきた. すでに, ³⁴Cysの還元型と酸化型を分離定

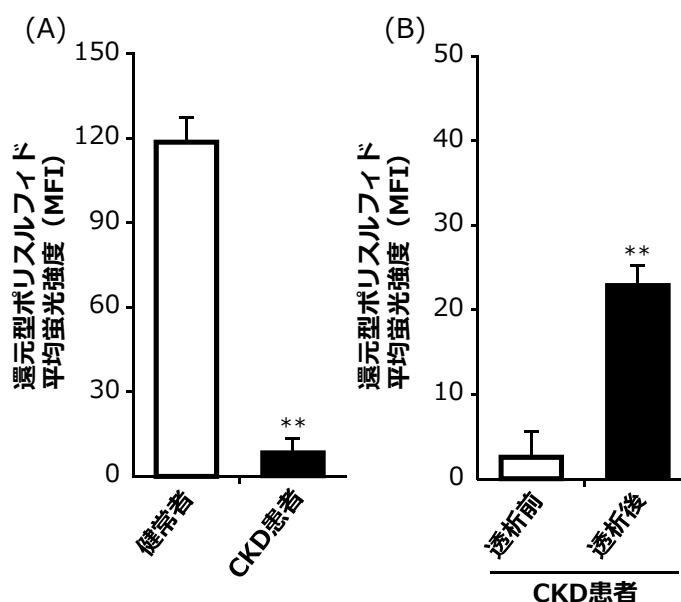


図4 CKD患者血中におけるアルブミンの還元型ポリスルフィド量と血液透析前後の変動
 (A) ** $p < 0.001$ vs. 健常者. データは, 平均値 \pm 標準偏差として示す. (n=8-14)
 (B) ** $p < 0.01$ vs. 透析前. データは, 平均値 \pm 標準偏差として示す. (n=8)

量するHPLCやESI-TOF-MSによる測定法が確立されており, 酸化型³⁴Cys分率(アルブミン³⁴Cys酸化度)あるいはCys付加体の上昇が, 加齢やさまざまな酸化ストレス関連疾患で確認されている^{12,13)}. このようなアルブミンのレドックス研究を行う中で, 我々はアルキル還元法を用い, ヒト血清から単離したアルブミンにCys-SSHのような還元型ポリスルフィド化が含まれており, その還元型ポリスルフィド化がCKDなどの病態において減少することを発見した(図4A). また興味深いことに, 維持血液透析患者の血中アルブミンの還元型ポリスルフィド濃

度は、血液透析前後で大きく増加することを確認しており、これは活性酸素や尿毒症物質などの酸化ストレス誘発物質が透析療法により除去されたことを鋭敏に反映している結果であると考えている(図4B)。現在、病態発症前あるいは早期からの血中還元型ポリスルフィド濃度の変動を精査し、酸化ストレス関連疾患リスク予測因子としての可能性を人間ドック受診者検体にて解析中である。

これまで、アルブミンの抗酸化作用が³⁴CysのSH基が出発点であるかのように考えられてきたが、今回新たにアルブミンに存在するCys-SSHのような還元型ポリスルフィドの関与が判明した。まだ未発表データではあるが、“このCys-SSHのような還元型ポリスルフィド量とアルブミンの抗酸化作用の間に極めて高い相関が認められること”や“アルブミンに存在する酸化型ポリスルフィド量は還元剤や酸化剤との反応によって還元型ポリスルフィドを生成すること”を我々は突き止めている。これは、酸化型ポリスルフィドのユニークな反応特性を生かした「巧みなレドックス調節機構」と考えている。現在我々は、このアルブミンのポリスルフィド化がもたらす「新規生体恒常性維持機構」の概要を以下のように仮説立てている(図5)。まず、(1)アルブミンは生合成段階でポリスルフィド化を受け、(2)循環血中での酸化的環境下において、多くは酸化型ポリスルフィドとして分子内に常備している。(3)周辺の酸化あるいは還元反応に応答し、酸化型ポリスルフィドから還元型ポリスルフィドへと変換し、(4)還元型ポリスルフィドにより、抗酸化作用を発揮する。健常時レベルの活性酸素量であれば、この

反応で十分対応可能であるが、(5)病態時レベルの活性酸素種量に及ぶと、Cys化アルブミンが増加し、アルブミン酸化度が増加する、このような機構であると現段階では推測している。

今後、レドックス応答性のCys残基の特定やその特異的な検出法などの構築により、生体におけるアルブミンのポリスルフィド化の生物学的意義の詳細な解明に迫ることができると考えている。加えて、肝硬変を含む慢性肝炎、炎症性腸炎、肺気腫などの他の慢性期疾患におけるアルブミン-Cys-SSHの変動や、血液脳脊髄液、関節液、腹水などの血清以外の組織液中や尿中のアルブミンにおけるポリスルフィド化の関連などについても、今後明らかにしていきたい。

5. 結語

現在臨床では、血中におけるアルブミンの「量」の測定が「栄養状態の指標」として、行われている。近年では、血中アルブミンが低値であるほどCOVID-19による重症化をもたらすことも報告されており、アルブミンの「量」を測定する重要性が再認識されている^{14,15}。今回述べてきたアルブミンの「ポリスルフィド化」は、アルブミンの「質」を決定づける新たな因子であると我々は考えており、臨床での新たな早期酸化ストレスマーカーとして標準的に測定されることを切望している。アルブミンの「ポリスルフィド化」は、酸化ストレス関連疾患の病態早期から変動し、「酸化型」から「還元型」に変換することで、一過的に抗酸化作用を発動させ、病的な酸化ストレスと対峙することで生体恒常性維持に働いていることが少しずつ明らかになっ

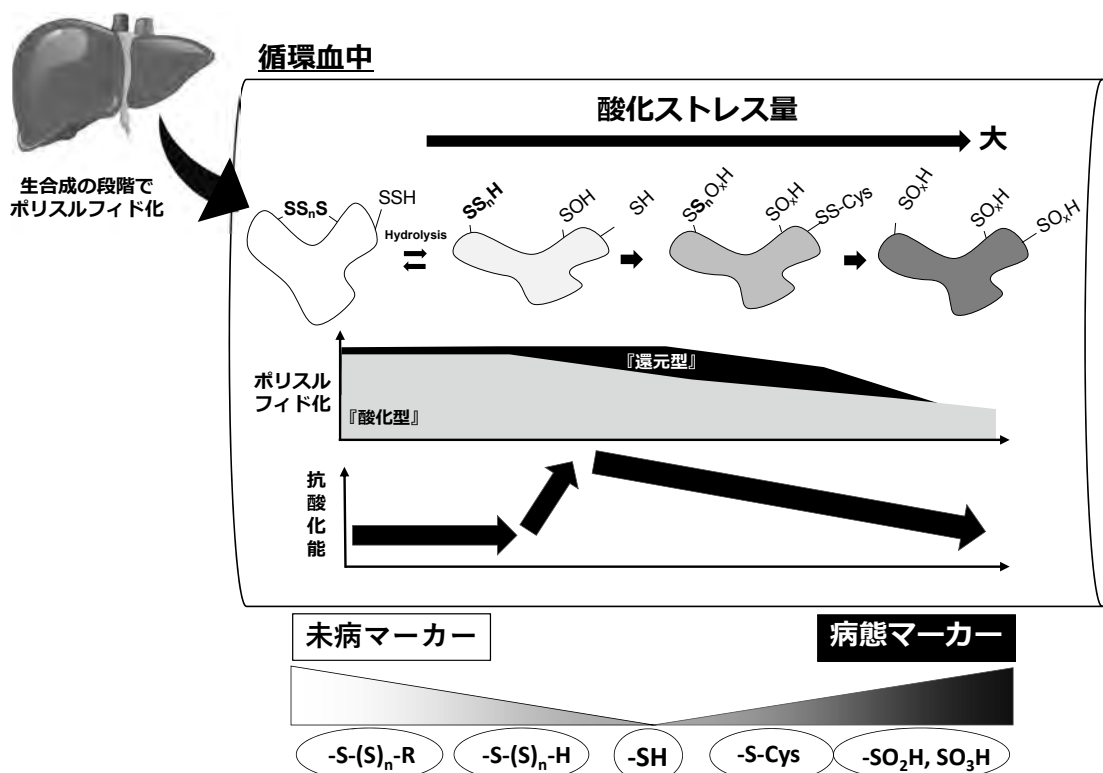


図5 アルブミンのポリスルフィド化と生体恒常性維持機構

てきている。今後、「ポリスルフィド化」というアルブミンの「質」が、病態早期マーカーあるいは診断マーカーになりうる可能性をさまざまな臨床検体にて詳細に検証することが急務である。その一方で、酸化ストレス関連疾患治療薬として、人工的かつ高効率に「ポリスルフィド化」させた薬剤の開発も非常に興味深い研究領域であると感じている。動物種を超え、長い生物進化の中で受け継いできた「ポリスルフィド化」による生体恒常性維持機構は、今回注目したアルブミンに限ったことではなく、毛髪や皮膚におけるケラチンなどにおいても同様な機構を有していることを我々は突き止めている。今回の「アルブミンのポリスルフィド化」が、生物の中で多彩な機能を発揮している「ポリスルフィド化」という生理現象の解明に少しでも貢献できれば幸いである。

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行ったものである。また、本研究に携わるきっかけと研究のご支援・ご助言を頂きました東北大学医学部の赤池孝章先生ならびに熊本大学医学部の澤智裕先生に心より謝意を表します。また、本研究に関して、惜しみなく有意義なディスカッションをして頂きました徳島大学薬学部の清水太郎先生ならびに安藤英紀先生に深く感謝申し上げます。また、多くの大変過酷な実験を続けて頂いた大学院生、学部生、多くの卒業生にも深謝致します。特に、アルブミンのポリスルフィド化に関しては、和歌山県立医科大学薬学部の池田真由美先生の研究成果を中心にご紹介しました。この場をお借りして、心から感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Iwao Y, Ishima Y, Yamada J, Noguchi T, Kragh-Hansen U, Mera K, Honda D, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. Quantitative evaluation of the role of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin using recombinant mutants *IUBMB Life*. 2012; 64: 450-454.
- 2) Cha M, Kim IH. Disulfide between Cys392 and Cys438 of human serum albumin is redox-active, which is responsible for the thioredoxin-supported lipid peroxidase activity. *Arch Biochem Biophys*. 2006; 445: 19-25.
- 3) Fasco MJ, Stack RF, Lu S, Hauer CR 3rd, Schneider E, Dailey M, Aldous KM. Unique cyanide adduct in human serum albumin: potential as a surrogate exposure marker. *Chem Res Toxicol*. 2011; 24: 505-514.
- 4) Akaike T, Ida T, Wei FY, Nishida M, Kumagai Y, Alam MM, Ihara H, Sawa T, Matsunaga T, Kasamatsu S, et al. Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun*. 2017; 8: 1177.
- 5) Moest RR. Hydrogen sulfide determination by the methylene blue method. *Anal Chem*. 1975; 47: 1204-1205.
- 6) Kasamatsu S, Kakihana Y, Koga T, Yoshioka H, Ihara H. Generation of rat monoclonal antibody to detect hydrogen sulfide and polysulfides in biological samples. *Antioxidants*. 2020; 9: 1160.
- 7) Ikeda M, Ishima Y, Shibata A, Chuang VTG, Sawa T, Ihara H, Watanabe H, Xian M, Ouchi Y, Shimizu T, et al. Quantitative determination of polysulfide in albumins, plasma proteins and biological fluid samples using a novel combined assays approach. *Anal Chim Acta*. 2017; 969: 18-25.
- 8) Oettl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *British Journal of Pharmacology*. 2007; 151: 580-590.
- 9) Oettl K, Birner-Gruenberger R, Spindelboeck W, Stueger HP, Dorn L, Stadlbauer V, Putz-Bankuti C, Krisper P, Graziadei I, Vogel W, Lackner C, Stauber RE. Oxidative albumin damage in chronic liver failure: Relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival. *Journal of Hepatology*. 2013; 59: 978-983.
- 10) Shibata A, Ishima Y, Ikeda M, Sato H, Imafuku T, Chuang VTG, Ouchi Y, Abe T, Watanabe H, Ishida T, et al. Human serum albumin hydropersulfide is a potent reactive oxygen species scavenger in oxidative stress conditions such as chronic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 479: 578-583.
- 11) Ramos LF, Shintani A, Ikizler TA, Himmelfarb J. Oxidative stress and inflammation are associated with adiposity in moderate to severe CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19: 593-599.
- 12) Turell L, Radi R, Alvarez B. The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic Biol Med*. 2013; 65: 244-253.
- 13) Nagumo K, Tanaka M, Chuang VT, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, Kubota K, Tanaka M, Matsushita K, Yoshida A, et al. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One*. 2014; 9: e85216.
- 14) Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, Xiang J, Wang Y, Song B, Gu X, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020; 395: 1054-1062.
- 15) Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, Huang H, Zhang L, Zhou X, Du C, et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med*. 2020; 180: 934-943.

水素ガス吸入療法への期待

Expectations for Hydrogen Gas Inhalation Therapy

本間 康一郎

Koichiro Homma

和文抄録

水素ガス吸入療法について、近年注目が集まっている。過去には水素ガスには生理活性作用がないと考えられていたが、2007年に水素ガスに活性酸素の除去効果があることが明らかになって以降、加速的に研究が進んでいる。本稿では、水素ガス吸入療法について科学的に明らかになっている生理作用と治療効果、そして将来の展望について述べてみたい。

Abstract

Hydrogen gas inhalation therapy has been the focus of much attention in recent years. In the past, hydrogen gas was thought to have no physiologically active effects, but since 2007, when it was revealed that hydrogen gas has the effect of removing reactive oxygen species, research has been progressing at an accelerated pace. This paper describes the physiological effects and therapeutic effects of hydrogen gas inhalation therapy that have been scientifically clarified, as well as the future prospects for this therapy.

Keywords

hydrogen gas, reactive oxygen, myocardial infarction, post cardiac arrest syndrome, hemorrhagic shock, contra media-induced acute kidney injury, COVID-19

はじめに

水素は健康増進から病気の予防、治療まで幅広い効果が期待されている。例えば、生活習慣病、アトピー性皮膚炎¹⁾、花粉症²⁾、慢性関節リウマチ³⁾、気管支喘息⁴⁾といった多くの慢性疾患に対する効果が報告されている。一方で、急性心筋梗塞⁵⁾、心肺停止⁶⁾、出血性ショック^{7,8)}といった急性期疾患での報告も多数ある。本稿では、私たちの研究結果を中心に紹介したい。

水素と水素ガス

水素は自然界に存在し、人体内にも微量に存在する分子である。水素は可燃性であり、室温で空気中の4.0-75.0 vol% (以下、%と表示)の範囲(爆発限界)で可燃する。酸素中における水素ガスの爆発限界は4.0-94.0%である。4%以下では燃焼や爆発の危険はない。水素ガスは自己発火しにくく、発火点はガソリン(500℃)より高い(527℃)。アメリカ航空宇宙局(National Aeronautics and Space Administration; NASA)は各種報告をまとめ、人体に無害で発がん性がないことを報告している⁹⁾。

「水素」は原子番号1の原子であり「H」と表記されるが、その水素原子2つが結合した水素分子(H₂)もまた「水素」と呼ばれる。そのため、「水素」という言葉では水素原子(H)と水素分子(H₂)のどちらを意味するか曖昧になってしまう。そこで、明確に水素分子(H₂)を示したい場合、英語ではmolecular hydrogenやhydrogen gasという表記を用い、日本語では水素分子あるいは水素ガスと表現することが多い。現在の医学・薬学の領域で治療応用が期待されている「水素」は、もちろん物質として存在

慶應義塾大学 医学部 救急医学

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35 Department of Emergency and Critical Care Medicine, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku, Tokyo 160-8582, Japan

論文受付 2022年9月30日 論文受理 2022年10月4日

する水素分子 (H₂) であるので、多くの文献では水素ガスという表現を用いている。ここでも、水素分子 (H₂) を示すために、水素ガスという表現を用いる。

活性酸素について

私たちが生命活動を営む上で酸素は必須である。活性酸素とは、呼吸によって体内に取り込まれた酸素の一部が通常よりも活性化された状態になることを指し、ヒトを含む哺乳類では取り込んだ酸素の数%が活性酸素に変化すると考えられている。

活性酸素には生理活性作用と細胞障害作用があり、よく2つの顔があると例えられる(図1)。生理活性作用として、体内の免疫機能に重要な役割を担っている。また、細胞間の情報伝達や、排卵、受精などにも利用されている。一方で細胞障害作用には酸化活性の強い活性酸素が関与する。活性酸素は、スーパーオキシドである O₂⁻ から、NO, H₂O₂, ROO[·], ONOO⁻, OH (ヒドロキシラジカル) へと酸化活性の度合いが強くなる。このため、O₂⁻ から、NO, H₂O₂ は善玉活性酸素、ROO[·], ONOO⁻, OH (ヒドロキシラジカル) は悪玉活性酸素と比喩されている。私たちに活性酸素を除去する抗酸化能力が備わっている。体内で産生される抗酸化酵素としてスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼがある。これらは加齢等により産生量が減少するため、その結果として産生された活性酸素が除去されず、悪玉活性酸素であるヒドロキシラジカルが増加する。

水素ガスの活性酸素への作用

上述したように、ヒドロキシラジカルは最も酸化作用が強く、最も有害として知られている。1990年代ころまでにビタミンCやEなど様々な抗酸化物質による臨床試験が行われてきたが、有効性は証明されず、むしろ有害な結果もあった¹⁰⁾。このことはすべての活性酸素種を消去することは有害であることを示唆しており、最も有害なヒドロキシラジカルのみを選択的に消去

する方法が望まれていた。そのような中で、2007年に当時日本医大のグループは、水素がヒドロキシラジカルのみ反応することを明らかにした¹¹⁾。

上段が水素なし、下段が水素ありで、一番右のヒドロキシラジカルにのみ反応し、それを除去している。それまで水素には生理活性効果がないといわれていたため、この研究結果がブレークスルーとなり、加速的に研究が進むこととなった。

水素ガスの吸入方法

常温・常圧では無色の気体で存在する水素ガスは、ガス状の分子の中で最も軽く、原子半径が小さいために物質透過性が高い。また、非常に燃焼しやすいため、専用のボンベに貯蔵するか、高圧化や液体化などの特別な手法を用いて貯蔵する必要がある。

それらの特性、特に可燃性ガスという点を踏まえて、人体へ投与する際にはボンベに貯蔵した水素ガスを吸入させることが多い。これは、医療現場で必要不可欠となっている酸素の投与方法と類似しており、多くの医療関係者にとって直感的に理解しやすい投与方法であると思われる。酸素以外にも、一酸化窒素(NO)の吸入療法なども存在し、既にガス吸入療法は一定の領域で確立しており、水素ガスの治療効果・安全性が明らかになれば、医療現場への導入にあまり時間はかからないと予想されている。水素ガスの吸入はヒトの潜水病予防に49%の水素ガスが用いられており、健康人が吸入しても健康障害の発生が認められないことが知られる¹²⁾。

具体的な水素ガス吸入方法として、水素ガスを口元で放出し吸入させる方法や、人工呼吸器と水素ガスボンベを接続する方法などが挙げられるが、前述の通り物質透過性が高いことから周囲への水素ガスの漏出が常に懸念事項となる。それに合わせて高い可燃性ガスであることから、現在では2~4%程度の低い濃度の水素ガスが吸入療法として研究対象となっていることが多い。最近では、水を電気分解して水素を発生されるコンパクト

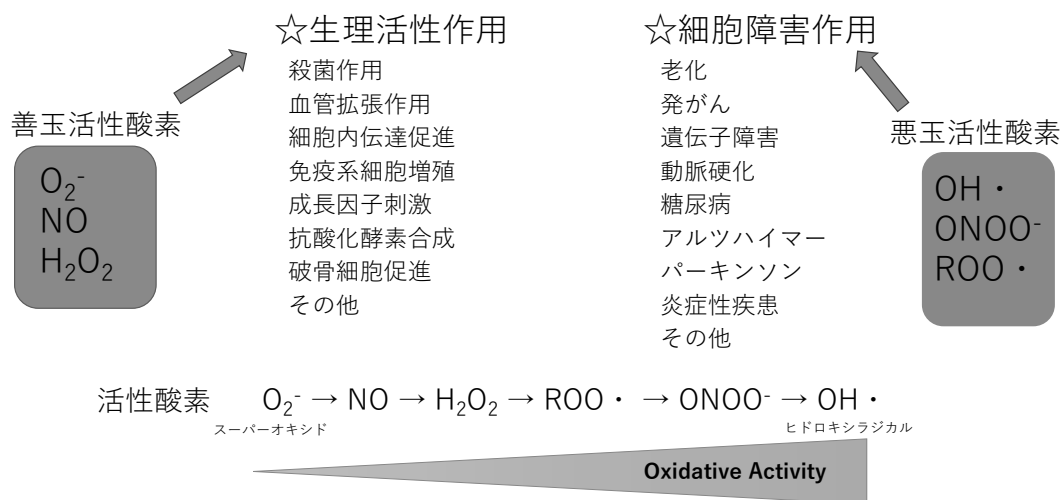


図1 活性酸素 2つの顔

活性酸素には生理活性作用と細胞障害作用といった相反する作用がある。スーパーオキシドからヒドロキシラジカルに向かうに従い細胞障害作用が強くなる。

トな装置も多くあり、クリニックやフィットネスクラブなどでの導入が加速している¹³⁾。さらに、ポケットサイズの吸入器も登場しており、水素ガスの吸入が身近なものとなってきている。

急性期病態への作用

水素ガス吸入療法は中国では医薬品、医療機器として承認されている。先に述べた2007年日本医科大学からの報告以降、日本でも盛んに研究が行われており、今後の医薬品化を目指して基礎研究のみならず臨床研究を実施している慶應義塾大学の研究グループからの報告を中心に紹介する。

急性心筋梗塞に対する水素ガス吸入療法

急性心筋梗塞は治療技術の発達により死亡率が低下している。一方で、急性心筋梗塞の範囲が大きくなると心臓のポンプ機能が低下し、心不全の病態につながる。この心不全の患者は増加しており、患者の生活の質の低下や医療費の増加が社会問題になっている。急性心筋梗塞に対する最も効果的な治療は原因となった血管を可及的速やかに再灌流し、心筋梗塞の範囲を最小限に留めることである。一方で、再灌流自体が心筋梗塞の範囲を増大させることも明らかになっている。つまり、急性心筋梗塞における最終的な心筋梗塞の範囲は、虚血性梗塞と再灌流による二次的な心筋障害の組み合わせとなる。心筋梗塞の範囲を小さくすることは先述した心不全の発症を防ぐために重要である。このような背景に対して、ST上昇型心筋梗塞(ST-elevated myocardial infarction: STEMI)に対して経皮的冠動脈インターベンション(Percutaneous coronary intervention: PCI)を施行した患者における、水素ガス吸入療法の前向き介入研究がある⁵⁾。

同研究では、STEMIと診断された20人の患者のうち10人に1.3%の水素ガスと26%の酸素吸入を行い、残りの10人に

26%の酸素吸入のみを行って、PCI後の治療成績を比較している。水素ガス吸入の治療効果に関して、PCIから7日後の心臓MRI検査で測定された心筋虚血領域を軽減させる効果は認めなかったが、その後6か月の左室駆出率(ejection fraction: EF)の有意な改善が認められた。また、水素ガス吸入療法による有害事象の増加は認めず、人体における安全性も示された。

心肺停止と水素ガス吸入療法

人体における水素ガスの治療効果を示唆するもう1つの重要な研究として、心肺停止蘇生後症候群(Post-Cardiac Arrest Syndrome: PCAS)を認める患者における、水素ガス吸入療法の前向き介入研究が挙げられる⁶⁾。

心肺停止の有効な蘇生に関する研究は数十年前より世界中で盛んに行われており、質の高い胸骨圧迫や、致死的不整脈に対する早期除細動など、より効果的な心肺蘇生法が確立し、心肺蘇生に関する医学も少しずつ進歩している。一方で、心肺停止からの蘇生が成功したとしても、必ずしも良好な脳機能予後を得られるとは限らず、多くの心肺停止蘇生後の患者は自立した生活を送ることが困難な状況に陥るのも事実である。この問題は世界中で取り上げられ、PCASという名のもと、心肺蘇生法と並行して多くの研究が行われている。しかし、体温管理療法がPCASの有効な治療であることが解明された以外に期待できる治療は確立しておらず、いまだに多くの心肺停止蘇生後の患者が限られた脳機能での生存を余儀なくされている。

そのような中で、ラットPCASモデルを用いた研究において、水素ガスの吸入が体温管理療法と同等の生命予後の改善効果を認めること、さらに体温管理療法との併用によって体温管理療法単独と比較してさらに脳機能予後を改善させることが明らかになった¹⁴⁾(図2a)。

この知見を基盤とし、実際にPCASと診断された5名の患者

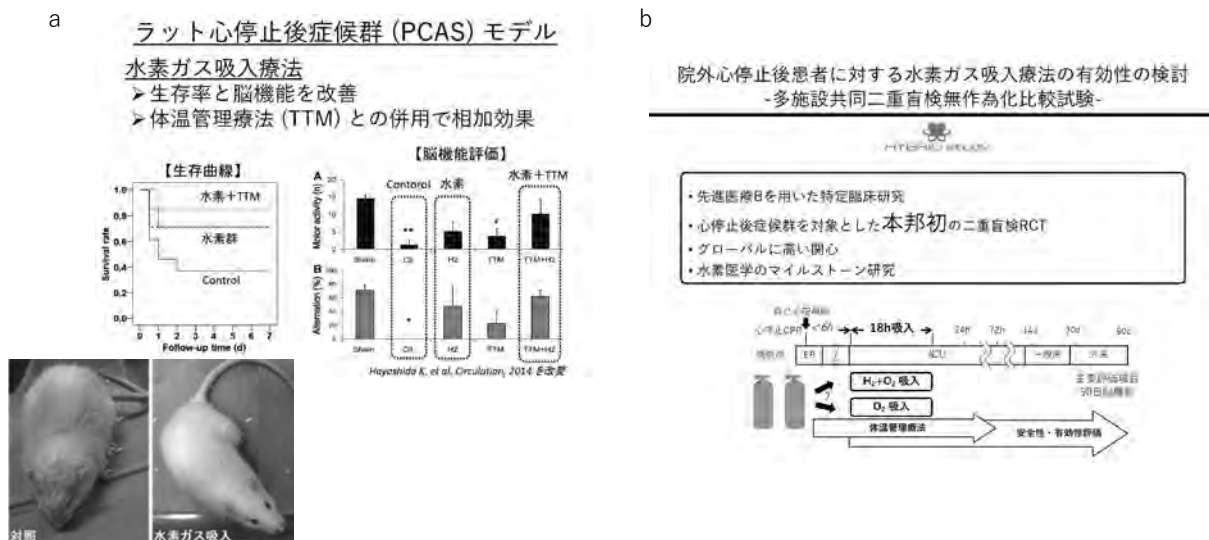


図2 心停止後症候群に対する水素ガス吸入療法

- ラット心停止後症候群モデルにおいて、水素ガス吸入により生存率、脳機能の改善を認め、さらに体温管理療法との併用により上乗せ効果が認められた。
- 心停止後症候群患者に対する水素ガス吸入療法の臨床研究プロトコール

に対して水素ガス吸入療法の治療効果を調べた研究では、体温管理療法とともに2%の濃度の水素ガス吸入療法を実施し、90日後の脳機能を調査している。水素ガス吸入療法を施行しなかったコントロール群との比較は行ってないものの、全体の80%にあたる4人の患者が健康で正常な日常生活を送ることができたと報告されており、これは一般的なPCASの脳機能予後と比較すると非常に良好な結果であった。また、水素ガス吸入療法による有害事象も認めなかった¹⁵⁾。

水素ガス吸入療法を実施したPCASの症例数は少なかったものの、その治療効果の可能性と安全性を踏まえ、2017年より二重盲検下ランダム化比較試験である院外心停止後患者に対する水素ガス吸入療法 (HYBRID II trial) が現在進行中である。本研究では、PCASと診断された患者を対象に、治療群とコントロール群を無作為かつ盲検下で割り当て、治療群に2%の濃度の水素ガス吸入療法を実施するというものである。今後、結果が報告される予定となっており、水素ガス吸入療法の臨床実用へのステップとして、重要な研究として注目されている⁶⁾ (図2b)。

出血性ショック

出血性ショックによる死亡は世界的な問題であり、米国では年間6万人以上となっている。世界では年間190万人が死亡しており、そのうち150万人が外傷によるものと報告されてい

る¹⁶⁾。出血性ショックの治療は速やかな止血と輸血による循環血液量を回復させることが重要である¹⁷⁾。しかし、病院の外ではこれらが通常困難であるため外傷による出血性ショックによる死亡は病院に到着する前の環境で起こっている。そのため、病院の外で、止血や輸血の前に利用できる治療オプションとして水素ガスに着目し、出血性モデル動物へ水素ガスを投与した結果、血管内皮構造の保護により血管の恒常性を維持し、生存率を改善することが明らかになった^{7,8)}。

造影剤による急性腎障害

慢性腎臓病患者は現在国内で1,330万人 (20歳以上の成人の8人に1人) いると考えられ、私たちの生活をおびやかす新たな国民病といわれている。今後も高齢者の増加に伴い、増加の一途をたどることが容易に予想される。この慢性腎臓病が進行すると、血液透析などの腎代替療法が必要となるが、血液透析患者は30万人を超え、全医療費の約4%にもなり医療経済を圧迫している。このように慢性腎臓病が増加しているなかで、病気の診断や治療のために造影剤を使用する頻度は増加しているが、慢性腎臓病患者では造影剤投与による急性腎障害 (造影剤腎症) を発症するリスクが高く、腎臓寿命がさらに短縮するが、造影剤腎症予防ガイドラインでは半日以上前から生理食塩水を補液することしか推奨されていない。急性心筋梗塞、大動脈解離、肺塞栓症や急性腹症などといった致死的な疾患を診断する

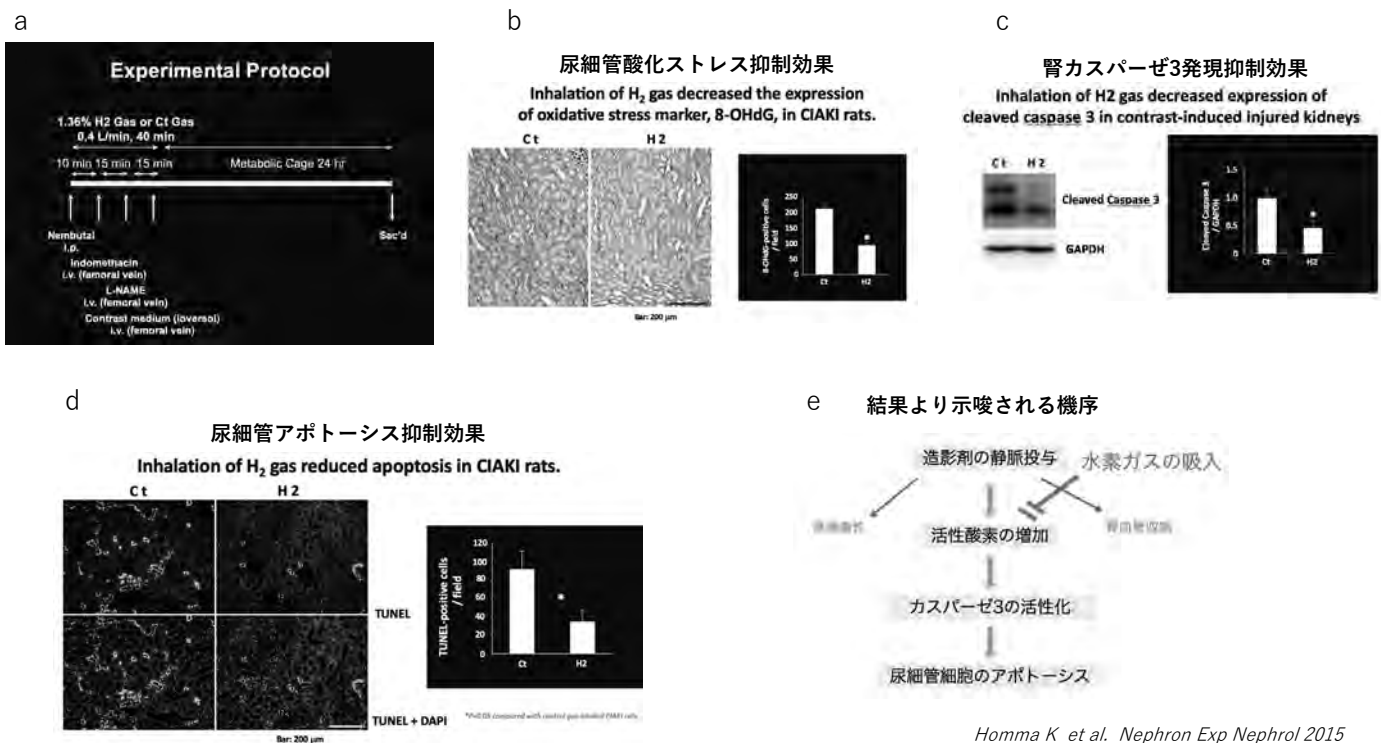


図3 造影剤投与による急性腎障害に対する水素ガス吸入療法

- 研究プロトコル
- 水素ガス吸入により腎臓組織での酸化ストレスの指標である8-OHdGを抑制した。
- 腎臓においてアポトーシスの指標であるカスパーゼ3の発現を抑制した。
- 腎臓組織においてアポトーシスの抑制を確認した。
- 水素ガス吸入が造影剤投与による腎障害を抑制する機序

Homma K et al. Nephron Exp Nephrol 2015

際に造影剤を使用する検査は必須であるが、緊急性が高く、十分に補液を行う時間的余裕がなく、造影剤腎症に対しては何も対策を行うことができないジレンマがある。造影剤腎症発症の要因の1つとして活性酸素の過剰産生があげられるため、私たちは水素ガス吸入の効果を期待し造影剤腎症モデル動物を用いて検討した。その結果、水素ガスの吸入による腎臓保護効果を明らかにした¹⁸⁾(図3)。

新型コロナウイルス感染症と水素ガス吸入療法

新型コロナウイルス感染症の患者に対する水素ガス吸入療法の治療効果を示唆する結果が、2020年5月に中国より発表された¹⁹⁾。これは、新型コロナウイルス感染症では、強い全身の炎症反応が重要な病態として示唆されている背景を踏まえ、水素ガスの抗炎症作用に期待して行われた研究であるが、研究デザインやその結果からは水素ガスの治療効果を確認するには至っていない。重症新型コロナウイルス肺炎患者では、血液や肺動脈で好中球細胞外トラップ (Neutrophil Extracellular Traps, NETs) が過剰に産生されており、これが重症化と関連している。佐野らは、敗血症モデル動物に対して水素ガスの吸入させることにより肺における過剰なNETsの産生を抑制することを報告している²⁰⁾。

おわりに

水素ガス吸入療法は簡単かつ安価である。また、最も重要である安全性が高い。今後、ヒトにおける有効性を質の高い臨床研究で示すことが重要である。また、作用機序の理解が不十分であるため、基礎研究を通じての解明が望まれる。それらを通じて、用法、用量が明らかになり、医薬品として承認されることを期待したい。

引用文献

- 1) Yoon YS, Sajo ME, Ignacio RM, Kim SK, Kim CS, Lee KJ. Positive Effects of hydrogen water on 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Biol Pharm Bull.* 2014;37:1480-1485.
- 2) Fang S, Li X, Wei X, Zhang Y, Ma Z, Wei Y, Wang W. Beneficial effects of hydrogen gas inhalation on a murine model of allergic rhinitis. *Exp Ther Med.* 2018; 16: 5178-5184.
- 3) Ishibashi T, Sato B, Rikitake M, Seo T, Kurokawa R, Hara Y, Naritomi Y, et al. Consumption of water containing a high concentration of molecular hydrogen reduces oxidative stress and disease activity in patients with rheumatoid arthritis: an open-label pilot study. *Med Gas Res.* 2012; 2: 27.
- 4) Zhang N, Deng C, Zhang X, Zhang J, Bai C. Inhalation of hydrogen gas attenuates airway inflammation and oxidative stress in allergic asthmatic mice. *Asthma Res Pract.* 2018;4:3.
- 5) Katsumata Y, Sano F, Abe T, Tamura T, Fujisawa T, Shiraishi Y, Kohsaka S, Ueda I, Homma K, Suzuki M, Okuda S, Maekawa Y, Kobayashi E, Hori S, Sasaki J, Fukuda K, Sano M. The

Effects of Hydrogen Gas Inhalation on Adverse Left Ventricular Remodeling After Percutaneous Coronary Intervention for ST-Elevated Myocardial Infarction - First Pilot Study in Humans. *Circ J.* 2017; 81: 940-947.

- 6) Tamura T, Hayashida K, Sano M, Onuki S, Suzuki M. Efficacy of inhaled HYdrogen on neurological outcome following BRain Ischemia During post-cardiac arrest care (HYBRID II trial): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2017; 18: 488.
- 7) Matsuoka T, Suzuki M, Sano M, Hayashida K, Tamura T, Homma K, Fukuda K, Sasaki J. Hydrogen gas inhalation inhibits progression to the "irreversible" stage of shock after severe hemorrhage in rats. *J Trauma Acute Care Surg.* 2017; 83: 469-475.
- 8) Tamura T, Sano M, Matsuoka T, Yoshizawa J, Yamamoto R, Katsumata Y, Endo J, Homma K, Kajimura M, Suzuki M, Kobayashi E, Sasaki J. Hydrogen Gas Inhalation Attenuates Endothelial Glycocalyx Damage and Stabilizes Hemodynamics in a Rat Hemorrhagic Shock Model. *Shock* 2020; 54: 377-385.
- 9) National Aeronautics and Space Administration Safety standard for hydrogen and hydrogen systems: Guidelines for Hydrogen System Design, Materials Selection, Operation, Storage and Transportation Office of Safety and Mission Assurance, Washington, DC 20546
- 10) Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. Miller ER 3rd, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. *Ann Intern Med.* 2005; 142: 37-46.
- 11) Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med.* 2007; 13: 688-94.
- 12) Fontanari P, Badier M, Guillot C, et al. Changes in maximal performance of inspiratory and skeletal muscles during and after the 7.1-MPa Hydra 10 record human dive. *Eur J Appl Physiol* 2000; 81: 325-8.
- 13) Sano M, Shirakawa K, Katsumata Y, Ichihara G, Kobayashi E.J. Low-Flow Nasal Cannula Hydrogen Therapy. *Clin Med Res.* 2020; 12: 674-680.
- 14) Hayashida K, Sano M, Kamimura N, Yokota T, Suzuki M, Ohta S, Fukuda K, Hori S. Hydrogen inhalation during normoxic resuscitation improves neurological outcome in a rat model of cardiac arrest independently of targeted temperature management. *Circulation.* 2014; 130: 2173-80.
- 15) Tamura T, Hayashida K, Sano M, Suzuki M, Shibusawa T, Yoshizawa J, Kobayashi Y, Suzuki T, Ohta S, Morisaki H, Fukuda K, Hori S. Feasibility and Safety of Hydrogen Gas Inhalation for Post-Cardiac Arrest Syndrome - First-in-Human

- Pilot Study. *Circ J.* 2016; 80: 1870-1873.
- 16) Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et.al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012; 380: 2095-128.
- 17) Cannon JW. Hemorrhagic Shock. *Engl J Med.* 2018; 378: 370-379.
- 18) Homma K, Yoshida T, Yamashita M, Hayashida K, Hayashi M, Hori S. Inhalation of Hydrogen Gas Is Beneficial for Preventing Contrast-Induced Acute Kidney Injury in Rats. *Nephron Exp Nephrol.* 2015; Jan 9.
- 19) Guan WJ, Wei CH, Chen AL, Sun XC, Guo GY, Zou X, Shi JD, Lai PZ, Zheng ZG, Zhong NS. Hydrogen/oxygen mixed gas inhalation improves disease severity and dyspnea in patients with Coronavirus disease 2019 in a recent multicenter, open-label clinical trial. *J Thorac Dis.* 2020; 12: 3448-3452.
- 20) Shirakawa K, Kobayashi E, Ichihara G, Kitakata H, Katsumata Y, Sugai K, Hakamata Y, Sano M. H₂ Inhibits the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *JACC Basic Transl Sci.* 2022; 7: 146-161.

日本血液代替物学会 総会

- | | |
|---|--|
| <p>1. 日 時：
令和3年（2021年）10月14日（木）12：30～12：40</p> <p>2. 場 所：
WEB開催</p> | <p>3. 議 題：</p> <p>① 第28回年次大会の報告</p> <p>② 会員動向</p> <p>③ 令和2年度事業報告</p> <p>④ 令和2年度会計報告</p> <p>⑤ 令和3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) 第28回日本血液代替物学会年次大会
(大会長 田口和明)
- 2) 開催年月日 令和3年10月14日（木）～15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：74名
- 3) 購読会員：2箇所

③ 令和2年度事業報告（令和2年4月1日～令和3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3年10月14日（木）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（金）WEB開催
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第28巻1号

④ 令和2年度収支決算報告が行なわれ承認された。

令和2年度 会計報告 収支決算表
(自 令和2年4月1日 至 令和3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	5,256,705	会誌出版費	509,950
正会員会費	430,000	集会・委員会費	0
施設会員会費	400,000	年会補助金	800,000
購読会員会費	6,000	ホームページ維持費	330,000
学生会員会費	0	謝金	49,000
雑収入	0	事務費(消耗費)	33,918
年次大会費補助金 残金と次回繰越金	804,921	雑役務費	6,380
利息	594	次期繰越金	5,168,972
計	6,898,220	計	6,898,220

⑤ 令和3年度事業計画（経過報告）（令和3年4月1日～令和4年3月31日）

- 1) 定期総会の開催
令和3年10月14日（木）12：30～12：40
於 WEB開催
- 2) 第28回年次大会の開催（大会長：田口 和明）
令和3年10月14日（木）～15日（金）
於 WEB開催
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第29巻1号

会誌「人工血液」バックナンバーのメディカルオンライン掲載について

本学会の会誌「人工血液」は1993年より刊行され、本年第30巻を発刊するに至りました。バックナンバーは冊子ごとに本学会ホームページで常時閲覧できますが、論文ごと、要旨ごとの検索が出来ないことが課題でした。しかしこの度、並行してメディカルオンラインにもWeb掲載することになりました。これにより、論文ごと、要旨ごとの検索とpdfファイルのダウンロードが可能となり、文献検索を通して本学会の活動を、より多くの人に知っていただけることが期待されます。既に初巻から28巻までが掲載されています。どうぞご活用ください。

メディカルオンラインURL：<https://www.medicalonline.jp>

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、理由とその旨を届出て、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4年度 日本血液代替物学会役員名簿

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 病院長
理 事	東 寛	旭川医科大学 名誉教授
	池 田 康 夫	根津育英会武蔵学園 学園長
	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
	田 口 和 明	慶應義塾大学薬学部 准教授
	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	小松 晃之	中央大学理工学部 教授
阿部喜代司	筑波大学 名誉教授	酒井 宏水	奈良県立医科大学医学部 教授
池田 康夫	根津育英会武蔵学園 学園長	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
池淵 研二	埼玉医科大学 教授	高橋 英嗣	佐賀大学大学院 教授
石田 竜弘	徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授	田口 和明	慶應義塾大学薬学部 准教授
伊藤 大知	東京大学大学院工学系研究科 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 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 病院長
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		

Call for Papers

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

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



Instructions for Authors (last revised Nov. 20, 2013)

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

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

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

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

either of the following methods with a covering letter (of any format):

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

ii) Submission by post of four sets of hardcopies.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

References to electronic sources should be given as follows:

Name of website.

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

Examples:

1. Wong NS, Chang TM. Polyhemoglobin-fibrinogen: a novel oxygen carrier with platelet-like properties in a hemodiluted setting. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007; 35: 481-489.
2. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *J Am Med Assoc* 2008; 299: 2304-2312.
3. Sakai H, Sou K, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin vesicles as a Molecular Assembly. Characteristics of Preparation Process and Performances 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

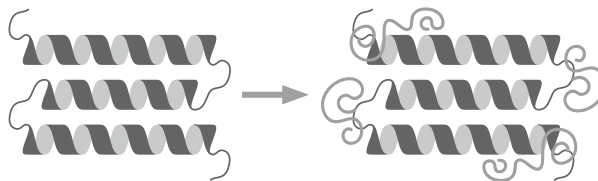
<https://www.jbpo.or.jp>

FUNCTIONALIZED PEGS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

MERCK

多種多様な官能基と幅広い分子量のラインアップを取り揃えております。

- Heterobifunctional PEGs
- Homobifunctional PEGs
- Monofunctional PEGs
- PEG Dendrimers and Multi-Arm PEGs
- PEG Copolymers
- PEG and Oligo Ethylene Glycol
- Poly(ethylene oxide) (PEO) Powders
- High Oligomer Purity PEGs



ポリエチレングリコール(PEG)製品の詳細はこちら
<https://bit.ly/3QHr2dH>



シグマ アルドリッチ ジャパン

ライフサイエンス サイエンス & ラボソリューションズ事業本部

製品の最新情報はこちら www.sigmaaldrich.com/JP/ja

シグマアルドリッチ ジャパン合同会社はメルクのグループ会社です。

The life science
business of Merck
operates as
MilliporeSigma in
the U.S. and Canada.

Sigma-Aldrich®

Lab & Production Materials

試薬 / 実験機材の総合ディーラー

試薬メーカーとの連携で、新製品の開発を完全サポート



<http://www.takacho.biz>

研究者の皆様と共に 95年



近年、科学技術の発展は目覚しくそれに伴い、バイオサイエンスの分野においても各種の新製品が開発され、めまぐるしく進歩を遂げております。

弊社は試薬のトップメーカー各社との緊密な連携により、エンドユーザーのニーズに適した試薬や機材の紹介・納入を迅速かつ確実に実行することをモットーとして営業活動を行っております。

株式会社 高長

〒113-0021 東京都文京区本駒込 5-2-10

本社 TEL 03-3941-7161
FAX 03-3946-3980

多摩営業所 TEL 0425-74-8371
FAX 0425-74-8372

柏営業所 TEL 04-7141-0081
FAX 04-7141-0082

福島営業所 TEL 024-525-3881
FAX 024-525-3882

川崎営業所 TEL 044-221-5155
FAX 044-221-5156

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, 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.30(1) 2022年11月11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

分光分析技術による生体分子の構造評価システム

タンパク質の三次構造測定



NRS-4500 / レーザラマン分光光度計

アライメント調整、光源やフィルターなどの切換えを自動化、省スペースを実現。微量試料の測定からケミカルイメージングまでの幅広い用途に対応します。

非破壊・非侵襲分析



タンパク質の二次構造測定

FT/IR-4X / フーリエ変換赤外分光光度計

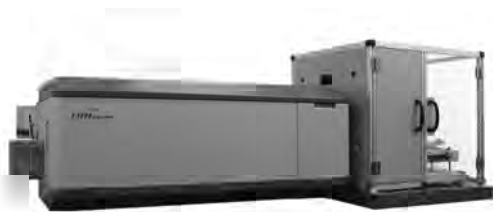
小型 FT/IR ながらリサーチグレードクラスの基本性能を有し、高感度 MCT 検出器、マルチチャンネル顕微鏡、ラピッドスキャンへの拡張性を持ちます。ナビゲーション機能により誰でも簡単に高品質なスペクトルを取得できます。



ATR 法 1 滴分析



タンパク質高次構造測定



HTCD Plus / ハイスループット円二色性測定システム

測定、複数溶媒による流路洗浄、乾燥まで全自動化され、多検体の自動測定ができます。コンタミネーション防止ケース、試料温度調節機能の搭載により、長時間の測定において懸念される試料の変性や蒸発を防ぎます。

多検体ハイスループット測定

<https://www.jasco.co.jp>

製造・販売

日本分光株式会社

〒192-8537 東京都八王子市石川町 2967-5

TEL : 042-646-4111(代)

販売代理店

ジャスコサポート株式会社

〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台 2-5-12

TEL : 03-3294-4851 MAIL : jasco.support@jasco.co.jp

JASCO

JASCO は日本分光株式会社の登録商標です。
本広告に記載されている装置の外観および各仕様は、
改善のため予告なく変更することがあります。

日本血液代替物学会
<http://www.blood-sub.jp/>