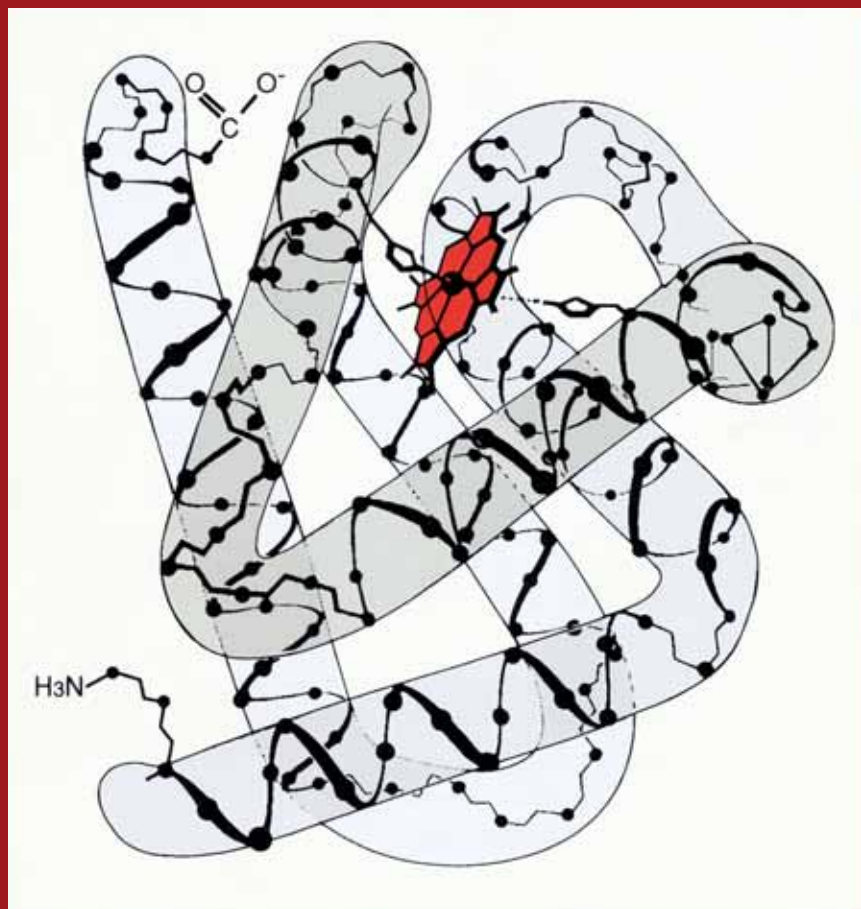


人工血液

VOLUME 26
NUMBER 1
2018

日本血液代替物学会 会誌

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



第25回年次大会プログラム

原著:重回帰式を用いたエタノール注入法によるADP
内包リポソームの調製条件の最適化

総説:温度応答性リポソームの開発と薬物送達シ
ステムへの応用

事務局たより

The 25th Annual Meeting Program

Original Article:

Optimization of the Preparation Conditions of
ADP-Encapsulated Liposomes Prepared by
an Ethanol Injection Method with Multiple
Regression Equations

Review:

Development of Temperature-Responsive
Liposomes and Their Application for Drug
Delivery Systems

Artificial Blood

The Society of Blood Substitutes, Japan

ひたむきな命の頑張りに、
未来を届ける薬があります。

JB

「けつしょうぶんかくせいざい血漿分画製剤」で、皆様のお役に立ちたいから。
日本血液製剤機構は、さらに前進していきます。

善意と医療のかけ橋



JBキャラクター
ジェイバード (JBird) です。

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



人工血液

第 26 卷 第 1 号 2018 年 10 月

目 次

第 25 回年次大会プログラム

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

原著：重回帰式を用いたエタノール注入法による ADP 内包リポソームの調製条件の最適化	
..... 駒木根 元気 他	37

総説：温度応答性リポソームの開発と薬物送達システムへの応用	
..... 宗 慶太郎	47

事務局たより

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 26 No. 1 October, 2018

Contents

The 25th Annual Meeting Program

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

<i>Original Article: Optimization of the Preparation Conditions of ADP-Encapsulated Liposomes Prepared by an Ethanol Injection Method with Multiple Regression Equations</i>	
..... Genki Komakine, et al.	37

<i>Review: Development of Temperature-Responsive Liposomes and Their Application for Drug Delivery Systems</i>	
..... Keitaro Sou	47

第25回日本血液代替物学会年次大会

The 25th Annual Meeting of the Society of Blood Substitutes, Japan

『血液代替物—その有用性証明への挑戦—』

大会長：東 寛（旭川医科大学）

会 期：2018年10月18日（木）、19日（金）

会 場：旭川市大雪クリスタルホール

【年次大会事務局】

旭川医科大学 小児科学講座

〒078-8510 旭川市緑が丘東2条1丁目

Tel：0166-68-2481

Fax：0166-68-2489

E-mail：ketsueki-daitai@asahikawa-med.ac.jp

大会長挨拶

第25回日本血液代替物学会を旭川市で開催させていただく事になりました。

第Ⅷ因子製剤に代表される血漿成分は、その成分を純化して長期保存が可能な製剤とする事ができます。しかしながら、赤血球や血小板などの輸血用血液製剤中の血球成分はそれを取り出して、機能を温存したまま長期保存する事は未だに実現しておりません。翻って、血液代替物は年単位の長期保存が可能であり、このことは、既存の輸血用血液製剤との大きな違いです。遠隔の地において、予期せぬ危機的大量出血が発生しても、保存してある血液代替物を用いて急場をしのぐ事が出来れば、質の高い救命を目指す事が可能となります。我が国の輸血用血液製剤は世界一安全である事は言うまでもない事です。その供給体制も様々な工夫を凝らして、必要な時に必要なだけ供給できる体制ができているとされています。しかしながら、実際にはそうではない場合がある事も少しずつ知られてきているように思われます。このような現実を考えますと、医療の現場では、いざという時に、輸血用血液製剤の代わりとなりうる、血液代替物に対する潜在的なニーズが想像以上にあると言えるのではないのでしょうか。そうだとすれば、1日も早く、血液代替物の有用性を広く世に認知してもらい、現場のニーズに応える必要があります。従いまして、今回の学会でのテーマを「血液代替物—その有用性証明への挑戦—」とさせていただきました。特別講演一つ、トピックス3つ、会長要望講演一つを企画しました。また、遠方での開催であるにも関わらず、21もの一般演題の登録をいただきありがとうございました。

学会としては質素な学会になろうかと思いますが、多くの皆様に旭川へご参集いただき、学会での活発な議論を展開していただきますよう心よりお願い申し上げます。

第25回日本血液代替物学会年次大会
大会長 東 寛
(旭川医科大学)

お知らせとお願い

■会員・参加者の皆様へ

●会場

旭川大雪クリスタルホール
(北海道旭川市神楽3条7丁目)

●受付

平成30年10月18日(木) 9:00 から
平成30年10月19日(金) 9:00 から

●参加登録

参加登録費 一般:10,000円、学生:3,000円

参加登録費は、年次大会受付にて現金でお支払ください(クレジットカードは使用できません)。参加登録後、ネームカードをお渡しします。会期中、ネームカードは会場内で必ず御着用ください。

当日、抄録集をお持ちでない場合は1,500円でご購入も可能です。

●入会受付

受付にて日本血液代替物学会の入会手続きも行っております。
会費は、正会員10,000円、購読会員3,000円、学生会員3,000円です。

●年次大会予稿集

年次大会予稿集は、会員全員及び発表者(非会員)に事前配布しています。
当日、忘れずにご持参ください。また、当日、受付にて1部1,500円で販売致します。

●懇親会

参加費:4,000円

参加者相互の親睦を図るため、以下の通り、懇親会を開催します。受付にて、参加登録費と一緒に懇親会参加費を現金でお支払いください。皆様のご参加をお待ちしております。

日時:平成30年10月18日(木) 18:00 から
場所:旭川トーヨーホテル3階「琥珀の間」

■発表者へのお願い

1. 発表内容は、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。PowerPoint等のプレゼンテーションソフトを使用してください。
2. 発表に使用するパーソナルコンピューター(PC)は各自でご用意ください。発表者は事前の休憩時間にご自分のPCを指定された末端に接続し、液晶プロジェクターから問題なく投影されることを必ずご確認願います。
3. 念のため事務局でPC(Windows 7, PowerPoint 2013)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メモリー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. プロジェクター画面の解像度はXGA(1,024×786ピクセル)ですので、画面の設定をXGAに合わせて下さい。
6. 動画ファイルはWindows Media Playerで再生できるものをお願いします。事前に再生できるかご確認下さい。
7. ご使用いただくPCはmini D-sub 15pinのモニター出力端子が必要です。この端子がないPCをお使いの場合は、必ず別途変換コネクタをご持参ください。
8. Macを使用される発表者は、必ず外付けのコネクタをご持参ください。
9. スクリーンセーバー並びに省電力設定は予め解除してください。

■講演発表時間

大会長挨拶	5 分
特別講演	60 分
トピックス	60 分
会長要望講演	30 分

演題数の関係で、若干時間配分が変更になることもございます。

■各種会議日程

理事会・評議委員会	：平成 30 年 10 月 18 日（木）12：00～12：50 （第一会議室）
総 会	：平成 30 年 10 月 18 日（木）13：00～13：30 （大会会場）

■大会事務局

旭川医科大学 小児科学講座
〒078-8510 旭川市緑が丘東 2 条 1 丁目
Tel：0166-68-2481
Fax：0166-68-2489
E-mail：ketsueki-daitai@asahikawa-med.ac.jp

学会のホームページにて、最新のお知らせ、注意事項、プログラムなどを掲載していきます。合わせてご確認、ご利用ください。
学会のホームページ <https://www.blood-sub.jp/kaikoku.php>

大会日程表

	2018 年 10 月 18 日 (木)	2018 年 10 月 19 日 (金)
9:00	9:00 受付	9:00 受付
9:30	9:25 開会の辞 9:30~10:30 一般演題Ⅰ 座長：酒井宏水(奈良県立医科大学) 演者：1 田口和明(慶應義塾大学薬学部) 演者：2 永崎太清(熊本大学薬学部) 演者：3 和田直樹(熊本大学薬学部) 演者：4 北岸宏亮(同志社大学理工学部)	9:30~10:30 一般演題Ⅳ 座長：小松晃之(中央大学) 演者：1 市原聖人(中央大学理工学部) 演者：2 五十嵐啓介(中央大学) 演者：3 鹿島知周(中央大学) 演者：4 小田切優樹(崇城大学)
10:00		
10:30	10:30~10:40 Coffee Break 10:40~11:40 トピックスⅠ 「命をつなぐ移植臓器灌流保存方法における人工赤血球(HbV)含有灌流保存液の研究」 演者：松野直徒(旭川医科大学) 座長：木下 学(防衛医科大学校)	10:30~10:40 Coffee Break 10:40~11:40 特別講演 「PEG修飾製剤に対する抗PEG抗体の誘導とAccelerated blood clearance (ABC)現象」 演者：石田竜弘(徳島大学) 座長：小田切優樹(崇城大学)
11:00		
11:30		
12:00	11:50~12:50 昼食 理事会・評議員会(第一会議室)	11:50~13:00 昼食
12:30		
13:00	12:50~13:20 総会(大会会場)	13:00~14:00 トピックスⅢ 「細胞培養技術を用いた赤血球生産の現状と課題」 演者：船戸興自(日本赤十字社中央血液研究所) 座長：東 寛(旭川医科大学)
13:30	13:20~14:00 トピックスⅡ 「人工赤血球製剤の生体適合性：非臨床試験による安全性の評価」 演者：酒井宏水(奈良県立医科大学) 座長：丸山 徹(熊本大学)	
14:00	14:00~14:10 Coffee Break 14:10~15:10 一般演題Ⅱ 座長 堀之内宏久(さいたま市立病院) 演者：1 萩沢康介(防衛医科大学校) 演者：2 大浦由香子(埼玉医科大学) 演者：3 庄中達也(旭川医科大学) 演者：4 石原 洋(旭川医科大学)	14:00~14:10 Coffee Break 14:10~15:25 一般演題Ⅴ 座長 武岡真司(早稲田大学) 演者：1 芳野和真(早稲田大学) 演者：2 中原景子(早稲田大学) 演者：3 西浦 衛(早稲田大学) 演者：4 得能正裕(崇城大学) 演者：5 松平 崇(奈良県立医科大学)
15:00	15:10~15:20 Coffee Break 15:20~15:50 会長要望講演「危機的出血に対する新鮮血輸血の経験および症例検討から考える人工血液への期待」 演者：衛藤由佳(旭川医科大学) 座長：小林紘一(慶應義塾大学)	15:25 閉会の辞
16:00	15:50~16:50 一般演題Ⅲ 座長：河野光智(東海大学) 演者：1 大岩加奈(東海大学) 演者：2 橋本 諒(東海大学) 演者：3 石田 治(防衛医科大学校) 演者：4 橋本賢一(防衛医科大学校)	
16:30		
17:00		
17:30		
18:00	18:00~20:00 懇親会	

交通案内

旭川大雪クリスタルホールまでのアクセス

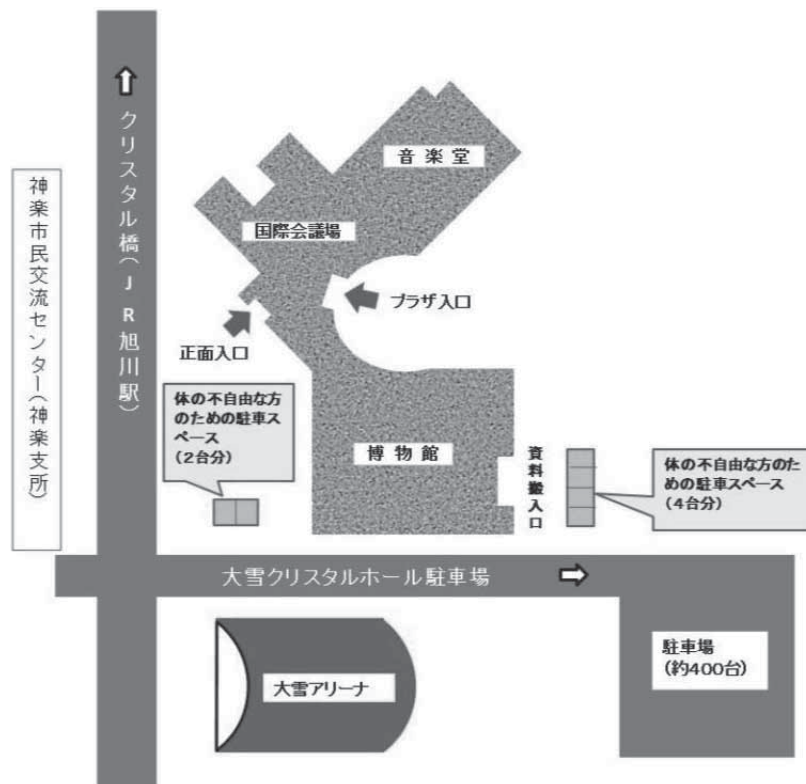
JR「旭川駅より」

- ・ 徒歩 10 分 旭川駅南口西側出口から徒歩 10 分（730m）
- ・ タクシー 2～3 分 旭川駅南口東側または北口タクシー乗り場から 2～3 分
- ・ バス利用の場合……大雪アリーナ前下車、徒歩 3 分

道北バス：39 番、40 番、41 番

旭川電気軌道バス：80 番、81 番

旭川大雪クリスタルホール 案内図



住所

〒 070-8003 北海道旭川市神楽 3 条 7 丁目

TEL：0166-69-2000

○懇親会会場

旭川トーヨーホテル 3 階「琥珀の間」

〒 070-0037 北海道旭川市 7 条 7 丁目 32-12

TEL：0166-22-7575（代表）

第1日目 平成30年10月18日（木）

9：25～9：30 大会長挨拶

9：30～10：30 一般演題Ⅰ

座長：酒井 宏水（奈良県立医科大学医学部）

1. 「一酸化炭素結合型ヘモグロビン小胞体の急性膵炎治療への応用」
田口 和明（慶應義塾大学薬学部）
2. 「急性腎障害に対する一酸化炭素デリバリーシステムの有用性評価」
永崎 太清（熊本大学薬学部）
3. 「バイオミメティックな一酸化炭素デリバリーは脂肪肝の再生不全を改善する」
和田 直樹（熊本大学薬学部）
4. 「内在性一酸化炭素の選択的除去が及ぼす体内時計システムへの影響」
北岸 宏亮（同志社大学理工学部）

10：30～10：40 Coffee Brake

10：40～11：40 トピックスⅠ

「命をつなぐ移植臓器灌流保存方法における人工赤血球（HbV）含有灌流保存液の研究」

演者：松野 直徒（旭川医科大学移植医工学治療開発講座）

座長：木下 学（防衛医科大学校免疫微生物学講座）

11：50～12：50 理事会・評議委員会（第一会議室）

13：00～13：20 総会（大会会場）

13：20～14：00 トピックスⅡ

「人工赤血球製剤の生体適合性：非臨床試験による安全性の評価」

演者：酒井 宏水（奈良県立医科大学医学部）

座長：丸山 徹（熊本大学薬学部）

14：00～14：10 Coffee Brake

14：10～15：10 一般演題Ⅱ

座長：堀之内 宏久（さいたま市立病院呼吸器外科）

1. 「HbV の経骨髄投与により出血性ショックを制御する」
萩沢 康介（防衛医科大学校生理学講座）
2. 「人工酸素運搬体により産科危機的出血を制御する」
大浦 由香子（埼玉医科大学総合医療センター麻酔科）
3. 「肝移植の機械灌流保存時に人工赤血球含有灌流液を用いたブタによる基礎的検討」
庄中 達也（旭川医科大学外科学講座）
4. 「肝臓灌流保存における毛細胆管の微細構造に対する人工赤血球含有灌流液の効果」
石原 洋（旭川医科大学移植工学治療開発講座）

15：10～15：20 Coffee Brake

15:20～15:50 会長要望講演

「危機的出血に対する新鮮血輸血の経験および症例検討から考える人工血液への期待」

演者：衛藤 由佳（旭川医科大学救急医学講座）

座長：小林 紘一（慶應義塾大学医学部）

15:50～16:50 一般演題Ⅲ

座長：河野 光智（東海大学医学部）

1. 「イヌ肺切除周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与による循環動態の変化」
大岩 加奈（東海大学医学部）
2. 「肺切除周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与の急性期及び長期的効果」
橋本 諒（東海大学医学部）
3. 「人工血小板 H12-(ADP)-リボソームによる人工心肺後凝固障害の制御、前臨床段階における評価」
石田 治（防衛医科大学校外科 2）
4. 「リボソーム封入酸素運搬体の致死性出血性ショック（85%出血後蘇生）実験モデルにおける蘇生効果と抗不整脈効果」
橋本 賢一（防衛医科大学校集中治療部）

18:00～20:00 懇親会（旭川トーヨーホテル 3 階「琥珀の間」）

第2日目 平成30年10月19日（金）

9:30~10:30 一般演題Ⅳ

座長：小松 晃之（中央大学理工学部）

1. 「(酵素-アルブミン) クラスターの合成と酵素活性」
市原 聖人（中央大学理工学部）
2. 「アロステリック因子で酸素親和性を調節できる（組換えヘモグロビン（C93A(β))-アルブミン) クラスターの合成」
五十嵐 啓介（中央大学理工学部）
3. ラット出血性ショックモデルを用いた HemoActTM の有効性評価」
鹿島 知周（中央大学理工学部）
4. 「4-フェニル酪酸ナトリウムの血清アルブミン結合に関する構造化学的研究」
小田切 優樹（崇城大学薬学部）

10:30~10:40 Coffee Brake

10:40~11:40 特別講演

「PEG 修飾製剤に対する抗 PEG 抗体の誘導と Accelerated blood clearance (ABC) 現象」

演者：石田 竜弘（徳島大学大学院医歯薬学研究部）

座長：小田切 優樹（崇城大学薬学部）

11:50~13:00 昼食

13:00~14:00 トピックスⅢ

「細胞培養技術を用いた赤血球生産の現状と課題」

演者：船戸 興自（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所研究開発部）

座長：東 寛（旭川医科大学小児科学講座）

14:00~14:10 Coffee Break

14:10~15:25 一般演題Ⅴ

座長：武岡 真司（早稲田大学大学院先進理工学研究科）

1. 「GSSG 内包リボソームの LPS 刺激マクロファージ様細胞に対する効果」
芳野 和真（早稲田大学大学院先進理工学研究科）
2. 「リボソームと血小板の結合能評価に関する研究」
中原 景子（早稲田大学大学院先進理工学研究科）
3. 「負電荷リボソームと血小板の結合能評価に関する研究」
西浦 衛（早稲田大学大学院先進理工学研究科）
4. 「出血性ショックラットに対するヘモグロビン小胞体投与が肝 Cytochrome P450 肝代謝薬物の体内動態に与える影響」
得能 正裕（崇城大学薬学部）
5. 「化学修飾ヘモグロビンの $\alpha\beta$ サブユニット交換反応」
松平 崇（奈良県立医科大学医学部）

15:25 閉会の辞

PEG 修飾製剤に対する抗 PEG 抗体の誘導と Accelerated blood clearance (ABC) 現象

○石田竜弘^{1,2}

¹ 徳島大学大学院医歯薬学研究部, ² 徳島大学産業院

ishida@tokushima-u.ac.jp

Accelerated blood clearance (ABC) 現象は、ポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソーム (SL) を繰り返し投与した際、2 回目投与 SL において、従来の高い血中滞留性が損なわれ、血中から速やかに消失する、という現象として 2000 年にオランダのグループによって報告された。近年同様の現象が PEG 修飾リポソームだけでなく、PEG 修飾ミセル、PEG 修飾ウイルス、PEG 修飾タンパクにおいても生じることが報告されている。PEG は両親媒性の高分子であり、ナノキャリアやウイルス、さらにはタンパク、核酸などに被飾することで、その生体内安定性を高めるとともに抗原性を減少させることから、広く利用されてきた。また、PEG 自体も抗原性や毒性が低いということで、医薬品や化粧品などの添加物としても用いられてきており、このような PEG に対して免疫反応が生じるという報告は驚きをもって迎えられた。

当研究室では、ABC 現象発現機構の解明を目指し、PEG 修飾リポソームを中心としてこれまで検討を重ねてきた。その結果、①初回投与 PEG 修飾リポソームが T cell independent (TI) 抗原として作用し、PEG に対する抗体 (抗 PEG IgM) の分泌が誘導される事、②この抗 PEG IgM の誘導には脾臓辺縁体の B 細胞 (MZ B cell) が重要な役割を果たしている事、③誘導された抗体が血中に存在している間に PEG 修飾リポソームを投与すると PEG に抗体が結合し、補体系の活性化が誘導され、結果として PEG 修飾リポソームが異物として Kupffer 細胞に取り込まれる事、などを明らかにしてきた。

PEG 修飾リポソームは pDNA や siRNA の送達キャリアとしても期待されており、活発に開発研究が続けられている。当研究室では、特に化学修飾を施していない天然型の核酸を用いた場合、pDNA を含有させると Toll-like receptor-9 (TLR-9) を介して B 細胞を活性化して抗 PEG 抗体の分泌誘導を亢進すること、また siRNA を含有させると TLR-7 を介して同様に抗 PEG 抗体の分泌誘導を亢進させることも明らかにした。さらに、最近の検討では、既に市販されている PEG 修飾タンパク製剤に対しても、投与条件や投与量によっては抗 PEG IgM が誘導されること、また何らかの原因で既に抗 PEG 抗体の誘導が生じている個体に対して PEG 修飾タンパクを投与するとその血中滞留性が顕著に減弱され、期待される薬効が得られない可能性があることも示した。実際、日本赤十字社から供与された献血血液を用いた検討で、一定数の抗 PEG IgM キャリア (保有者) が存在することを確認しており、このようなヒトに PEG 修飾タンパク製剤を投与しても薬理効果が得られない可能性が高い。このような事態は患者の治療機会を奪うだけでなく医療経済上でも大きな問題をはらんでおり、看過できない課題であると考えている。

以上の様に、抗原性がないとされていた PEG であるが、高分子上に提示されることでハプテン化され、抗体を誘導することを明らかとした。PEG 化は被修飾体の生体内安定性や抗原性を減弱させるため、未だ高分子医薬開発における golden standard である。しかし、我々の検討から、生体が有する精巧な生体防御機構はやはりこのような PEG 修飾製剤を異物として認識し、排除するということが明らかとなった。今後も、PEG に対する生体防御 (免疫活性化) について検討し、生体に受容されるナノメディシンの開発に資する情報の発信に努める。

命をつなぐ移植臓器灌流保存方法における人工赤血球 (HbV) 含有灌流保存液の研究

○松野直徒^{1,2}, 庄中達也², 金澤寛之^{1,2}, 合地美香子², 大谷将秀², 高橋裕之², 西川祐司³, 小原弘道⁴, 暮地本宙也⁵, 酒井宏水⁶, 古川博之², 東 寛⁷

¹ 旭川医科大学 移植医工学治療開発講座, ² 旭川医科大学 消化器病態外科分野, ³ 旭川医科大学 腫瘍病理学, ⁴ 首都大学東京 機械工学, ⁵ 帯広畜産大学 健康管理センター, ⁶ 奈良医科大学 化学, ⁷ 旭川医科大学 小児科学
mtn@asahikawa-med.ac.jp

移植医療の大きな課題であるドナー臓器不足解決のために心停止臓器などのマージナルな臓器の移植適用拡大が加速されている。しかしながら、肝臓においては虚血再灌流障害の克服のために新しい技術が必要不可欠である。我々は、欧米において臨床レベルで普及している腎臓灌流保存の経験をもとに 2011 年より、医工薬学連携によるマージナルドナーに対応する新しい臓器保存方法の開発（基盤研究(B)）として本格的に研究を開始した。肝臓灌流保存の研究用試作機を作り、ブタ肝臓保存において温度と酸素管理の重要性を明らかにした。さらに、2016 年より、酒井、東らと共同研究を開始し人工赤血球(HbV)を積極的機械灌流法に利用する実験を行ってきた。すなわち医理工の横断型連携によって、心停止後摘出されたブタ肝臓保存に適した灌流保存温度の検討、さらに HbV 含有還流保存液の濃度の検討、工学的酸素消費動態の検討、移植を模擬した体温血液灌流による評価を行った。結果の一部はすでに論文掲載されているが、まとめると、心停止後摘出肝臓の保存は従来から広く行われている単純な冷却保存では再灌流時に重篤な虚血再灌流障害を併発し、機能を発現しないこと。そのためには 22° 程度の subnormothermic 領域の保存がそこまでの温灌流が良いことを明らかにした。また市販されている灌流保存液に 100ml, 300ml 程度の低用量の HbV を混入させ 4 時間灌流保存した肝臓の虚血再灌流障害は単純冷却保存に比較し、有意に門脈圧、肝機能、乳酸値などの低下を示した。また組織中 TNF α や IFN γ なども抑制されていた。これは 2 年以上保存した HbV を用いても傾向は変わらなかった。現在、ヒト臨床で低温灌流保存方法の多施設共同臨床研究を準備中であり、今後、低用量の人工赤血球含有還流液による安全性、有効性について多施設共同臨床研究を始めたいと考えている。

【代表的参考文献】

- 1: 小原弘道, 松野直徒ほか, 臓器機械灌流による臓器機能評価技術の新展開 Organ Biology 2018 年 25 巻 2 号 p.192-196 DOI <https://doi.org/10.11378/organbio.25.192>
- 2: Shonaka T, Matsuno N et al: The application of perfusate with human-derived oxygen carrier solution under subnormothermic machine perfusion for donation after cardiac death (DCD) liver grafts in pigs Transpl Proc. 2018 doi:10.1016/j.transproceed.2018.02.184
- 3: Bochimoto H, Matsuno N et al: The ultrastructural characteristics of porcine hepatocytes donated after cardiac death and preserved with machine perfusion preservation. PLoS One, 2017 12, e0186352. PMID.

トピックスⅡ

人工赤血球製剤の生体適合性：非臨床試験による安全性の評価

酒井宏水

奈良県立医科大学 医学部 化学教室

hirosakai@naramed-u.ac.jp

人工赤血球(ヘモグロビンベシクル, Hb-V)は、精製濃縮 Hb 溶液をリポソームでカプセル化した微粒子である。Hb-V 分散液は長期間保存でき、感染源を排除してあり、血液型に関係なくいつでもどこでも投与できる利点を有する。Hb のカプセル化によって、遊離 Hb の毒性(血管外漏出, NO 捕捉, 血管損傷)を遮蔽できる。既に出血性ショックモデル蘇生試験や、制御不能出血モデルへの投与試験の結果が多く得られており、危機的出血において輸血用血液の投与が出来ない場合に、Hb-V の緊急投与によって救命ができるものと期待される。また、輸血代替としての利用のみならず、Hb-V 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、レーザー治療の標的としての利用、更には、一酸化炭素(CO)治療薬として、様々な炎症性疾患にも有効であることが解ってきた。これまでに得られた多くの安全性・有効性に関する成果については、ほとんど全てが学術誌に公表されている^[1-3]。2015 年より日本医療研究開発機構(AMED)の支援を受け、安全性・有効性について先見的研究を継続するとともに、PMDA との協議を重ね、製造工程の確立と非臨床安全性試験などを順次進めてきた。その結果についても報告したい。

【文献】

- 1) Sakai H. Overview of potential clinical applications of hemoglobin vesicles (HbV) as artificial red cells, evidenced by preclinical studies of the academic research consortium. J Funct Biomater. 2017; 8: e10
- 2) 酒井宏水, 堀之内宏久, 東 寛, 小田切優樹, 小林絃一. 輸血代替としての人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の安全性試験(総説). 人工血液 2013; 21: 36-48
- 3) 酒井宏水. 人工赤血球(ヘモグロビンベシクル)製剤の新しい利用法(総説). 日本輸血細胞治療学会誌. 2018; 64(印刷中)

細胞培養技術を用いた赤血球生産の現状と課題

○船戸興自¹，栗田 良¹

¹ 日本赤十字社 血液事業本部 中央血液研究所 研究開発部

k-funato@jrc.or.jp, r-kurita@jrc.or.jp

将来的な献血者人口の減少に対する懸念や、輸血感染症の低減といった観点から、近年血液製剤の試験管内製造に対する期待は高まっている。当研究所においても iPS 細胞、さらに不死化赤血球前駆細胞株を用いた赤血球の生産に取り組んでいる。

赤血球を生体外で生産する方法としてこれまでは造血幹細胞 (HSC) を用いた赤血球生産が試みられてきた。多くの実績があり増殖効率や赤血球生産効率も高い。しかしながら、HSC の増殖能には限りがあり、安定的かつ大量に赤血球を生産する用途には使用しにくいのが現状である。このような観点から近年では、無限増殖能を有する iPS 細胞や不死化細胞株を用いた赤血球生産法が注目されている。

iPS 細胞は無限増殖能と 3 胚葉分化能を有することから、赤血球に限らず様々な細胞の原料となり得る。赤血球生産も可能であるが、再現性がやや乏しい点や分化誘導期間が長い点など、課題もある。これらの課題を克服する一つの方法として不死化赤血球細胞株を用いる方法がある。不死化細胞株は増殖と分化を薬剤の添加によって制御されており、任意のタイミングで前駆細胞の状態から赤血球への分化誘導を行う事が可能である。不死化細胞株が樹立された当初は赤血球の生産効率(脱核率)は低かったが、ここ数年で赤血球生産効率が向上し、生産された赤血球の機能解析も進んでいる。

本日は赤血球生産技術の現状を総括するとともに、現在抱える課題点や今後の展望について報告する。

危機的出血に対する新鮮血輸血の経験および症例検討から考える人工血液への期待

○衛藤由佳¹，館岡一芳²

¹ 旭川医科大学病院 集中治療部，² 名寄市立総合病院 麻酔科

麻酔関連偶発症症例調査によると，出血は手術室における心停止の原因の約 1/3 を占めている。術中の大量出血・急速出血といった患者を危機的状況に陥れる出血が発生した際は「危機的出血」として麻酔科医 / 外科医がコマンダーとなり，非常事態宣言をして指揮命令系統を確立し，救命のために適切な輸血療法を行う必要がある。

演者の前任地である名寄市立総合病院は道北に位置する 3 次医療機関であり，四国 4 県と同等の広大な医療圏を担う総合病院である。適切な在庫保持のため血液製剤の院内在庫は必要最低限であり，最も近い血液センターまで約 80km 離れていることから，危機的出血の際は救命のための新鮮血輸血もやむを得ない状況となる。過去に同院で新鮮血輸血を施行した 6 症例について検討した結果，緊急手術が 6 例中 5 例であり，事前に準備血を用意できない状況で危機的出血が起きた際に新鮮血輸血が必要となっていた。出血量の中央値は 9880ml であり転帰は死亡 2 例，悪化転院 1 例，軽快転院 3 例であった。新鮮血輸血の問題点は GVHD の発症や溶血，輸血後感染症であるが，今回の検討ではいずれもみとめなかった。

偶発症例調査では大量出血による心停止の転帰は不良であり，心停止に至らないためには血管内容量と酸素運搬能の両者の維持が重要である。人工赤血球が臨床応用される上での利点は，酸素運搬能の維持のみならず，必要時に速やかに投与できること，GVHD や輸血関連感染症の懸念がないことと考える。人工赤血球が血管内容量保持にどの程度寄与するのかは検討が必要である。大量出血の際，血管内容量維持を目的とした膠質液等の大量輸液により，希釈性凝固障害が生じることが知られている。近年 iPS 細胞による血小板作成が話題となっているが，大量出血に伴う凝固障害の制御は必要不可欠であり，人工血液による凝固止血能の改善にも期待したい。特に血液製剤の確保が困難な地域において，在庫保持が可能である人工血液に期待する役割は大きいと考える。

一般演題 I-1

一酸化炭素結合型ヘモグロビン小胞体の急性膵炎治療への応用

○田口和明¹, 永尾紗理², 酒井宏水³, 丸山 徹², 小田切優樹^{4,5}

¹ 慶應義塾大学薬学部, ² 熊本大学薬学部, ³ 奈良県立医科大学, ⁴ 崇城大学薬学部, ⁵ 崇城大学 DDS 研究所
taguchi-kz@pha.keio.ac.jp

【緒言】 ヘモグロビン小胞体(HbV)に一酸化炭素(CO)を担持させた一酸化炭素結合型 HbV(CO-HbV)は新規 CO 供与体であり, これまでに我々は CO-HbV が抗炎症作用を介して炎症性疾患である特発性肺線維症や潰瘍性大腸炎に対して顕著な治療効果を発揮することを報告している^{1,2)}. 本講演では, CO-HbV が炎症性疾患の 1 つである急性膵炎に対して有効性を示した結果を紹介する.

【実験】 急性膵炎モデルマウスは, セルレイン誘発急性膵炎モデルマウスとコリン欠乏エチオニン添加食(CDE)誘発急性膵炎モデルマウスの 2 種類を作製し, 実験に用いた. 生理食塩水, HbV(1,000mg Hb/kg), CO-HbV(1,000mg Hb/kg)は規定時間に尾静脈内単回投与した. 血漿及び臓器サンプルを規定時間に回収し, 各々の評価に用いた.

【結果と考察】 致死性 CDE 誘発急性膵炎モデルマウスを用い, 生存率を評価した結果, 生理食塩水投与群, HbV 投与群と比較して, CO-HbV 投与群は有意な生存期間の延長を示した. また, 両モデルともに, 生理食塩水および HbV 投与群においては, 血中アミラーゼ・リパーゼの上昇を示したが, CO-HbV 投与群ではこれらの上昇を抑制し, 組織学的な膵臓の変化も明らかに改善した. さらに CO-HbV 投与は, 膵組織への好中球の浸潤とそれに伴う膵組織の酸化傷害を抑制した. 興味深いことに, CO-HbV は膵臓におけるマクロファージの極性を炎症抑制型マクロファージである M2 様マクロファージに可塑性を傾けており, その結果, 膵臓における炎症性サイトカイン産生を抑制し, 抗炎症性サイトカインの産生を促進していた.

【結論】 CO-HbV は CO の強力な抗炎症・抗酸化効果を発揮することで, 急性膵炎に対し治療効果を発揮したと考えられ, 新規急性膵炎治療薬候補として期待できる.

【文献】

1. Nagao S, Taguchi K, Sakai H, Tanaka R, Horinouchi H, Watanabe H, et al., *Biomaterials*. 2014, 35, 6553.
2. Nagao S, Taguchi K, Miyazaki Y, Wakayama T, Chuang VT, Yamasaki K, et al., *J Control Release*. 2016, 234, 49.

一般演題 I-2

急性腎障害に対する一酸化炭素デリバリーシステムの有用性評価

○永崎太清¹, 柳澤洋輝¹, 田口和明^{2,3}, 西田健人¹, 前田仁志¹, 酒井宏水⁴, 渡邊博志¹, 深川雅史⁵, 小田切優樹³, 丸山 徹¹

¹熊本大薬・薬剤学分野, ²慶應大薬・薬効解析学, ³崇城大薬・薬物動態学, ⁴奈良医大・化学教室, ⁵東海大医・腎内分泌代謝内科
136p1038@st.kumamoto-u.ac.jp

【緒言】急性腎障害(AKI)は、脱水、手術、薬剤や災害などの種々の要因で腎機能が急激に低下する病態であり、重篤化すると末期腎不全を経て維持透析へ移行する。近年、AKIが慢性腎臓病(CKD)の重要な危険因子であることが明らかとなり、“AKI to CKD”という新たな腎不全進展経路が提唱されるようになってきた。超高齢社会に突入した本邦では、AKIを切っ掛けにCKDへ移行する割合が増加すると予想されており、AKIに対する抜本的な対策が求められているが、未だ有効な治療薬は開発されていない。そこで本研究では、生理活性ガスであり、多様な生物活性を保持する一酸化炭素(CO)に着目し、赤血球(RBC)にCOを付加したCO-RBCのAKIに対する腎保護効果を評価した。

【実験】腎臓中のCO量はガスクロマトグラフィーにより測定した。IR誘発AKIモデルマウスは、ICRマウスの両腎動脈をクリップで虚血(35分間)し、その後に血流を再灌(Ischemia-reperfusion: IR)することで作成した。虚血の30分前にCO-RBC(1400mg Hb/kg)を静脈内投与し、投与24時間後に腎保護効果を評価した。

【結果と考察】CO-RBC投与により、腎臓中のCO量が有意に増加した。IR処置群では、腎機能の指標であるBUN、血清クレアチニン値の有意な上昇が観察されたが、これらの上昇はCO-RBC投与により有意に低下した。また、CO-RBCによる腎保護効果はPAS染色による組織学的評価からも確かめられた。対照的に、RBC投与による腎保護効果は認められなかったことから、CO-RBCで認められた腎保護効果はCOに起因している可能性が示された。腎組織における炎症及び酸化ストレスマーカーをPCR法及び免疫染色により評価したところ、病態群では炎症性サイトカインの産生亢進と、酸化ストレスマーカーの蓄積が認められたが、これらの変動はCO-RBC投与によって顕著に抑制された。また、IR処置群で認められたアポトーシス陽性細胞の増加はCO-RBC投与によって抑制されていた。これらCO-RBC投与群の抗酸化・抗炎症・抗アポトーシス効果は、RBC投与群では認められなかった。さらにCO-RBC投与群では、AKI-CKDモデルで観察された腎臓の線維化が抑制されていた。

【結論】CO-RBCより腎臓へ供給されたCOは、抗酸化・抗炎症・抗アポトーシスといった多面的な作用を発揮する結果、“IR誘発AKI”及び“AKI to CKD”の両者に対して優れた腎保護効果を発揮したことから、CO-RBCはAKIに対する新規治療薬としての可能性を秘めている。

一般演題 I-3

バイオミメティックな一酸化炭素デリバリーは脂肪肝の再生不全を改善する

○和田直樹¹, 柳澤洋輝¹, 田口和明^{2,3}, 前田仁志¹, 木下 学⁴, 酒井宏水⁵, 渡邊博志¹, 小田切優樹², 丸山 徹¹

¹熊本大薬・薬剤学分野, ²崇城大薬・薬物動態学, ³慶應大薬・病態解析学, ⁴防衛医大・免疫微生物学, ⁵奈良医大・化学教室
152p2035@st.kumamoto-u.ac.jp

【緒言】 肝硬変や肝癌等の非代償的な末期肝不全に対しては、肝移植が唯一の治療選択肢となる。肝移植では、肝組織の再生不全が問題となるが、中でも脂肪浸潤をきたした肝臓(脂肪肝)は正常肝に比べて再生能に乏しく、グラフト機能不全を生じやすいことが問題視されている。そのため本邦では、脂肪肝は肝移植ドナーの適応除外であり、慢性的なドナー不足の一因となっている。他方、肝癌に対しても部分肝切除が施行されるが、脂肪肝の場合には術後の合併症が懸念される。従って、脂肪肝切除後の肝再生不全に対する治療法の開発は、①ドナー適応拡大、②切除後の予後改善の観点から意義深い。我々は、生理活性ガスである一酸化炭素(CO)を赤血球(RBC)中のヘモグロビンに結合させた CO enriched RBC(CO-RBC)がバイオミメティックな CO デリバリーとして機能すること、また脂肪肝炎モデルマウスに対して優れた肝保護効果を発揮することを報告してきた。本研究では、脂肪肝マウスに 70% 肝切除(PH)を施し、肝再生に及ぼす CO-RBC の影響について検討した。

【実験】 マウス精製 RBC に CO ガスを付加することで CO-RBC を作成した。健常マウス及び高脂肪食(HFD)を 2 週間給餌し作製した脂肪肝モデルマウスに 70% PH を行い、術後 48 時間目に各種評価を行った。また、肝臓中 CO 量はガスクロマトグラフィーを用いて測定した。

【結果】 CO-RBC を静脈内投与すると、肝臓中の CO 量が有意に増加した。この CO の肝移行性は脂肪肝マウスでより増大した。健常マウスに 70% PH 処置を行い、処置直後に CO-RBC(1400mg Hb/kg), RBC(1400mg Hb/kg), saline を静脈内に単回投与し、PH 処置 48 時間後における肝重量を測定したところ、Saline 投与群と比較して、CO-RBC 投与群では、肝重量の増加、すなわち肝再生の促進が認められた。この結果は、肝組織切片を用いた細胞増殖マーカーの発現解析からも支持された。また、肝機能マーカーとして、血中アルブミン濃度を測定したところ、肝重量の結果を反映して、70% PH による血中アルブミン濃度の低下は CO-RBC 投与により改善された。これらの結果は、HFD 脂肪肝マウスにおいても再現された。対照的に、RBC 投与群では、健常及び脂肪肝マウスのいずれに対しても肝再生効果が認められなかった。次に、CO-RBC による肝再生促進効果が CO の脂質低下作用や肝障害抑制効果に起因するものか否かを検証すべく、HFD 給餌に伴う肝臓への脂質蓄積及び肝障害マーカーに及ぼす CO-RBC の影響を検討したところ、単回投与では CO-RBC による脂質蓄積抑制効果や肝障害低減作用を見出すことができなかった。これらの結果から、CO-RBC は肝障害や脂肪浸潤を改善することなく、独立した機序で肝再生を促進している可能性が示唆された。

【結論】 CO-RBC は、健常肝だけでなく、脂肪肝に対しても、肝切除後の再生を促進することが判明した。CO-RBC は肝再生不全に対する新規治療薬としての可能性を秘めている。

一般演題 I-4

内在性一酸化炭素の選択的除去が及ぼす体内時計システムへの影響

○北岸宏亮¹, 峯岸彩夏¹, 根本 滋², 佐上郁子³, 加納航治¹

¹ 同志社大学理工学部, ² 同志社女子大学薬学部, ³ 京都府立大学生命環境学部

hkitagis@mail.doshisha.ac.jp

【緒言】 動物の体内には内在性の一酸化炭素(CO)が存在する。内在性 CO にはさまざまな生理機能があると提唱されているが、その全容は明らかではない。なぜならば CO はヘム代謝の際の副産物として産生するため、遺伝子ノックアウトによる欠失状態を作ることが困難であるためである。我々はこれまでに生体内で CO を選択的に除去できる化合物 hemoCD を開発し、その利用について報告してきた。今回、内在性 CO の選択的除去が生物リズムを司る時計遺伝子の発現リズムに大きく影響を与えることを見出したので、報告する。

【実験】 hemoCD の PBS 溶液をマウスに腹腔投与し、主に肝臓内の時計遺伝子の mRNA 定量を行った。コントロール群として、hemoCD の中心に鉄を持たない Fb-hemoCD を同量投与したマウスを使用した。

【結果と考察】 hemoCD 溶液を投与すると、内在性 CO が除去されて、時計遺伝子群(Per, Cry など)の発現リズムがいずれも大きく変動した。時計遺伝子の発現には、CO 結合性転写因子タンパク質である NPAS2 が関わっている。そこで NPAS2 の活性を投与の前後で比較した結果、NPAS2 による転写活性が CO の濃度に依存して大きく変化していることが明らかとなった。さらに動物の血中 CO を除去すると、炎症性サイトカインである TNF- α の産生が誘発され、それによる生体内リズムの変動も観測された。一時的な CO の低減は、その後約 19 時間にわたって時計遺伝子の発現に影響することが明らかとなった。

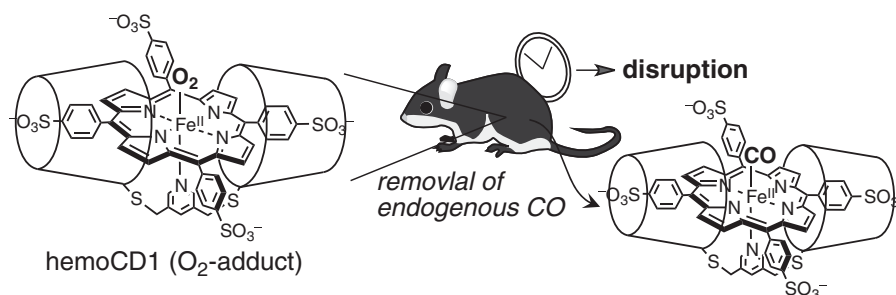


Fig. 1. A flowchart of this study.

【結論】 CO 除去分子 hemoCD を用いることによって、内在性 CO が体内時計調節システムに直接的に寄与していることが明らかとなった。

【文献】

1) S. Minegishi, I. Sagami, S. Negi, K. Kano, H. Kitagishi, *Sci. Rep.* **2018** accepted.

一般演題Ⅱ-1

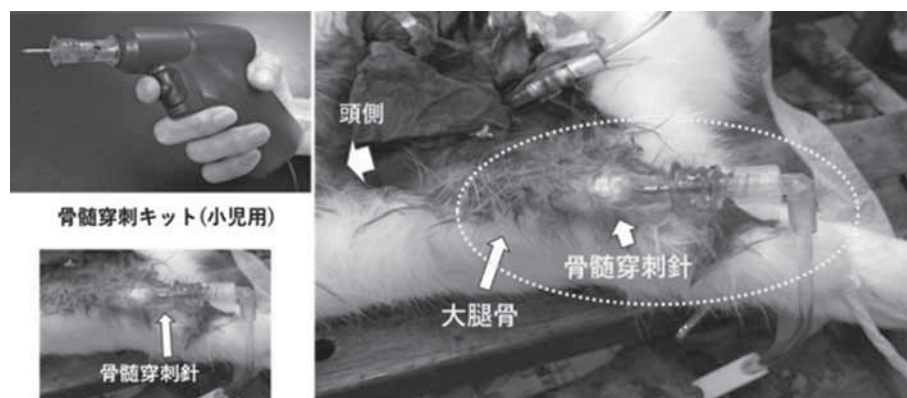
HbV の経骨髄投与により出血性ショックを制御する

○萩沢康介¹, 木下 学², 酒井宏水³

¹ 防衛医科大学校生理学講座, ² 防衛医科大学校免疫微生物学講座, ³ 奈良県立医科大学化学教室

hagisawa@ndmc.ac.jp

【緒言】 出血性ショックでは末梢血管が収縮・虚脱するため、輸液ルートの確保に難渋する場合も多い。アメリカ外科学会が作成した Advanced Trauma Life Support (ATLS) においても救急現場では末梢静脈の代替手段として骨髄輸液ルートを推奨している。今回、ウサギ出血性ショックモデルを用いて、prehospital での蘇生輸液としての HbV の有用性について検討した。



家兎大腿骨よりの骨髄輸液ルートの刺入

【実験】 ウサギ(雄性 2.5kg)の大腿動脈から 100ml の全血を脱血する。脱血の後半で 50ml の生理食塩水を大腿静脈から投与すると Hb 濃度は 5g/dl 前後、平均動脈圧は 20mmHg 前後まで急速に低下する。直ちに大腿骨末端部位に EZ-IO 骨髄穿刺システム (Teleflex 社, NC, USA) を使用して輸液ルートを確認し(右図)、以下の輸液を行った。1: 乳酸リンゲル 50ml 投与 (n=8)。2: 5% ヒトアルブミンを 50ml 投与 (n=10)。3: HbV30ml に続いて 5% ヒトアルブミンを 20ml 投与 (n=10)。

これら 3 群の血行動態、血算、血液ガス分析、凝固機能検査を経時的に測定し、24 時間後の予後についても比較した。

【結果】 HbV の急速骨髄投与により Hb 濃度は 7.1 ± 0.6 g/dl に、平均動脈圧は 48 ± 9 mmHg まで回復したが、5% アルブミン、L-乳酸ナトリウムリンゲル液の急速骨髄投与では Hb 濃度と平均動脈圧はそれぞれ 3.4 ± 0.4 g/dl と 32 ± 7 mmHg, 4.5 ± 0.4 g/dl と 26 ± 4 mmHg であり、ショックからの回復は認められなかった。24 時間後の生存率は HbV 群が 70% に対して、5% アルブミン群と L-乳酸ナトリウムリンゲル液群は 30% と 0% であった。

【結論】 HbV の経骨髄投与は出血性ショックから回復させることに成功し、prehospital での蘇生輸液として有用であることが示唆された。

一般演題Ⅱ-2

人工酸素運搬体により産科危機的出血を制御する

○大浦由香子¹, 照井克生², 萩沢康介³, 木下 学⁴, 酒井宏水⁵

¹ 埼玉医科大学総合医療センター麻酔科, ² 埼玉医科大学総合医療センター産科麻酔科, ³ 防衛医科大学校生理学講座, ⁴ 防衛医科大学校免疫微生物学講座, ⁵ 奈良県立医科大学化学教室

youra@saitama-med.ac.jp

【緒言】 毎年 50 人前後の妊産婦が死亡しており, その中でも産科危機的出血は妊産婦死亡原因の第一位である。危機的出血に陥った場合は早期から輸血が必要となるが, 日本では分娩の半数以上が産科一次施設で行われており輸血準備が十分とは言えず, 初期治療に困難を伴う場合がある。本研究では妊娠末期のウサギに産科危機的出血を生起させ, 凝固障害, 血小板低値, 貧血を伴う出血性ショックの病態モデルを確立する。さらに赤血球輸血の代替として HbV を投与して, 急性期の救命効果を検証し, 産科一次施設から集約的治療が可能な大規模病院に到着するまでの初期治療として HbV が赤血球(以下 RBC)輸血を代替しうるかを検討する。

【実験】 妊娠末期のウサギを開腹し, 子宮間膜の動静脈の根部付近を切離して危機的出血を起こす。出血から 60 分間, 5 分毎に出血量と等量の HbV:25%アルブミンを 4:1 の混合液を投与して血行動態を維持させる。陽性対象群として RBC と PPP を 1:1 で輸血する。陰性対象群は 5%アルブミンを投与し, 各々の母体への影響の違いを経時的に観察する。

【結果と考察】 総出血量は 212+125 ml だった。60 分後の Hb 濃度(平均値)は HbV 群(n=4)で 8.6 g/dL, RBC 群(n=2)で 10.8 g/dL, アルブミン群(n=4)で 2.4 g/dL であった。出血中の平均動脈圧は HbV 群は 60 mmHg 前後, RBC 群で 50 mmHg 後半を維持でき, アルブミン群は 40 mmHg 前後であった。乳酸値の上昇も HbV 群は 1.6 mmol/L, RBC 群で 0.7 mmol/L, アルブミン群は 4.3 mmol/L であった。HbV は出血開始後 60 分間の循環動態維持にはアルブミン以上の期待が持てると考えられる。

【結論】 産科危機的出血のモデルを作成した。HbV は産科危機的出血の初期治療として有効である。

一般演題Ⅱ-3

肝移植の機械灌流保存時に人工赤血球含有灌流液を用いたブタによる基礎的検討

○庄中達也¹, 松野直徒¹, 小原弘道², 吉川 遼², 西川祐司³, 暮地本宙己⁴, 酒井宏水⁵, 東 寛⁶, 石井大介¹, 合地美香子¹, 大谷将秀¹, 金澤寛之¹, 古川博之¹

¹ 旭川医科大学 外科学講座 消化器病態外科学分野, ² 首都大学東京 システムデザイン学部 機械システム工学科, ³ 旭川医科大学 病理学講座 腫瘍病理学分野, ⁴ 帯広畜産大学 保健管理センター, ⁵ 奈良医科大学 医学部 化学, ⁶ 旭川医科大学 小児科
shonaka@asahikawa-med.ac.jp

【緒言】肝移植ではその初期に Primary graft dysfunction と呼ばれるグラフト肝不全が5-7%の頻度でおきるとされている¹⁾²⁾。この原因は虚血再灌流障害にあるとされわれわれはこの改善のために機械灌流保存を用いることを研究している。ピッツバーグ大学からの報告³⁾によると、肝移植時の灌流保存にウシ由来ヘモグロビン含有液(Hemopure™)を添加した灌流液による機械灌流保存で、グラフト機能を改善させることがブタを用いた基礎研究で報告された。

【実験】目的：肝臓の機械灌流保存に人工赤血球(hemoglobin vesicles, HbV)を含有させることで得られる効果を検討する。方法：20-30kgの雑種ブタを用い、ドナー肝を4時間の冷却保存(Group1)、灌流液のみの灌流保存(Group2)、Hct2-3%程度の人工赤血球含有灌流液(Group3)、Hct 6-7%程度の人工赤血球含有灌流液(Group4)で灌流保存を行い、移植後の状態を模擬し2時間のブタ自己血を用いた機械灌流を行いその効果を検討した。HbVは作成後18-20ヶ月経過したものを使用した。

【結果と考察】灌流中120分での酸素消費量はGroup2:3:4=0.35:0.46:0.50と少量のHbVでもドナー肝での酸素消費量が増加している傾向が見られた。再灌流30分の平均AST(IU/L)はGroup1:2:3=3757:1150:1279:804とGroup4は有意に低値であった。灌流中および灌流終了後のTNFαはHbV含有灌流液で減少する傾向が見られた。肝臓への機械灌流を行うことで中心静脈や類洞周りを中心とした障害が冷却保存群と比較して抑制される傾向が見られた。

【結論】肝灌流保存を行う際、灌流液にHbVを添加することで肝組織に酸素供給量を増やし、肝細胞障害や代謝障害を軽減しできる可能性があることが示唆された。HbVは長期間保存後でも酸素運搬能が維持された。

【文献】

- 1) Strasberg SM, Howard TK, Molmenti EP et al, *Hepatology*. 1994, 20, 829-838
- 2) 古川博之, 岸田明博, 大村孝志ら, *外科*. 1998, 60, 768-771
- 3) Fontes P, Lopez R, Van DP et al, *AM J Transplant*. 2015, 15, 381-394

一般演題Ⅱ-4

肝臓灌流保存における毛細胆管の微細構造に対する人工赤血球含有灌流液の効果

○石原 洋¹, 暮地本宙己^{1,4}, 合地美香子², 金澤寛之^{1,2}, 庄中達也², 小原弘道³, 松野直徒^{1,2}, 古川博之²

¹ 旭川医科大学移植医工学治療開発講座, ² 旭川医科大学外科学講座消化器病態外科学分野, ³ 首都大学東京機械工学, ⁴ 帯広畜産大学保健管理センター

botimoto@obihiro.ac.jp

【緒言】 肝移植における脳死ドナーの不足は国際的に深刻な問題であり, 心停止ドナー肝の活用はその解決法の一つとされている. 従来の単純冷却法に代わる機械灌流保存法の開発を試みるため, 我々は灌流条件が肝細胞に与える影響についての超微形態解析を行っている¹⁾. 今回私たちは灌流保存時の肝細胞および毛細胆管の微細構造を解析した上で, 人工赤血球(Artificial oxygen carrier, AOC)含有灌流液が毛細胆管の微細構造に与える影響を検討した.

【実験】 体重 25 kg 前後の雑種ブタを, 温阻血 1 時間後に 4 時間の, UW 液を用いた hypothermic machine perfusion (HMP) および, UW 液あるいは AOC 含有灌流液を用いた Subnormothermic machine perfusion (UW_SNMP あるいは AOC_SNMP) を実施する実験群に区分し, 各群のブタ肝臓の肝細胞内および毛細胆管の微細構造変化を, 透過型および走査型電顕で比較検討した.

【結果と考察】 まず, 開腹直後の正常なブタ肝臓を観察すると, 杆状のミトコンドリアを豊富に含む肝細胞が確認され, 毛細胆管周囲には層板を形成するゴルジ装置の局在が観察された. 温阻血 1 時間後には, 肝細胞内に巨大な空胞と, 二重膜の小胞様構造をもつ特異なミトコンドリアが出現し, 毛細胆管断面積は正常と比較して著明に減少したが, 毛細胆管周囲のゴルジ装置の層板構造は保たれていた. その後, HMP 群では肝細胞内のミトコンドリアが膨化傾向を示す一方で, UW_SNMP 群ではミトコンドリアの膨化傾向が比較的抑制され, 細胞質成分を隔離する巨大な空胞も多く観察されたことから, SNMP は HMP と比較して肝細胞の保護効果に優れていると考えられた. 温阻血 1 時間後に減少した毛細胆管断面積の回復度合いも, HMP 群と比較して, UW_SNMP 群で有意に大きかったが, HMP および UW_SNMP 群の両方で, 毛細胆管周囲に層板構造を持つゴルジ装置は観察できなかった. そこで AOC_SNMP 群のブタ肝臓の毛細胆管を観察したところ, 毛細胆管周囲に層板構造を持つゴルジ装置が再び局在していることが確認できた.

【結論】 温阻血後の肝細胞内では, 低酸素環境により発生した障害因子を隔離し, 細胞を生存させるための細胞内小器官の変化が出現するが, 肝臓の灌流保存において SNMP は HMP より細胞生存のための代謝を抑制しないため, 結果として肝細胞の障害を緩和すると考えられた. さらに AOC の付加は, 低酸素環境を改善してゴルジ装置も含めた毛細胆管周囲の細胞内環境の正常化を促すことから, 胆汁産生機能の回復に有効である可能性が, 本研究で示された.

【文献】

1) Bochimoto H, Matsuno N, Ishihara Y, Shonaka T, Koga D, Hira Y, et al., *PLoS One*. **2017**, *12*, e0186352.

一般演題Ⅲ-1

イヌ肺切除周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与による循環動態の変化

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

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

ohiwakana@gmail.com

【緒言】 ヘモグロビン小胞体(HbV)は, 赤血球からヘモグロビンを抽出精製し, リボソームに内包, 膜表面をPEG修飾して粒径を250nmに調製した粒子である。出血性ショックに対する蘇生液としての臨床応用が期待されているが, 輸血頻度の高い外科手術時の大量出血に対する使用も想定される。血液型がなく, ウィルスなどの感染源を排除され, 室温で2年以上の備蓄が可能であるため, 手術室に常備でき, いつでも遅滞なく投与が可能になると考えられる。これまでの実験でマウスやラットの肺切除モデルでの周術期出血において, ヘモグロビン小胞体の投与が血液や組織の酸素化に寄与し, 呼吸循環動態を安定させることが明らかになっている。手術侵襲からの回復にも明らかな有害事象を認めず, 赤血球と同等の効果を示した。より臨床に近い実験としてイヌに肺切除術を行い, 同時に脱血する周術期出血モデルを作成し, ヘモグロビン小胞体投与の有効性を検討した。

【実験】 イヌ(ビーグル犬, 体重約10kg)に対して全身麻酔, 人工呼吸器管理下に手術を行った。右大腿静脈よりスワンガンツカテーテルの挿入と右大腿動脈ラインの確保を行い, 血行動態のモニタリングと血液ガス分析で血液の酸素化を評価した。左肺全摘後に, 動脈ラインから循環血液量の30%(約250ml)を50mL/minの速さで脱血し, 同量のヘモグロビン小胞体溶液(ヘモグロビン濃度8.6g/dl)を投与した。或いはコントロールとして5%アルブミン溶液, 生理食塩水を投与した。肺切除前および後, 脱血後, 各輸液後に血圧, 心拍出量等の循環動態の指標の測定, 血液ガス分析を行った。全身麻酔を維持したまま, 1時間ごとに5時間までデータ採取を行った。

【結果と考察】 脱血前に119/81mmHgであった血圧は30%脱血により49/34mmHgまで低下し, ショックに陥った。ヘモグロビン小胞体溶液の投与により, 90/48mmHgまで回復し, 維持された。血液ガス分析ではpHが7.06まで低下したが, 7.22まで回復した。心拍出量は脱血により1.4L/minにまで低下したが, ヘモグロビン小胞体の投与で3.7L/minまで上昇し, 安定した。

【結論】 イヌ肺切除周術期出血モデルにおいて, ヘモグロビン小胞体の投与は血液や組織の酸素化に寄与し, 循環動態を安定させたと考えられた。外科手術時の大量出血に対して, 即時に投与可能なヘモグロビン小胞体が有効である可能性が示唆された。

肺切除周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与の急性期及び長期的効果

○橋本 諒¹, 河野光智¹, 小野沢博登¹, 大岩加奈¹, 増田良太¹, 渡辺真純², 堀之内宏久³, 酒井宏水⁴, 小林絃一², 岩崎正之¹

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

hryo@tokai.ac.jp

【緒言】 輸血が可能な医療施設での外科手術においても、大量出血した場合、輸血の遅れによって救命出来ない、或いは低酸素脳症などの不可逆的傷害が残る症例がある。ヘモグロビン小胞体 HbV は、期限切れ赤血球からヘモグロビンを抽出精製し、リポソームに内包、膜表面を PEG 修飾して粒径を 250nm に調製した人工酸素運搬体である。血液型がなく、ウィルスなどの感染源を排除され、室温で 2 年以上の備蓄が可能である。出血性ショックに対する蘇生液などとしての臨床応用が期待されているが、輸血頻度の高い、外科手術時の大量出血に対する使用も見込まれる。ヘモグロビン小胞体は手術室に常備でき、いつでも遅滞なく投与が可能になると考えられる。我々はマウス、ラット肺切除モデルを用い、ヘモグロビン小胞体の有効性と安全性を検討してきた。

【実験】 マウス或いはラットに人工呼吸器管理下に開胸し、左肺全摘除する。同時に動脈カニューレより、マウスでは全循環血液量の 40% を、ラットでは 30% を脱血する。等量の各種輸液を行い、以下の実験群を作成した。(1) リンゲル液或いは生理食塩水群、(2) 5% アルブミン群、(3) ヘモグロビン小胞体群: HbV を 5% アルブミン液に分散した液体 (Hb 濃度 8.6 g/dl)、(4) 洗浄赤血球群: マウス或いはラット赤血球を生理食塩水で洗浄後、5% アルブミン液に分散させた液体 (Hb 濃度 8.6 g/dl)。閉胸後、人工呼吸器を止め、自発呼吸を確認して抜管した。

【結果と考察】 マウスモデルでは術後 1 週間までの観察を行った。リンゲル液群は全例が直後に死亡し、アルブミン群は 50% が死亡した。ヘモグロビン小胞体群と赤血球群では 100% の長期生存が得られ、摂食量、体重や自発運動量の回復も両群で同等だった。ラットモデルでは人工呼吸器離脱後 1 時間まで血圧のモニタリングと動脈血液ガス分析を行った。脱血により血圧は 30 mmHg までに低下するが、各輸液で上昇した。人工呼吸器を停止すると、生理食塩水群では血圧が急速に低下し、全例が死亡した。アルブミン群では 60% の生存率であった。ヘモグロビン小胞体群と赤血球群は循環動態が安定し、全例が生存した。PaO₂ はヘモグロビン小胞体群では人工呼吸器離脱後も赤血球群と同等で、血中乳酸値も低値が維持された。

【結論】 左肺全摘術中に大量脱血するマウス及びラットモデルで、ヘモグロビン小胞体の投与は急性期では呼吸循環動態を安定させ、長期的には術後の回復に重篤な影響を及ぼさず、赤血球輸血と同等の結果を示した。外科手術時の大量出血に対して、ヘモグロビン小胞体の投与が有効である可能性が示唆された。

一般演題Ⅲ-3

人工血小板 H12-(ADP)-リポソームによる人工心肺後凝固障害の制御，前臨床段階における評価

○石田 治¹，萩沢康介²，鈴木英紀⁴，木下 学³

¹ 防衛医科大学校外科²，² 同生理学，³ 同免疫微生物学，⁴ 日本医科大学

oishida2000@gmail.com

【緒言】 人工心肺後凝固障害は血小板機能障害，消費性凝固障害，線溶系の亢進等が複雑に関与しあうことによって生じる．人工心肺を用いた心臓手術では術後大量出血がしばしば経験され，血小板輸血を要することも少なくない．人工心肺動物モデルにおいて，人工血小板 H12-(ADP)-リポソームが人工心肺後凝固障害の制御へ有用であるかにつき検討し，前臨床段階での評価を行った．

【実験】 NZW 家兎 (3 kg) を用いて人工心肺後凝固障害モデルを作成した．人工心肺手術終了後，① Platelet poor plasma 単独投与 (PPP 群)，② Platelet rich plasma 単独投与 (PRP 群)，③ PPP+H12-(ADP)-リポソーム (PPP+H12 群)，④ PRP+H12-(ADP)-リポソーム (PRP+H12 群) の 4 群に分け術後投与を行い，血液凝固止血能の評価を行った．

【結果と考察】 PPP 群と PPP+H12 群においては血液凝固止血能の改善が認められず，新規に(不活化していない)血小板が投与される必要があると示唆された．PRP 群と PRP+H12 群では血小板数，血液凝固能検査，血小板機能検査では同等の改善がみられたが，出血時間検査においては PRP + H12 群が PRP 群を有意に上回る改善を示した (PRP+H12 群：257 ± 121 vs PRP 群：488 ± 122 sec, $p < 0.001$)．この結果から，H12-(ADP)-リポソームが組織損傷部位において血小板凝集を促進し止血血栓形成時間を短縮するべく作用したことが示唆された．さらに H12-(ADP)-リポソーム投与後の止血部位を電子顕微鏡で精査し，結果を解析中である．

【結論】 今回の前臨床段階実験において，H12-(ADP)-リポソームは人工心肺後凝固障害の制御に有用であることが示された．

一般演題Ⅲ-4

リボソーム封入酸素運搬体の致死性出血性ショック(85% 出血後蘇生)実験モデルにおける蘇生効果と抗不整脈効果

○橋本賢一¹, 高瀬凡平¹, 東村悠子¹, 朝比奈はるか², 酒井宏水³

¹ 防衛医科大学校 集中治療部, ² 防衛医科大学校 救急部, ³ 奈良県立医科大学 医学部 化学教室

hashimoto.kenich2@gmail.com

【緒言】 出血性ショックにおいて, リボソーム封入酸素運搬体(Liposome-encapsulated hemoglobin[HbV])は保存血輸血と同等の蘇生効果があること実験的に示されている。しかし, 85% 血液を HbV に置換した際の蘇生効果や心筋保護効果の詳細は不明である。85% 出血における生存率と抗不整脈効果を実験的に検討した。

【実験】 SD ラット(n=30)の femoral artery, vein から脱血・蘇生液投与を同時に施行し 85% 出血性ショックモデルを作成した。蘇生液は 5%albumin(ALB 群), 洗浄赤血球(wRBC 群)及び HbV(HbV 群)とした。15 ラット(各群 n=5)で 24 時間後の生存率を検討し, 15 ラット(各群 n=5)で蘇生後, 心筋を摘出・ランゲンドルフ灌流心と心筋活動電位を可視化できる di-4-ANEPPS で染色し, 光工学的手法(OMP)にて, 活動電位の伝搬速度・伝搬様式, 及び再分極過程の均一性を示す指標(action potential duration dispersion [APDd])を測定した。電気生理検査である burst pacing にて致死性心室性不整脈(VT/VF)誘発の有無と OMP 指標との関係も検討した。

【結果】 ALB 群では 24 時間後生存しているラットはいなかった。wRBC 群・HbV 群では 80% 以上で生存した。OMP 解析では, ALB 群で wRBC 群・HbV 群に比べ伝導速度の遅延と伝導様式の異常が認められる傾向が認められた。ALB 群で全例 VT/VF が誘発されたのに対し, wRBC 群・HbV 群では誘発されなかった。APDd は, ALB 群で他の 2 群に比し延長していた(28 ± 9 vs. 12 ± 2 , 14 ± 2 ms; $P < 0.05$)。

【結論】 致死性出血性ショックラットモデルにて, HbV は, APDd の延長抑制効果を介して, wRBC と同等の予後改善効果と抗不整脈効果が認められる可能性があるとし唆された。

一般演題Ⅳ-1

(酵素-アルブミン) クラスターの合成と酵素活性

市原聖人, 森田能次, 小松晃之

中央大学理工学部

komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

【緒言】我々はヘモグロビン(Hb)に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(Hb-HSA₃, 製剤名“HemoAct™”)を合成し, Hbの血中滞留時間および安全性の大幅な向上に成功している¹⁻²⁾. 一方, 酵素は様々な疾患の治療に有効である. カタラーゼ(CAT)やスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)は, がんの転移や虚血再灌流障害の抑制に用いられ³⁻⁴⁾, アスパラギナーゼ(ASP)は, 白血病の治療に使用されている. しかし, 血中半減期は短く, その改善が強く望まれていた. これらの酵素をHSAで被覆すれば, 血中滞留性の延長や免疫反応の回避のみならず, 安全性の向上も期待できる. 本報では, CAT, SOD, ASPの分子表面にHSAを結合した一群のコア—シェル型(酵素-アルブミン)クラスターを合成し, それらの構造と酵素活性を明らかにしたので報告する.

【実験】ウシ肝臓由来CAT, ウシ赤血球由来SOD, 大腸菌由来ASPを二官能性架橋剤 Succinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]-cyclohexane-1-carboxylate(SMCC)を用いてHSAと結合した後, ゲルろ過クロマトグラフィー(Superdex 200pg)によりCAT-HSA_m, SOD-HSA_m, ASP-HSA_mクラスターを単離した. 蛋白質定量から平均HSA結合数を決定, 等電点電気泳動からpI値を測定した. UV-vis. スペクトルとOxygraph溶存酸素計を用いてCAT-HSA₄の過酸化水素不均化能, シトクロムc法からSOD-HSA₃のO₂^{•-}除去能, NH₃定量からASP-HSA₄のアスパラギン分解能を解析した.

【結果と考察】合成した(酵素—アルブミン)クラスターのHSA/CAT, HSA/SOD, HSA/ASP比は約4, 3, 4であり, HSAがCATに平均4個, SODに平均3個, ASPに平均4個結合していることが明らかとなった. CAT-HSA₄, SOD-HSA₃, ASP-HSA₄の等電点(pI)(5.2, 5.0, 5.0)がHSAの値(pI=5.0)と同等であったことから, 各クラスターの表面は負電荷で覆われていると考えられる. CAT-HSA₄の過酸化水素不均化能はCATと変わらず, SOD-HSA₃のO₂^{•-}除去能はSODの65%, ASP-HSA₄のアスパラギン分解能はASPの50%であることがわかった.

【結論】酵素をコア, HSAをシェルとしたCAT-HSA₄, SOD-HSA₃, ASP-HSA₄を初めて合成し, その構造と酵素活性を明らかにした. それぞれの(酵素-アルブミン)クラスターは血中滞留性に優れたがん転移抑制剤, 虚血再灌流障害の抑制剤, 白血病治療薬として期待できる.

【文献】

- 1) K. Yamada, T. Komatsu, *et al.*, *PLoS One*, **2016**, *11*, e149526.
- 2) H. Iwasaki, T. Komatsu, *et al.*, *Art. Cells Nanomed. Biotechnol.*, **2018**, *46*, in press.
- 3) M. Nishikawa, M. Hashida, *et al.*, *J. Control. Release*, **2005**, *109*, 101.
- 4) T. Hanawa, S. Asayama, *et al.*, *J. Control. Release*, **2009**, *135*, 60.

一般演題Ⅳ-2

アロステリック因子で酸素親和性を調節できる(組換えヘモグロビン(C93A(β))-アルブミン)クラスターの合成

○五十嵐啓介, 森田能次, 小松晃之

中央大学理工学部

komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

【緒言】 ヒトヘモグロビン(HbA)に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(HbA-HSA₃)は、赤血球の代替物となる人工酸素運搬体である¹⁾。一方、生体内のHbAには2,3-ジホスホグリセリン酸やイノシトールヘキサリン酸(IHP)などのアロステリック因子が結合し、Tense状態が安定化されるため、酸素親和性は適度な値に保たれている。しかし、HbA-HSA₃にアロステリック因子を添加しても酸素親和性は変わらない。これは α -スクシンイミド- ω -マレイミド架橋剤がCys-93(β)にも反応し、IHPの効果が抑制されているためである²⁾。この現象はマレイミド化合物を用いる修飾Hb製剤では必ず見られると言ってよい。本報では、Cys-93(β)を置換不活性なAlaに変換した(組換えヘモグロビン-アルブミン)クラスター(rHbA-rHSA₃)を合成し、それがIHP添加で酸素結合能を調節可能な人工酸素運搬体となることを明らかにしたので報告する。

【実験】 Cys-93(β)をAlaに変異導入したプラスミドDNAを用いて*Pichia*酵母を形質転換し、それを培養することでHbA(C93A(β))変異体(rHbA)を得た。これに架橋剤(N-スクシンイミジル-3-マレイミドプロピオネート:SMP)を反応させ、分子表面にマレイミド基を構築後、rHSAと反応させることでrHbA-rHSA₃を合成した。UV-visスペクトル、CDスペクトルからrHbA-rHSA₃のコアrHbAの四次構造を解析した。また、酸素解離曲線から酸素親和性の指標ある P_{50} およびHill係数(n)を算出し、IHP添加前後における酸素結合能の変化を測定した。

【結果と考察】 電気泳動、CDスペクトルからHbA(C93A(β))の二次構造が天然Hbと同一であること、質量分析およびチオール定量からCys-93(β)がAlaに置換されていることを確認した。rHbA-rHSA₃のHPLC曲線、Native-PAGE、CDスペクトルからrHbA 1分子に対して平均3個のrHSAが結合していることがわかった。HbAには2つの四次構造があり、oxy体はR状態、deoxy体はT状態をとる。原料rHbAに比べ、rHbA-rHSA₃(deoxy体)の430nmにおける吸光度は低く、287nmにおける負のCDバンドは上昇したことから、rHbA-rHSA₃のdeoxy体はT状態ではなく、R状態に近いR'状態であると推察される。従来のHbA-rHSA₃にIHPを添加しても酸素親和性(P_{50})は全く変化しなかったが、rHbA-rHSA₃にIHPを加えると酸素解離曲線は右側にシフトし、 P_{50} は10Torrから16Torrに増加した。肺-末梢組織間の酸素運搬効率従来は従来の2倍に向上することになる。

【結論】 Cys-93(β)を置換不活性なAlaに変換した組換えHbを用いたクラスター(rHbA-rHSA₃)を合成し、それがIHP添加で酸素結合能を調節できる人工酸素運搬体となることを明らかにした。

【文献】

- 1) R. Haruki, T. Kimura, T. Komatsu, et al., *Sci. Rep.*, **2015**, *5*, 12778.
- 2) Y. Cheng, T. Shen, V. Simplaceanu, C. Ho, *Biochemistry* **2002**, *41*, 11901.

一般演題Ⅳ-3

ラット出血性ショックモデルを用いた HemoAct™ の有効性評価

○鹿島知周¹, 市原聖人¹, 岡本 航¹, 小野沢博登², 河野光智², 岩崎正之², 小松晃之¹

¹ 中央大学理工学部, ² 東海大学医学部

komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

【緒言】我々はヘモグロビン(Hb)の分子表面に平均3個のヒト血清アルブミン(HSA)を結合させたコア-シェル構造の(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター(Hb-HSA₃, 製剤名“HemoAct™”)を開発し, 人工酸素運搬体製剤としての実用化に向けた研究を進めている¹⁻⁴⁾。本報では, 50% 脱血によるラット出血性ショックモデルを用い, 呼吸・循環動態観察, 血液学的検査および血液ガス分析から HemoAct™ の有効性を評価したので報告する。

【実験】精製ウシ Hb と HSA を二官能性架橋剤 N-(β-maleimidopropoxy)succinimide ester を用いて結合した後, 陰イオン交換クロマトグラフィー(Q Sepharose Fast Flow)により未反応 HSA を除去し, HemoAct™([Hb]=5 g/dL)を得た。Wistar 系雄性ラット(体重: 約 250 g)に対して循環血液量の 50% 量を脱血することで出血性ショック状態とした後に, HemoAct™の投与による蘇生を行った。採血および測定時点は, 脱血前, 脱血直後, 試料投与から 0, 1, 3, 6 hr の計 6 時点とした。

【結果と考察】平均動脈血圧は, 50% 脱血により脱血前の約 30% まで低下したが, HemoAct™の投与により脱血前と同程度まで回復し, その後も安定した推移を示した。赤血球数および Hct 値は, HemoAct™投与後に脱血前値の約 40% に減少し, その後の変動は見られなかった。動脈血酸素分圧は脱血後に脱血前値の約 150% まで上昇したが, HemoAct™投与により脱血前と同程度まで回復し, その後も返血群と同様の推移を示した。また, 脱血により上昇した乳酸値は HemoAct™投与 1 時間後に脱血前と同程度まで回復した。以上の結果から, HemoAct™が出血性ショック状態ラットの蘇生に有用であることが明らかとなり, 本製剤の赤血球代替物としての有効性が示された。

【結論】ラット出血性ショックモデルにおける呼吸・循環動態観察, 血液学的検査, および血液ガス分析から HemoAct™の赤血球代替物としての有効性を明らかにした。

【文献】

- 1) R. Haruki, T. Kimura, T. Komatsu, *et al.*, *Sci. Rep.* **2015**, 5, 12778.
- 2) K. Yamada, K. Yokomaku, T. Komatsu, *et al.*, *PLoS One* **2016**, 11, e149526.
- 3) R. Shinohara, T. Yamada, T. Komatsu, *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, 8, 819.
- 4) H. Iwasaki, K. Yokomaku, T. Komatsu, *et al.*, *Art. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2018**, 46, in press.

一般演題Ⅳ-4

4-フェニル酪酸ナトリウムの血清アルブミン結合に関する構造化学的研究

○小田切優樹^{1,2}, 榎田泰介¹, 河合聡人³, 田口和明⁴, 丸山 徹⁵, 山崎啓之^{1,2}

¹ 崇城大学薬学部, ² 崇城大学 DDS 研究所, ³ 藤田保健衛生大学医学部, ⁴ 慶応義塾大学薬学部, ⁵ 熊本大学薬学部
otagirim@ph.sojo-u.ac.jp

【緒言】 4-フェニル酪酸ナトリウム(PB)は現在、尿素サイクル異常症の治療に用いられているが、ヒストン脱アセチル化酵素阻害作用や小胞体ストレスの改善など多様な薬効により、さらなる臨床応用が期待されている。しかし、そのタンパク結合に関する情報は少なく、PBのヒトにおける薬物動態及び薬効・副作用との関係を考えるうえで、また、各種実験動物における薬物動態学的及び薬力学的データをヒトに外挿するうえで、タンパク結合の詳細を把握しておくことが重要となる。そこで本研究では、PBのアルブミンにおける結合特性並びに結合サイト構造の解明を行った。

【実験】 限外濾過法、蛍光スペクトル法、CD スペクトル法、部位特異的変異法およびX線結晶解析法を駆使してPBのアルブミン結合を系統的に評価した。

【結果と考察】 PB、その代謝物及び関連構造化合物を用いた検討より、いずれもヒト血清アルブミン(HSA)において、サイトIIへ特異的に結合しており、その親和性は、フェニル基とカルボキシル基間のアルキル側鎖長に依存していた。次いで結合に関与しているアミノ酸残基を検討した結果、411 Tyr 及び 410 Arg が重要であることが明らかとなった。さらにHSA-PB複合体のX線結晶構造解析の結果より、PBのカルボキシル基はHSAにおけるサイトII領域の411 Tyr, 410 Arg 及び 489 Ser の側鎖と水素結合を形成し、フェニル基及びアルキル側鎖は疎水性ポケットと van der Waals 相互作用しており、イブプロフェンやジアゼパムと類似の様式で結合していることが明らかとなった。加えて、PBのアルブミン結合は、すべての動物種でHSA分子上のサイトIIに相当する部位へ結合しており、HSA同様に、疎水性相互作用及び静電的相互作用が関与していることが示唆され、その親和性は、ヒトとウシ、ウサギとラットアルブミンがそれぞれ類似していることが判明した。PBのドッキングポーズから、カルボキシル基は、Arg, Tyr 及び Lys と相互作用していたが、その組み合わせは動物種により異なっていた。また、アルキル側鎖及びフェニル基は、Leu, Ile, Phe 及び Val で構成される疎水性領域に位置していた。ヒト及びウシアルブミンにおいては、結合定数及びドッキングエネルギーより、明確な結合サイトの至適サイズの存在が示唆された。

【結論】 本研究で得られた知見は、多様な薬効を有するPB及びその誘導体のヒトにおける薬物動態及び薬理効果の理解という点で、様々な疾患治療へ臨床応用される際の有用な基礎資料になると考えられる。

GSSG 内包リポソームの LPS 刺激マクロファージ様細胞に対する効果

○芳野和真¹, 多喜川真人¹, 武岡真司¹

¹ 早稲田大学大学院先進理工学研究科
amuzak.06.ihsy@akane.waseda.jp

【緒言】 活性酸素種 (ROS) は病原体に対する生体防御システムに欠かせない一方で、過剰に存在すると酸化ストレスとなって炎症を引き起こす。生体内の ROS 除去物質であるグルタチオンには還元体 (GSH) と酸化体 (GSSG) が存在する。ROS 除去作用をもつ GSH に関しては様々な研究対象となっているが、実際に利用する際には容易に GSSG に酸化される点が課題になる。他方、GSSG は研究例が少ないものの細胞内にて GSH に酵素的に還元されることが知られており、GSH の前駆体としての可能性が期待される。本研究では、GSSG を内包させたリポソームを調製し、それによって LPS 刺激マクロファージ様細胞へ GSSG を運搬した際の効果について検討を行う。

【実験】 DPPC/cholesterol/K0C16 (リジン型カチオン性脂質)=1/1/1 の混合脂質を 20mM GSSG 溶液 (pH 2.9) または 20mM HEPES (pH 7.4) で水和し (脂質濃度 10mg/mL), エクストルージョン法にて粒子径を制御 (Φ 0.45, 0.20, 0.10 μ m), 超遠心分離による外水相の未内包 GSSG の除去 (4°C, 33000rpm, 30min) を経て、GSSG 内包リポソーム分散液を得た。次に、PMA 刺激 (100nM, 18h) を施した THP-1 由来マクロファージ様細胞に LPS 刺激 (0, 1, 5, 10 μ g/mL, 2h) を行い、酸化ストレスを与えた上で脂質濃度 25 μ M の GSSG 内包リポソームで処理した。同様にして、25 μ M の空リポソーム処理及び 25 μ M の空リポソーム + GSSG 処理も行った。その後、24 時間後の細胞の活性と毒性を WST-1 法と LDH 法にて各々評価した。

【結果と考察】 調製したリポソームを物性評価したところ、空リポソームは粒子径 151 ± 39 nm, ζ 電位 62.1 ± 3.6 mV であり、GSSG 内包リポソームは粒子径 149 ± 35 nm, ζ 電位 49.7 ± 1.6 mV, GSSG 濃度 2.2mM (脂質濃度 10mg/mL) であった。また、WST-1 と LDH による分析の結果、空リポソーム、空リポソーム + GSSG 処理群では活性低下と毒性上昇が認められたが、GSSG 内包リポソーム処理群ではそれらが認められなかった。よって、本検討から LPS 刺激マクロファージ様細胞に対する本カチオン性リポソームの細胞毒性、およびリポソームにより細胞内へ運搬された GSSG の毒性改善効果が示唆された。

【結論】 LPS 刺激を施した THP-1 由来マクロファージ様細胞に対して、カチオン性リポソームに内包された GSSG はその細胞毒性を低減した。

リボソームと血小板の結合能評価に関する研究

○中原景子¹, 陳素雲¹, 武岡真司¹

¹ 早稲田大学大学院先進理工学研究科

keiko.n@akane.waseda.jp

【緒言】 血小板輸血は血小板減少症や大量出血の治療法として有効であるが、長期保存が困難であり、感染症などの副作用が懸念されている^{1,2)}。当研究室では長期保存、大量調製可能な血小板代替物として H12-(ADP) リボソームを開発してきた。本リボソームはリボソーム表面上に担持されたフィブリノゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)を介して活性化血小板上の GPIIb/IIIa に結合することで、出血部位に特異的に集積し血小板凝集を増強する³⁾。本研究では H12-(ADP) リボソームの構成脂質に着目し、血小板との結合能及び結合部位の同定を行った。

【実験】 96 ウェルガラスプレートに血小板、蛍光標識リボソーム、血小板を活性する ADP を添加し、固定した後、蛍光顕微鏡を用いて血小板凝集塊中の蛍光標識リボソームの観察及び蛍光定量を行った。また、リボソームの競合拮抗剤を用いて、リボソームと血小板の結合を阻害した。続いて、トランスフェクションによりチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO 細胞)に蛍光標識受容体を発現した。蛍光標識リボソームを CHO 細胞に添加し、フローサイトメトリーを用いてリボソームと CHO 細胞の結合を評価した。

【結果と考察】 リボソームは構成脂質の濃度依存的に血小板凝集塊中に巻き込まれたことから、リボソームと血小板の結合にはこの脂質が関与することが示唆された。また、競合拮抗剤により血小板凝集塊中に巻き込まれるリボソームが減少したことから、リボソームの血小板との結合機構が示唆された。更に、本脂質含有リボソームは受容体発現 CHO 細胞に特異的に結合した。

【結論】 リボソームの構成脂質はリボソームと血小板との結合に関与し、本脂質は受容体に特異的に結合することが示唆された。

【文献】

- 1) Blajchman M.A., *Transfus Clin Biol*, **8**, 267-271 (2001).
- 2) Taguchi K *et al.*, *Drug Metab Dispos*, **41**, 1584-1591 (2013).
- 3) Okamura Y *et al.*, *Transfusion*, **7**, 1221-1228 (2005).

一般演題 V-3

負電荷リボソームと血小板の結合能評価に関する研究

○西浦 衛¹, 中原景子¹, 武岡真司¹

¹ 早稲田大学大学院先進理工学研究科
nsurmmr0806@asagi.waseda.jp

【緒言】 血小板輸血は血小板減少症や大量出血の治療法として有効であるが、長期保存が困難であり、感染症などの副作用が懸念されている¹⁾²⁾。当研究室では長期保存、大量調製可能な血小板代替物として H12-(ADP) リボソームを開発してきた。表面に担持されているフィブリノーゲン γ 鎖 C 末端ドデカペプチド(H12)と内包されている血小板惹起物質 ADP が有効成分であり、止血能を有することが既に証明されている³⁾。また先行研究からリボソームは負電荷脂質の濃度依存的に血小板凝集塊中に巻き込まれることが示唆された。そこで本研究では新たな負電荷脂質を合成し、負電荷リボソームと血小板との結合能の評価を行った。

【実験】 3 種類の負電荷脂質を合成した後、その合成脂質と DPPC、コレステロール、PEG-DSPE、DiD を混合した蛍光標識リボソーム分散液を水和法にて調製した。続いて、モルモット (Hartley, Male, 8 weeks, 450 g) から心臓穿刺法により血液を採取し、全血に対して 1/10 となるように 3.8% クエン酸ナトリウムを混合した。全血を遠心分離 (1400 rpm, 10 min, r.t.) し、上清の PRP を回収した。次に、PRP 回収後の血液を再度遠心分離 (5000 rpm, 10 min, r.t.) し、上清の PPP を回収した。PRP, PPP を混合し血小板濃度 $20 \times 10^4/\mu\text{L}$ の PRP を調製した。次に、96 ウェルプレートに血小板 ($20 \times 10^4/\mu\text{L}$, $50 \mu\text{L}$)、蛍光標識リボソーム ($200 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{L}$)、血小板を活性化させる ADP ($1 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{L}$) を添加し、ホルマリン (8%, $60 \mu\text{L}$) で固定した後、蛍光顕微鏡を用いて血小板凝集塊中の蛍光標識リボソームの観察及び蛍光定量を行った。

【結果と考察】 合成した 3 種類の負電荷脂質は ESI-MS, ¹H-NMR によって同定を行った。また 3 種類の合成脂質含有リボソームをそれぞれ調製し物性評価したところ、粒子径 247 ± 97 , 261 ± 115 , $219 \pm 86 \text{ nm}$ 、 ζ 電位 -22.0 ± 0.2 , -20.2 ± 1.0 , $-35.9 \pm 0.2 \text{ mV}$ であった。これらのリボソームを 30 日後に再度物性評価したところ変化はみられなかった。また、リボソームの ζ 電位の負の値が増加するほど、血小板凝集塊中に巻き込まれるリボソームの量が増加した。これらの結果をヒストグラムで表したところ、確かに ζ 電位と凝集塊中にリボソーム量には正の相関関係があることが示された。

【結論】 3 種類の負電荷脂質の合成に成功し、負電荷リボソームと血小板との結合能はリボソームの ζ 電位に依存することが示された。

【文献】

- 1) Blajchman MA, *Transfus Clin Biol*, 8, 267-271 (2001).
- 2) Taguchi K *et al.*, *Drug Metab Dispos*, 41, 1584-1591 (2013).
- 3) Hagiwara K *et al.*, *Transfusion*, 55, 314-325 (2014).

一般演題 V-4

出血性ショックラットに対するヘモグロビン小胞体投与が肝 Cytochrome P450 肝代謝薬物の体内動態に与える影響

得能正裕¹, ○田口和明², 山崎啓之^{1,3}, 酒井宏水⁴, 小田切優樹^{1,3}

¹ 崇城大学薬学部, ² 慶應義塾大学薬学部, ³ 崇城大学 DDS 研究所, ⁴ 奈良県立医科大学

otagirim@ph.sojo-u.ac.jp

【緒言】ヘモグロビン小胞体(HbV)は、外傷などによる大量出血患者に対する使用が想定されている。このような大量出血患者においては、HbV 投与による蘇生と同時にあるいは蘇生後に、麻酔薬を始めとした種々の薬物治療の実施が想定される。HbV 投与が併用薬物の代謝などの体内動態に何らかの影響を及ぼす場合、併用薬の薬効発現が減弱したり、逆に副作用のリスクが高まったりする可能性が考えられる。従って、大量出血に伴う HbV 投与が併用薬物の体内動態に与える影響を評価することは、薬物相互作用の観点から極めて重要である。本研究では、肝臓における主要薬物代謝酵素である Cytochrome P450(CYP)に着目し、出血性ショックモデルラットに対する HbV 蘇生が CYP 代謝型薬物の体内動態に与える影響について検討した。

【実験】50% 出血性ショックモデルラットに HbV、新鮮および保存赤血球(7日間保存)のいずれかを脱血量と等量輸血した。輸血 24 時間後に、肝臓ミクロソームを回収し、肝臓中 CYP4 分子種(CYP1A2, 2C11, 2E1, 3A2)の発現量及び代謝活性を Western blotting と *in vitro* 基質代謝試験にてそれぞれ評価した。また、CYP4 分子種(CYP1A2, 2C11, 2E1, 3A2)特異的に代謝される各基質薬物(CYP cocktail)を静脈内投与し、各薬物の薬物動態の変化についても検討を行った。

【結果と考察】出血性ショックモデルラットを各蘇生液で輸血を施し、蘇生 24 時間後の肝 CYP 分子種別タンパク質発現量を Western blotting で検討した結果、sham 群と比較して HbV 群で CYP 分子種の全般的な発現量の低下が観察されたものの、同様の低下は赤血球群においても示された。一方、赤血球輸血群と比較して HbV 群において CYP4 分子種の代謝活性に若干の低下が認められた。そこで、蘇生後 24 時間後の出血性ショックモデルラットに対して、CYP cocktail 体内動態試験を行った結果、sham 群と比較すると HbV および赤血球群で各薬物の消失が遷延したが、HbV 輸血群においては赤血球群よりも強い薬物消失遷延を示した。

【結論】大量出血時に対する HbV 輸血は、肝 CYP タンパク質発現量の低下と CYP 代謝活性の低下が相加的に影響し、CYP 代謝型薬物の消失遷延をもたらすと考えられたが、この現象は赤血球輸血時でも確認されたことから、HbV 輸血による特異的な影響というよりは大量出血に伴う蘇生に起因する何らかの因子が関与していると考えられた。

化学修飾ヘモグロビンの $\alpha\beta$ サブユニット交換反応

○松平 崇, 久禮智子, 山本恵三, 酒井宏水

奈良県立医科大学医学部 化学教室

mattu@naramed-u.ac.jp

【緒言】 赤血球から単離されたヘモグロビン(Hb)を原料として用いた人工酸素運搬体(Hemoglobin Based Oxygen Carriers, HBOCs)を、赤血球代替物として利用する研究が進められている。Hbをそのまま血管内に投与した場合に発生する重篤な副作用を回避するため、リン脂質小胞体に内包させたHb小胞体^[1](カプセル型HBOCs)のほか、分子内架橋、PEGによる表面修飾、ランダム重合などの方法により、様々な構造を持つ化学修飾型HBOCsが合成されてきた。Hbは水溶液中において $\alpha_2\beta_2$ 四量体構造と $\alpha\beta$ 二量体構造との平衡状態になることが知られているが、その解離定数は μM オーダーと小さく、生理的条件下では大部分が安定な四量体構造を保っている^[2]。そのため、四量体が解離しないことを前提に設計されたHBOCsも多い。本研究では、2本のPEGで化学修飾されたHBOCsと、化学修飾されていないHb(native Hb)との間で、解離平衡を経由した $\alpha\beta$ サブユニットの交換反応が起こることを明らかにした^[3]。

【実験】 赤血球から単離されたHbにマレイミドで末端を修飾したPEGを反応させ、2箇所の $\beta 93\text{Cys}$ が選択的にPEG化されたHBOCs(bis-PEG-Hb)を合成した。Bis-PEG-Hbとnative HbをPBS(pH 7.4)中で混合し、続いて $\beta 82\text{Lys}$ 同士を選択的に分子内架橋する試薬bis-(3,5-dibromosalicyl)fumarate(DBBF)を反応させ、生成物をサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により分析した。分子量が2kDaから40kDaまで異なるPEGを用いて実験を行った。

【結果と考察】 2本のPEGが結合したbis-PEG-Hbとnative Hbの混合溶液にDBBFを反応させ、 $\alpha_2\beta_2$ 構造を固定したところ、PEGが1本だけ結合したmono-PEG-Hbの存在が確認された。この結果は、生理的条件下でも解離平衡を経由した $\alpha\beta$ サブユニット交換反応は容易に進行することを示唆している。ピークの積分比から各成分の比率を求め、式(1)から交換平衡定数 K_{eq} を算出したところ、PEGの分子量の増加に伴い K_{eq} は0.82から2.86まで増大した。このような交換反応は、bis-PEG-Hbに限らず、他の化学修飾型HBOCsにおいても起こり得ると考えられる。

$$K_{eq} = \frac{[\text{mono-PEG-Hb}]^2}{[\text{bis-PEG-Hb}][\text{native Hb}]} \quad \cdots (1)$$

【結論】 Bis-PEG-Hbとnative Hbとの間で、解離平衡を経由した $\alpha\beta$ サブユニット交換反応が起こることを明らかにした。カプセル型HBOCsでは二量体への解離の影響はないが、化学修飾型HBOCsでは解離が起こりうることを考慮した設計が必要となる。

【謝辞】 本研究は科研費(基盤C, 17K01367)の補助を受けて進められた。

【文献】

[1] Kure, T., Sakai, H., *Langmuir* **2017**, 33, 1533-1540.

[2] Acharya, S.A. et al. Hemoglobin-Based Oxygen Carriers as Red Cell Substitutes and Oxygen Therapeutics; Kim, H. W., Greenburg, A. G., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, **2013**; pp 185-234.

[3] Matsuhira, T., Kure, T., Yamamoto, K., and Sakai, H., *Biomacromolecules* **2018**, in press.

重回帰式を用いたエタノール注入法による ADP 内包リポソームの調製条件の最適化

Optimization of the Preparation Conditions of ADP-Encapsulated Liposomes Prepared by an Ethanol Injection Method with Multiple Regression Equations

駒木根 元気, 武岡 真司

Genki Komakine, Shinji Takeoka

和文抄録

エタノール注入法とエクストルージョン法を用いて、リン脂質二分子膜小胞体（リポソーム）へ水溶性薬剤としてアデノシン二リン酸（ADP）を内包効率高く内包させることを目的とした。種々の調製条件を変更して計 38 種類のサンプルを調製後 ADP 内包量と内包効率に関するデータを蓄積し考察を行った。次に重回帰分析から ADP 内包量と内包効率を目的変数とする重回帰式を求め、各パラメータの重要度の位置づけを行い、その妥当性について実測値や分子集合体に関する計算値から考察した。

Abstract

The purpose of this study is to explore the optimal conditions for encapsulation of water-soluble drug, adenosine bisphosphate (ADP) in the preparation of phospholipid liposomes by combination of an ethanol injection method and an extrusion method. We changed conditions to prepare 38 liposome samples and analyzed the obtained data of the ADP encapsulation amount and the encapsulation efficiency. Then from the multiple regression analyses, the multiple regression equations of which objective variables are ADP encapsulation amount and ADP encapsulation efficiency were obtained. We made the order of importance for explainable variables and discussed about validity of this approach from experimental data and calculation data of molecular assembly.

Keywords

Liposome, Ethanol Injection, Extrusion, Encapsulation, Encapsulation amount, Encapsulation efficiency, Multiple regression analysis

1. 研究背景

リン脂質二分子膜小胞体（リポソーム）は、内水相や脂質二分子膜に水溶性薬剤や脂溶性薬剤を担持させ、表面を抗体やリガンドで表面修飾させることによって、標的部位に効率高く薬物を運搬するシステム（Drug Delivery System, DDS）として注目され、既に 20 品目近くのリポソーム製剤（日本では 3 品目のみ）が既に上市されている。当研究室では、凍結乾燥させた混合脂質粉末の単純水相とエクストルージョン法によって、粒径が制御された薬物内包リポソーム分散液を調製してきた。し

かし、薬物を内包させる条件は混合脂質の粉末状態や水相プロセスに左右され、その再現性やスケールアップなどに課題が残されている。他方、リポソーム製造によく用いられる方法として、エタノール注入法がある¹⁾。この方法は混合脂質をエタノールに完全に溶解させ、これを攪拌している水媒体中に注入することにより、エタノールは水と混合して拡散し、脂質分子は水媒体中で分子集合してリポソームを形成する。その際水媒体に予め溶解している水溶性薬物を内包する。リポソームの粒径は、エタノール注入法でも条件によって制御されるが、その

早稲田大学大学院 先進理工学研究科 生命医科学専攻

〒162-8480 東京都新宿区若松町 2-2 TWIns Department of Life Science and Medical Bioscience, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, TWIns 2-2 Wakamatsucho, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8480 JAPAN

論文受付 2018 年 8 月 25 日 論文受理 2018 年 8 月 27 日

後のエクストルージョンによってシャープに制御され、その際に更なる薬物の内包も期待できる²⁾。エタノール注入法は条件の制御が比較的容易で、スケールアップも可能である³⁾。LIPEX Extruderを用いる方法⁴⁾では、混合脂質のエタノール溶液と薬物の水溶液との混合をスタティックミキサーによってインラインで行い、大型エクストルーダーを用いて粒径が制御された薬物内包リポソーム分散液を調製する方法であり、スケールアップに優れたリポソーム調製法として企業にて採用されている。但し、これらの調製法においてもリポソームに薬物を内包させるためのパラメータは多種にわたって複雑に影響しており、多くの実験を重ねての条件設定が必要とされる。

本研究では、このエタノール注入法とエクストルージョン法を組合わせたリポソーム調製法にて、薬物を高濃度に高効率で

内包するための調製条件の最適化を多変量解析の一種である重回帰分析にて行うことを目的とする。得られた重回帰式の意味を考察し、結果の妥当性を評価する。薬物として永年、血小板の凝集作用を増強させる機能を有する H12-(ADP) リポソームで調製経験のあるアデノシン二リン酸 (ADP) を選んだ⁵⁾。また、混合脂質の組成としては、リポソーム表面を H12 にて修飾していないリポソームの混合脂質を同様の理由で選んだ⁵⁾。

2. 実験方法

2.1 材料

1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC), cholesterol, 1,5-dihexadecyl-N-succinyl-L-glutamate (DHSG) は日本精化から購入した。1,2-Distearoyl-sn-

Table 1. Injecting conditions of the lipid mixture-ethanol solution to the ADP-PBS aq. solution

No.	Lipid mixture-ethanol solution			Ethanol injection			ADP-PBS aq. solution		
	[Lipid mixture] (mg/mL)	Volume (mL)	Temp. (°C)	Injection rate (mL/sec)	Inner diameter of injector (mm)	Stirring rate (rpm)	Volume (mL)	[ADP] (mM)	Temp. (°C)
①	50	0.15	62-66	1.8	0.5	600	2.85	5	56.0
②	100	0.15	62-66	1.8	0.5	600	2.85	5	55.0
③	200	0.15	62-66	1.8	0.5	600	2.85	5	52.5
④	300	0.15	62-66	1.8	0.5	600	2.85	5	55.4
⑤	300	0.30	62-68	1.8	0.8	600	2.70	5	60.7
⑥	300	0.60	62-68	1.8	0.8	600	2.40	5	56.5
⑦	300	0.90	62-68	1.8	0.8	600	2.10	5	48.9
⑧	300	1.20	62-68	1.8	0.8	600	1.80	5	53.5
⑨	300	0.30	60-66	1.8	0.8	600	2.70	5	55.0
⑩	150	0.60	60-66	1.8	0.8	600	2.40	5	57.9
⑪	100	0.90	60-66	1.8	0.8	600	2.10	5	56.2
⑫	300	1.20	62-65	1.8	1.5	600	2.80	5	22.5
⑬	300	1.20	62-65	1.8	1.5	600	2.80	5	22.5
⑭	300	1.20	62-65	1.8	1.5	600	2.80	5	48.0
⑮	300	1.20	62-65	1.8	1.5	600	2.80	5	48.0
⑯	300	1.20	62-65	1.8	1.5	600	2.80	5	59.5
⑰	300	1.20	62-65	1.8	1.5	600	2.80	5	59.5
⑱	300	0.90	62-65	1.8	0.8	600	2.10	1	60.2
⑲	300	0.90	62-65	1.8	0.8	600	2.10	5	57.5
⑳	300	0.90	62-65	1.8	0.8	600	2.10	10	60.6
㉑	300	0.30	62-68	1.8	0.8	600	2.70	5	58.2
㉒	300	0.15	62-68	1.8	0.8	600	2.85	5	59.8
㉓	300	1.20	60-66	1.8	1.5	600	2.80	5	60.2
㉔	300	1.20	62-65	1.8	1.5	600	2.80	5	58.4
㉕	300	1.20	62-65	1.8	1.5	600	2.80	5	58.4
㉖	300	1.20	62-65	1.8	1.5	600	2.80	5	58.4
㉗	300	1.20	62-65	1.8	1.5	600	2.80	5	58.4
㉘	300	1.06	62-65	1.8	1.5	600	2.94	5	58.4
㉙	250	0.93	60-66	1.8	1.5	600	3.07	5	59.2
㉚	300	0.93	60-66	1.8	1.5	600	3.07	5	56.1
㉛	300	0.90	60-66	0.225	0.8	75	2.10	5	52.5
㉜	300	0.90	60-66	0.225	0.8	600	2.10	5	51.7
㉝	300	0.90	60-66	0.225	0.8	1200	2.10	5	53.2
㉞	300	0.90	60-66	1.8	0.8	75	2.10	5	54.6
㉟	300	0.90	60-66	0.225	0.8	75	2.10	5	50.1
㊱	300	1.20	62-65	1.8	1.5	600	2.80	5	62.5
㊲	300	1.20	62-65	1.8	1.5	600	2.80	10	58.4
㊳	300	0.90	62-65	0.225	0.8	600	2.10	10	64.0

glysero-3-phosphatidylethanolamine-N-[monomethoxy poly (ethyleneglycol)] (PEG-DSPE) は日油から購入した。H12-PEG-Glu2C18 は文献⁵⁾に従って研究室にて合成したものを用いた。ADP は Sigma-Aldrich 社, Octyl β -D-glucopyranoside (OG) は Carbosynth 社から購入した。

2.2 リポソームの調製法

DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE の4種類の脂質を5:5:1:0.033 のモル比でエタノールに所定濃度に溶解させた。この混合脂質-エタノール溶液を所定量, 予め所定濃度になる様に ADP を溶解させて攪拌している PBS 溶液中に内径の異なる注射針の注射器を用いて所定の速度で注入し, ADP 内包リポソーム分散液を得た。これをエクストルーダー (Northern lipids,

Inc.10mL 用) にてエクストルージョン (フィルター孔径 ϕ 0.20 μm (Nuclepore membrane) を2回, ϕ 0.10 μm (Nuclepore membrane) を2回) を行った。続いて, エタノール濃度が1%以下となるまで PBS によって希釈してからゲルろ過クロマトグラフィー (Sephadex G25, GE Healthcare) を行って未内包の ADP ならびにエタノールを除去した。

全てのサンプルにおけるエタノール注入法における条件を Table 1 に, エタノール注入・エクストルージョン後のリポソーム分散液の条件 (ただし, 溶液の容量, エタノールの濃度, ADP 濃度はエタノール注入法における条件からの計算値, 混合脂質濃度はエクストルージョン後の実測値) とその後のエクストルージョン時の温度を Table 2 に示す。

Table 2. Conditions of the liposome dispersion after ethanol injection and extrusion

No.	Liposome dispersion				Extrusion
	Volume (mL)	[Ethanol] (%)	[ADP] (mM)	[Lipid mixture] (mg/mL)	Temp. (°C)
①	3.0	5	4.75	1.4	23
②	3.0	5	4.75	2.5	23
③	3.0	5	4.75	7.1	23
④	3.0	5	4.75	9.9	23
⑤	3.0	10	4.5	40.3	23
⑥	3.0	20	4.0	67.0	23
⑦	3.0	30	3.5	89.2	23
⑧	3.0	40	3.0	133.9	23
⑨	3.0	10	4.5	26.5	50
⑩	3.0	20	4.0	28.3	50
⑪	3.0	30	3.5	27.1	50
⑫	4.0	30	4.7	86.5	23
⑬	4.0	30	4.7	86.5	23
⑭	4.0	30	4.7	87.7	23
⑮	4.0	30	4.7	87.7	50
⑯	4.0	30	4.7	86.9	50
⑰	4.0	30	4.7	86.9	50
⑱	3.0	30	3.5	69.4	50
⑲	3.0	30	3.5	72.8	50
⑳	3.0	30	3.5	78.7	50
㉑	3.0	10	4.5	22.2	23
㉒	3.0	5	4.75	15.2	23
㉓	4.0	30	3.5	86.2	50
㉔	4.0	30	3.5	90.9	50
㉕	4.0	30	3.5	90.9	50
㉖	4.0	30	3.5	90.9	50
㉗	4.0	30	3.5	90.9	50
㉘	4.0	30	3.68	90.9	50
㉙	3.0	30	3.84	74.1	50
㉚	3.0	30	3.84	63.0	50
㉛	3.0	30	3.5	83.4	50
㉜	3.0	30	3.5	84.6	50
㉝	3.0	30	3.5	69.6	50
㉞	3.0	30	3.5	82.2	50
㉟	3.0	30	3.5	73.2	50
㊱	4.0	30	3.5	77.3	50
㊲	4.0	30	3.5	90.0	50
㊳	3.0	30	3.5	82.1	50

2.3 リボソームの物性評価法

2.2で調製したリボソーム分散液に関して、リボソームの平均粒径、脂質濃度、リボソームのADP内包量を測定した。また、これらの測定値から脂質回収率とADP内包効率を算出した。

1) 粒径

脂質濃度が0.2mg/mLとなるようにリボソーム溶液を希釈し、キュベットに1mL添加し、Zeta Sizer nanoZS (Malvern Instruments Ltd.)を用いてリボソームの粒径を測定した。

2) 脂質濃度

リン脂質C-テストワコー(和光純薬工業株式会社)を用いてDPPC濃度を算出した。また、エタノール注入に用いたロットの混合脂質を重クロロホルム溶液に溶解させて核磁気共鳴装置NMR AS400 (OXFORD)にて¹H-NMRを測定し各脂質の混合比を求め、DPPC濃度の実測値から総脂質濃度を算出した。

3) ADP内包量

リボソーム分散液:OG=4:1(v/v)となるようにOGをリボソーム分散液に加え、ボルテックス攪拌を行うことにより、リボソーム構造を完全に破壊して内包ADPを全て放出させた。HPLC(Waters)を用いて可溶化させたリボソーム溶液中のADP量を測定した。2)で測定した脂質濃度を用い、脂質20mgあたりのADP内包量(mg)として計算した。この単位は1バイアル当たりの混合脂質量を20mgと設定していることから便宜的に決めた。

4) 脂質回収率の算出

2)の脂質濃度の測定法と同様、エクストルージョン前のリボソーム分散液の脂質濃度を測定し、溶液の容量を掛けることにより脂質量を算出した。同様にしてエクストルージョン後のリボソーム分散液に含まれる脂質量を算出した。(eq. 1)から脂質回収率を算出した。

$$\begin{aligned} & \text{脂質回収率(\%)} \\ &= \frac{\text{エクストルージョン後の分散液に含まれる脂質量}}{\text{エクストルージョン前の分散液に含まれる脂質量}} \times 100 \end{aligned} \quad (\text{eq. 1})$$

5) ADP内包効率の算出

3)で算出した脂質20mgあたりのADP内包量と、4)で算出したエクストルージョン後の脂質量からエクストルージョン後のリボソームに含まれる総ADP量を算出した。(eq. 2)によってADP内包効率を算出した。

$$\begin{aligned} & \text{ADP内包効率(\%)} \\ &= \frac{\text{リボソームに内包されたADPの総量}}{\text{調製に用いたADPの総量}} \times 100 \\ &= \frac{\text{脂質量20mgあたりのADP内包量/20} \times \text{エクストルージョン後の脂質量}}{\text{調製に用いたADPの総量}} \times 100 \end{aligned} \quad (\text{eq. 2})$$

2.4 エクセルを用いた重回帰分析の方法

目的変数はADP内包量とADP内包効率とした。説明変数は、a. 脂質-エタノール溶液の脂質濃度、b. ADP-PBS溶液の温度、c. リボソーム分散液中のエタノール濃度、d. リボソーム分散液中の脂質濃度、e. エクストルージョンの温度、f. 攪拌速度、g. 注入速度、h. 注入器具の内径、i. ADP-PBS溶液のADP濃度とした。更に、それぞれの説明変数を2乗、3乗、1/2乗したものと、常用対数をとったものを加え、計45種類を説明変数とした。Table 1, 2の38サンプルを用いて、以下の1)から5)の流れに従ってエクセルにて重回帰分析を行った。

1) 多重共線性関係にある二変数の検定と除外⁶⁾

最初に全変数間の相関係数を調べ、多重共線性関係が疑われる二変数に関してVIF統計量を算出した。VIF統計量が5を超えるると多重共線性関係が認められ係数が適切に推定されないため、VIF統計量が5を超える場合には変数を片方ずつ除いて重回帰分析を行い、自由度修正決定係数がより高く、変数のP値がより低い方を候補に残した。

2) スチューデント化残差を用いた外れ値の除外

明らかに有意でない変数を除いた後、全てのサンプルに対しスチューデント化残差を算出し、外れ値を除外した。i番目のサンプルのスチューデント化残差は、全残差群から残差diを除いた残差群を用いて標準偏差を求め、求められた標準偏差で残差diを割った値となる。この手法では、i番目のサンプルの残差が大きい場合に、それを除いて標準偏差を求めることになるため、外れ値を発見しやすくなる。スチューデント化残差の絶対値が2より大きい場合を外れ値として除外した。

3) 変数減少法⁷⁾

変数減少法により、変数を除く前後での不偏分散の比(F値)を求めて検定し、回帰式に有意でない変数を1つずつ減らした。F<2のとき、除いた変数は有意でない変数として除外した。

4) 診断プロットによる回帰式の評価⁸⁾

診断プロットとして、残差プロットと正規Q-Qプロットを作成した。残差プロットでは、横軸に予測値、縦軸に残差をとる。残差が適度にばらついていることが望ましいが、残差に偏りが見られる場合、実測値は適切に推定されていないと判断される。正規Q-Qプロットでは、横軸に残差を、縦軸に残差が正規分布に従う場合の予測値をとった。プロットが一直線上に並ぶとき、残差のばらつきが正規分布に従うと判断した。

5) 標準化による項の重要度の検討⁹⁾

得られた重回帰式の変数に温度や濃度などの条件を代入するが、単位が異なるために単純な係数の比較によって変数間の重要度を決めることができない。そのため、最終的な重回帰式が得られた後、全ての実測値を標準化して重回帰分析を行い、得られた係数を比較して重要度を決定した。

3. 結果および考察

Table 3に38サンプルの混合脂質エタノール溶液をADP-PBSに注入した直後のリボソームの粒子径とその後エクストルージョンをかけた際の脂質の回収率、そしてゲルろ過クロマ

Table 3. Results of ADP encapsulation with liposomes by ethanol injection and extrusion.

No.	Particle size (nm) after injection	Lipid Recovery (%) at extrusion	ADP encapsulated amount (mg/Lipid 20mg)	Encapsulation efficiency (%)
①	117±43	87	0.067	0.20
②	124±37	100	0.032	0.21
③	154±43	85	0.073	1.10
④	158±44	90	0.078	1.70
⑤	167±52	90	0.081	7.70
⑥	179±59	89	0.066	12.0
⑦	186±55	95	0.060	17.0
⑧	217±63	97	0.066	22.3
⑨	148±35	82	0.085	4.0
⑩	143±37	92	0.075	4.8
⑪	128±34	99	0.053	4.0
⑫	170±53	91	0.069	18.2
⑬	177±58	99	0.087	23.3
⑭	177±47	96	0.071	20.5
⑮	168±50	92	0.096	23.8
⑯	172±47	85	0.085	23.7
⑰	178±55	84	0.120	29.5
⑱	149±43	88	0.016	13.7
⑲	144±37	86	0.073	12.7
⑳	141±36	87	0.171	16.3
㉑	-	-	0.058	3.1
㉒	-	-	0.063	1.9
㉓	-	-	0.104	25.9
㉔	-	-	0.115	28.0
㉕	-	-	0.106	25.8
㉖	-	-	0.101	24.6
㉗	-	-	0.115	28.0
㉘	201±75	70	0.117	28.5
㉙	149±40	95	0.085	18.2
㉚	148±39	90	0.078	12.3
㉛	138±35	89	0.060	12.4
㉜	139±36	92	0.078	12.8
㉝	137±33	96	0.060	11.2
㉞	139±34	88	0.069	13.8
㉟	140±35	97	0.073	14.5
㊱	144±40	85	0.083	15.2
㊲	142±40	54	0.162	17.0
㊳	138±38	89	0.177	17.9

トグラフィーによって未内包の ADP とエタノールを除去して得られた ADP 内包リポソーム分散液における ADP の内包量と ADP 内包効率をまとめた。サンプル㉑から㉗はエタノール注入した後引き続きエクストルージョンを行ったために粒子径と脂質回収率の数値が欠損している。

ADP 内包効率は (eq. 2) によって表されるので、ADP 内包効率を向上させるには、脂質量あたりの ADP 内包量を向上させるか、混合脂質のエタノール溶液を注入した際のリポソーム分散液の脂質濃度を高くして内包 ADP の総容積を増やせばよい。そして、脂質量あたりの ADP 内包量を向上させるには、エタノール注入時に ADP を内包させる際に高濃度の ADP を内包させる条件検討とエクストルージョン時に ADP をリポソームに更に内包させる条件検討がある。エクストルージョン時にメンブランフィルターの孔径よりも大きな粒径のリポソームを通

過させる際に、リポソームはずり応力を受けて大きく変形し、一部は分断して小さなリポソームとなる。その際に濃度勾配によって外水相の ADP がリポソームに入ると考えられている。以上の観点から Table 3 を考察する。

1) 脂質-エタノール溶液中の脂質濃度の検討

Table 3 のサンプル①, ②, ③, ④は、各々エタノール溶液中の混合脂質濃度を 50mg/mL, 100mg/mL, 200mg/mL, 300mg/mL としてリポソームを調製した結果である。エタノール注入法においては、注入速度、攪拌速度、脂質濃度等のパラメータを変化させることにより、注入後に調製されるリポソームの粒径が変化し、特にエタノール溶液中の脂質濃度を高くすると注入後に調製されるリポソームの粒径が大きくなることが知られている¹⁰⁾。本実験においても、エタノール中の脂質

濃度を増加させると粒径が大きくなる傾向が認められた。エタノール中の脂質濃度が 50mg/mL, 100mg/mL のサンプルは、注入後の粒径が 100nm を若干上回る大きさであるため、最終孔径 0.1 μ m のメンブランフィルターによるエクストルージョン時にあまりずり応力を受けることなく通過してしまい、エクストルージョン時の ADP の内包は期待できない状況であったと思われる。従って、エクストルージョンによって効果的に粒径制御される粒径 (約 150nm) となるエタノール注入時の脂質濃度条件では、エクストルージョン後のリボソームの ADP 内包量は増加したと考察できる。

他方、脂質回収率はサンプル間で大きな差や傾向は見られないが、ADP 内包効率はエタノール中の脂質濃度を高めるにつれ高くなっている。ただし、エタノール中の脂質濃度を 400mg/mL とした場合、加熱によって脂質をエタノールに溶解はできたものの注入時に析出してしまい、エクストルージョンが不可能であり、300mg/mL が上限であった。

2) 脂質-エタノール溶液と ADP 溶液の混合比の検討

Table 3 のサンプル④, ⑤, ⑥, ⑦は、エタノール溶液中の脂質濃度を 300mg/mL に固定して脂質-エタノール溶液の容量を各々 0.15mL, 0.3mL, 0.6mL, 0.9mL, 1.2mL とし、各々 2.85mL, 2.7mL, 2.4mL, 2.1mL, 1.8mL の ADP-PBS 溶液に注入して計 3mL リボソーム分散液を調製した結果である。

エタノール濃度を増加させるにつれ、リボソームの粒径が大きくなっている。これは、エタノールの可塑効果によってリボソームの膜の柔軟性・流動性が大きくなり、エクストルージョン時にフィルターを通過しやすくなり、粒径が制御されにくくなったためと考えられる。

また、エタノール濃度を増加させるにつれ ADP 内包量は減少する傾向が見られるが、脂質-エタノール溶液の割合を増やしたことにより、相対的に ADP-PBS 溶液の割合が減り、注入後のリボソーム溶液全体の ADP 濃度が薄まったためと考えられる。ADP 内包効率は、リボソーム分散液の脂質濃度の増加とともに向上した。他方、脂質回収率は、リボソーム溶液の脂質濃度が 120mg/mL の場合に大きく低下した。これは、脂質濃度を高すぎたためにリボソーム溶液の粘性が増し、エクストルージョン時のメンブランフィルター上に脂質が多く取り残されたためであろう。

3) リボソーム溶液中のエタノール濃度の検討

2) の実験では、エタノール溶液とリボソーム分散液の脂質濃度が同時に変更されていたため、エタノール濃度の影響のみを見ることは難しかった。そのため、サンプル⑨, ⑩, ⑪にて各々脂質濃度 300mg/mL, 150mg/mL, 100mg/mL の脂質エタノール溶液 0.3mL, 0.6mL, 0.9mL を、それぞれ 2.7mL, 2.4mL, 2.1mL の ADP-PBS 溶液に注入した。この場合には、リボソーム分散液の脂質濃度を 90mg/mL に統一させた状態で、エタノール濃度を各々 10%, 20%, 30% とした。

Table 3 から、エタノール濃度を増加させるにつれ粒径が小

さくなっていることが分かる。これは 1) と同じく、脂質-エタノール溶液の脂質濃度を低下させたために注入後の粒径が小さくなったためと考えられる。ADP 内包量が低いのも 1) と同じく、注入後の粒径が小さかったためにエクストルージョン時に ADP の内包が効果的に向上しなかった理由と、2) と同じく、脂質-エタノール溶液の割合を高めることによりリボソーム分散液全体の ADP 濃度が薄まったことが理由として考えられる。

ADP 内包量はエタノール濃度の増加に伴って減少しているものの、ADP 内包効率は 45% の間でほとんど変化していなかった。これは、(eq. 2) の分子の“脂質量あたりの ADP 内包量”が減少して分母の“調製に用いた ADP の総量”も同時に減少している理由と、エタノール濃度の高いサンプルほどリボソーム溶液の粘度が下がり、エクストルージョン後脂質回収率が高まって (eq. 2) の分子の“調製後の脂質量”が高くなった理由によると考えられる。

4) ADP 溶液の温度とエクストルージョン時の温度の検討

Table 3 のサンプル⑫と⑬, ⑭と⑮, ⑯と⑰では、脂質-エタノール溶液注入時の ADP-PBS 溶液の温度を各々 22.5 $^{\circ}$ C, 48.0 $^{\circ}$ C, 59.5 $^{\circ}$ C と変化させ、リボソームを調製した。また、それぞれのサンプルを 2 つに分け、⑫, ⑭, ⑯は 23 $^{\circ}$ C (常温) にてエクストルージョンを行い、もう一方の⑬, ⑮, ⑰は 50 $^{\circ}$ C でエクストルージョンを行った結果である。

粒径はサンプル間で特に違いは見られなかった。ADP 内包量は、PBS, エクストルージョン共に加熱した方が高くなっていた。これは、PBS の場合にはエタノール注入時のリボソームの形成時に ADP の分子運動性が高まり、エクストルージョンの場合にはフィルターを通過する際にリボソームの膜の分子透過性が高まり、ADP が内水相に入りやすくなったためと考えられる。

脂質回収率にも特定の傾向は見られなかったが、ADP の内包効率は ADP 内包量と同じ傾向を示しており、加熱により高くなっていた。これは、ADP の内包量が向上が ADP 内包効率の向上に直接つながったものと思われる。

5) ADP-PBS 溶液の ADP 濃度の検討

Table 3 のサンプル⑱, ⑲, ⑳では、各々 ADP-PBS 溶液の ADP 濃度を 1mM, 5mM, 10mM と変更してリボソームを調製した結果である。

粒径はサンプル間で大きな違いはなく、ADP 内包量は ADP-PBS 溶液の濃度におおよそ比例していた。ADP 内包効率、脂質回収率には大きな違いは見られなかった。(eq. 2) において、分子の“脂質量あたりの ADP 内包量”は向上しているが、同時に、分母の“調製に用いた ADP の総量”も向上しているためである。

6) 重回帰式の算出と注入条件の最適化

ADP 内包量を目的変数として得られた重回帰式 (eq. 3) と、各項の標準偏回帰係数を Table 4 に示す。

ADP 内包量 (mg/ 脂質 20 mg)

$$= 0.017i + 0.0094h^3 + 5.3 \times 10^{-4}e - 5.1 \times 10^{-7}c^3 + 9.7 \times 10^{-8}b^3 - 0.046$$

(eq. 3)

Table 4. Standard partial regression coefficient of the multiple regression equation for ADP encapsulation amount

Explanatory variables	i	h ³	e	c ³	b ³
Standard partial regression coefficient	0.786	0.424	0.208	-0.187	0.156

変域は、各条件の最小値と最大値を用いて以下のように設定した。

i : ADP-PBS 溶液の ADP 濃度 (mM), $1 \leq i \leq 10$

h : 注入器具の内径 (mm), $0.5 \leq h \leq 1.5$

e : エクストルーダーの温度 (°C), $23 \leq e \leq 50$

c : リボソーム分散中のエタノール濃度 (%), $5 \leq c \leq 30$

b : ADP-PBS 溶液の温度 (°C), $22.5 \leq b \leq 64.0$

この重回帰式の自由度修正済決定係数 R^2 は 0.87 であった。また、Fig. 1(A)に残差プロット、Fig. 1(B)に正規 Q-Q プロット、横軸と縦軸にそれぞれ実測値と予測値をとったプロットを Fig. 2 に示す。

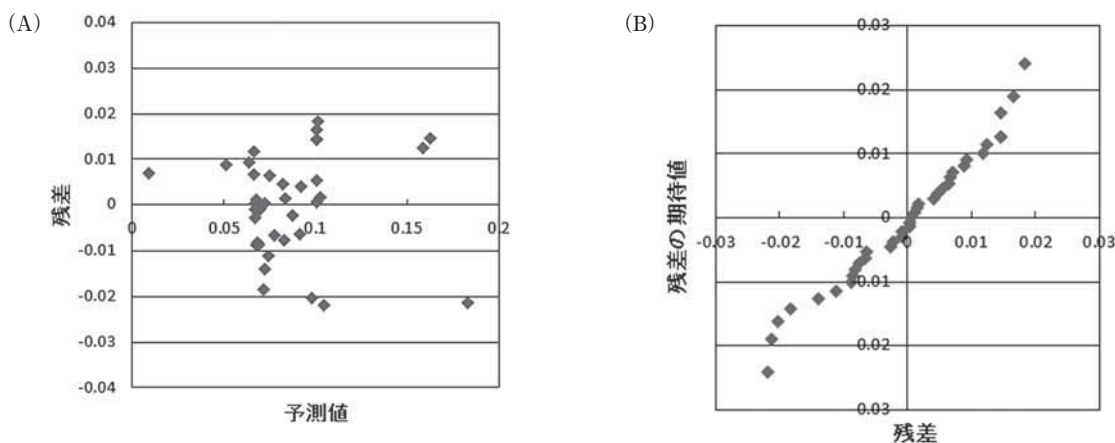


Fig. 1. Residual plot (A) and normal Q-Q plot (B) for ADP encapsulation amount

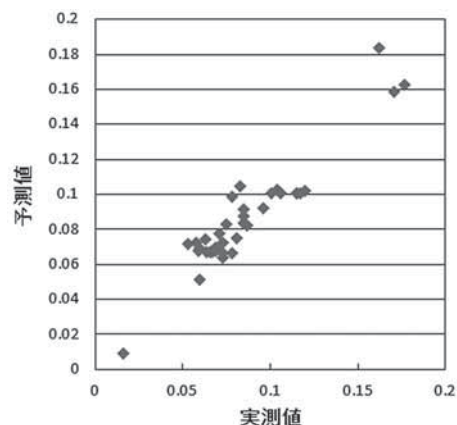


Fig. 2. Predicted value vs. measured value for ADP encapsulation amount

Fig. 1(A) より残差は適度にばらついていることが分かり、Fig. 1(B)からは残差が正規分布に従っていることが分かる。自由度修正済決定係数と Fig. 2 からは、得られた重回帰式が正確に実測値を予測していると判断できる。

ADP 内包効率を目的変数として得られた重回帰式を (eq. 4) に、各項の標準偏回帰係数 (各項の単位の違いを除いたものであり、各項の重要度を示す) を Table 5 に示す。

ADP 内包効率 (%)

$$= 0.0020d^2 + 2.3h^3 + 2.2 \times 10^{-5}b^3 + 0.024e - 4.1$$

(eq. 4)

Table 5. Standard partial regression coefficient of the multiple regression equation for ADP encapsulation efficiency

Explanatory variables	d ²	h ³	b ³	e
Standard partial regression coefficient	0.706	0.358	0.128	0.035

変域は、各条件の最大値と最小値を用いて以下のように設定した。

d : リボソーム溶液中の脂質濃度 (mg/mL), $1.4 \leq d \leq 90.9$

h : 注入器具の内径 (mm), $0.5 \leq h \leq 1.5$

b : ADP-PBS 溶液の温度 (°C), $22.5 \leq b \leq 64.0$

e : エクストルーダーの温度 (°C), $23 \leq e \leq 50$

この重回帰式の自由度修正済決定係数 R^2 は 0.96 であった。また、Fig. 3(A)に残差プロット、Fig. 3(B)に正規 Q-Q プロット、横軸と縦軸にそれぞれ実測値と予測値をとったプロットを Fig. 4 に示す。

自由度修正済決定係数と Fig. 3 から、得られた重回帰式が正確に実測値を予測できていると判断できる。Fig. 4 からは、残差が偏りなくばらついていること、残差が正規分布に従っていることが分かる。

内包効率に関する重回帰式と内包量に関する重回帰式を考察する。(eq. 3) と (eq. 4) にエクストルーダーの温度と PBS 溶液の温度が共通している。これは、“脂質量あたりの ADP 内包量”を向上させることにより、ADP 内包効率を向上させたと考えられる。その理由はエクストルーダーの温度を上げることによってエクストルージョン時のリポソーム膜の透過性が高まり ADP 内包が促進されるため、また、PBS 溶液の温度を上げることによってリポソーム形成時の膜の透過性が高まり ADP 内包が促進されるためと考えられる。(eq. 4) と (eq. 5) には注射針の内径も共通している。注入針の内径を大きくすると、注入後のリポソームの粒径も大きくなることが知られている⁸⁾。

エクストルージョン前のリポソームの粒径を大きくすることによって、エクストルージョン時のリポソームの変形が促進され、リポソームの膜の透過性が更に高まって、内包が促進されたと考えられる。これは、“エクストルージョン時に ADP 内包量を向上させる”に該当すると考えられる。

内包量に関する重回帰式 (eq. 3) では、PBS 溶液の ADP 濃度とリポソーム溶液のエタノール濃度が重要である。これは、内包 ADP の濃度には単純に PBS 中の ADP 濃度が相関しているためである。内包効率に関する重回帰式 (eq. 4) では、リポソーム溶液中の脂質濃度が最も重要である。これは、脂質量が増えることによりリポソームの数が増えるためである。しかし、PBS 溶液の ADP 濃度を上げても (eq. 2) 内の分子の“脂質量あたりの ADP 内包量”を向上させるが、同時に (eq. 2) の分母の“調製に用いた ADP の総量”も増えるため、結果として ADP 内包効率はほとんど変化しない。同様にリポソーム溶液中のエタノール濃度の割合を増やすと、(eq. 3) 内の分子の“脂質量あたりの ADP 内包量”が減少するが、ADP を溶解させている PBS 溶液の割合も減少するため、(eq. 2) の分母の“調製に用いた ADP の総量”も減少するため、結果として ADP 内包効率はほとんど変化しない。

内包効率の重回帰式 (eq. 4) に表されているパラメータ、リ

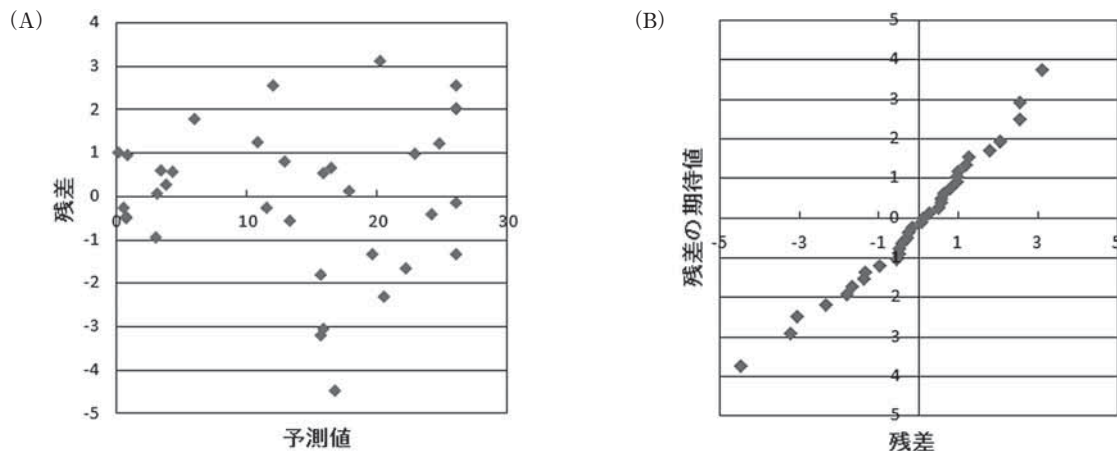


Fig. 3 Residual plot (A) and normal Q-Q plot (B) for ADP encapsulation efficiency

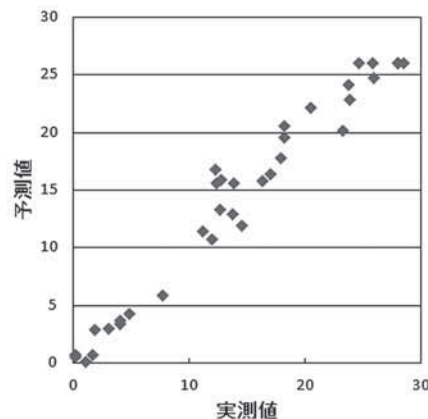


Fig. 4. Predicted value vs. measured value for ADP encapsulation efficiency

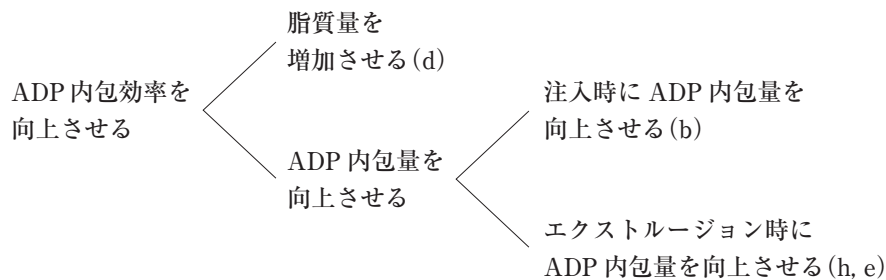


Fig. 5. Classification of each parameter in terms of mechanism for improving encapsulation efficiency (d: lipid concentration of liposome solution, b: temperature of PBS, h: diameter of injector, e: temperature of extruder)

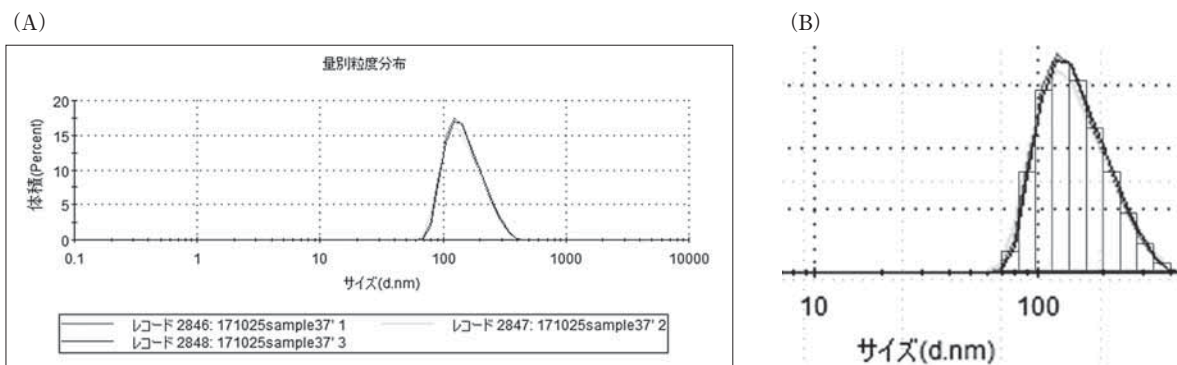


Fig. 6. Distribution of volume of liposomes (A) and its histogram (B)

ポソーム溶液の脂質濃度 (d), 注入器具の内径 (h), ADP-PBS 溶液の温度 (b), エクストルーダーの温度 (e) の相関を Fig. 5 にまとめた. 注入器具の内径 (h), ADP-PBS 溶液の温度 (b), エクストルーダーの温度 (e) は“ADP 内包量を向上させる”に分類されている通り, 内包量の重回帰式 (eq. 3) にも表されている.

また, 得られた内包効率に関する重回帰式 (eq. 4) を用いて, 目的変数の最大値を算出した. リポソーム溶液の脂質濃度 (d), 注入器具の内径 (h), ADP-PBS 溶液の温度 (b), エクストルーダーの温度 (e) にそれぞれ変域の最大値を代入した. その結果, 求められた ADP 内包効率の予測値の最大値は 27% であった.

ADP-PBS 溶液を 59.5℃ に, エクストルーダーを 50℃ に加熱した際のデータの条件が今回最適化した条件と一致しており, その内包効率 (実測値) は 29.5% であった.

7) 内包効率の最大値の理論値との比較

今回得られた ADP 内包効率の最大値の予測値は 27%, 実測値の最大値は 29.5% であったが, これらの数値が理論的にはどの程度であるか考察した.

内包効率 29.5% を示した際, リポソーム溶液中の脂質濃度は 90.9mg/mL であった. また, Fig. 6(B) のように, 粒径の体積分布からヒストグラムを作成し, その平均を求めると, 160nm であった.

脂質の混合比が DPPC/Cholesterol/DHSG/PEG-DSPE =

5/5/1/0.033 であることを考慮すると, DPPC は 6.94×10^5 mol 含まれていることになり, アボガドロ定数を $6.02 \times 10^{23}/\text{mol}$ とすると, これは 4.18×10^{19} 分子となる. また, π -A カーブより, DPPC と cholesterol が 1:1 のモル比で含まれるとき, DPPC 1 分子あたりの占有面積は 0.431 nm^2 となる¹¹⁾. これらの値を用い, 総脂質濃度 90.9mg/mL のリポソーム溶液 1mL における内水相の容量を算出した.

$$\begin{aligned} & \text{リポソームの表面積の合計 (nm}^2\text{)} \\ &= \frac{\text{DPPC 1 分子あたりの占有面積} \times \text{DPPC の分子数}}{\text{リポソームの膜数}} \\ &= \frac{0.431 \times (4.18 \times 10^{19})}{2} = 9.01 \times 10^{18} \text{ nm}^2 \end{aligned} \quad (\text{eq. 5})$$

$$\begin{aligned} & \text{リポソームの数} \\ &= \frac{\text{リポソームの表面積の合計 (nm}^2\text{)}}{\text{リポソーム 1 個あたりの表面積 (nm}^2\text{)}} \\ &= \frac{9.01 \times 10^{18}}{4 \times \pi \times (160/2)^2} = 1.12 \times 10^{14} \text{ 個} \end{aligned} \quad (\text{eq. 6})$$

$$\begin{aligned} & \text{リポソームの容量 (mL)} \\ &= \text{リポソーム 1 個あたりの容量 (mL)} \times \text{リポソームの数} \\ &= \left(\frac{4 \times \pi \times (160/2)^3}{3} \times 10^{-21} \right) \times (1.12 \times 10^{14}) = 0.24 \text{ mL} \end{aligned} \quad (\text{eq. 7})$$

この結果は脂質濃度 90.9mg/mL のリポソーム分散液において、リポソーム内外の ADP の濃度差が無くなったとき、内包効率が 24% となることを示している。すなわち、今回の実験における内包効率の理論的な最大値とも言える。実際は DPPC: cholesterol = 1:1 の混合脂質ではなく、DHSG や PEG-DSPE も含まれているため、分子の占有面積はやや大きくなると想定され、リポソームの表面積の合計もそれに伴って大きくなる可能性がある。従って、重回帰より導出された予測値の最大値である 28%、実測値の最大値である 29.5% は妥当であると考えられる。

4. 結論

重回帰分析を用いることにより、ADP 内包効率の向上に重要なパラメータを特定できた。また、実験データや ADP 内包量に関する重回帰分析の結果を参照することにより、各パラメータがどのように ADP 内包効率を向上させるのか、なぜ重要であるのかを考察できた。ADP 内包効率に関する重回帰式から導出された内包効率の最大値と、重回帰式から導出された最適条件を用いて達成された内包効率の実測値の最大値は、理論計算による内包効率の値とほぼ同等であった。

また、導出された ADP 内包効率を最大にする条件（リポソーム溶液の脂質濃度 90mg/mL、注入器具の内径 1.5mm、PBS の温度 64℃、エクストルーダーの温度 50℃）は、使用する ADP 濃度を 5mM とした中では ADP 内包量も最大（0.12mg/脂質 20mg）であった。現在、本調製条件で得られた ADP 内包リポソーム表面にドデカペプチド H12 を担持させたものは、十分な止血能を有することが動物試験にて予備的に確認されている。

謝辞

重回帰解析にてご助言を頂いた早稲田大学大学院先進理工学研究科 教授 村田 昇 博士に謝意を表します。

引用文献

1) Batzri S, Korn ED. Single bilayer liposomes prepared without

sonication. *Biochim Biophys Acta* 1973; 298; 1015-1019

- 2) Zheng Y, Tao C. Increasing the Entrapment of Protein-Loaded Liposomes with a Modified Freeze-Thaw Technique: A Preliminary Experimental Study. *Drug Develop Indust Pharm* 2009; 35; 165-171
- 3) Charcosset C, Juban A, Valour J, Urbaniak S, Fessi H. Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices 2015; 94; 508-515
- 4) Northern Lipids Inc.. Lipex Diaphragm Pump Extrusion System Operating Manual Ver. 1.0: Northern Lipids Inc., 2009; 1-51
- 5) Okamura Y, Takeoka S, Eto K, Maekawa S, Fujie T, Maruyama H, Ikeda Y, Handa M. Vesicles of variable diameter prepared by a modified injection method. *J Thromb Haemost* 2009; 7; 470-477
- 6) 菅民郎. 例題と Excel 演習で学ぶ多変量解析 回帰分析・判別分析・コンジョイント分析 編: オーム社, 2016; 64-66, 86
- 7) 野澤昌弘. JUSE-StatWorks による多変量解析入門 [第 2 版]. 棟近雅彦 編: 日科技連, 2012
- 8) 加藤剛. 本当に使えるようになる多変量解析超入門 (知識ゼロでもわかる統計学): 技術評論社, 2013; 148-158
- 9) 菅民郎. Excel で学ぶ実験計画法—シックスシグマと重回帰分析: オーム社, 2002; 140-142
- 10) Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Sang WJ, Zarghami N, Hanifehpour Y, Samiei M, Kouhi M, Nejati-Koshki K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* 2013; 8; 102-110
- 11) Kodama M, Shibata B, Nakamura S, Lee S, Sugihara G. A monolayer study on three binary mixed systems of dipalmitoyl phosphatidyl choline with cholesterol, cholestanol and stigmasterol. *Coll Surf B* 2004; 33; 211-226

温度応答性リポソームの開発と薬物送達システムへの応用

Development of Temperature-Responsive Liposomes and Their Application for Drug Delivery Systems

宗 慶太郎

Keitaro Sou

和文抄録

脂質分子の自発的分子集合により形成される閉鎖小胞体（リポソーム）は、タンパク質、核酸、低分子薬物などを微粒子として体内に投与するキャリアとして使われ、人工血液や薬物送達システム（DDS）への応用においてその安全性や効果が実証されている。温度に応答した薬物放出機能をもつ温度応答性リポソームは、熱刺激により薬物動態を制御するナノデバイスとして次世代DDSへの応用が期待される。本稿では、温度応答性リポソームの設計原理とDDSへの応用について概説する。温度応答性リポソームをDDS技術として生体内で安全・効果的に機能させるには、特定細胞や組織の標的化、微小空間の正確な温度制御と温度モニタリング、薬物動態や薬物放出挙動の可視化などの新しい技術開発と並行した進展が重要となる。

Abstract

Closed vesicles (liposomes) formed by spontaneous molecular assembly of lipid molecules have been used as carriers for injecting proteins, nucleic acids, and drugs, etc. as micro/nanoparticles into the body. The safety and efficacy of the liposomal formulations has been demonstrated in application to artificial blood and drug delivery system (DDS). Temperature-responsive liposomes that release drugs in response to temperature are expected to be applied for next-generation DDS as nanodevices that control pharmacokinetics by heat stimulation. This paper reviews the design principle and DDS applications of temperature-responsive liposomes. Development of advanced technologies such as targeting specific cells and tissues, accurate temperature control and temperature monitoring in nano/micro scales, and imaging of pharmacokinetics and drug release behavior is important to function the temperature-responsive liposomes as a DDS technology.

Keywords

drug delivery system, drug release, hyperthermia, temperature-responsive liposomes

1. はじめに

DDSの研究開発は、薬物の体内動態を最適化することで副作用を最小限に抑えながら薬物としての効果を最大限に高める技術の治療に応用することを目的としている。特に抗がん剤投与による治療では、多くの場合正常細胞への副作用を伴うため、効果的なDDS技術の開発が待たれている。がんの治療では、投与した抗がん剤をできるだけ高い効率でがん細胞内まで安定に到達させて、がん細胞内で強力に薬物を作用させることが目標となる。

現在までに、ポリエチレングリコール（PEG）鎖で表面修飾

したリポソーム（ステルスリポソーム）にドキソルビシン（DOX）を内包したDoxilが抗悪性腫瘍剤として臨床応用されている¹⁻³⁾。PEG鎖で表面修飾するとリポソームの血中滞留性が向上するため、腫瘍組織の高い血管透過性により腫瘍組織への蓄積が進行する（EPR効果）^{4,5)}。EPR効果の臨床的意義については十分なエビデンスが得られていないものの⁶⁾、非臨床試験ではEPR効果による受動的ターゲティングの効果が確認されている。リポソームに内包されたDOXはがん細胞に作用しないため、腫瘍組織に移行した後のリポソームからのDOXの放出挙動やがん細胞内へのリポソームの移行はがん細胞での薬

早稲田大学 理工学術院総合研究所

〒162-8480 東京都新宿区若松町2-2 Research Institute for Science and Engineering, Waseda University, 2-2 Wakamatsu-cho, Shinjuku, Tokyo 162-8480, Japan

E-mail: soukei@aoni.waseda.jp

論文受付 2018年7月10日 論文受理 2018年7月24日

物利用効率に関連する重要な因子である。現在のところ、腫瘍組織内に蓄積した後のステルスリポソームからの薬物放出を制御できず、加えて、がん細胞によるステルスリポソームの取り込みが活発でないため、リポソームから腫瘍間質液中にゆっくりと放出された遊離 DOX ががん細胞に取り込まれていると理解されており、これががん細胞での薬物利用効率低下の一因になっていると考えられている^{2,3)}。

従って、がん細胞での薬物利用効率を増大させることが課題となっており、腫瘍組織まで安定に薬物を保持して送達した後、がん細胞に積極的に取り込まれ、がん細胞内で薬物を速やかに放出するリポソームの開発が求められている。このようなリポソームを設計すると、相反する薬物の保持機能が必要になる。すなわち、がん細胞内に到達するまでは薬物を安定に保持する機能が必要で、がん細胞内に到達した後は薬物を積極的に放出する機能が必要になる。このジレンマを解消するため、外部刺激により薬物保持機能を制御できる刺激応答性リポソームが開発されており、熱、磁場、音波、光、pH などが外部刺激として使われている⁷⁻¹²⁾。特に熱エネルギーは正常組織に低侵襲で生体組織のあらゆる部分への照射が可能で、がんの温熱療法と組み合わせた相乗効果も期待できる。

2. 温度応答性リポソームの設計原理

特定の温度に応答して薬物を放出するリポソームは、温度応答性リポソームないし温度感受性リポソームと呼ばれる（本稿では、温度応答性リポソームとする）。DDS に用いられる温度応答性リポソームは、体温（37℃付近）以下の温度では薬物を安定に保持し、外部から熱エネルギーを与えて温度上昇させると、特定の温度（臨界温度）以上で薬物を放出するように設計される。温度応答性リポソームの臨界温度は 40～43℃の範囲に設定される場合が多いが、42.5℃以上に温度が上昇すると細胞の生存率が低下するため¹³⁾、正常組織に侵襲を与えずに安全に加熱するには 42℃以下が望ましい。温度応答性リポソームは、設計原理や構成成分によっていくつかに分類される。

2-1. 脂質の相転移による温度応答性リポソーム

脂質分子が形成する脂質二分子膜は、成分組成によって温度変化に応答して可逆的に相転移する。ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）では 41℃で相転移が起こり、この温度以上では流動性の高い無秩序相（液晶相）、以下では流動性の低い秩序相（ゲル相）をとる。この転移温度をゲル液晶相転移温度（ T_m ）という。 T_m は、脂質分子の親水頭部の構造、アシル鎖の鎖長と不飽和度などに依存し、アシル鎖が長くなると高くなり、不飽和度が高くなると低下する¹⁴⁾。 T_m では、脂質分子の炭化水素鎖の炭素-炭素結合の配向がトランスからゴーシェ状態に変化し脂質分子の充填状態に大きな変化が生じる^{15,16)}。

脂質の相転移による温度応答性リポソームの概念が初めに報告されたのは 1970 年代後半で、DPPC とジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC、 $T_m=55^\circ\text{C}$ ）を 7:3 のモル比で混合したリポソーム（ $T_m=41-43^\circ\text{C}$ ）が使われた¹⁷⁾。相転移するリポ

ソームを T_m まで加熱すると、固相（ゲル相）脂質膜ドメインと液晶相脂質膜ドメインが混在する状態になり、相の境界に生じる結晶粒界（Grain Boundary）により薬物透過性が増大する（図 1）。相転移を利用する温度応答性リポソームには、DPPC やジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）を主成分として、DSPC や水素添加大豆ホスファチジルコリン（HSPC）を混合した膜が主に用いられ、異なる相転移温度をもつ脂質の組み合わせにより脂質膜の結晶粒界の欠陥が増大し膜透過性が増大する。リポソームの安定性を高めるために、コレステロールを含有するリポソームも検討されたが、コレステロールは脂質膜の相転移温度を広幅化ないし消失させるため、温度に応答した薬物放出の速度や効率に負の効果を与える場合がある¹⁸⁾。ステルスリポソームと同様に、温度応答性リポソームの表面をジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE）に結合した PEG（分子量 2,000）（PEG2000-DSPE）で修飾することで血中滞留時間が延長する。加えて、4 - 5 mol% の PEG2000-DSPE を温度応答性リポソームに導入すると、 T_m には変化しないものの PEG2000-DSPE が脂質膜の結晶粒界の安定化に寄与するため内包物の放出が増加する¹⁹⁾。

混合脂質膜の相転移を利用した温度応答性リポソームは、一般的に薬物放出速度が緩やかなため長時間の加熱を要し、薬物放出効率が低いと理解されている。一方で、DPPC : DSPC : PEG2000-DSPE（90 : 10 : 5 モル比）で構成される温度応答性リポソームにリポソーム内水相の pH を下げた pH 勾配法で内包した DOX は、42℃で 1 分間加熱することで 95%が放出される^{19,20)}。これは、 T_m 付近で pH 勾配が解消されて DOX が溶解

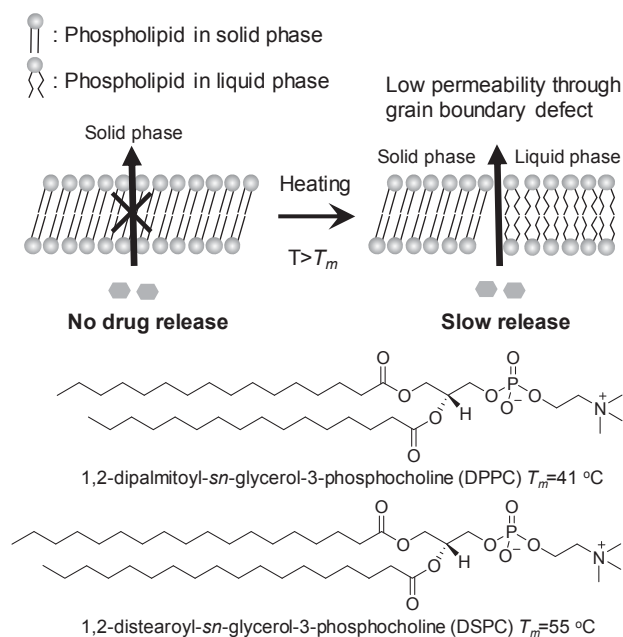


Fig. 1 Drug release from temperature-responsive liposomes based on phase transition of the lipid membrane which typically consists of DPPC and DSPC mixture. At the gel to liquid-crystalline phase transition temperature (T_m), mixed state of solid and liquid phases leads the grain boundary defect in the bilayer membrane that permits the drug release.

するためと考えられている。また、*in vitro*でのモデル実験と比較して、*in vivo*実験では温度応答性リポソームからの薬物放出が促進されることが報告されており、血漿タンパク質や脂質などのリポソーム膜を不安定化する因子による結晶粒界の安定化が示唆されている^{20, 21)}。

2-2. リゾ脂質を利用する温度応答性リポソーム

リポソームの成分にアシル炭素鎖を一本もつリゾ脂質を混合すると、薬物の透過性が増大する。このコンセプトは1999年に報告され、DPPC:PEG2000-DSPE (90:4 モル比) からなるリポソームに~10mol%のリゾ脂質 [モノパルミトイルホスファチジルコリン (MPPC) やモノステアロイルホスファチジルコリン (MSPC)] を導入すると、温度応答性の薬物放出が大幅に増強されることが示された²²⁾。10mol%のMSPCを導入したリポソームでは、MSPCを導入してないリポソームと比較して42℃でのDOXの膜透過係数が10倍大きくなる²³⁾。

リゾ脂質は、疎水部に比べて親水頭部が相対的に大きく、臨界ミセル濃度より高い濃度の水溶液中で曲率の大きいミセルを形成する傾向がある。相転移に近づくときとゲル相と液晶相の境界に生じる結晶粒界にリゾ脂質が蓄積して、脂質膜中に安定化した欠陥 (ナノ細孔) の形成が促される²³⁾ (図2)。分子量の異なるデキストランの透過挙動から、ナノ細孔の大きさは~10nmと見積もられており²⁴⁾、この細孔を通して速やかに薬物が放出される。PEG2000-DSPEの導入は、ナノ細孔内の反発力をもたらすことによってナノ細孔の形成および安定化を助長して温度応答性の薬物放出を増強する。

リゾ脂質を含有する温度応答性リポソームは、その優れた温度応答性薬物放出能の一方で、*in vivo*における不安定性が指摘

されている。リゾ脂質はアシル鎖を二本もつ脂質のように安定な分子集合体を形成できずリポソームから容易に離脱する。実際に、*in vivo*投与後1時間以内にリポソームから約70%のリゾ脂質が解離することが示されており、リポソームから血漿タンパク質や細胞膜に移行するためと考えられている²⁵⁾。リゾ脂質は薬物の膜透過を促すナノ細孔の形成に関与するため、*in vivo*投与してリゾ脂質の解離が進行すると薬物放出能が低下していく²⁵⁾。従って、リゾ脂質を利用する温度応答性リポソームは、短時間で標的部位に到達して速やかに熱刺激により薬物放出する用途に適している。

2-3. 高分子を利用する温度応答性リポソーム

温度応答性高分子とリポソームのハイブリッドによる温度応答性リポソームが開発されている²⁶⁻²⁹⁾。温度応答性高分子をリポソーム膜に取り付けることで、脂質膜の相転移を利用する温度応答性リポソームの薬物放出を増強できるだけでなく、温度応答しないリポソームに温度応答性の薬物放出能を付与することもできる。温度応答性高分子は、低温では水に溶けているが、加温するとある温度を境に溶解度が急激に低下して水に溶けなくなる。これは、高温になると高分子鎖と水との水素結合が切れて水不溶性になるため、溶解度の低下が始まる温度を下限臨界共溶温度 (LCST) と呼ぶ。温度応答性高分子をリポソーム表面に取り付けると、LCSTより低い温度では、高分子は水和されリポソーム表面に伸展して立体安定化に寄与する。一方、温度がLCST以上に上昇すると、水不溶となった高分子が凝縮してリポソーム膜を不安定化して内包物の放出をもたらす (図3)。

温度応答性高分子を利用した温度応答性リポソームは1994年に河野らにより初めて報告された²⁷⁾。これまでに、多くのリポソーム組成と温度応答性高分子の組み合わせが報告されており、温度応答性高分子として*N*-イソプロピルアクリルアミド (NIPAM) の共重合体が主に用いられてきた (図3)。NIPAMの重合体は約32℃にLCSTを有しているが、疎水性モノマー [アクリル酸オクタデシル (ODA), *N,N*-ジドデシルアクリルアミドなど] との共重合によりLCSTは低下し、逆に親水性モノマー [アクリル酸 (AA), アクリルアミド (AAM), プロピルアクリルアミド, *N*-アクリロイルピロリジンなど] との共重合ではLCSTが上昇する²⁶⁻²⁹⁾。

温度応答性高分子を利用した温度応答性リポソームでは、リポソーム工学の側面から温度に応答した薬物放出挙動について*in vitro*実験を中心に多くの興味深い結果が得られている。リポソームの組成と温度応答性高分子の種類の組み合わせにより多くのバリエーションが可能で、今後も工学的な側面からより精度の高い温度応答機能をもったリポソームの開発が進められていくものと思われる。一方で、リポソーム表面はさまざまな生体反応に関与し、特殊な温度応答性高分子で修飾したリポソームの体内動態、毒性、代謝などについては従来のリポソームと異なる可能性がある。臨床応用に向けた*in vivo*での実践的な研究により、安全性や治療効果について温度応答性高分子

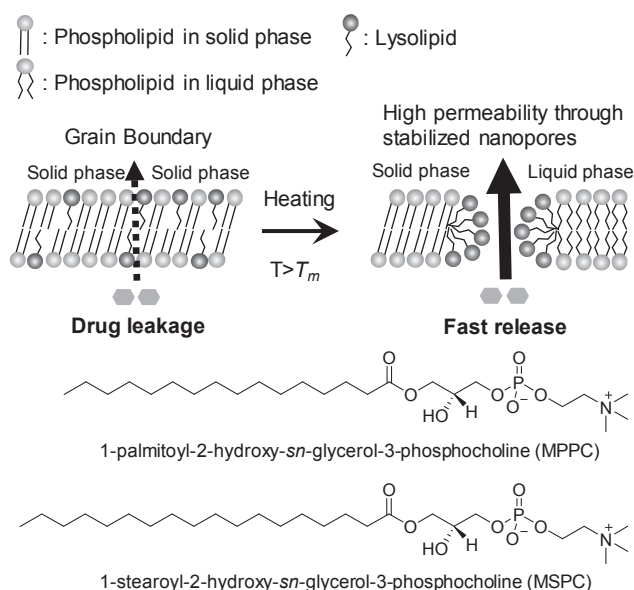


Fig. 2 Mechanism of enhanced drug release from temperature-responsive liposomes using lysolipids such as MPPC and MSPC. The grain boundary defect between solid and liquid phases is stabilized by the lysolipids forming nanopores that permit high permeability of drugs.

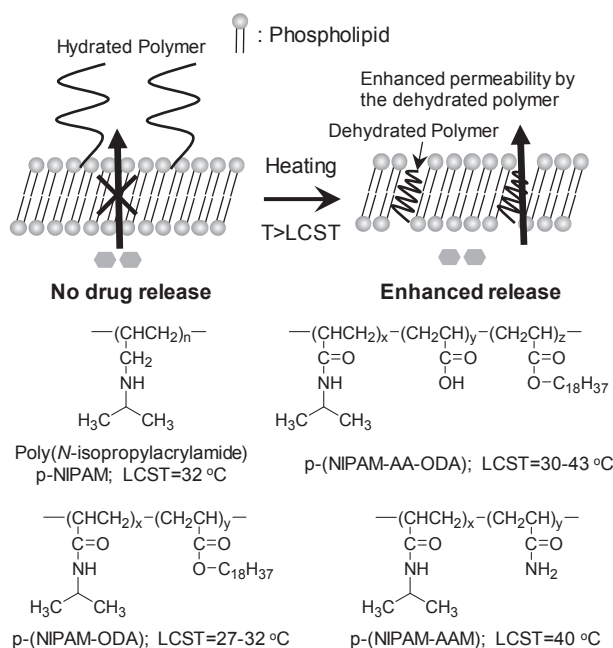


Fig. 3 Mechanism of enhanced drug release from temperature-responsive liposomes using temperature-responsive polymers. Copolymers of N-isopropylacrylamide (NIPAM) is mainly used as the temperature-responsive polymers. The hydrated temperature-responsive polymers are extended from the surface of liposomes below lower critical solution temperature (LCST). At temperature above LCST, the temperature-responsive polymers are dehydrated and destabilize the liposome membrane. ODA: octadecyl acrylate, AA: acrylic acid, AAM: acrylamide

を用いる利点の検証が待たれている。

2-4. 脂質の相転移と浸透圧を利用する温度応答性リポソーム

浸透圧が低い溶液（低張）を赤血球と混合すると赤血球内外の浸透圧に差が生じ、赤血球外の水が半透膜の性質をもつ細胞膜を通して赤血球内に流れ込み、最終的に赤血球が破裂してヘモグロビンが放出される（低張溶血）。リポソーム膜も細胞膜と同様に半透膜の性質を示すことから、リポソーム内外の電解質濃度差を作ることによって浸透圧差をつくることができ、温度応答性リポソームの薬物放出の促進に利用できる（図4）³⁰⁻³²。生体内で温度応答性リポソームからの薬物放出を促進する目的では、リポソームの外層の浸透圧は生理条件（300mOsm/L）となるので、温度応答性リポソームに生理条件より高張溶液を内包する。

DPPE: 負電荷脂質 (SA): PEG5000-DSPE (9:1:0.06 モル比) で構成される温度応答性リポソーム ($T_m=40^\circ\text{C}$) に 250, 550, 850mOsm/L の溶液を内包して、 42°C で 10 分間加熱した後の蛍光マーカー（カルセイン）の放出を比較すると、5%, 67%, 87% のカルセインがリポソームから放出される³¹。リポソーム内層の浸透圧が高くなるほど薬物放出効率が上がるが、850mOsm/L まで浸透圧を上げると 37°C で 10 分間加熱後に 6% のカルセインの漏出が観測される。従って、体温付近で

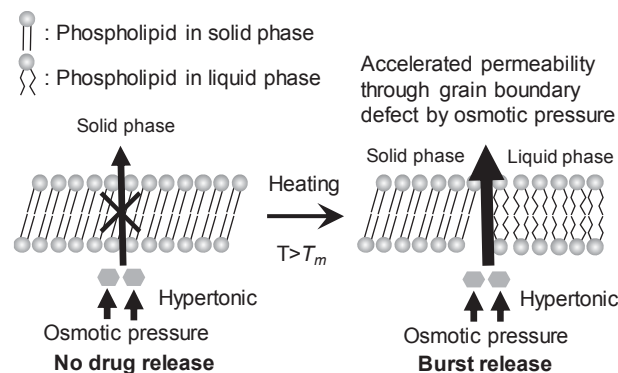


Fig. 4 Mechanism of accelerated drug release from temperature-responsive liposomes based on phase transition of the lipid membrane and osmotic pressure. The temperature-responsive liposomes encapsulating hypertonic solution rapidly release drug at T_m with help of osmotic pressure.

薬物を安定に保持し加温時に限り薬物を効率高く放出するには、リポソームの組成と薬物の種類によって浸透圧の適正範囲の設定が必要である。本法は、浸透圧を利用することで特殊な脂質や高分子を使わずに温度応答性の薬物放出を加速できる利点がある。経時的な浸透圧差の解消による薬物放出能の低減や *in vivo* における安定性や効果についての更なる検討が必要である。

3. リポソームの表面修飾によるがん細胞の標的化

がん細胞での薬物利用効率を確実に増大して、がん細胞選択的に高濃度の抗がん剤を作用させるには、温度応答性リポソームをがん細胞に能動的に取り込ませる仕組みが必要となる。他の正常細胞に比較してがん細胞で高発現している受容体はがん細胞標的化のターゲットとなり、この受容体に特異的に結合する抗体やリガンド分子をリポソームの表面に取り付けることでがん細胞の標的化が試みられている。

葉酸は真核細胞においてヌクレオチド塩基の生合成に必要な必須ビタミンとして細胞内に取り込まれる³³。葉酸受容体の発現は細胞種や組織内の細胞の局在に大きく依存することが知られており、特定のがん細胞（上皮細胞、卵巣がん、子宮頸がん、乳がん、肺がん、腎臓がん、結腸直腸がんおよび脳腫瘍）の膜上で高発現している^{34,35}。従って、葉酸はがん細胞の検出や標的化のためのリガンドとして使用でき、葉酸で表面修飾したリポソームはがん細胞に能動的に取り込まれる³⁶⁻³⁸。

葉酸をリポソーム表面に取り付ける方法としては、葉酸を親水基に導入した両親媒性分子をリポソームの成分として混合するのが一般的である^{36,37}。一方、あらかじめ調製したリポソームの表面を葉酸で修飾することもできる³⁸。ジベンゾシクロオクテン基 (DBCO) とアジド基 (N_3) は、水中で混合すると温和な条件で効率高く化学反応が進行してトリアゾール環を形成する（クリック反応）。ジベンゾシクロオクテン基を頭部に導入した両親媒性分子 (DBCO-PEG₅-G16) を使うと、リポソーム表面に DBCO 基を固定できる（図 5A, B）。DPPE: SA:

PEG5000-DSPE (9 : 1 : 0.03 モル比) からなる温度応答性リポソームに 5mol% の DBCO-PEG₅-G16 を導入し、このリポソーム分散液にアジド基を導入した葉酸 (FA-N₃) を添加するとリポソームの表面でクリック反応が進行し、葉酸で表面修飾したり

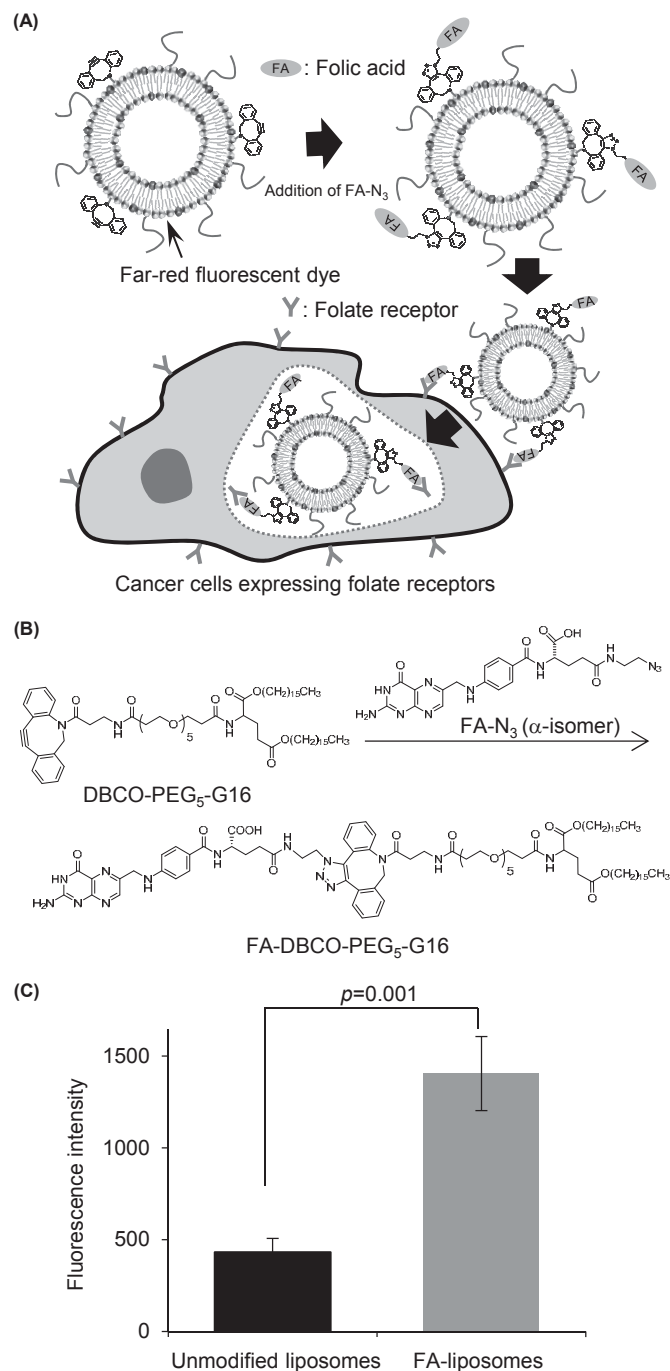


Fig. 5 Surface modification of liposomes with folic acids to target cancer cells. (A) Remote surface modification of preformed liposomes with folic acids. (B) Molecular components for remote modification of preformed liposome with folic acids by click chemistry. (C) Fluorescence intensity of SKOV-3 ovarian cancer cells treated with unmodified liposomes and folic acid (FA)-modified liposomes. Data are mean $\pm$ SD (n=3). Statistical analysis for two group comparisons was done with a two-tailed unpaired t-test. (Modified the original published in reference 38)

ポソームが簡便に得られる。葉酸受容体を高発現することが知られている卵巣がん細胞 (SKOV-3) によるリポソームの取り込みを比較すると、葉酸で表面修飾したリポソームでは取り込み量が有意に増大している (図 5C)。この方法では、葉酸に限らずアジド基を導入したりリガンド、タンパク質、核酸などを温和な条件でリポソームの表面に取り付けることがきき得るため、リポソームのがん細胞への取り込みを増強させる方法論として広く応用できると思われる。がん細胞に取り込まれた後に熱刺激により温度応答性リポソームから薬物を一気に放出させることで、がん細胞での薬物利用効率の大幅な向上が期待できる。

4. 生体組織の局所加熱

温度応答性リポソームを DDS に応用するには、リポソーム技術の進展に加えて生体組織の局所を正確に加熱する技術が必要となる。がん治療法の一つの選択肢として温熱療法が知られており、がん組織やがん細胞を局所加熱する医療技術の開発が進んでいる。温熱療法における古典的な方法は温浴での加熱で、この方法は表面組織を加熱するための選択肢として利用可能であるが、標的部位の局所的な加熱や生体深部の加熱は難しい³⁹⁾。局所的な温熱療法のためには、電磁波や超音波の使用が検討されている^{40, 41)}。

レーザー光は遠隔的にエネルギーを照射するツールとして有効で、特に近赤外領域 (波長 700-1100nm) のレーザー光が局所加熱のエネルギー源として注目されている。近赤外領域の光エネルギーを熱に変換 (光熱変換) する物質として、近赤外吸収色素⁴²⁻⁴⁴⁾や金ナノ粒子^{45, 46)}などが用いられ、加熱したい部位に近赤外吸収色素や金ナノ粒子などの光熱変換物質を配置することで、ナノスケールでの加熱が可能である。脂質二分子膜や内水相に光熱変換物質を担持させた温度応答性リポソームに近赤外レーザーを照射すると熱が発生して薬物が放出される⁴²⁻⁴⁶⁾。また、980nm の近赤外レーザーを使えば、近赤外吸収色素や金ナノ粒子を使わずに生体組織を加熱できる^{31, 32, 47)}。980nm の近赤外光は水に吸収されて熱に変換されるため、水分を多く含む生体組織ではレーザーを照射した部分が加熱される。

温度応答性リポソーム ($T_m=40^\circ\text{C}$) に濃度消光する条件でカルセインを内包してがん細胞 (HeLa 細胞) に取り込ませ、近赤外レーザー (波長: 980nm) 照射で加温すると、細胞内でリポソームからカルセインが放出されて蛍光強度が上昇する様子が観測される (図 6)³¹⁾。温度制御には温度モニターが不可欠で、温度が上昇すると蛍光強度が低下する温度感受性蛍光分子 (ER thermo yellow) を用いると細胞内の温度も同時に測定できる⁴⁸⁾。レーザー照射すると細胞内の温度が上昇して、細胞内の温度が 40°C に達した辺りでカルセインの蛍光強度の増大が認められることから (図 6C)、細胞内で温度応答性リポソームから温度にตอบสนองして内包物が放出されている様子が計測できている。細胞レベルでの局所加熱や温度モニター、薬物放出の可視化技術の進展は、特定の細胞内で正確に温度応答性リポソームの薬物放出を制御する技術の確立に不可欠である。

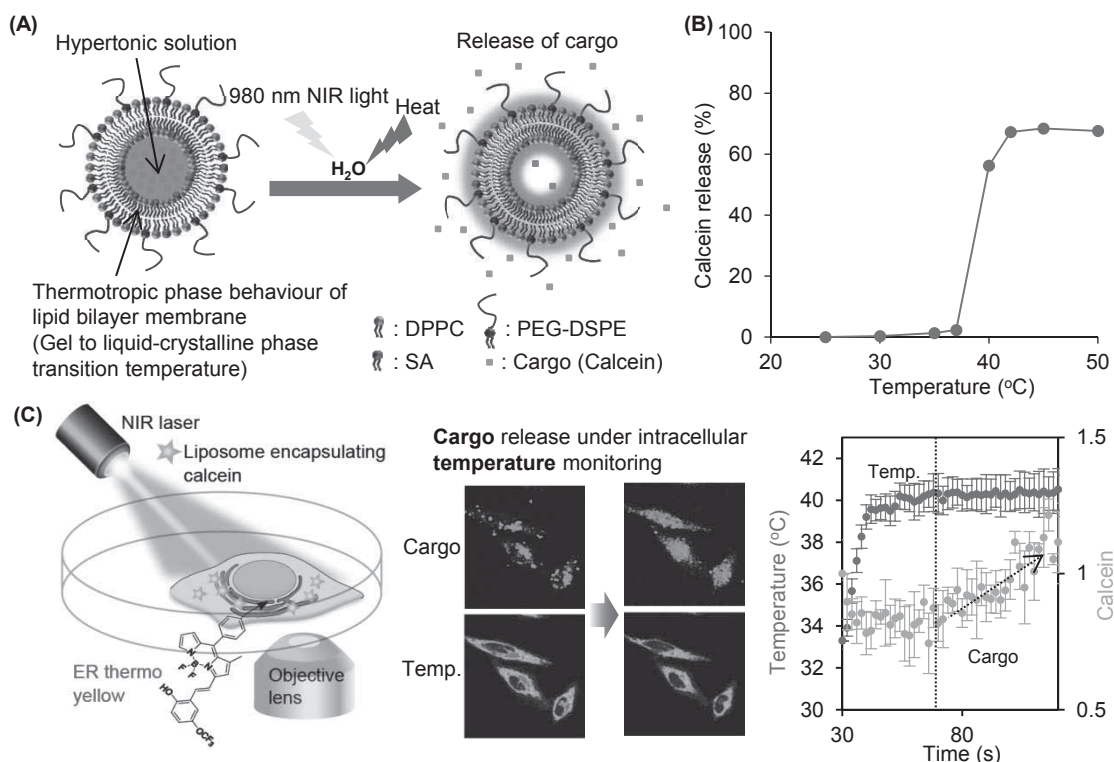


Fig. 6 Photothermal release of cargo from temperature-responsive liposomes under intracellular temperature monitoring. (A) Near-infrared light-triggered release of cargo from temperature-responsive liposomes encapsulating hypertonic solution. (B) Calcein release from temperature-responsive liposomes encapsulating hypertonic solution (50 mM calcein, 200 mM NaOH, and 150 mM sodium gluconate) at various temperatures. (C) On-demand release of calcein from temperature-responsive liposomes in HeLa cells by irradiation of 980 nm laser. The HeLa cells were stained with temperature-sensitive fluorescent dye (ER thermo yellow) for monitoring the intracellular temperature. (Modified the original published in reference 31)

5. おわりに

リポソームを使った抗悪性腫瘍剤 (Doxil) がFDAに認可 (1995年) されてから20年以上が経過した。DOXに比較してリポソーム化したDoxilでは副作用を軽減できる利点が確認されたが、Doxilの腫瘍組織への移行率が高いわりに治療効果は期待ほど高くない⁴⁹⁾。この原因として、Doxilのがん細胞内への移行率が低くリポソームからの薬物放出速度も緩やかなのでがん細胞での薬物利用効率が低い点が指摘され、次世代リポソーム製剤の開発課題となっている。がん細胞に積極的に取り込まれ、熱刺激により薬物を放出する温度応答性リポソームは、この課題解決に有効である。熱による薬物放出制御は同時にごん細胞に対する熱刺激となるので相乗効果も期待できる。温度応答性リポソームを生体内で安全かつ効果的に機能させるには、微小スケールの局所加温や温度モニタリング、薬物動態や薬物放出の可視化技術の進展も重要で、温度応答性リポソームはこれらのマルチ機能を搭載したスマートデバイスとして進化していき、次世代医療に貢献するものと思われる。

謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費 (JP16H03844) の助成により行われた。

参考文献

1. Gabizon A, Catane R, Uziely B, Kaufman B, Safra T, Cohen R, Martin F, Huang A, Barenholz Y. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res* 1994; 54: 987-992.
2. Gabizon AA, Shmeeda H, Zalipsky S. Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting. *J Liposome Res* 2006; 16: 175-183.
3. Barenholz Y. Doxil® the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release* 2012; 160: 117-134.
4. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 1986; 46: 6387-6392.
5. Wu NZ, Da D, Rudoll TL, Needham D, Whorton AR, Dewhirst MW. Increased microvascular permeability contributes to preferential accumulation of stealth liposomes in tumor tissue. *Cancer Res* 1993; 53: 3765-3770.
6. Prabhakar U, Blakey DC, Maeda H, Jain RK, Seivick-Muraca EM, Zamboni W, Farokhzad OC, Barry ST, Gabizon A,

- Grodzinski P. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect (Epr) for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res* 2013; 73: 2412-2417.
7. Needham D, Dewhirst MW. The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 53: 285-305.
 8. Al-Ahmady Z, Kostarelos K. Chemical components for the design of temperature-responsive vesicles as cancer therapeutics. *Chem Rev* 2016; 116: 3883-3918.
 9. Zhang Y, Yu J, Bomba HN, Zhu Y, Gu Z. Mechanical force-triggered drug delivery. *Chem Rev* 2016; 116: 12536-12563.
 10. Shim G, Ko S, Kim D, Le QV, Park GT, Lee J, Kwon T, Choi HG, Kim YB, Oh YK. Light-switchable systems for remotely controlled drug delivery. *J Control Release*. 2017; 267: 67-79.
 11. Suzuki R, Oda Y, Omata D, Nishiie N, Koshima R, Shiono Y, Sawaguchi Y, Unga J, Naoi T, Negishi Y, Kawakami S, Hashida M, Maruyama K. Tumor growth suppression by the combination of nanobubbles and ultrasound. *Cancer Sci* 2016; 107: 217-23.
 12. Li T, Amari T, Semba K, Yamamoto T, Takeoka S. Construction and evaluation of pH-sensitive immunoliposomes for enhanced delivery of anticancer drug to ErbB2 over-expressing breast cancer cells. *Nanomedicine* 2017; 13: 1219-1227.
 13. Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, Felix R, Riess H. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 43: 33-56.
 14. Koynova R, Caffrey M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim Biophys Acta* 1998; 137: 91-145.
 15. Nagle JF, Tristram-Nagle S. Structure of lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1469: 159-95.
 16. Leonenko ZV, Finot E, Ma H, Dahms TE, Cramb DT. Investigation of temperature-induced phase transitions in DOPC and DPPC phospholipid bilayers using temperature-controlled scanning force microscopy. *Biophys J* 2004; 86: 3783-93.
 17. Yatvin MB, Weinstein JN, Dennis WH, Blumenthal R. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science* 1978; 202: 1290-3.
 18. Gaber MH, Hong K, Huang SK, Papahadjopoulos D. Thermosensitive sterically stabilized liposomes: formulation and in vitro studies on mechanism of doxorubicin release by bovine serum and human plasma. *Pharm Res* 1995; 12: 1407-16.
 19. Li L, ten Hagen TL, Schipper D, Wijnberg TM, van Rhoon GC, Eggermont AM, Lindner LH, Koning GA. Triggered content release from optimized stealth thermosensitive liposomes using mild hyperthermia. *J Control Release* 2010; 14: 274-9.
 20. Li L, ten Hagen TL, Hossann M, Süss R, van Rhoon GC, Eggermont AM, Haemmerich D, Koning GA. Mild hyperthermia triggered doxorubicin release from optimized stealth thermosensitive liposomes improves intratumoral drug delivery and efficacy. *J Control Release* 2013; 168: 142-50.
 21. Kong G, Dewhirst MW. Hyperthermia and liposomes. *Int J Hyperthermia*. 1999; 15: 345-70.
 22. Anyarambhatla GR, Needham D. Enhancement of the Phase Transition permeability of DPPC liposomes by incorporation of MPPC: A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia. *J Liposome Res* 1999; 9: 491-506.
 23. Mills JK, Needham D. Lysolipid incorporation in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes enhances the ion permeability and drug release rates at the membrane phase transition. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1716: 77-96.
 24. Needham D, Park JY, Wright AM, Tong J. Materials characterization of the low temperature sensitive liposome (LTSL): effects of the lipid composition (lysolipid and DSPE-PEG2000) on the thermal transition and release of doxorubicin. *Faraday Discuss* 2013; 161: 515-34.
 25. Banno B, Ickenstein LM, Chiu GN, Bally MB, Thewalt J, Brief E, Wasan EK. The functional roles of poly (ethylene glycol)-lipid and lysolipid in the drug retention and release from lysolipid-containing thermosensitive liposomes in vitro and in vivo. *J Pharm Sci* 2010; 99: 2295-308.
 26. Kono K. Thermosensitive polymer-modified liposomes. *Adv Drug Delivery Rev* 2001; 53: 307-319.
 27. Kono K, Hayashi H, Takagishi T. Temperature-sensitive liposomes: Liposomes bearing poly (N-isopropylacrylamide). *J Control Release* 1994; 30: 69-75.
 28. Kim JC, Bae SK, Kim JD. Temperature-sensitivity of liposomal lipid bilayers mixed with poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid). *J Biochem* 1997; 121: 15-9.
 29. Han HD, Choi MS, Hwang T, Song CK, Seong H, Kim TW, Choi HS, Shin BC. Hyperthermia-induced antitumor activity of thermosensitive polymer modified temperature-sensitive liposomes. *J Pharm Sci* 2006; 95: 1909-17.
 30. Oku N, Naruse R, Doi K, Okada S. Potential usage of thermosensitive liposomes for macromolecule delivery. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1191: 389-91.
 31. Arai S, Lee CLK, Chang YT, Sato H, Sou K. Thermosensitive nanoplatforms for photothermal release of cargo from liposomes under intracellular temperature monitoring" *RSC Advances* 2015; 5: 93530-93538.
 32. Sou K, Chan LY, Lee CLK. Temperature tracking in a three-

- dimensional matrix using thermosensitive liposome platform. *ACS Sensors* 2016; 1: 650-655.
33. Kamen BA, Smith AK. A review of folate receptor alpha cycling and 5-methyltetrahydrofolate accumulation with an emphasis on cell models in vitro. *Adv Drug Delivery Rev* 2004; 56: 1085-1097.
34. Ross JF, Chaudhuri PK, Ratnman M. Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications. *Cancer* 1994; 73: 2432-2443.
35. Toffoli G, Cernigoi C, Russo A, Gallo A, Bagnoli M, Boiocchi M. Overexpression of folate binding protein in ovarian cancers. *Int J Cancer* 1997; 74: 193-198.
36. Lee RJ, Low PS. Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem* 1994; 269: 3198-3204.
37. Lee RJ, Low PS. Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1233: 134-144.
38. Dong S, Teo JDW, Chan LY, Lee CLK, Sou K. Far-red fluorescent liposomes for folate receptor-targeted bioimaging. *ACS Appl Nano Mater* 2018; 1: 1009-1013.
39. Kong G, Braun RD, Dewhirst MW. Characterization of the effect of hyperthermia on nanoparticle extravasation from tumor vasculature. *Cancer Res* 2001; 61: 3027-32.
40. Hauck ML, LaRue SM, Petros WP, Poulson JM, Yu D, Spasojevic I, Pruitt AF, Klein A, Case B, Thrall DE, Needham D, Dewhirst MW. Phase I trial of doxorubicin-containing low temperature sensitive liposomes in spontaneous canine tumors. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4004-10.
41. Mitragotri S. Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 255-60.
42. Carter KA, Shao S, Hoopes MI, Luo D, Ahsan B, Grigoryants VM, Song W, Huang H, Zhang G, Pandey RK, Geng J, Pfeifer BA, Scholes CP, Ortega J, Karttunen M, Lovell JF. Porphyrin-phospholipid liposomes permeabilized by near-infrared light. *Nat Commun* 2014; 5: 3546.
43. Li M, Teh C, Ang CY, Tan SY, Luo Z, Qu Q, Zhang Y, Korzh V, Zhao Y. Near-infrared light-absorptive stealth liposomes for localized photothermal ablation of tumors combined with chemotherapy. *Adv Funct Mater* 2015; 25: 5602-5610.
44. Li H, Yang X, Zhou Z, Wang K, Li C, Qiao H, Oupicky D, Sun M. Near-infrared light-triggered drug release from a multiple lipid carrier complex using an all-in-one strategy. *J Control Release* 2017; 261: 126-137.
45. Kwon HJ, Byeon Y, Jeon HN, Cho SH, Han HD, Shin BC. Gold cluster-labeled thermosensitive liposomes enhance triggered drug release in the tumor microenvironment by a photothermal effect. *J Control Release* 2015; 216: 132-9.
46. Li Y, He D, Tu J, Wang R, Zu C, Chen Y, Yang W, Shi D, Webster TJ, Shen Y. The comparative effect of wrapping solid gold nanoparticles and hollow gold nanoparticles with doxorubicin-loaded thermosensitive liposomes for cancer thermo-chemotherapy. *Nanoscale* 2018; 10: 8628-8641.
47. Viger ML, Sheng W, Doré K, Alhasan AH, Carling CJ, Lux J, de Gracia Lux C, Grossman M, Malinow R, Almutairi A. Near-infrared-induced heating of confined water in polymeric particles for efficient payload release. *ACS Nano* 2014; 8: 4815-26.
48. Arai S, Lee SC, Zhai D, Suzuki M, Chang YT. A molecular fluorescent probe for targeted visualization of temperature at the endoplasmic reticulum. *Sci Rep* 2014; 4: 6701.
49. O'Brien ME, Wigler N, Inbar M, Rosso R, Grischke E, Santoro A, Catane R, Kieback DG, Tomczak P, Ackland SP, Orlandi F, Mellars L, Alland L, Tendler C. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 440-9.

日本血液代替物学会 総会

- | | |
|--|---|
| <p>1. 日 時：
平成29年12月7日（木）12：40～</p> <p>2. 場 所：
早稲田大学 西早稲田キャンパス
〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-4</p> | <p>3. 議 題：① 第24回年次大会の報告
② 会員動向
③ 平成28年度事業報告
④ 平成28年度会計報告
⑤ 平成29年度事業計画（経過報告）</p> |
|--|---|

以下審議内容を略記します。

① 年次大会の開催状況として下記事項が報告された。

- 1) 事業名 第24回日本血液代替物学会年次大会
(大会長 武岡真司)
- 2) 開催年月日 平成29年12月7日（木）・8日（金）
- 3) 開催場所 早稲田大学 西早稲田キャンパス
- 4) 参加範囲 日本血液代替物学会会員、臨床医学・理工学研究、国内の大学および医療機関臨床医、血液センター関係者

② 会員状況は以下の通り

- 1) 施設会員：3社
- 2) 正会員：72名
- 3) 購読会員：3箇所

③ 平成28年度事業報告（平成28年4月1日～平成29年3月31日）が行なわれ各々承認された。

- 1) 定期総会の開催
平成28年11月24日（木）早稲田大学西早稲田キャンパスにて開催
- 2) 第23回年次大会の開催（大会長 木下 学）
平成28年11月24日（木）・25日（金）於 早稲田大学西早稲田キャンパス
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第24巻1号

④ 平成28年度収支決算報告が行なわれ承認された。

平成28年度会計報告 収支決算表

（自 平成28年4月1日 至 平成29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	6,403,885	会誌出版費	502,440
正会員会費	420,000	集会・委員会費	378,125
施設会員会費	600,000	年会補助金	1,260
購読会員会費	9,000	ホームページ維持費	324,000
学生会員会費	0	謝 金	471,000
雑 収 入	24,648	事務費(消耗費)	2,499
利 息	1,391	事務費(通信費)	17,520
		雑 役 務 費	4,790
		次期繰越金	5,757,290
計	7,458,924	計	7,458,924

⑤ 平成29年度事業計画（経過報告）（平成29年4月1日～平成30年3月31日）

- 1) 定期総会の開催
平成29年12月7日（木）12：40～
於 早稲田大学 西早稲田キャンパス
- 2) 第24回年次大会の開催（大会長：武岡真司）
平成29年12月7日（木）・8日（金）
於 早稲田大学 西早稲田キャンパス
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第25巻1号

日本血液代替物学会 会則

第1章 総則

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

第2条：(事務局) 本会の事務局は当分の間、会長の所属機関内に置く。

2. 事務局は会長の統括のもと本会の事業および会計に関する一般事務を司る。

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

第4条：(事業) 本会は前条の目的達成のため、次の事業を行う。

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

第2章 会員

第5条：(種別) 本会会員は次の分類とする。

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

第6条：(会費) 会員は、つぎの種別に従って会費を納めなければならない。

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

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

第8条：(退会) 退会しようとする会員は、理由とその旨を届け

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：(役員の選任) 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、その任期は役員の任期に準ずる。

第13条：(任期) 役員および監事の任期は2年とし、再任を妨げない。

第14条：(会長) 会長は、各事業を司り本会を代表統括する。

第15条：(副会長) 会長を補佐し会長に事故があるときはその代理となる。

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

第17条：(監事) 監事は、資産の状況および理事の会務執行状況を監査する。

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

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

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

第20条：(事務局および職員) 本会の事務を処理するため、事務

局および職員を置く。

2. 職員人事は会長が任命権者となり、有給とする。

第4章・年次大会長

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

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

2. 理事会の議決によって、副大会長を次年度の大会長とすることができる。

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

第5章 会議

第24条：(会議) 本会の会議は、つぎの3種とする。

- 1) 理事会
- 2) 総会
- 3) 評議員会

第25条：(理事会) 理事会は、理事をもって構成する。

2. 理事会は年2回以上会長が召集する。ただし、会長が必要と認めたとき、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

平成30年度 日本血液代替物学会 役員名簿

顧問	高久史磨	日本医学会 会長
会長	酒井宏水	奈良県立医科大学医学部 教授
副会長	堀之内 宏久	さいたま市立病院 副院長
理事	東 寛	旭川医科大学 教授
	池田康夫	早稲田大学 特任教授
	小田切 優樹	崇城大学薬学部 教授
	小松晃之	中央大学理工学部 教授
	武岡真司	早稲田大学理工学術院 教授
	丸山 徹	熊本大学薬学部 教授
	米川元樹	社会医療法人北楡会 理事長
監事	清水 勝	西城病院 理事
	小林 紘一	慶應義塾大学 名誉教授

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

日本血液代替物学会 評議員名簿

東 寛	旭川医科大学 教授	佐久間一郎	カレスサッポロ北光記念クリニック 院長
阿部喜代司	筑波大学 名誉教授	清水 勝	西城病院 理事
池田 康夫	早稲田大学 特任教授	高久 史磨	日本医学会 会長
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
伊藤 俊之	京都府赤十字血液センター	武岡 真司	早稲田大学理工学術院 教授
稲田 英一	順天堂大学医学部 教授	田所 憲治	日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所 前所長
大柳 治正	近大姫路大学 副学長	長澤 俊郎	筑波記念病院
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 教授	萩沢 康介	防衛医科大学校 助教
木下 学	防衛医科大学校 准教授	福島 昭二	神戸学院大学薬学部薬学科 教授
黒澤 良和	藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授	堀之内宏久	さいたま市立病院 副院長
河野 光智	東海大学医学部 准教授	丸山 徹	熊本大学薬学部 教授
小林 紘一	慶應義塾大学 名誉教授	村田 満	慶應義塾大学医学部 教授
小松 晃之	中央大学理工学部 教授	米川 元樹	社会医療法人北楡会 理事長
酒井 宏水	奈良県立医科大学 教授		

M E M O

[illegible]

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

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

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

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

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

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

ii) ハードコピー4部を郵送する。

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

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

4) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著

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

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

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

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

8) 論文中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.

平成 年 月 日

Date:

代表著者（署名）

Corresponding Author (Signature) _____

連絡先

Contact Address:

（本用紙はコピーしたものを使用されても結構です。）

This form may be photocopied for use.

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

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

M E M O

[illegible]

編集委員

●酒井 宏水(委員長), 東 寛, 武岡 真司, 堀之内 宏久, 棟近 公司, 村田 満, 渡辺 真純●

日本血液代替物学会 会誌

■発行 日本血液代替物学会

■編集・制作「人工血液」編集委員会

■印刷 株式会社 研恒社

人工血液 vol.26(1) 2018年9月28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
