

人工血液

第 12 卷 第 2 号 2004 年 7 月

目 次

第11回年次大会プログラム	30
---------------------	----

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 12 No. 2 July, 2004

Contents

<i>The 11th Annual Meeting Program</i>	<i>30</i>
--	-----------

第11回日本血液代替物学会年次大会

The 11th Annual Meeting of
The Society of Blood Substitutes, Japan

テーマ

「臨床利用をめざして」

大会長：川村明夫（札幌北榆病院）

会期：2004年7月13日(火), 14日(水)

会場：北方圏センター

札幌市中央区北3条西7丁目
道庁別館12階

年次大会 大会長挨拶

日本血液代替物学会年次大会も11回を迎えることになりました。

省みて10年、F Cに替わり新しい酸素運搬体の開発がすすみ、今にも臨床家の手元に届けられる事を楽しみにして参りました。もちろん、この思いは私だけではなく、等しく臨床家の望みであります。しかし、現実には厳しく、この分野の臨床研究は下火となり残念な結果になっております。

そこで、今回の年次大会では血液代替物の開発状況、臨床適応、その可能性に光が当たるようプログラムを編成させていただきました。

血液代替物が臨床の現場に果たす役割は、現在われわれが考えている以上に広く深いものになる可能性を秘めていると、一臨床家の私は考えております。今回の年次大会を通して会員、そして研究者の皆様方に血液代替物研究の重要性を今一度ご検討いただければと願うものでございます。

7月の札幌は快適で、食べ物も美味しい季節でございます。皆様方の来札を心よりお待ちしております。

第11回日本血液代替物年次大会長

特定医療法人北榆会 札幌北榆病院

川村 明夫

お知らせとお願い

参加者の方へ

会場及び受付開始

会場、及び受付開始時間は両日とも午前8時30分です。

参加登録

参加費は10,000円（懇親会費を含む）です。

ネームカード（領収書）をお渡ししますので、所属・氏名を各自でご記入の上、ご着用下さい。

会期中、会場へご入場の際には必ずネームカードをご着用下さい。

年会費および新入会受け付け

日本血液代替物学会に未入会の方は、総合受付で入会手続きをおとり下さい。

年会費は正会員10,000円、購読会員6,000円、学生会員5,000円です。

抄録集

抄録集は会員全員に事前送付しています。それ以外にご入用の方は総合受付にて1部1,500円で販売いたしますが、部数に限りがあります。

懇親会

参加者相互の親睦を図るため、7月13日(火)午後6時30分より小樽市銭函「中村番屋」において懇親会を開催します。午後5時30分に送迎バスが会場ビル前より出発いたしますので、ぜひご参加下さい。

演題発表される方へ

- ・発表はPCプレゼンテーション（Windows版 Power Point）のみとさせていただきます。講演予定の30分前までに、WindowsフォーマットのCDRまたはUSBフラッシュメモリを発表受付にご持参下さい。
- ・PCの持ち込みはできません。
- ・シンポジウム・ワークショップの講演時間は各自15分＋総合討論、一般講演の講演時間は9分、討論時間は3分です。
- ・時間厳守をお願い致します。
- ・外国人の参加者のためにも、スライドの図表は極力英語をご使用下さい。

各種会議日程

理事会：7月13日(火) 12:00～

評議員会：7月13日(火) 理事会終了後

総会：7月14日(水) 11:45～

学会事務局

特定医療法人 北楡会 札幌北楡病院

〒003-0006 札幌市白石区東札幌6条6丁目5-1

電話：011-865-0111 FAX：011-865-9719

e-mail：11jbs@hokuyu-aoth.org

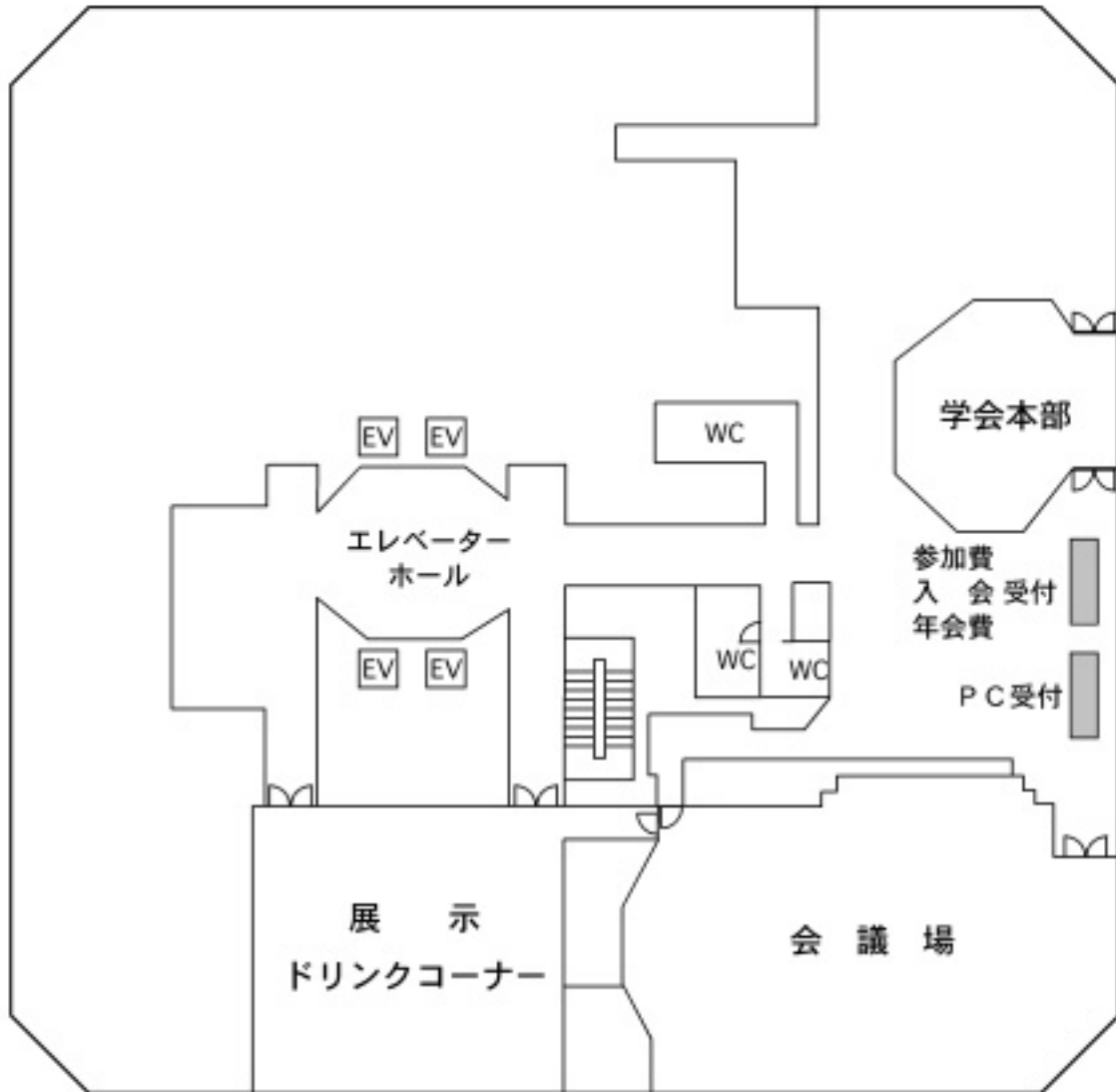
<http://www.hokuyu-aoth.org/11jbs>

事務局長 中尾康夫

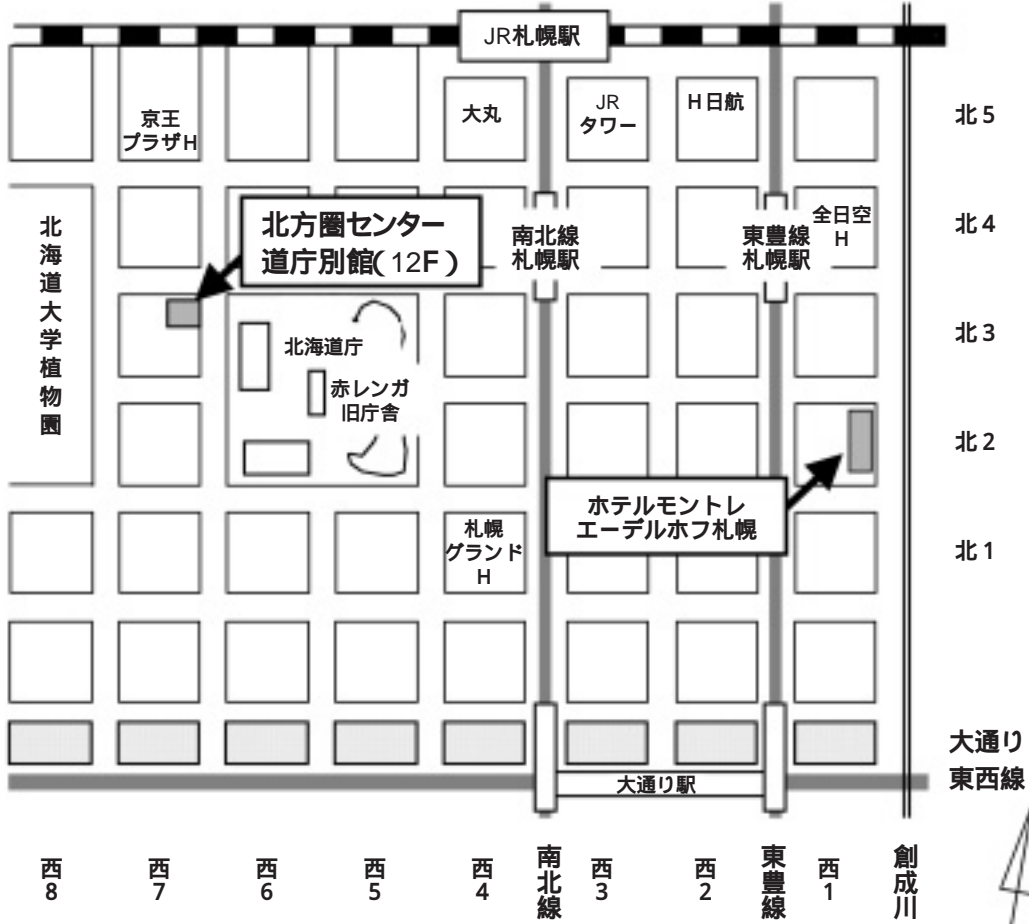
日 程 表

7月13日(火)	7月14日(水)
9:00 開会の辞	9:00 一般演題 1
9:05 ワークショップ 1	10:00 一般演題 2
11:15 教育講演 1 「血清アルブミンの構造特性と医薬への応用」 小田切優樹(熊本大学大学院医学薬学研究部)	11:00 教育講演 3 「止血の分子機構と人工血小板・血小板代替物」 池田康夫(慶應義塾大学医学部内科)
12:00 理事会(昼食) 評議員会	11:45 総会 (第35回「人工血液」編集委員会)
13:00 教育講演 2 「メタボローム(網羅的代謝解析)技術による赤血球の新しい生理作用の探索 ガスバイオロジーの観点から」 末松 誠(慶應義塾大学医学部医化学教室)	12:30 12:45 大会長講演 「血液代替物の臨床利用を目指して」 川村明夫(特定医療法人北楯会札幌北楯病院外科)
13:45 招請講演 「Improving the efficiency of oxygen carriers for blood substitutes」 Marcos Intaglietta (Department of Bioengineering, University of California, San Diego)	13:15 特別講演 「生体内における酸素移動と低酸素症に対する対応」 小林紘一(慶應義塾大学医学部外科)
14:30 シンポジウム	14:00 一般演題3
17:30	15:00 ワークショップ2 「人工免疫グロブリン、リコンビナントアルブミンの開発状況」 17:00

会場案内図



交通案内図



7月13日(火)

9:00 開会の辞

9:05~11:15 ワークショップ1「酸素運搬体系血液代替物開発の現況」
司会 武岡真司(早稲田大学理工学総合研究センター)
高折益彦(東宝塚さとう病院)

W1-1 ナノカプセル型人工酸素運搬体の開発現況
緒方嘉貴, 金田伸一
(テルモ株式会社研究開発センター)

W1-2 L-チロシン内包によるヘモグロビン小胞体のメト化抑制
阿閉友保, 武岡真司, 土田英俊
(早稲田大学理工学総合研究センター)

W1-3 完全合成型人工酸素運搬体の開発
甲斐俊哉, 木田善規, 福富一平, 帆足洋平, 片山直久, 山本尚志, 大川裕紀, 弘津一郎, 佐藤 誠
(ニプロ株式会社医薬品研究所)

W1-4 ヒト赤血球由来ヘモグロビンによるヘモグロビン小胞体の開発と酸素輸液としての医療利用
高木智史
(株式会社オキシジェニクス)

W1-5 アルブミン-ヘム製剤の安全性試験に関する検討
小松晃之, 土田英俊
(早稲田大学理工学総合研究センター)

11:15~12:00 教育講演1 司会 西 勝英(熊本大学医学部薬理学第二)

血清アルブミンの構造特性と医薬への応用
小田切優樹
(熊本大学大学院医学薬学研究部)

12:00~13:00 理事会 評議員会

13:00~13:45 教育講演2 司会 北島 顕(医療法人社団カレスサポロ)

メタボローム(網羅的代謝解析)技術による赤血球の新しい生理作用の探索 ガスバイオロジーの
観点から
末松 誠
(慶應義塾大学医学部医化学教室)

13 : 45 ~ 14 : 30 招請講演 司会 酒井清孝 先生 (早稲田大学理工学部応用化学科)

Improving the efficiency of oxygen carriers for blood substitutes

Marcos Intaglietta

(Department of Bioengineering , University of California , San Diego)

14 : 30 ~ 17 : 30 シンポジウム「血液代替物の臨床利用 どのような状態に適用されるか」

司会 平澤博之 (千葉大学大学院医学研究院救急集中治療医学)

村田 満 (慶應義塾大学医学部内科)

S-1 ヘモグロビン小胞体による40%血液交換後の回復過程

酒井宏水¹, 堀之内宏久², 武岡真司¹, 小林紘一², 土田英俊¹

(早稲田大学理工学総合研究センター¹, 慶應義塾大学医学部外科²)

S-2 ウサギ急性出血性ショックモデルへの人工赤血球によるFluid resuscitation の効果

寺嶋克幸¹, 杖下隆哉², 坂本篤裕¹, 小川 龍¹

(日本医科大学麻酔科集中治療室¹, 三井記念病院麻酔科²)

S-3 Perfluorocarbonを用いたLiquid ventilationの有効性と問題点

松田兼一, 平澤博之, 平山 陽

(千葉大学大学院医学研究院救急集中治療医学)

S-4 人工赤血球を用いた人工心肺充填液のFeasibility test

山崎真敬, 饗庭 了, 四津良平

(慶應義塾大学心臓血管外科)

S-5 Neo Red Cellの心虚血再灌流障害に対する有効性

井坂光宏¹, 佐久間一郎², 石塚隆伸³, 緒方嘉貴³, 安田慶秀¹

(北海道大学大学院医学研究科循環器外科¹, 同循環病態内科², テルモ株式会社研究開発センター³)

S-6 PEG-BSA resuscitation maintains functional capillary density (FCD) in sepsis

Nanae Hangai-Hoger , Pedro Cabrales , Amy G. Tsai , Marcos Intaglietta

(Department of Bioengineering , University of California , San Diego)

S-7 Liposome-encapsulated hemoglobin potentiates radiation therapy to suppress cancer growth in mice

Akira T. Kawaguchi¹, Chieko Murayama¹, Youji Tsutsui², Yoshitaka Ogata²,

Munetaka Haida¹, Yukihiro Ohizumi¹

(Tokai University School of Medicine¹, Terumo Co Ltd²)

18 : 30 懇親会 (於 小樽市銭函 中村番屋)

7月14日(水)

9:00~10:00 一般演題1 座長 酒井宏水(早稲田大学理工学総合研究センター)

一般-1 ヘモグロビン小胞体の体内動態解析

宗 慶太郎¹, Robert Klipper², Beth Goins², William T. Phillips², 土田英俊¹
(早稲田大学理工学総合研究センター¹, Univ. Texas Health Science Center at San Antonio²)

一般-2 Improvement of tissue pO₂ by hemoglobin site specifically pegylated at Cys-93() during extreme hemodilution studied in hamster window chamber

Pedro Cabrales¹, Belur N. Manjula², Amy G. Tsai¹, Seetharama A. Acharya², Marcos Intaglietta¹
(Department of Bioengineering, University of California, San Diego¹, Departments of Medicine and of Physiology and Biophysics, Albert Einstein College of Medicine, NY²)

一般-3 ³置換ヘム誘導体とアルブミン-ヘム複合体の酸素結合

中川晶人, 小松晃之, 土田英俊
(早稲田大学理工学総合研究センター)

一般-4 ¹²⁵Iラベル化ヘモグロビン小胞体の体内動態特性について

安楽 誠¹, 浦田由紀乃¹, 宗 慶太郎², 酒井宏水², 土田英俊², 小田切優樹¹
(熊本大学大学院医学薬学研究部¹, 早稲田大学理工学総合研究センター²)

一般-5 高ずり速度下で発現する血小板代替物の血小板凝集協同効果

岡村陽介¹, 武岡真司¹, 土田英俊¹, 半田 誠², 池田康夫²
(早稲田大学理工学総合研究センター¹, 慶応義塾大学医学部²)

10:00~11:00 一般演題2 座長 小松晃之(早稲田大学理工学総合研究センター)

一般-6 ヘモグロビン小胞体(HbV)投与がラット免疫系に及ぼす影響

阿部英樹¹, 山口美樹¹, 藤原満博¹, 酒井宏水², 武岡真司², 土田英俊², 東 寛¹, 池田久實¹
(北海道赤十字血液センター¹, 早稲田大学理工学総合研究センター²)

一般-7 Microvascular reponse to exchange transfusion with stored RBC: perfusion and oxygen delivery

Amy G. Tsa, Pedro Cabrales, Marcos Intaglietta
(Department of Bioengineering, University of California, San Diego)

一般-8 Liposome-encapsulated hemoglobin alleviates myocardial ischemia and reperfusion in the rat

Akira T. Kawaguchi¹, Teruhisa Tanabe¹, Munetaka Haida¹, Yoshitaka Ogata²
(Tokai University¹, Terumo Corporation²)

一般-9 ヘモグロビン精製工程におけるSD処理を用いたウイルス不活化検討

小島潤也, 木村哲寛, 後藤 博, 上田 努, 筒井洋治, 岡本 武, 稲葉勝利, 金田伸一, 緒方嘉貴
(テルモ株式会社研究開発センター)

11:00~11:45 教育講演3 司会 池田久實(北海道赤十字血液センター)

止血の分子機構と人工血小板・血小板代替物

池田康夫

(慶應義塾大学医学部内科)

11:45~12:30 総会

12:45~13:15 大会長講演 司会 水戸迪郎(旭川医科大学名誉教授)

血液代替物の臨床利用を目指して

川村明夫

(特定医療法人北楡会札幌北楡病院外科)

13:15~14:00 特別講演 司会 土田英俊(早稲田大学理工学総合研究センター)

生体内における酸素移動と低酸素症に対する対応

小林紘一

(慶應義塾大学医学部外科)

14:00~15:00 一般演題3 座長 佐久間一郎(北海道大学大学院医学研究科循環器内科)

一般-10 血流停止させた細動脈内のヘモグロビン小胞体からの酸素放出挙動

酒井宏水¹, Pedro Cabrales², Amy G. Tsai², 武岡真司¹, Marcos Intaglietta², 土田英俊¹

(早稲田大学理工学総合研究センター¹, Department of Engineering, University of California, San Diego²)

一般-11 虚血 - 再開通モデルラットにおける脳機能不全の多角的評価と人工酸素運搬体の有効性に関する検討

富樫広子¹, 佐久間一郎², 山口 拓¹, 尾谷 浩¹, Subrina Jesmin², 掛端 仁³, 緒方嘉貴⁴, 石塚隆伸⁴, 仲井邦彦⁵, 吉岡充弘¹

(北海道大学大学院医学研究科神経薬理¹, 循環病態内科学², 侵襲制御医学³, テルモ株式会社研究開発センター⁴, 東北大学院医学研究科環境保健医学⁵)

一般-12 脳局所微小循環レベルにおける酸素代謝の光学的解析法

塚田孝祐¹, 末松 誠¹, 南谷晴之²

(慶應義塾大学医学部医化学教室¹, 慶應義塾大学理工学部物理情報工学科²)

一般-13 Liposome-encapsulated hemoglobin limits area of cerebral infarction in the rat

Akira T. Kawaguchi¹, Munetaka Haida¹, Hideo Tsukada², Yoshitaka Ogata³

(Tokai University¹, Hamamatsu Photonics², Terumo Corporation³)

- 一般-14 Liposome-encapsulated hemoglobin suppresses vulnerability and improves reversibility of ventricular fibrillation in ischemic canine myocardium
Akira T. Kawaguchi¹, Kazutane Usui¹, Teruhisa Tanabe¹, Yoshitaka Ogata², Munetaka Haida¹
(Tokai University School of Medicine¹, Terumo Co Ltd²)

15:00~17:00 ワークショップ2「人工免疫グロブリン、リコンビナントアルブミンの開発状況」

司会 阿岸鉄三(板橋中央総合病院血液浄化療法センター)

笠井正晴(特定医療法人北楡会札幌北楡病院内科)

- W2-1 ヒト血清アルブミンの消失に関するアミノ酸残基の解析~ Site に存在するArg-410の重要性~
岩尾康範¹, 安楽 誠¹, 山崎啓之¹, 川井恵一², 丸山 徹¹, 小田切優樹¹
(熊本大学大学院医学薬学研究部¹, 金沢大学医学部保健学科²)
- W2-2 組換えヒト血清アルブミンの構造及び機能解析
中島和幸¹, 岡村 宏¹, 小田嘉明¹, 柴田伸一¹, 宮津嘉信¹, 溝上 寛¹, 船津昭信¹, Peter Kiessling²
(財団法人化学及血清療法研究所¹, ZLB Behring²)
- W2-3 リコンビナントアルブミンの開発状況
小林 薫
(三菱ウェルファーマ株式会社蛋白医薬研究所)
- W2-4 治療薬としてのヒト抗体開発の現状
黒澤良和
(藤田保健衛生大学総合医科学研究所)
- W2-5 免疫グロブリンの血管炎抑制効果と人工化
鈴木和男
(国立感染症研究所生物活性物質部)
- W2-6 抗体工学の進歩と癌治療
太田 聡
(協和発酵工業株式会社東京研究所)

生体内における酸素移動と低酸素症に対する対応

小林 紘一
慶應義塾大学医学部外科

酸素は生体の代謝を円滑に行うために不可欠である。正常人では空気を吸入 ($F_iO_2=0.21$) しているが低換気、拡散能の低下、換気・血流不均等分布やシャント率の上昇などにより血液ガスの異常がもたらされる。低酸素血症には $PaCO_2$ の上昇と $PaCO_2$ の低下を伴うものの2種類がある。

生体内の酸素加の状態を知るための方法としては動脈血と静脈血の血液のガス分析、パルスオキシメーター、混合静脈血の酸素飽和度、酸素電極による組織の酸素分圧測定などがある。

低酸素血症に対する治療としては酸素投与、機械呼吸、extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) や percutaneous cardiopulmonary support (PCPS) や液体換気などがある。慢性呼吸不全に対しては在宅酸素療法 (home oxygen therapy, HOT) が普及しており、また家庭での呼吸器による治療も可能となっている。長期使用可能な人工肺はまだ製造されていない。本邦ではまだ十分普及していないが肺移植も慢性呼吸不全に対する治療法の1つとしてあげられる。

人工酸素運搬体は全身的な治療法としては大量出血による低酸素血症に、局所的な使用としては梗塞や腫瘍の酸素加を可能にするものとして開発されている。生体内における酸素の移動と低酸素血症について報告する。

血液代替物の臨床利用を目指して

川村 明夫
特定医療法人北楡会 札幌北楡病院 外科

血液代替物の開発と実地使用は現代の臨床家にとって最も渴望されている。

今回、第11回血液代替物学会の年次大会長を仰せつかった。そこで、折角の機会を頂いたので、今までの血液代替物への係りの一端を報告する。

私は1980年からFCを利用して移植に用いる臓器の保存を実験的、臨床的に研究してきた。最初は移植に提供された生体腎の灌流、ついでUS腎のviabilityを保つことに目的が置かれた。そして、この研究で得られた成果から常温での肝灌流と肝切除を検討した。すなわち、肝臓を保存しながら切除しようとした。大変良い成績をえたがまもなくFCが存在なくなり、臨床利用に至らなかった。同様に腎臓の保存と保存腎のconditioningもFC利用の細胞外液で灌流を行うことにより、保存中に利尿させることができた。

一方、Neo Red Cellの臨床利用へ向けての研究もお行ってきた。最初にNECによる高度血液交換を小動物で行った。この研究では80%の血液をNECで置換しても問題がないことが証明され、重度外傷に適應できることが証明された。これはさらにトータルボディーリンス、免疫調節の可能性を示唆した。高度交換のモデルで免疫系を検討し、さらに実験で心臓異種移植を行った。通常的心臓異種移植では11分で心臓は拒絶され、停止するが我われの実験では10時間を超えて移植心は機能を保った。

以上の研究結果から、血液代替物の開発と進歩は人工臓器による臓器保存、移植、免疫のコントロール、外傷などの分野で人類に多大な貢献をするものと確信する。今後の発展を切に期待したい。

IMPROVING THE EFFICIENCY OF OXYGEN CARRIERS FOR BLOOD SUBSTITUTES

Marcos Intaglietta
Department of Bioengineering, University of California,
San Diego, La Jolla, California

The safety and efficacy of hemoglobin-based oxygen carrying blood substitutes have made continuous progress, resulting in compounds that are not vasoactive and show minimal or no side effects. These compounds comprise polyethylene glycol conjugated hemoglobin, hemoglobin vesicles and large hemoglobin polymers. To the present they utilize human hemoglobin, therefore their use may impact the blood transfusional supply, unless they are formulated in such a fashion that their efficacy in restoring circulatory carrying capacity is increased relative to an equivalent amount of blood, allowing their use at significantly lower hemoglobin concentrations than normal blood. This goal is attainable by lowering hemoglobin p50, while maintaining some degree of cooperativity. Formulations that increase viscosity may also provide additional benefits in preserving microvascular function, particularly perfusion and functional capillary density.

血清アルブミンの構造特性と医薬への応用

小田切優樹
熊本大学大学院医学薬学研究部

ヒト血清アルブミン (HSA) は585個のアミノ酸残基から成る分子量約66.5 kDaの糖鎖を持たない単純蛋白質である。HSAの基本構造は α ヘリックスとそれを結ぶ柔軟なhinge領域より形成される3つのドメインより成る (ドメイン I, II, III) が、水溶液中ではこれらのドメインがさらに折り重なって、心臓の様な形状をした特有の立体構造をとっている。また、HSAはその分子中に35個のシステイン残基 (Cys) を有しているが、そのうち17対は分子内ジスルフィド結合を形成し、9つのループの構築やHSAの構造安定化に大きく寄与している。興味深いことに、一次配列上34番目のCysはSH基が唯一遊離の状態が存在しており、このSH基は抗酸化能やリガンド輸送能といったHSAに特有な機能発現に重要な役割を果たしている。

HSAは血漿蛋白質の中で最も高濃度 (約4 g/dL) に存在し、生体内において血漿膠質浸透圧の調節、脂肪酸や尿毒症物質をはじめとする内因性リガンド及び薬物などの外因性リガンドの輸送担体、酸化還元緩衝能及び酵素的作用 (エステラーゼ様作用) など多様な機能を有している。

本講演では、HSAの構造と機能について、最近、我々の研究室で得られた知見を中心に紹介する。まず光アフィニティラベル法や部位特異的変異法を駆使したHSA分子上のリガンド結合部位のトポロジー解析について述べる。次いで、アルブミンの分子設計に際し有用な基礎情報となることから、ヒトを含む種々のアルブミンの構造安定性について紹介する。さらに、医薬への応用という観点から、組換え技術により合成したアルブミン二量体などの機能性アルブミンやNOトラフィック蛋白としてのアルブミン変異体の有用性について紹介する。

教育講演 2

メタボローム（網羅的代謝解析）技術による赤血球の新しい生理作用の探索 ガスバイオロジーの観点から

末松 誠

慶應義塾大学医学部 医化学教室

ガス状メディエータは生体内で生成される低分子で細胞膜を他の物質に比べて容易に通過して蛋白質をはじめとする生体高分子の「隙間」に入り込み、部位特異的に結合してその機能を調節するさよう特徴を持つ分子群である。我々の教室ではheme oxygenase (HO) から生成される一酸化炭素 (CO) が肝臓の類洞血管を恒常的に弛緩させ、この臓器に低い血管抵抗を保障することで血流維持作用をもたらすことを示し、内因性のCOが血管機能制御に関与する最初の証明を提示した。これを契機として生体内でのCOがNOと類似の血管拡張物質であることを示唆する報告が多数提示されたが、我々の知る限り両者は全く異なる生理作用を有するガスメディエータであることをいくつかの実験から証明してきた。ガス分子の作用点やレセプタ分子を探索することは困難を極めるが、メタボローム、いわゆる網羅的一斉代謝物解析技術を応用することにより戦略的に特定のガス分子の作用点を同定し、その生物学的考察を推進することが可能になった。

その成果のひとつとして、ストレス誘導性HO-1由来のCOにより、methionineからcysteineを生成するrate-limiting heme enzymeであるcystathionine beta synthaseが阻害され、肝臓のthiol代謝のremodelingが起こることが明らかになった。COのこのような作用はNOには存在しない。さらに代表的なヘム蛋白であるhemoglobinは赤血球において酸素運搬体としてだけでなく、局所の酸素濃度を感知しながら各種の代謝物を活発に出し入れするメタボリックシンクとして作用し、COはその作用を阻害、NOは活性化することが明らかになった。これらの現象はともにCOがヘムに結合すると6配位、NOが結合すると5配位をとるという根本的な違いからくる構造蛋白のコンフォメーション変化の違いによるものである。またcystathionine beta synthaseのCOによる阻害は第3のガスメディエータである硫化水素の阻害を起こし、胆汁のquality controlももたらすことがあわせ明らかになった。講演ではGas Biologyから見た新しい代謝制御ネットワークの解明について最新の知見を報告する。

教育講演 3

止血の分子機構と人工血小板・血小板代替物

池田康夫

慶應義塾大学医学部内科

止血の為の血栓形成過程は、人の備える精緻かつ重要な生体防御反応である。本教育講演では、現在までに明らかにされている止血血栓形成の分子機構を解説すると共に、我が国が中心となって進められている人工血小板・血小板代替物の開発方針についても述べる。

止血血栓形成の第一歩は、血管内皮下組織への血小板粘着反応である。健全な血管内皮細胞には抗血栓作用があり、血小板は決してそれに粘着する事は無い。血管内皮下組織において、血小板粘着の標的となる基質蛋白は、コラゲンであり、血小板・コラゲン相互反応の分子機構の解析が進み、血漿フォンビルブランド因子、血小板膜糖蛋白 $2b/3a$ 、GPVIなど重要性が確認された。粘着した血小板は、活性化し、細胞膜表面の蛋白、リン脂質構造の変化を通して、流血中より新たな血小板をリクルートし、血液凝固反応を促進させる。血小板凝固塊とフィブリン網の形成により、止血血栓過程が完了する。

血管損傷時に形成される外因系凝固の初期反応としての組織因子・凝固第VII因子複合体形成、血小板活性化に伴って放出される血小板膜マイクロパーティクルなどの重要性についても多くの知見が集積しつつある。

ヘモグロビン小胞体による40%血液交換後の回復過程

酒井宏水¹⁾, 堀之内宏久²⁾, 武岡真司¹⁾, 小林紘一²⁾,
土田英俊¹⁾
早稲田大学 理工学総合研究センター¹⁾,
慶応義塾大学 医学部 外科²⁾

【緒言】Hb小胞体が赤血球と同等の酸素運搬機能を有することが明らかにされてきた。本研究では、Hb小胞体分散液でラットの循環血液量の40%を交換した後2週間の回復過程について、組織病理と血液生化学検査から検討することを目的とした。

【方法】麻酔下Wistar系ラット(n = 40)の頸動静脈に挿管し、Hb小胞体を5g/dLリコンビナントヒトアルブミン(rHSA)に分散させた溶液(HbV/rHSA)、或はrHSA単独の投与と脱血を繰返し、循環血液量の40%を交換した。その後1, 3, 7, 14日後に、血液学的、血液生化学的検査、摘出臓器の重量測定と組織病理学的検討を実施した。

【結果および考察】ラットは全例が犠牲死させるまで生存し、Hct値も7日後に回復した。脾臓重量の増大がHbV/rHSA群で1-3日後にみられ、また血中脂質濃度も増大したが、7日後には完全に回復した。14日後に肝脾に僅かにヘモジデリン沈着が認められたが、血液生化学検査では、鉄/ビリルビン濃度や肝機能を反映する酵素濃度の上昇は無く、HbVの成分が障害なく速やかに分解、排泄或は再利用されていることが示唆された。対照のrHSA群でも3日後に顕著な脾臓重量の増大がみられ、またHbV/rHSA群、rHSA群ともに脾臓に赤芽球が多量に現れたことから、脾臓肥大の原因はHbVの捕捉だけでなく、ラットに特有の脾臓内造血機能の亢進も理由として考えられた。また、これがHct値の急速な回復に貢献している。

ウサギ急性出血性ショックモデルへの人工赤血球によるfluid resuscitationの効果

寺嶋克幸¹⁾, 杖下隆哉²⁾, 坂本篤裕¹⁾, 小川 龍¹⁾
日本医科大学 麻酔科 集中治療室¹⁾,
三井記念病院 麻酔科²⁾

【緒言】人工赤血球によるfluid resuscitationの組織酸素分圧の変化への影響を調査した。

【方法】体重2-2.7kgの雄ニュージージーランドホワイト種ウサギを対象とした。Ketamineを筋注後、耳静脈より末梢ラインを確保し、thiopentalの持続静注によって麻酔維持を行った。気管切開にて気道確保後、PCO₂が35-45mmHgとなるように人工呼吸を行った。圧測定、採血目的に兎径動脈と頸静脈を確保した。頸静脈と対側の脳、腎臓、肝臓、骨格筋に酸素電極を挿入した。15分後、自然脱血にて平均血圧が30-35mmHgとなるようにし、30分維持をした。その後、脱血量と等量の乳酸リンゲル液(RAc群)、5%リコンビナントアルブミン溶液(rAlb群)、もしくは、人工赤血球加5%リコンビナントアルブミン溶液(AE-rA群)で蘇生を行った。その後2時間までを観察期間とした。

【結果】ショック前の動脈血ガス分析値、各組織酸素分圧値に各群間に差は無かった。蘇生15分後と1時間後で、脳の酸素分圧はRAc群に比べAE-rA群で高く、2時間後はRAc群に比べrAlb群とAE-rA群で高かった。蘇生後の肝組織酸素分圧はRAc群に比べrAlb群で高く、腎組織酸素分圧はRAc群に比べAE-rA群で高かった。

【結語】急性ショックに対する5%リコンビナントアルブミン溶液と人工赤血球加5%リコンビナントアルブミン溶液による蘇生は、細胞外液補充液である乳酸リンゲル液より組織酸素分圧を上昇させる可能性がある。

Perfluorocarbonを用いたLiquid Ventilationの有効性と問題点

松田兼一，平澤博之，平山 陽
千葉大学大学院医学研究院救急集中治療医学

Perfluorocarbon (PFC) は血液代替物として期待されたが、いまだ臨床応用されていないのが現状である。一方、PFCの新しい臨床応用法としてliquid ventilation (LV) への応用がある。LVとは酸素ガスの代わりに、酸素化したPFCを用いる全く新しい人工呼吸法である。高比重、低表面張力という物理特性を持つPFCを用いて人工呼吸することで虚脱肺の拡張、肺洗浄効果が期待され、通常の人工呼吸では対応できない重症呼吸不全に対して肺酸素化能の改善を得ることが可能である。また最近、PFCの薬理特性によるmediator産生抑制効果、好中球の集積抑制効果を介した肺の炎症反応抑制効果も注目を集めている。我々もラットを用いた急性及び慢性肺障害モデルにおいてLVによる肺胞内滲出液洗浄除去効果、肺酸素化能の改善効果、mediatorの産生抑制効果や肺繊維化抑制効果等を確認している。一方、LVを臨床応用するためにはいくつかの問題点がいまだ残されている。我々が開発した従圧式LV専用呼吸器の至適操作条件についてラットを用いて検討したところ、LVの至適操作条件を決定する際には従来の人工呼吸とは大きく異なる考え方が必要となる上に、液体が肺内に流入することによる循環動態への影響も考慮に入れなければならないことが判明した。さらにラットを用いたモデルにおいてLVによると思われる肺損傷を認めたことから、LV施行後の長期安全性についても再検討する必要があると考えられた。以上より、PFCをLVに用いることで虚脱肺の拡張効果、肺洗浄効果、さらに肺炎症反応抑制効果など様々な効果が期待できることが判明した。PFCを用いたLVは、解決すべき問題があるものの近い将来critical care領域における必要不可欠な治療法の一つになると思われた。

人工赤血球を用いた人工心肺充填液のfeasibility test

山崎真敬，饗庭 了，四津良平
慶應義塾大学 心臓血管外科

近年、新生児乳児の開心術の成績は飛躍的に向上したが、一般的には人工心肺回路の充填液として依然として輸血が用いられている。これは低体重の患者で無輸血充填とした場合、近年の人工心肺回路の改良によりその充填量が限界まで小さくなくても、人工心肺の運転中に激しい血液希釈状態となり、臓器の適正な酸素供給が保証されないためである。一方で輸血には肝炎やエイズなど多種の重篤な合併症のリスクを伴っている。上記のような臨床上のジレンマの一解決手段として、我々は人工赤血球（ヘモグロビン小胞体；HbV）に注目した。現時点の人工赤血球は半減期が短いのが欠点のひとつになっている。しかしながら人工心肺運転中に生じる血液希釈状態という特殊な環境はおおよそ数時間であり、その数時間だけ血液の役割を果たし、その後速やかに代謝される現在の人工赤血球の特徴は小児心臓外科の立場から考えると臨床上のジレンマを解決に導く大きな利点となる。すなわち人工赤血球の欠点を利点として活用する逆転的発想が可能である。我々はラットを用いて慢性人工心肺モデルの作成を行った。人工心肺のカニューレーションとして、脱血は経右内頸静脈的に右房から、送血は尾動脈を介して行った。人工心肺の運転は常温下、無拍動送血法で50 ml/kg/minの流量で30分間行った。我々はその生存例を得て、この人工心肺モデルが十分実現可能であることを確認したので、報告する。

Neo Red Cellの心虚血再灌流障害に対する有効性

井坂光宏¹⁾, 佐久間一郎²⁾, 石塚隆伸³⁾, 緒方嘉貴³⁾,
安田慶秀¹⁾
北海道大・院・医・循環器外科¹⁾, 同循環病態内科²⁾,
テルモ(株)研究開発センター³⁾

目的: Neo Red Cell (NRC) の心虚血再灌流における有効性を検討した。

方法: Hartley系雄性モルモット心をランゲンドルフ法にて灌流し, 灌流液として10 mg/ml BSA含有Krebs-Henseleit液 (KHS, pH7.4) を用いた (37°C, 左室拡張期圧10 mmHg, 大動脈圧30 mmHg, 95%O₂・5%CO₂)。30分間の安定化後, baselineとして30分間灌流し, 30分間灌流を中止, 45分間再灌流した。心拍数, coronary flow (CF) rate (ml/g/min) およびLVDP, 再灌流時の心室細動 (VF) の持続時間および出現頻度 (%) を観察した。まず, KHS群, 低親和性NRCの虚血前投与群, 再灌流時投与群, 虚血前および再灌流時投与群の4群を比較し, 最も有効な投与方法について高親和性NRC群と比較した。NRC灌流液中のHb濃度は1 mg/mlとした。

結果: KHS群, 低親和性NRCの虚血前投与群, 再灌流時投与群, 虚血前および再灌流時投与群の4群では, 血行動態の指標に各群間で有意差を認めなかったが, VF出現率および持続時間は再灌流時投与群で有意に低値となった。高親和性NRC群と低親和性NRC群の比較では, 再灌流時の心拍数に有意差を認めなかったが, LVDPおよびCF rateが高親和性NRC群で著明に改善した。一方, VF出現率および持続時間には有意差を認めなかった。

結論: 再灌流時に高親和性NRCを投与することにより, 心虚血再灌流障害が軽減されることが示され, NRCのショックや失血時の投与が心臓へ好影響をもたらす可能性が示唆された。

PEG-BSA RESUSCITATION MAINTAINS FUNCTIONAL CAPILLARY DENSITY (FCD) IN SEPSIS

Nanae Hangai-Hoger, Pedro Cabrales,
Amy G. Tsai and Marcos Intaglietta
Department of Bioengineering, University of California,
San Diego, La Jolla, California

Microvascular impairment due to sepsis is treated by fluid administration to treat collapsed capillaries due to vascular leakage and tissue edema. Maintenance and restoration of FCD can be targeted by using polyethylene glycol modified albumin, a fluid with plasma expansion capacity that does not extravasate, and has high viscosity, which is beneficial in maintaining FCD.

Sepsis was induced by LPS (*E. coli*) injection in the hamster window model. Fluid treatment was instituted with Dextran 70 (DEX-G) or 2.5% PEG-BSA (PEG-G). Fluid was infused for 1 hour, after LPS injection. Blood pressure (BP), heart rate (HR) and FCD were measured at t = 2, 6, 12 and 24 hrs after LPS injection. BP was significantly lowered in control, no treatment (t = 6, 12 and 24) and DEX-G (t = 6 and 24). HR did not change in any group. Control FCD reduced to 9.5% (t = 2), 6.7% (t = 6), 9.4% (t = 12) and 16.2% (t = 24) from baseline. In DEX-G, FCD reduced to 43.6% (t = 2), 42.5% (t = 6), 22.3% (t = 12) and 29.4% (t = 24) from baseline, which were significantly lower than baseline and significantly higher than control (t = 2 and 6). In PEG-G, FCD was reduced to 68.3% (t = 2), 36.4% (t = 6), 69.8% (t = 12) and 83.5% (t = 24) from baseline, which were significantly lower than baseline at t = 2, 6 and 12, while significantly higher than control at all time points and higher than DEX-G at t = 2, 12 and 24. In conclusion PEG-BSA resuscitation maintained BP and FCD during sepsis treatment.

This study was supported in part by the NIH grants R24-HL 64395, R01-HL 62318 and R01-HL 62354 to MI.

LIPOSOME-ENCAPSULATED HEMOGLOBIN POTENTIATES RADIATION THERAPY TO SUPPRESS CANCER GROWTH IN MICE

Akira T. Kawaguchi¹⁾, Chieko Murayama¹⁾,
 Youji Tsutsui²⁾, Yoshitaka Ogata²⁾, Munetaka Haida¹⁾,
 Yukihiko Ohizumi¹⁾
 Tokai University School of Medicine¹⁾, Terumo Co Ltd²⁾

Background. Liposome-encapsulated hemoglobin (NRC, Terumo Co, Ltd) has been modified to have a high-O₂-affinity (P⁵⁰=10 mmHg, hNRC) to increase O₂ delivery to hypoxic tissues such as neoplasm. We hypothesize that targeted O₂ delivery to neoplasm by hNRC may potentiate radiation therapy and test effects of hNRC and radiation on cancer growth in mice.

Methods. In order to determine optimal dosage, hNRC (0.5%, 1%, 2% of body weight) was intravenously infused 30 minutes before radiation therapy (20 gray) on transplanted squamous cell carcinoma (SCCVII) in mice (C3H/HeN, n=7 in each group). Tumor size was monitored daily thereafter to titrate suppression on tumor growth. In order to determine optimal interval, 1% body weight of hNRC was infused 30, 60, 90 and 120 minutes before a same radiation therapy (n=7 in each group). Tumor size was monitored daily to measure the period of time required to duplicate tumor mass by 5 times. In other mice, hNRC or empty liposome (1% of body weight) were infused without radiation and tumor excised 1, 3, 6, 24, 48 and 72 hours later (n=5 in each group) for histochemical staining for HIF peptide.

Results. hNRC was most effective when 1% of body weight was infused as compared to empty liposomes or 0.5% or 2% of hNRC. Tumor growth was most suppressed when interval between hNRC infusion and radiation was shortest, 30 minutes. As the result, 1% hNRC infusion 30 minutes prior to radiation elongated 5-times tumor duplication time from 15 days (no treatment) to 21 days, modifying factor 1.40. HIF expression showed no difference before 6 hours, but started decreasing in the tumor of hNRC-treated mice 24 to 48 hours after administration.

Conclusion. hNRC was effective to potentiate radiation therapy against tumor growth in mice. Decreased expression of HIF in hNRC-treated tumor may suggest targeted tumor oxygenation as a potential mechanism, and possible synergistic effect in cancer chemotherapy as well. Optimal dose, timing and O₂-affinity need to be further defined.

ナノカプセル型人工酸素運搬体の開発現況

緒方嘉貴，金田伸一
 テルモ株式会社 研究開発センター

今後急速な少子高齢化の到来により、輸血用血液製剤の需給バランスが楽観できない状況にあります。また、現行の血液製剤による輸血は、過誤輸血（異型輸血）やウイルス感染のリスクを伴い、特に赤血球製剤は冷蔵保存状態で有効期間が21日間の条件があり、緊急時や大規模災害発生時の輸血対応が困難という問題があります。このため、長期保存が可能で、血液型を問わずに使用可能、かつ、ウイルス感染の心配のない赤血球製剤の代替物の早期実用化が望まれています。

そこで長期保存が可能で、血液型がなくウイルス感染の心配もない赤血球製剤の代替物を早期に実用化することを目的として、ナノカプセル型人工酸素運搬体製造技術の研究開発が、フォーカス21に取り上げられ、平成15年度よりNEDOが主管する「ナノカプセル型人工酸素運搬体制剤の製造技術開発プロジェクト」として開発を進めております。

本プロジェクトの目的は、酸素運搬機能を有する物質として、ヘモグロビンをナノサイズのカプセル内に封入したナノカプセル型人工酸素運搬体に関して、臨床応用可能な製剤を製造する技術開発を行い、さらに、ナノカプセル型人工酸素運搬体を用いて虚血性疾患等に対する酸素供給による治療法に関して、動物実験を実施して有効性の評価を行う事を目標とし、

- ・ナノカプセル型人工酸素運搬体の製造技術の開発
- ・製剤の特性試験及び非臨床試験による安全性、有効性の評価
- ・虚血性疾患等に対する酸素供給による治療法の有効性の評価

これら研究開発目標を、平成17年度までに完了し、プロジェクト完了後に、臨床治験を開始するのに必要な準備を整えることとなっております。

本報告では、本プロジェクト開始から約1年を経過し、開発現況と今後の進め方について報告させていただきます。

ワークショップ1-2

L-チロシン内包によるヘモグロビン小胞体のメト化抑制

阿閉友保, 武岡真司, 土田英俊
早稲田大学理工学総合研究センター

【目的】オキシヘモグロビン (oxyHb) は自動酸化により中心鉄が3価のmetHbとなり酸素配位能を失う。本研究では、高純度Hbをリン脂質二分子膜にて被覆したHb小胞体の酸素運搬能延長を目的とし、L-チロシン (L-Tyr) を用いた小胞体内Hbのmet化抑制を試みた。

【方法】5 wt%oxyHb溶液にL-あるいはD-Tyr (0~1 mM) を添加し、自動酸化速度が極大となる酸素分圧40 Torrにて振とう条件下、37 °Cにて自動酸化させmet化率を算出した。更に、L-Tyr (0~1 mM) 内包oxyHb小胞体を調製し、同様の条件にて自動酸化させmet化率を算出した。また、oxy体での低温保存時のmet化率の算出、及びL-Tyr内包Hb小胞体からのL-Tyr漏出量を定量した。

【結果及び考察】5 wt%oxyHb溶液にL-Tyrを添加すると、L-Tyr濃度の増加に伴うT50 (50%のoxyHbがmetHbとなる時間) が10時間ほど延長された。一方、D-Tyr添加系ではT50の延長は確認されなかった。L-Tyr内包Hb小胞体でもT50は約1.5倍延長された。更に、L-Tyr内包Hb小胞体のoxy体を4 °Cにて保存するとmet化の進行が抑制され、低温でもL-Tyrは効果を有することを確認した。また、L-Tyr内包Hb小胞体からのL-Tyr漏出は酸素分圧40 Torr, 37 °Cにて24時間振とうした場合で約2%程度であり、室温静置では3ヶ月経過しても検出されなかった。以上より、Hb小胞体にL-Tyrを内包することによりmet化が抑制されることが確認された。また、そのメカニズムについても考察する。

ワークショップ1-3

完全合成型人工酸素運搬体の開発

甲斐俊哉, 木田善規, 福富一平, 帆足洋平, 片山直久,
山本尚志, 大川裕紀, 弘津一郎, 佐藤 誠
ニプロ(株)医薬品研究所

米国を中心にヘモグロビン修飾型の人工酸素運搬体が開発中であるが、いずれもヒトあるいは牛等の動物のヘモグロビンを原料としており、その安全性と安定供給に懸念が残る。また、ヘモグロビンはそのまま体内に投与すると、NOの捕捉による血圧上昇等の副作用が認められる。これに対して日本国内を中心としてリポソームにヘモグロビンを内包した、細胞型人工酸素運搬体の開発が進められている。これらの製剤はヘモグロビンの副作用を低減し、より安全で有効性の高い人工酸素運搬体として最も臨床に近い段階に開発が進んでいる。一方でこれらの人工酸素運搬体は献血由来の原料に依存している点で、国内使用に限定されるとともに安定供給にも不安が残る。

我々は、グループ内で開発した遺伝子組換えヒト血清アルブミン (rHSA) の高純度、高生体適合性、非感染性、量産性などの特徴に着目し、rHSAに可逆的酸素配位能を有する合成ヘムを包接させた新規の完全合成ヘム蛋白質 (アルブミン-ヘム) の開発を行っている。既に合成ヘムの選定が終了し、ラット、イヌを用いた交換輸血実験で有効な酸素運搬能を確認している。また輸血代替のみならず、腫瘍の酸素化、虚血部位の酸素化等の効果についても臨床応用を目指した評価を進めている。今回はアルブミン-ヘムの製剤としての安定性、製造方法、動物での検討結果について報告する。

一方、ヘモグロビンを封入した細胞型人工酸素運搬体として、内包する献血由来のヘモグロビンを遺伝子組換えヘモグロビンに置き換えたタイプの開発にも既に着手しており、先行して(株)オキシジェニクス、早稲田大学、慶応義塾大学とともに細胞型人工酸素運搬体のGMPに準拠した製造施設の設置を進めている。これらの概要についても紹介する。

ワークショップ1-4

ヒト赤血球由来ヘモグロビンによるヘモグロビン小胞体の開発と酸素輸液としての医療利用

高木智史
株式会社オキシジェニクス

ヘモグロビン小胞体とは、期限切れヒト赤血球由来の精製ヘモグロビンをリン脂質二分子膜小胞体に内包させた人工酸素運搬体であり、早稲田大学・慶應義塾大学の共同研究グループが中心となって文部科学省CREST研究とし、引続いて厚生労働省科学研究として推進された成果を元に、(株)オキシジェニクスが具体的に社会に繋ぐ開発を推進している。特徴としては、ウイルスなどの感染源を不活化除去処理したヒト高濃度ヘモグロビンを250 nmの均一球径の小胞体に内包し、膜成分の組成や表面修飾に工夫が施されており、物理化学的安定度を確保して、室温で2年間安定、血中滞留寿命の延長と共に血液型のない人工酸素運搬体として、救急救命医療現場で充分対応し得るものとなっている。げっ歯類を用いた試験においては、血小板や補体の活性化回避をはじめとする基本的安全性を保持させながら、酸素輸送効果を確認している。

ヘモグロビン小胞体は、20年余にわたる基礎研究による極めて優れた技術で製造され、多岐にわたる動物試験や最先端のバイオイメージング技術によって安全性と有効性が確認されており、加えて市場価値、国際的需要などを考慮し、従来に類例の少ない開発対象である。バイオ関連の新技术展開、Venture Businessの設立とその推進を業とするバイオアクセラレーターの支援によって、(株)オキシジェニクスが2002年12月19日に設立された。

(株)オキシジェニクスは、予備試験として霊長類を用いた安全性検証を行い、この製剤がGLP基準の非臨床試験、GMP試料によるヒト臨床試験に進むことを確認している。現在、厚生労働省科学研究の一環として、規格基準を満たす試料の製造とその提供を引き受けつつ、(株)ニプロの協力を得て、GMP基準の製造準備をしているので、この概略を報告したい。

ワークショップ1-5

アルブミン-ヘム製剤の安全性試験に関する検討

小松晃之，土田英俊
早稲田大学 理工学総合研究センター

【緒言】組換えヒト血清アルブミン (rHSA) に合成ヘムを包接させて得たアルブミン-ヘム製剤 (rHSA-heme) は、原料を生体由来物質に依存しない完全合成系酸素輸液 (人工酸素運搬体) である¹⁾。修飾ヘモグロビン投与後に見られる血管収縮・血圧上昇などの副作用はなく²⁾、生体内で酸素輸送可能な赤血球代替物として機能する。本報では、アルブミン-ヘム製剤の安全性試験を実施したので、その結果について報告する。

【方法】麻酔下ラット20%血液交換モデルを用い、rHSA-heme製剤 ([rHSA]=5 g/dL, pH 7.4, (株)ニプロ製) 投与後6時間までの呼吸・循環器系パラメータを観測、血液学的検査、血液生化学検査を実施した。交換後1~7日までの安全性を体重、臓器重量、血液生化学検査及び病理組織学的検査を指標に評価した。また、ラット20%投与モデルを用い、rHSA-heme投与14日後までのhemeの体内分布、排泄に関する検討を行った。

【結果および考察】rHSA-heme 20%血液交換後の呼吸・循環器系パラメータ及び血液学的検査値は、血液交換終了6時間後まで、無処置対照群あるいは20%rHSA投与群とほぼ同様に推移した。1日後に体重は一旦減少するものの、7日後には無処置対照群と同等値まで増加。rHSA-heme製剤の高い安全性が示された。

rHSA-heme投与後の血漿中、主要臓器中におけるheme濃度推移をLC/MS/MSにより定量した結果、hemeは肝臓に特異的に捕捉され、14日後には消失することが明らかとなった。

- 1) *Bioconjugate Chem.*, 2000, 11, 46; 2001, 12, 71; 2002, 13, 397.
- 2) *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, 64A, 257.

ヒト血清アルブミンの消失に関与するアミノ酸残基の解析～ Site に存在する Arg-410 の重要性～

岩尾康範¹⁾, 安楽 誠¹⁾, 山崎啓之¹⁾, 川井恵一²⁾,
丸山 徹¹⁾, 小田切優樹¹⁾
熊本大学大学院医学薬学研究部¹⁾,
金沢大学医学部保健学科²⁾

【目的】ヒト血清アルブミン (HSA) の消失に関与するアミノ酸残基を検索するため、金属触媒酸化 HSA (MCO-HSA) を作製し、部位特異的変位法で作製した 1 残基置換変異体とその構造、機能及び体内動態特性について比較検討した。

【方法】MCO-HSA は、12, 24, 48, 72 時間まで、経時的に作製した。1 残基置換変異体及び MCO-HSA の構造は CD スペクトル、HSA 分子表面の電荷及び疎水性は、キャピラリー電気泳動及び疎水領域プローブ (bis-ANS) を用いて評価した。また、消化酵素認識能の評価はキモトリプシン処理し、SDS-PAGE で評価した。動態特性は、In-111 を各種 HSA に標識させ、体内動態特性を検討した。

【結果及び考察】酸化時間に伴い、MCO-HSA 分子表面の電荷及び疎水性は正電荷を有するアミノ酸残基の修飾による分子表面の負への帯電と疎水性の増大が観察され、マクロな構造変化を引き起こしていることが判明した。一方、1 残基置換変異体において HSA の Site 及び Site といわれるリガンド結合サイトのうち、Site では、Lys-199、Site では Arg-410 において分子表面の負への帯電と疎水性の増加が観察されたものの、1 残基置換によるマクロな構造変化は認められなかった。また、MCO-HSA の時間依存的な消化酵素認識能の上昇が認められたものの、変異体では Arg-410 のみ顕著に上昇した。体内動態特性においても、Arg-410 は血中から顕著に消失するとともに肝臓での取り込みを有意に増加した。これらのことより、酸化に伴う Arg-410 の修飾がアルブミンの生体内からの消失に大きく関与している可能性が示唆された。

組換えヒト血清アルブミンの構造及び機能解析

中島和幸¹⁾, 岡村 宏¹⁾, 小田嘉明¹⁾, 柴田伸一¹⁾,
宮津嘉信¹⁾, 溝上 寛¹⁾, 船津昭信¹⁾, Peter Kiessling²⁾
財団法人 化学及血清療法研究所¹⁾, ZLB Behring²⁾

ヒト血清アルブミン (HSA) は、585 個のアミノ酸残基よりなる 66 kDa の単純たんぱく質であり、生体内では膠質浸透圧の維持や脂肪酸および各種薬剤などの物質輸送などに重要な働きをする。従って、ヒト血漿より精製された HSA 製剤 (pHSA) は、循環血漿量維持の目的で使用されてきた。しかし、原料となるヒト血漿の国内自給量の安定的な確保に対する不安が完全に否定できないため、組換え技術を用いた医薬品の開発が望まれていた。我々は、HSA 遺伝子を導入した酵母を大量培養した後、高純度に精製された組換え HSA (rHSA) の製剤化に成功した。rHSA の性状解析については、本学会第 9 回大会において、報告したが、その後 rHSA の立体構造評価および薬物結合能の評価に関して、更なる検討をおこなったので報告する。立体構造に関して、X 線結晶構造解析、核磁気共鳴 (NMR) スペクトル、電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルにより解析を行った。X 線結晶解析では 2.2-2.5 Å の分解能で精密化を行った結果、決定された rHSA の立体構造は pHSA と極めて類似していることが確認された。また、NMR スペクトルおよび ESR スペクトルは、pHSA と同様なパターンを示した。HSA の生物活性として、薬物結合能について評価するために、特異的な部位に結合する 9 種類の薬物に対する結合能を表面プラズモン共鳴法により測定を行った。その結果、rHSA の各薬物に対する結合能は pHSA と有意な差は認められず、同様な生物活性を保持していることが確認された。

以上の結果より、rHSA の構造および機能は pHSA と同一であると考えられた。

リコンビナントアルブミンの開発状況

小林 薫
三菱ウェルファーマ株式会社 蛋白医薬研究所

現在では、遺伝子操作技術の進歩により種々の医薬品の開発が可能となっており、エリスロポエチンや第 因子製剤などがすでに市販されている。これらのバイオテクノロジー応用医薬品は、既存の低分子医薬品では代替することが困難なもの、生体から医薬品として安定供給する際に必要となる量を確保することが困難なものについても安定供給の道を開くものである。しかし、バイオテクノロジーを利用して生産されたタンパク質は、宿主細胞や製造工程に起因した多様性を持つのが一般的である。また、ヒト以外の宿主を利用して生産されるため、宿主由来不純物についても慎重な対応が求められる。そのため、遺伝子組換えにより医薬品を開発するためには各種の規制をクリアする必要がある、代表的なガイドラインと絡ませながら当社が開発中であるリコンビナントアルブミン (rHSA) について概要を述べる。rHSAの開発は、組換えDNA技術によるたん白質の生産における最も困難な目標の1つとされてきた。その理由として、アルブミンの投与量が、他の組換えDNA技術により創られた医薬品と比べ極端に高いことが挙げられる。また、1g当りの単価を考えた場合、他の血漿由来たん白質製剤に比べると安価であり、しかも、大量に供給する必要があることも理由の一つに挙げられる。rHSAの開発では、これまでに例の無い高純度と高生産性という相反しやすい事象を大量生産の場において両立させることが要求される。この目的を達成するため、我々はメタノール資化性酵母を用いてrHSAの高生産系及び高度精製系を確立した。我々が実施した物理化学的・免疫学的性質の結果及び年間100万バイアルの生産が可能な実生産用プラント (北海道・千歳市) での製造結果と生産されたrHSAに関する分析結果も踏まえ紹介する。

治療薬としてのヒト抗体開発の現状

黒澤良和
藤田保健衛生大学総合医科学研究所

組換えDNA技術を使って自由にヒト抗体を単離調製可能となり、現在様々な疾患に対する治療薬としてヒト抗体の開発を進めている。ウイルスや病原菌の分泌する毒素に対して抗体が中和効果を示すことは、本来の生物機能である。血清中に中和抗体を有するヒトがボランティアとして協力してくれれば、成分採血-抗体ライブラリーの作製-スクリーニング-抗体の検定-ヒト抗体への変換と大量調製を経て治療用ヒト抗体ができる。SARSウイルスもこの方法を用いて治癒したヒトから中和抗体がとれるに違いない。一方、我々は、細胞膜上のすべての分子に対する抗体を網羅的に単離する技術開発に成功し、癌特異抗原の同定-癌治療用ヒト抗体開発プロジェクトを大々的に進めている。肝癌の例では、1000種類の抗体を単離し、そのうち数% (60種) が癌特異的染色能を示した。その一部について、何故癌特異的になるか理由も判明しつつある。この中に治療薬となるものが含まれると確信している。自己免疫疾患のなかには自己抗原に対する抗体の出現が病因であるがその実体がわからないものがいくつも残されている。この実体解明に同様の技術が使える。ゲノムサイエンスの展開から得られたデータベースの充実が大きい。以上列記したように、ファージディスプレイを中心技術とする新しい抗体技術の現状を紹介する。トランスレーショナルリサーチが叫ばれているが、治療薬を現実的につくり出す時期が到来したと実感している。

免疫グロブリンの血管炎抑制効果と人工化

鈴木和男

国立感染症研究所・生物活性物質部

血管炎である川崎病の治療をステロイドパルスから大量ガンマグロブリン製剤治療 (IVIG) に変えてから重篤な病態は激減し、その有効性が実証されている。また、IVIGは、加齢に伴って増加する自己免疫疾患、血管炎などの難治性疾患におけるステロイドパルス治療の危険性を回避する初期治療法として注目されている。しかし、IVIGにおける感染症や安全性の観点か、人工化が期待されている。そこで、まず、治療評価用のモデルマウスとして *Candida albicans* Water Soluble fractions (CAWS) 誘発の動脈炎発症マウスを開発した。本マウスにより、グロブリン治療を評価した結果、中期治療開始群において汎血管炎発生抑制、汎血管炎への進展抑制があり、EBMの観点から、IVIG治療のモデルマウスとしての有効性を認めた。一方、MPO (myeloperoxidase) -ANCA関連血管炎の治療を目的とし、抗体遺伝子のライブラリーから人工 scFv 抗体のプロトタイプを作製した。人工Fc部分と組み合わせ、血管炎治療用の人工グロブリンの合成系を樹立し、治療の条件と治療に必須な部分の検討に入った。本ワークショップにて、グロブリン製剤の人工化による治療戦略について述べたい。

抗体工学の進歩と癌治療

太田 聡

協和発酵工業株式会社 東京研究所

1990年代の抗体工学の進歩により生み出されたキメラ抗体やヒト化抗体 (CDR移植抗体) は、マウスモノクローナル抗体の欠点であった抗原性の問題を克服することにより血中での長期安定性と頻回投与を可能にし、多くの臨床試験においてその有効性が実証されている。癌分野においては非ホジキンリンパ腫適応の抗CD20キメラ抗体Rituxan、乳癌適応の抗Her2/Erb-2ヒト化抗体Herceptinなどの抗体医薬が期待の新薬として登場し、新しい医療分野を開拓しつつある。

現在開発が進んでいる抗体療法のターゲット分子は大きく2つに分類することができる。すなわち、1) がん細胞表面に多数発現しているが、がん細胞の増殖や進展に直接関与しない分子、2) がん細胞の増殖や進展に直接関与する分子、の2つである。我々は、1) のカテゴリーにおいて、ガングリオシドGM2やGD3に着目して研究を進めている。本ワークショップでは、抗GM2キメラ抗体、ヒト化抗体の *in vivo*, *in vitro* 抗腫瘍効果とそのメカニズムについて報告したい。その一方で、現在の抗体医薬の薬効は必ずしも充分ではなく、抗体の活性増強は重要な研究課題である。これまで非常に多くのアプローチが検討されており、抗癌剤コンジュゲート、放射性同位元素コンジュゲートが上市されている。RituxanやHerceptinは多彩な抗腫瘍メカニズムを持つが、最近になり抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC活性) が最も重要な抗腫瘍メカニズムであると注目されてきた。我々は、抗体のADCC活性は生産する宿主細胞により大きく異なることを見出し、その違いは糖鎖中のフコースの有無によることを明らかにした。低フコース抗体はADCC活性および抗腫瘍活性が顕著に上昇しており、次世代の抗体医薬として有望である。

ヘモグロビン小胞体の体内動態解析

宗 慶太郎¹⁾, Robert, Klipper²⁾, Beth, Goins²⁾,
William, T. Phillips²⁾, 土田英俊¹⁾
早稲田大学理工学総合研究センター¹⁾,
Univ. Texas Health Science Center at San Antonio²⁾

【目的】濃厚ヘモグロビン (Hb) 溶液をリン脂質二分子膜で被覆したHb小胞体は安全に酸素輸送できる酸素輸液として期待される。本報では、Hb小胞体の体内分布と血中半減期に関する相関因子を明らかにし、臨床応用への外挿から効果と安全度を見積もることを目的とした。

【方法】Technetium-99m (^{99m}Tc) で放射化標識したHb小胞体 ([Hb]=9.5 g/dL) をSDラットあるいはNZWラットに 1 mL/min で投与し (血液に対し25 vol%), カメラおよびシンチレーションカウンタで肝臓および脾臓への分布率と血中残存率の経時変化を計測した。投与48時間後に臓器を採取し、各臓器へのHb小胞体の分布率を計測した。

【結果および考察】Hb小胞体の血中半減期 ($t_{1/2}$) は34.8時間 (ラット) および62.6時間 (ラビット) であった。血中から消失したHb小胞体は主に肝臓、骨髄、脾臓に捕捉され、投与48時間後での投与量に対する分布率の総和は22.6% (ラット) および13.6% (ラビット) であった。この総和と消失相半減期 ($t_{1/2}$) の間には逆相関が認められた。一方、臓器重量当りの取込み量は肝臓、骨髄、脾臓について種差を認めず、臓器に捕捉されたHb小胞体の分布密度は一致することが示された。これらの結果は、Hb小胞体の体内動態が体重 (血液量) と臓器重量の比に依存することを示しており、この重量比を考慮して外挿できる可能性を示唆している。この解析により算出されるHb小胞体の体内分布と消失半減期について報告する。

IMPROVEMENT OF TISSUE pO₂ BY HEMOGLOBIN SITE SPECIFICALLY PEGYLATED AT CYS-93() DURING EXTREME HEMODILUTION STUDIED IN HAMSTER WINDOW CHAMBER

Pedro Cabrales¹⁾, Belur N. Manjula²⁾, Amy G. Tsai¹⁾,
Seetharama A. Acharya²⁾ and Marcos Intaglietta¹⁾
Department of Bioengineering, University of California,
San Diego, La Jolla, CA¹⁾, Departments of Medicine and
of Physiology and Biophysics, Albert Einstein College of
Medicine, Bronx, NY²⁾

The oxygen transport capacity of non-hypertensive polyethylene-glycol (PEG) conjugated hemoglobin solutions was investigated in the hamster chamber window model. Microvascular measurements were made to determine oxygen deliveries in conditions of extreme hemodilution. Two isovolemic hemodilution steps were performed with 6% Dextran 70 (70 kDa MW) plasma expander until hematocrit (Hct) was 35% of control. Isovolemic blood volume exchange was continued using two surface modified pegylated hemoglobins (P5K2, P₅₀ = 8.6, and P10K2, P₅₀ = 8.3) until hematocrit Hct was 11%. P5K2 and P10K2 are PEG conjugated hemoglobins that maintain most of the hemoglobin allosteric properties, and have a cooperativity index $n = 2.2$. The effects of these molecular solutions were compared to those obtained in a previous study using MP4, a PEG-modified hemoglobin whose P₅₀ was 5.4 and cooperativity was 1.2 (Tsai *et al.*, 2003). Tissue oxygen levels were higher after P5K2 (7.0 ± 2.5 mmHg) and P10K2 (6.3 ± 2.3 mmHg) vs. MP4 (1.7 ± 0.5 mmHg) or the non-oxygen carrier Dextran 70 (1.3 ± 1.2 mmHg). Microvascular oxygen delivery was higher after P5K2 and P10K2 (2.22 and 2.34 mlO₂/dl_{blood}) compared to MP4 (1.41 mlO₂/dl_{blood}) or Dextran 70 (0.90 mlO₂/dl_{blood}), however all these values were lower than control (7.42 mlO₂/dl_{blood}). The total hemoglobin in blood was similar in all cases; therefore the improvement in tissue pO₂ and oxygen delivery appears to be due to the increased cooperativity of the new molecules.

This study was supported in part by the NIH grants R24-HL 64395, R01-HL 62318 and R01-HL 62354 to MI.

一般演題 (1) 3

3 置換ヘム誘導体とアルブミン-ヘム複合体の酸素結合

中川晶人, 小松晃之, 土田英俊
早稲田大学 理工学総合研究センター

【緒言】テトラアミノフェニルポルフィリン (TAPP) の面上に, 4つの疎水性置換基 (⁴構造) と軸塩基配位子を導入したヘム誘導体 (FeP) を組換えヒト血清アルブミン (rHSA) に包接させたアルブミン-ヘム複合体が, 生体内で酸素輸送できる人工酸素運搬体 (酸素輸液) として機能することを報告してきた。本報では, より少ない工程数で合成可能な³置換構造の新規ヘム (³-FeP) を設計・合成し, そのrHSA複合体の酸素結合について検討したので報告する。

【方法】TAPPのatrop異性体混合物にトリチルブロマイドを小過剰モル反応させ, TAPP-モノトリチル (³) 体を得た。続いて, 疎水性置換基を導入, トリチル基を除去して軸塩基配位子を結合後, 鉄を挿入して³-FePを合成した。化合物の同定は, TLC, 赤外吸収, 紫外可視吸収, 1H-NMR, MSスペクトルにより行った。

【結果および考察】重要な中間体であるTAPP-モノトリチル (³) 体は, atrop異性体間の平衡移動を利用する方法により, 収率57%で得られた。従来, 軸塩基配位子を分子内に共有結合するため, ピロール環位へホルミル基を導入する必要があったが, 1つのアミノフェニル基へ軸塩基配位子を結合することにより, 簡便に類似構造を持たせることが可能となった。その結果, ³-FePはFePに比べ, 4工程少ない計7工程で合成できた。³-FePをrHSAに包接させた複合体の酸素結合能についても併せて報告する。

一般演題 (1) 4

¹²⁵Iラベル化ヘモグロビン小胞体の体内動態特性について

安楽 誠¹⁾, 浦田由紀乃¹⁾, 宗 慶太郎²⁾, 酒井宏水²⁾,
土田英俊²⁾, 小田切優樹¹⁾
熊本大学大学院医学薬学研究部¹⁾,
早稲田大学 理工学総合研究センター²⁾

【緒言】本研究は, 輸血に代わりうる人工酸素運搬体としてヘモグロビン小胞体 (HbV) に着目し, 有効かつ安全性に優れた人工血液製剤の開発を目的に, ¹²⁵I標識Hb及びHbVの Mausにおける体内動態実験を行い, その半減期及び臓器分布等から動態特性を評価した。

【方法】実験動物はddY系雄性マウスを使用した。Hb及びHbV投与液の調製は, IODO-GENを用い, ヨウ素標識Hb (¹²⁵I-Hb) 及びHbV (¹²⁵I-HbV) を調製した。この方法によるラベル化効率は90%以上であった。マウスに尾大静脈から投与後, 経時的に開腹し, 下大静脈より採血, 採尿終了後, 下大静脈を切断し放血致死させ, 組織を摘出した後, 重量を秤量し, 各組織の放射活性をオートウェルガンマーカウンターを用いて測定した。

【結果及び考察】¹²⁵I-Hb (200mg/kg) 及び¹²⁵I-HbV (200mg/kg, 1400mg/kg) の投与量において体内動態特性を評価した。投与後8時間までの血中体内動態について検討した結果, ¹²⁵I-HbV (1400mg/kg) > ¹²⁵I-HbV (200mg/kg) > ¹²⁵I-Hb (200mg/kg) の順に半減期の延長が観察された。この各臓器への¹²⁵I-HbV, ¹²⁵I-Hb分布推移を検討した結果, Hbのみでは, 各臓器での素早い消失が認められたのに対して, HbV投与時では, 各臓器での取込み抑制とともに, 脾臓への取り込み上昇が観察された。この取り込みの増大は小胞体化による脾臓の貪食細胞への取り込み促進の可能性が示唆された。また, 脾臓への蓄積は8時間後には消失していたことから, HbVの速やかな代謝も確認された。

一般演題 (1)-5

高ずり速度下で発現する血小板代替物の血小板凝集協同効果

岡村陽介¹⁾, 武岡真司¹⁾, 土田英俊¹⁾, 半田 誠²⁾,
池田康夫²⁾
早稲田大学理工学総合研究センター¹⁾,
慶応義塾大学医学部²⁾

【目的】フィブリノーゲン鎖C末端アミノ酸序列(H12)担持微粒子は特に低ずり速度下で血小板粘着の増強効果を示す。他方, 血小板膜蛋白質rGPIb 担持微粒子は高ずり速度下で血小板と凝集する。そこで本報では, 全血流条件下にて出血部位認識能を持つ微粒子の構築を目的とし, H12あるいはrGPIb 担持ラテックスビーズ(LB)の混合系についてずり速度と血小板凝集能の関係を明らかにする。

【方法】チオール基導入H12あるいはrGPIb をLBに担持させた(H12-LB, rGPIb -LB)。血小板減少血液([血小板]= $2.0 \times 10^4/\mu\text{L}$; 正常値の1/10)にそれぞれH12-LB, rGPIb -LB ([LB]= $1.0 \times 10^5/\mu\text{L}$)あるいは両者の混合系([LB]= $5.0 \times 10^4/\mu\text{L}$ ずつ)を添加し静置後(37°C, 10 min), コラーゲン基板を流動させ, LBを蛍光顕微鏡にて観察した。

【結果・考察】H12-LB単独の基板への粘着率(1)は低ずり速度で最大となり, ずり速度の増大と共に低下した。他方, rGPIb -LB単独(2)では逆に高ずり速度で最大となり, ずり速度の低下と共に低下した。両者の混合系では, 特に高ずり速度時に(1), (2)の相加平均よりも粘着率は増大する傾向が得られた。高ずり速度下, 混合系の流動後の基板をSEM観察したところ, 血流に対して血小板血栓の正面, 背面部にH12-LBが, 側面部にrGPIb -LBが結合する傾向が観察された。これは, 高ずり速度下ではrGPIb -LBによって血小板凝集が促進され, 形成された血栓の正面と背面には乱流が生じ, そこへH12-LBの結合が起こって血小板凝集を促進させたためと考えられた。従って血栓形成に両者の共存による協同効果が観察された。

一般演題 (2)-6

ヘモグロビン小胞体(HbV)投与がラット免疫系に及ぼす影響

阿部英樹¹⁾, 山口美樹¹⁾, 藤原満博¹⁾, 酒井宏水²⁾,
武岡真司²⁾, 土田英俊²⁾, 東 寛¹⁾, 池田久實¹⁾
北海道赤十字血液センター¹⁾,
早稲田大学理工学総合研究センター²⁾

【目的】ヘモグロビン小胞体(HbV)は, ヒトヘモグロビンを脂質二重膜で被覆し, 表面をポリオキシエチレングリコールで修飾した球体型の人工酸素運搬体である。ヒト血液を用いたin vitro検討では, 血小板および好中球の機能, 血漿凝固活性への影響は無く, 生体適合性に優れていることが確認された。今回, HbVが免疫機能に及ぼす影響についてラットを用い検討した。

【方法】WKAHラットに, 循環血液量の20%相当のHbV(約3 mL)をエーテル麻酔下, 尾静脈より輸注し, 対照群には生理食塩水を輸注した。投与6時間, 1, 3, 7日後に脾臓を摘出し, 単一脾細胞を調製した。白血球の変化をフローサイトメーターで測定, T細胞機能は, ConAに対する増殖能を3H-チミジンの取り込み量を指標に解析した。

【結果】脾細胞中白血球の割合は, HbV投与により変化はしなかった。HbV投与6時間目, 1日目の脾細胞では, 低濃度ConA刺激(0.1, 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)による3H-チミジン取り込み量抑制が見られた。しかし, 3日目以降の脾細胞は生食群と同等の反応性を回復した。また, 高濃度ConA刺激(3 $\mu\text{g}/\text{ml}$)では取り込み量低下は認められず, 両群共にConA 0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 刺激による活性化T細胞の割合, IL-2産生量, アポトーシスT細胞の割合に違いは見られていない。

【考察】低濃度ConA刺激に対する脾細胞反応性は, HbV投与群においてのみ一過性の低下が認められた。しかし, 生食群と同等のT細胞活性化およびIL-2分泌が見られていることから, 他の抑制性因子の関与が考えられる。反応性低下の機序および臨床的意義については今後の継続検討課題であろう。

MICROVASCULAR RESPONSE TO EXCHANGE TRANSFUSION WITH STORED RBC: PERFUSION AND OXYGEN DELIVERY

Amy G. Tsai, Pedro Cabrales, and Marcos Intaglietta
Department of Bioengineering, University of California,
San Diego, La Jolla, CA 92093-0412

BACKGROUND: Transfusions are intended to augment oxygen carrying capacity. The ability of fresh and stored RBCs to maintain microvascular perfusion and oxygen delivery to the tissue has not been directly measured.

STUDY DESIGN AND METHODS: Microvascular responses to exchange transfusion with fresh and stored RBCs after acute isovolemic hemodilution with a plasma expander were investigated using the hamster window chamber model. In vivo functional capillary density (FCD), blood flow, and high-resolution oxygen distribution in microvascular networks were measured by noninvasive methods.

RESULTS: Exchange transfusion with an RBC suspension after a 60 % isovolemic hemodilution with dextran 70 (MW=70 kDa) resulted in a hematocrit of 18% (5.6 ± 0.2 g Hb). All other systemic parameters were unchanged. Stored RBCs (28 days in CPDA-1) resuspended in FFP matched to the Hct/Hb concentration were exchange transfused until 25% of the circulating RBCs were Stored RBCs. Stored RBCs reduced microvascular flow and FCD by 63% and 54% respectively of the level achieved when Fresh RBCs were exchange transfused. Microvascular oxygen extraction by the Stored RBC was 54% lower than that of the Fresh RBCs. Tissue oxygen level was 3.5 and 14.4 mmHg for the Stored and Fresh RBC respectively.

CONCLUSION: Circulation of stored RBC in a hemodiluted animal resulted in significantly malperfused and under oxygenated microvasculature which was not detectable at the systemic level.

This study was supported in part by the NIH grants R01-HL 76182 to AGT, R24-HL 64395, R01-HL 62318 and R01-HL 62354 to MI.

LIPOSOME-ENCAPSULATED HEMOGLOBIN ALLEVIATES MYOCARDIAL ISCHEMIA AND REPERFUSION IN THE RAT

Akira T. Kawaguchi¹, Teruhisa Tanabe¹,
Munetaka Haida¹, Yoshitaka Ogata²
Tokai University¹, Terumo Corporation²

Background. We tested a hypothesis that liposome-encapsulated-hemoglobin (LEH, diameter 200 nm) may deliver oxygen beyond blockage through collaterals, improve microcirculation and limit ischemic damages after acute myocardial ischemia and reperfusion.

Methods. Pressure-volume loops were analyzed 10 and 40 minutes after occlusion of the left anterior descending artery and 10 and 40 minutes after reperfusion in rats. LEH (LEH+, n=5) or empty liposome solution (LEH-, n=5) of 1% body-weight was infused 5 minutes before (Pre) or 10 minutes after onset of ischemia (Post). End-diastolic and end-systolic pressure-volume relationships were defined in each occasion and left ventricular size and function were analyzed before and after onset of ischemia and reperfusion.

Results. Although end-diastolic (EDV) or end-systolic (ESV) left ventricular volumes were not significantly different, stroke volume (SV), end-diastolic pressure (EDP) and ejection fraction (EF) were significantly higher in LEH+ rats after onset of ischemia and reperfusion. LEH 10 minutes after onset of ischemia showed similar protective effects with less significance.

Conclusion. LEH before (pretreatment) or after onset of myocardial ischemia (therapeutic use) appeared to be effective in preserving stroke volume and ejection fraction in the rat. Since percutaneous coronary intervention and/or coronary bypass surgery always involve myocardial ischemia, pretreatment with LEH may be useful to reduce iatrogenic risk and damage. LEH may also be useful as an emergency treatment after onset of myocardial ischemia before definite therapy intervenes.

ヘモグロビン精製工程におけるSD処理を用いたウイルス不活化検討

小島潤也, 木村哲寛, 後藤 博, 上田 努, 筒井洋治,
岡本 武, 稲葉勝利, 金田伸一, 緒方嘉貴
テルモ株式会社 研究開発センター

【緒言】ナノカプセル型人工酸素運搬体 (NRC) の原料となるヘモグロビンの精製工程に, ウイルス不活化を目的とした Solvent/Detergent (SD) 処理を導入し, ナノカプセル型人工酸素運搬体のウイルスに対する安全性を高める検討を行っている. SD処理不活化技術は, 既に血漿分画製剤に利用され, たんぱく質への影響が少ない利点がある. しかしながら, 赤血球膜成分が混在することにより, 効果が問題となる可能性があった. そこで, 赤血球膜成分存在下において, ヘモグロビンをSD処理した際のウイルス不活化効果を検討した.

【方法】TritonX-100或いはデオキシコール酸ナトリウム及び Tri (n-butyl) -phosphate (TNBP) でSD溶液を調製した. 次に遠心洗浄した濃厚赤血球製剤に指標ウイルス (Human parainfluenza virus 2, Human herpesvirus 1) を0.1 ml加え, これにSD溶液を混合し, 全溶液量1.1 mlの試料とした. この溶液の10倍段階希釈液を調製し, Reed-Munch法によりウイルス感染価を算出し, リダクションファクターを得た.

【結果及び考察】TritonX-100或いはデオキシコール酸のどちらを用いた場合でも, 十分なウイルス不活化効果があり, TritonX-100を用いた場合には, TNBP: 0.3%, TritonX-100: 0.2%の条件において, 赤血球溶液とSD液を混合した直後でも, リダクションファクターがlog 6以上であることを確認した. さらに低濃度のTritonX-100を用いた場合でも, 処理時間を1時間以上とすることで, 添加したウイルスは完全に不活化されていた. この結果からSD処理の高いウイルス不活化効果を確認した. またSD処理がヘモグロビンへ与える影響が少ない事も確認した. 従って, ヘモグロビン精製工程におけるウイルス不活化法として, SD処理が効果的に導入可能であることが示唆された.

血流停止させた細動脈内のヘモグロビン小胞体からの酸素放出挙動

酒井宏水¹⁾, Pedro Cabrales²⁾, Amy G. Tsai²⁾, 武岡真司¹⁾,
Marcos Intaglietta²⁾, 土田英俊¹⁾
早稲田大学 理工学総合研究センター¹⁾, Department of
Engineering, University of California, San Diego²⁾

【緒言】低酸素状態に陥った組織に対し, 修飾Hb溶液の投与が酸素化に有効であることが多数報告されているが, Hb小胞体も有茎皮弁の虚血領域の酸素化に有効であることが最近Erniらと早稲田の共同研究により具体的に明らかにされた (AJP Heart 2003;285: H1140-H1147). 本研究では, 低酸素領域に効率的に酸素を供給するための条件を検討することを目的とし, 今回はHb小胞体投与後に, 細動脈の血流を停止させた後の酸素分圧の変動から, Hb小胞体の酸素放出の特徴を明らかにすることを目的とした.

【方法】Hamster dorsal skinfold window modelを利用し, 皮下微小循環を観測部位とした. 血管内酸素分圧の測定には, Pd-coproporphyrin/アルブミン複合体を予め投与し, その燐光寿命から算出した. Hb小胞体を7 mL/kg投与した. 顕微鏡下に細動脈 (直径約50 μ m) を硝子製微細ピペットで30秒間経皮的に圧迫して血流を停止させ, その100 μ m下流域の血管内酸素分圧の変化を追跡. Hb小胞体の酸素結合平衡曲線より酸素飽和度の推移を算出した. Hb小胞体は, 高酸素親和度 (P50 = 8 mmHg, HbV8), および低酸素親和度 (P50 = 29 mmHg, HbV29) の二種類について検討した.

【結果および考察】細動脈内の酸素分圧は平常50-52 mmHgであるが, 血流停止させると直ちに酸素分圧は低下し, 最終的に5 mmHgに到達した. しかしHbV8を投与した場合は, HbV28の投与に比較して僅かに遅延された. また, 酸素飽和度の推移から, 血管内酸素分圧が10 mmHg以下になると, 赤血球やHbV29の酸素飽和度は10%以下に低下したが, HbV8の酸素飽和度は60%近い値を維持し, より多くの酸素を保持しながら酸素を徐放した. 投与量が全血液量の10%と僅かであるにも拘らず, 低酸素領域では赤血球上回る酸素供給源として作用していることが明らかとなった.

虚血 - 再開通モデルラットにおける脳機能不全の多角的評価と人工酸素運搬体の有効性に関する検討

富樫広子¹⁾, 佐久間一郎²⁾, 山口 拓¹⁾, 尾谷 浩¹⁾,
Subrina Jesmin²⁾, 掛端 仁³⁾, 緒方嘉貴⁴⁾, 石塚隆伸⁴⁾,
仲井邦彦⁵⁾, 吉岡充弘¹⁾
北海道大・院・医・神経薬理¹⁾, 同循環病態内科学²⁾,
同侵襲制御医学³⁾, テルモ(株)研究開発センター⁴⁾,
東北大・院・医・環境保健医学⁵⁾

脳循環不全に伴った疾患に対する人工酸素運搬体の応用の可能性を追究する目的で, 脳虚血後の脳機能不全の評価系として妥当性の高いモデルを確立し, それを用いて, 人工酸素運搬体であるリボソーム封入ヘモグロビン (Neo Red Cell: NRC) の効果を検討した。両側総頸動脈を10分間閉塞することによって一過性不完全脳虚血モデル (2VO) ラットを作製し, 電気生理学的ならびに行動学的に脳機能変化を評価した。2VOラットでは, 虚血後4日目, 海馬歯状回領域における長期増強 (LTP) 形成の障害が認められた。虚血後1日目, LTP形成障害に先行して, 海馬NO産生の増加が認められた。誘導型NO合成酵素阻害薬は海馬NO産生を抑制し, 歯状回領域におけるLTP形成障害を改善した。2VOラット海馬では, 神経細胞の変性脱落などの形態学的変化を認めなかった。また, 虚血後4日目および7日目に施行した行動学的検討から, 不安関連行動の増強が観察された。すなわち, 2VOラットでは, 文脈的条件恐怖に対する不安水準の上昇を示す「すくみ行動」の亢進が認められた。この不安関連行動の増強は, 両側総頸動脈閉塞中にNRCを静脈内に投与することによって, 偽手術群のレベルまで抑制された。これらの結果は, 脳循環不全後の機能障害に対する治療戦略としての人工酸素運搬体NRCの有用性を示唆するものである。

脳局所微小循環レベルにおける酸素代謝の光学的解析法

塚田孝祐¹⁾, 末松 誠¹⁾, 南谷晴之²⁾
慶應義塾大学医学部 医化学教室¹⁾,
慶應義塾大学理工学部 物理情報工学科²⁾

血液代替物の輸血において大脳皮質の酸素代謝を定量的に解析することは極めて重要である。そこで局所酸素代謝を定量解析するために脳微小循環の血流観察および微小血管の酸素分圧を計測し, さらにエネルギー代謝過程で電子供与体として機能する補酵素NADHの蛍光強度から組織酸素代謝レベルをイメージングする手法を提案した。さらにラットの脱血・返血蘇生モデルにおける脳循環動態と酸素代謝について実験的に検討したので報告する。

Wistar系雄性ラットをhalothane/nitrous oxide麻酔後, 大腿部の動静脈を確保し, 左頭頂部にclosed cranial windowを作製した。脳微小循環血流はFITC蛍光色素を選択的に赤血球に標識することで可視化し, オフラインで画像解析した。脳微小血管内の組織酸素分圧を非接触かつ局所的に計測するために, レーザ励起されたPd-ポルフィリンの酸素消光作用を利用した。NADH蛍光はUV光源を用いて中心波長340nmで脳表に照射し, 冷却CCDカメラで画像化した。またラットの全脳虚血モデルを作製し, 自己血輸血における各計測パラメータの変化を計測した。

急性出血性ショックおよび返血蘇生時の脳表微小循環動態, 酸素分圧およびNADH蛍光の経時的変化を計測した。計測開始5分後から1分間で血圧が40 mmHgに低下するまで脱血を行い, その2分後から返血蘇生を行った。脳血流と細静脈酸素分圧の低下は血圧とほぼ同様に低下した。また脳虚血によってNADH蛍光輝度が緩やかに増大し, 蘇生後baselineに回復した。以上より本計測系は脳局所酸素代謝の計測に有効であることが示された。

LIPOSOME-ENCAPSULATED HEMOGLOBIN LIMITS AREA OF CEREBRAL INFARCTION IN THE RAT

Akira T. Kawaguchi¹⁾, Munetaka Haida¹⁾, Hideo Tsukada²⁾, Yoshitaka Ogata³⁾
Tokai University¹⁾, Hamamatsu Photonics²⁾,
Terumo Corporation³⁾

Background. Treatment of cerebral infarction (CI) has been limited to indirect therapies aiming at reduction of edema or oxygen demand. We tested a hypothesis that liposome encapsulated hemoglobin (LEH) with a high ($P_{50}=10$ mmHg) or low ($P_{50}=45$ mmHg) oxygen affinity may ameliorate tissue hypoxia and limit ischemic damages in a photo-induced thrombosis (PIT) model of the middle cerebral artery in the rat.

Methods. LEHs were intravenously infused 1% of body weight 5 minutes after PIT occlusion of the right middle cerebral artery in SD rats. Twenty-four hours later, rats were killed and area of CI was determined in 6 frontal plane slices of the whole brain using TTC staining. Extent of CI was compared with control CI rats treated with the same amount of empty liposome solution.

Results. High- and low-oxygen affinity LEH were both effective in significantly reducing area of CI in the cortex but not in the basal ganglia as compared to CI rats receiving empty liposome solution. Extent of CI in the basal ganglia was comparable among CI rats regardless of treatment, suggesting consistent creation of CI by the PIT method. There was no significant difference in improvements between LEHs with a high- and a low-oxygen affinity.

Conclusion. Nanometer-sized LEH with a high- or low-oxygen affinity were effective in reducing area and/or extent of infarction mainly in the cerebral cortex after PIT occlusion of the middle cerebral artery in the rat.

LIPOSOME-ENCAPSULATED HEMOGLOBIN SUPPRESSES VULNERABILITY AND IMPROVES REVERSIBILITY OF VENTRICULAR FIBRILLATION IN ISCHEMIC CANINE MYOCARDIUM

Akira T. Kawaguchi¹⁾, Kazutane Usui¹⁾,
Teruhisa Tanabe¹⁾, Yoshitaka Ogata²⁾, Munetaka Haida¹⁾
Tokai University School of Medicine¹⁾, Terumo Co Ltd²⁾

Background. Liposome-Encapsulated Hemoglobin (NRC, Terumo Co, Ltd) has been modified to have a high O_2 -affinity ($P_{50}=10$ mmHg, hNRC) to increase O_2 delivery to hypoxic tissues such as ischemic myocardium. We hypothesize that targeted O_2 delivery by hNRC may suppress arrhythmogenicity and improve reversibility in canine myocardium under ischemia.

Methods. Empty liposome or hNRC (0.5% of body weight) was infused 5 minutes after occlusion of the left anterior descending artery (LAD) in open chest dogs. Ten minutes after LAD occlusion, programmed electric stimuli on the left ventricle were started to titrate vulnerability for ventricular fibrillation (VF). Once VF is induced, LAD occlusion is released and defibrillated by direct current cardioversion using 1, 3, 5, 7 and 10 J. Ten minutes after reperfusion, the same VF induction/reversal study was repeated using the alternate solution, empty liposome or hNRC.

Results. While hNRC increased VF threshold and decreased energy for defibrillation in each animal ($n=3$), empty liposome failed to change vulnerability or reversibility of VF in any of the animals ($n=3$) regardless of order of administration, empty liposome or hNRC.

Conclusion. Liposome-Encapsulated Hemoglobin with a high O_2 -affinity appears to be effective to suppress vulnerability, and improve reversibility of VF in ischemic canine myocardium. Optimal dose, timing and O_2 -affinity need to be defined.

投稿規定

本誌は、血液代替物開発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を集める。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。

執筆規定

ワープロを用いフロッピーによる投稿を原則とする。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) 原稿はワープロを用いて作成し、使用したソフト名を記載してフロッピーにより提出すること。その際、ハードコピー4部を添え右肩上に「論説」、「総説」、「原著」等を明記すること。オリジナルのソフトおよびテキストファイル形式でも保存し提出すること。
- 2) 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、英文所属、ついで筆頭著者の住所、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。
- 3) 総説、原著、および報告については、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。英文抄録は英文ワープロを用いて、別の「ABSTRACT」ファイルとしてハードコピーとともに提出しても構わない。
- 4) 句読点はコンマ(,)ピリオド(.)とする。
 - 5) 文中の英語は、Times, Helvetica, Courier, Symbol フォントを原則とし、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。
 - 6) 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。
 - 7) 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。本文ハードコピー上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。
 - 8) 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。

1. 太田和夫. 移植医療と社会. 医学のあゆみ 1993;164:442-6.
2. 砂本順三, 岩本 清, リポソームの調製, 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編, リポソーム, 東京: 南江堂, 1988:21-40.
3. Fowler SA, Andracki M, Hurst G, Honkan VA, Walder J, Casteel DA. Prolongation of the intravascular retention of hemoglobin modified with a long-chain fatty acid derivative. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 1994;22:27-42.
4. Reichert CM, Kelly VL, Macher AM. Pathologic features of AIDS. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS. Philadelphia: Lippincott, 1985; 111-60.
- 9) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。
- 10) 既発表の図表, その他を引用, 転載する場合には, あらかじめ版權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。

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。

編集委員会

武岡真司(委員長), 池淵研二, 津田良夫, 仲井邦彦, 福島昭二, 堀之内宏之, 宮尾秀樹, 村田満, 渡辺真純

日本血液代替物学会 会誌

発行 日本血液代替物学会

編集・制作「人工血液」編集委員会

印刷 株式会社 研恒社

人工血液 vol.12(2) 2004年7月1日発行

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部呼吸器外科内

TEL(03)5363-3493 FAX(03)5363-3499

〒169-8555 東京都新宿区大久保3-4-1

早稲田大学理工学部65-208室

TEL(03)5286-3217 FAX(03)3205-4740

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

TEL(03)3265-8961 FAX(03)3264-1995