

VOLUME 13
NUMBER 2
2005

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

第12回年次大会プログラム

The 12th Annual Meeting Program

人工血液

第 13 卷 第 2 号 2005 年 5 月

目 次

第12回年次大会プログラム	50
---------------------	----

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 13 No. 2 May, 2005

Contents

<i>The 12th Annual Meeting Program</i>	<i>50</i>
--	-----------

第12回日本血液代替物学会年次大会

The 12th Annual Meeting of
The Society of Blood Substitutes, Japan

大会長：武岡 真司（早稲田大学 理工学術院 教授）

会期：2005年6月6日(月), 7日(火)

会場：早稲田大学国際会議場3階 第1、第2会議室

東京都新宿区西早稲田1-20-14

組織委員：池田 久實 北海道赤十字血液センター 所長

池淵 研二 埼玉医科大 教授

川村 明夫 札幌北楡病院 理事長

北畠 顕 北海道大学 名誉教授

末松 誠 慶應義塾大学 医学部 教授

高折 益彦 東宝塚さとう病院 名誉院長

土田 英俊 早稲田大学 理工学部 名誉教授

西 勝英 肥後医育振興会 理事

湯浅 晋治 日本赤十字社 血液事業本部 血液事業経営会議委員

実行委員：小松 晃之 早稲田大学理工学総合研究センター 助教授

酒井 宏水 早稲田大学理工学総合研究センター 助教授

宗 慶太郎 早稲田大学理工学総合研究センター 講師

中川 晶人 早稲田大学理工学総合研究センター 助手

事務局：担当：岡村 陽介 阿閉 友保

新宿区大久保3-4-1

早稲田大学 理工学部 65-208室

Tel & fax : 03-5286-3217

年次大会 大会長 挨拶

日本血液代替物学会は、小さいながらも世界唯一の血液代替物を専門に取扱う学会であり、我が国独自の人工血液開発の先導役となって確実に歩みを続け、第12回年次大会を早稲田大学にて開催できることを心から光栄に感じております。

私は、日本血液代替物学会の発足当時から事務局として関与する貴重な経験をさせて頂き、血液の機能の一部を代替する製剤を取扱う領域は、正に医・薬・理・工学の境界であり、新しい領域を開拓する楽しさと、本当の意味での専門家は居ないのではないかという不安と困難さを感じていました。そして、国からの多角的な支援も頂きながら、効果のある安全性の高い製剤が漸く臨床に登場してくる段階となり、色々な方面からの期待も加わって本学会の存在意義と、果たさなければならない責任の大きさを痛感しております。本学会の活動は、主として年次大会の開催と会誌「人工血液」の発行であります。そして、会誌「人工血液」は年次大会の成果の記録でもあります。本年次大会が、多種多様な専門領域からの参加者を集め、発表者の成果を共有し、討論によって相互の理解を深めて今後の研究発展に繋がること願っております。

さて、本年次大会では、組織委員の先生方のご協力により、人工赤血球の開発企業から臨床を目指した開発状況とパネル討論、学会から提案される「人工酸素運搬体の製造に関するガイドンス」の解説と様々な立場の関係者によるパネル討論、ウイルス・プリオン対策、赤血球代替物の安全性と適応、血小板代替物、治療用抗体医薬、改良型赤血球製剤や幹細胞による血球誘導など、重要と思われるテーマは殆んど取り込むことができました。海外からの4名の招待講演者と2社のベンチャー企業からの発表も加わり、充実したプログラムとなりました。また、一般演題の申込みが多数あったため、急遽ポスターセッションを作った次第で、ポスターに回られた申込者の方には心よりお詫びを申し上げます。また、多くの若い研究者には参加のみならず、ポスターセッションにて発表と討論の機会を持って頂きたいとも考えました。口頭発表は、ワークショップや特別講演を除いて15分間ととても短く、充分なる討論はできないものと危惧しております。そこは、2日目の懇親会をどなたでも無料で参加できる会と致しましたので、是非発表者にコンタクトして、疑問の解決と懇親を深めて頂ければ幸いです。

最後に本年次大会の参加者全員が何かを得てお帰り頂き、自身のご研究に役立て頂ければ、主催者として大変嬉しく思います。

第12回 日本血液代替物学会年次大会
大会長 武岡 真司
(早稲田大学 理工学術院 教授)

お知らせとお願い

参加者の方へ

開場及び受付開始

開場、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10,500円（懇親会費を含む）です。

ネームカード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。

年会費及び新入会受付

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ください。

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。

懇親会

参加者相互の親睦を図るため、6月7日(火)午後6時00分よりリーガロイヤルホテル東京「ダイヤモンド2階」において懇親会を開催します。参加費は無料ですので、ぜひご参加下さい。

演題発表される方へ

口頭発表について

第12回日本血液代替物学会年次大会では、口頭発表はすべて液晶プロジェクターで行います。ご了承下さい。

1) メディアの持ち込み

発表用のパソコン（Windows XP）は事務局で用意します。CD-RあるいはUSBメモリーにて発表用Power Pointを受付けます（ご自身のパソコンは不可）。

2) 会場受付

発表1時間前には会場受付を済ませ、液晶プロジェクターの試写を行って下さい。

3) 発表時間

プログラムに丸印が付いている発表は、20分（発表17分、質疑3分）それ以外は、15分（発表12分、質疑応答3分）です。

ポスター発表について

第12回日本血液代替物学会年次大会では、ポスターセッションを設けることになりました。

1) 発表時間

ポスターの貼付は6月6日(月)12:00までをお願い致します。発表時間は6月6日(月)18:15~19:45(90分)であり、発表者はご自身のポスターの前に待機し参加者と活発な討論をお願い致します。

2) 発表方法

ポスター展示パネルの大きさは、横90cm、縦180cmです。講演題目、所属先、発表者名などは各自で作成し、ご持参下さい。発表番号（左上隅、横20cm、縦10cm）は事務局で準備致します。

各種会議日程

理事会	: 6月6日(月)	12:15~12:45	早稲田大学国際会議場 4階
評議員会	: 6月6日(月)	12:45~13:15	早稲田大学国際会議場 4階
総会	: 6月7日(火)	12:15~12:45	早稲田大学国際会議場 3階 第1会議室

学会事務局

〒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

第12回 日本血液代替物学会年次大会事務局

担当 岡村 陽介、阿閉 友保

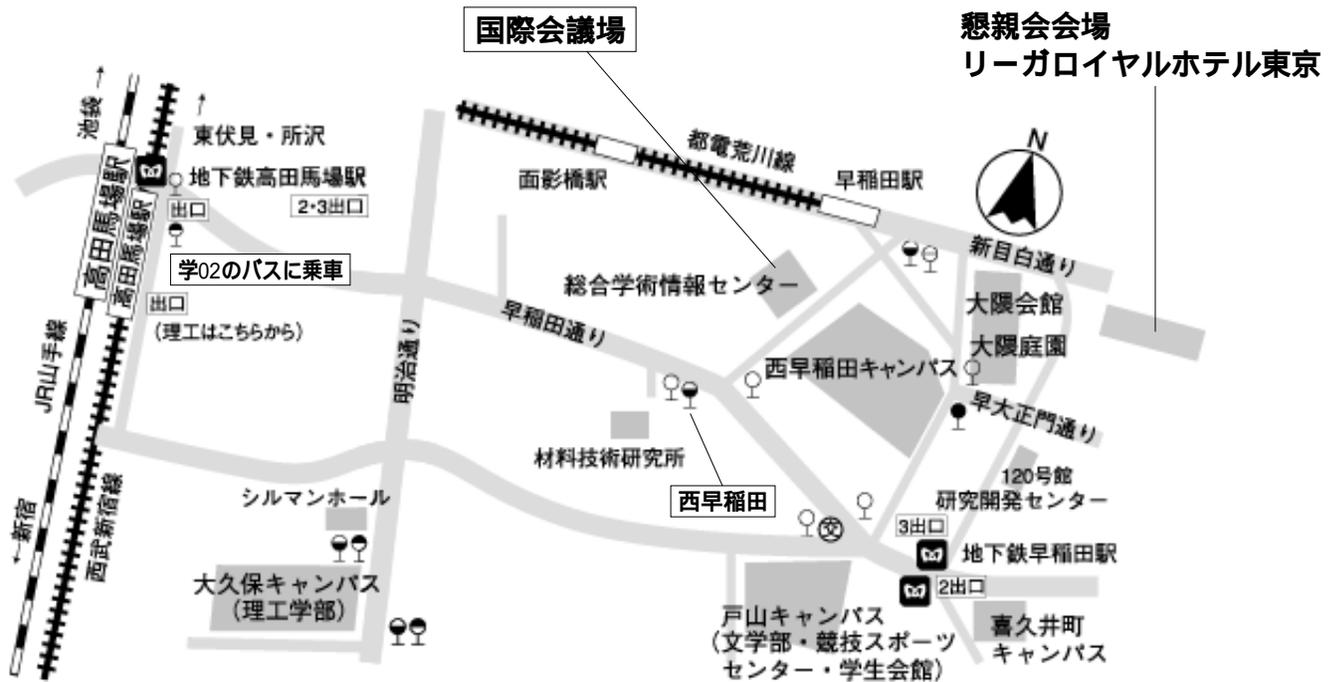
TEL & FAX 03-5286-3217

e-mail: info@blood-sub.jp

日 程 表

6月6日(月)	6月7日(火)
9:00 開会の辞	9:00 一般演題
9:20 ワークショップ 1. 臨床に向けた赤血球代替物の 開発動向	10:00 招待講演 1. 「Conjugate of Bovine Hemoglobin and Human Serum Albumin as a Candidate for Blood Substitute」 Su Z (中国科学院) 2. 「Preparation of Uniform Sized Microcapsules Containing Protein or Peptide Drug for Controlled Release」 Ma G (中国科学院) 3. 「Oxygen Transport and Release by Blood Substitute: Effect of Oxygen Affinity」 Intaglietta M (UCSD)
11:00 教育講演 1 「Blood Flow Regulatory Mechanisms in the Microcirculation and Blood Substitutes」 Johnson PC (UCSD)	11:10 ワークショップ 3. ウイルス・プリオン対策
11:30 大会長講演 「分子集合科学を利用した人工血液の創製」 武岡 真司(早大理工)	
12:10 理事会(昼食) 評議員会	12:10 総会(昼食) (第39回「人工血液」編集委員会)
13:30 会長講演 「人工酸素運搬体の製造に関するガイド ラインの策定 = 血液代替物学会の取り組みと役割 =」 小林 統一(慶大医)	13:30 教育講演 2 「付加価値赤血球製剤への期待と展望」 末松 誠(慶大医)
14:00 ワークショップ 2. 人工酸素運搬体の製造に関する パネル討論	14:00 シンポジウム 3. 血小板代替物
15:55 シンポジウム 1. 赤血球代替物の安全性	16:00 教育講演 3 「幹細胞から血球細胞の誘導」 千葉 滋(東大病院)
17:10 シンポジウム2 2. 赤血球代替物の適応	16:30 シンポジウム 4 4. 抗体医薬など蛋白質製剤の開発
18:10	17:35 閉会の辞
18:15 ポスターセッション(第2会議室)	18:00 懇親会

交通案内図



JR山手線 高田馬場駅より 徒歩20分

西武池袋線 高田馬場駅より 徒歩20分

東京メトロ 東西線 早稲田駅より 徒歩5分

都電荒川線 早稲田駅より 徒歩5分

〔都営バス〕(高田馬場駅より)

学02 早大正門行きのバスに乗り

「西早稲田」下車 徒歩3分

6月6日(月)

． 午前の部

9：00～9：20 開会

9：20～11：00 ワークショップ 1．臨床に向けた赤血球代替物の開発動向
(司会：阿岸 鉄三, 川村 明夫)

W-1 「MalPEG-hemoglobin (MP4) Improves Hemodynamics, Acid-base Status, and Survival After Uncontrolled Hemorrhage in Anesthetized Swine」(Winslow RM, Sangart)

W-2 「ナノカプセル型人工酸素運搬体の開発状況」 (緒方 嘉貴, テルモ(株))

W-3 「ヒトヘモグロビン小胞体開発の新局面」 (高木 智史, (株)オキシジェニクス)

W-4 「人工酸素運搬体の大量製造への取り組み」 (甲斐 俊哉, ニプロ(株))

パネル討論 (30分間)

11：00～11：30 教育講演 1． (座長：末松 誠)

「Blood Flow Regulatory Mechanisms in the Microcirculation and Blood Substitutes」
(Johnson PC, UCSD)

11：30～12：10 大会長講演 (座長：土田 英俊)
「分子集合科学を利用した人工血液の創製」(武岡 真司, 早大理工)

12：10～13：30 昼食
(12：15～12：45 理事会、12：45～13：15 評議員会)

． 午後の部

13：30～14：00 会長講演 (座長：酒井 清孝)

「人工酸素運搬体の製造に関するガイドラインの策定 = 血液代替物学会の取り組みと役割 =」
(小林 紘一, 慶大医)

14：00～15：40 ワークショップ 2．人工酸素運搬体の製造に関するパネル討論
(司会：高折 益彦, 武岡 真司)

W-5 「製造に関するガイダンス」(高折 益彦, 東宝塚さとう病院)
パネラー
薬事：小澤 建夫(バイオアクセラレーター(株))、川上 浩司(東大大医)
企業：緒方 嘉貴(テルモ(株))、松浦 昭宏((株)オキシジェニクス)
医学：川口 章(東海大医)、堀之内 宏久(慶大医)

15:55~17:10 シンポジウム 1. 赤血球代替物の安全性 (座長: 小林 統一)

- S-1 「リポソーム封入ヘモグロビン(TRM645)のヒト免疫機能に及ぼす影響: ヒト免疫系再構築マウス(NOG)における検討」(川口 章, 東海大医)
- S-2 「Hb小胞体が免疫系に及ぼす影響について」(池田 久寛, 東 寛, 北海道赤十字BC)
- S-3 「マウスにおけるHb小胞体の血中滞留性と組織移行性について」(安楽 誠, 熊大医薬研)
- S-4 「Hb小胞体による50%出血ショック蘇生後の回復過程」(酒井 宏水, 早大理工総研)
- S-5 「ウサギ出血性ショックモデルに対する人工赤血球投与後の臓器酸素分圧と血漿浸透圧への影響」(寺嶋 克幸, 日本医大)

17:10~18:10 シンポジウム 2. 赤血球代替物の適応 (座長: 饗庭 了)

- S-6 「人工酸素運搬体による腫瘍酸素加と放射線治療効果増強について -実験的検討-」(堀之内 宏久, 慶大医)
- S-7 「ラット摘出還流心臓での虚血 再還流障害に対するHb小胞体の保護効果」(加藤 隆一, 防衛医大)
- S-8 「人工心肺による体外循環モデルと人工赤血球による充填効果」(山崎 真敬, 慶大医)
- S-9 「リポソーム封入ヘモグロビンの発症後投与はサル脳虚血再還流障害を緩和する - PETを用いた酸素動態の検討 -」(川口 章, 東海大医)

夕方の部

18:15~19:45 ポスターセッション (第2会議室) (進行: 武岡 真司)

6月7日(火)

． 午前の部

9：00～10：00 一般演題 （座長：堀之内 宏久）

- G-1 「部位特異的アミノ酸置換を利用した新しいアルブミン - ヘムの合成と酸素結合」
(小松 晃之, 早大理工総研)
- G-2 「組換え型アルブミン二量体の体内動態特性について」(浦田 由紀乃, 熊大医薬研)
- G-3 「人工酸素運搬体ヘモグロビン小胞体による固形腫瘍の酸素化の試み」(泉 陽太郎, 慶大医)
- G-4 「低酸素親和性赤血球輸血による抗敗血症効果」(内山 智, (都)老人研)

10：00～10：20 招待講演 1． （座長：小松 晃之）

「Conjugate of Bovine Hemoglobin and Human Serum Albumin as a Candidate for Blood Substitute」(Su Z, 中国科学院)

10：20～10：40 招待講演 2． （座長：宗 慶太郎）

「Preparation of Uniform Sized Microcapsules Containing Protein or Peptide Drug for Controlled Release」(Ma G, 中国科学院)

10：40～11：10 招待講演 3． （座長：酒井 宏水）

「Oxygen Transport and Release by Blood Substitute : Effect of Oxygen Affinity」
(Intaglietta M, UCSD)

11：10～12：10 ワークショップ 3． ウイルス・プリオン対策 （座長：清水 勝）

- W-6 「人工酸素運搬体とウイルス・プロセスバリデーション」(阿部 英樹, 北海道赤十字BC)
- W-7 「A New Assay for the Detection of Misfolded Prion Protein (PrPsc) in Blood」
(Rudolph AS, Adlyfe Inc.)

討論 (20分間)

12：10～13：30 昼食
(12：15～12：45 総会)

午後の部

13:30~14:00 教育講演 2. (座長: 土田 英俊)

「付加価値赤血球製剤への期待と展望」(末松 誠, 慶大医)

14:00~15:50 シンポジウム 3. 血小板代替物 (座長: 池田 康夫, 武岡 真司)

S-10 「人工血小板の開発状況(総論)」(池田 康夫, 慶大医)

S-11 「rGPIb リポソームの機能評価」(斉藤 浩, 三菱ウェルファーマ(株))

S-12 「フィブリノーゲン 鎖C末端ドデカペプチド結合微粒子のin vitro, in vivo評価」(半田 誠, 慶大医)

S-13 「人工血小板H12結合アルブミン重合体の血小板凝集系における分布 -免疫電顕的検討-」
(鈴木 英紀, (都)臨床研)

S-14 「人工血小板の止血機能増強、血栓性におよぼすvon Willebrand因子 - GPIb およびコラーゲン受容体の作用の差異」(田村 典子, 東海大医)

S-15 「人工血小板の輸送と粘着のバイオメカニクス」(谷下 一夫, 慶大理工)

S-16 「Freeze-Dried Platelet Derivatives for Hemostatic and Growth Factor Application」
(Rudolph AS, Adlyfe Inc.)

16:00~16:30 教育講演 3. (座長: 池田 久實)

「幹細胞から血球を誘導する」(千葉 滋, 東大病院)

16:30~17:35 シンポジウム 4. 抗体医薬など蛋白質製剤の開発 (座長: 黒澤 良和)

S-17 (総論)「各種感染症に対する治療薬ヒト抗体の開発状況」(黒澤 良和, 藤田保健衛生大医)

S-18 「肝癌に対する治療薬としてのヒト抗体の開発状況」(杉岡 篤, 藤田保健衛生大医)

S-19 「血管炎治療のためのガンマグロブリンの人工化」(鈴木 和男, 国立感染研)

S-20 「CHO細胞で産生した遺伝子組換えヒトアンチトロンビンの性状解析」
(大井 英之, 三菱ウェルファーマ(株))

17:35~17:40 閉会の辞

18:00~20:00 懇親会

ポスタープログラム

平成17年6月6日(月)

夕方部

18:15~19:45 ポスターセッション (第2会議室) (進行:武岡 真司)

- P-1 リポソーム封入ヘモグロビンはラット脳梗塞(PITモデル)の梗塞領域を縮小する
(東海大学医学部) 川口 章
- P-2 リポソーム封入ヘモグロビンの創傷治癒促進効果
(東海大学医学部) 川口 章
- P-3 ヘモグロビン小胞体の単回投与1年後の血液生化学、組織病理学的検討
(早稲田大学理工総研) 酒井 宏水
- P-4 ポリエチレングリコール鎖を結合した両親媒性化合物によるリン脂質小胞体の表面修飾とヘモグロビン小胞体の安定化効果
(早稲田大学理工総研) 宗 慶太郎
- P-5 L-Tyr/metHb系によるHb小胞体のメト化抑制
(早稲田大学大学院理工学研究科) 阿閉 友保
- P-6 In vitroにおけるヘモグロビン小胞体の血小板活性化に対する影響
(北海道赤十字血液センター) 藤原 満博
- P-7 ヘモグロビン小胞体(HbV)がラット免疫系(脾臓細胞)に及ぼす影響
(北海道赤十字血液センター) 阿部 英樹
- P-8 ビーグル犬50%脱血ショックモデルにおけるHb小胞体の蘇生効果と安全性評価
(慶應義塾大学医学部外科) 山本 学
- P-9 新規な酸素結合サイト³型ヘムの合成とアルブミンヘムの酸素結合
(早稲田大学大学院理工学研究科) 飯塚 誠
- P-10 アルブミン-ヘムの静的構造とダイナミクス
(早稲田大学 理工学術院) 佐藤 高彰
- P-11 ポリエチレングリコール鎖で表面修飾したアルブミン-ヘムの酸素結合能
(早稲田大学理工総研) 中川 晶人
- P-12 ポリエチレングリコール鎖で表面修飾したアルブミン-ヘムの合成とその構造および溶液物性
(早稲田大学理工総研) 黄 宇彬
- P-13 麻酔下イヌ出血ショックモデルを用いた人工酸素輸液アルブミン-ヘムの酸素運搬能評価
(ニプロ株式会社) 山本 尚志
- P-14 Synthesis and O₂-Binding Properties of Albumin- Heme Having Covalently Linked GluFePs as O₂-Coordination Site
(早稲田大学理工総研) 王 栄民
- P-15 フィブリノーゲン鎖C末端ドデカペプチド結合担体の止血効果
(早稲田大学大学院理工学研究科) 岡村 陽介
- P-16 原子間力顕微鏡による人工血小板粘着におけるせん断依存性の評価
(慶應義塾大学大学院理工学研究科) 緒方 亜美
- P-17 rGPIb リポソームの集積性評価
(三菱ウェルファーマ株) 是永 真規
- P-18 人工血小板の粘着及び流動時における微視的挙動の評価
(慶應義塾大学大学院理工学研究科) 鈴木 健一
- P-19 PEG修飾アルブミン重合体へのH12ペプチド結合と止血能評価
(早稲田大学大学院理工学研究科) 藤枝 俊宣
- P-20 H12結合リン脂質小胞体の止血能評価
(早稲田大学大学院理工学研究科) 前川 一平
- P-21 光刺激応答性ガスキャリア液を用いた新規酸素濃縮器の開発
(早稲田大学大学院理工学研究科) 軽部 博泰

人工酸素運搬体の製造に関するガイドラインの策定 = 血液代替物学会の取り組みと役割 =

小林 紘一
慶應義塾大学医学部外科

酸素運搬の役割を担う赤血球の代替をする人工酸素運搬体の研究は40年以上にわたり熱心な研究者によって行われてきた。パーフルオロ化合物製剤の開発ではミドリ十字(株)が開発したFluosolがFDAでも認可を受け、臨床でも使用されたが、1994年に臨床現場から姿を消した。現在、欧米では修飾ヘモグロビンによるacellular type人工酸素運搬体の開発研究が盛んに行われ、一部は臨床治験が進められている。

人工酸素運搬体は現在使用されている薬剤とはまったく性格を異にしており、血液の代替として使用されることを前提とした物質の開発という点からは輸血と同等の機能と安全性が求められている。また、投与量の上限、投与スピードなどの設定は今後の課題と考えられている。

この状況下で米国FDAは現在まで、人工酸素運搬体製造と臨床応用に関わる基本姿勢と見通しについて数回文書を発表し、研究開発を行う研究者、企業に目標とすべき事項を明らかにしているが開発指針としてではなくFDAの考えを述べた文書にとどまっている。

本邦での人工酸素運搬体の開発研究は公的資金(厚生(労働)省、文部(科学)省)を背景として進んできた点に特徴がある。また、本邦に於ける人工酸素運搬体の開発研究のもうひとつの特徴として、リン脂質小胞体にヘモグロビンを内包したcellular type人工酸素運搬体の開発研究がある。FDAの発表した人工酸素運搬体製造にかかわる指針の中には、cellular type人工酸素運搬体開発の分野には適当でない部分もあり、cellular type人工酸素運搬体の製造、前臨床での検討項目等の指針については研究が進んでいる本邦で設定することが適当と考えられ、いわゆるMinimum Requirementと呼べるものを明らかにすることが重要であると考えられる。

本邦に於いて人工酸素運搬体開発研究の指針の策定を誰がいつ行うかということは大きな課題である。最近、複数の人工酸素運搬体開発グループが臨床応用を目指して開発を加速させており、指針を作るうえで最適の時期にあると考えられる。当学会は発足当初より人工血液の開発研究に対する研究発表・討議の場を提供してきた。人工酸素運搬体製造の指針の策定にあたっては複雑な利害が生じる可能性もあるが、当学会がAcademic consciencesを発揮して次世代の人々に残せる道標を策定するべきと考え、現在、理事会および理事会の諮問機関においてプレリミナリーな議論を進めている。当学会に於いて策定される指針は安全性に関する注意点が主体を占めると考えられるので、学会員を主体に学会以外の有識者を加えて検討し、学会の意見という形で公表すべきであると考えている。当然のことであるが、学会で策定した指針は一定の期間後に見直しをする、或は必要に応じて修正することとし、学会としての考え方を表明する形で世間に問うてゆくのがよいと考える。

臨床応用が始まる際には治験の形での検討が行われると考えられ、治験に入ってからつまづかないだけの安全性のデータを収集することが重要であるが、過重なデータ収集は開発スピードの抑制、治験の遅延につながるので一考を要する。

理事会で討議されている人工酸素運搬体に関する製造、安全性評価指針について概説するとともに当学会の果たす役割について述べる。

分子集合科学を利用した人工血液の創製

武岡 真司
早稲田大学理工学術院

我々の研究グループ(早稲田大学理工学総合研究センター酸素輸液プロジェクト 代表者 土田英俊)では、慶應義塾大学医学部(小林紘一教授、池田康夫教授、末松 誠教授、四津良平教授ほか)を中核とした医工連携体制をとって厚生労働省科学研究、医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業として、赤血球代替物と血小板代替物の開発研究を推進してきた。現在、これに開発を担当する企業が加わり産官学連携の組織で稼働している。

ここでは、「モノづくり」に徹した理工学的立場から人工血液(赤血球代替物、血小板代替物)の設計の考え方や現状について述べたい。赤血球代替物は、リン脂質の二分子膜小胞体(リボソーム)に酸素を酸素分圧に応じて吸収・脱着する分子(ヘモグロビン)を内包させた酸素運搬体(ヘモグロビン小胞体)であり、これが血中に長く留まって安全、安定に酸素運搬機能を発現し続ける製剤である。それに対して血小板代替物は、血管損傷部位や活性化した血小板のみを認識する分子をリボソームやアルブミン重合体に担持した微粒子であり、これが血中に長く留まって血管損傷部位に特異的に粘着して止血機能を発現する製剤である。担体には、高い血液適合性と適当な血中滞留性が求められるが、分解性や代謝物の毒性に対する検討も重要である。

ヘモグロビン小胞体は、ヘモグロビン分子の高純度精製とウイルス不活化、膜成分組成の厳選と高品質化(純度やエンドトキシン除去)、簡便かつ精密な分子集合制御による高濃度Hbの高効率な内包技術、ポリエチレングリコール(PEG)鎖による表面修飾技術、配位子制御による安定化技術の確立によって、安定製造が可能となり、企業への技術移転も既に終了している。期限切れ赤血球の安定供給と期限切れであるためスペックが幅広い赤血球からの安定なヘモグロビン精製が課題となっている。本製剤の安全性と機能や適応に関しては、本年次大会で充分議論されるのでここでは割愛する。通常のリボソーム製剤と比較して1000倍オーダーの投与量を想定した適応であるので、慎重で多角的な安全性の検討が必要であるが、これがクリアされればリボソーム製剤のブレイクスルーになるものと期待されている。

他方、血管損傷部位の認識能を担っている血小板膜蛋白質GPIb やGPIa/IIaや、血小板の一次凝集に関与するフィブリノーゲンの機能ペプチドを、PEG修飾リボソームやアルブミン重合体の表面に担持させることによって、止血能(血小板減少ラットの出血時間を有意に短縮)を有する製剤の創製に成功している。担体としてアルブミン重合体とリボソームの特徴を整理し、これらの認識部位の組合せ方法、担持方法、ずり速度に応じた製剤の設計などが工学系の研究課題となっている。

招待講演 1

Conjugate of Bovine Hemoglobin and Human Serum Albumin as a Candidate for Blood Substitute

Xiuling Lu, Guanghui Ma and Zhiguo Su^{*}
National Key Laboratory of Biochemical Engineering,
Institute of Process Engineering,
Chinese Academy of Sciences, P.O.Box 353, Beijing
100080, China
^{*}Correspondence: zgsu@home.ipe.ac.cn

Conjugate of bovine hemoglobin (bHb) and human serum albumin (HSA) was prepared. The reaction condition was optimised to give a product that was a mixture composed of 89.7% one-to-one Hb-HSA conjugate, 6.0% oligomer of Hb and HSA, 3.5% unconjugated HSA and 0.8% unconjugated Hb, with an average molecular weight of 157kD. The physicochemical characteristics determined were similar to that of blood. Effects of single replacement on blood pressure and long term survival of rats with 30% and 60% acute blood loss were studied, using Ringer-lactate solution, stroma-free hemoglobin (SFHb), 5% HSA in Ringer-lactate, whole blood and no resuscitation fluid as controls. Results showed that Hb-HSA conjugate maintained the mean arterial pressure of rats to initial level with no pressor effect. Effects of the replacement fluids on 30% bleeding rats showed that, for the group infused with Hb-HSA conjugate, histology of five major organs, heart, renal, liver, spleen and lung, were essentially normal, similar to that of whole blood, while obviously renal side-effects appeared in other groups. The efficacy of the conjugate was further demonstrated by the resuscitation of lethal hemorrhagic shock rats (60% acute blood loss) with 100% survival rate (followed for 14 days), the same result as whole blood. The Hb-HSA conjugate has been proved to be safe and effective by in vitro and in vivo experiments. The product has a potential to become a candidate of blood substitute.

招待講演 2

Preparation of uniform sized microcapsules containing protein or peptide drug for controlled release

Guanghai Ma et al.
National Key Laboratory of Bio-chemical Engineering,
Institute of Process Engineering, Chinese Academy of
Sciences

Micro-encapsulation and controlled release of protein drug is an important research field because the half-life time of protein drug is relatively short. The control of size and size distribution of microcapsule is necessary because they determine the bio-distribution and bio-availability of drug in the human body. It is difficult to obtain uniform sized microcapsules with good reproducibility by conventional preparative method. We developed a special membrane emulsification technique (MET) to prepare uniform sized polylactide (PLA) microcapsules, and chitosan microspheres containing protein or peptide drug.

A hydrophilic porous glass membrane with uniform pores was used. In the case of preparation of PLA microcapsule, water containing biomedicine was used as an internal water phase (W1), PLA dissolved in solvent was used as an oil phase (O). After W1/O primary emulsion was obtained by homogenizer, W1/O/W2 double emulsion was prepared by pressing the W1/O primary emulsion through the pores of the membrane into the external aqueous phase (W2) containing poly(vinyl alcohol) (PVA) stabilizer etc. Finally, the solvent was evaporated to obtain uniform microcapsule.

SEM photographs of PLA microcapsules prepared this new technique and conventional mechanical stirring method is compared in Fig.1. Apparently, the microcapsule prepared by the MET was very uniform and showed good dispersity. Further more, the encapsulation efficiency of drug was much higher in the former case, attained to 92%, while it is only around 50% in the latter case.

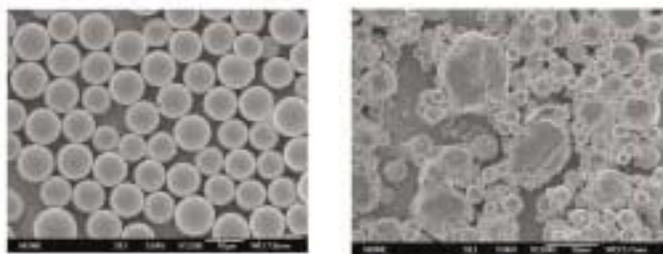
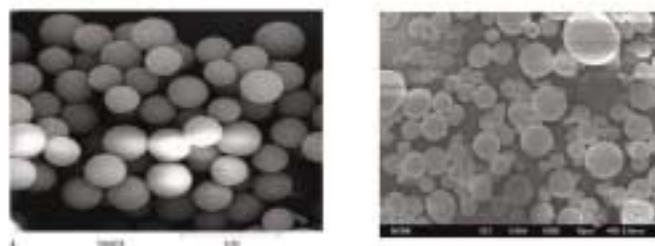


Fig.1 SEM photographs of PLA microcapsules prepared by membrane emulsification technique (left) and mechanical stirring method (right).

In the case of preparation of chitosan microsphere, the membrane was modified to hydrophobic at the first. Then, the chitosan aqueous phase containing drug was pressed through the pores of the membrane into the oil phase containing emulsifier to form uniform W/O emulsion. Finally, the chitosan aqueous droplet was solidified to form microsphere by a special method. By this technique, the diameter of chitosan microsphere can be controlled easily by changing the pores of the membrane, the microspheres with the size from 400 nm to 18mm can be obtained.

SEM photographs of chitosan microspheres prepared this new technique and conventional mechanical stirring method is compared in Fig.2. Apparently, the microspheres prepared by the MET was very uniform.



(a) Membrane emulsification technique (b) Mechanical stirring method

Fig.2 Chitosan microspheres prepared by membrane emulsification and mechanical stirring methods

The effect of preparative condition on the bio-activity and release behavior of bio-medicine was also studied.

For the preparation and applications of microspheres and microcapsules by the membrane emulsification technique, we have published more than 40 papers in international journals.

Oxygen transport and release by blood substitutes: Effect of oxygen affinity

Amy G. Tsai^{1,2}, Pedro Cabrales² and Marcos Intaglietta^{1,2}

1) Department of Bioengineering, University of California,
San Diego, La Jolla, California 92093

2) La Jolla Bioengineering Institute, La Jolla, California
92037

Hemoglobin based oxygen carrying blood substitutes deliver oxygen to the tissue in proportion to their concentration in blood. The release of their oxygen to the tissue, however, is determined by their affinity for oxygen. The microcirculation, the site where oxygen is delivered presents a longitudinal oxygen gradient such that blood pO_2 has near arterial values in the largest arterioles, and this falls to the tissue level in the capillaries. This gradient reverses in the venular circulation due to diffusional and convective shunts. Ease of oxygen release or low affinity of hemoglobin for oxygen causes oxygen to be delivered to the arterioles, thus oxygenating tissue regions with high oxygen content, to the detriment of regions with low pO_2 . High affinity hemoglobin has the opposite effect, discharging oxygen only in regions with low oxygen. Therefore high affinity hemoglobin self regulates the release of oxygen and leads to a uniform tissue oxygen distribution. Extreme hemodilution experiments with hemoglobin vesicles of low and high affinity show that the latter yields significantly higher tissue pO_2 . The tissue appears to locally consume oxygen in proportion to oxygen availability, thus over oxygenating the arterioles is counterproductive in terms of supplying oxygen to the tissue, and may elicit autoregulatory vasoconstriction. Vasoconstriction increases oxygen consumption by the microcirculation, lowers functional capillary density, and requires a greater concentration of oxygen carrier to attain adequate levels of tissue pO_2 . These considerations show that high oxygen affinity is advantageous for the formulation of hemoglobin based blood substitutes, since it leads to more uniform oxygen distribution, targeting anoxic regions, lowering vasoactivity, and reducing the amount oxygen carrier required.

This work was supported by USPHS-HLBI grants R01-HL76182 to AGT and R24-HL64395 and R01-HL62354 R01-HL62318 to MI.

Blood Flow Regulatory Mechanisms in the Microcirculation and Blood Substitutes.

P.C. Johnson, A.G. Tsai and M. Intaglietta.

Dept of Bioengineering, Univ.of California, San Diego, La
Jolla, CA 92093-0412

Blood flow regulation is the result of a complex interaction of a number of control mechanisms in the microcirculation that subserve different needs of the organism. Most obvious is the need for oxygen to satisfy the metabolic requirements of the tissue. Certain mechanisms are linked to the products of oxidative and anaerobic metabolism from the parenchymal cells. However the contribution of these mechanisms under resting conditions is not clear since oxygen delivery to most organs is well in excess of metabolic requirements and tissue PO_2 is 20-30 Torr. Other mechanisms such as NO, prostaglandins, adenosine and cytochrome P450 are linked to the PO_2 of the arteriolar wall and endothelium. Normal flow regulation also includes mechano-sensitive mechanisms such as the myogenic response to intra-arteriolar pressure and the endothelium response to wall shear stress. The myogenic response is one of the principal mechanisms of blood flow regulation. Wall shear stress provides a significant stimulus for both NO and prostaglandin synthesis in organs under resting conditions and exercise. Introduction of a circulating fluid with chemical and rheological properties different from whole blood may alter blood flow and oxygen delivery by changing the normal stimuli to one or more of the many individual mechanisms that regulate blood flow. The NO scavenging properties of hemoglobin, for example, limit its use in free solution. Changes in viscosity will introduce variable effects on wall shear stress and intravascular pressure in different regions of the vascular network. The ideal blood substitute would provide the same chemical environment in the lumen and physical stimuli to the vascular wall as provided by blood, considering the many control mechanisms based on these properties.

教育講演 2

付加価値赤血球製剤への期待と展望

末松 誠

慶應義塾大学医学部 医化学教室

赤血球は酸素濃度変化に応じて代謝のリモデリングを活発に行う細胞であることが最近明らかになりつつある。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hemoglobinが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つつ構造を変え、結果として赤血球が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することが明らかになった。低酸素による血管拡張反応は赤血球内のhemoglobinのSH修飾に伴いINO自身が(GS-NOのような形で)放出されて起こることがStamlerらにより報告されたが、この知見に対する異論も多い。赤血球を1分程度の低酸素に暴露すると解糖系が活性化しATP合成が活性化するとともに、細胞外にATPが放出される。この反応がhemoglobinをスイッチとして起きていることを示す証左として、COはその作用を阻害、NOは活性化し、いわゆるT-R transitionに伴う構造変化がhemoglobinが酸素センサーとして作用することの実体であることが示された。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。したがって酸素濃度の高低に関らず、酸素乖離能が高くATP放出の高いINO処理hemoglobinを有する赤血球は虚血性臓器障害の治療などへの応用が可能である。

教育講演 3

幹細胞から血球を誘導する

千葉 滋

東京大学医学部附属病院 無菌治療部

赤血球、血小板、白血球といった全ての血球は、造血幹細胞という種類の細胞に由来する。造血幹細胞は骨髄の海綿骨表面に生息し、自己複製を繰り返すことにより、自ら枯渇することなく、生涯にわたり血球を産生し続ける。1人の人は毎日2000億個もの赤血球を産生するが、これを産生するもとの造血幹細胞の総数は1億個くらいであろうと推定されることから、その能力の高さを推し計ることができる。このような幹細胞の持つ高い能力を利用して、体外で血球を自在に産生することができれば、輸血医療に抜本的な改革をもたらすことも可能であろう。造血幹細胞は、出生前後までは末梢血にも多数流れているため、造血幹細胞の医療応用にあたっては、臍帯血はいいソースとなる。

臍帯血造血幹細胞からの体外血球産生技術の中では、赤血球の産生技術がもっとも進んでいる。フランスのDouayらは、臍帯血造血幹細胞から大量に赤血球を量産する技術開発に取り組んでいる。最近の報告では、1人由来の臍帯血から、数単位分に相当する赤血球の産生が可能であったとしている。この赤血球は脱核しており、体内で産生された赤血球と同等の形態、変形能、酸素運搬能などを備えていた。

好中球輸血は、化学療法後などの好中球減少時の重症感染症などの際に有用な医療手段となりうるが、献血者からの供給体制が取られていない血球成分である。90年代以降、G-CSFなどのサイトカインをドナーに投与して好中球を採取することにより、十分な数の好中球投与が可能となり、この方法が感染症の改善や救命に有効であるという報告がなされはじめた。G-CSFを投与後に採取した好中球は、機能的にも活性化されているため有効なのではないか、とも議論されている。しかし、投与された好中球は時間の単位で血管内から姿を消し、有効性を期待するには1日に数回の投与が必要であるため、ドナーはもちろん、医療者側の負担も大きく、血縁者ドナーに頼ったままで一般的な医療手段とすることは困難である。もし臍帯血造血幹細胞から体外で自在に好中球の産生が可能になれば、これまで実現しなかった好中球輸血という医療手段が生まれる可能性がある。

本講演ではこの他、幹細胞から大量の血球産生する際の前提条件となる造血幹細胞や前駆細胞の体外増幅法について、われわれ自身の取り組みを紹介する。また、供給の面で究極の材料とされるES細胞からの血球産生についても触れる。

リポソーム封入ヘモグロビン(TRM645)のヒト免疫機能に及ぼす影響：ヒト免疫系再構築マウス(NOG)における検討

川口 章¹⁾, 亀谷 良江¹⁾, 酒井 晶子¹⁾, 灰田 宗孝¹⁾,
垣生 園子¹⁾, 緒方 嘉貴²⁾

1) 東海大学医学部

2) テルモ株式会社

Backgrounds. Safety evaluation in animals sometimes overlooks untoward effects in humans. Liposome-encapsulated hemoglobin (TRM645) is tested in mice reconstituted with human immune system as a preclinical safety evaluation.

Methods. Newly established immunodeficient mice (NOG) were transfused with 2×10^5 hematopoietic stem cells isolated from human cord blood. In those mice reconstituted with human immune system, changes in immunocompetent cells in peripheral blood, spleen and bone marrow were examined 2 days and 7 days after 1% body weight intravenous (iv) administration of TRM645 (n=8), empty liposome (n=8), and phosphate buffered saline (n=8) using immunohistochemical and flow-cytometrical techniques.

Results. While numbers of human CD4+ (helper T) cells, CD8+ (suppressor T) cells and CD19+ (B) cells in the spleen of mice receiving liposome (TRM645 or empty liposome) increased as compared to mice receiving saline 2 days after iv administration, the increase disappeared when studied 7 days after iv administration. All of these lymphocytes were in resting state so far as the expression of CD25 was examined (CD25(-)). Cellularity, distribution and maturation of these human cells in bone marrow or peripheral blood were comparable among the groups throughout the observation.

Conclusion. The increase of resting human lymphocytes in mouse spleen receiving liposome may suggest a non-specific response of natural metabolic pathway where liposome is captured and human (=homologous) hemoglobin degraded by the reticuloendothelial system. There was no apparent untoward effect of TRM645 per se in a short-term as these mice are all active and healthy before sacrifice. Studies on effects of repeated administration of TRM645 on long-term, and on active immunization in the "humane mice" are underway.

ヘモグロビン小胞体 (HbV) が免疫系に及ぼす影響について

池田 久實, 東 寛

北海道赤十字血液センター

我々はこれまでヘモグロビン小胞体 (HbV) の安全性について主としてヒト血液成分を用いた *in vitro* の検討を行ない、血漿凝固系、カリクレイン-キニン系、血小板機能にはほとんど影響を与えないことから、HbVには高い生体適合性のあることを報告してきた。しかしながら、この小胞体はあくまでも異物であり、生体内投与後速やかに脾臓や肝臓の網内系に取り込まれることから、生体防御機構への影響についても十分な検討が必要である。そこで、非特異的生体防御機構の一員としての好中球、補体系、そして特異的生体防御機構としての免疫担当細胞群への影響について順次検討を続けてきている。現在までに得られた結果についてその概要を述べる。

「好中球への影響」：f-MLP刺激に対する好中球走化運動およびそのMac-1分子の発現増強効果に対する影響を検討したが、特段に影響を認めなかった。従って、HbVと好中球との直接的な相互作用はないものと推定された。

「補体系への影響」：HbVは、ラットあるいはヒト血漿と混合しても補体を活性化しなかった。また、HbVを直接ラットに投与(iv)することによる血中の補体価の変動を検討したところ、投与3日後に一過性かつ軽度の補体価の低下を見た。HbVは *in vitro* では補体に影響を与えないことから、この低下は、補体の消費ではなく、補体の一過性の産生低下を反映していると考えられた。

「アナフィラキシー反応の誘導」：HbVをラットに間歇的に投与し、アナフィラキシー反応の出現の有無を検討した。卵白アルブミン(OVA)投与ラットは2回目の投与直後に全てショック死したが、HbV投与ラットには、3回目の投与においても特段の変化は認めなかった。

「免疫担当細胞への影響」：コンカナバリンA (Con A) 刺激による脾臓T細胞増殖反応は、HbV投与6時間後の細胞では高濃度Con Aに対する応答性は維持していたが、低濃度Con Aに対する応答性が顕著に低下した。応答性の低下は経時的に回復し、投与3日後の脾細胞では生食投与群と同等の反応性を示した。T細胞の活性化マーカー、サイトカイン産生能の検討から、T細胞の反応性の低下の原因は、T細胞が一過性のアナジー状態となることによると推定された。また、反応系にNOの産生を阻害する物質(L-NMMA)を添加しておくことでT細胞の反応性の低下は認められなくなる傾向のあることから、NOの産生がこの現象に関与していると考えられた。同様の現象が抗原刺激でも認められるのかを含め、今後はその詳細についての検討が必要である。

シンポジウム S-3

マウスにおけるヘモグロビン小胞体の血中滞留性と組織移行性について

安楽 誠¹⁾, 浦田 由紀乃¹⁾, 武岡 真司²⁾, 土田 英俊²⁾,
小田切 優樹¹⁾

- 1) 熊本大学大学院医学薬学研究所
- 2) 早稲田大学 理工学総合研究センター

【緒言】

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(以下HbV)が考案され,十分な酸素輸送能を発揮することが証明されてきた.しかし,この優れた機能を有するHbVについて,これまでにその体内動態特性の詳細は殆ど行われていない.このような背景の下,本研究は,有効性かつ安全性に優れた人工血液製剤の開発を目的として,¹²⁵I標識HbVのマウスにおける体内動態実験を行い,その半減期及び臓器クリアランス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.HbV投与液の調製は, IODO-GENを用い, ヨウ素標識HbV (¹²⁵I-HbV)を調製した.この方法によるラベル化効率は95%以上であった.マウスに投与後,経時的に開腹,採血し,組織を摘出後,各組織の放射活性をオートウェルガンマカウンターにより測定し, MULTIから半減期及び各臓器クリアランスを算出した.また,原子発光分析法による鉄濃度推移はマウスにおいて投与後,経時的に採血した血液中の鉄含量を原子発光分析法により算出した.

【結果及び考察】

1, 10, 200, 1400 mg/kg の投与量において体内動態特性を評価した.その結果,投与後72時間までのHbV消失半減期は,濃度依存的な延長に伴い, AUCの増加,全身クリアランス及び分布容積の低下が観察された.¹²⁵I-HbVの臓器移行性に関して,HbV1400 mg/kg投与後,72時間までの各臓器移行性を検討した結果,主に肝臓・脾臓への移行が観察された.そこで,肝臓・脾臓への濃度依存的な臓器移行性を評価した結果,濃度依存的な取り込み抑制が観察され,肝臓・脾臓の取り込み過程における受容体等を介した担体輸送の関与の可能性が示唆された.次に,主要臓器における取込みクリアランスを算出したところ,各臓器初期取込みクリアランスは,肝臓・脾臓において顕著な増大が認められた.また,濃度依存的な取り込みクリアランスを算出した結果,肝臓・脾臓においてのみ有意な取り込み抑制が観察され,受容体等を介した担体輸送の可能性が強く示唆された.さらに,¹²⁵I標識を利用したHbV体内動態評価の妥当性を検討するため,原子発光分析法による血中鉄濃度推移を測定した.その結果,1400mg/kg投与後72時間までの血中鉄濃度推移は¹²⁵I-HbVと同様の半減期を示し,¹²⁵Iを利用した標識HbV動態評価の妥当性が確認された.

シンポジウム S-4

ヘモグロビン小胞体による50%出血ショック蘇生後の回復過程

酒井 宏水¹⁾, 勢司 泰久²⁾, 佐藤 夏枝²⁾, 堀之内 宏久³⁾,
武岡 真司¹⁾, 土田 英俊¹⁾, 小林 紘一³⁾

- 1) 早稲田大学 理工学総合研究センター
- 2) オキシジェニクス(株)東京研究所
- 3) 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科

【目的】

ラット50%出血ショックモデルに対し,rHSAに分散させたHb小胞体(HbV/rHSA)の投与が蘇生効果を改善し,また循環動態を6時間安定に保持させることを明らかにしている(Crit. Care Med. 2004;32: 539-545).ここでは,その後の回復過程について最長14日間観察を行い,安全性に関する知見を得ることを目的とした.

【方法】

Wistar系ラット(, 体重240-310g)を吸入麻酔下(1.5% Sevoflurene),左大腿動静脈に挿管,循環血液量の50%を脱血し,15分後に同量の蘇生液を投与した.蘇生液は,HbV/rHSA(HbV suspended in rHSA, [Hb] = 8.6 g/dL), SAB (Shed autologous blood, [Hb] = 13.4 ± 2 g/dL), およびrHSA (recombinant human serum albumin, 5 g/dL)の三種類である.測定項目として,血圧,心拍数,血液ガス組成,Hctについて,脱血前,脱血後,投与直前,投与直後,1,3,6時間後に測定を行った.6時間後の測定を終了した後,大腿動静脈のカテーテルを外し縫合して覚醒させ,最長14日間生存させた.犠牲死させる際には,Sevoflurene吸入麻酔下,右大腿動脈に挿管し,同様の測定を実施した.

【結果および考察】

これまでに計38匹のラットを用いた試験を行った.脱血ショック状態としたところ,投与前に7匹が死亡し,残りの31匹について蘇生液の投与を実施した.HbV/rHSA投与群は18匹中15匹が1日以上生存,SAB投与群が10匹中8匹が生存,rHSA投与群では3匹中1匹が生存した.脱血後に血圧は約30 mmHgに低下するが,HbV/rHSAの投与によりほぼ脱血前の値にまで回復したのに対し,rHSAの投与では完全には回復しなかった.血液ガス組成は,脱血に伴う過呼吸とアシドーシス,嫌気性代謝による乳酸値の上昇と,血糖値の上昇が見られたが,投与により全群ともに回復し,その後安定した値を推移した.HbV/rHSA投与後に半減したHct値は,7日後には完全に回復したことから,造血機能に障害が無いと考えられた.

シンポジウム S-5

ウサギ出血性ショックモデルに対する人工赤血球の臓器酸素分圧と血漿浸透圧への影響

寺嶋 克幸, 杖下 隆哉, 小川 龍, 坂本 篤裕
日本医科大学大学院 疼痛制御麻酔科学分野

出血性ショックの患者に対して、細胞外液補充液やコロイド溶液は循環血漿量の補填の目的で投与されている。これらは、諸外国ではプレホスピタルケアの一つとして行われている。同種輸血は酸素運搬体の補填目的に行われるが、いくつかの施行前検査を必要とするため、ホスピタルケアとなるのが一般的である。Hemoglobin-Vesicles (HbV)は、人工酸素運搬体の一つであり、これらの検査を必要としないため、出血性ショック患者に対する緊急投与の可能性をもつ。今回我々は、出血性ショックモデルに対する大量HbV溶液投与の影響を、臓器酸素分圧、酸素消費量、血漿浸透圧の点から細胞外液補充液やアルブミン溶液と比較した。

方法：24匹のニュージーランドホワイト系統のウサギ（平均体重2.3 kg）を対象とした。人工呼吸/麻酔下に動脈より平均血圧が15分間30 - 35 mmHgとなる様に自然脱血し30分維持した。これらを4群に分け、a)脱血量と等量の乳酸リンゲル液(LR)、b)3倍の乳酸リンゲル液(3XLR)、c)等量の5%リコンビナントヒトアルブミン溶液(rHSA)、d)rHSAに分散したHbV溶液(rHSA/HbV)によって輸液蘇生された。脳・腎皮質と肝臓・骨格筋に酸素分圧プローブが挿入された。

結果：LRを用いた輸液蘇生では、その後の平均動脈圧や中心静脈圧が低下し、心係数も低下した。また、過剰塩基は低下し、血漿乳酸値は増加したままであった。静脈血酸素飽和度は、rHSA群とrHSA/HbV群で回復したが、rHSA/HbV群はLR群や3XLR群に比べ酸素消費量が高かった。脳や腎臓の酸素分圧もrHSA/HbV群で蘇生後早期より回復した。晶質浸透圧は4群とも変化が無かったが、膠質浸透圧はrHSA群とrHSA/HbV群で維持された。

考察：コロイド溶液は蘇生後の循環血漿量を維持し、蘇生後2時間の血行動態を安定させた。出血性ショックにおける細胞外液補充液は全身的な嫌気性代謝を改善しなかった。HbVの大量投与は血行動態に与える影響はわずかで、主要臓器の速やかな酸素分圧の改善をもたらした。また、酸素消費量の増加と好気性代謝への回復も速やかであったと考えられる。このような、人工酸素運搬体の蘇生効果は、出血性ショック患者に対して付加的価値をもたらす可能性があるかもしれない。

シンポジウム S-6

人工酸素運搬体による腫瘍酸素加と放射線治療効果増強について - 実験的検討 -

堀之内 宏久¹⁾, 山本 尚志¹⁾, 小林 紘一¹⁾, 小松 晃之²⁾,
土田 英俊²⁾

1) 慶應義塾大学医学部外科
2) 早稲田大学理工総研

【背景と目的】腫瘍細胞は低酸素環境下では放射線に対する感受性が低く、これが放射線治療の治療効率を下げる要因となっている。われわれが開発中の人工酸素運搬体アルブミン-ヘムが、腫瘍組織の酸素環境を改善し、放射線感受性を上昇させて照射の抗腫瘍効果を増強させることができるかどうかについて検討した。

【方法】Donryuラットに発生した腹水肝癌(LY-80)を用い、約 1×10^5 個をDonryuラット右大腿筋膜下に移植、腫瘍移植6日目に直径10mm \pm 2mmとなったのを確認し、頸動脈より腹部大動脈下端に挿入したポリエチレンカテーテルよりアルブミン、あるいはアルブミン-ヘム5mg/kg、10ml/kg、メト化したアルブミン-ヘムを2.5ml/minの速度で動注、動注直後に腫瘍局所に20Gyの照射を行った。対照群として治療を行なわない群、アルブミン、あるいはアルブミン-ヘムを投与し照射を行なわない群を設定した。それぞれの群について体重、腫瘍重量、生存日数を計測した。

【結果】照射開始後、治療を加えない群、アルブミン-ヘムを投与したのみの群では腫瘍の成長とともに体重の増加が抑制され、腫瘍移植後23日までに前例死亡を認めた。一方、照射群でも14日目より体重の増加に抑制がかかった。アルブミン-ヘムを投与後照射を行なった群では照射後体重の増加の抑制は認めず、24日まで体重の増加を認めた。腫瘍増殖抑制率は腫瘍移植後18日目で無処置群を100としたとき、照射群18.9アルブミン+照射20.2であるのに対し、アルブミン-ヘム+照射群では3.9と有意に腫瘍の成長を抑制していた。生存期間延長効果もアルブミン-ヘムに照射を加えた群で有意に延長が認められた。

【考察】動注による腫瘍組織の酸素加によって照射の感受性を上げることが可能であり、治療に応用できる可能性が示唆された。

シンポジウム S-7

ラット摘出灌流心臓での虚血-再灌流障害に対するヘモグロビン小胞体の保護効果

加藤 隆一, 別所 基明, 浜 御幸, 山岸 正, 柳田 茂樹,
楠原 正俊, 大鈴 文孝
防衛医科大学校 第1内科学教室

【目的】救急・災害医療に利用可能な人工赤血球として、細胞型のヘモグロビン小胞体(HbV)が有力な候補となっている。HbVを外傷時や出血時に緊急投与する際には、心臓への影響、特に虚血-再灌流時の心筋障害の発生への留意が必要となる。そこで、ラットの摘出心臓をランゲンドルフ灌流する方法を用いて、HbVが虚血-再灌流時の心機能にどのような効果をもたらすかを予備的に検討した。

【方法】9-12週齢のWistar系雄性ラットにヘパリン1000単位を腹腔内投与し、その10分後にキシラジン10 mg/Kgとケタミン90 mg/Kgを腹腔内投与して麻酔した。開胸して心臓を取り出し、直ちに氷冷したKrebs-Henseleit buffer (NaCl 116 mM, KC14.7 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.5 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, and glucose 11.0 mM) (KH-buffer)に投入し拍動を停止させた。大動脈にカニューレを挿入し、KH-bufferを用いて静水圧100 cmH₂O, 38 °Cでランゲンドルフ灌流した。KH-bufferは実験を通じて95% O₂ + 5% CO₂混合ガスを通気した。左心室にラテックスバルーンを挿入し、圧トランスデューサーを介して多チャンネル記録計に接続し、左室発生圧(LVDP)を連続的に記録して心機能の指標とした。HbVとHbを含まない空球小胞体(V)は、Hb濃度が0.33 g/dLになるようにそれぞれKH-bufferで希釈し、38 °Cに加温して95% O₂ + 5% CO₂混合ガスを通気した。約20分間KH-bufferでcontrol灌流を行った後、対照群、V群、HbV群の3群に分けて以下の実験を行った。対照群では、control灌流の後虚血30分-再灌流30分の処置を施した。V群とHbV群では、虚血30分-再灌流30分処置の前に、それぞれに対応する上記の希釈溶液を10分間灌流した。

【結果】 HbVとVは、10分間灌流してもLVDPにほとんど影響を与えなかった。対照群では、虚血30分後に30分再灌流しても心機能の回復は見られなかった。V群とHbV群では、虚血30分-再灌流30分後に明確な心機能の回復が見られたが、機能回復の程度において両群間にほとんど差はなかった。V群とHbV群では、灌流時間を短縮(5分)したり、Hb濃度を下げた(0.10 g/dL)場合、心機能を回復させる効果はわずかしが観察されなかった。

【考察】今回の実験結果から、HbVは何らかの心筋保護作用を持つであろうことが示唆された。ただ、Hbを含まない空球小胞体(V)を灌流した時にも同様の結果が得られたので、Hbの寄与がどの程度であるかは、今の段階では不明である。今後は、HbVとHbを含まない空球小胞体(V)の効果の差を明らかにするための実験と、両者の作用メカニズムあるいは作用経路を明らかにするための実験を計画したいと考えている。

シンポジウム S-8

人工心臓による体外循環モデル作成と人工赤血球による充填効果

山崎 真敬, 饗庭了, 四津 良平
慶應義塾大学 心臓血管外科

【目的】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、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。我々は人工赤血球(ヘモグロビン小胞体; HbV)を人工心肺回路の充填液に利用することで、運転中の血液希釈状態においても適正な酸素供給が可能であると考えた。

【対象と方法】SDラットを用いて慢性人工心肺モデルの作成を行った。ローラーポンプと特製膜型肺を用いて人工心肺回路を作成し、回路内に5%血清アルブミン製剤を充填した群、人工赤血球を充填した群、偽手術群に分けて実験を行った。体重450g前後のSDラットをセボフルレンにて全身麻酔し、14G静脈留置針にて気管内挿管した。挿管後人工呼吸器管理とした。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200ml/kg/minの流量で90分間行った。人工赤血球充填液のヘモグロビン濃度は8.6g/mLとした。人工心肺運転終了後は人工心肺回路内の残存血液を遠心分離し、沈殿した自己血を20分間かけて血管内に戻した。その後、カニューレを抜き、麻酔から覚醒させたのち、動物をゲージにて飼育した。術後1, 3, 5, 7日目に迷路試験を行い、術後7日目に動物は犠牲死させた。脳の組織を採取し、海馬部の病理学検査を行った。

【結果】5%血清アルブミン製剤を充填した群と人工赤血球を充填した群では前者の方が有意に死亡率が高かった。また迷路試験の結果からは5%血清アルブミン製剤を充填した群に関して高次脳機能障害が示唆された。第7病日に犠牲死させ、病理学的評価を施行したが全ての群で異常を認めなかった。

【結論】人工心肺回路の充填液に人工赤血球を用いたこの人工心肺モデルは十分実現可能であった。また人工赤血球を添加することにより得られる酸素運搬量の増大が高次脳機能の障害を軽減させる可能性に関して一定の知見を得た。

リポソーム封入ヘモグロビンの発症後投与はサル脳虚血再還流障害を緩和する - PETを用いた酸素動態の検討

川口 章¹⁾, 灰田 宗孝¹⁾, 塚田 秀夫²⁾, 緒方 嘉貴³⁾

- 1) 東海大学医学部
- 2) 浜松ホトニクス
- 3) テルモ株式会社

Background.

Treatment of cerebral infarction (CI) has been limited to indirect therapies aiming at reduction of edema or oxygen (O_2) demand. We tested a hypothesis that liposome encapsulated hemoglobin (LEH) with a high (hLEH, $P_{50}=10\text{mmHg}$) or low (lLEH, $P_{50}=45\text{mmHg}$) O_2 affinity may improve microcirculation, ameliorate tissue hypoxia and limit ischemic damages using positron emission tomography (PET) in the monkey undergoing middle cerebral artery (MCA) 3-hour occlusion followed by 3-hour reperfusion.

Methods.

Cerebral blood flow (CBF), O_2 extract fraction (OEF) and metabolic rate of O_2 (CMR) were studied by PET before ischemia, 2-hour later, immediately after reperfusion, and 3-hour after reperfusion. Immediately after MCA occlusion, hLEH (n=4), lLEH (n=4) and empty liposome (EL, n=4) 1% of body weight were intravenously infused. After PET study, integrated area of CI was determined in 6 frontal slices of the brain using TTC staining.

Results.

Despite infusion of LEHs immediately after MCA occlusion, there was no significant difference in O_2 metabolism up to 2 hour of ischemia. Immediately after reperfusion, CBF relatively decreased and OEF relatively increased in monkeys receiving LEH. 3-hour after reperfusion, area of mild to moderate CMR reduction (down to -30%) decreased (EL=64%, lLEH=46%, LEH=48%, $p<.05$) and area of mild to moderate CMR increase (up to 30%) increased in LEH-treated monkeys (EL=25%, lLEH=36%, hLEH=35%, $p<.05$) while there was no difference in area of severe reduction (<-30%) or severe increase (+30%) in CMR. TTC staining showed that LEH reduced area of CI mainly in the cerebral cortex (EL=27%, lLEH=13%, hLEH=12%) than in basal ganglia (EL=40%, lLEH=32%, hLEH=33%). There was no significant difference in improvements between lLEH and hLEH.

Conclusion.

LEH with a high- or low- O_2 affinity were effective in preserving CMR O_2 and in reducing area of infarction mainly in the cerebral cortex after occlusion/reperfusion of MCA in the monkey.

人工血小板の開発状況 (総論)

池田 康夫

慶應義塾大学医学部内科

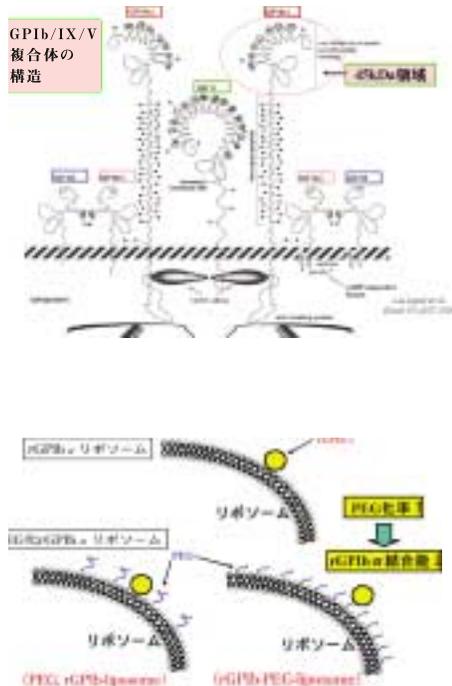
血小板輸血は欠くことの出来ない重要な治療法であるが、二つの大きな課題がある。一つはその需要の増加と血小板の短い保存期間(72時間)の為に起こる供給不足・緊急時供給体制の不備であり、もう一つはウィルス感染症をはじめとする輸血後副作用の発現である。これらの課題を解決し得る人工血小板(血小板代替物)の開発と臨床応用は、血液事業の効率化のみならず緊急災害時の備蓄の観点からも重要であり、21世紀の医療の当然目指すべき方向といえる。人工血小板の作製にあたっては、輸注されてもすぐ機能してはならない(流血中で勝手に血栓を作ってはならない)など難しい点も多い。具体的戦略としては、(1)代替物それ自身では十分な止血効果を得ることが出来なくても、生体に残存する血小板や凝固因子などを利用して止血効果を発揮させる、(2)出血している部位に特異的に集まりその部位に粘着する物質、粘着後それ自身が互いに凝集しあう物質、近傍に残存する正常血小板を巻き込んで凝集する物質、が考えられる。平成12年度から始まった厚生労働科学研究費補助金医薬安全総合事業「人工血小板開発研究」では、血管損害部位に特異的に集積し得る微粒子系が作成され、更に血管損害部位において生体内に残存する血小板をリクルートしてヒト血小板と凝集塊を形成しこれを促進させ得ることが、主にin vitro評価から実証された。また平成15年度に「認識部位担持リポソーム・アルブミン重合体の安全性と止血効果の評価」として新たに始まった研究班においては、それらの候補人工粒子が生体内で十分な止血機能を有し、しかも流血中では凝集塊・血栓形成や臓器障害を惹起しないことを確認するなど、止血能と同時に安全性の評価が課題とされている。血中投与可能な担体としては、リコンビナントヒト血清アルブミン(rHSA)を利用したアルブミン重合体(polyAlb)とリン脂質膜を利用したリポソームを対象とし、出血部位への認識能を付与させるために、血小板膜蛋白質(GPIb, GPIa/IIa)のリコンビナント体を担持させ、さらに出血部位へ粘着後に二次凝集塊を形成させるためにフィブリノゲンまたは対応する序列のペプチドを選択した。既にin vitroやin vivoで血小板機能や止血能を増強することが示されており、その将来に大きな期待がもたれる。

シンポジウム S-11

rGPIb リポソームの機能評価

斉藤 浩¹⁾, 是永 真規¹⁾, 野田 宗宏¹⁾, 岡村 陽介²⁾,
 武岡 真司²⁾, 土田 英俊³⁾, 半田 誠⁴⁾, 村田 満⁴⁾,
 横山 健次⁴⁾, 梶村 真弓⁴⁾, 末松 誠⁴⁾, 池田 康夫⁴⁾
 1) 三菱ウェルファーマ(株), 2) 早稲田大学大学院理工学研究科, 3) 早稲田大学理工総研, 4) 慶應義塾大学医学部

血小板膜蛋白質であるGPIbは、GPIb/IX/V複合体を形成しており、血小板の粘着に参与している。すなわち、血小板は血管に損傷が生じた際、表出する内皮下のコラーゲンに結合し、血流からのずり応力により構造変化したフォンビルブランド因子(vWF)とGPIbを介して結合・解離を繰り返す。これが一連の止血機構の引き金となる、いわゆる血小板のテザリング現象である。我々は、vWFとの結合部位であるGPIbに注目し、この組換え体(rGPIb)を大量製造した。これを生体適合性を有するリポソームに導入することにより、血小板代替物構築の可能性につき検討を進めている。rGPIbリポソームは血管損傷部位に存在するvWFへ結合することで集積し、残存するホストの血小板の血栓形成を補助する形で、また凝固系因子と連携する形で止血能を増強できるのではないかと期待している。本演題ではrGPIbリポソームのPEG修飾と粘着能、集積性に関する機能評価を中心にご紹介する。



シンポジウム S-12

フィブリノーゲン 鎖C末端ドデカペプチド結合 微粒子のin vitro, in vivo評価

半田 誠¹⁾, 岡村 陽介^{1,2)}, 武岡 真司²⁾, 池田 康夫¹⁾
 1) 慶應義塾大学医学部
 2) 早稲田大学大学院理工学研究科

【目的】止血機能を持つ微粒子の開発において、活性化血小板表面に発現されるGPIIb/IIIaを認識するフィブリノーゲン(Fbg)を担持させた微粒子は血小板を巻込んだ凝集塊の形成に有効であるものの、Fbgの不安定性とヒト由来である点が課題であった。そこで、Fbg鎖C末端アミノ酸配列(HHLGGAKQAGDV: H12)を、生体適合性を有する微粒子(アルブミン重合体(polyAlb), リン脂質小胞体(vesicle))に担持させ、in vitro流動状態下におけるH12認識能を評価した。さらに、血小板減少ラットを用いてin vivo止血能評価を行った。

【方法】架橋剤SPDPあるいは二官能性ポリエチレングリコール(PEG)にてH12をpolyAlb, vesicle表面に定量的に担持させた。血小板減少血液にH12結合微粒子を添加し、コラーゲン基板に対する血小板の粘着挙動を蛍光顕微鏡観察した(ずり速度150 s⁻¹)。ブスルファン投与(20 mg/kg)により作製した血小板減少ラット([PLT]=2.0 × 10⁶ / μL; 正常値の1/5)にH12微粒子を投与した後、尾先端から1cmの箇所を切開し(長さ2.5 mm, 深さ1 mm), その出血時間を計測した。

【結果及び考察】H12-polyAlbを血小板固定化基板上に流動させたところ、直ちに粘着し、H12未結合体、または抗GPIIb/IIIa抗体存在下では粘着が抑制されたことから、活性化血小板に対する特異的相互作用を確認した。血小板減少ラットにH12-polyAlbを投与したところ、出血時間は330 ± 73秒となり、生食(712 ± 131秒), polyAlb(723 ± 78秒)投与群と比較して出血時間を著しく短縮させた。続いて、H12-polyAlbの血中滞留時間の延長を図り、ポリエチレングリコール(PEG)を介してH12を担持させたH12-PEG-polyAlbを調製した。分子量5.0 kDaのPEG鎖にH12を結合させたH12-PEG-polyAlbでは血小板凝集能が保持され、PEG修飾型の血中滞留時間は、PEG未修飾体型に比べて約20倍延長できること明らかとなった。さらに、活性化血小板へのH12の特異的認識能はPEG鎖の付加で影響されないことを確認でき、血小板減少ラットの止血能評価より、このPEG修飾polyAlb(40 mg/kg)は投与後3時間経過しても止血能を保持していることを確認した。

他方、H12-PEG-vesicleも同様に、流動下において活性化血小板のみと特異的に結合し、血小板減少状態下でも血小板凝集を増幅させた。その凝集促進能は、H12導入率が0.3 mol%から0.6 mol%まではほとんど変わらなかったことから、0.3 mol%の導入率で充分であった。さらにH12-PEG-vesicleも投与量依存的に出血時間を短縮させたことから止血能を有する微粒子であることが確認できた。

人工血小板H12結合アルブミン重合体の血小板凝集系における分布-免疫電顕的検討-

鈴木 英紀¹⁾, 岡村 陽介²⁾, 武岡 真司²⁾, 池田 康夫³⁾

- 1) 東京都臨床医学総合研究所
- 2) 早稲田大学大学院理工学研究科
- 3) 慶応義塾大学医学部血液内科

血小板膜糖蛋白質GPIIb/IIIaを認識するフィブリノゲン鎖C末端のドデカペプチド(H12)を結合させたアルブミン重合体(H12-Alb)は, 血小板減少症状態下でも血小板凝集を促進させることをすでに報告した。今回, H12に対する家兎抗体を使う免疫電顕法でH12-Albの血小板凝集塊における分布を検討した。

【方法】3.8%クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として健康人の肘静脈から採血し, これを遠心して多血小板血漿 (PRP) を得た。1X10⁵/μl に調製したPRPを凝集計にセットし, そこにH12-Alb(0.2 mg/ml)を添加し, さらにADP(5 μM)を加えて凝集曲線を観察した。5分後, 凝集計のキュベット内に0.2%グルタルアルデヒド-8%パラホルムアルデヒド混合液を等量加えて試料を固定した。遠心後, ペレットをPBSで洗浄, 2.3Mショ糖に浸漬し, さらに液体窒素で凍結してその超薄切片を作製した。切片を家兎抗H12抗体, さらに金粒子(10 nm)標識ヤギ抗家兎抗体でインキュベート後, ウラン染色して透過型電顕で観察した。

【結果】前もってH12-Albを凍結超薄切片法またはネガティブ染色法で観察すると, H12-Albは直径0.2~0.4 μmの糸くず状に観察された。抗H12抗体で免疫染色した時, H12の存在を示す金粒子は, 決して多くはないが, 糸くず状構造の上に分布した。しかし, このH12-Albをウサギ抗フィブリノゲン抗体でインキュベートした時, 金粒子は全く分布しなかった。凝集実験では, コントロールのAlbの添加時にはADPを加えた1分以降に凝集が解離する曲線を示した。これを電顕で観察すると, 血小板は変形しているものの, 血小板相互の接着は粗で小凝集塊が形成されているに過ぎず, 血小板のほとんどの細胞質には顆粒が残存していた。一方, H12-Albを添加したADP凝集は, 約2分で平衡に達して解離のみられない曲線を描き, 凝集を促進させた。電顕観察では, ADP凝集像はコントロールに比してその塊が大きく, 血小板の変形度および相互の接着度も強かった。さらに顆粒が消失した放出反応像が見られた。免疫電顕法では, 無刺激血小板においてH12の存在を示す金粒子は顆粒膜上および開放小管系の膜上に僅かに検出された。一方, H12-Albを添加したADP凝集時では, 電子密度のある不定形物質が一部の凝集塊表面および血小板間に存在し, H12はこれに一致して検出された。

【結論】H12-Albは血小板減少症状態下の血小板凝集を促進させることを形態学的に確認した。H12-Albは決して多くはないが, 凝集している血小板間に検出されたことから, 本重合体はADP刺激によって活性化した血小板のGPIIb/IIIaに結合し, 血小板相互を接着させることによって凝集を促進させると考えられた。

人工血小板の止血機能増強, 血栓性におよぼす von Willebrand因子 - GPIb およびコラーゲン受容体の作用の差異

田村 典子¹⁾, 後藤 信哉¹⁾, 石田 英之²⁾, 武岡 真司³⁾, 岡村 陽介³⁾, 池田 康夫⁴⁾

- 1) 東海大学医学部内科学系, 2) 東海大学医学部基礎医学系, 3) 早稲田大学大学院理工学研究科, 4) 慶応義塾大学医学部

目的: アルブミン重合体に, 血小板表面上の各種受容体タンパク, あるいは血漿リガンドを結合させることにより止血機能増強効果を有する人工血小板を作成することを試みた。止血機能増強効果を血小板血栓の2次的広がりにより, 副作用として現れる血栓性の増強効果を血小板血栓の3次的成長を指標として評価した。

方法: 血管壁損傷部位への血小板の集積には, 損傷により暴露されたコラーゲンに対する受容体, コラーゲンに結合したvon Willebrand因子に対する受容体が重要な役割を果たす。そこで, 代表的なコラーゲン受容体であるGPIa/IIa, von Willebrand因子受容体であるGPIb, 血漿タンパクであるvon Willebrand因子を結合させたアルブミン重合体を作成した。止血, および血栓形成のモデルとして, 血管内皮損傷部位で血流に曝露されるマトリックスであるコラーゲンを固相化したガラス表面上に, 任意の壁すり速度の条件で全血を灌流するシステムを用いた。赤血球の存在下における血小板, 人工血小板の血栓のイメージングを可能にするためにアルブミン重合体および全血中のヒト血小板をFITCおよびFITC標識抗ヒトGPIIb/IIIa抗体にて蛍光標識した。出血を合併する血小板減少症のモデルとなるように採取した血液を遠心して血小板を取り除いた再構成血液を作成した。血液および再構成血液に各種アルブミン重合体を添加してコラーゲン上を灌流した。8分間の灌流後にコラーゲン上に形成された血小板血栓の大きさを2次的, 3次的に解析した。3次元イメージングに当たっては高速レーザー共焦点顕微鏡とピエゾモーターを用いた3次元投影イメージング法を用いた。

結果: コラーゲン, von Willebrand因子, GPIb を結合させたアルブミン重合体はいずれも再構成血液灌流時における血小板血栓の成長を促進させる効果を有した。GPIa/IIa結合アルブミン重合体が血小板血栓の2次的成長を効率的に促進したのに対して, von Willebrand因子, GPIb 結合アルブミン重合体は一カ所に集積して血栓の3次的成長をより効率的に促す効果を有した。3次的成長は血小板数を減少させない血液を用いた時に特に顕著であった。

総括: ヒト血小板受容体タンパクを結合させたアルブミン重合体は, 血小板数減少時における血小板血栓による止血を促進させる効果を有した。Von Willebrand因子およびその受容体であるGPIb を結合させた場合には, 血栓の3次的成長が促される結果, 血小板数の回復時に血管閉塞, 末梢血栓などの病的血栓を形成させるリスクが危惧された。ヒト血液を用いたex vivo実験結果からは, GPIa/IIa結合アルブミン重合体の人工血小板としての有用性が示唆された。

人工血小板の輸送と粘着のバイオメカニクス

藤田 英輝¹⁾, 鈴木 健一¹⁾, 緒方 亜美¹⁾, 田村 典子²⁾,
後藤 信哉²⁾, 武岡 真司³⁾, 池田 康夫⁴⁾, 谷下 一夫¹⁾
1) 慶應大学大学院理工学研究科, 2) 東海大学医学部,
3) 早稲田大学大学院理工学研究科, 4) 慶應大学医学部

血小板輸血は血小板減少症や血小板機能異常症が原因となつて起こる出血の治療や予防に対して唯一効果的な治療であり, これに代わる治療法は現在のところ存在しない。また, 血小板輸血は癌治療や, 外科手術においても欠くことの出来ない補助治療法として非常に重要な位置を占めている。しかし, 現在の血小板輸血には種々の問題があり, 人工的な血小板代替物の必要性が高まっている。

本研究では, 矩形管流路内での人工血小板の挙動及び粘着現象を観察し, 粒子の粘着現象, 管内での粒子の挙動を定量的に評価することで, 人工血小板の粘着・凝集能が発揮するための情報を得る。特にLatex-beads(LB)とvesicleの2種類のcarrierを用いることにより, 粒子の変形能の違いが「粘着能力」, 「血流中の濃度分布」, 「流れとは直角方向への移動能力」に対してどのような影響を与えるかを調べることを目的とする。

血小板代替物のモデルにはLBとvesicleをcarrierとして, 遺伝子組換えにより作成された血小板膜糖タンパク質であるrecombinant Glycoprotein Ib (rGPIb) を表面修飾したものをを用いた。これをヒトの血液より作成した赤血球ゴーストとともに1辺200 μm の矩形流路に流し, 人工血小板の挙動を観察した。得られた画像から, vWf表面(rGPIb のリガンド)に粘着する粒子の数(粘着能力), 流路内での濃度分布, 流れと垂直方向(壁面に向かうもしくは離れる方向)への粒子の動き(移動能力)を定量的に評価しcarrierによる違いを比較した。

rGPIb-vesicleはvWf壁面に対して粘着と乖離を繰り返し, 可逆的な反応を繰り返したのに対して, rGPIb-LBはvWfに粘着し不可逆的な反応が見られた。またrGPIb-LBはrGPIb-vesicleよりもvWf壁面近傍での粒子の濃度が高かった。流れと垂直方向の拡散係数に関してはrGPIb-vesicleの方が大きな値であり, 移動能力はrGPIb-vesicleの方が大きいということがわかった。

FREEZE-DRIED PLATELET DERIVATIVES FOR HEMOSTATIC AND GROWTH FACTOR APPLICATION

Alan S. Rudolph PhD MBA, David Ho PhD, Keith Moskowitz PhD, Ruth Sum and Cindy Orser PhD.
Adlyfe Inc. 9430 Key West Ave. Rockville, MD 20850

Platelets provide critical functions in the cessation of bleeding and in the initiation of key events in cellular and tissue repair and regeneration. We have developed novel methods to introduce stabilizing sugars into platelets that enable the freeze-dried stabilization and recovery of key platelet functions. Endocytotic loading of platelets with small molecular weight disaccharides such as trehalose can be achieved in an efficient process amenable to scale up and high throughput manufacturing. Standard freeze-drying protocols result in a dry powder that can be easily reconstituted for intravenous administration, or incorporated into bandages or dressings for application as a hemostatic or wound healing dressing. We have measured critical functions of the reconstituted materials which correlate to the clinical indication of choice. Measures of adhesion, activation, and aggregation of the platelet derived dry powder reveal similar functions as normal platelets. These include agonist response to thrombin and ristocetin, retention of cell surface markers (Gp1b and GPIIb/IIIa), and ability to adhere to collagen and fibrinogen. The platelet derivative materials are procoagulant and significantly reduce whole blood clotting times in vitro. We have also measured the growth factor content of the reconstituted platelet materials in cell based bioassays and are able to recover functional growth factors for application in wound healing and tissue regeneration. We have evaluated these materials in pre-clinical efficacy models in small animals. Application of our reconstituted platelet derivative materials in bleeding models shows substantial hemostatic activity and recovery of blood pressure in a rat aortic punch model compared to other hemostatic materials such as chitosan or inorganic zeolite. We have also demonstrated the topical administration of freeze-dried platelet powders in hard to heal incisional wounds in a diabetic mouse model which demonstrate increased granulation and closure of the wound compared to controls. We are currently evaluating manufacturing methods for clinical development and regulatory approval of freeze-dried platelet derivative products.

黒澤 良和

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所

我々は病原性ウイルス，病原菌が分泌する毒素，ヘビ毒に対してそれぞれ中和力を持つヒト抗体を単離調製することにより治療薬開発を目指して研究を進めている．数10名のヒト（扁桃，臍帯血，骨髄，末梢血）由来の巨大抗体ライブラリー(AIMS)から，水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)，ロタウイルスおよびジフテリア毒素，破傷風毒素に対する強い中和活性を示す抗体単離に成功した．抗VZV抗体および抗ジフテリア毒素抗体については，臨床試験を実施できる強力な性質を持つことが証明されている．ハブ毒に対する強い中和抗体を血清中に持つドナーの協力を得て，3Lの血液に相当するリンパ球から巨大抗体ライブラリーを作製してハブ毒の出血因子HR1を中和する抗体を得た．成分採血により個人から大量のリンパ球を得る戦略を見出したことから，新たな局面が開けた．トキシoidで免疫したヒトのリンパ球から作製した抗体ライブラリーより多数の抗ボツリヌス抗体を単離した．既にAIMSライブラリーよりインフルエンザウイルス中和抗体を5種類単離しているが，今回3名の小児科医(60歳，40歳，30歳)の協力を得て3組の巨大ライブラリーを作製した．小児科医は日々感染症患者に接しており（免疫されており），そこでそのライブラリーから抗インフルエンザ抗体を多数単離した．この中には，数10年のantigen driftによる変異の影響を受けずに広くインフルエンザウイルスを中和する抗体が含まれる．一方，日本人が感染した経験のないSARSウイルスに対しては，AIMSライブラリーをソースとして中和抗体を単離する技術開発に成功した．以上のように，多くの感染症に対して各々その性質に応じて治療用抗体を単離できる技術開発に成功したと判断している．

杉岡 篤

藤田保健衛生大学消化器外科(I)

【緒言】癌に対する抗体治療は特異的分子標的治療薬として期待されているが，癌特異抗原が同定されていないため，従来のハイブリドーマ法による抗体作製法で得られる癌に対する抗体は限られていた．現時点では固形癌に対する治療用抗体は臨床試験段階を含めても数種類に過ぎず，いずれも完全ヒト型抗体ではない．一方，ファージ・ディスプレイ法による抗体作製法では，膨大なファージ抗体クローンの中から標的抗原に対する抗体クローンを網羅的に単離し，完全ヒト型抗体として調製可能で，未知抗原に対する抗体も単離でき，単離された抗体から逆に標的抗原を同定できる．しかし，これまで固形癌に対する網羅的抗体単離法は確立されておらず，標的抗原を同定する方法も確立されていなかった．われわれは肝細胞癌を対象に，ファージ・ディスプレイ法を用いて未知癌抗原に対する網羅的単離法を確立し，標的抗原の同定法も確立したので報告する．

【方法と結果】

(1) ファージ・ディスプレイ法による肝細胞癌に対する特異抗体の網羅的単離法の確立

われわれのファージ・ディスプレイシステム(AIMS)は約1千億種類のファージ抗体クローンからなる巨大なライブラリーである．このライブラリーには理論的にすべてのヒト抗体クローンが含まれており，「既知の精製抗原」に対しては，通常のバイオパニング法によるスクリーニングでアフィニティーの高い抗体が網羅的に単離できる．しかし，固形癌などの「未知の未精製抗原」を用いると，回収クローンは少なくアフィニティーも低かった．この問題に対し，われわれは特殊な有機溶媒を用いて癌細胞膜上に結合した抗体クローンを一括回収する方法を開発した(Organic Screening)．さらに，first screeningで得られた抗体をsecond screeningで共存させることにより回収クローンの種類を増やすことにも成功した(Masking Method)．これらの技術革新により固形癌に対する抗体クローンの網羅的単離法がはじめて確立された(特願2003-406554)．

(2) 肝細胞癌に対する癌特異抗体クローンの選択

現在までに培養肝癌株と外科的切除材料を用いて3,215種類の肝臓に対する抗体クローンを単離した．CDR3シークエンス解析，免疫組織染色による選別過程を経て癌細胞膜上に局在する157種類の異なる新規癌特異抗体を単離した．検索したすべての肝細胞癌切除例において複数の癌特異抗体が得られていた．

(3) 癌特異抗体の標的抗原の同定法の確立

癌細胞膜のビオチン化と抗体ビーズ法により抗体が認識する標的抗原を精製した後，免疫沈降法を行った．得られたバンドを用いて3種類のプロトコールによる質量分析を行い，癌特異抗体の認識する抗原を同定した．癌特異抗原としてEGFR, IGSF4, α -actinin-1,4が同定され，その特異性を免疫電顕，強制発現系およびRNAiで確認した．特にIGSF4ではRNAiにより癌細胞の細胞死が認められ，癌細胞にとって必須の分子であり，抗体治療の標的分子となりうると考えられた．

【結語】ファージ・ディスプレイ法による癌特異抗体の網羅的単離法が確立され，肝臓に対して157種類の新規癌特異抗体が得られた．いずれも治療用抗体としての有用性が期待され，今後これらの抗体を駆使することにより肝臓に対する真のテーラーメイド医療が可能となると考えられる．

シンポジウム S-19

血管炎治療のためのガンマグロブリンの人工化

鈴木 和男

国立感染症研究所・生物活性物質部

【研究目的】大量ガンマグロブリン製剤治療 (IVIg) は難治性疾患の初期治療として必要性が増し、人工化が望まれている。大量発現させた本表品を用い、開発した病態モデル動物により薬効を評価する。また、人工化の臨床応用にむけ、IVIgによる良好な治療成績も得ている。

【研究方法】薬効評価：血管炎モデルマウスにより治療効果を判定する。

【結果と考察】臨床 = 血管炎へのIVIg施行で、早期の疾患活動性の抑制、腎死や感染症発症頻度の低下など有効な成績得た。人工化グロブリンは、大量発現ができ、可溶性の改良を行っている。また、血管炎誘導型モノクローナル抗体を作製した。モデルマウス = 1) 川崎病様血管炎モデルマウス: *Candida albicans* water soluble substances (CAWS) 誘導冠状動脈炎モデルマウス。 *C. albicans* の培養条件 pH により、収量、糖組成、構造、血管炎誘発活性が変化し、CAWS投与直後、末梢好中球数の増加と、その機能 (MPO放出、活性酸素産生能) が亢進した。2) SCG/Kj マウスおよびBSA誘導腎炎マウスの評価系もでき、MPO関連血管炎のモデルマウスとしての有用性が高い。IVIg治療効果 = CAWS誘導冠状動脈炎モデルマウスにおいて、IVIgにより発症頻度は有意に抑制された。劇症型心筋炎モデル = 難治性心筋炎や心不全の治療モデルとなる自己免疫性心筋炎をIg融合タンパクの遺伝子導入により著明に抑制された。

【結論】IVIg療法により、早期の疾患活動性の抑制、腎死や感染症発症頻度の低下などの有効な成績を得た。今回は、臨床に加え、モデルマウスでのIVIgの有意な抑制効果について報告し、人工ガンマグロブリンを改良点などについても発表する。さらに、その安全性の確保について検討した。

尚、本研究は、厚生労働科研費 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業「血管炎治療のための人工ポリクローナルグロブリン製剤の開発と安全性」) の分担者の研究成果に基づいている。

シンポジウム S-20

CHO細胞で生産した遺伝子組換えヒトアンチトロンビンの性状解析

大井 英之¹⁾、広瀬 正明¹⁾、望月 忍¹⁾、塚田 稔²⁾

1) 三菱ウェルファーマ株式会社 蛋白医薬研究所

2) 株式会社ベネシス 枚方研究所

アンチトロンビン (AT) は血液凝固の制御機構において主要な調節機能を担うセリンプロテアーゼインヒビターであり、ヒト血漿中に約150mg/Lの濃度で存在する。ヒト血漿由来AT (pAT) 製剤は主として日欧で播種性血管内凝固症候群 (DIC) に使用されている。我々は安全性の高い組換えAT (rAT) 製剤を開発するために、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞による発現系を構築し、哺乳動物由来蛋白質不含培地を用いて組換え細胞を培養することにより1g/Lを超える生産性を達成している (桑江, 第17回日本動物細胞工学会国際大会, 2004)。今回、培養上清からrATを高収率・高純度で精製する方法を構築し、精製されたrATの性状を解析したので報告する。

精製：カラムクロマトグラフィーと膜処理を組み合わせ弱アルカリpH下で精製することにより、純度99%以上で比活性がpATと同等のrATを調製した。

アミノ酸配列及び構造分析：rATのアミノ酸組成、N末端配列、ペプチドマッピング、CDスペクトルはいずれもpATと同等であった。

糖鎖分析：pATはN型糖鎖が4本付加した型が93%の存在比であったが、rATには糖鎖が3本の型が45%存在した。また、rATの糖鎖非還元末端のシアル酸含有率は低く、還元末端にはフコースが高率に付加していた。

*in vitro*活性：トロンビン阻害に関するヘパリンコファクター活性及びヘパリン非存在下での進行型活性はrATとpATで同等であった。rATのヘパリン親和性はpATより高かった。

DICモデルでの効力：エンドトキシン又はトロンボプラスチン誘発したラットDICモデルにおいて、rATとpATは同等の効果を示した。

以上の結果から、rATはpATを置き換えうる組換え製剤としての性状を有していると判断している。

ワークショップ W-1

MalPEG-hemoglobin (MP4) improves hemodynamics, acid-base status, and survival after uncontrolled hemorrhage in anesthetized swine.

Robert M. Winslow, MD^{1,2}, Mark A. Young, PhD¹, Louis Riddez, MD, PhD^{3,5}, B. Thomas Kjellstrom, MD, PhD^{4,5}, Jenny Bursell⁵, Ford Winslow¹, Jeff Lohman¹

1) Sangart, Inc., San Diego, CA, USA, 2) Department of Bioengineering, University of California San Diego, San Diego, CA, USA, 3) Department of Surgery, Karolinska Hospital, Stockholm, Sweden, 4) Department of Surgery, Karolinska Institute at Soder Hospital, Stockholm, Sweden, 5) Department of Defense Medicine, Swedish Defense Research Agency (FOI), Stockholm, Sweden

Financial Support and Disclosures: This work was supported by grants RO1 HL076163 and RO1 HL64395 from the NHLBI, and by Sangart, Inc. Dr. R. Winslow is President and CEO of Sangart, Inc. Dr. Young, Mr. Lohman, and Mr. F. Winslow are employees of Sangart, Inc.

MalPEG-hemoglobin, 4 g/dL (MP4), is a hemoglobin-based oxygen carrier with a low hemoglobin concentration, low P50, high colloid osmotic pressure, and high viscosity. This study evaluated resuscitation with MP4 in anesthetized swine hemorrhaged 250 mL by controlled withdrawal, followed by a 5 mm tear in the abdominal aorta. Four groups of pigs (n=7 each) were randomized after hemorrhage by aortic tear to receive 250 mL of MP4, Ringer's acetate (RA), 10% pentastarch (PS), or 4 g/dL stroma-free hemoglobin (SFH), followed by aortic repair and transfusion of 250 mL autologous blood. Endpoints were 20-hour survival, hemodynamic parameters, and acid-base status. Continuous aortic, pulmonary arterial, and central venous pressures, cardiac output by thermodilution, arterial and venous blood gases, electrolytes, lactate, base excess, oxygen delivery, consumption, and extraction ratio, hematocrit, hemoglobin, urine output. Body weight (24-27 kg) and hemorrhage volume (26-33 ml/kg) were similar in the 4 groups. The nadir of mean arterial pressure (22-28 mmHg), and the rise in lactic acid (5-8 mEq/L) after hemorrhage were similar in all groups, indicating equivalent shock in the 4 groups. Survival was greatest in the MP4-treated animals (6/7) compared with RA (2/7), PS (1/7) and SFH (2/7) and was accompanied by an improved recovery of arterial pressure, cardiac output, and lactate. Total hemoglobin concentration was equivalent in all groups. Arterial pressure did not rise above baseline values and systemic vascular resistance was unchanged following administration of MP4, indicating the lack of peripheral vasoconstriction. Mortality in RA, SFH and PS-treated animals was associated with deteriorating acid-base status, low urine output, and hyperkalemia. These data demonstrate that restoration of oxygen delivery with a small volume of MP4 yields significant recovery from hemorrhage without systemic vasoconstriction.

ワークショップ W-2

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

輸血は、現代の医療において必須の治療法の一つであるが、輸血用血液製剤の供給量は献血者数に依存しており、高齢化社会の進行に伴う需給状態の変化が懸念されている。また、輸血医療は、副作用、合併症、過誤輸血、感染症等の問題も内在している。現在、輸血の安全性は大幅に向上してきているが、今後、需給リスクや新たな輸血リスクが問題視される可能性も否定できない。そのため、これらの問題の解決手段の一つとなり、現行の輸血医療を補助する製剤として、血液代替物の開発には期待が持たれている。長期保存が可能で、血液型がなく、輸血副作用や感染症のリスクを回避し得る、赤血球製剤の代替物については、これまでも研究開発に多くの時間が費やされてきたが、開発中止となった事例も多く、何れも、未だ開発の途上にある。

我々は、米国で開発が先行している、人工酸素運搬体の問題を解決し得る方法として、ヒト赤血球由来のヘモグロビン(Hb)をナノサイズの脂質カプセル内に封入したナノカプセル型人工酸素運搬体の開発を行って来た。これまでに、効率の良いHbのカプセル内封技術、カプセル表面の修飾による生体内での安定性、安全性を向上させる技術、高効率に酸素を運搬するための技術、長期保存を可能にする技術等を開発し、製剤の処方設計を完了した。また、本製剤については、既に、脱血モデルを用いた試験においてその有効性(酸素運搬能力)と、複数の動物種による安全性を、予備的に確認しており、現在、第I相臨床試験実施に向け、治験用製剤として開発コードTRM-645の非臨床試験を実施中である。

なお、ナノカプセル型人工酸素運搬体製造技術の研究開発が、経済産業省の研究開発事業に取り上げられ、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製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、既に治験薬GMP製造設備が完成し、現在バリデーションを行なっている。本プロジェクトの最終年度である本年度中にバリデーションを完了し、平成18年度には第I相臨床試験を開始予定である。本報告では、開発の現状、今後の予定と課題について報告させて頂く。

ヒトヘモグロビン小胞体開発の新局面

高木 智史
株式会社オキシジェニクス

1980年代より早稲田大学工学部の土田，武岡らによって始められた人工酸素運搬体（ヒトヘモグロビン小胞体；HbV）の開発は，1990年代に慶應義塾大学医学部の小林，末松らがさらに参画し，処方最適化，製剤規格の設定がなされ，効果・安全性も確認された．2002年より両大学からstart-upした株式会社オキシジェニクスも加わり，これまで両大学の共同研究で蓄積された膨大な技術，データを基に医薬品としての実用化に向けた舵取りがなされた．すなわち，HbVの形状，ヘモグロビン純度等の物性データ，安全性，体内滞留性，体内動態，酸素運搬能等の生物学的データより，単回投与での救命救急の酸素輸液としての実用化の目的が立ったと判断された．

HbVは，期限切れヒト赤血球由来の精製ヘモグロビンを直径約250nmの均一球径の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る．またHbVは，ウイルスなどの感染源を不活化除去処理し，且つ膜成分組成や表面修飾の工夫により物理化学的安定度を確保して，室温での長期安定，血中滞留寿命の延長と共に血液型不適合のない人工酸素運搬体として，医療現場の要求に十分対応可能なものと考えられた．予備試験ではあるがすでに霊長類およびげっ歯類を使用した安全性検証を行い，またイヌおよびラット等を用いた種々の病態を想定した薬理試験により薬効が確認されている．その結果この製剤を使用するGLP基準非臨床試験，GMP試料によるヒト臨床試験という開発の方向性が確定された．一方製造については，早稲田大学の指導の下オキシジェニクス社による安定したHbV製造法が確立し，さらに大量製造へ向けてニプロ株式会社と協力して工業化を推し進めており，また臨床における安全性および効果を実証するための準備も着実に進行している．

2004年秋に米国食品医薬品局（FDA）より試案として赤血球代替物のガイダンス（Criteria for Safety and Efficacy Evaluation of Oxygen Therapeutics as Red Blood Cell Substitute）が示され，赤血球代替物の特徴づけ，臨床適用が明示され，従来の血液代替から酸素治療薬としての存在意義を獲得したと考えられる．さらにこれら酸素治療薬は最優先審査承認制度（Fast Track）の対象になるとされており，まだ草稿段階とはいえFDAがこのようなガイダンスを出したことにより，人工血液開発は具体的な指針を得て新たな局面を迎えたと判断される．

人工酸素運搬体の大量製造への取り組み

甲斐 俊哉，木田 善規，福富 一平，帆足 洋平，片山 直久
ニプロ株式会社 医薬品研究所

少子高齢化の急速な進展に伴い，輸血用血液の安定供給に懸念があるとともに，輸血には依然として異型輸血やウイルス感染のリスクが大きな問題として残されている．また赤血球製剤は冷蔵保存で21日間という短い有効期限故に，災害に備えた備蓄面でも問題を抱えている．そこで，長期保存が可能で血液型に関係なく投与が可能であり，かつウイルス感染の危険性のない人工赤血球（人工酸素運搬体）の開発が強く望まれている．このような状況にあり，人工酸素運搬体の開発は厚生労働科学研究事業の中で，国家的施策として位置づけられており，官民を上げて様々な取り組みが行われている．

我々は，カプセル型人工酸素運搬体及び遺伝子組換えヒト血清アルブミンを利用した人工酸素運搬体の開発を推進している．既に動物実験において輸血代替物としての有効性はもとより，虚血性疾患への酸素供給体としての応用，あるいは腫瘍の酸素化による放射線治療の向上効果についてもその有用性を評価している．

また，開発の進展とともに最終的な製剤の大量製造方法の確立及び臨床応用（治験薬の製造）を可能とするパイロットプラントの設置が急務となっている．既に述べたように我々は数種類の人工酸素運搬体の開発を並行して行っているが，それぞれの製造方法には共通する重要工程がある．それらの各工程について大量製造への適応性の最終評価を進めている．現在，一度に60Lの最終製剤を得るために必要な最終ラインの設計をほぼ終了し，治験薬製造へ向けた準備を進めており，これら製造方法の概要について紹介するとともに今後の開発スケジュールについて報告する．

一方，カプセル型人工酸素運搬体はヒトの血液から抽出したヘモグロビンを使用するため，依然として原料供給に不安が残っている．そこで，カプセル化するヘモグロビンを遺伝子組換えヘモグロビンに置き換えるため，別途遺伝子組換えヒトヘモグロビンの発現についても検討中である．宿主として大腸菌と酵母を用いた独自の発現方法により，高効率に組換えヘモグロビンを生産する方法を見出すとともに，精製法についても目処が立っている．これらの方法は大量製造にも応用可能な方法であり，その概要についても紹介する．

ワークショップ W-6

人工酸素運搬体とウイルス・プロセスバリデーション

阿部 英樹, 東 寛, 池田 久實
北海道赤十字血液センター

現在開発中の人工酸素運搬体は、ヒトあるいはウシの赤血球に由来するヘモグロビンを加工して調製するものと、パーフルオロケミカルのような化学合成物質を用いるものに大別される。ヘモグロビンを原料とする場合、生物由来の感染性因子の混入に対する安全対策が、非常に重要となる。即ち、ヘモグロビン(天然体および組み替え体)を原料とする人工酸素運搬体の製造工程には、ウイルスの除去および不活化工程が組み込まれなければならない。

血漿分画製剤は、血漿から治療効果に必要な各種タンパク質を分離、精製、濃縮したものであり、その製造工程にはウイルス除去、不活化工程が組み込まれている。その工程は、ウイルス・プロセスバリデーションにより保証が行われている。ヘモグロビンを用いる人工酸素運搬体(HBOC; hemoglobin-based oxygen carrier)は、赤血球からヘモグロビンを分離、精製、加工して製造する。そのため、HBOCは赤血球分画製剤と考えることができる。HBOCには、原料の赤血球とは異なる保存性、使用特性、治療効果が期待されている。これらのことから、HBOCのウイルスに対する安全性確保には、血漿分画製剤のウイルス・バリデーションの概念を適応することが妥当であると考えられる。

HBOC製造工程への使用が考えられているウイルス安全対策として、加熱処理、有機溶剤・界面活性剤処理(S/D処理; solvent/detergent treatment)、ナノフィルトレーション、光増感処理などがある。それぞれの方法ごとに耐性を示すウイルスが存在する。血漿分画製剤の製造工程には、二つ以上の異なるウイルス不活化・除去工程について検討することが望ましいとされている。またGMPに準拠して、バリデーション可能な方法が望まれている。これらの点を踏まえて、HBOCのウイルス安全性対策を講じることが必要である。

ワークショップ W-7

A New Assay For The Detection Of Misfolded Prion Protein (PrP^{Sc}) In Blood.

Cindy Orser PhD, Tao Pan PhD, Jasmeet Sethi PhD, Craig Nelson, Pete Andreotti PhD, and Alan S. Rudolph PhD
MBA.

Adlyfe Inc. 9430 Key West Ave, Rockville, MD 20850

We have developed a new in vitro diagnostic assay for the rapid detection of misfolded prion protein (PrP^{Sc}) in blood. Small peptides structurally designed with fluorescent probes have been synthesized. Upon interaction with PrP^{Sc} in a blood sample, the peptides undergo a conformational change from alpha helix to beta sheet that mimics the folding reaction known to occur as PrP^C converts to the infectious and deleterious PrP^{Sc} (J. Biomolecular Structure and Dynamics 21:353-365 2003). The conformational change in the synthetic peptide is accompanied by formation of an excimer state of the fluorescent probes on the peptide which is easily monitored over the timecourse (30-180 minutes) of the reaction. Superior sensitivity of the assay is achieved due to signal amplification as additional peptides are recruited in solution to undergo a similar conformation change. This has enabled the detection of PrP^{Sc} in blood plasma and serum of animals infected with disease. In a controlled model of infection in hamsters, we have shown that this method can detect disease presymptomatically and considerably earlier than current ELISA or Western Blot tests which are currently unable to detect disease in blood. We have also demonstrated the detection of PrP^{Sc} in the blood of animals with endemic disease including Sheep Scrapie and BSE. The test is currently being optimized for large scale automated high throughput testing for PrP^{Sc} for live animal surveillance of disease as well as human blood screening for vCJD.

一般演題 G-1

部位特異的アミノ酸置換を利用した新しいアルブミン-ヘムの合成と酸素結合

小松 晃之, 土田 英俊
早稲田大学 理工学総合研究センター

ヒト血清アルブミン(HSA)は血漿蛋白質の約60 wt%を占める単純蛋白質であり, コロイド浸透圧調整のほか, 疎水性低分子を非特異的に包接・運搬する役割を担っている. メトヘモグロビン(metHb)から漏出したヘミンも, その多くはHSAにより捕捉される. 我々は, HSA-ヘミン錯体のX線結晶構造解析に成功し, ヘミンがHSAのサブドメインIB内にTyr-161との軸配位結合及びプロピオン酸側鎖と3つの塩基性アミノ酸残基(R 114, H146, K190)間との静電的相互作用により固定されていることを明らかにした.

HSAのヘム結合サイトは, 疎水性アミノ酸残基のみから構成されているので, ヘム鉄の配位圏内に近位塩基(His)が存在すれば, Hbやミオグロビン(Mb)のヘムポケットと同様なナノ分子空間が構築できるはずである. 今回, 部位特異的アミノ酸置換によりサブドメインIB内へHisを導入した組換えアルブミン[rHSA (mutant)]を産生し, それにプロトヘムIXを結合させた新しいアルブミン-ヘム[rHSA(mutant)-heme錯体]を合成, 酸素結合パラメータを算出するとともに, ヘムポケット構造と酸素結合能の相関を明らかにしたので報告する.

ヘム鉄に最も近距離にあるアミノ酸残基として, イソロイシン142 (I142), ロイシン185(L185)を選定. 遺伝子組換え法によりこれらをヒスチジン(His)へ変換したrHSA(I142H/Y161L), rHSA(L185H/Y161L)を産生した. rHSA(mutant)にヘミンを包接させ, rHSA(mutant)-heminを調製, 中心鉄(III)を還元するとイミダゾールが1つ結合したFe(II)5配位高スピン錯体(deoxy体)が得られ, Hisが中心鉄に軸配位していることがわかった. そこへ酸素を通気すると, スペクトルは速やかに酸素錯体型へと移行した.

rHSA(I142H/Y161L)-hemeの酸素親和性はMbに比べ1/35と低く($P_{1/2}$: 18 Torr), ヒト赤血球に近かった. 遠位ヒスチジンが存在しないため, Mbのヘムポケットに比べ低極性であり, これが大きな酸素解離速度定数の原因となり, 低い酸素親和性を与えたものと考えられる. また, 軸塩基(His)をヘム面に対して反対側のL185に導入したrHSA(L185H/Y161L)-hemeも酸素錯体を生成した. rHSA(mutant)-heme錯体の場合, ヘム面のどちら側に軸塩基を導入しても, 酸素錯体形成が可能であることは興味深い. これは, 天然ヘム蛋白質には見られない特徴で, アルブミン内に構築できるヘムポケットの構造自由度がきわめて高いことを示している.

一般演題 G-2

組換え型アルブミン二量体の体内動態特性について

浦田 由紀乃¹⁾, 安楽 誠¹⁾, 小松晃之²⁾, 土田 英俊²⁾,
小田切 優樹¹⁾

1) 熊本大学大学院医学薬学研究部
2) 早稲田大学 理工学総合研究センター

【緒言】

輸血に代わりうる人工酸素運搬体として組換え型ヒト血清アルブミン-ヘム複合体(rHSA-FeP)が開発され, 更に高濃度酸素輸送を目的として二量体化rHSA-FePが作製された. しかし, 現段階での二量体化rHSA-FePに関する検討は*in vitro*によるものであり, キャリア蛋白であるアルブミン二量体(Dimer)の体内動態に関する詳細な検討は殆ど行われていない. そこで本研究では, Dimerの体内動態について, 通常アルブミン(Monomer)と比較検討することにより, 将来的なDimerの製剤化を視野に入れ, 二量体化rHSA-FePの臨床応用につながるDimerの基礎的評価を行った.

【方法】

実験動物はddY系雄性マウス及びSD系雄性ラットを使用した. Dimer及びMonomer投与液として, ¹²⁵I-Dimer, ¹²⁵I-Monomer, また¹¹¹In-Dimer, ¹¹¹In-Monomerの2種類の標識体を調製した. マウス及びラットに投与後, 経時的に採血し, 組織を摘出後, 各組織の放射活性をオートウェルガンマカウンターを用いて測定し, MULTIIにより半減期及び各臓器クリアランスを算出した.

【結果及び考察】

Monomer及びDimerの¹²⁵I標識体をラットに急速静脈内投与し, 両者の生体内挙動を比較検討したところ, Dimerの消失半減期は約2倍延長し, 二量体化により血中滞留性が改善された. また, 48時間後の両者の組織内分布において, 皮膚, 筋肉へのDimerの移行が抑制されたことから, 二量体化による分子サイズの増大が血管透過性の抑制を惹起したものと考えられた. また, この傾向は, ¹¹¹In標識体においても確認された. さらに, Monomer及びDimerの詳細な臓器移行性を検討するため, ¹¹¹In標識体をマウスに急速静脈内投与後, 両者の臓器移行性について比較検討した. その結果, 主に肝臓, 腎臓への移行が観察されたものの, 二量体化による有意な取り込みの違いは観察されなかった. 一方, 皮膚, 筋肉への移行については, ラットと同様, 血管透過性抑制によるDimerの取り込み抑制が観察された. 以上の結果から, MonomerよりDimerを使用したrHSA-FeP複合体が, 大量の酸素を必要とする緊急時の輸血に対して, より有用である可能性が示唆された. 現在, 炎症やネフローゼ症候群モデルマウス及びラットを作製し, 病態時におけるDimerの体内動態について検討中であり, この結果についても併せて報告する.

一般演題 G-3

人工酸素運搬体ヘモグロビン小胞体による固形腫瘍の酸素化の試み

泉 陽太郎¹⁾, 山本 学¹⁾, 竹内 健¹⁾, 渡辺 真純¹⁾,
堀之内 宏久¹⁾, 寺村 裕治²⁾, 酒井 宏水²⁾, 武岡 真司²⁾,
土田 英俊²⁾, 小林 紘一¹⁾

- 1) 慶應義塾大学医学部呼吸器外科
- 2) 早稲田大学 理工学総合研究センター

背景：固形腫瘍の発育および転移には血管新生が必須であることがほぼ明らかとなりつつある。固形腫瘍は様々な機構により独自の血管を誘導していると考えられているが、現在までの研究でこれらの新生血管は形態的および機能的に正常組織の毛細血管とは異なっている点が多々見出されている。赤血球の主要な機能の一つに正常組織への酸素運搬があるが、腫瘍血管構築のなかでは赤血球は必ずしもその機能を十分に発揮できない可能性が考えられる。実際に腫瘍組織酸素分圧は正常組織と比べ有意に低下している。このような環境により腫瘍の悪性化の進行あるいは治療抵抗性が獲得される可能性が考えられている。今回我々は人工酸素運搬体として現在開発が進行しているヘモグロビン小胞体(HbV)が赤血球に比べてより効率的に腫瘍組織に酸素を運搬する可能性について検討した。

方法：動物種はC57/BLマウスを用いた。腫瘍はC57/BL由来の肺癌株Lewis肺癌を用いた。下肢大腿筋膜に腫瘍片を移植し、腫瘍径が約7mmに達した段階で実験を行った。腫瘍組織酸素分圧の測定は蛍光消滅法を応用したOxyspot法にて行った。麻酔下にマウス尾静脈を確保しポルフィリン誘導体を静注した。その後、移植腫瘍部分の皮膚を剥離し、腫瘍表面を露出した。この際表面の損傷や出血が見られた動物は除外した。試料はHbVとその分散液である生食を尾静脈比較した。腫瘍組織酸素分圧を試料投与前および投与後約30分間測定した。また筋組織酸素分圧を参考値として測定した。

結果：腫瘍組織酸素分圧は試料投与後約10分でHbV投与群において生食投与群に比べて有意に上昇した。その後徐々に低下し有意差は無くなった。

考察：HbVの全身投与により腫瘍組織酸素分圧が一過性ではあるが上昇する可能性が示唆された。腫瘍組織酸素分圧上昇の機序、治療法への応用の可能性などにつき今後検討が必要である。

一般演題 G-4

低酸素親和性赤血球輸血による抗敗血症効果

内山 智¹⁾, 黄 菲^{1,2)}, 野尻 英俊^{1,3)}, 清水 孝彦¹⁾, 白澤 卓二¹⁾

- 1) 東京都老人総合研究所分子老化研究グループ
- 2) 順天堂大学医学部麻酔科学講座
- 3) 順天堂大学医学部整形外科講座

Lipopolysaccharide (LPS)をはじめとする内毒素に誘発される敗血症は全身性の微小血栓形成により循環を阻害し、組織の血液供給を減らして全身の酸素不足状態を引き起こすことが知られている。我々は酸素を効率よく組織に供給できる低酸素親和性変異型ヘモグロビン-Hb Presbyterianに注目した。Presbyterian型ヘモグロビンを含有する低酸素親和性変異型赤血球をLPSに誘発された敗血症モデルマウスに輸血し、その抗敗血症の治療効果を検討した。

Presbyterian型ヘモグロビンを持つ遺伝子改変マウスから変異型赤血球を採取して精製した後、野生型マウスに輸血し、同時にLPSを投与して敗血症を誘発した。対照群は、別々に野生型赤血球とPBSを輸血し、同時にLPSによる敗血症を誘発した。処置マウスの生存を一週間観察した。肝細胞におけるApoptosisの程度もApotag法で評価した。

変異型赤血球輸血群はPBS輸血群より有意に生存率が高かった。野生型赤血球輸血群もPBS輸血群より生存率が高い傾向が見られたが、有意な差が認められなかった。変異型赤血球輸血群と野生型赤血球輸血群との比較で生存率の有意な差も認められなかった。肝細胞におけるApoptosisの程度は、変異型赤血球輸血群はほかの二対照群より有意に軽減された。野生型赤血球輸血群とPBS輸血群の間では有意な差が認められなかった。

変異型ヘモグロビンを持つモデルマウスのLPSに対する耐性も検討した。LPS投与後、一週間の生存率は変異型マウスと野生型マウスとの間で有意な差が認められなかった。

我々は、変異型ヘモグロビンを含有する低酸素親和性変異型赤血球を用いる輸血は敗血症に対して生存率を改善できると結論する。変異型ヘモグロビン自身は変異型生体の内毒素に対する耐性を高めない。その治療効果が輸血の処置に依存すると結論する。

本研究から、低酸素親和性の人工赤血球や人工血液代用品が開発され、敗血症の臨床輸血治療に応用される可能性が示唆された。

ポスターセッション P-1

リポソーム封入ヘモグロビンはラット脳梗塞 (PITモデル) の梗塞領域を縮小する

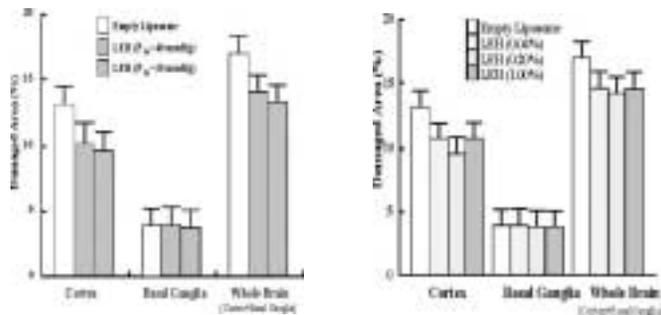
川口 章¹⁾, 福元 大²⁾, 塚田 秀夫²⁾, 灰田 宗孝¹⁾, 緒方 嘉貴³⁾

- 1) 東海大学医学部
- 2) 浜松ホトニクス
- 3) テルモ株式会社

Background. Treatment of cerebral infarction (CI) has been limited to indirect therapies aiming at reduction of edema or oxygen (O₂) demand. We tested a hypothesis that liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) with a high (P₅₀=10mmHg) or low (P₅₀=40mm Hg) O₂ affinity may improve microcirculation, ameliorate tissue hypoxia and limit ischemic damages using photo-induced thrombosis of the middle cerebral artery (MCA) in the rat (PIT model).

Methods. Cerebral infarction was made in rats by transorbital approach to middle cerebral artery, which was occluded by photo-induced thrombosis (PIT model). LEH and its diluted solution was administered after PIT occlusion of the MCA. These rats are killed 24 hours later and area of infarction was assessed by integrated area of CI in 6 frontal slices of the brain using TTC staining.

Results. LEH with a high and low O₂ affinity (1% of body weight) significantly reduced the extent of infarction as compared in rats receiving empty liposome or saline (Figure left). There was no significant difference with regard to O₂ affinity. A stepwise dilution of LEH (P₅₀=40 mmHg) revealed that protective effect was significant as low as 0.04% of body weight (Figure right) mainly in the cerebral cortex (impending infarction) rather than basal ganglia (core of infarction).



Conclusion. LEH with a high or low O₂ affinity in a small dose (0.04% of body weight) is effective in reducing area of cerebral infarction mainly in the cortex (ischemic penumbra) rather than basal ganglia after photo-induced thrombotic occlusion of the MCA in the rat (PIT model).

ポスターセッション P-2

リポソーム封入ヘモグロビンの創傷治癒促進効果

川口 章¹⁾, 岡本 祐一¹⁾, 木勢 佳史¹⁾, 幕内 康博¹⁾, 緒方 嘉貴²⁾

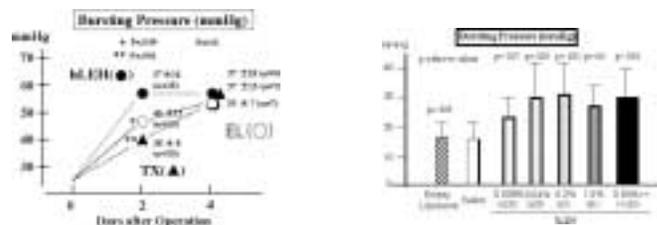
- 1) 東海大学医学部
- 2) テルモ株式会社

Backgrounds. Liposome-encapsulated hemoglobin with a high O₂ affinity (hLEH, P₅₀=10 mmHg) may allow efficient O₂ delivery to surgical wounds and accelerate its healing. We test this hypothesis in a rodent gastric wound healing model.

Method 1. One percent (1%) body weight of hLEH, empty liposome (EL) and homologous blood (TX) were intravenously given prior to 10 mm gastrotomy and anastomosis with 4 stitches in SD rats. Two and 4 days later, the whole stomach was excised and histological studies were performed after bursting pressure was determined by gradually inflating the stomach.

Method 2. hLEH repeatedly diluted by 5 times (1%, 0.2%, 0.04% and 0.008% of body weight) with saline to an aliquot of 1% of body weight (n=15) was intravenously infused before a similar gastrotomy - anastomosis model in SD rat. Two days later, histological studies were performed after bursting pressure was determined.

Results. Bursting pressure of the wound was significantly higher in rats receiving hLEH (1%) in 2 days as compared to animals receiving either transfusion or empty liposome. The difference disappeared in 4 days (Figure left). In stepwise dilution, bursting pressure was significantly higher in rats receiving hLEH higher than 0.04%, and non-significantly higher in rats receiving 0.008% of hLEH than animals receiving the same amount of saline or empty liposome (Figure Right). Histological examination revealed a good wound healing, little inflammation and accumulation of macrophages in hLEH-treated rats. Appearance of macrophage was also prominent in rats receiving empty liposome, suggesting liposome's outer capsule (lipid, PEG) attracts the tissue scavenger, but inflammation and delayed wound healing were similar to the animals receiving saline.



Conclusion. The results suggest that hLEH be effective in an amount as small as 0.04% of body weight to improve wound healing early after gastrotomy in the rat. Decreased inflammatory response may suggest improved microcirculation and efficient O₂ delivery to the wound as a possible mechanism. Optimal O₂-affinity, timing and amount of LEH need to be defined as a novel approach to improve surgical wound healing.

ポスターセッション P-3

ヘモグロビン小胞体の単回投与1年後の血液生化学，組織病理学的検討

酒井 宏水¹⁾，勢司 泰久²⁾，堀之内 宏久³⁾，池田 栄二³⁾，
武岡 真司¹⁾，土田 英俊¹⁾，小林 紘一³⁾

- 1) 早稲田大学 理工学総合研究センター
- 2) オキシジェニクス(株)東京研究所
- 3) 慶應義塾大学 医学部

【目的】これまでにHb小胞体(HbV)の単回投与，および反復投与試験の結果から，HbVは最終的に細網内皮系に捕捉され，速やかに分解消失することが明らかにされた(*Am J Pathol* 2001;159:1079，*J Pharmacol Exp Ther* 2004;311:874)．二週間の観察では特に非可逆的な副作用を認めていない．しかし，第40回人工臓器学会(仙台)において，Nose博士からの指摘として，PFC乳剤を投与した場合に，肺障害のため1年を待たずに動物が死亡する例があるので，長期的な観察を早く実施すべきとの助言を戴いた．HbVも脂質成分を多く含む点でPFCと類似しているため，投与後1年間の体重の推移と，血液生化学的検査と組織病理学的観察を実施した．

【研究方法】Wistar系ラット(，体重 263 ± 8 g) 5匹に対し，尾静脈よりHbVを20 mL/kg投与した．ラットを個別にケージに入れ，1年間飼育した．この間，体重の推移を観察した．1年経過後，血液生化学検査，および臓器を摘出，組織病理学的観察を行った．

【結果および考察】ラットは全例が1年間生存し，体重は最終的に 821 ± 75 gまで増加した．血漿は乳糜が認められ，血液生化学検査の結果，明らかな高脂血症であった．これらは，比較的小さいケージの中で，接種量を制限することなく1年間飼育したために肥満になったと考えられる．肝機能を反映するパラメータ，AST，ALT，LDHは正常範囲であった．既報のHbV単回投与(20mL/kg)の後の血液生化学検査では，投与1～2日後に一過性の血漿中脂質濃度増大が認められた(*Biomaterials* 2004;25:4317)．これはHbVがマクロファージに捕捉された後，脂質成分が遊離したものであるが，7日目には正常値に戻った．今回の実験結果から，高脂血症のラットに比較すれば1～3日後の脂質濃度の増大は無視出来る程度であることが明らかになった．組織病理学的検討では，著変は認められなかったが，ヘモジリン沈着が脾臓，副腎，腎臓に認められた．また，1例に下垂体腺腫が認められた．これらの所見は全て比較試験や文献から老化による現象と考えられた．また，肺には全例において全く異常を認めなかった．

【結論】HbVを単回投与したあと，ラットは全例が1年間生存した．また，血液生化学検査，組織病理学的検査では，肥満および老化による影響が見られたが，HbV投与に直接関係する異常は認められなかった．

ポスターセッション P-4

ポリエチレングリコール鎖を結合した両親媒性化合物によるリン脂質小胞体の表面修飾とヘモグロビン小胞体の安定化効果

宗 慶太郎，武岡 真司，土田 英俊
早稲田大学 理工学総合研究センター

精製ヒトヘモグロビン(Hb)($>35\text{wt}\%$)を内相に充填し，リン脂質の分子二層膜で被覆したHb小胞体は，生体組織へ酸素を供給する酸素輸液となり得る．このHb小胞体表面をポリエチレングリコール(PEG)で修飾すると，凝集，血液成分との相互作用の抑制，溶液レオロジー制御，血中滞留時間の調節などが可能となり，安定分散系として長期保存可，投与後の凝集回避など，輸血代替物として期待できる物性が得られることを確認している．

本報では，簡便に合成できる両親媒性化合物をHb小胞体の物性制御に利用することを目的とし，PEGを親水部に有する両親媒性化合物(PEG-Lys_{2C₁₆}，PEG-Lys_{2C₁₈}，PEG-Glu_{2C₁₈})を合成，これらをHb小胞体の表面修飾に利用した系についてPEG鎖の導入安定度，分散系安定化効果，Hb内包効率などを従来のリン脂質型PEG脂質(PEG-DSPE)と比較検討した．

リン脂質小胞体は水溶性高分子添加により凝集し，添加高分子に下限臨界分子量(Mc)が存在する．小胞体の分散安定度が高い程Mcが大きくなるため，PEG脂質の凝集抑制機能を表する指標となる．表面をPEG修飾していない小胞体のMcは1,570であるが，PEG-Lys_{2C₁₆}およびPEG-Glu_{2C₁₈}(総脂質に対して0.3 mol%)で表面修飾した場合，Mcは13,000および14,400に増大した．同量のPEG-DSPEで表面修飾した場合のMcは13,300であり，合成系両親媒性化合物での表面修飾により同等あるいはより高い凝集抑制効果が認められた．PEG脂質0.3mol%の導入ではHbの内包効率に影響は無いが，1mol%まで増大させるとHbの内包効率は低下する．これは，内水相に伸びたPEG鎖の排除体積効果により，Hbの内包が阻害されるためと考えられる．PEG脂質の導入量を増大させる場合，予め調製したHb小胞体に後導入にてPEG脂質を導入する方法が有効であり，PEG-Lys_{2C₁₈}およびPEG-DSPEでは添加PEG脂質の81%および77%が小胞体に導入されたが，アルキル鎖の短いPEG-Lys_{2C₁₆}では74%に低下，またPEG-Glu_{2C₁₈}では27%と低く，これはPEG-Glu_{2C₁₈}自体の形成する集合体の安定度が高いためであると考えられる．何れの系も一旦二分子膜に導入されると脱離は確認されなかった．

以上の結果より，本検討の両親媒性化合物は何れも小胞体表面にPEG鎖を安定固定するのに十分な親疎水バランスを有していると考えられる．特に，Hbの内包効率を低下させずに導入量を増大させるには，後導入効率の高いPEG-Lys_{2C₁₈}が優れており，分散系安定化効果もリン脂質型のPEG-DSPEと同等であることから，Hb小胞体やその他小胞体の表面修飾剤として期待できる．

ポスターセッション P-5

metHb/L-Tyrによる過酸化水素消去系を封入したヘモグロビン小胞体の機能評価

阿閉 友保¹⁾, 相原 源就¹⁾, 土田 英俊²⁾, 武岡 真司¹⁾

1) 早稲田大学大学院理工学研究科

2) 早稲田大学理工学総合研究センター

【目的】高純度ヘモグロビン(Hb)をリン脂質二分子膜にて内包したHb小胞体は赤血球とは異なり、活性酸素(ROS)消去系を有していないため、ROS、特に過酸化水素(H₂O₂)によるmet化が機能低下の大きな因子である。本研究では、metHb/L-TyrによるH₂O₂消去系を有するHb小胞体を評価する。

【方法】予め調製したmetHb(0~4 wt%)及びL-Tyr(0~8.5 mM)を内包した5 wt%Hb小胞体分散液(内包oxyHb: 36 wt%)を調製し、H₂O₂の連続添加によるmet化率の推移、及び酸素分圧40 Torr、37℃における自動酸化速度をUV-visスペクトルから算出した。更に、metHb/L-Tyr内包Hb小胞体をWistar系ラット(優性、250g、n=6)に尾静脈より投与後、経時的に採血しmet化率の推移を測定した。

【結果及び考察】H₂O₂の連続添加では、内包metHb濃度、あるいはL-Tyr濃度が大きいほどmet化の抑制が確認された。特に、4 wt% metHb/8.5 mM L-Tyr内包系で劇的な抑制が確認された。このmet化率上昇傾向は、酸素分圧40 Torr、37℃におけるHb小胞体の自動酸化とほぼ同じであり、これはHb小胞体の自動酸化にもH₂O₂が大きく関わっているためである。また、in vivo試験においても同様にmetHb/L-Tyr内包Hb小胞体にてmet化の大きな抑制が認められ、met化率の上昇曲線はカタラーゼ内包によるHb小胞体のmet化抑制の飽和時の上昇曲線とほぼ一致した。この結果より、Hb小胞体への4 wt% metHb/8.5 mM L-Tyrは充分量であったと考えられる。また、投与したL-Tyr濃度はラットの静脈投与におけるLD₅₀の1/1000であり、ラットの死亡例もなかったため、安全性も高いことが示唆された。

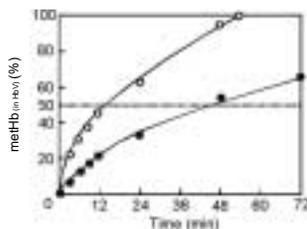


Figure Time course of methHb formation in Hb vesicles in vivo (20 mL/kg, Wistar rat). Hb vesicles were coencapsulating no metHb and L-Tyr, 4 wt% metHb and 8.5 mM L-Tyr.

ポスターセッション P-6

In vitroにおけるヘモグロビン小胞体の血小板活性化に対する影響

藤原 満博¹⁾, 若本 志乃舞¹⁾, 阿部 英樹¹⁾,

山口 美樹¹⁾, 東 寛¹⁾, 武岡 真司²⁾, 土田 英俊²⁾, 池田 久實¹⁾

1) 北海道赤十字血液センター

2) 早稲田大学理工学総合研究センター

【目的】ヘモグロビン小胞体 (HbV) は人工酸素運搬体の一つとして開発され、出血性ショックなどの動物モデルにおいて有効性が示されている。前臨床試験がおこなわれるうえで、生体適合性の観点からHbVのヒト血球細胞への影響を考慮する必要がある。そこで、HbVの血小板に対する影響を、放出反応および血小板活性化マーカーの発現を指標にして検討した。

【方法】(1) PAC-1およびCD62Pの発現の測定：全血(クエン酸三ナトリウム加)とHbV(0, 20, 40%)を37℃, 60分間インキュベーションした。その混合液をHepes Tyrode's bufferにて希釈し、FITC標識PAC-1, PE標識CD62P, PerCP標識CD42aのカクテルとADPを加え、20分間、室温、暗所で反応後、1%パラホルムアルデヒドにて固定した。固定後、PBSを添加して遠心し、PBSに再浮遊した。フローサイトメトリーにてscatter gram上で血小板高密度領域にゲートを設定し、更にCD42a陽性細胞をゲートしてPAC-1およびCD62P陽性細胞率を測定した。(2) 放出反応の測定：全血から、platelet-rich plasma (PRP)を採取した。HbV (0, 20, 40%)とPRP(最終血小板濃度 17×10^4 cells/ μ l)を37℃, 60分間プレインキュベーションした後、collagen (1 μ g/ml)またはADP (2 μ M)を添加して5分間反応させた。反応後、上清を採取し、RANTES, serotonin, α -thromboglobulin (α -TG), thromboxane B₂ (TXB₂)の濃度をELISA kitにて測定した。

【結果】(1) ADP刺激によるPAC-1の発現は、20%および40%HbV存在下で亢進がみられたが、CD62Pの発現はいずれのHbVの濃度でも影響がなかった。(2) PRPとHbVのインキュベーションによりTXB₂とRANTESのわずかな自発的な放出の減少がみられたが、ADP刺激によるTXB₂, RANTES, α -TGの放出にはHbVの影響はみられなかった。(3) 同様に、collagen刺激によるTXB₂, RANTES, α -TG及びserotoninの放出反応に対しHbVの有意な影響はみられなかった。

【結論】高濃度のHbV (40%)においても、血小板の活性化はみられなかった。また血小板活性化の初期段階のマーカーであるPAC-1については、ADPによる活性化をHbVはわずかに亢進させたものの、血小板アゴニストによって惹起される、血栓形成や炎症反応にかかわる生理活性物質の放出には有意な影響は与えなかった。以上より、HbVは40%の濃度においても、未刺激およびアゴニスト刺激下の血小板に対し、有害な作用は示さず、生体適合性においてすぐれていると考えられた。

ポスターセッション P-7

ヘモグロビン小胞体 (HbV) がラット免疫系 (脾臓細胞) に及ぼす影響

阿部 英樹¹⁾, 東 寛¹⁾, 藤原 満博¹⁾, 山口 美樹¹⁾,
酒井 宏水²⁾, 武岡 真司²⁾, 土田 英俊²⁾, 池田 久實¹⁾

1) 北海道赤十字血液センター

2) 早稲田大学理工学総合研究センター

【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。前回、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ところ、低濃度コンカナバリンA (ConA, 0.3 µg/ml) 刺激に対する脾臓中のT細胞増殖反応の低下が観察された。今回はその要因について、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時間後に脾臓を摘出し、単一脾細胞を調製した。ConA刺激48時間後の、NO産生量、サイトカイン産生量、活性化T細胞の割合、またT細胞増殖能などについてNO合成酵素阻害剤を用いて解析した。

【結果】前回同様HbV投与群の脾臓細胞では、高濃度ConA刺激 (3 µg/ml) では生食投与群と同等の増殖能がみられたが、低濃度ConA刺激 (0.3 µg/ml) では増殖能の低下が見られた。このときNO合成酵素阻害剤 (L-NMMA) を共存させたところ、低濃度ConA刺激による増殖能は回復した。生食群や高濃度ConA刺激には影響はみられなかった。NO産生量はHbV投与群で有意に高かったが、L-NMMAにより生食群と同等にまで低下した。一方、L-NMMA添加は、アポトーシス細胞の割合、活性化T細胞の割合、IL-2産生量には影響しなかった。

HbV群ではIL-2刺激によるT細胞増殖は、IL-2単独および低濃度ConA刺激共存下、L-NMMA共存下においてもみられなかった。

【考察】 HbV投与群においてみられた低濃度ConA刺激に対する脾臓細胞反応性の一過性の低下には、NOが何らかの形で関与しているものと考えられた。T細胞は高親和性IL-2受容体を発現しているが (前回報告済み)、NO産生を抑制し、過剰のIL-2添加によっても反応しないことから、IL-2受容体よりも下流のシグナル伝達系に一過性の異常が生じていると考えられる。

今後、これらの機序の詳細な解析が必要であろう。

ポスターセッション P-8

ビーグル犬50%脱血ショックモデルにおけるHb小胞体の蘇生効果と安全性評価

山本 学¹⁾, 堀之内 宏久¹⁾, 渡辺 真純¹⁾, 酒井 宏水²⁾,
武岡 真司²⁾, 勢司 泰久³⁾, 佐藤 夏枝³⁾, 須賀 裕子³⁾,
小林 紘一¹⁾, 土田 英俊²⁾

1) 慶應義塾大学医学部外科, 2) 早稲田大学理工総研,

3) オキシジェニクス京都研究所

【背景】2004年にGLPに準じる調製施設を整備したことによりHb小胞体の開発はベンチ上の少量調整から中等量の調整が可能となり、試料の安定供給体制が整備された。このため、中、大動物を用いた検討が可能となった。

【目的】Hb小胞体の安全性と効果を検討するため、ビーグル犬を用い、50%脱血ショックによる変化に対する安全性と効果について主として循環系のダイナミクスから検討した。

【方法】6~7kgの雄性ビーグル犬を用い全身麻酔、気管内挿管、自発呼吸下に動脈圧ライン、Swan-Ganzカテーテルを留置、脾摘を行った後、循環血液量の50%を脱血しショック状態とした。60分間50Torr以下のショックを維持した後Lactate Ringer液 (LR群)、5%アルブミン生食 (Alb群)、Hb小胞体分散液 (HbV群)、瀉血を行った自己血 (ASB群) にて蘇生を行い、4時間観察、血行動態と酸素運搬について検討した。

【結果】LR群をのぞいて蘇生にはよく反応し平均血圧は安定した。心拍出量はAlb群で蘇生後他の群に比しHyperdynamicとなっ経時的に減少した。平均肺動脈圧はHbV群で蘇生直後に22Torrまで上昇したが、10分後には脱血前値と同等の値を示し、実験期間中に大きな変動を認めなかった。Hb小胞体投与後の酸素運搬は蘇生後上昇し、腎皮質組織酸素飽和度などの上昇を認め、酸素運搬に貢献していることが明らかとなった。

【考察】Hb小胞体分散液は出血性ショックに対して安全で、効果の高い蘇生液の成分であることが明らかとなった。投与直後の肺動脈圧の一過性の上昇について機序を解明すべきであると考えられた。

新規な酸素結合サイト³型ヘムの合成とアルブミン-ヘムの酸素結合

飯塚 誠¹⁾, 武岡 真司¹⁾, 中川 晶人²⁾, 小松 晃之²⁾, 土田 英俊²⁾

1) 早稲田大学大学院理工学研究科

2) 早稲田大学理工学総合研究センター

ポルフィリン面上に4つの疎水性置換基を導入した⁴型ヘム(FeCP)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-ヘム複合体は、生理条件下はもちろん、生体内でも酸素輸送のできる完全合成系人工酸素運搬体である。本報では、⁴型ヘムに比べ簡便に合成できる³型ヘム(³FeCP)を設計・合成し、その酸素結合パラメーターを決定、酸素結合能が従来系と変わらないことを明らかにした。

³型ヘムはテトラ(-アミノフェニル)ポルフィリンを出発物質として4段階で合成した。従来の⁴型ヘムに比べ、半分の工程数で収率高く合成できる。³型ヘム前駆体のNOE差スペクトルを測定し、³型構造を確認した。

³型ヘムのFe(II)5配位高スピン錯体(deoxy体)に酸素を通気すると、速やかに酸素錯体が得られた。³FeCPの酸素親和性($P_{1/2}$)は67 Torr(25 mmHg)であり、これは相当する⁴型ヘムの値に比べて高い(酸素親和性は低い)。疎水性置換基の数が減少すると、置換基がヘム面上の空間を覆うように傾くため酸素結合速度定数(k_{on})が減少し、酸素親和性が低下するものと考えられる。

既法¹⁾に従いアルブミン-ヘム複合体を調製した。rHSA-³FeCP溶液は極めて安定で、6ヶ月後でも沈殿・凝集は見られなかった。rHSA-³FeCPのdeoxy体に酸素を通気すると、酸素分圧に反応して可逆的に酸素錯体が得られた($P_{1/2}$:45 Torr(37 mmHg))。³型ヘムを用いたアルブミン-ヘムではヘム置換基の構造が酸素錯体の安定度に大きく影響を及ぼすことも明らかとなった。

Ref. 1) *Bioconjugate Chem.* 2002, 13, 397-402

アルブミン-ヘムの静的構造とダイナミクス

佐藤 高彰¹⁾, 中川 晶人²⁾, 小松 晃之²⁾, 土田 英俊²⁾

1) 早稲田大学 理工学術院

2) 早稲田大学 理工学総合研究センター

遺伝子組換えアルブミン(rHSA)に合成ヘムを包接させたアルブミン-ヘム複合体(rHSA-heme)は、血液と同じ赤色を呈した完全合成系人工酸素運搬体である。本研究では、rHSA-heme溶液の高い保存安定性や優れた溶液物性の分子論的解明を目的として、rHSA及びrHSA-heme溶液について、小角X線散乱測定と誘電分散測定を行い、溶液の静的構造とダイナミクスを詳細に検討した。

散乱曲線は、SAXSess (PANalytical Anton Paar, 小角分解能 $q_{min}=0.07nm^{-1}$)を用いて極低バックグラウンドで行い、透過率補正後、水を標準試料として絶対強度に換算した。誘電分散測定には1MHz-20GHzの広周波帯をカバーする時間領域反射法(HP54120B+54121A)を用い、水和数、rHSAの双極子モーメントや回転拡散係数などを評価した。

一般にナノ粒子系の散乱強度 $I(q)$ は、 $I(q)=nP(q)S(q)$ の形で与えられる(n は粒子数密度)。 $P(q)$ は形状因子、 $S(q)$ は構造因子と呼ばれ、前者は粒子の大きさ、形状、内部構造の情報を与え、後者は粒子間干渉性散乱に相当するため、粒子間相互作用ポテンシャルを強く反映する。 $P(q)$ から、全てのrHSA及びrHSA-heme溶液中で8~8.5nmの最大直径を有する球状に近い偏平型粒子の存在が認められ、結晶構造解析の結果とよく一致した。rHSA溶液の $S(q)$ からは、緩衝溶液中ではrHSA表面電荷はよく遮蔽されており、rHSA間相互作用は剛体球相互作用に近くなるが、透析を行うとクーロン力による静電反発のため、粒子間相互作用は強く反発的(repulsive)になることが分かった。rHSA-heme系に関しては、散乱強度 $I(q)$ が $q<0.5nm^{-1}$ の極小角領域で急激に増加するなど、rHSA系とは粒子間相互作用ポテンシャルが明らかに異なり、ヘムの包接によって“非常に圧縮されやすい溶液構造”が形成されるといえる。これはrHSA粒子間の近距離相互作用が親和的(attractive)になったことを意味しており、実際、 $S(q)$ は井戸幅が約8 nmの井戸型ポテンシャルモデルで近似できた。

一方、誘電スペクトルの分析からは、ヘムを包接させてもrHSA分子の回転拡散係数にほとんど影響がないことが実証された。従って、「rHSA-heme溶液中では、rHSA間の近距離相互作用が親和的となり、長距離相互作用クーロン反発との微妙なバランスの結果、数十nmオーダーの大きな濃度揺らぎ、或いは平衡クラスターを生じるが、長寿命の多量体は形成されず、rHSA分子は独立した粒子として振舞う」ことが初めて実証された。

ポスターセッション P-11

ポリエチレングリコール鎖で表面修飾したアルブミン-ヘムの酸素結合能

中川 晶人, 王 荣民, 黄 宇彬, 小松 晃之, 土田 英俊
早稲田大学 理工学総合研究センター

1. 組換えヒト血清アルブミン(rHSA)にテトラフェニルポルフィリン鉄誘導体を包接させたアルブミン-ヘム(rHSA-heme)複合体が, 生理条件下はもちろん生体内でも酸素輸送のできる完全合成系人工酸素運搬体として機能することを明らかにしてきた. さらに最近, rHSA-hemeをポリエチレングリコール(PEG)鎖で表面修飾すると, hemeの血中滞留性が向上することも見出した. 本報では, PEG修飾アルブミン-ヘムの酸素結合能を詳細に評価したので報告する.

2. 酸素結合サイトとして ⁴-FecycPまたは ³-FecycPを包接させた2種類のrHSA-hemeについて, 片末端にマレイミド基またはスクシンイミド基を有する分子量2 kDaおよび5 kDaのPEG(M2000, M5000, S2000, S5000)で表面修飾を行い, PEG(rHSA-heme)溶液を得た(1分子当りの平均PEG結合数: 6本). 異なる酸素分圧に対する吸収スペクトル変化から酸素親和度($P_{1/2}$)を決定, レーザーフラッシュホトリシス法を用いて酸素結合・解離速度定数(k_{on}, k_{off})を算出した.

3. PEG(rHSA-heme)の $P_{1/2}$ は, 未修飾体とほぼ同じ値であり, PEGの分子量・結合様式の違いによる差も見られなかった(Table 1). k_{on} は未修飾体に比べ1/2~1/3に減少したが, k_{off} も低下したため, 結果として酸素親和度に変化はない. PEGで表面修飾することにより, 酸素錯体半減期は1.5~2倍に延長した.

	heme	PEG	$P_{1/2}$ (Torr)
PEG(rHSA-heme)	⁴ -FecycP	S2000	36
		S5000	32
	M2000	M2000	32
		M5000	31
rHSA-heme	³ -FecycP	M2000	41
	⁴ -FecycP	-	34
	³ -FecycP	-	45

ポスターセッション P-12

ポリエチレングリコール鎖で表面修飾したアルブミン-ヘムの合成とその構造および溶液物性

黄 宇彬, 小松 晃之, 中川 晶人, 王 荣民, 土田 英俊
早稲田大学 理工学総合研究センター

1. 我々は組換えヒト血清アルブミン(rHSA)に鉄テトラフェニルポルフィリン誘導体を包接させたアルブミン-ヘム(rHSA-heme)複合体が, 生理条件下(水中, pH 7.3, 37 °C)で酸素を可逆的に結合解離できる合成ヘム蛋白質(完全合成系人工酸素運搬体)となることを明らかにしてきた. 今回は, その分子表面をポリエチレングリコール(PEG)鎖で表面修飾した新しいrHSA-heme複合体を調製し, その構造と溶液物性について詳細に検討したので報告する.

2. 片末端にマレイミド基またはスクシンイミド基を有する分子量2 kDaまたは5 kDaのPEG(M2000, M5000, S2000, S5000)をrHSA-heme表面に共有結合し, PEG修飾rHSA-hemeを調製した. MALDI-TOFMS測定により分子量を決定, 表面PEG鎖の平均結合数を算出した. また, 得られたPEG(rHSA-heme)溶液の粘度, 比重, コロイド浸透圧(COP)を測定し, PEG鎖の分子量や結合様式との相関を解明した. さらに, PEG(rHSA-heme)溶液をラットへ投与した後のheme血中滞留時間を算出した.

3. rHSA-hemeの分子表面に導入されたPEG鎖の本数は, MALDI-TOFMS測定により明確に観測することができた. 反応条件を制御すると, 活性基の種類(マレイミド基またはスクシンイミド基)によらず, 表面PEG鎖の本数が調節できることも見出した. そこで, rHSA-heme 1分子当りの平均PEG結合数を6本にそろえた上記4種のPEG修飾rHSA-heme([rHSA]=5 wt%)を調製し, そのCOPを比較したところ, PEG_{M2000} (rHSA-heme), PEG_{S2000} (rHSA-heme)の値は未修飾rHSA-hemeと同等であったが, PEG_{M5000} (rHSA-heme), PEG_{S5000} (rHSA-heme)のCOPは大きな値を示した.

ラットの尾静脈からPEG修飾rHSA-heme溶液を投与(20%)し, 血中滞留時間を測定, hemeの半減期は15 hrとなり, 未修飾rHSA-hemeに比べ延長した.

麻酔下イヌ出血ショックモデルを用いた人工酸素輸液アルブミン - ヘムの酸素運搬能評価

山本 尚志^{1,2)}, 堀之内 宏久¹⁾, 山本 学¹⁾, 小林 紘一¹⁾,
小松 晃之³⁾, 中川 晶人³⁾, 黄 宇彬³⁾, 弘津 一郎²⁾,
甲斐 俊哉²⁾, 土田 英俊³⁾

- 1) 慶應義塾大学 医学部 呼吸器外科
- 2) ニプロ株式会社 医薬品研究所
- 3) 早稲田大学 理工学総合研究センター

【背景】我々はこれまで組換えヒト血清アルブミン (rHSA) に合成ヘムである鉄テトラフェニルポルフィリン誘導体 (FecycP) を包接させたアルブミン - ヘム (rHSA-FecycP) 複合体が、小動物を用いた出血ショックモデルにおいて有用な赤血球代替物となりうることを明らかにしてきた。

【目的】今回、生体内におけるrHSA-FecycPの酸素運搬能をより詳細に評価することを目的として、ビーグル犬を用いた検討を行った。

【方法】雄性ビーグル犬を用い、セボフルレン吸入麻酔下、推定循環血液量の75%を5%rHSAで置換した後、30%の脱血を行った。30分間ショック状態を保持した後、脱血量と等量の蘇生液を投与した。蘇生液としては5%rHSA生食 (rHSA群, n=4) 及びrHSA-FecycP生食 (rHSA-FecycP群, n=4) を用いた。投与後4時間までの経過観察を行い、循環動態パラメータ、血液ガス分析値、組織酸素分圧、酸素運搬量、等を指標に酸素運搬能の評価を行った。

【結果及び考察】rHSA群では死亡例が認められたが、rHSA-FecycP群では全例が投与後4時間まで生存した。また、rHSA-FecycP投与により平均血圧は脱血前値の90%程度まで回復し、rHSA-FecycP投与直後の総酸素運搬量に占めるrHSA-FecycP由来の酸素運搬量の割合は約25%であった。これらの結果より、rHSA-FecycPは生体内で酸素運搬能を有しており、出血ショックからの回復に効果的であるものと考えられた。

【結論】rHSA-FecycPは有用な赤血球代替物となりうることが示唆された。

Synthesis and O₂-Binding Properties of Albumin-Heme Having Covalently Linked GluFePs as O₂-Coordination Site

Rong-Min Wang, Teruyuki Komatsu, Eishun Tsuchida
Adv. Res. Inst. for Sci. & Eng., Waseda University

As a model of the O₂-carrying synthetic hemoprotein, tetrakis{(, , , -pivalamido)phenyl}porphinatoiron (II) with a proximal-imidazole (FeP) is incorporated into recombinant human serum albumin (rHSA), giving an entirely synthetic hemoprotein [albumin-heme (rHSA-FeP)], which can coordinate O₂ under physiological conditions (pH 7.3, 37°C). This O₂-carrying plasma hemoprotein could be of extreme medical importance not only as a blood replacement composition, but also as an O₂-transporting medicine. The major driving force of the heme-binding to rHSA is a hydrophobic interaction, therefore, its binding ability are not high enough to maintain the heme concentration in the circulatory system. In order to prolong the persistence of FeP in the blood stream, we have synthesized a new FeP molecule having a succinimidyl-glutamyl side-chain (GluFePs) and fixed it to the rHSA structure through a covalent bond. Structure and O₂-binding properties of this novel albumin-heme [rHSA(GluFeP)] conjugate have been studied.

Firstly, the branched tail including the imidazolyl and succinimidyl groups via a glutamate junction were introduced into the active heme (FeP). All reactions can be performed at room temperature with high yields. Then, the succinimidyl group of heme (GluFePs) selectively reacted with the NH₂ group of lysine of albumin in the range of pH 6.3-8.6 at room temperature with high yield. The average binding numbers of FeP in an rHSA were estimated to be three by MALDI-TOFMS. The conjugation of GluFePs did not induce any change in the circular dichroism spectrum of rHSA in the 200-250 nm region. This means that the secondary structure of albumin remained unaltered after the covalent binding of the hemes. The obtained rHSA(GluFeP) can reversibly absorb O₂ under physiological conditions, and its O₂-binding affinity [$P_{1/2}(O_2)$] was identical to that for human erythrocytes. The half-lifetime of the O₂ adduct was ca. 5 hr at 37 °C, which is significantly longer than that of the non-covalent rHSA-FeP hybrid.

ポスターセッション P-15

フィブリノーゲン 鎖C末端ドデカペプチド結合担体の止血効果

岡村 陽介¹⁾, 前川 一平¹⁾, 藤枝 俊宣¹⁾, 武岡 真司¹⁾,
半田 誠²⁾, 池田 康夫²⁾

- 1) 早稲田大学大学院理工学研究科
- 2) 慶応義塾大学医学部

【目的】フィブリノーゲン 鎖C末端ドデカペプチド (HHLGGAKQAGDV: H12)を生体適合性を有するナノ微粒子(アルブミン重合体(polyAlb), リン脂質小胞体(vesicle))に結合させ、流動状態下におけるH12による活性化血小板上のGPIIb/IIIaへの認識能を評価した。さらに、血小板減少ラットを用いてH12-polyAlbの止血能評価を行い、担体の相違による止血効果の相違を検討した。

【方法】チオール基導入H12を、片末端にマレイミド基を有するポリエチレングリコール(PEG)を介して、polyAlbあるいはvesicleに担持させた(H12-polyAlb, H12-vesicle)。再構成血液(Hct. 50%)にFITC標識させた両者のH12担持微粒子を添加し静置後(37℃, 10 min), 出血部位に見立てた血小板固定化基板上を流動させ(ずり速度150 s⁻¹), その粘着挙動を蛍光顕微鏡にて観察した。血小板減少ラット(Wister系, 8週齢, 250-280 g, [PLT]=2.0 × 10⁵ / μL)にH12-polyAlbあるいはH12-vesicleを投与し, 3時間後に尾先端を傷つけ止血までの時間を測定した。

【結果及び考察】H12-polyAlb, H12-vesicleを血小板固定化(活性化血小板)基板上に流動させたところ, 直ちに粘着した。他方, H12未結合体, または抗GPIIb/IIIa抗体存在下では粘着が抑制されたことから, 両者の活性化血小板に対する特異的相互作用を確認した。血小板減少ラットにH12-polyAlbを投与したところ(約4 × 10¹²粒子), 出血時間は330773秒となり, 生食(712 ± 131秒), polyAlb(723 ± 78秒)投与群と比較して出血時間を著しく短縮させた(Fig. 1)。他方, H12-vesicle(約6 × 10¹³粒子)でも同様に短縮させた(441 ± 66秒)。さらに投与粒子数の比較(血小板数 vs. 出血時間の相関からの見積もり)により, 止血効果は前者の方が約20倍高いことが判明し, この要因の検討結果も併せて報告する。

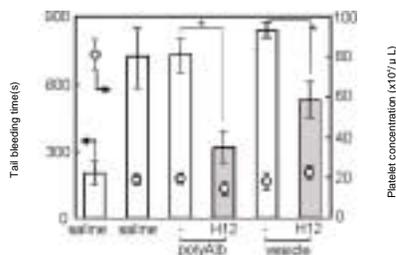


Fig. 1 Haemostatic effects of H12-polyAlb or H12-vesicle on tail bleeding time. The administered amount of H12-polyAlb or H12-vesicle was 40 or 30mg/kg, respectively. [PLT] (N = 6-10).

ポスターセッション P-16

原子間力顕微鏡による人工血小板粘着におけるせん断依存性の評価

緒方 亜美¹⁾, 武岡 真司²⁾, 池田 康夫³⁾, 谷下 一夫¹⁾

- 1) 慶應義塾大学大学院理工学研究科
- 2) 早稲田大学大学院理工学研究科
- 3) 慶應義塾大学医学部

本研究ではvon Willebrand factor (vWf) と人工血小板との粘着力を原子間力顕微鏡 (AFM) によって直接測定し, せん断速度に依存する粘着力の変化を定量的に評価することにより, 人工血小板の粘着能のせん断依存性について検討を行った。人工血小板プロトタイプとしてはLatex Beads (LB) をcarrierとして recombinant Glycoprotein (GP)Ib を固相化したrGPIb-LB (粒径200 nm)を用いた。

AFMのカンチレバー探針先端にウシ血清アルブミン(BSA)をコーティング後, rGPIb-LBを修飾し, vWfとの測定で得られたフォースカーブからフックの法則を用いて粘着力を算出した。その際の試料としては, 厚み200 μmの平行平板流路を用いてカバーガラスに固相化したvWfにせん断速度負荷を60分間行い, 流れを止めた直後, 及び10分毎にrGPIb-LBとの粘着力を測定した。

Fig.1に, vWfに対するせん断速度負荷を止めてから60分後までのrGPIba-LBとvWfとの粘着力を示す。vWfへのせん断速度負荷時はせん断速度負荷なしの場合よりもrGPIb-LBとの粘着力が大きくなった。1200s⁻¹のせん断速度負荷をかけた直後のrGPIba-LBとvWf間にはたらく粘着力は200s⁻¹のせん断速度負荷時と比較して約5.5倍, せん断速度を負荷しない場合とで約8倍大きい値を示した。

また, vWfに対する流れを止めてから30分後まではrGPIb-LBとの粘着力が時間経過に伴い低下していることが明らかになった。生理的状況下では血小板粘着を引き起こす際のvWfは常に血流にさらされているが, 高せん断速度下でのみ機能するvWfのGPIb 結合部位は, 流れから外した状態で測定した場合でも機能していることがわかった。このことより, vWfはせん断負荷を一時的に記憶する, もしくは, 高せん断速度下で線維状に伸びたvWf分子が, 流れが止まった後に形状を元に戻すまでの変化が比較的遅い変化である, といった可能性が考えられる。

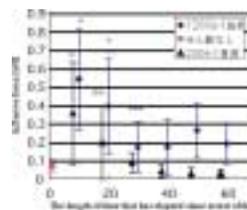


Fig.1 時間経過に伴うrGPIb-LBとvWfとの粘着力

ポスターセッション P-17

rGPIb リポソームの集積性評価

是永 真規¹⁾, 上出 佳永子¹⁾, 今田 光昭¹⁾, 塚田 稔²⁾,
村田 満³⁾, 池田 康夫³⁾

- 1) 三菱ウェルファーマ (株)
- 2) (株) ベネシス
- 3) 慶應義塾大学医学部

【目的】血小板膜蛋白質GPIbは、GPIb / IX / V複合体を形成しており、血小板の粘着に参与している。すなわち、血小板は血管損傷部位において、フォンビルブランド因子 (VWF) と GPIb を介してテザリングし、これが一連の止血機構の引き金となる。我々はVWFとの結合部位であるGPIb に注目し、この組換え体 (rGPIb) を大量調製した。これを生体適合性を有するリポソームに導入することにより、血小板代替物作製の可能性につき検討を進めている。本演題ではrGPIb リポソームのex vivo血管壁への結合性、in vivo血栓への集積性に関して報告する。

【方法】rGPIb リポソームの調製は、活性化N-グルタリルホスファチジルエタノールアミンにrGPIb を結合させた後、界面活性剤で可溶化した脂質と混合し、ゲルろ過にて界面活性剤を除去する方法で行った。rGPIb 自体のex vivo血管壁への結合性は、¹²⁵I標識rGPIb を用い、ラット血管壁ブロックへの結合量を測定し評価した。またrGPIb リポソームの血管壁への結合性も、脂質を³Hで標識したrGPIb リポソームを用い、モルモット血管壁ブロックへの結合量を同様に測定し評価した。rGPIb リポソームのin vivo血栓への集積性は、あらかじめ頸動静脈にシャントを作成した血小板減少ラットに³H標識rGPIb リポソームを尾静脈内投与した後、シャント内血栓重量と血中及びシャント内血栓中の放射活性を測定し評価した。

【結果】ex vivo血管壁への結合性評価において、対照とした¹²⁵I標識ヒト血清アルブミン(HSA)は血管壁にまったく結合しなかったのに対し、¹²⁵I標識rGPIb は飽和的に血管壁に結合した。この結合は可溶性rGPIb の存在により競合的に阻害されることから特異的であると考えられた。³H標識rGPIb リポソームも同様に血管壁に結合し、この結合は可溶性rGPIb の存在により競合的に阻害される特異的なものであった。また、この結合はリストセチン存在下増強された。一方、対照とした³H標識HSAリポソームの結合は観察されなかった。in vivo血栓への集積性評価では、コントロールの³H標識リポソームと比較して³H標識rGPIb リポソームは放射活性比 (血栓/血液) が有意に高かった。これは³H標識rGPIb リポソームが血栓に特異的に集積したことを示唆した。

【結論】今回、rGPIb リポソームは血栓形成部位への特異的な集積性を有することが明らかとなった。このことは、rGPIb リポソームが血栓部位で止血に参与する可能性を示唆した。

ポスターセッション P-18

人工血小板の粘着及び流動時における微視的挙動の評価

鈴木 健一¹⁾, 藤田 英輝¹⁾, 田村 典子²⁾, 後藤 信哉²⁾,
武岡 真司³⁾, 池田 康夫⁴⁾, 谷下 一夫¹⁾

- 1) 慶應義塾大学大学院理工学研究科, 2) 東海大学医学部, 3) 早稲田大学大学院理工学研究科, 4) 慶應義塾大学医学部

本研究では矩形管路内の人工血小板の挙動及び粘着現象を高速度カメラ及びデジタルカメラを用いて観察し、それらを定量的に評価することで人工血小板が粘着・凝集能を発揮するための情報を得る。特にLatex-Beads (LB)とvesicleの2種類 (粒径1 μm) のcarrierを用いることにより、粒子の変形能の違い(LBが剛体球であり、vesicleは変形能を持つ粒子)が「流れと直角方向への移動能力」、「血流中の濃度分布」、「粘着能力」に対してどのような影響を与えるかを評価した。

1辺が200 μmの矩形管路を用いて、管路の片側面にvon Willebrand factor (vWf)をコーティング、血管内皮損傷部位を模擬した。その管路内にヘマトクリット(Ht)40%の赤血球ゴーストとrGPIb -LBもしくはrGPIb -vesicleを粒子濃度 $2.0 \times 10^5 / \mu\text{l}$ 、ずり速度 1500 s^{-1} となるように灌流し、管路にレーザーを照射、vWf壁面上の挙動をDigital Video (DV)、管路内の挙動をImage Intensifierを介した高速度カメラで観察した。

Fig.1は流動中の粒子の濃度分布と拡散を示す。流動中のrGPIb -LBは壁面近傍 (20~25 μm) において濃度のピークをとるのに対し、rGPIb -vesicleはより管軸中心 (40~45 μm) に多く存在する。変形能を持った粒子 (rGPIb -vesicle) が剛体球 (rGPIb -LB) より壁面から離れた領域で高濃度が見られたのは変形能を持つ粒子の軸集中効果が原因と考えられる。

Fig. 2はvWf壁面に粘着している粒子量の時系列変化である。rGPIb -LBはvWf壁面に対して迅速に付着し、不可逆的な粘着が起こった。40 sec以降は飽和状態となり一定の値をとっている。rGPIb -vesicleは45 secと75 secでピークを取るものの、粘着面積が一定になることはない。これはrGPIb -vesicleが壁面上で粘着と解離を繰り返しrollingしているが、壁面に蓄積していかなかったことを表している。

人工血小板のcarrierの物性が管路内及び粘着表面上での挙動に大きく影響することが明らかとなり、血小板代替物として人工粒子を用いる際、粘着能と濃度分布という観点では、そのcarrierに剛体球を用いた方が有利と言える。

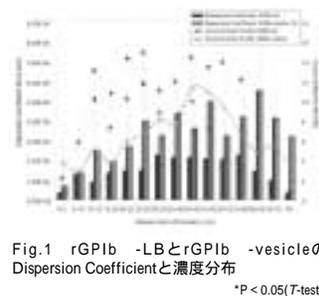


Fig.1 rGPIb -LBとrGPIb -vesicleの Dispersion Coefficientと濃度分布
*P < 0.05 (T-test)

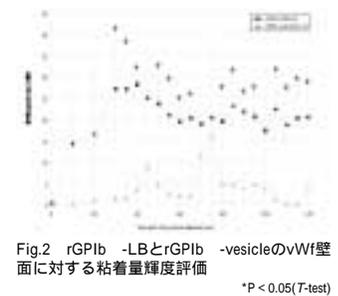


Fig.2 rGPIb -LBとrGPIb -vesicleのvWf壁面に対する粘着量時系列評価
*P < 0.05 (T-test)

ポスターセッション P-19

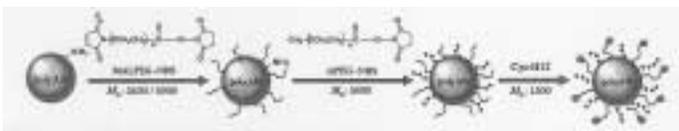
PEG修飾アルブミン重合体へのH12ペプチド結合と止血能評価

藤枝 俊宣¹⁾, 岡村 陽介¹⁾, 武岡 真司¹⁾, 半田 誠²⁾,
池田 康夫²⁾

- 1) 早稲田大学大学院理工学研究科
- 2) 慶応義塾大学医学部

[緒言] H12結合アルブミン重合体 (H12-polyAlb)は、血小板凝集を促進し血小板減少症モデルラットの止血時間の短縮効果が確認されている。本報では、分子量の異なるポリエチレングリコール(PEG)を介してH12をpolyAlbに担持させた2種類のH12-PEG-polyAlbを合成し、その血小板凝集能、血中滞留時間値から有用なPEGを選択し、長期的な止血効果の持続について報告する。

[実験] H12-PEG-polyAlb(粒径: 200 ± 80 nm)の合成方法を以下に示す。



多血小板血漿([PLT]= $2.0 \times 10^9/\mu\text{L}$)にH12-PEG-polyAlbを添加し攪拌後、ADPにて活性化した血小板の分散液の透過度を測定し、H12未結合PEG-polyAlb添加時の透過度との差からH12の機能を評価した。前講演者と同様に作製した血小板減少症モデルラットを用いて、H12-PEG-polyAlbの $T_{1/2}$ 算出(投与量:[rHSA]=40 mg/kg)および3時間後の止血時間(投与量:[rHSA]=4, 20, 40 mg/kg)を測定した。

[結果及び考察] MALPEG-NHS(M_w : 3.4 kDa)の時、H12血小板凝集促進能は、mPEG修飾量がpolyAlb 1 粒子あたり 5.2×10^4 分子まで保持された。そして、これ以上の修飾量では機能が大幅に低下した。これはPEG鎖がマッシュルーム構造からブラッシュ構造に遷移し、MALPEG末端のH12が埋没したためと考えられる。他方、MALPEG-NHS(M_w : 5.0 kDa)の時、mPEG最大修飾量(6.1×10^4 分子/1粒子)でもH12機能は維持され、 $T_{1/2}$ は約180分であった(参考: 未修飾体 約10分, M_w : 3.4 kDaの場合 約150分)。血小板減少症モデルラットにH12-PEG-polyAlbを投与したところ(4, 20, 40 mg/kg)、止血時間はそれぞれ 626 ± 158 , 594 ± 184 , 330 ± 73 sであり、投与量依存的に止血時間が短縮した。特に40 mg/kg投与時は生理食塩水群、PEG-polyAlb群と比較して有意に短縮し、正常ラットの止血時間に匹敵した。H12-PEG-polyAlbは投与3時間後でも止血能を有することが明らかになった。

ポスターセッション P-20

H12結合リン脂質小胞体の止血能評価

前川 一平¹⁾, 岡村 陽介¹⁾, 武岡 真司¹⁾, 半田 誠²⁾,
池田 康夫²⁾

- 1) 早稲田大学大学院理工学研究科
- 2) 慶応義塾大学医学部

[緒言] 表面にフィブリノーゲン鎖C末端400-411番目のアミノ酸配列 (H12:HHLGGAKQAGDV)を担持させた小胞体は、出血部位での血小板凝集の促進が期待できる。また、小胞体の血中滞留性の向上にはポリエチレングリコール(PEG)による表面修飾が必要である。本報では、H12の認識反応を保持するために、H12をPEG鎖末端へ担持させたPEG修飾小胞体(H12-PEG-vesicles)を構築し、流動下での血小板凝集促進能の*in vitro*評価、血小板減少症モデルラットを用いた*in vivo*止血能測定を行い、血小板代替物としての機能を評価した。

[実験] 血小板を蛍光標識した血小板減少血液([血小板]= $5.0 \times 10^4/\mu\text{L}$) 5mLにH12-PEG-vesicles (DPPC:cholesterol:DPEA:PEG-DSPE:H12-PEG-Glu2C18=5:5:1:0.03:0.03, 粒径: 250 ± 80nm, 1.5wt%, PBS分散, 200 μL)を添加、これをコラーゲン基板上に流動させ、血小板の基板への粘着占有率(SC)を解析した。busulfanをWister系雄性ラット(8weeks, 250-280g)に投与後10日目のラットを血小板減少症モデルラット([PLT] = $20 \times 10^4/\mu\text{L}$, 正常ラット[PLT] = $80 \times 10^4/\mu\text{L}$)とした。これにH12-PEG-vesiclesを投与し(10,30,40 mg/kg)、5分後に尾先端を傷つけ止血時間を測定した。

[結果及び考察] コラーゲン基板上のSCは $10.4 \pm 1.6\%$ であった。PEG小胞体の添加では血小板粘着に何ら影響を及ぼさなかったが(SC= $9.4 \pm 0.3\%$)、H12-PEG-vesiclesの添加では血小板粘着は約2倍増大し(SC= $17.2 \pm 1.9\%$)、血小板凝集促進効果が確認できた。血小板減少症モデルラットにH12-PEG-vesiclesを投与したところ、止血時間は生理食塩水投与群と比較して、投与量の増大と共に短縮した(Fig. 1)。以上より、H12-PEG小胞体は止血能を有する微粒子であることが確認できた。

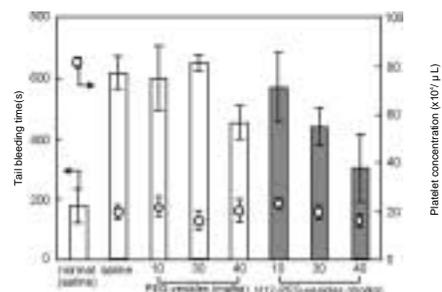


Fig.1 Effects of the administration of H12-PEG-vesicles on tail bleeding time (solid bars). ○: platelet concentration in the rats (N = 6-10).

ポスターセッション P-21

光刺激応答性ガスキャリア液を用いた新規酸素濃縮器の開発

軽部 博泰, 小堀 深, 酒井 清孝

早稲田大学大学院理工学研究科

酸素療法とは、慢性閉塞性肺疾患（COPD）をはじめとする呼吸器系疾患の患者に対して高濃度の酸素を吸入させる治療法である。この療法に使用されている酸素濃縮器には、ガス透過膜を利用した膜型のもので吸着剤を用いた吸着型のものがあるが、高濃度かつ高流量の供給はできない。そこで本研究では、光刺激によって酸素の結合・解離を制御する金属錯体を溶解させたガスキャリア液を用いた新規酸素濃縮器を検討した。この酸素濃縮器は、二つの膜モジュール間をガスキャリア液が循環することで効率の良い酸素移動を実現するものである。遮光下の第一モジュールで空気中からガスキャリア液に酸素を濃縮し、光照射下の第二モジュールでガスキャリア液から酸素を解離させて呼吸器系疾患の患者に必要な高濃度の酸素を供給する。

本研究における光刺激応答性酸素運搬体として、遮光時に酸素と結合し、光照射によって酸素を解離するポルフィリン錯体 oxo-molybdenum^{5, 10, 15, 20}-tetra-mesitylporphyrin (Mo O (tmp)) を合成した。また、使用する溶媒として酸素運搬性能、酸素移動性能および安全性の観点からシリコンオイルを選定し、シリコンオイルに Mo O (tmp) を溶解させた光刺激応答性ガスキャリア液を調整した。遮光状態で Mo O (tmp) を完全に Mo O (tmp)(O₂) に酸素化させたガスキャリア液に光照射を行い、得られた酸素分圧を測定した。得られた結果から、ガスキャリア液の酸素濃縮率を調べた。また、遮光下にした際に Mo O (tmp) から解離された酸素の経時変化から反応速度定数を算出した。酸素解離分圧変化および酸素結合速度定数よりガスキャリア液の至適濃度を決定した。

完全に酸素化させた Mo O (tmp)(O₂) から、光照射によって解離させた酸素の分圧変化より、最大で大気中の約2倍程度まで酸素を濃縮できることがわかった。しかし、高濃度のガスキャリア液にすると、ガスキャリア液内で錯体同士が凝集し、酸素結合反応速度定数が小さくなることが示された。酸素分圧変化および酸素結合反応速度定数の値から、光刺激応答性ガスキャリア液の至適濃度を決定でき、新規のガスキャリア液循環型酸素濃縮器への応用の可能性が示された。

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(、)とピリオド(．)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. リボソームの調製. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三 編. リボソーム. 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。

[本誌掲載著作物の二次利用および著作権について]
以下の点につきまして、あらかじめご了承ください。

本誌の一部、もしくは全部をCD-ROM、インターネットなどのニューメディアに二次利用させていただく場合があります。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)は本学会に譲渡されたものとします。したがって、上記の諸権利の承諾は本学会で行います(本項については、著作者ご自身の再利用を拘束するものではありませんが、再利用される場合はご一報ください)。

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), 東 寛, 池淵研二, 小林 薫, 酒井宏水, 福島昭二, 堀之内宏久, 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.13(2) 2005年5月27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

日本血液代替物学会
<http://www.blood-sub.jp/>