人工血液

第 18 巻　第 1 号　2010 年 5 月

目　次

会告 …… 2

原著　Determination of electrolyte concentrations in serum containing cellular artificial oxygen carrier（HbV）
……Seiji Miyake　他　3

総説　反芻家畜における血液代替物としての初乳
……萩原 克郎　9

人工細胞研究における巨大リポソーム
……湊元 幹太　15

トピックス
微小血管分岐部内の人工赤血球/赤血球動態に関する流体シミュレーション ……百武 徹　他　25

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 18 No. 1 May, 2010

Contents

Announcement …… 2

Original Article：
Determination of electrolyte concentrations in serum containing cellular artificial oxygen carrier（HbV）
……*Seiji Miyake, et al.*　3

Review：*The colostrum as a blood substitute in a ruminant*
……*Katsuro Hagiwara*　9

Giant liposomes in studies on artificial cells
……*Kanta Tsumoto*　15

Topics：*Numerical study on flow behaviors of red blood cells with liposome-encapsulated hemoglobin at microvascular bifurcation* ……*Toru Hyakutake, et al.*　25

会　告

第17回日本血液代替物学会年次大会

期　日：2010年10月18日（月）～19日（火）
会　場：熊本市国際交流会館（熊本市花畑町4-8）
大会長：小田切　優樹（崇城大学薬学部教授・熊本大学客員教授）
テーマ：「血液代替物科学の最前線」
プログラム：

◆特別講演

「新たな磁気共鳴画像化法の開発と酸化ストレス疾患の可視化」
内海英雄（九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点長）

「生活習慣病の分子病態と治療戦略」
尾池雄一（熊本大学大学院生命科学研究部・分子遺伝学分野教授）

「がん治療の最前線」
馬場秀夫（熊本大学大学院生命科学研究部 消化器外科学教授）

◆シンポジウム1（人工酸素運搬体の臨床応用）
◆シンポジウム2（人工血小板の現状と将来）
◆シンポジウム3（細胞型ナノ医薬品の新展開）
◆大会長講演

「アルブミンに夢を描いて35年」
小田切優樹（崇城大学薬学部教授・熊本大学大学院生命科学研究部客員教授）

演題募集締切り：平成22年８月10日（火）

※ 演題募集は学会HPにて行います。その他詳細につきましてもホームページでお知らせする予定です。

http://www.blood-sub.jp/info/announce.html

事務局：　崇城大学薬学部
〒860-0082　熊本市池田4-22-1
TEL: 096-326-3887／096-326-4019
FAX: 096-326-3887／096-326-5048
（担当者　豊岡真希）

original article

Determination of electrolyte concentrations in serum containing cellular artificial oxygen carrier (HbV)

Seiji Miyake [(1)], Jiro Takemura [(1)], Masuhiko Takaori [(2)]

Abstract

We attempted to measure electrolyte (Na, K, C) ion concentrations in serum containing an artificial oxygen carrier, HbV (hemoglobin encapsulated liposme vesicle emulsified in physiological saline), by dry chemical method using Vitros250™ (Ortho Clinical Diagnostics) or conventional wet method using TBA200FRNEO™ (Toshiba Medical System). Clinically satisfactory values of the electrolyte ion concentrations were obtained in the serum which contained the HbV at 1/2 ～ 1/32 volume ratio and even in original HbV emulsion by the dry chemistry method. By the wet method, however, satisfactory values with clinically acceptable accuracy were not obtained when mixing volume rate of the HbV remained above 1/8 mixing rate. Subsequently the satisfactory values were obtained when mixing rate of the HbV in serum reduced less than 1/16. Reason for the above limited capacity for the wet method remained obscure. Further a trace amount of potassium ion in the HbV emulsion was a puzzle.

Keywords

cellular artificial oxygen carrier, serum electrolyte determination, dry chemistry, liposome encapsulated hemoglobin, polarographic examination

1. Introduction

It has been desired to develop a therapeutic agent which can restore the circulating blood volume and also oxygen carrying capacity of blood for treatment of massive hemorrhage instead of transfusion of blood, which should be stored at 5±1 ℃ and compatibility test must be required. Such therapeutic agent is expected most useful for initial treatment e.g. in accident field by Medicares and most effective for life saving for out-of-hospital patient care. Up date, two types of candidate, namely hemoglobin based oxygen carrier (HBOC) and perfluorocarbon based oxygen carrier, were tested for this purpose. Unfortunately development for the latter was discontinued due to short life span in the circulation and also to thrombocytopenia after infusion[1)]. On the other hand for the former, acellular type, it has been pointed out arteriolar vasoconstriction due to its scavenging effect of nitric oxide from endothelial cells[2,3,4)] and consequent coronary events[5)] after its infusion. Thus two pharmaceutical companies have withdrawn from the HBOC development in early 2009. Only liposome encapsulated hemoglobin vesicle which is emulsified in the physiological saline (HbV) remains to be developed further as HBOC without noticeable adverse effects.

In general, however, it has been reported that HBOCs could interfere clinical laboratory tests[6,7,8)], particularly spectrophotometry used that would be interfered by absorbancy of hemoglobin molecule. Moreover laboratory test without spectrophotometry, such as polarographic examination, would be suspected to be interfered by the HbV. Since the HbV vesicles covered with non-electroconductive phospholipid, their adherence on electrode surface might effect on boundary potential.

This study was carried out to demonstrate whether or not analyzers commonly used in practice could work well for measurement of electrolyte concentrations in serum containing a cellular artificial oxygen carrier, HbV.

(1) Osaka Prefecture Saiseikai Noe Hospital

(2) East Takarazuka Sato Hospital, 2-1 Nagao-cho Takarazuka-city Hyogo 665-0873, JAPAN

論文受付 2009年12月15日　論文受理 2010年1月18日

2. Materials and Methods

Experimental procedures were performed in Osaka Prefecture Saiseikai Noe Hospital. Blood of 18 ml was donated by six healthy, adult volunteers for each who had consented to an informed consent which had stated purpose and procedure of the study and which had been authorized by ethics committee of the hospital. The experimental procedures were examined and regulated by the ethics committee. The HbV was produced and supplied by Nippro Co (Kusatsu, Shiga), which is one of member in research group of Japanese Ministry of Health, Welfare and Labor Research Project "Clinical Applications of Artificial Oxygen Carrier H18-Drug Innovation H18-General-022". Physicochemical properties for the HbV was listed in Table 1. Medium of the HbV was collected by ultracentrifugation (50,000 G for 30 minutes) and supplied by Dr. Sakai, H. , Associate Professor, Waseda University who is also one of member in the above research project.

Table 1. Physicochemical properties of HbV

diameter of vesicle (nm)	270
vesicle volume (HbVcrit %)	> 30
hemoglobin content (g/dL)	9.7
phospholipid content (g/dL)	6.7
hemoglobin / phospholipid ratio	1.5
carbon monooxide hemoglobin (%)	0.1
endotoxin (EU/ml)	< 0.3
sterility test	passed

Blood of 2 ml was collected in EDTA-2K tube and used to determine hematocrit and hemoglobin value. Serum of approximately 9 ml was collected in a serum separating vacuum tube by centrifugation with 1,300 G for 30 minutes from remained blood. Human albumin powder (A3782-1G Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, U.S.A.) was dissolved at 4 % in the HbV and the medium separated from HbV.

The HbV was mixed with the original serum at 1:1 volume ratio (1/2 mixture of the HbV). Subsequently a part of this mixture was mixed with the original serum at 1:1 volume ratio and 1/4 mixture of the HbV was prepared. Then serial mixtures, 1/8 ～ 1/32, were prepared in the same manner. Electrolyte concentrations (Na^+, K^+, Cl^-) were measured duplicated for the original serum, serial mixtures of HbV and serum, HbV and medium of HbV with dry (D) method※ mounted on Vitros250™ (Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, N.Y., U.S.A) and wet (W) method※ mounted on TBA200FRNEO™ (Toshiba Medical System, Ohtawara, Tochigi), respectively. The above experimental procedure was repeated on five other days. Consequently total 12 measurements were performed for each same categorized sample with the both methods, respectively. Concentration of the electrolytes in the mixtures of HbV and serum was estimated by simple, mathematical dilution equation. For example, Na^+ concentration in the 1/2 mixture was calculated as follows

$$Na\ (1/2\ \text{mixture}) = (1/2\ A + 1/2 \times 0.7 \times 154) \div (1/2 + 1/2 \times 0.7)$$

where A is concentration of Na^+ in the original serum and 0.7 is ratio of water volume contained in aliquot volume of the HbV. Since liposome encapsulated hemoglobin vesicles were emulsified in the physiological saline at volume of 30 % , Na^+ concentration for the medium of HbV was adapted to Na^+ concentration of the physiological saline of 154 mEq/L. Mean and standard deviations for actually measured value (Am ± SD), estimated value (Em ± SD) calculated the above equation and difference (Dm ± SD) between the actually measured value and the estimated value were provided for each measurement.

When the Dm was less than 2.0 mEq/L for Na^+, less than 0.05 mEq/L for K^+ and less than 2.0 mEq/L for Cl^-, actually measured value corresponded to those Dms for each was evaluated as acceptably determined value, respectively.

Hematocrit and hemoglobin value for the original blood was measured with RBC pulse height detection method and sodium lauryl sulfate hemoglobin method, respectively, using Automated Hematology Analyzer XE-2100™ (Sysmex Corp. Kobe, Hyogo).

※ When we measure concentration of electrolytes in sample (serum of plasma) using the dry method which is mounted of Victors250™ (Orho Clinical Diagnostics), we inject the sample and reference solution into a small cylinder with maximum capacity of 500μl for each and put those cylinders on each proper position inside of the analyzer. The analyzer sucks up the sample and reference solution with a needle simultaneously and drops them at each proper spot on a piece of film which specific electrode for Na, K, and Cl ion are built in, respectively. After measurement we take out the film and the cylinders and discard them. Therefore any fluid remains inside of the analyzer and so we call the above procedure as dry method.

On the other hand for the wet method, each specific electrode adapted to the ions is provided in capillary part inside of an analyzer, for example, TBA200FRNED™ (Toshiba Medical System). The capillary is always filled with special reference solution for the ions and calibrated. Therefore we call it as wet method.

Table 2. Electrolyte concentrations for the original serum (serum), serial mixtures of the original HbV and the serum, and the original HbV (HbV)

			HbV	HbV in the mixtures					serum
				1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	
Na^+	D	Am	155.0±2.2	148.0±1.9	147.1±2.2	146.4±2.4	145.8±2.6	145.3±2.8	143.0±2.5
		Em		148.1±1.5	145.9±2.1	146.4±2.3	144.3±2.5	144.2±2.5	
		Dm		0.0±0.9	1.2±0.5	0.0±0.5	1.5±0.9	1.2±0.7	
	W	Am	110.2±1.4	125.7±1.0	134.6±1.3	138.7±1.5	140.8±1.7	141.8±1.6	142.0±1.3
		Em		147.0±0.8	144.5±1.0	144.8±1.2	142.7±1.2	142.4±1.3	
		Dm		−21.3±0.9	−9.9±1.0	−6.1±0.9	−1.8±1.0	−0.5±0.8	
K^+	D	Am	ND	2.22±0.18	3.12±0.22	3.53±0.25	3.71±0.25	3.82±0.25	3.93±0.30
		Em		2.32±0.18	3.20±0.30	3.61±0.29	3.77±0.30	3.86±0.31	
		Dm		−0.10±0.06	−0.05±0.07	−0.07±0.07	−0.05±0.08	−0.05±0.08	
	W	Am	0.35±0.01	1.94±0.13	2.89±0.17	3.36±0.18	3.60±0.20	3.72±0.20	3.85±0.25
		Em		2.27±0.16	3.11±0.20	3.54±0.24	3.70±0.25	3.78±0.26	
		Dm		−0.33±0.07	−0.22±0.07	−0.18±0.08	−0.10±0.07	−0.05±0.08	
Cl^-	D	Am	150.0±6.7	126.7±3.5	115.9±2.4	111.1±2.3	109.4±2.5	108.4±2.1	107.0±1.7
		Em		126.5±1.0	116.2±1.4	112.7±1.7	109.1±1.8	108.1±1.8	
		Dm		0.2±2.7	−0.3±1.3	−1.6±0.8	0.4±1.2	0.3±1.0	
	W	Am	105.3±1.21	104.5±0.9	104.8±1.1	104.8±1.3	104.9±1.6	104.8±1.5	103.9±1.7
		Em		124.6±1.1	113.6±1.4	109.7±1.6	106.0±1.7	104.9±1.7	
		Dm		−20.1±0.4	−8.8±0.5	−4.9±0.5	−1.1±0.7	−0.2±0.6	

D : dry method W : wet method mEq/L
serum = the original serum obtained from the volunters
n = 12 mean ± standard deviations ND : not detectable
Am : mean for acutually measured values Em : mean for estimated values by the mixing equation (* see text)
Dm : mean for differences between Am and Em corresponded

3. Results

As shown on upper column in Table 2, Na^+ concentration was determined as 155.0±2.2 mEq/L for the original HbV and 143.0±2.5 mEq/L for the original serum with the D method. Difference (Dm) between actually measured 148,0±1.9 mEq/L for the 1/2 mixture and 148.1±1.5 mEq/L for its estimated value was 0.0±0.9 mEq/L. Subsequently Dms with the D method measurement were distributed in a range of 0.0±0.5 ～ 1.5±0.9 mEq/L for the 1/4 ～ 1/32 mixtures.

On the other hand with the W method, Na^+ concentration for HbV and 1/2 mixture were measured as 110.2±1.0 mEq/L and 125.7±1.0 mEq/L with Dm of −21.3±0.9 mEq/L , respectively. Subsequent Dm for the 1/4 and 1/8 mixture were −9.9±1.0 and −6.1±0.9 mEq/L, respectively and therefore those Ams were not evaluated as the acceptably determined value. Dm with Na^+ concentration for the 1/16 and 1/32 mixture, however, was 1.8±1.0 and 0.5±0.8 mEq/L, respectively. Those were less than 2.0 mEq/L and those actually measured values were evaluated as the acceptably determined value.

K^+ concentrations were listed on middle column in Table 2. K^+ concentration for the HbV could not measured by the D method. Since the analyzer the D method mounted showed "ND" (not detectable) on its display panel. However subsequent actually measured values of K^+ concentration for the 1/2 ～ 1/32 mixture distributed in a range of 3.12 ～ 3.82 mEq/L and Dms were less than −1.00±0.06 mEq/L with the D method.

With the W method, on the other hand, K^+ concentration for the HbV was determined as 0.35±0.01 mEq/L and Dms for the serial mixtures of 1/2 ～ 1/32 distributed in a range of −0.33±0.07 ～ −0.05±0.08 mEq/L . Those Dms became smaller corresponded to decreasing in the mixing rate of the HbV down to the 1/32 mixture.

As shown on lower column, Cl^- concentration measured with the D method was 126.7±3.5 mEq/L with Dm of 0.2±

2.7 mEq/L for the 1/2 mixture and 115.9±2.4 mEq/L with Dm of −0.3±1.3 mEq/L for the 1/4 mixture. With the D method, maximum Dm of −1.6±0.8 mEq/L was noted in the 1/8 mixture and the other Dms did not exceed it.

Contrary with the W method, Cl^- concentration was measured as 105.3±1.2 mEq/L for the HbV. And also Cl^- concentration was measured as 104.5±0.9 mEq/L for the 1/2 mixture and 104.8±1.1 mEq/L for the 1/4 mixture. These values differed −20.1±0.4 and −8.8±0.5 mEq/L from those each estimated value, respectively. However actually measured Cl^- concentration of 104.9±1.6 for the 1/16 mixture and 104,8±1.5 mEq/L for the 1/32 differed −1.1±0.7 and −0.2±0.6 mEq/L from each corresponded estimated value, respectively. Therefore those actually measured values were evaluated as the acceptably determined value.

As shown in Table 3, Na^+ concentration for medium separated form the HbV was determined as 154.5±2.1 mEq/L with the D method and as 151.5±0.8 mEq/L with the W method. Cl^- concentration was determined as 156.2±6.9 mEq/L for the medium with the D method and 151.3±0.8 mEq/L with the W method. K^+ in the medium was not detected with the D method but was determined as 0.40±0.02 mEq/L with the W method.

Hematocrit and hemoglobin value for blood donated by the volunteers was 43.4±3.7 % and 15.1±1.5 g/dl, respectively.

Table 3. Electrolyte Concentrations in Medium of HbV

	Na^+	K	Cl
dry method	154.5±2.1	ND	156.2±6.9
wet method	151.5±0.8	0.40±0.02	151.3±0.8

mean ± standard deviations mEq/L
ND : not detectable

4. Discussion

Several reports have pointed out that contamination of HBOCs in blood specimen interferes clinical laboratory examinations[6,7,8], particularly spectrophotometry used. Further Miyake et al[9] have reported that exact determination of blood type, such as A, B, O, and AB, with an automated blood type analyzer could not be guaranteed until the HbV contamination would become less than 5 %. In addition it has been reported by Ali et al that contamination of HBOC in the circulating blood does interfere with pulse oxymetry for oxygen saturation monitoring.[10]. Murata et al[11], therefore, eliminated the HbV vesicles from patients' plasma by ultracentrifugation for a number of clinically laboratory tests. Alternatively Takaori et al[12], Murata et al[13], Sou et al[14] mixed the blood with high molecular weight dextran, such as 200 ～ 600 kD, and separated the HbV vesicles entrapped into aggregated red cells and obtained HbV free plasma. These procedures separating the HbV vesicles, however, would not be applicable for clinical laboratory practice, particularly in emergency medicine. Cameron et al[15] has reported, nevertheless, that electrolyte concentrations in blood containing Hemospan™ (HBOC) could be determined using with Rcohe/Hitachi 902 ISE Modular Analytics (Mannheim, Germany) without any HBOC separation. Their blood samples, however, had been diluted 8 times in the analyzer. In practice where HBOC would be used for treatment for massive hemorrhage, the HBOC might be contaminated up to 40 % in blood as documented in a guidance for clinical application of the HBOC[16] and thus their corroboration above would not be guaranteed.

Fortunately in this study, we could measure the electrolyte concentrations in the 1/2 mixture with HbV and even in the original HbV with the D method while a few values for K^+ were exceeded a little beyond the acceptable range. In contrast with the W method the electrolyte concentrations could not be measured while the mixture rate was higher than 1/8 but could be less than 1/16. Reason why definite determination could be most done with the D method but not with the W method until the HbV was diluted less than the 1/16 remained obscure. It also remained to reveal that the liposome vesicle per se or liposome enclosed hemoglobin would affect on measurement with the W method.

In processing the HbV formation, namely encapsulation of hemoglobin solution which obtained from hemolysed red cells, K^+ should be enclosed into liposome vesicle. The vesicles were rinsed several times with physiological saline after the encapsulation. In fact, Na^+ in the HbV was found at concentration of 154.5±2.1 mEq/L with the D method and 151.5±0.8 mEq/L with the W method. However K^+ concentration for the HbV per se and the medium separated was determined as 0.35±0.01 mEq/L and 0.40±0.02 mEq/L with the W method, respectively. Liposome membrane is defined as semipermeable by Chang[17]. Therefore possibility that K^+ might diffuse out through the liposome membrane during storage could be anticipated. This possibility remained also to be revealed in the future.

Incidentally any abnormal findings were noted on neither hematocrit nor hemoglobin value for the blood donated by volunteers.

5. Summary

It was confirmed that the dry method mounted on Vitros200™ (Orho Clinical Diagnostics) was most adaptable to determine electrolyte concentrations, such as Na^+, K^+, and Cl^-, in serum containing the HbV. On the other hand, the wet method mounted on TBA200FRNEO™ (Toshiba Medical System) was limited to determine them until the HbV would be mixed less than 1/16. Reason for the limited capacity for the wet method remained to be explained in the future. Reason for presence of trace amount of K^+ in the HbV and for possible permeation of ions through liposome membrane also remained to be studied.

6. Acknowledgement

This study was supported by the Grant for Japanese Ministry of Health, Welfare and Labor Research Project "Clinical Applications of Artificial Oxygen Carrier H18-Drug Innovation H18-General-022". Authors would like also to express a great thank for Dr. Hiromi Sakai, Waseda University who supplied medium separated from the HbV by ultracentrifugation.

References

1. Takaori M. Artificial oxygen carriers : Looking forward to its future, Artif Blood 2007; 25: 90-98. (in Japanese)
2. Gibson QH. The kinetics of reactions between haemoglobin and gases. In : Butler JAV, Katz B, eds. Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry. New York : Pergamon Press, 1959; 1-54.
3. Motterlini R, MacDonald VW. Cell-free hemoglobin potentiates acetylcholine-induced coronary vasoconstriction in rabbit hearts. J Appl Physiol 1993; 75: 2224-2233.
4. Katusic ZS, LeeHC, Clambey ET. Crosslinked hemoglobin inhibits endothelium-dependent relaxations in isolated canine arteries. Eur J Pharmacol 1996; 299: 239-244.
5. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-base blood substitutes and risk of myocardial infarction and death - A meta-analysis. JAMA 2008; 299: 2304-2312.
6. Callas DD, Clark TL, Moreira PL, Lansden C, Gawry MS, Kahn S, Bermes EWJr. In vitro effects of a novel hemoglobin-based oxygen carrier on routine chemistry, therapeutic drug, coagulation, hematology, and blood bank assays. Clin Chem 1997; 43: 1744-1748.
7. Wolthuis A, Peek D, Scholten R, Moreira P, Gawry M, Clark T, Westrhuis L. Effect of the hemoglobin-based oxygen carrier HBOC-201 on laboratory instrumentation : Cobas integra, Chiron blood gas analyzer 840, Sysmex SE-9000 and BCT. Clin Chem Lab Med 1997; 37: 71-61.
8. Jahr JS, Osgood S, Rothenberg SJ, Li QL, Butch AW, Osggod R, Cheung A, Driessen B. Lactate measurement interference by hemoglobin-base oxygen carriers (Oxyglobin™, Hemopure™, and Hemolink™). Anesth Analg 2005; 100: 431-437.
9. Miyake S, Ohashi Y, Takaori M. Blood type determination for blood which contains hemoglobin based artificial oxygen carrier : Special reference to automated analyzer. Artif Blood 2007; 15: 85-89. (in Japanese)
10. Ali AA, Ali GS, Steinke JM, Shepherd AP. Co-oximetry interference by hemoglobin-based blood substitutes. Anesth Analg 2001; 92: 863-869.
11. Murata M, Komine R. Effects of hemoglobin vesicles on blood cells, blood coagulation and fibrinolysis Report for Japanese Ministry of Health, Welfare and Labor Research Project "Studies on improvement on safety of Artificial Oxygen Carrier H17-Regulatory Science for Medical Drug & Instrument - 074" with Chief Investigator Kobayashi, K. April 2006 : 34-40 (in Japanese)
12. Takaori M, Fukui A. Treatment of massive hemorrhage with liposome encapsulated human hemoglobin (NRC) and hydroxyethyl starch (HES) in beagles. Artif Cells Blood Subst Immob Biotech 1996; 24: 643-653.
13. Murata M. Optimization on laboratory examination for blood specimens contained hemoglobin vesicles (HbV). Artif Blood 2007 ; 15: 22 (in Japanese)
14. Sou K, Komine R, Sakai H, Kobayashi K, Tsuchida E, Murata M. Clinical laboratory test of blood specimens containing hemoglobin vesicles Interference avoidance by addition dextran. Artif Blood 2009; 17: 6-15. (in Japanese)
15. Cameron SJ, Gerhardt G, Engelstad M, Young MA, Norris EJ, Sokoll LJ. Interference in clinical chemistry assays by the hemoglobin-based oxygen carrier, Hemospan™. Clin Biochem 2009; 42: 221-224.
16. Takaori M. Approach to clinical trial considering medical ethics and efficacy for HbV, liposome encapsulated hemoglobin vesicle. Artif Cells Blood Subst Immob Biotech 2005; 33: 65-73.
17. Chang TMS. Semipermeable aqueous microcapsules (artificial cells) with emphasis on experiments in an extracorporeal shunt system. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1966; 12: 13-19.

人工酸素運搬体（HbV）を含む血清での電解質測定

三宅誠司，武村次郎（大阪府済生会野江病院検査科），高折益彦（東宝塚さとう病院）

要約　オーソ・クリニカル・ダイアグノステイック社製ビトロス250™を用いたdry法はリポソーム膜に包埋されたヘモグロビン粒子である人工酸素運搬体（HbV）が共存しても血清中の血清電解質（Na^+，K^+，Cl^+）濃度の測定で臨床的に十分耐えら得るものと評価された．一方，東芝メデイカルシステムズ（TBA200FRNEO™）を使用したwet法での測定ではHbVが1/8までの混入では予想濃度値との間に差を生じた．しかし1/16以下の混入においては臨床検査値として認容される精度で測定可能であった．

wet法において一定濃度以下のHbV混入にならないと上記血清中電解質の濃度測定ができなかった理由，さらにwet法で僅かながら検出されたHbV，およびHbV浮遊液中のK^+の由来については今後に研究する課題として残された．

総　説

反芻家畜における血液代替物としての初乳

The colostrum as a blood substitute in a ruminant

萩原 克郎

Katsuro Hagiwara

和文抄録

ウシなどの家畜は，胎盤構成がヒトとは異なることから胎子期間に母親から免疫グロブリンの移行が無く，免疫学的に未熟な‘無グロブリン状態’で出生する．そのため，生後の適切な管理が感染防御上重要である．従って，新生子ウシは，不足しているグロブリンを始めとする血液中の様々な要素を母親の初乳に依存し，それを介して補う必要がある．これまでに，新生子の感染防御や発育に，初乳由来の免疫活性化因子の作用が重要であることが報告されている．本稿では，新生子ウシの免疫学的特徴と母子免疫を中心に，初乳が多機能な成分を有した完全食品であるとともに，子牛の免疫機能を経口的に補うことが出来る血液代替物質の側面を有していることを紹介したい．

Abstract

The domestic animals such as bovine are different from a human in placenta structure. In humans, fetal chorionic epithelium is bathed in maternal blood because chorionic villi have eroded through maternal endothelium. In contrast, the chorionic epithelium of bovine fetus remains separated from maternal blood by 3 layers of tissue. Therefore, the immunoglobulin can not be transferred through the placenta in fetus period. An antibody transfer via the colostrum to the newborn calf is the important role for the disease prevention. Colostrum is complete food having the nutritional ingredient, and also, the colostrum contains many immunostimulation factors for the disease prevention in newborn calf. In this article, I would like to introduce the examples that the cytokines in colostrum transfer orally from mother to a newborn calf.

Keywords

Colostrum, Immunoglobulin, Calf, Cytokine

１．母子免疫

感染症に対する抵抗性が抗体という形で母親から子へ伝えられる受動免疫の事象は「母子免疫」と一般的に理解されている．その移行抗体は，動物種によって移行様式が異なり，それは胎盤構造によって決定される．ヒト・霊長類（血・絨毛型胎盤）では，胎盤を経由してIgGが胎子に移行する．すなわち新生子は母親由来のIgGを持って出生するが，反芻動物のウシ（結合織・絨毛型胎盤）では胎盤を介しての抗体移行はなく，無グロブリン状態で出生する．従って，新生子期のグロブリン供給は，初乳中のグロブリンに依存しているため，家畜において初乳は新生子の感染防御上，重要な役割を担っている（Table 1）．

Table 1. Passive transfer of immunoglobulin to the newborn animals

Animal	Placenta structure	Fetal transfer	Transfer to newborn	
			Levels	Terms (hours)
Cow	Syndesmochorial Placentae	—	+++	24
Pig	Epitheliochorial Placentae	—	+++	24〜36
Horse	Epitheliochorial Placentae	—	+++	24
Dog	Endotheliochorial Placentae	+	++	24〜48

２．初乳中の成分

ウシの初乳（colostrum）は，液性成分と細胞成分に分けられ，各成分のいずれも新生子にとって重要な免疫学的役割を担っている．その成分は新生子にとって必要な栄養素すなわち，蛋白質，エネルギー源としての糖分，ビタミン，ミネラルを豊富に含んでいる[1]．初乳中蛋白質は，その50〜60％を免疫グロブリンが占め，その他ラクトフェリン，リゾチーム，ビタミン，

酪農学園大学 獣医学部　〒069-8501　北海道江別市文京台緑町582　School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, 582 Midorimachi, Bunkyodai Ebetsu-shi, Hokkaido 069-8501, Japan.

論文受付 2009年12月21日　論文受理 2010年２月10日

ホルモンなどで構成される．細胞成分としては，リンパ球，マクロファージそして好中球が存在する．初乳中の免疫グロブリン量は，初産牛よりも経産牛の方が，ホルスタイン種よりもジャージー種の方が多い傾向にあり[2]，品種により違いが認められる．一般的に，ウシの初乳はIgGが最も多く（38-80mg/ml），そのほとんどが母牛の血清から移行しているため，成分比は母親血清中の免疫グロブリン比と類似している（Fig. 1）．その比率は，常乳中においても同様の傾向を示している．一方，反芻獣以外のヒトやイヌの乳中グロブリンは，IgAが大半を占めており，前述の胎盤構造に依存した抗体移行の有無を補う理にかなった成分構成である．また，乳腺中に存在するIgA産生細胞は，腸管関連リンパ組織（gut associated lymphoreticular tissue: GALT）に由来し，分泌されるIgA（S-IgA）の特異性も母親の消化管で抗原提示を受けた各種細菌等の抗原を認識するものが多いことが知られている[3]．初乳中にはトリプシン阻害物質が含まれ，初乳の消化管における分解を抑制し，新生子ウシの消化管における抗体移行を助けている．

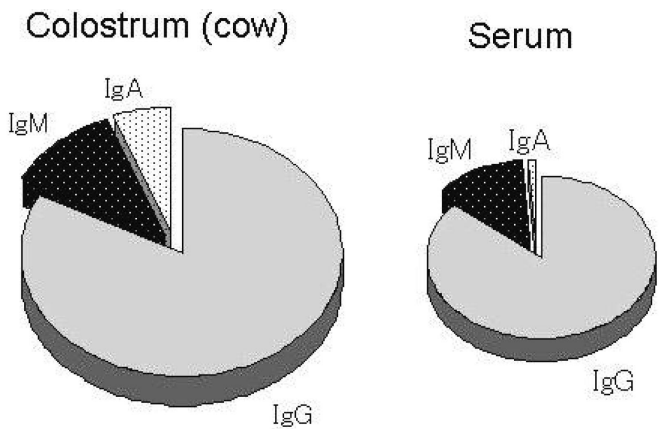


Fig. 1. 初乳中の免疫グロブリン濃度の比較
ウシの初乳中免疫グロブリン（IgG, IgM, IgA）比率は，血清中のそれとほぼ同様でIgGが豊富に含まれ，その構成比は常乳中も同様である．

３．初乳中の細胞

初乳中には白血球が１ml中約10^6個存在し，その内約半数は，Ｔリンパ球が占めている[4]．それらＴリンパ球の構成比率をFig. 2に示した．Ｔ細胞のサブセットでは，γδＴ細胞とCD8陽性Ｔ細胞が多くを占めている（Fig. 2）．これら初乳中リンパ球は，新生子に摂取された後，消化管で短時間（約24～36時間）生存し，その一部の細胞は消化管壁を通過し，乳び管や腸間膜リンパ節にまで移動していることが報告され，移行した母親由来の免疫細胞が新生子の感染防御に役立っている可能性が指摘されている[5,6]．その例として，毒素原性大腸菌の経口感染に対する抵抗性を調べた研究では，細胞成分を含んだ初乳を飲ませた子ウシの方が飲ませなかった子ウシよりも糞便中の大腸菌排泄が有意に促進され，血清中の大腸菌特異的IgAとIgM抗体の誘導が確認されている[7]．これらの知見から，初乳中に含まれているリンパ球も，新生子の感染抵抗性および感染防御に重要な役割を担っていると推察される．

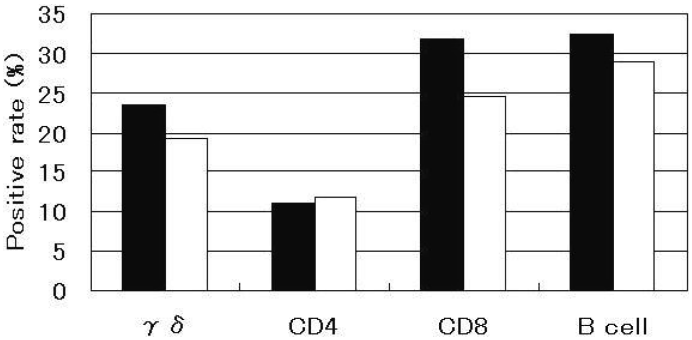


Fig. 2. 初乳中のリンパ球構成
ウシ初乳中に含まれるリンパ球をフローサイトメトリー解析すると，CD8及びγδＴ細胞がＢ細胞についで多く含まれ，その割合は経産牛に多いことが示された．■：経産牛，□：初産牛

４．初乳中の抗体の新生子移行

新生子への抗体移行は動物種によってその様式が異なり，それは胎盤構造によって決定される．反芻動物のウシ（結合織・絨毛型胎盤）において，抗体は胎盤を通過できず，初乳を介してのみ抗体が移行する．初乳中の抗体は新生子消化管粘膜上皮のFcレセプター（FcRn）に結合し，結合した抗体はピノサイトーシス（エンドサイトーシス）によって細胞内に取り込まれ，乳び管を経由して新生子に移行する．新生子が初乳中の免疫グロブリンを吸収し得る時間は生後０～24時間と極めて短時間であり[8]，その期間にほとんど全種のγ-グロブリンを吸収することが可能である．IgAは大半が消化管に留まるが，吸収された一部のIgAは上皮より腸管内へ再分泌される．

母親の乳腺中に存在するIgA産生細胞から分泌されるS-IgAは，病原微生物に対する中和抗体として働く以外に，腸管からの高分子抗原成分の吸収抑制の作用を有する．この作用は，一度経口的に入ってきた抗原に感作されるとその抗原に対するS-IgAが誘導され，その後同一抗原が入ってきてもS-IgAと結合し抗原吸収が阻止される持続感作防御機構である[9]．このようにウシにおいても，IgAは腸管の感染防御ならびに外来抗原吸収抑制に重要な役割を担っている．ウシにおける移行抗体の半減期は，IgGで16～32日，IgMで４日，IgAで2.5日であり，新生子の腎臓糸球体はγ-グロブリン透過性があるため一時的に尿中に排泄される．

また，飼養管理と抗体移行に関するいくつかの研究報告も存在する．母牛が栄養制限を受けた場合，初乳中のIgG量は影響を受けないが，その初乳を摂取した子ウシへの免疫グロブリン移行量が減少することが指摘されている[10,11]．また，初乳摂取後24～48時間における新生子ウシの血清中IgG量とその後の生存率調査結果では，死亡子ウシの半数以上の血清中IgG量が10mg/ml以下であったと報告されている．それ故，子ウシ血清中の移行抗体量は10mg/ml以上になるよう管理することが推奨されている[12]．

５．移行抗体と新生子免疫応答

初乳を摂取した新生子ウシとそうでない子ウシの白血球数を比較すると，初乳摂取した子ウシでは６～24時間後に有意な増加が認められ[13]，初乳摂取により末梢血中の貪食能を有する好中球や単球の数が増加することが知られている[14]．胎子や初乳未摂取の新生子のリンパ節中にはIgG1，IgG2，IgM及びIgA陽性細胞が存在するが，初乳を摂取した新生子では，IgG1及びIgG2陽性細胞の減少が認められ，初乳によるリンパ節中の免疫グロブリン陽性細胞率が影響を受ける[15]．一般にIgGを受身移入した（移行抗体の存在する）個体では，その後に感作する抗原に対する免疫応答が減弱する．特に移行抗体が存在する新生子にワクチンを接種しても抗体が誘導されない．この現象は，適切なワクチン接種時期の設定に影響する．この様な移行抗体による抑制作用は，B細胞の活性抑制と移行抗体による外来抗原のマスキングによるものである．前者は，抗原と結合したIgGがBリンパ球上のFcレセプター（FcγR IIb）と結合することにより，B細胞レセプター（BCR）を介する活性を阻害し，その抗原に対する抗体産生を抑制すると考えられている[4,16,17]．一方で，初乳摂取した生後２週齢の子ウシに *Pasteurella haemolytica* A1を２週間隔で免疫すると，血清中に莢膜抗原に対するIgMが検出されることが報告されており，移行抗体による抗体産生抑制はアイソタイプ特異的な現象であることが推測される[18]．移行抗体は，ワクチン接種後の抗原特異抗体産生に影響をおよぼすことが知られている．すなわち，移行抗体が存在する新生子にワクチンを接種しても十分な抗原特異的抗体が産生されないが，移行抗体消失時期にワクチンを接種するとその効果が現れ抗体が産生されるのである．従って，予防を目的としたワクチン接種は，移行抗体の減少期に実施することが効果的だが，それに際しては移行抗体の動態を調べる必要がある．実際，経済的な側面から，生産動物のワクチン予防効果と感染リスクの回避は常に頭を悩ます事例である．

６．初乳中の免疫活性化物質

最近ヒトを含め種々の動物由来の初乳中に様々なサイトカインが存在することが報告されている[19～25]．サイトカインは，多様な生物学的活性を有し種々の細胞に作用して，免疫系に作用する[30]．筆者らは，免疫細胞の分化増殖ならびに炎症反応に深くかかわっているサイトカインであるIL-1β，IL-6，TNF-αおよびIFN-γの４種類についてウシの乳清中の濃度推移を調べ，初乳中に測定した全てのサイトカインが含まれていることを明らかにした[25]．それらの濃度は分娩直後の初乳が最も高く，分娩後１週間から10日までに急激に減少を示した（Fig. 3）．そこで初乳中細胞における各種サイトカイン遺伝子発現を調べると，分娩直後に認められたほぼ全てのサイトカインmRNAの発現は，３日後には減少あるいは消失した．この結果から，初乳中のサイトカインは分娩前後の短い期間に盛んに合成されていたことが推測された．その中でもIFN-γは，主にT細胞から産生される細胞性免疫を活性化するサイトカインである．初乳中に多く含まれることから，初乳中のT細胞サブセットをモノクローナル抗体結合磁気ビーズで分離しそれらのIFN-γ遺伝子発現を調べると，CD8およびγδT細胞において高率に発現していることが明らかとなった[26]．新生子は特に細胞性免疫が未熟であるため，このような初乳中のリンパ球が産生するIFN-γが新生子の免疫活性化に一役を担っている可能性が示唆される．

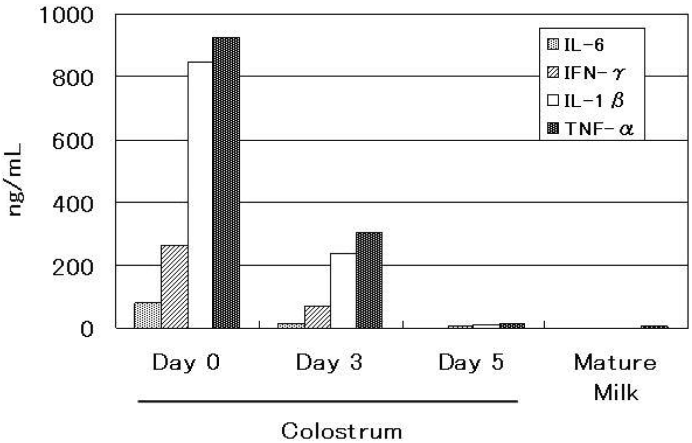


Fig. 3. 初乳中のサイトカイン
ウシ初乳中サイトカインの濃度変化を示した．各サイトカインは，分娩直後がもっとも高濃度を示し，分娩後3-5日の間に乳中から消失する．健常な乳中（常乳）には殆んど検出されない．

このように初乳中に多量のサイトカインが存在していることは，それを飲む新生子の免疫系に刺激を付与するものと考えられる．新生子ウシは，無グロブリン血漿のみならずIL-2やIFN-γ産生をはじめとした細胞性免疫の活性化因子の発現が極めて低いことが特徴である．従って，出生後の外来抗原に対するリンパ球の増加・活性化など感染抵抗性を付与するための要素が必要であり，その補給源として初乳中のサイトカインが重要な役割を担っている可能性が推察される[26,27]．

ヒトの初乳が，末梢血単核球（PBMC）のサイトカイン（IL-1，IL-2，IL-3およびIL-6）の産生促進やNK細胞の活性化作用を有することが報告されている[28]．筆者らも初乳由来の乳清を培地に添加して新生子ウシリンパ球に対する活性化能（リンパ球幼若化反応）を調べると，リンパ球幼若化反応が有意に促進することを確認した（Fig. 4）．また，新生子ウシのPBMCを初乳中に存在するサイトカイン（IL-1β，TNF-α或いはIFN-γ）で刺激すると，ConAに対する反応性が促進した[29]．この知見は，前述した初乳中サイトカイン濃度の推移と相関し，初乳中に存在するサイトカインが新生子のリンパ球などの免疫細胞を活性化する可能性を示唆している．実際に初乳を摂取した子ウシの血清中サイトカインを定量すると，摂取１日後をピークとして一過性の上昇が確認され，その後速やかに減少した[30]．また，Biotin標識したウシのリコンビナントIL-1βを出生直後の新生子ウシに経口投与した場合，血中へ一過性に移行し，好中球の増加を主とする白血球数の増加と活性酸素生成能の亢進が確認された[27]．

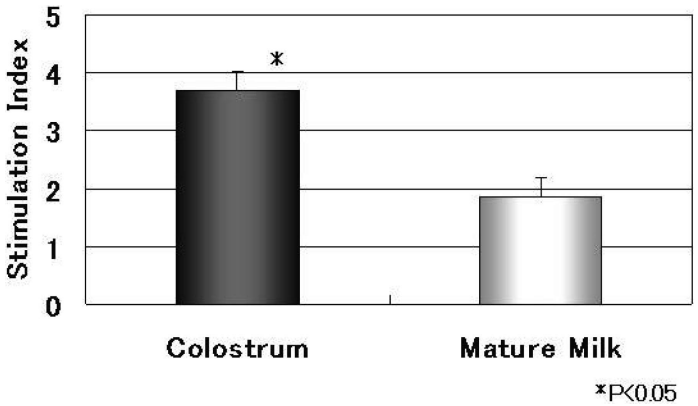


Fig. 4. 乳清添加によるリンパ球幼若化反応の比較
初乳或いは常乳（出荷乳）の乳清を10％添加した培地を用いCon Aに対する新生子牛のリンパ球幼若化反応を示した．初乳由来乳清を添加するとリンパ球幼若化反応が有意に亢進する．この反応は，初乳中に含まれるIL-2含量と相関する．

このように初乳は新生子に移行抗体の付与のみならず，それに含まれるサイトカインによって，抗体では補えない新生子の免疫細胞の活性化と感染防御に有効に働いていると考えられる．興味深いことに，これら初乳中に含まれるIL-1βは，炎症性サイトカインとして作用するが，実際には母牛の乳腺組織や新生子に対し炎症を惹起せず速やかに消失する．この事から，初乳中には過剰なIL-1作用の制御因子が存在することが推測された．そこで，サイトカイン抑制分子に注目してIL-1の抑制因子であるIL-1 receptor antagonist（ra）やIL-1 receptor type 2（R2）を測定すると，IL-1濃度と相関して乳中に存在していた[31]．この知見により，健常乳腺組織ではIL-1とともに，その制御性因子であるIL-1raやIL-1R2を同時に産生し，母牛の乳腺ならびに新生子体内における炎症波及の制御機構が働いている事が推察される．

７．新生子牛の免疫細胞の推移

生後直後の新生子ウシでは，特に末梢血中の好中球数が多く，好中球数とリンパ球数の比（N:L）が高い傾向にある[32,33]．このような白血球数の変化は，分娩時に産生される糖質コルチコイドに影響することが指摘され[34]，妊娠後期の胎子あるいは８～8.5ヶ月齢で帝王切開により生まれた新生子では認められない[33,35,36]．正常分娩で生まれた新生子の末梢血中の桿状核好中球出現は，生後直後では37％，24時間後には71％，48時間後では47％の個体で観察されるが，生後３週間には11％まで減少する．肉用牛のリンパ球数は，生後２日まで変化せず，生後３週齢頃に２倍に増えN:L比も１以下になりほぼ成牛と同じ比率となる[37]．一方，乳牛のリンパ球数は生後２日目までに２倍に増加する[33]．

造血幹細胞に由来する前駆細胞が胸腺内で成熟・分化し，末梢に分布するＴ細胞には，細胞表面にＴ細胞レセプター（TCR）を発現するが，大部分のＴ細胞はαβ型のレセプターを発現し，一部の細胞はγδ型のレセプターを発現する．αβ型のＴ細胞は，細胞表面にCD4やCD8分子を発現する細胞に分けられる．胎子，新生子血液中のＴ細胞表面分子の違いを調べるとCD4とCD8陽性細胞は，８ヶ月齢胎子で最も多く存在し，その割合は生後直後から120日齢まで減少が認められる．また，胎子と新生子の脾臓では成牛のそれより高い傾向を示す．血液中のγδ型Ｔ細胞も胎子期に最も多く，生後150日齢までに成牛レベルに減少するが，胎子と子ウシのリンパ節では，成牛よりもその数が多いのが特徴である[38]．著者らは，子ウシγδ型Ｔ細胞のサイトカイン遺伝子発現を調べた結果，細胞性免疫の活性化に関与するIL-2やIFN-γなどの発現は認められなかったが，それら細胞はIL-5やTGF-βなどIgAのクラススイッチを誘導するサイトカインを主に産生する傾向を示した（未発表）．このように新生子ウシのＴ細胞は，TGF-βを高発現する特徴を有している．また，Ｂ細胞とMHCクラスⅡ陽性細胞の割合は，新生子で低い傾向にあるが，初乳摂取した新生子の血液中MHCクラスⅡ陽性細胞と単球の割合は増加することが報告されている[14]．

８．終わりに

初乳を介する母子免疫は複雑かつ巧妙に感染防御と免疫活性化を新生子に付与していることが推察される．初乳を介した移行抗体は受動的な感染防御であるが，初乳中サイトカインなどは，新生子の免疫系細胞に直接・間接に作用してそれらを活性化させることから，能動的な免疫系賦活化作用により，感染防御能を助けているものと考えられる．母牛の血液中機能成分が，出生後初乳という形で血液代替物質となり，新生子の免疫機能活性化に寄与している事は興味深い現象である．今後の研究進展に伴う詳細な機序の解明が進むことにより，免疫機能の未熟な新生子に対する感染防御に対し，初乳がより発展的に応用される可能性が期待される．

参考文献

1. Quigley JD III, Drewry JJ. Nutrient and Immunity Transfer from cow to calf pre- and postcalving. J Dairy Sci 1998; 81: 2779-2790.
2. Tyler JW, Steevens BJ, Hostetler DE, Holle JM, Denbrigh JL. Colostrum immunoglobulin concentrations in Holstein and Guernsey cows. Am J Vet Res 1999; 60: 1136-1139.
3. McClelland DB, Antibodies in milk. J Reprod Fertil 1982; 65: 537-543.
4. Tizard IR, Immunity in the fetus and newborn. In: Tizard IR, ed. Veterinary Immunology: An Introduction. USA: W.B. Saunders Company, 1996; 210-221
5. Sheldrake RF, Husband AJ. Intestinal uptake of intact maternal lymphocytes by neonatal rats and lambs. Res Vet Sci 1985; 39: 10-15.
6. Williams PP. Immunomodulating effect of intestinal absorbed maternal colostral leukocytes by neonatal pigs. Can J Vet Res 1993; 57: 1-8.

7. Riedel-Caspari G. The influence of colostral leukocytes on the course of an experimental *Escherichia coli* infection and serum antibodies in neonatal calves. Vet Immunol Immunophathol 1993; 35: 275-288.
8. Deutsch HF, Smith VR. Intestinal permeability to proteins in herbivore. Am J Physiol 1957; 191: 271.
9. Stocks CR, Soothill JF, Turner W. Immune exclusion is a function of IgA. Nature 1975; 255: 745-746.
10. Burton JH, Hosein AA, Grieve DG, Wilkie BN. Immunogloblin absorption in calves as influence by dietary protein intake of their dams. Can J Anim Sci 1984; 64: 185-186.
11. Hough RL, McCarthy FD, Kent HD, Eversole DE, Wahlberg ML. Influence of nutritional restriction during late gestation on production measures and passive immunity in beef cattle. J Anim Sci 1990; 68: 2622-2627.
12. Wells SJ, Dargatz DA, Ott SL. Factors associated with mortality to 22 days of life in dairy herds in the United States. Prev Vet Med 1996; 29: 9-19.
13. Clover CK, Zarkower A. Immunological responses in colostrum-fed and colostrum-deprived calves. Am J Vet Res 1980; 41: 1002-1007.
14. Menge C, Neufeld B, Hirt W, Schmeer N, Bauerfeind R, Baljer G, Wieler LH. Compensation of preliminary blood phagocyte immaturity in the newborn calf. Vet Immunol Immunophathol 1998; 62: 309-321.
15. Aldridge BM, McGuirk SM, Lunn DP. Effect of colostral ingestion on immunoglobulin-positive cells in calves. Vet Immunol Immunophathol 1998; 62: 51-64.
16. Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H, Ravetch JV. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. Nature 1996; 379: 346-349.
17. Yuasa T, Kubo S, Yoshino T, Ujike A, Matsumura K, Ono M, Ravetch JV, Takai T. Deletion of fc gamma receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis. J Exp Med 1999; 189: 187-194.
18. Hodgins DC, Shewen PE. Serologic responses of young colostrum fed dairy calves to antigens of *Pasteurella haemolytica* A1. Vaccine 1998; 16: 2018-2025.
19. Bocci V, von Bremen K, Corradeschi F, Franchi F, Luzzi E, Paulesu L. Presence of interferon-γ and interleukin-6 in colostrum of normal women. Lymphokine Cytokine Res 1993; 12: 21-24
20. Dinarello C. Interleukin-1β in human colostrum. Res Immunol 1990; 141: 505-513.
21. Ginjala V, Pakkanen R. Determination of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and insulin-like growth factor (IGF-1) in bovine colostrum samples. J Immunoassay 1998; 19: 195-207.
22. Goto M, Maruyama M, Kitadate K, Kirisawa R, Obata Y, Koiwa M, Iwai H. Detection of interleukin-1 β in sera and colostrum of dairy cattle and in sera of neonates. J Vet Med Sci 1997; 59: 437-441.
23. Rudloff HE, Schmalstieg FC Jr, Mushtaha AA, Palkowetz KH, Liu SK, Goldman AS. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) in human milk. Pediatr Res 1992; 31: 29-33.
24. Saito S, Maruyama M, Kato Y, Moriyama I, Ichijo M. Detection of IL-6 in human milk and its involvement in IgA production. J Reprod Immunol 1991; 20: 267-276.
25. Hagiwara, K., Kataoka, S., Yamanaka, H., Kirisawa, R., Iwai, H., 2000, Detection of cytokines in bovine colostrum. Vet Immunol Immunopathol 76, 183-190.
26. Hagiwara K, Domi M, Ando J. Bovine colostral CD8-positive cells are potent IFN-gamma-producing cells. Vet Immunol Immunopathol 2008; 124: 93-8.
27. Hagiwara K, Yamanaka H, Higuchi H, Nagahata H, Kirisawa R, Iwai H. Oral administration of IL-1β enhanced the proliferation of lymphocytes and the O_2- production of neutrophils in newborn calves. Vet Immunol Immunopathol 2001; 81: 59-69.
28. Bessler H, Straussberg R, Hart J, Notti I, Sirota L. Human colostrum stimulates cytokine production. Biol Neonate 1996; 69: 376-382.
29. Yamanaka H, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai H. Proinflammatory cytokines in bovine colostrum potentiate the mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells from newborn calves through IL-2 and CD25 expression. Microbiol Immunol 2003; 47: 461-468.
30. Yamanaka H, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai H. Transient detection of proinflammatory cytokines in sera of colostrum-fed newborn calves. J Vet Med Sci 2003; 65: 813-816.
31. Hagiwara K, Kitajima K, Yamanaka H, Kirisawa R, Iwai H. Development of a sandwich ELISA assay for measuring bovine soluble type II IL-1 receptor (IL1R2) concentration in serum and milk. Cytokine 2005; 32: 132-136.
32. Adams R, Garry FB, Aldridge BM, Holland MD. Odde KG. Hematologic values in newborn beef calves. Am J Vet Res 1992; 53: 944-950.
33. Tennant B, Harrold D, Reina-Guerram M, Kendrick JW, Laben RC. Hematology of the neonatal calf: Erythrocyte and leukocyte values of normal calves. Cornell Vet 1974; 64: 516-532.
34. Mao XZ, Li SZ, Zhu ZK, Qin WL. The development changes and correlations of some blood hormone levels and immune indexes during the postnatal period in neonatal calves. Zentralbl Veterinarmed A. 1994; 41: 405-412.

35. Hubbert WT, Hollen EJ. Cellular blood elements in the developing bovine fetus. Am J Vet Res 1971; 32: 1213-1219.
36. Schultz RD, Confer F, Dunne HW. Occurrence of blood cells and serum proteins in bovine fetuses and calves. Can J Comp Med 1971; 35: 93-98.
37. Ryan GM. Blood values in cows: leucocytes. Res Vet Sci 1971; 12: 576-578.
38. Wilson RA, Zolnai A, Rudas P, Frenyo LV. T-cell subsets in blood and lymphoid tissues obtained from fetal calves, maturing calves, and adult bovine. Vet Immunol Immunopathol 1996; 53: 49-60.

総　説

人工細胞研究における巨大リポソーム

Giant liposomes in studies on artificial cells

湊元 幹太

Kanta Tsumoto

和文抄録

リポソームは，リン脂質を水に懸濁すると自然に形成される，２分子膜で包まれた閉鎖小胞であり，細胞の膜系モデル，薬剤や遺伝子の送達キャリアなどに利用されている．このうち，光学顕微鏡で観察できる～１μm以上のものを巨大リポソーム（giant liposome）と呼ぶ．μmサイズに着目し，人工細胞モデル的な観点からよく研究されてきたが，従来のリポソーム（～100 nm程度）でさかんな医療応用に関してはほとんど未知数である．本稿では，巨大リポソームに関して，①細胞機能・構造の模倣研究の例，②調製法の現状と課題点について述べ，③酸素運搬体としての可能性について推察する．このなかで，筆者らの研究である，遺伝子発現系を導入した巨大リポソーム，バキュロウイルス／昆虫細胞発現系を用いた巨大プロテオリポソーム調製法，糖含有薄膜の静置水和による単層の巨大リポソーム調製法についても，紹介したい．

Abstract

Liposomes are vesicles enclosed with lipid bilayers, which are spontaneously formed when phospholipid is suspended in an aqueous solution. They are often used as model cell membranes, drug or gene carriers, etc. Generally, liposomes with a diameter of more than ～1 μm, the size of which is large enough to observe using optical microscopy, are referred to as giant liposomes. Because they have such a large size as microns, they are well studied by researchers who have an interest in artificial cell models; however, their potentialities are not so explored for medical application, which is a common purpose for conventional small liposomes (～100 nm). In the present paper, I outline the studies using giant liposomes on (1) mimicking cell function and structure, (2) preparation methodologies of giant liposomes and their problems to be considered, and (3) the availability for substitution for oxygen carriers. I also mention, from our previous work, studies on encapsulation of a gene expression system to giant liposomes, preparation of giant proteoliposomes using a baculovirus/insect cell gene expression system, and enhanced formation of giant unilamellar vesicles by gentle hydration of sugar-containing phospholipid films.

Keywords

liposome, giant unilamellar vesicle, GUV, artificial cell, gentle hydration, proteoliposome

１．はじめに

“人工細胞（artificial cell）”研究は，細胞の機能の一部，あるいは全部を，人工的に模倣・再構成した物体を創ろうという試みであろう．その目的には，大雑把に見ると，医療応用研究の要請から，たとえば，人工赤血球（artificial red blood cell）のように特定の機能を発現することをめざすものと，生命現象の根本原理に対する興味に基づいて，いわゆる“最小細胞（minimal cell）”のようなものが人工的に創出されることをめざすものとがある，と思われる．伝統的には，人工細胞ということばの響きは，まず，本誌読者の関心事であるところの前者のことを想起させる[1]．一方，後者の立場からの人工細胞（モデル）研究も，最近，バイオインフォマティクスやバイオリソースの基盤の拡充も強力な後押しとなって，活発となってきている．筆者の興味は，どちらかといえば後者寄りであって，前者との関係は希薄ではあるものの，研究ではもっぱら人工脂質小胞（ベシクル，vesicle）であるリポソーム（liposome）を扱っている．周知の通り，このような脂質ベシクルは，血液代替物研究においても，とくに重要な位置を占めている．筆者らは，細胞に匹敵するサイズ（直径 ～10 μm以上）をもった巨大リポソーム（giant liposome）の調製法に関する研究なども手が

三重大学大学院 工学研究科 分子素材工学専攻　〒514-8507　三重県津市栗真町屋町1577　Division of Chemistry for Materials, Graduate School of Engineering, Mie University, 1577 Kurimamachiya-cho, Tsu, Mie 514-8507, Japan

論文受付 2010年１月７日　論文受理 2010年２月１日

けてきた．また，巨大リポソームは，その大きな内容積ゆえ，将来的に血液代替物をはじめ医学・薬学的な場面でその応用が期待されることも考えられる．そこで本稿では，私たちのこれまでの研究をまじえて，巨大リポソーム，ならびにそれを利用した人工細胞研究について情報を提供したい．そして，粗削りではあるが，巨大リポソームの細胞型酸素運搬体としての活用の可能性と課題点について推察したい．なお，“最小細胞”の実現をめざし，構成生物学の立場から生命の原理を解き明かそうとしているリーダー的存在の，P. L. Luisiが最近著した単行本[2]は，生命におけるベシクル構造の必然性に関する示唆に富んでおり，この類の研究の背景と現状とを深く理解する助けとなるので，関心がある方は一読されたい．

２．巨大リポソームによる人工細胞モデルの研究例

２.１　巨大リポソームとは

A. D. Banghamは，1964年に，レシチン（卵黄から抽出したホスファチジルコリン）の懸濁液の電子顕微鏡観察により，２分子膜のラメラ構造からなるベシクルが存在することを確認した[3]．さらに，Banghamのベシクルが，イオンを内封することができ，生体膜に似た透過性を示すこと[4]が，翌年報告された．これ以前にも古くから，脂質の懸濁液にはコロイド状のものが存在することは知られてはいたが，脂質膜のベシクルであることを明解に結論したBanghamの発見をもって，リポソームの発見とする[5,6]．リポソームは，種々の両親媒性脂質から調製することができ，今日まで，細胞膜のモデルとして広く研究に利用されている．一般に，リポソームの分類は，その調製法と形状，すなわちサイズとラメラリティ（lamellarity）によっておこなわれる．調製法は，クロロホルムやメタノールなどの有機溶媒に溶解したリン脂質の溶液をガラス容器内で蒸発させ，底面に脂質薄膜を形成し，それに水性の溶液を加えて脂質を水和・膨潤させることで調製する水和法（Bangham法）が，簡単であり，よく利用される．このほか，逆相蒸発法，有機溶媒注入法，界面活性剤除去法，押し出し法，などいくつも存在し，用途にあわせて選択されるが，その基本は，いったん単分子レベルまで脂質分子をばらばらに分散させたのち，ラメラ状に自発的に分子会合させることである[7-11]．形状による分類は，Fig. 1のようになる．まず，１枚（単層）の脂質２分子膜からなるベシクル（unilamellar vesicle, ULV）と，多重層のベシクル（multilamellar vesicle, MLV）に分けられる．ULVは，そのサイズにより，小さな単層ベシクル（small unilamellar vesicle, SUV），大きな単層ベシクル（large unilamellar vesicle, LUV），巨大な単層ベシクル（giant unilamellar vesicle, GUV）とさらに区分けされる．特徴的なサイズは，SUV，LUV, GUVでそれぞれ，おおよその直径が，～50 nm, ～100 - 1000 nm, ～10 - 200 μmである．これらの境界はかなり恣意的であるものの，通常，調製法によってできあがりのリポソームの形状が決まることが多いため（たとえば，超音波処理法ではSUVができる，など），それほど困ることはない．このうち，巨大リポソームは，GUVに該当する．ただ，このリポソームを扱うときには，後述するように，細胞と同じく光学顕微鏡で観察が可能であるという利点が重要であるため，ラメラリティよりもサイズに関心が向く場合が多い．そのため，巨大リポソーム（giant liposome, GL），巨大ベシクル（giant vesicle, GV），細胞サイズリポソーム（cell-sized liposome），細胞サイズベシクル（cell-sized vesicle）といった名称も頻繁に用いられている．現在では，“GUV”が略語として広く通用するようになっているが，注意すべきは，単層性が明らかでない場合にこのことばを用いることは不適当である点である．そして，巨大リポソームの調製においては，実は，単純に単層性のリポソームとならない場合がある．本稿では，単層性を強調する場合に“GUV”を用い，それ以外は“巨大リポソーム”で統一する．

巨大リポソームは，単純な水和法（Bangham法）で，簡単に作製できる．筆者もおこなってみたが，鶏卵の卵黄を注射器で抜き取りクロロホルムによって抽出したものを，ナスフラスコに入れロータリーエバポレーターで除去すると，黄色の薄膜が底面に形成される．そこに蒸留水を加えると，いとも簡単に白濁したリポソーム懸濁液が得られるが，それを位相差顕微鏡で観察すると，多様な形状の巨大リポソームが見られ，長時間眺めていても飽きることがない（Fig. 2）．おそらく，Banghamが初めに得たサンプルにも含まれていただろう．リポソームの発見の後，比較的早い時期から，水和法をはじめとしたいくつかの方法で形成した巨大リポソームの報告がなされている[12-15]．しかし，他のリポソームとは異なり，細胞ほどの大きな内容積をもつにもかかわらず医療・産業面での応用はあまりなされなかった．その理由として，LUVやSUVで可能なサイジング処理が使えず，また，大小のリポソームを効率的に分離する技術もないため，多分散性が回避できないこと，そして，生理的な

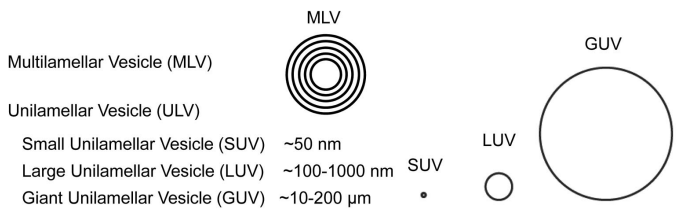


Fig. 1. Classification of liposomes based on lamellarity and size.

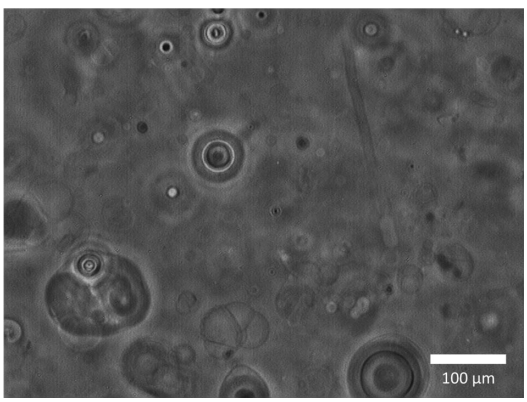


Fig. 2. Microscopic image of giant liposomes spontaneously formed from dry films prepared from lipid extracted from egg yolk.

イオン強度の溶液中では，大量かつ安定的・効率的に調製することが難しいことなどが挙げられる．一方，基礎研究においては，①固定することなく光学顕微鏡で観察できる，②膜の変形・崩壊・透過性の増大などのダイナミクスが可視化できる[16,17]，③相分離など膜の局所構造が観察できる[18]，④光ピンセット[19,20]やマイクロマニピュレーター[21]で直接操作できる，といった大きいサイズに由来する利点があるため，細胞（膜）モデルとして多用されてきた．これらの実験では，顕微鏡ステージの上で，目的に適った巨大リポソームを個別に選択し，単一ベシクルレベルで観察をおこなうため，上述した多分散性はあまり問題とならない．

2.2　細胞構造・機能の模倣

μmサイズをもったベシクルは，細胞の生化学的，生物物理学的プロセスを内包させる微小な反応の場として最適である．細胞の機能を切り取り，その基本的な責任因子の一部を組み入れた，単純な巨大リポソームにおいて，どのような“生物らしい”ふるまいが出現するか．そんな興味は，人工細胞モデルの研究においても，大きな役割を果たしてきた．そのような研究のさきがけに，名古屋大学・宝谷らの，細胞骨格タンパク質を巨大リポソームに封入する一連の研究がある[16,22,23]．アクチンやチューブリンの重合に共役した巨大リポソームの変形（突起の形成）などが観察され，単純な系で生きた細胞を思わせる動きとなっている．さらに，巨大リポソームを用いた細胞挙動の模倣として興味深い研究には，たとえば，次が挙げられる．①浸透圧や光感受性脂質による出芽や陥入（エンドサイトーシス）の模倣[24,25]，②３成分系（dioleoylphosphatidylcholine（DOPC）/ dipalmitoylphosphatidylcholine（DPPC）/cholesterolのように，低融点脂質／高融点脂質／コレステロールの系）からなる巨大リポソーム膜上での（液体秩序相l_o／液体無秩序相l_d）相分離によるラフト様構造（マイクロドメイン）の形成[18]，③polyethylene glycol（PEG）とデキストランによる水性２相分離を，PEG修飾脂質を含む巨大リポソームに封入したときの，ベシクル内部の区画（コンパートメント）形成とそれに連動した形態変化[26,27]，そして，④コレステロール量による巨大リポソーム間のニューロン様ネットワークの形成[28]，などである．これらに共通する点は，比較的単純な化学物質あるいは物理条件のコントロールによって，生命を感じさせる挙動が誘発されていることである．また，巨大リポソームをモデル細胞膜として目的タンパク質の機能解析に用いる例[29]は，近年，一般的となってきており，手法としてのGUVが定着したといえる．

人工細胞モデルの構築に，巨大リポソームを微小な反応場として用いる場合，どのような細胞機能を組み込むことが求められるだろうか．私たちは，これまでとこれからの研究を概観し，Fig. 3に示す機能を備えさせた“マイクロロボット”のようなものを提出した[30]．ベシクル内には，これまで代謝関連をはじめ多くの酵素反応は封入されているが[2]，自律的にふるまう人工細胞モデルには，“セントラルドグマ”の封入と，外部から内部への信号を受け取り，また内部から外部へ発信する経路とを構成することが必須と考えられる．前者については，筆者を含む多くの研究者が，ベシクル内に核酸配列とタンパク質発現系の封入を試み報告している（これらの仕事は，P. L. Luisiの著書[2]にまとめられている）．筆者らは，吉川・野村らのT4ファージDNA高分子鎖（全長約50 μm）の封入と可視化観察[31]を受けて，巨大リポソームへの転写系封入と可視化解析を行った[19]．鋳型となるT7プロモーターをもった巨大DNA（λ ZAPII），T7 RNAポリメラーゼ，adenosine triphosphate（ATP），guanosine triphosphate（GTP），cytidine triphosphate（CTP），蛍光標識したuridine triphosphate（UTP）（BODIPY-UTP）を含む転写反応溶液によりリン脂質薄膜（DOPC/ dioleoylphosphatidylglycerol（DOPG））を水和して，転写反応系を捕捉した巨大リポソームを調製した（Fig. 4）．DNA（4',6-diamidino-2-phenylindole

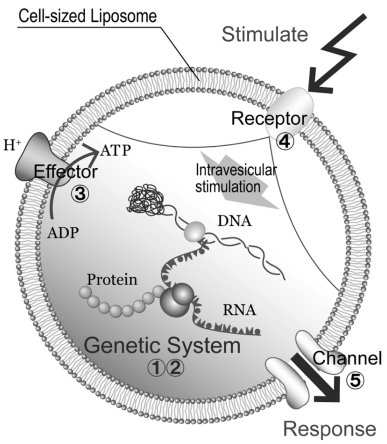


Fig. 3.　A cartoon of an artificial cell model constructed on a giant liposome, which is modified from ref.[30]

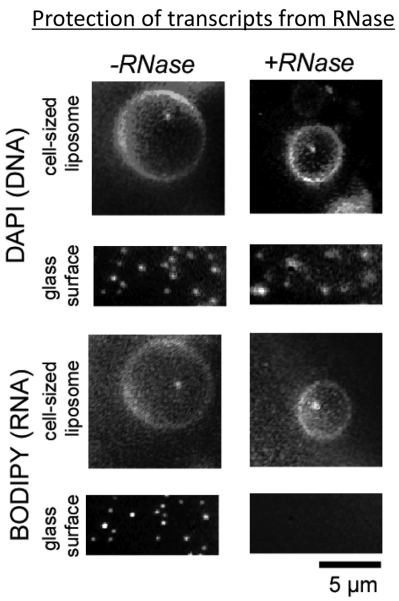


Fig. 4. Entrapping a transcription（RNA synthesis）system within a giant liposome. Ongoing transcription was observed using a laser scanning microscope. RNA inside a giant liposome was protected from digestion by externally added RNase, while RNA outside was degraded.（This image is originally published in ref.[19]）

（DAPI））とRNA（BODIPY）の共染色により，リポソーム内部のDNA上でのRNA合成が認められた．外部よりRNA分解酵素（RNase）を施しても，リポソームは保護能を示し，内部で転写されたRNAは分解されずに残った．筆者らはさらに，巨大リポソーム内部での遺伝子発現を試みた[32]．T7プロモーター下流に緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子をもったプラスミドDNAを，T7 RNA ポリメラーゼ，無細胞タンパク質合成系（大腸菌抽出液）とともに，静置水和法で巨大リポソーム内へ取り込んだ（Fig. 5）．興味深いことに，わざと発現活性が悪くなるよう，キットのうち必須添加物の濃度を低くしたところ，巨大リポソームのいくつかにおいて内部でGFPが高発現（外部に比べ，～10倍の活性亢進）しているのが確認された．この理由は明らかではない．しかし，巨大リポソーム内部へ高分子を取り込む濃度にかなりのばらつきがあること[33]，また大阪大学の四方らのグループが明らかにしているように本質的に反応容積が大きくばらつくこと[34]，などから考えると，低発現活性条件で高発現側に傾いた巨大リポソームが顕微鏡観察により選択された，と思われる．

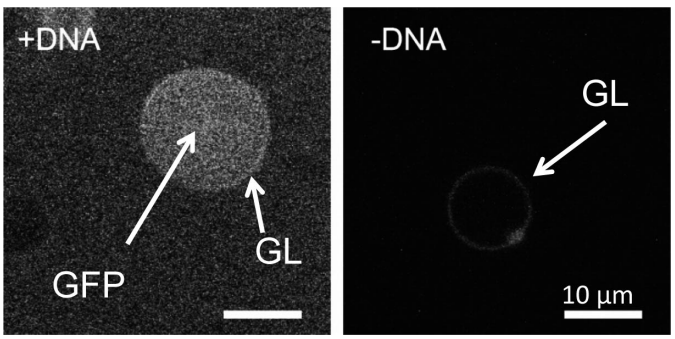


Fig. 5. Entrapping a gene expression system inside a giant liposome (GL). Plasmid DNA containing a green fluorescent protein (GFP) gene, T7 RNA polymerase, *E. coli* extract and other requisite components were mixed in one solution, and then phospholipid films were hydrated with the solution. Giant liposomes containing the gene expression systems were spontaneously formed. Without plasmid DNA, no GFP was observed.

2.3　巨大プロテオリポソームの構築

内外をつなぐ膜界面の機能再構成も，人工細胞研究には欠かせない．これらは主に膜タンパク質のはたらきである（Fig. 3）．膜タンパク質を再構成したリポソームをプロテオリポソーム（proteoliposome），とくにμmサイズのものは，巨大プロテオリポソーム（giant proteoliposome）という[35]．東京大学の桐野らのグループが，かなり早い時期に作製に成功しており，パッチクランプ法でイオンチャネルの活性を解析した[35]．ただ，純粋な脂質ベシクルに目的の（組換え）膜タンパク質を再構成したものを得ることは比較的難しい．現在よく用いられる手法は，まず，従来の界面活性剤除去法などで小さなプロテオリポソームを調製し，次にそれを，巨大リポソームへ膜融合させる[36]，または，電極上で乾燥・薄膜化してエレクトロフォーメーション法（electroformation，後述）に供する[37]，のいずれかである．小さなプロテオリポソーム調製を経ない方法としては，無細胞タンパク質発現系で発現した膜貫通タンパク質を直接脂質２分子膜へ埋め込む手法が注目される[38,39]．筆者らは，近年，組換えタンパク質発現系として頻用されるバキュロウイルス（*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, AcNPV）／昆虫細胞（Sf9細胞）発現系を用いて，巨大プロテオリポソームを調製した．膜タンパク質を組み込んだAcNPVに感染したSf9細胞は，さかんに目的のタンパク質をエンベロープ膜に搭載した出芽ウイルス（budded virus, BV）をつくる．このBVは弱酸性条件下，酸性脂質（ホスファチジルセリン，ホスファチジルグリセロールなど）を含むリポソームと膜融合する．このようにして，アセチルコリンレセプターやG protein coupled receptor（GPCR）の組換えプロテオリポソームが，あらゆるサイズのリポソームから調製できる[40-42]．（Fig. 6に甲状腺刺激ホルモン受容体を再構成した巨大プロテオリポソームの顕微鏡像を示す．）このような手法を組み合わせると，シグナル伝達のような細胞膜の高次機能が巨大リポソーム上で発現できるかもしれない．

今後，これらの研究の進展によって，生命らしい人工細胞が創出できると期待される．本稿に関連した内容は，他にもまとめられているので参考にされたい[43,44]．

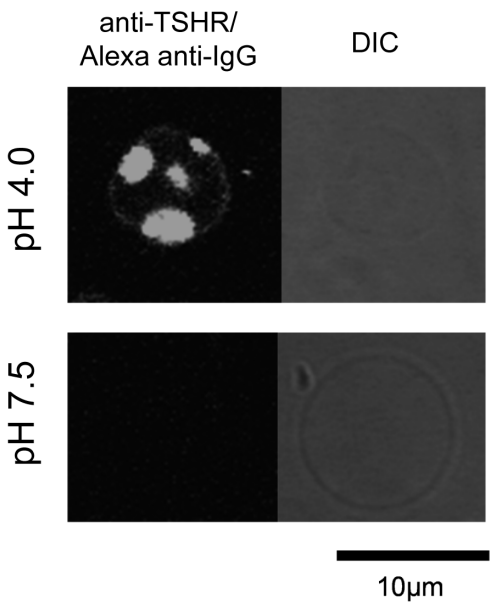


Fig. 6. Giant proteoliposomes on which thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) was reconstituted. TSHR is a member of G protein coupled receptor (GPCR) family. TSHR on giant proteoliposomes was visualized with rabbit polyclonal anti-TSHR antibody reacted with Alexa 488 conjugated anti-rabbit IgG antibody. Baculovirus BV was fused with giant liposomes only under an acidic condition (pH 4.5).

３．巨大リポソーム調製法

３.１　形成のメカニズム

上述のように，リポソーム調製は，リン脂質分子の分散と，ラメラ状への再会合（大気中での乾燥薄膜，あるいは水中での２分子膜）のステップからなる．したがって，巨大リポソームについても種々の調製法があるが（文献[8,11]に詳しい），水和法が好まれているようである．これまでに紹介した例のほとんどで，巨大リポソームは水和法（静置水和法，あるいはelectroformation法）で作製されている．水和法は，簡便かつ穏和な条件で行うので，生体分子の活性を損なうことなくリポソームに封入することができる．水和法では，有機溶媒に溶かした脂質分子から，まず２分子膜がラメラ構造に積層した乾燥薄膜を，ガラス面，または電極面に形成させる．蒸留水や緩衝液に浸し，静かに水和させるか（静置水和法，natural swelling, gentle hydration），または交流電場印加下で水和させ（electroformation），膨潤した巨大リポソームを得る．水和の過程で，ラメラ間隙が剥離しやすい状況では単層性のGUVが，そうでなければ多重層（multilamellar, or oligolamellar）の巨大リポソームが生じる．したがって，GUVを得るためには，ファンデルワールス力に打ち勝って膜間に斥力的な相互作用がはたらかなくてはならない．ふつう，膜の波打ち（undulation）や構造水の重なりのため，流動性のある温度ではラメラ間隙は広がる[45]．しかし，生理食塩水のようにイオン強度が高い溶液で水和するとGUV形成は著しく阻害される．特に，静置水和法では，細胞膜の主成分である電気的に中性のホスファチジルコリン（phosphatidylcholine, PC）のGUVはできない．PCからなるGUVは，生物化学だけでなく物性科学でも重要な素材であったため，調製法の研究がさかんにおこなわれてきた．electroformation法では，交流電場による水和・膨潤が促進される．静置水和法では，PC膜間に斥力的相互作用を，①親水性基への２価カチオン（Mg^{2+}, Ca^{2+}）の親和[46,47]，②水溶性高分子（PEG）修飾脂質の含有による排除体積の利用[48]，によって導入することで，塩溶液中でのGUV形成が可能となった（Fig. 7）．ラメラ間隙の反発には，２価カチオンにより引き込まれた対イオン（Cl^-）が生む浸透圧差の重要性も示唆された[47]．筆者らは，これをヒントに，薄膜調製時に浸透物質として水溶性の糖をドープすることで，高効率のPC-GUV調製法を考案した．

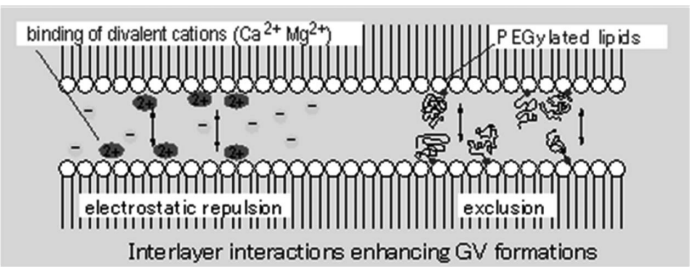


Fig. 7. Interlayer repulsive interaction enhancing GUV formation.

３.２　糖含有薄膜による水和法

筆者らは，ラメラ間隙に糖がサンドイッチされたリン脂質薄膜を静置水和することで，塩溶液でもGUVが得られるよう改良した（Fig. 8）[49]．Dioleoylphosphatidylcholine（DOPC）と，メタノールへの溶解度が比較的高いヘキソース（glucose, fructose, mannoseなど）を，クロロホルム／メタノール（v/v = 2:1）に溶かし，アルゴン気流下で揮発させ薄膜を調製する．この糖含有薄膜を蒸留水に浸すと，速やかに水和・膨潤しリポソームが得られる（Fig. 9）．図のように，DOPCのみの薄膜からはいびつな巨大リポソームは生じるが，GUVはできていない．一方，糖含有薄膜からはGUVが形成された．水和直後，ラメラ間隙は極めて高濃度の糖水溶液で満たされ，外部のバルクの水に対して著しく高い浸透圧となっている．これを解消するため，水が膜を透過，あるいは，薄膜のエッジから回り込んでしみこみ，このときの水の浸透がラメラ間を引き離し，単層のリポソームを膨潤させる，と考えられる（Fig. 8）．形成個数や，GUVのサイズ分布は，仕込むリン脂質と糖のモル比に影響される（Fig. 10）．糖/脂質が大きいと，高イオン強度での形成が可能となったが，ある値より大きくなるとGUVが形成しなくなった．これは薄膜のラメラ構造が崩れることによる．また，蒸留水水和でも，糖/脂質は１以上必要であった．この閾値の存在は，膜間を引き離す反発力は転移的に生じることを意味し，GUV形成にunbinding transitionと呼ばれる現象が重要であることを示唆している[50]．このように糖含有薄膜による静

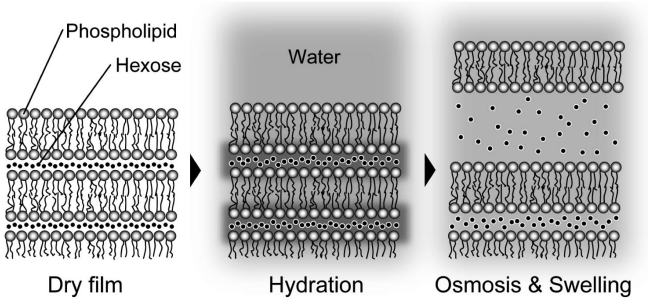


Fig. 8. Schematic representation of sugar-sandwiched phospholipid films and their hydration process. (This is originally published in ref.[49]).

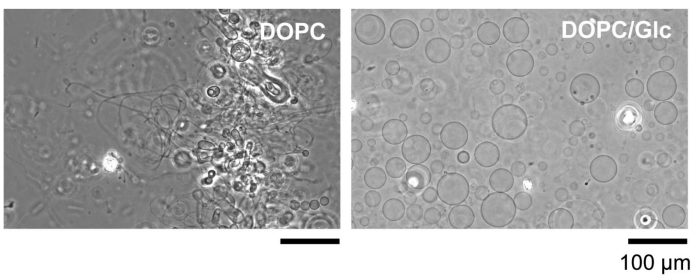


Fig. 9. Enhanced formation of GUVs from sugar (glucose, Glc)-containing DOPC films. Giant spherical and unilamellar liposomes were only observed (right) using phase contrast microscopy. Aggregated liposomes with uneven structure were observed when pure DOPC films were hydrated (left). (This is originally published in ref.[49]).

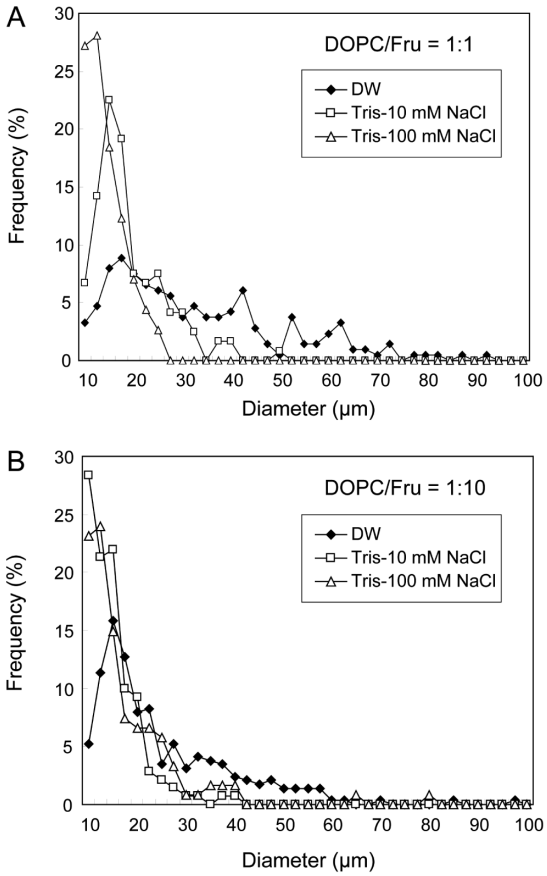


Fig. 10. Size distributions of GUVs prepared from sugar (fructose, Fru)-containing DOPC films. DOPC/Fru = 1:1 (A) and 1:10 (B) in molar ratio. (This is originally published in ref.[49]).

置水和法は，GUV形成における膜間反発のコントロールの重要性を，明確に示す例である．

3.3　デザインされた調製法と課題

現在まで，いろいろな巨大リポソーム調製法が報告されているが，生理的イオン環境で，高効率，高収量で作る方法は，まだないようである．その理由の１つには，リポソームがミセルのような平衡構造ではないことが挙げられ，したがって，同じ最終組成であっても形成経路に依存した構造を呈すると考えられる[2,51-53]．この点は留意すべきである．逆に言えば，形成経路を含めて新規にデザインすることで，用途に合わせた，所望の巨大リポソームを作れるだろう，ということである．油水界面に張った単分子膜に細胞サイズの単分子膜で覆われた油中水滴を通すことでリポソームを形成させたり[54]，平面膜にパルスジェットの流れを当てることでリポソーム形成させる[55]，アガロースを足場とした脂質フィルムを水和するとPBS中で巨大リポソームが形成する[56]，など従来の水和法とは違った興味深い作製法が報告されている．将来，血液代替物としてGUVが利用されるとすれば，おそらく目的にあった調製法の新規考案がともなうのだろう．

４．細胞型運搬体としての可能性

現在，リポソーム型のヘモグロビン小胞体（hemoglobin vesicle, HbV）が，最も有力な酸素運搬の血液代替物として期待されている．HbVのサイズは，サブミクロン（230-250 nm）に揃えられているが，直径１-３μmの巨大リポソームからなるHbVであれば，内容積がおよそ10^3倍に増え，また，血管を通過する際の変形能が期待できれば，到達性，安定性の面からも有利かもしれない．しかしながら，上述したように，複雑な脂質組成と内容物をもつGUVを大量に調製することは，難しい．さらに，GUVサイズは多分散であり，サイジングの課題もある．これまでのGUV研究成果を，HbVへの転用可能性の議論に単純には援用できない．そこで，ここでは粗削りであるが，巨大リポソームそのものの研究知見をベースに，これを巨大なHbVとして利用する場合に想定される課題点について，サイズならびに形状安定性の視点から，簡単に述べるにとどめたい．

４.１　封入率とサイジング

濃縮操作をともなわないリポソームへの物質の封入率は，単純な“囲い込み”によって見積もれる．このとき，封入率は，リン脂質濃度，リン脂質分子の断面積（占有面積），リポソーム径の関数となる（Fig. 11）．封入率は，濃度と径に比例するため，直径１μm程度のGUVとすれば，１mMのリン脂質では封入率が10％未満となってしまうが，10-100 mM以上なら，30％以上の範囲で調整可能である．このリン脂質濃度は，通常の実験濃度としてふつうに利用されている．単純には，同じ封入率でも，サイズが大きくなると脂質濃度を下げることができるが，安定性の劣化や調製過程のロスは避けられない．Fig. 12は，静置水和法で調製したものを５μm径の孔をもったポリカーボネートメンブレンフィルターで濾過したGUVの顕微鏡像である．濾過前には，サイズのばらついたGUVであったが，濾過後は見かけ上，均一になっている．このことから，フィルターによるサイジングは効果的と思われるが，収量の低下，リーク，孔径以下のリポソームの除去などに，課題が残る．既存のGUV調製法を参考にしながらも，HbVに適したGUV形成プロセスの設計が，必要となるだろう．

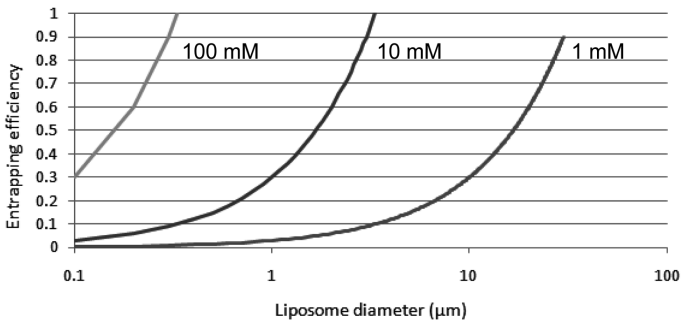


Fig. 11. Roughly estimated entrapping efficiency of GUVs. The efficiency is a function of phospholipid concentration, section of a molecule of phospholipid, and radius of a liposome, as follows: (Entrapping efficiency) = (1/6) $CN_A ar$, where C is the phospholipid concentration, a is the section of a phospholipid molecule, r is the radius of a liposome, and N_A is Avogadro constant.

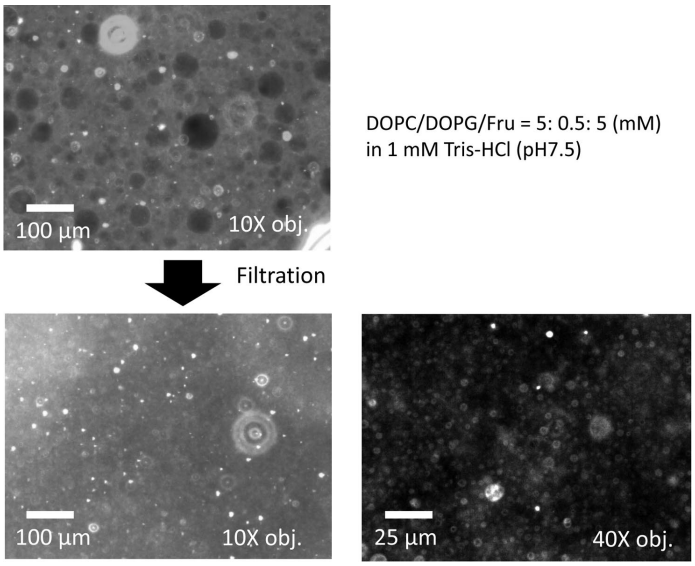


Fig. 12. Reduction of sizes of giant liposomes using 5 µm-pored polycarbonate membrane filter (Millipore Isopore). After filtration, smaller GUVs were obtained, as shown in a dark field microscopic image (40× objective lens).

4.2　形状安定性

血中分散安定度や血中滞留性の向上のため，HbV表面はPEGにより修飾されている[57]．リポソームは，通常，肝臓や脾臓などの細網内皮系細胞により貪食されるが，表面がPEGなどの水溶性高分子で修飾されることにより，これらから捕捉されにくくなる，いわゆるステルス性を帯びるようになる．ステルス性はHbVの機能維持に必要であるが，上述の通り，PEG修飾は巨大リポソームを生理的塩環境で安定的に形成するためにも効果的である[48]．一方，PEG修飾により巨大リポソーム膜は曲がりにくくなる[58]．したがって，次に述べる変形能への影響があると考えられる．

巨大リポソームの大容量は，酸素運搬能を考えると魅力的である．しかし，血管内でのさまざまなストレスに耐えなければ膜の崩壊や損傷が生じ，内包物が漏れてしまうだろう．巨大リポソームは，このようなストレスへ耐えうるだろうか．たとえば，赤血球は，毛管中における種々の条件の粘性流に適応して変形する柔軟性をもっていることが知られている[59]．巨大リポソームは赤血球と異なり形状が対称であるため，流れの中でこれほどの明確な適応は示さないものの，流体の粘性に依存して，変形と運動モードの変化を見せることがある[60]．また，一般に，リポソーム膜は水をよく透過する半透膜であるため，巨大リポソームは外部の環境変化を感じ取って比較的速やかに変形することができる．変形を誘発するきっかけは，温度変化，浸透圧変化，電場・磁場の変化，静水圧変化，膜構成分子の挿入・分解・内葉外葉での分布の変化，膜への相互作用因子の吸着，などによって膜内外でのバランスが崩れることである．表面積一定の条件で最大の容積を与える形状は球であるが，このようなバランスの崩れが起こると，流動性が高い脂質２分子膜を水が透過することによって，内部の体積が調整され，巨大リポソームは変形する．特に浸透圧に対する応答性は顕著であり，内部溶液より高浸透圧の溶液にさらすことで，チューブや数珠，海星，凹んだ形状などが現れる[16,24]．上述の細胞骨格タンパク質であるアクチン繊維との相互作用による巨大リポソームの形状変化も[16,22,23]，このような膜内外のバランスの崩れによって引き起こされる現象であるが，膜の安定性を高めるという観点からも興味深い[61]．赤血球の脂質組成をもたせて巨大リポソームを形成しても，赤血球のような膜弾性は得られない[62]．しかし，簡単な合成脂質からなる巨大リポソーム内層をアクチンで被覆するだけでも，剪断に対する応答性が天然の細胞にかなり近づくことが報告されている[63]．

巨大リポソームの変形能を活かすには，PEGの表面修飾や細胞骨格様の構造などによって膜の安定性を高めつつも，膜の曲げ弾性と水の透過性を適度に保たねばならない．また，適当な脂質分子溜めがリポソーム膜上にないと，過度の膨張には耐えられず破裂する．これらの特性は，外部因子のほか，膜脂質分子，表在分子，封入分子などの種類や組成にも影響されるため，目的に適った構成を検討する必要がある．巨大リポソームが，たとえば毛細血管のような経路の中でどのように振る舞うのか，に至っては私の知る限りにおいて，理論，実験とも研究がほとんどなく，検証すべき課題であろうと思われる．

5．おわりに

巨大リポソームは，細胞サイズという特徴から，人工細胞研究に適した素材として注目を集めてきた．細胞機能を模倣するため，個別のプロセスや因子を組み込んだ研究が進み，一定の成功を収めている．今後は，内容物だけでなく，膜タンパク質なども組み込んで，より高次の相互作用系を再構成した巨大リポソームの構築が待たれる．そのためにも，調製法の研究が，さらに重要となるだろう．平衡構造でないため，形成過程に依存した形態をとるという巨大リポソームの特性は，用途・目的に応じた調製法の設計が枢要であることを強く示唆する．血液代替物として利用する場合にも，このことが当てはまると思われる．

6．謝辞

本稿で紹介した筆者の研究は，三重大学招聘教授・吉村哲郎先生，京都大学教授・吉川研一先生，ならびに京都大学物質－細胞統合システム拠点特定研究員・野村 M．慎一郎博士とともにおこなってきたものです．そのほか多くの先生方，学生諸氏の協力も得て遂行されました．ここに感謝いたします．また，筆者の巨大リポソーム調製法の研究に興味を示していただき，本誌に執筆させていただけるきっかけを与えて下さった，東宝塚さとう病院名誉院長・高折益彦先生に深謝申し上げます．

参考文献

1. Chang TM. Artificial Cells: Biotechnology, Namomedicine, Regenerative Medicine, Blood Substitutes, Bioencapsulation, and Cell/Stem Cell Therapy (Regenerative Medicine,

Artificial Cells and Nanomedicine, vol.1). Singapore: World Scientific Publishing, 2007.
2. ピエル・ルイジ・ルイージ. 創発する生命, 化学的起源から構成的生物学へ. 白川智弘, 郡司ペギオー幸夫訳. 東京 : NTT出版, 2009.
3. Bangham AD, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. J Mol Biol 1964; 8: 660-668.
4. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J Mol Biol 1965; 13: 238-252.
5. 井上圭三, 野島庄七. リポソーム概論. 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三編. リポソーム. 東京 : 南江堂, 1988: 1-19.
6. 奥直人. リポソーム概論. 秋吉一成, 辻井薫監修. リポソーム応用の新展開, 人工細胞の開発に向けて. 東京 : エヌ・ティー・エス, 2005: 4-11.
7. 砂本順三, 岩本清. リポソームの調製. 砂本順三, 井上圭三編. リポソーム. 東京 : 南江堂, 1988: 21-40.
8. 寺田弘, 吉村哲郎編. ライフサイエンスにおけるリポソーム, 実験マニュアル. 東京 : シュプリンガー・フェアラーク東京, 1992.
9. 奥直人. リポソームの作成と実験法. 東京 : 廣川書店, 1994.
10. Lasch J, Weissig V, Brandl M. Preparation of liposomes. In: Torchilin VP, Weissig V, eds. Liposomes, second edition. New York: Oxford University Press, 2003: 2-29.
11. 佐塚泰之, 島内寿徳, 久保井亮一. リポソームの調製法. リポソーム応用の新展開, 人工細胞の開発に向けて. 東京 : エヌ・ティー・エス, 2005: 33-45.
12. Reeves JP, Dowben RM. Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. J Cell Physiol 1969; 73: 49-60.
13. Hub HH, Zimmermann U, Ringsdorf H. Preparation of large unilamellar vesicles. FEBS Lett 1982; 140: 254-256.
14. Mueller P, Chien TF, Rudy B. Formation and properties of cell-size lipid bilayer vesicles. Biophys J 1983; 44: 375-381.
15. Oku N, Scheerer JF, MacDonald RC. Preparation of giant liposomes. Biochim Biophys Acta 1982; 692: 384-388.
16. Hotani H, Nomura F, Suzuki Y. Giant liposomes: from membrane dynamics to cell morphogenesis. Curr Opin Colloid Interface Sci 1999; 4: 358-368.
17. Tamba Y, Yamazaki M. Single giant unilamellar vesicle method reveals effect of antimicrobial peptide magainin 2 on membrane permeability. Biochemistry 2005; 44: 15823-15833.
18. Veatch SL, Keller SL. Seeing spots: complex phase behavior in simple membranes. Biochim Biophys Acta 2005; 1746: 172-185.
19. Tsumoto K, Nomura SM, Nakatani Y, Yoshikawa K. Giant liposome as a biochemical reactor: transcription of DNA and transportation by laser tweezers. Langmuir 2001; 17: 7225-7228.
20. Ichikawa M, Yoshikawa K. Optical transport of a single cell-sized liposome. Appl Phys Lett 2001; 79: 4598-4600.
21. Needham D, Zhelev DV. The mechanochemistry of lipid vesicles examined by micropipet manipulation techniques. In: Rosoff M, ed. Vesicles, surfactant science series, vol.62. New York: Marcel Dekker, Inc., 1996: 373-444.
22. Honda M, Takiguchi K, Ishikawa S, Hotani H. Morphogenesis of liposomes encapsulating actin depends on the type of actin-crosslinking. J Mol Biol 1999; 287: 293-300.
23. Nomura F, Honda M, Takeda S, Inaba T, Takiguchi K, Itoh TJ, Ishijima A, Umeda T, Hotani H. Morphological and Topological Transformation of Membrane Vesicles. J Biol Phys 2002: 28; 225-235.
24. Hamada T, Miura Y, Ishii K, Araki S, Yoshikawa K, Vestergaard M, Takagi M. Dynamic processes in endocytic transformation of a raft-exhibiting giant liposome. J Phys Chem B 2007; 11: 10853-10857.
25. Ishii K, Hamada T, Hatakeyama M, Sugimoto R, Nagasaki T, Takagi M. Reversible control of exo- and endo-budding transitions in a photosensitive lipid membrane. ChemBioChem 2009; 10: 251-256.
26. Long MS, Jones CD, Helfrich MR, Mangeney-Slavin LK, Keating CD. Dynamic microcompartmentation in synthetic cells. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 5920-5925.
27. Cans AS, Andes-Koback M, Keating CD. Positioning lipid membrane domains in giant vesicles by micro-organization of aqueous cytoplasm mimic. J Am Chem Soc 2008; 130: 7400-7406.
28. Nomura SM, Mizutani Y, Kurita K, Watanabe A, Akiyoshi K. Changes in the morphology of cell-size liposomes in the presence of cholesterol: formation of neuron-like tubes and liposome networks. Biochim Biophys Acta 2005; 1669: 164-169.
29. Wollert T, Wunder C, Lippincott-Schwartz J, Hurley JH. Membrane scission by the ESCRT-III complex. Nature 2009; 458: 172-177.
30. 湊元幹太, 吉川研一. 人工モデル細胞とミクロ・ロボティクス. 日本ロボット学会誌　2007; 25: 186-190.
31. Nomura S, Yoshikawa K. Giant phospholipid vesicles entrapping giant DNA. In: Luisi PL, Walde P, eds. Giant vesicles. West Sussex:John Wiley & Sons, 2000: 313-317.
32. Nomura SM, Tsumoto K, Hamada T, Akiyoshi K, Nakatani Y, Yoshikawa K. Gene expression within cell-sized lipid vesicles. ChemBioChem. 2003 Nov 7; 4(11): 1172-5.
33. Dominak LM, Keating CD. Polymer encapsulation within giant lipid vesicles. Langmuir 2007; 23: 7148-7154.

34. Hosoda K, Sunami T, Kazuta Y, Matsuura T, Suzuki H, Yomo T. Quantitative study of the structure of multilamellar giant liposomes as a container of protein synthesis reaction. Langmuir 2008; 24: 13540-13548.
35. Saito Y, Hirashima N, Kirino Y. Giant proteoliposomes prepared by freezing-thawing without use of detergent: reconstitution of biomembranes usually inaccessible to patch-clamp pipette microelectrode. Biochem Biophys Res Commun 1988; 154: 85-90.
36. Kahya N, Pécheur EI, de Boeij WP, Wiersma DA, Hoekstra D. Reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles via peptide-induced fusion. Biophys J 2001; 81: 1464-1474.
37. Girard P, Pécréaux J, Lenoir G, Falson P, Rigaud JL, Bassereau P. A new method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles. Biophys J 2004; 87: 419-429.
38. Nomura SM, Kondoh S, Asayama W, Asada A, Nishikawa S, Akiyoshi K. Direct preparation of giant proteo-liposomes by in vitro membrane protein synthesis. J Biotechnol 2008; 133: 190-195.
39. Kaneda M, Nomura SM, Ichinose S, Kondo S, Nakahama K, Akiyoshi K, Morita I. Direct formation of proteo-liposomes by in vitro synthesis and cellular cytosolic delivery with connexin-expressing liposomes. Biomaterials 2009; 30: 3971-3977.
40. Fukushima H, Mizutani M, Imamura K, Morino K, Kobayashi J, Okumura K, Tsumoto K, Yoshimura T. Development of a novel preparation method of recombinant proteoliposomes using baculovirus gene expression systems. J Biochem 2008; 144: 763-770.
41. Fukushima H, Matsuo H, Imamura K, Morino K, Okumura K, Tsumoto K, Yoshimura T. Diagnosis and discrimination of autoimmune Graves' disease and Hashimoto's disease using thyroid-stimulating hormone receptor-containing recombinant proteoliposomes. J Biosci Bioeng 2009; 108: 551-556.
42. Tsumoto K, Yoshimura T. Recombinant proteoliposomes prepared using baculovirus expression systems. Methods Enzymol 2009; 465: 95-109.
43. 野村M.慎一郎, 秋吉一成. 細胞機能をどこまで組み立てられるか？セルサイズリポソーム工学から人工細胞モデルへ. 化学と工業　2006; 59: 860-863.
44. 湊元幹太, 吉川研一. 序論2：細胞機能の模倣とモデルシステムの構築. 宇理須恒男編. ナノメディシン, ナノテクの医療応用. 東京：オーム社, 2008: 279-286.
45. 山崎昌一. 生体膜の溶媒和. 永山國昭編. 水と生命, 熱力学から生理学へ. 東京：共立出版, 2000: 79-96.
46. Akashi K, Miyata H, Itoh H, Kinosita K Jr. Preparation of giant liposomes in physiological conditions and their characterization under an optical microscope. Biophys J 1996; 71: 3242-3250.
47. Magome N, Takemura T, Yoshikawa K. Spontaneous formation of giant liposomes from neutral phospholipids. Chem Lett 1997; 26: 205-206.
48. Yamashita Y, Oka M, Tanaka T, Yamazaki M. A new method for the preparation of giant liposomes in high salt concentrations and growth of protein microcrystals in them. Biochim Biophys Acta 2002; 1561: 129-134.
49. Tsumoto K, Matsuo H, Tomita M, Yoshimura T. Efficient formation of giant liposomes through the gentle hydration of phosphatidylcholine films doped with sugar. Colloids Surf B Biointerfaces 2009; 68: 98-105.
50. Yamada NL, Hishida M, Seto H, Tsumoto K, Yoshimura T. Unbinding of lipid bilayers induced by osmotic pressure in relation to unilamellar vesicle formation. EPL: Europhys Lett 2007; 80: 48002.
51. 吉川研一. 自己組織化. 石渡信一, 桂勲, 桐野豊, 美宅成樹編. 生物物理学ハンドブック. 東京：朝倉書店, 2007: 585-588.
52. Rodriguez N, Pincet F, Cribier S. Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: a comparison by fluorescence microscopy. Colloids Surf B Biointerfaces 2005; 42: 125-130.
53. Nishimura K, Hosoi T, Sunami T, Toyota T, Fujinami M, Oguma K, Matsuura T, Suzuki H, Yomo T. Population analysis of structural properties of giant liposomes by flow cytometry. Langmuir. 2009; 25: 10439-10443.
54. 山田彩子, 濱田勉, 吉川研一. 細胞サイズリポソームの新しい作製法とその応用. 生物物理 2009; 49: 256-259.
55. Funakoshi K, Suzuki H, Takeuchi S. Formation of giant lipid vesiclelike compartments from a planar lipid membrane by a pulsed jet flow. J Am Chem Soc 2007; 129: 12608-12609.
56. Horger KS, Estes DJ, Capone R, Mayer M. Films of agarose enable rapid formation of giant liposomes in solutions of physiologic ionic strength. J Am Chem Soc 2009; 131: 1810-1819.
57. 武岡真司. ヘモグロビンをカプセル化した人工赤血球. リポソーム応用の新展開, 人工細胞の開発に向けて. 東京：エヌ・ティー・エス, 2005: 618-623.
58. Bivas I, Vitkova V, Mitov MD, Winterhalter M, Alargova RG, Méléard P, Bothorel P. Mechanical properties of lipid bilayers containing grafted lipids. In: Luisi PL, Walde P, eds. Giant vesicles. West Sussex:John Wiley & Sons, 2000: 207-219.
59. Sakai H, Sato A, Okuda N, Takeoka S, Maeda N, Tsuchida E. Peculiar flow patterns of RBCs suspended in viscous fluids and perfused through a narrow tube（25μm). Am J

Physiol Heart Circ Physiol. 2009; 297: H583-H589.
60. Mader MA, Vitkova V, Abkarian M, Viallat A, Podgorski T. Dynamics of viscous vesicles in shear flow. Eur Phys J E. 2006; 19: 389-397.
61. Miyata H, Hotani H. Morphological changes in liposomes caused by polymerization of encapsulated actin and spontaneous formation of actin bundles. Proc Natl Acad Sci USA. 1992; 89: 11547-11551.
62. Sleep J, Wilson D, Simmons R, Gratzer W. Elasticity of the red cell membrane and its relation to hemolytic disorders: an optical tweezers study. Biophys J. 1999; 77: 3085-3095.
63. Limozin L, Roth A, Sackmann E. Microviscoelastic moduli of biomimetic cell envelopes. Phys Rev Lett. 2005; 95: 178101

トピックス

微小血管分岐部内の人工赤血球/赤血球動態に関する流体シミュレーション

Numerical study on flow behaviors of red blood cells with liposome-encapsulated hemoglobin at microvascular bifurcation

百武 徹 [(1)]，松本 健志 [(2)]
Toru Hyakutake [(1)], Takeshi Matsumoto [(2)]

和文抄録

ナノカプセル型人工赤血球とヒト赤血球を含む微小血管分岐部内の流体シミュレーションを行った．２次元Ｙ型微小血管分岐部モデルを作成し，分岐部内における赤血球と人工赤血球の挙動を追跡することで，分岐後の各血球分配特性を調べた．流体の解析には混相流解析に有効な格子ボルツマン法（LBM）を適用した．赤血球と流体の連成解析にはImmersed boundary法を，赤血球膜にはneo-Hookeanモデルを用いた．各血球間のインタラクションにはMorseポテンシャルを適用した．赤血球のみを流した場合，血球分配の偏りが見られ，血しょう分離が生じた．一方，赤血球の半分を同体積の人工赤血球に置換した場合，赤血球はさらに偏りを示したが，人工赤血球は主流部において血しょう層に多く分布しているために，一部は赤血球の行き届かない分岐部へと分配され，結果として酸素分配の偏りが解消された．これらの結果は，人工赤血球への置換が微小循環系における酸素供給の不均一性改善へ貢献していることを示唆している．

Abstract

Flow analysis at microvascular bifurcation after partial replacement of red blood cell (RBC) with liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) was performed using the lattice Boltzmann method. A two-dimensional bifurcation model with a parent vessel and daughter branches was considered, and the distributions of the RBC and LEH were calculated. In the present study, the immersed boundary method was employed to incorporate the fluid-membrane interaction between the flow field and deformable RBC. The cell membrane is treated as a neo-Hookean viscoelastic material and a Morse potential was adopted to model the intercellular interaction. When only RBCs flowed into the daughter branches with unevenly distributed flows, plasma separation occurred and the RBC flow to the lower-flow branch was disproportionately decreased. On the other hand, when the half of RBC was replaced by isovolumic LEH, the biasing of RBC flow was enhanced whereas LEH flowed favorably into the lower-flow branch, because many LEH within the parent vessel are suspended in the plasma layer that is impenetrable to RBCs. Consequently, the branched oxygen fluxes became nearly proportional to flows. These results indicate that LEH facilitates oxygen supply to branches that are inaccessible to RBCs.

Keywords

liposome-encapsulated hemoglobin, red blood cell, microvascular bifurcation flow, lattice Boltzmann method, biased flux

１．はじめに

急速な少子高齢化の到来に伴う輸血用血液製剤不足の解消，また現行の血液製剤に対する様々なリスクの軽減を目指し，現在，赤血球製剤の代替物として，様々なタイプの人工酸素運搬体が開発中である[1,2]．このうち，ヘモグロビンをリポソームに封入したカプセル型人工赤血球は，主に日本で開発が先行して

（1）横浜国立大学大学院 工学研究院　〒240-8501　横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5　Faculty of Engineering, Yokohama National University, 79-5 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama-city, Kanagawa 240-8501, JAPAN
（2）大阪大学大学院 基礎工学研究科　Graduate School of Engineering Science, Osaka University
論文受付 2009年11月２日　論文受理 2010年３月９日

おり，すでに赤血球代替物としての有用性が確認されつつある[3,4]．

カプセル型人工赤血球は，その直径が約200-250 nmとヒトの赤血球の1/30程度のナノスケールの粒子であり，血管抵抗が大きく赤血球が到達できない微小循環部位にも容易に酸素を運搬することができると考えられる．したがって，びまん性虚血を来すような不均一性の高い微小循環においては，赤血球の人工赤血球への置換が血流不均一性の改善へつながると考えられており，微小循環障害治療薬としての用途も期待されている．一方，このような人工赤血球の循環器疾患に対する効果に関する研究は，主に医学的観点からいくつかの研究が行われている[5-7]ものの，血管内における各血球挙動の流体力学的な考察はあまりされていない．微小循環系における人工赤血球輸送プロセスをより詳細に記述し，その作用機序を解明するためには，流体力学的観点に基づいた研究も重要であると考えられる．

微小血管内の流れの特徴として，赤血球と血管径が同じスケールの大きさとなるため，流れに対して赤血球のレオロジー的性質が無視できなくなることが挙げられる[8,9]．このような微小血管内における赤血球挙動，特にその変形に注目した研究は近年多く報告されている[10-13]．特に流体シミュレーションの貢献は大きく，各々の数値解析手法は赤血球の変形挙動をよく説明している．一方，微小血管分岐部における赤血球の分配に関して，これまで球形粒子や円盤形粒子を用いた低レイノルズ数におけるT型分岐部の実験[14]やin vivo実験による実験式の提案[15]など，現象の観察に基づいた研究が行われてきたが，微小血管分岐部における血球分配のメカニズム解明に関してはさらなる研究が求められている．我々は，これまで赤血球を簡単な剛体球粒子として仮定し，人工赤血球と赤血球が混在する微小血管分岐部内を対象として，不均一性改善のメカニズム解明を目的とした流体シミュレーションを行ってきた[16]．本論文では，さらに変形を考慮した赤血球モデルを用いて微小血管分岐部内の流体シミュレーションを行った．分岐部での赤血球と人工赤血球の分配特性を調べることにより，人工赤血球投入による酸素供給の不均一性改善メカニズムを明らかにできると考えられる．

2．解析手法

2.1　概要

本研究では，Fig. 1右のような2次元Y型微小血管分岐部モデルを構築した．管径はMurrayの法則[17]に従い，主流血管の直径D_0 = 20 μmに対して，分岐（娘）血管b_1, b_2の直径D_1 = D_2 = 15.87 μmとした．分岐角度はα_1 = α_2 = 45 °である．ここで，主流血管の流量Q_0に対して分岐血管の流量Q_1, Q_2とし，この割合を変化させることによって，様々な血流分配比で解析を行った．この分岐部モデルにおいて重要となるのが，主流血管に流入してくる赤血球，および人工赤血球の管断面における血球分布である．一般に，赤血球は変形により管中心部へ軸集中し，管壁に血しょう層が形成される．この現象を再現するために，本研究では，Fig. 1左のように予め各血球を含む直管内流れ（ポワズイユ流れ）の解析を行い，十分に時間が経った状態の管断面の血球分布を本分岐モデルでの主流血管の血球分布に適用した．

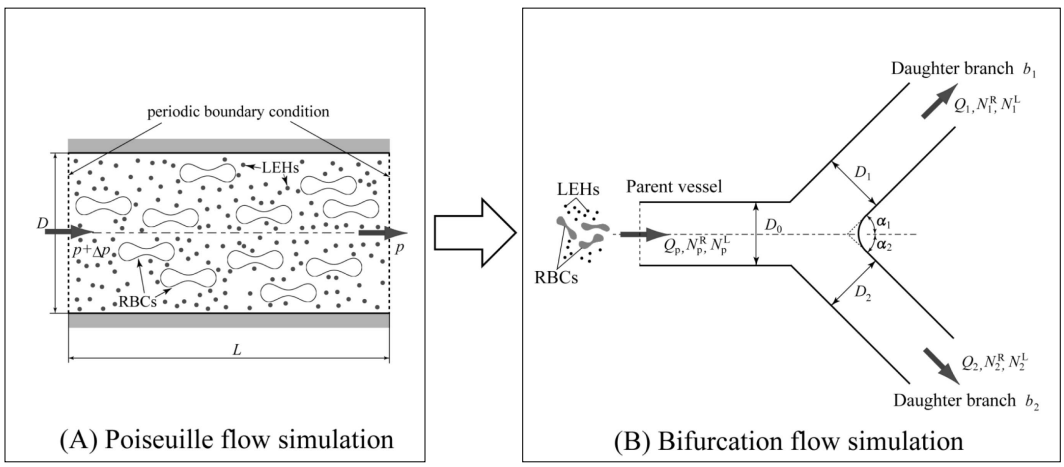


Fig. 1. (A) A geometry of two-dimensional Poiseuille flow (B) A two-dimensional symmetric Y bifurcation geometry. Flow in the parent vessel is not necessarily divided equally into two daughter branches, b_1 and b_2. Superscripts R and L indicate RBC and LEH, respectively.

2.2　流体シミュレーション手法

本研究では流体の解析に格子ボルツマン法（Lattice Boltzmann method, 以下LBM）[18,19]を適用した．LBMとは，Fig. 2右上に示すように，連続体である流体を各格子上にある仮想的な粒子の集合体と仮定し，この仮想粒子の速度分布関数を用いて衝突と並進の計算を繰り返すことにより，流体の巨視的変数を求める手法である．LBMの特徴として，1）アルゴリズムが簡単であるため並列計算に適している，2）複雑な形状に対して境界条件の設定が容易である，3）質量および運動量の保存性に優れているなどがあり，特に液滴や気泡などを含む混相流の解析に適した手法として近年注目されている流体解析手法のひとつである．したがって，本研究の対象となってい

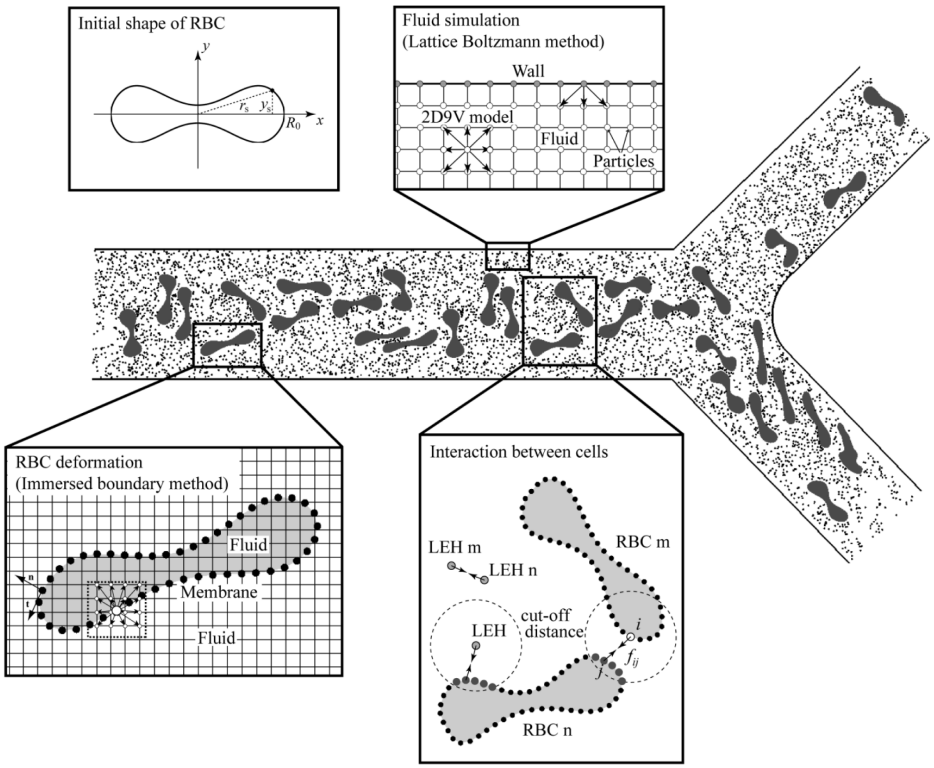


Fig. 2. Flow analysis at microvascular bifurcation was performed using the lattice Boltzmann method. The equation proposed by Evans and Fung[20] was employed for the initial shape of RBC. The immersed boundary method was employed to incorporate the fluid-membrane interaction between the flow field and deformable RBC. The cell membrane is treated as a neo-Hookean viscoelastic material and a Morse potential was adopted to model the intercellular interaction. Flow in the parent vessel was assumed to be fully developed (Poiseuille flow).

る様々な血球を含む混相流の解析に対して有効であると考えられる．なお，LBMの支配方程式については付録を参照して頂きたい．

2.3　赤血球のモデル化

赤血球の形状に関して，次式のように変形していない状態をFig. 2左上のようにEvans and Fung[20] によって提案された両凸形状とした．

$$y_s = \left[1-\left(\frac{r_s}{R_0}\right)^2\right]^{\frac{1}{2}}\left[C_0+C_1\left(\frac{r_s}{R_0}\right)^2+C_2\left(\frac{r_s}{R_0}\right)^4\right] \qquad (1)$$

ここで，R_0 = 3.91 μm, C_0 = 0.81 μm, C_1 = 7.83 μm, C_2 = −4.39 μmである．さらに，Fig. 2左下のように赤血球膜を節点で表現し，計算開始後はImmersed boundary法[21] を用いて赤血球膜と流体との連成解析を行った．また，赤血球膜モデルに関してはneo-Hookeanモデル[22] を考え，赤血球膜を表す節点にかかる力を次のように考えた．

$$\mathbf{T} = T_e\mathbf{t} + T_b\mathbf{n} \qquad (2)$$

ここで，$\mathbf{t}$, $\mathbf{n}$はそれぞれ赤血球膜上での接線方向および法線方向を示す．T_e, T_bはそれぞれ，節点にかかる張力および曲げ抵抗を表している．2次元膜においてT_eは以下のように表される．

$$T_e = \frac{E_s h}{\varepsilon^{3/2}}\left(\varepsilon^3 - 1\right) \qquad (3)$$

ここで，εは節点間距離の伸長率，E_sは膜の弾性係数，hは膜厚を示している．T_bに関しては次の曲げ抵抗[22,23] を考えた．

$$T_b = \frac{d}{dl}\left[E_b\left(\kappa - \kappa_0\right)\right] \qquad (4)$$

ここで，κは曲率，κ_0は初期形状の曲率，E_bは曲げ係数，lは膜表面に沿った弧長を示している．このモデルは厳密に赤血球膜を表現している訳ではないが，特徴的な赤血球運動特性（軸集中やtank-treading motion）を再現できており，本研究の目的である微小血管分岐部内における人工赤血球/赤血球の分配特性を調べることに関してはこの簡単なモデルで問題ないと考えられる．赤血球膜に関するパラメータは文献[24] に従った．

次に，赤血球および人工赤血球間のインタラクションに関しては，Fig. 2右下のようにカットオフ距離内において赤血球の節点i, j間に次のようなMorseポテンシャルから導かれる力が働くと考えた．

$$f(r)_{ij} = -\frac{\partial\phi(r)_{ij}}{\partial r} = 2D_e\beta\left[e^{2\beta(r_0-r)} - e^{\beta(r_0-r)}\right] \qquad (5)$$

ここで，rは節点i, j間の距離，D_eは表面エネルギー，βはスケーリングファクターである．また，r_0は節点i, j間でポテンシャルの最も低い距離を意味している．つまり，$r = r_0$でf = 0となる．主なパラメータは文献[26] に従った．今回，カットオフ距離$r_c = r_0$とし，赤血球の節点間には斥力のみがかかるとした．

流体シミュレーションの利点として，このカットオフ距離や，式（5）で用いられるパラメータ，さらには赤血球膜のパラメータを変化させることにより，赤血球凝集や赤血球変形能低下といった様々な赤血球動態を簡単に取り扱うことができることが挙げられる．

2.4　人工赤血球のモデル化

一般に，管内を流れる剛体粒子は，その回転により管軸と壁面の間に平衡位置が存在する[25]．平衡位置に達するまでの時間はレイノルズ数に依存しており[26]，レイノルズ数が低くなるほど平衡位置に達するまでの時間が長い．今回の微小血管分岐部では非常にレイノルズ数が小さいために，ナノ粒子としての人工赤血球単体が周囲の流体から受ける力はその半径方向への移動にほとんど寄与しないと考えてよい．一方，本シミュレーションでは，赤血球の半分を同体積の人工赤血球に置換した場合を想定しているため，人工赤血球の全体積は大きく，人工赤血球同士または赤血球とのインタラクションによる移動が流れに大きな影響を与えると考えられる．したがって，本研究では，粒子が流体から受ける力による回転の影響は考慮していないが，Fig. 2右下のように，人工赤血球間，および赤血球膜の節点との間に対してMorse ポテンシャルを適用した．

本解析では，人工赤血球を直径D_L = 300 nmの剛体粒子として取り扱い，遅い粘性流の2次元円柱周りで成り立つオセーン近似[27] に基づき，人工赤血球および流体の速度（各々$\mathbf{V}$および$\mathbf{u}$）から人工赤血球にかかる力$\mathbf{F}$を求めた．

$$\mathbf{F} = \frac{1}{2}\rho_L(\mathbf{V}-\mathbf{u})^2 D_L \frac{8\pi}{\mathbf{R}_L(2.002-\log\mathbf{R}_L)},\quad \mathbf{R}_L = \frac{(\mathbf{V}-\mathbf{u})D_L}{\nu} < 0.5 \quad (6)$$

これにより，次ステップのおける人工赤血球の速度，および位置を求めることができる．

2.5　計算条件

まず，血管内に赤血球と人工赤血球の混在するポワズイユ流れについての説明を行う．Fig. 1左に示すように，初期条件として赤血球と人工赤血球を計算領域内にランダムに配置し，時間の経過とともに各血球は領域内を流れる．赤血球の初期形状は式（1）より両凹形状とした．計算領域は管直径D = 20 μm, 管の長さL = 50 μmとした．上流面と下流面の境界条件には圧力差のある周期境界条件を適用し，壁面の境界条件にはすべりなし境界条件[28] を用いた．ここで，流体力学で重要な無次元数であるレイノルズ数を定義する．

$$\mathrm{Re} = \frac{u_m D}{\nu} \quad (7)$$

u_mは管内の平均流速，Dは管直径，νは流体の動粘性係数を表している．本計算では，u_m = 5.0 mm/s, ν = 1.0 mm^2/sとした．したがってレイノルズ数は0.1となる．

次に，分岐部モデルについての説明を行う．前述のように，D_0 = 20 μm，D_1 = D_2 = 15.87 μm，分岐角度はα_1 = α_2 = 45 °である．流体に関して，分岐後の流量Q_1, Q_2とし，血流分配比Q_1/Q_pを様々に変化させて解析を行った．主流血管に流入する各血球分布は，ポワズイユ流れの解析結果を用いた．血しょうはニュートン流体を仮定している．各血球は主流血管より流入後，分岐血管b_1, b_2のどちらかに分配され，計算領域外に移動したところで消去される．分岐血管b_1, b_2に分配された赤血球の数をそれぞれN_1^R, N_2^R，人工赤血球の数をN_1^L, N_2^Lとし，各血球分配比N_1^R/N_p^R, N_1^L/N_p^Lを求めた．

本研究では，赤血球と人工赤血球の割合として二つの場合を想定した解析を行った．ひとつは，人工赤血球を含まない場合で赤血球のヘマトクリットはHt^R = 0.30である．もうひとつは，赤血球のヘマトクリットの半分を同体積の人工赤血球へ置換した場合（Ht^R = Ht^L = 0.15）である．それぞれの結果を比較検討することで分岐部内における人工赤血球投与の効果を調べた．

3．結果

まず始めに，ポワズイユ流れの解析結果を示す．Fig. 3上に赤血球のみ（Ht^R = 0.30）を流した場合のある瞬間での赤血球の様子，および管断面における赤血球膜の節点分布を示す．赤血球膜の節点分布は，赤血球膜を表す各節点が下流面を通過する際の半径方向座標をカウントすることにより算出している．分布図の横軸ηは赤血球膜を表わす節点と中心軸との無次元距離を表している．Fig. 3より明らかなように，赤血球は流体との干渉，さらには血球間のインタラクションにより変形しながら管内を流れた．特に，壁面付近では流れのせん断応力が大きいため，赤血球はより変形をしながら管中心へと移動し，いわゆる軸集中が生じた．結果として，本シミュレーション手法により，管内の壁面付近で赤血球の存在しない血しょう層の形成[8,9] が再現できた．Fig. 3下に赤血球のヘマトクリットの半分を人工赤血球に置換した場合（Ht^R = Ht^L = 0.15）のある瞬間での各血球の様子，および管断面における赤血球膜の節点分布と人工赤血球の中心点分布を示す．黒い点が人工赤血球を表している．ヘマトクリットの減少により赤血球の軸集中は促進され，血しょう層が厚くなっていることが分かる．これにより，サイズの小さい人工赤血球はこの血しょう層へと移動し，結果として，赤血球とは異なり人工赤血球は血しょう層付近に多く分布するようになった．

前述のポワズイユ流れの解析結果を用いて，分岐部内流れの解析を行った．まず，赤血球のみを分岐部内に流した場合の結果を示す．Fig. 4に，それぞれ血流分配比Q_1/Q_p = 0.20および0.50における500, 2500, 4500 stepでの赤血球流れの様子を示す．Fig. 4より，分岐部付近では，赤血球は大きく変形をしながら，血流分配比に応じて各分岐血管へと分配された．また，Q_1/Q_p = 0.50では赤血球もほぼ同数がそれぞれの分岐血管へ分配されるのに対して，Q_1/Q_p = 0.20では二つの分岐血管間の血流分配量が大きく異なるため，赤血球の多くは血流分配量が多い分岐血管b_2へと分配され，結果として分岐血管b_1の赤血球分配比N_1^R/N_p^Rは0.12となり，Q_1/Q_p によりも小さくなった．さらにQ_1/Q_pが減少すると，赤血球分配比N_1^R/N_p^Rはほとんど0となり，血しょう分離が生じた．

次に人工赤血球を投与した場合（Ht^R = Ht^L = 0.15）を考える．

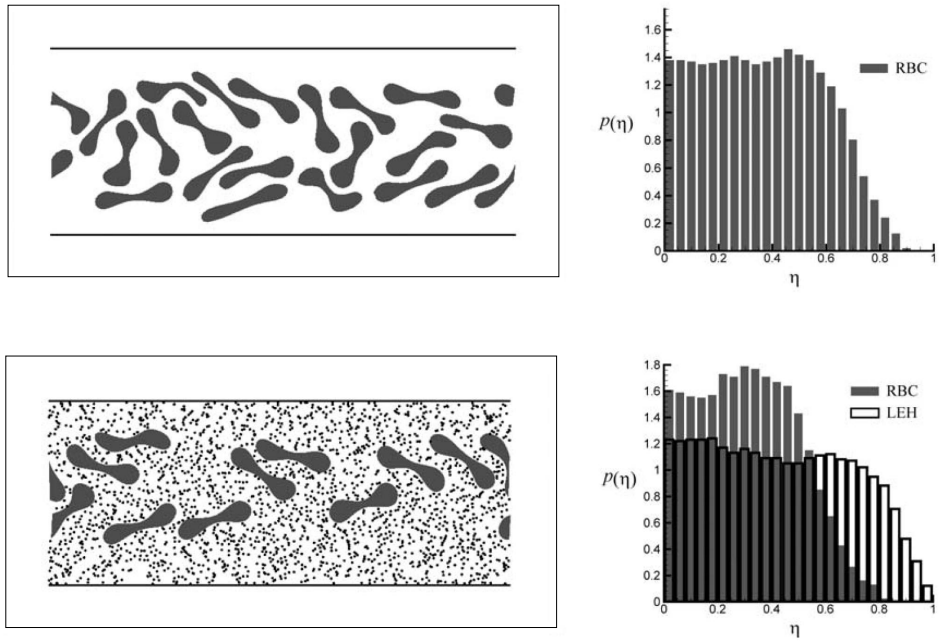


Fig. 3. Snapshot images and longitudinally distributions of RBC membrane nodes and LEH in the Poiseuille flow. The upper figures show the case of Ht^{R} = 0.30 and the lower figures show the case of Ht^{R} = Ht^{L} = 0.15.

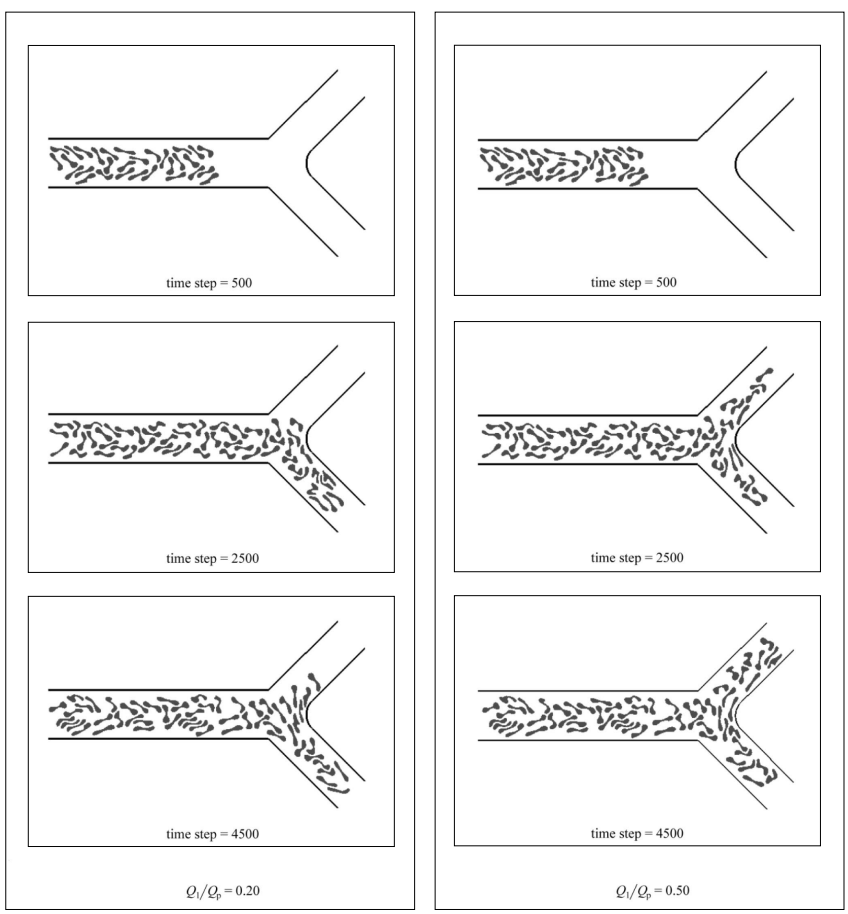


Fig. 4. Images of RBCs passing through the bifurcation at three time points. The hematocrit in the parent vessel Ht^{R} = 0.30. The fractional flow into daughter branch b_1 is Q_1/Q_p = 0.20 in the left, and Q_1/Q_p = 0.50 in the right.

Fig. 5に，それぞれ血流分配比Q_1/Q_p = 0.20および0.50における500, 2500, 4500 stepでの赤血球と人工赤血球の流れの様子を示す．Q_1/Q_p = 0.50では赤血球，人工赤血球ともにほぼ同数がそれぞれの分岐血管へ分配された．Q_1/Q_p = 0.20では二つの分岐部間の血流分配量が大きく異なるため，赤血球の多くは血流分配量が多い分岐血管b_2へと分配されたが，一方で，人工赤血球の一部は赤血球の分配されない分岐血管b_1へと分配された．Fig. 4の赤血球のみの場合（Ht^R = 0.30）と比べてみると，赤血球は，自身のヘマトクリット値の減少，および人工赤血球との干渉の影響で，b_1への血球分配比（N_1^R/N_p^R）が減少しており，さらに赤血球の偏りが増加した（N_1^R/N_p^R=0.065）．一方，人工赤血球は，赤血球に比べると，血しょう層付近に多く分布しているため（Fig. 3），その一部は血流分配量の少ない分岐血管b_1へと分配され，人工赤血球分配比の上昇が見られた（N_1^L/N_p^L=0.244）．この傾向は他の血球分配比においても見られた．以上の結果は，人工赤血球の投入により，微小血管分岐部における酸素供給の不均一性が改善されていることを示唆している．

4．考察

今回，微小血管内のような混相流の解析に有力な手法である格子ボルツマン法を用いて，赤血球の変形を考慮した赤血球／人工赤血球動態の流体シミュレーションを行った．特に微小血管分岐部に着目し，酸素不均一性の原因となる分岐部での赤血球の偏り，および，それに対する人工赤血球効果のメカニズムについて調査を行った．まず，ポワズイユ流れの解析を行うことにより，分岐部内に流入してくると想定される各血球の管断面分布を調べた．解析の結果，通常の赤血球のみの場合，赤血球は変形による軸集中の結果，管壁面付近に血しょう層の形成[8,9]が見られた．赤血球の半分を人工赤血球に置換した場合，血しょう層の形成の強化と，それに伴う人工赤血球の血しょう層への分布が見られた．これらの結果に基づき，続いて分岐部内の流体シミュレーションを行った．赤血球のみの場合，血球分配の偏りが見られ，血流分配比の低い分岐（娘）血管には赤血球がほとんど流入せず，血しょう分離[8,9]が見られた．一方，赤血球の半分を人工赤血球に置換した場合，血流分配量の少ない分岐血管へ多くの人工赤血球が分配され，酸素不均一性の軽減を示唆する結果が得られた．この理由としては，分岐前の主流血管において血しょう層付近に人工赤血球が多く分布してい

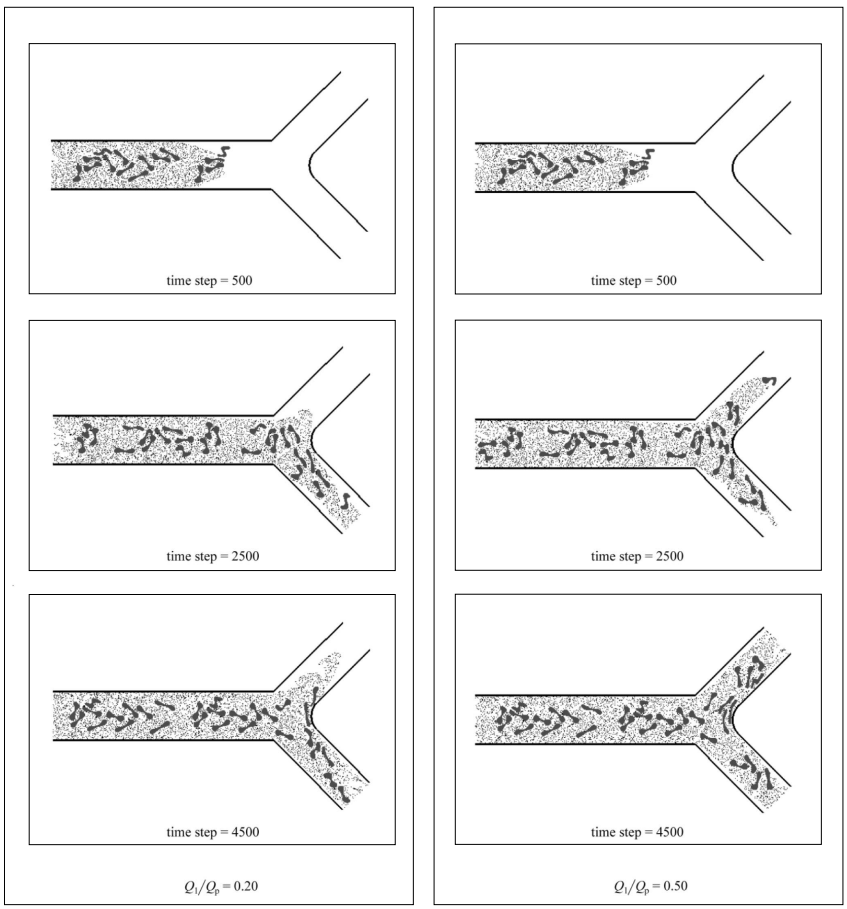


Fig. 5. Images of RBCs and LEHs passing through the bifurcation at three time points. In the parent vessel, hematocrit Ht^R is 0.15, and the volume fraction of LEH Ht^L is 0.15. The fractional flow into daughter branch b_1 is Q_1/Q_p = 0.20 in the left, and Q_1/Q_p = 0.50 in the right.

ることが挙げられる．つまり，赤血球軸集中による血しょう層の存在が，低血流側の分岐血管への人工赤血球の分配へ貢献していると考えられる．

一方，現段階において赤血球の変形も含めた３次元解析は計算負荷の観点から非常に困難であるため，本計算コードは２次元解析である．よって，分岐部での２次流れなどの３次元効果は考慮されていない．しかしながら，本シミュレーションでは赤血球変形による軸集中，血しょう層の形成（Fig. ３），さらには分岐部における血しょう分離の再現に成功した．したがって，３次元分岐流れにおいても壁付近に形成される血しょう層に多くの人工赤血球が存在し，これら人工赤血球による分岐部での酸素供給の偏りを軽減する効果は，実際の微小血管分岐部内でも起こると予想される．特に，血管径D_0が本計算条件よりも小さい場合は，Priesの経験式[15]からも分かるように，分岐部での赤血球偏りが顕著になってくるため，本考察に基づく人工赤血球の効果はさらに大きくなると考えられる．ただ，本シミュレーションでの赤血球膜の２次元的な変形は本来の３次元的な変形とは異なっており，さらに赤血球の偏りが大きくなると考えられるより小さい径（$D_0 < 10\,\mu\mathrm{m}$）の微小血管では，３次元的にこの人工赤血球効果がどの程度であるかを考察する必要があるだろう．また本分岐部モデルでは，二つの分岐血管径は等しいとし，分岐血管径の違いによる影響は考慮していない．実際には，上下非対称な分岐形状が多いと思われるが，片方の分岐血管径が小さくなると，さらに赤血球の偏りは促進される[15]．そのような場合，本考察に基づく人工赤血球の効果はさらに高まると考えられる．実際の微小血管内で考えられる現象として，人工赤血球は赤血球の他に白血球や血小板とインタラクションをすると考えられる．白血球が分岐部などの血管壁に接着あるいはローリングしている場合には，赤血球そのものの流れまで変えてしまい，局所的な酸素分配に大きく影響する．ただし，ここではそのような特殊なケースは考えていない．血小板については，今回想定しているような赤血球の半分を人工赤血球に置換する場合を考えると，血小板の体積分率は人工赤血球に比べ非常に小さいことから，白血球と同様にほとんど影響はないと考えられる．

今回，分岐部における各血球の分配比に焦点を当てて調査を行っているが，人工赤血球置換による流動抵抗の変化，つまり見かけの粘度の違いについて比較は行っていない．つまり，赤血球と人工赤血球の大きさが異なることから，赤血球と同じように人工赤血球について流体との相互干渉をモデル化するためには膨大な計算格子が必要となるため，本シミュレーションでは人工赤血球投入による見かけの粘度の増大は再現できない．この点について，今後は解析コードの改良を考える必要があるであろう．実際には，当然ではあるが，赤血球のヘマトクリットの上昇とともに流動抵抗が増加し，見かけの粘度は大きくなる．一方，人工赤血球に置換することにより，この見かけの粘度は減少する．したがって，同じ血球分配比であっても一つの分岐部を通過する血球の単位時間当たりの数は増加するため，見かけの粘度の変化は微小血管系としての流量変化を考える際には重要となる．

結論として，本流体シミュレーションにより，人工赤血球投与が微小循環における酸素不均一性の軽減に貢献し，局所的な潅流改善機能を示唆する結果を得た．本計算コードは，各種パラメータを変更することで容易に赤血球変形能の変化や各血球の集合・凝集などの現象を取り扱うことが可能である．特に，赤血球変形能の低下や赤血球凝集などの赤血球流動性の低下における人工赤血球の循環改善作用は興味あるところである．また，赤血球と人工赤血球がもつ酸素運搬能が，毛細血管での酸素供給不均一性軽減の効果に影響してくるため，今後はそのモデル化などが必要となると思われる．さらに，細動脈から毛細血管へのネットワーク形態に対応した解析が，各種臓器潅流に対する人工赤血球投与の効果を明らかにするためにも必要となってくるであろう．

謝辞

本研究の一部は，科学研究費補助金（若手研究(B)21700467）の援助を受けて行われた．ここに感謝の意を表す．

付録

格子ボルツマン法（LBM）では，連続体である流体を各格子上にある仮想的な粒子の集合体と仮定する．その際，仮想粒子の速度分布関数f_iを考え，この関数の時間発展を記述する次の格子ボルツマン方程式を用いる．

$$f_i(\mathbf{x}+\mathbf{c}\Delta t, t+\Delta t) - f_i(\mathbf{x}, t) = -\frac{1}{\boldsymbol{\tau}}\left[f_i(\mathbf{x}, t) - f_i^{eq}(\mathbf{x}, t)\right] \qquad \text{(A1)}$$

ここで，$\mathbf{x}$は仮想粒子の座標，$\mathbf{c}$は仮想粒子の速度，Δtは時間刻み，τは緩和時間を表している．また，右辺の衝突項にはBGKモデル[29]を用いている．$f_i^{eq}(\mathbf{x}, t)$は局所平衡分布であり，次式で表される．

$$f_i^{eq} = E_i\rho\left[1 + 3\mathbf{c}_i\cdot\mathbf{u} + \frac{9}{2}(\mathbf{c}_i\cdot\mathbf{u})^2 - \frac{3}{2}\mathbf{u}\cdot\mathbf{u}\right] \qquad \text{(A2)}$$

本計算では2次元流れを取り扱っていることから，2次元9速度（2D9V）モデル[30]を用いた．2D9Vモデルでは，物理空間を等間隔の正方形格子に分割し，速度空間を離散化するための仮想粒子の速度ベクトルc_i (i = 1, 2, ..., 9) は，c(0,0), c(±1,0), c(0,±1), c(±1,±1) の９つである．また，$E_1 = 4/9$, $E_2 = E_3 = E_4 = E_5 = 1/9$, $E_6 = E_7 = E_8 = E_9 = 1/36$となる．巨視的変数である流体の密度ρおよび流速$\mathbf{u}$は粒子の分布関数$f_i$を用いて次のように定義される．

$$\rho = \sum_{i=1}^{9} f_i, \quad \mathbf{u} = \frac{1}{\rho}\sum_{i=1}^{9} f_i\mathbf{c}_i \qquad \text{(A3)}$$

ここで，等温モデルを扱う場合，圧力$p = 1/3\rho$となる．また，動粘性係数νは以下のように求められる．

$$\nu = \frac{1}{3}\left(\tau - \frac{1}{2}\right)\Delta x \qquad \text{(A4)}$$

これにより，等温場における非圧縮性粘性流体の連続の式およびナヴエ・ストークス方程式は満たされる．

参考文献

1. Squires J E. Artificial blood. Science 2002; 295, 1002-1005.
2. Winslow R M. Red cell substitutes. Semin Hematol 2007; 44; 51-59.
3. 武岡真司. 分子集合科学を利用した人工血液の創製. 人工血液 2006; 13; 136-147.
4. Sakai H, Horinouchi H, Masada Y, Takeoka S, IkedaE, Takaori M, Kobayashi K, Tsuchida E. Metabolism of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model. Biomaterials 2004; 25; 4317-4325.
5. George I, Yi G-H, Schulman A R, Morrow B T, Cheng Y, Gu A, Zhang G, Oz M C, Burkhoff D and Wang J. A polymerized bovine hemoglobin oxygen carrier preserves regional myocardial function and reduces infarct size after acute myocardial ischemia. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006; 291; H1126-H1137.
6. Matsumoto T, Asano T, Mano K, Tachibana H, Todoh M, Tanaka M and Kajiya F. Regional myocardial perfusion under exchange transfusion with liposomal hemoglobin: in vivo and in vitro studies using rat hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005; 288; H1909-H1914.
7. Rudolph A S, Klipper R W, Goins B and Phillips W T. In vivo biodistribution of a radiolabeled blood substitute: ^{99m}Tc-labeled liposome- encapsulated hemoglobin in an anesthetized rabbit. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88; 10976-10980.
8. Goldsmith H L. The microrheology of human blood. Microvasc Res 1986; 31; 121-142.
9. Fung Y C. Biomechanics: Circulation. 2nd edition, Springer 1997.
10. Boryczko K, Dzwinel W and Yuen D A. Dynamical clustering of red blood cells in capillary vessels. J Mol Model 2003; 9; 1: 16-33.
11. Pozrikidis C. Numerical simulation of blood flow through microvascular capillary networks. Bull Math Biol 2009: 71; 6: 1520-1541.
12. Sugihara-Seki M and Fu B M. Blood flow and permeability in microvessels. Fluid Dyn Res 2005; 37; 1-2: 82-132.
13. Tsubota K, Wada S and Yamaguchi T. Particle method for computer simulation of red blood cell motion in blood flow. Comput Meth Prog Bio 2006; 83; 139-146.
14. Chien S, Tvetenstrand C D, Epstein M A F and Schmid-Schonbein G W. Model studies on distributions of blood cells at microvascular bifurcations. Am J Physiol Heart Circ Physiol 1985; 248; 568-576.
15. Pries A R, Secomb T W, Gaehtgens P and Gross J F. Blood flow in microvascular networks: experiments and simulation. Circ Res 1990; 67; 4: 826-834.
16. Hyakutake T, Tominaga S, Matsumoto T, Yanase S. Numerical study on flows of red blood cells with liposome-encapsulated hemoglobin at microvascular bifurcation. J Biomech Eng-T ASME 2008; 130; 1: 011014.
17. Murray C D. The physiological principle of minimum work: I. the vascular system and the cost of blood volume. Proc Natl Acad Sci USA 1926; 12; 3: 207-214.
18. Succi S. The Lattice Boltzmann Equation. Oxford. 2001.
19. 稲室隆二. 格子ボルツマン法―新しい流体シミュレーション法―. 物性研究. 2001; 77-2; 197-232.
20. Evans E A, Fung Y C. Improved measurements of the erythrocyte geometry. Microvascular Research 1972; 4; 335-347.
21. Peskin C S. Numerical analysis of blood flow in the heart. J Comput Phys 1977; 25; 220-233.
22. Bagchi P. Mesoscale simulation of blood flow in small vessels. Biophys J 2007; 92; 6: 1858-1877.
23. Pozrikidis C. Effect of membrane bending stiffness on the deformation of capsules in simple shear flow. J Fluid Mech 2001; 297; 123-152.
24. Zhang J, Johnson P C and Popel A S. Effects of erythrocyte deformability and aggregation on the cell free layer and apparent viscosity of microscopic blood flows. Microvas Res 2009; 77; 265-272.
25. Segré G and Silberberg A. Radial particle displacements in Poiseuille flow of suspensions. Nature 1961; 189; 209-210.
26. Inamuro T, Maeba K and Ogino F. Flow between parallel walls containing the lines of neutrally buoyant circular cylinders. Int J Multiphase Flow 2000; 26, 1981-2004.
27. Lamb H. Hydrodynamics. 6th edition. Cambridge University Press Cambridge 1932.
28. Inamuro T, Yoshino M and Ogino F. A non-slip boundary condition for lattice Boltzmann simulations (Erratum: 8, 1124). Phys Fluids 1995; 7; 2928-2930.
29. Bhatnagar P L, Gross E P and Krook M. A model for collision processes in gases. I. Small amplitude processes in charged and neutral one-component systems. Phys Rev 1954; 94; 511-525.
30. Qian T H, d'Humiéres D and Lallemand P. Lattice BGK models for Navier-Stokes equation. Europhys Lett 1992; 17; 479-484.

投稿規定（平成20年9月30日改訂）

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

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

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

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

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

ii）ハードコピー4部を郵送する．

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

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

４）原稿はA4版の大きさとし，第1頁には表題，英文表題，著者名，全著者所属，英文著者名，英文著者所属，続いて連絡の取れる著者（corresponding author）の住所，英文住所を記入する．手書き原稿の場合はB5版，1行20字，20行とする．

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

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

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

８）論文中の略語は初出の際に省略しないこと．薬品，医薬品，測定装置等は，外国語名の場合は言語のまま用い，日本語化しているものはカタカナとする．型式，販売（製造）元とその所在地も記入すること．
（例） Rhodamine B（Sigma-Aldrich, St. Louis, USA），ポリグラフシステム（LEG-1000; 日本光電工業, 東京）

９）句読点はコンマ（,）ピリオド（.）とする．

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

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

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

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

（例）

1. 高折益彦．人工酸素運搬体:その将来への期待．人工血液 2007;15:90-98.
2. 橋本正晴. 単回投与毒性試験. 野村 護, 堀井郁夫, 吉田武美編. 非臨床試験マニュアル. 東京: エルアイシー, 2001;37-48.
3. Wong NS, Chang TM. Polyhemoglobin-fibrinogen: a novel oxygen carrier with platelet-like properties in a hemodiluted setting. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2007; 35: 481-489.
4. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. J Am Med Assoc 2008; 299: 2304-2312.
4. Sakai H, Sou K, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin vesicles as a Molecular Assembly. Characteristics of Preparation Process and Performances or Artificial Oxygen Carriers. In: Winslow RM, ed. Blood Substitutes. London: Academic Press (Elsevier), 2006; 514-522.
5. 早稲田大学酸素輸液プロジェクト．
http://www.waseda.jp/prj-artifblood/index-ja.html
（2008年9月現在）

14）既発表の図表，その他を引用，転載する場合には，あらかじめ版権所有者の許可を得ること．また，掲載論文の著作権は本学会に帰属する．

15）二次掲載について．本誌は，他の言語ですでに掲載された論文を和文で二次掲載することは二重投稿ではなく正当な掲載と認めるが，著者は以下の事項を遵守する．

a）すでに掲載された論文であること．
b）著者は両方の雑誌の編集者より許可を得ていること．二次掲載する編集者に最初に掲載されたもののコピー，別刷，もしくは原稿のいずれかを添付すること．
c）論旨を変えないこと．執筆者は同一（順不同）であること．
d）二次掲載版のタイトル・ページに掲載される脚注には，その論文の全体もしくは一部分がすでに掲載されている旨を明記し，更に初出文献も示すこと．適切な脚注の例を以下に示す．「This article is based on a study first reported in the［…雑誌タイトル（完全な典拠情報を添えたもの）…］（訳：この論文記事は，［…］に最初に報告された研究に基づくものである）」．

これらの要件を満たしている場合は，その旨を明記して，総説または論文記事（二次掲載）として投稿する．

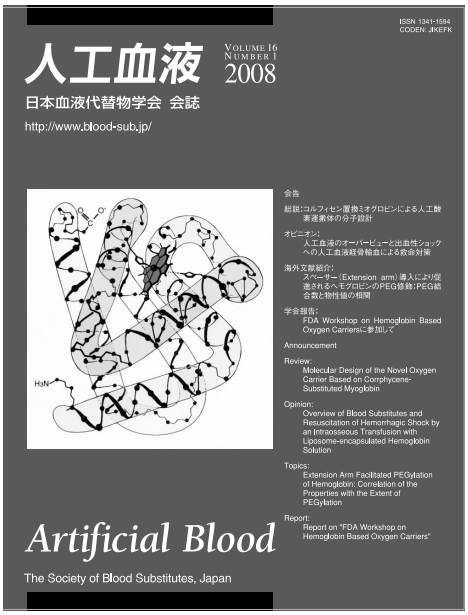
16）本誌掲載著作物の二次利用および著作権について．本誌の一部，もしくは全部をCD-ROM，インターネットなどのメディアに二次利用する場合がある．本誌に掲載する著作物の複製権・翻訳権・上映権・譲渡権・公衆送信権（送信可能化権を含む）は，著者が上述の著作権譲渡同意書を提出することにより，本学会に譲渡される．本項は，著作者自身の再利用を拘束するものでは無いが，再利用する場合は，編集委員長に通知をすること．

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

18）原稿の送付先
〒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
日本血液代替物学会　会誌「人工血液」編集部　宛
電話：03－5363－3493，FAX：03－5363－3499
E-mail：amorjsbs@sc.itc.keio.ac.jp

Call for Papers

Artificial Blood, **the official bilingual journal of The Society of Blood Substitutes, Japan, welcomes papers and other articles contributing to the research and development of blood substitutes.**
If you wish to submit an article for publication, please email it to the following address after first confirming the instructions for authors.



Instructions for Authors (last revised Sept. 30, 2008)

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

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

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

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

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

ii) Submission by post of four sets of hardcopies.

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

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

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

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

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

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

8) Abbreviations should be spelled out on their first appearance. The names of drugs, medical drugs, laboratory equipment, and so on should be given. The type, distributor (manufacturer) and the address should also be indicated.
Example: Rhodamine B (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) Polygraph system (LEG-1000; Nihon Kohden Corporation, Tokyo).

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

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

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

12) References should be cited numerically in order of appearance in the text using superscript letters as follows: [2], [3-5], [1, 4-6], etc. References should be listed using the Vancouver style as follows: Names of all authors. Title of paper. Title of journal. Year of publication; volume number: inclusive page numbers.
Abbreviations of journal names should be in accordance with *Index Medicus*. References to books should be given as follows:
Names of all authors. Title of paper. Name of editor(s). Book title. Place of publication: Publisher, year; inclusive page numbers.
References to electronic sources should be given as follows:
Name of website.
Address on new line (month and year of last access).

Examples:

1. Wong NS, Chang TM. Polyhemoglobin-fibrinogen: a novel oxygen carrier with platelet-like properties in a hemodiluted setting. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2007; 35: 481-489.
2. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. J Am Med Assoc 2008; 299: 2304-2312.
3. Sakai H, Sou K, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin vesicles as a Molecular Assembly. Characteristics of Preparation Process and Performances or Artificial Oxygen Carriers. In: Winslow RM, ed. Blood Substitutes. London: Academic Press (Elsevier), 2006; 514-522.
4. Oxygen Infusion Project, Waseda University, Japan. http://www.waseda.jp/prj-artifblood/index-ja.html (last accessed Sept 2008)

13) In the case of citation or reproduction of previously published figures or tables and other content, the permission of the copyright holder(s) must first be obtained. Copyright in the published papers shall belong to the Society.

14) Regarding secondary use and copyright in works published in the Journal, secondary use may be made of the Journal, in whole or in part, via media such as CD-ROM or the Internet. Reproduction rights, translation rights, film rights, dominion, and public transmission rights (including the right to make the works transmittable) are transferred to the Society by the author's submission of the aforementioned Copyright Transfer Agreement. This clause shall not restrict reuse by the author himself/herself, but the Editor-in-Chief must be informed in the event of reuse.

15) No publication fee is charged for publication in the Journal, and the author(s) shall receive as a gift 30 offprints of their contributions. Authors will be charged for copies in excess of this number (approximately 100 yen per copy). Authors wanting prints of color photos or on art paper, etc. must pay the actual cost of such prints.

16) Address for manuscripts to be sent:
Attn: Artificial Blood Editorial Office
The Society of Blood Substitutes, Japan
Division of General Thoracic Surgery, Department of Surgery,
Keio University, School of Medicine
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan
Tel: +81-3-5363-3493 Fax: +81-3-5363-3499
E-mail：amorjsbs@sc.itc.keio.ac.jp

人工血液
日本血液代替物学会会誌

Artificial Blood
The Official Journal of The Society of Blood Substitutes, Japan

日本血液代替物学会
会長　小林　紘一 殿
To: Dr. Koichi Kobayashi
President
The Society of Blood Substitutes, Japan

日本血液代替物学会　会誌「人工血液」に投稿した論文

表題
Manuscript Title: _____

_____

_____

につきまして，倫理規定に準拠した内容であること，また，共著者の全員が内容を確認していることを誓約いたします．なお，掲載された論文の著作権は，貴学会に帰属することを認めます．

I attest that the content of the above manuscript, submitted for publication in *Artificial Blood,* the journal of the Society of Blood Substitutes, Japan, conforms to ethical standards and has been confirmed by all coauthors. We acknowledge that copyright will be held by the Society.

平成　　年　　月　　日

Date:

代表著者（署名）
Corresponding Author（Signature）_____

連絡先
Contact Address:

（本用紙はコピーしたものを使用されても結構です．）
This form may be photocopied for use.

日本血液代替物学会　会誌「人工血液」編集部
〒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　E-mail：amorjsbs@sc.itc.keio.ac.jp

Artificial Blood Editorial Office
The Society of Blood Substitutes, Japan
Division of General Thoracic Surgery, Department of Surgery, Keio University, School of Medicine
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan
Tel: +81-3-5363-3493　Fax: +81-3-5363-3499　E-mail：amorjsbs@sc.itc.keio.ac.jp

●編集後記●

昨年10月に開催された第16回日本血液代替物学会年次大会の特別講演の演者の先生方に，本誌への総説・トピックスの寄稿をお願いしましたところ，３名よりご快諾を頂き，本号をまとめることができました．著者の先生方，また講演者を選定して下さいました大会長の高折益彦先生に心より御礼申し上げます．萩原先生の総説では，ウシにおいては，初乳の成分に多くの免疫グロブリンが含まれており，新生子の発育（生体防御）に極めて重要とのことである．ヒトの場合，母乳に沢山の細胞成分が含まれていると聞くが，母乳の方が粉ミルクより良いのだろうか？．湊元先生からは，巨大リポソームについて御紹介頂いた．変形能を有する，本物の赤血球に性質がより近い，人工赤血球の設計に結びつくかもしれない．百武先生からは，人工赤血球の微小血管内における流動挙動の特徴についてご説明頂いた．シミュレーションを駆使して，虚血性領域を人工赤血球がどのように酸素化するか，微粒子分散流体としての特長が更に具体的に明らかになった．三宅先生ほかの原著論文では，血液中の電解質濃度という極めて基本的で且つ重要なパラメータが，人工赤血球が共存する事によって影響を受けることがあるという報告である．今後の非臨床試験，臨床試験においても，測定装置機種の選定から，注意が必要である．人工赤血球については，実際問題として，また学術的な興味として，明らかにしなければならないことがまだまだ沢山ありそうである．

（酒井 宏水）

編集委員会

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

日本血液代替物学会　会誌　　**人工血液**　vol.18（1）　2010年５月20日発行

■**発行**　日本血液代替物学会
〒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

■**編集・制作**「人工血液」編集委員会
〒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

■**印刷**　株式会社　研恒社
〒102-0073　東京都千代田区九段北1-1-7
TEL（03）3265-8961　FAX（03）3264-1995

再生紙を使用