

人工血液

VOLUME 21
NUMBER 1
2013

日本血液代替物学会 会誌

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



第20回年次大会プログラム

総説: 輸血代替としての人工赤血液 (ヘモグロビン小胞体) 製剤の安全性試験

カプセル型人工酸素運搬体 —リポソーム化ヘモグロビンの開発

人工血小板H12 (ADP) リポソームを用いた急性血小板減少病態への止血・救命対策

事務局より

The 20th Annual Meeting Program

Review:

Safety Evaluation of Artificial Red Cells (Hemoglobin-Vesicles) as a Transfusion Alternative

Development of Capsule Type Artificial Oxygen Carrier—Liposome-encapsulated Hemoglobin

Hemostasis and Resuscitation by Transfusion of Platelet-function Enhancer, Nano-particle, H12(ADP)-liposome to Thrombocytopenic Rabbits which Suffered Liver Injury

Artificial Blood

The Society of Blood Substitutes, Japan

人工血液

第 21 巻 第 1 号 2013 年 11 月

目 次

第 20 回年次大会プログラム

大会長挨拶	3
日本血液代替物学会 20 年のあゆみ	4
お知らせとお願い	5
大会日程表	7
交通案内図	8
プログラム	9
抄録	11

総説 輸血代替としての人工赤血液（ヘモグロビン小胞体）製剤の安全性試験	
..... 酒井 宏水 他	36
カプセル型人工酸素運搬体 —リポソーム化ヘモグロビンの開発	
..... 金田 伸一 他	49
人工血小板 H12 (ADP) リポソームを用いた急性血小板減少病態への止血・救命対策	
..... 西川 可穂子 他	60

事務局たより

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 21 No. 1 November, 2013

Contents

The 20th Annual Meeting Program

Address from the President	3
20 years history of SBSJ	4
Information	5
Schedule	7
Venue and Access	8
Program	9
Abstracts	11

Review : Safety Evaluation of Artificial Red Cells (Hemoglobin-Vesicles) as a Transfusion Alternative

..... Hiromi Sakai, et al.	36
Development of Capsule Type Artificial Oxygen Carrier —Liposome-encapsulated Hemoglobin	
..... Shinichi Kaneda, et al.	49
Hemostasis and Resuscitation by Transfusion of Platelet-function Enhancer, Nano-particle, H12(ADP)-liposome to Thrombocytopenic Rabbits which Sufferd Liver Injury	
..... Kahoko Nishikawa, et al.	60

第20回日本血液代替物学会年次大会

The 20th Annual Meeting of the Society of Blood Substitutes, Japan

「二十年の節目を迎え 血液代替物研究の更なる発展を期待して」

大会長：酒井宏水（奈良県立医科大学医学部 化学教室・教授）

会 期：平成25年12月 6 日（金）、 7 日（土）

会 場：奈良県新公会堂（奈良県奈良市春日野町101）

【年次大会事務局】

奈良県立医科大学 医学部 化学教室内
〒 634-8521 奈良県橿原市四条町 840
Tel & Fax : 0744-29-8810
e-mail : artificial-blood@naramed-u.ac.jp

大会長挨拶

さてこの度、奈良県立医科大学化学教室の主催で日本血液代替物学会の第20回年次大会を開催させて頂くことになりました。年次大会は、「血液型に関係なく、安全で、長期備蓄できる、血液成分の代替物を開発し医療に貢献する事」を目指す、理工学、薬学、医学関連の産官学の研究者・医師が年に一度集い、研究の進展状況や、新しい技術などに関して、情報交換を行う貴重な場となっています。

わが国における血液代替物研究には、世界的にみても独創性の高い物質系を次々と生み出してきた半世紀以上におよぶ輝かしい歴史があります。これは、血液代替物の必要性が極めて明瞭で、患者にとってその実現は福音であり、また周辺医療技術への波及効果が絶大であることは容易に想像ができ、多くの研究者、医師を惹き付けてきた研究テーマであること物語っております。血漿成分については、遺伝子組換え技術も導入され、代用血漿剤や凝固因子など先進的な物質が実用化されています。しかし赤血球と血小板の代替物については今日、未だに実用化されていない状況です。わが国で近年開発研究が進展している人工赤血球、人工血小板は、アカデミアを中心とした研究組織によりその効能と安全性が多角的に検討され、膨大な非臨床データが蓄積されて参りました。長期間の備蓄が可能で、血液型に関係なく、感染を心配せずに何時でも必要な時に投与できる血液代替物の開発は、実用化に向け次の段階に進むべき状況にあります。

日本血液代替物学会は1993年7月21日に設立され、翌1994年に第1回目の年次大会が東京で開催されました。今回は第20回目の節目の大会であり、若輩の私が「奈良」で開催する機会を頂きましたことは誠に光栄でございます。学会の設立とこれまでの運営に御尽力くださいました、土田 英俊 先生、関口 定美 先生、小林 紘一 先生、池田 康夫 先生をはじめ、多くの先生方に心より敬意を表し、本学会の進展を振り返りつつ、今後本研究分野の新たな展開が続くことを念じ、テーマを「二十年の節目を迎え 血液代替物研究の更なる発展を期待して」としました。有意義で大きな成果を上げるよう学会関係者一同、鋭意努力致していく所存です。皆様のご参加により活発な御議論を頂き、本大会が、わが国で開発されて来た血液代替物の実用化への後押しとなること、また業界側に対するアピールが出来る機会になることを願っております。

なお、本年次大会の運営にあたり、ご寄附下さいました業界各社の御担当の皆様に対し、心より御礼申し上げます。これを機に、血液代替物研究へのご関心を益々深めて頂きますとともに、引続きのご支援と、開発研究に対する積極的なご関与を期待しております。どうぞ宜しく御願ひ致します。

第20回日本血液代替物学会年次大会

大会長 酒井宏水

奈良県立医科大学医学部化学教室 教授

日本血液代替物学会 20 年のあゆみ

会 合 名	会 期	大 会 長	会 場
日本血液代替物学会 設立	1993.7.21		明治記念館（東京）
血液代替物 シンポジウム	1993.12.3-4		フォーシーズンズホテル（東京）
第 1 回年次大会	1994.6.16-17	小林 紘一（慶應義塾大学医学部）	ホテルオークラ（東京）
第 2 回年次大会	1995.6.19-20	阿岸 鉄三（東京女子医科大学）	フォーシーズンズホテル（東京）
第 3 回年次大会	1996.6.18-19	元木 良一（福島県立医科大学）	福島ビューホテル（福島）
第 4 回年次大会 第 7 回血液代替物 国際会議 (7-ISBS)	1997.9.7-10	土田 英俊（早稲田大学理工学部）	早稲田大学国際会議場（東京）
第 5 回年次大会	1998.9.4-5	関口 定美（北海道赤十字血液センター）	かでの 2・7（札幌）
第 6 回年次大会	1999.9.10-11	池田 康夫（慶應義塾大学医学部）	京王プラザホテル（東京）
第 7 回年次大会	2000.9.7-8	北畠 顕（北海道大学医学部）	かでの 2・7（札幌）
第 8 回年次大会	2001.9.4-5	清水 勝（東京女子医科大学）	シェーンバッハ・サボー（東京）
第 9 回年次大会	2002.9.4-5	西 勝英（熊本大学医学部）	熊本国際交流会館（熊本）
第10回年次大会 第 9 回血液代替物 国際会議 (9-ISBS)	2003.3.3-5	小林 紘一（慶應義塾大学医学部）	京王プラザホテル（東京）
第11回年次大会	2004.7.13-14	川村 明夫（札幌北楡病院）	北方圏センター（札幌）
第12回年次大会	2005.6.6-7	武岡 真司（早稲田大学理工学部）	早稲田大学国際会議場（東京）
第13回年次大会	2006.8.24-25	末松 誠（慶應義塾大学医学部）	慶應義塾大学信濃町キャンパス（東京）
第14回年次大会	2007.6.14-15	半田 誠（慶應義塾大学医学部）	慶應義塾大学三田キャンパス（東京）
第15回年次大会	2008.10.23	堀之内 宏久（慶應義塾大学医学部）	慶應義塾大学信濃町キャンパス（東京）
第16回年次大会	2009.10.16-17	高折 益彦（東宝塚さとう病院）	慶應義塾大学信濃町キャンパス（東京）
第17回年次大会	2010.10.18-19	小田切 優樹（熊本大学薬学部）	熊本国際交流会館（熊本）
第18回年次大会	2011.10.27-28	米川 元樹（札幌北楡病院）	北海道大学医学部学友会館フラテ（札幌）
第19回年次大会	2012.10.25-26	東 寛（旭川医科大学）	旭川大雪クリスタルホール（旭川）
第20回年次大会	2013.12.6-7	酒井 宏水（奈良県立医科大学）	奈良県新公会堂（奈良）

お知らせとお願い

■会員・参加者の皆様へ

〈会場〉

奈良県新公会堂 2階会議室（奈良県奈良市春日野町 101）

〈受付〉

平成 25 年 12 月 6 日（金）9：00 から

平成 25 年 12 月 7 日（土）9：00 から

〈参加登録〉

参加登録費は、10,000 円、学生は 3,000 円です。事前参加登録は行ないません。

ネームカードをお渡ししますので、所属・氏名を各自でご記入ください。会期中は会場内で必ず着用ください。

〈新入会受付〉

日本血液代替物学会に未入会の方は、受付で入会手続きをおとりください。

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

〈抄録集〉

抄録集は会員全員に事前送付しています。当日お忘れなくご持参ください。

また、当日、受付にて一部 1,500 円で販売しています。

〈呼び出し〉

場内での呼び出しは行ないません。

〈懇親会〉

懇親会を開催致します。参加費は 2,000 円です。ふるってご参加ください。

日時：平成 25 年 12 月 6 日（金）17：30 頃より

会場：奈良迎賓館（奈良県新公会堂 1 階、学会会場の下のフロア）

〒 630-8212 奈良県奈良市春日野 101

■演者の先生へ

●発表時間

1. 一般演題 : 15 分（発表 10 分、質疑応答 5 分）
2. 特別講演 : 50 分
3. 教育講演 : 50 分
4. トピックス : 50 分

※ご発表時は緑色のランプが点灯し、発表時間がカウントダウンしていきます。

発表 2 分前になったら黄色の予告ランプが、終了時間以降は赤色のランプが点灯し、発表時間を過ぎた時間がカウントアップで表示されます。

くれぐれも時間厳守にてお願いします。

●受付場所、受付時間

1. PC 受付、発表データの受付は講演会場内（2 階 会議室 3・4）、左手前方の PC オペレーター席で行います。
2. 受付は、12 月 6 日、7 日の両日 9：00 より開始します。

※演者の先生は発表の 30 分前までに、受付をお済ませ下さい。

・発表形式と使用機材

1. 発表形式はパソコンによるプレゼンテーションのみとします。
2. PC はご自分で操作をお願いします。舞台上にモニター、キーボード、マウスを用意します。
3. 会場で用意する PC の OS は Windows7 です。
4. 使用できるアプリケーションは、Windows Power Point 2013, 2010, 2007, 2003 です（Mac 版 PPT, Keynote には対応していません）。
5. 動画・音声ファイルがある場合は PC 本体を持参されることを推奨いたします。
6. Macintosh で作成されたデータは、動画・音声ファイルの有無に関わらず、皆様 PC 本体をご持参下さい。

・データの作成について

1. データの作成は Microsoft Office Power Point をお願いします。
2. フォントは下記をお願いします。
日本語：MS ゴシック，MSP ゴシック，MS 明朝，MSP 明朝
英 語：Arial，Arial Black，Century，Century Gothic，Times New Roman
3. 画面の解像度は XGA（1,024×768 ピクセル）ですので画面の設定を XGA に合わせて下さい。
4. 動画ファイルは Windows Media Player で再生できるものをお願いします。事前に再生できるかご確認下さい。
5. 発表データにリンクファイル（静止画・動画・グラフ等）がある場合は発表分の Power Point ファイルとリンクファイルを1つのフォルダにまとめて保存して下さい。事前にデータを作成した PC 以外でのチェックをお願いします。
6. 発表データを CD-R 等にコピーする時には、ファイナライズ（セッションのクローズ・使用した CD のセッションを閉じる）作業を必ず行って下さい。

・受付方法

1. メディア持参の発表者
*発表用データを USB フラッシュメモリまたは CD-R に保存してご持参下さい。また、保存の際にはデータのファイル名を「(演題番号) (氏名)」として下さい。
*メディアの中には当日発表分のデータのみ入れて下さい。
*コピーさせていただいた発表データは学会終了後事務局が責任をもって消去いたします。
*発表データ保存媒体はデータ受付後にご返却いたします。
*データをメディアで持参出来るのは Windows のみです。
2. PC 本体持参の発表者 (Macintosh 使用の方など)
*お持込みいただく PC は mini D-sub 15pin のモニター出力端子が必用です。この端子が無い PC をご使用の場合は別途変換コネクタを必ず持参下さい。
*Mac を使用の発表者は必ず外付けのコネクタをご持参下さい。
*電源アダプターを必ずお持ち下さい。
*スクリーンセーバー、ならびに省電力設定は予め解除して下さい。
*万一に備えバックアップ用のデータ (USB メモリ、CD-R) をご持参下さい。
*発表終了後 PC をご返却致しますので、PC オペレーター席にお立ち寄り下さい。

■各種会議日程

理 事 会：平成 25 年 12 月 6 日（金）11：30～12：20 小会議室 3
評議員会：平成 25 年 12 月 6 日（金）12：20～12：50 小会議室 3
総 会：平成 25 年 12 月 6 日（金）13：00～13：30 会議室 3-4

■大会事務局

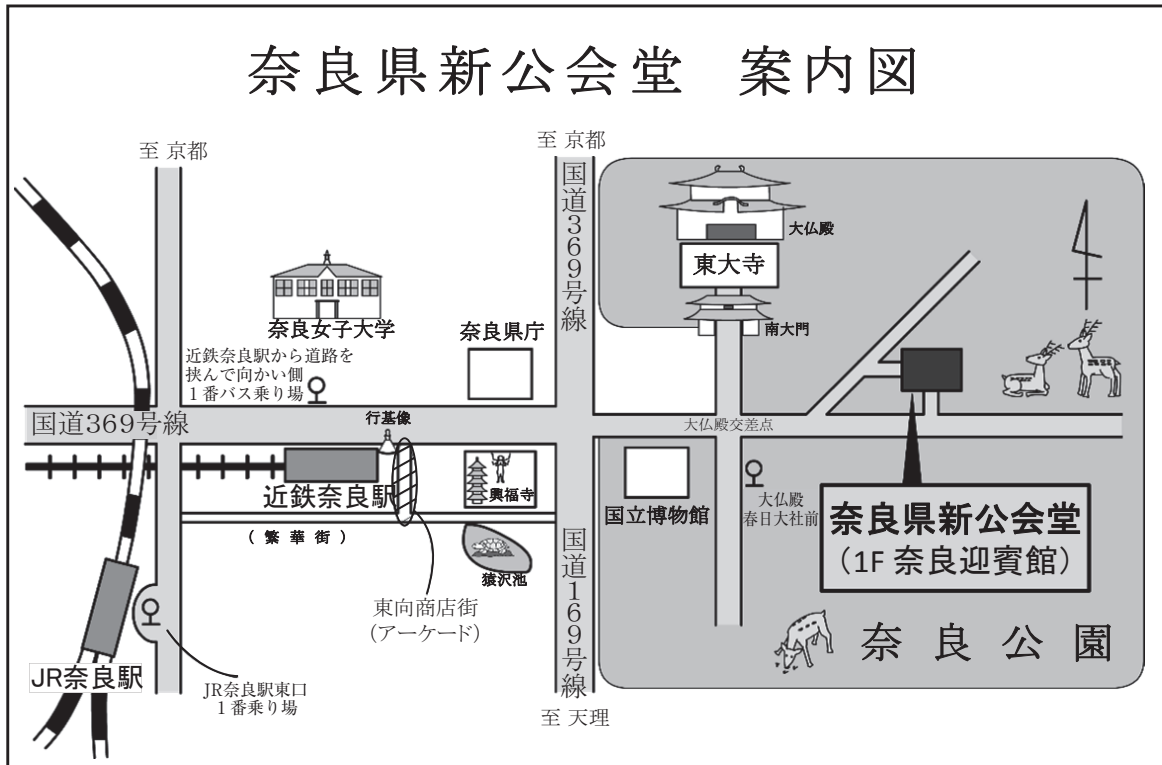
〒634-8521 奈良県橿原市四条町 840
奈良県立医科大学 医学部化学教室内
TEL & FAX：0744-29-8810
E-mail：artificial-blood@naramed-u.ac.jp

大会日程表

	平成 25 年 12 月 6 日 (金)	平成 25 年 12 月 7 日 (土)
9:00	9:00-9:25 受付 9:25 開会の辞	9:00-9:30 受付
9:30	9:30 第20回年次大会を祝して	9:30-11:00 一般演題 2 司会：小松 晃之 (中央大学) 佐藤 高彰 (信州大学) 演者：木村 拓矢 (中央大学) 春木 理沙 (中央大学) 伊藤 大知 (東京大学) 佐藤 高彰 (信州大学) 赤羽 健 (信州大学) 百武 徹 (横浜国立大学)
10:00	9:40-10:30 特別講演 1 「わが国の血友病止血治療薬の歴史と展望」 演者：吉岡 章 (奈良県立医科大学 学長) 司会：池田 康夫 (早稲田大学)	11:00-11:10 休憩
10:30	10:30-11:30 一般演題 1 司会：堀之内 宏久 (さいたま市立病院) 演者：東 寛 (旭川医科大学) 丸山 徹 (熊本大学) 高瀬 凡平 (防衛医科大学校) 垣内 健太 (早稲田大学)	11:10-12:00 特別講演 2 「重症マリアの合併症とその治療」 演者：狩野 繁之 (国立国際医療研究センター 部長) 司会：酒井 宏水 (奈良県立医科大学)
11:00		12:00-12:05 休憩
11:30	11:30-12:20 理事会	12:05-12:55 教育講演 (ランチョンセミナー) 「クモの糸のミステリー」 演者：大崎 茂芳 (奈良県立医科大学 名誉教授) 司会：山本 恵三 (奈良県立医科大学)
12:00		12:55-13:00 休憩
12:30	12:20-12:50 評議員会 12:50-13:00 休憩	13:00-15:30 シンポジウム 2 「人工血小板/H12-(ADP)リボソームの前臨床」 司会：武岡 真司 (早稲田大学) 丸山 徹 (熊本大学) 演者：岡村 陽介 (東海大学) 藤山 敦史 (早稲田大学) 土井 麻実 (早稲田大学) 橋本 麻衣 (熊本大学薬学部) 萩沢 康介 (防衛医科大学校)
13:00	13:00-13:30 総会	
13:30	13:30-16:00 シンポジウム 1 「人工赤血球(Hb 小胞体)製剤の将来展望」 司会：小林 紘一 (慶應義塾大学) 高折 益彦 (東宝塚さとう病院) 演者：河野 光智 (慶應義塾大学) 東 寛 (旭川医科大学) 田口 和明 (崇城大学) 力久 直昭 (千葉労災病院) 荒木 淳 (東京大学附属病院)	
14:00		
14:30		
15:00		
15:30		15:30-15:40 休憩
16:00	16:00-16:10 休憩 16:10-17:00 トピックス 1 「TPA を内包するナノパーティクルを用いた、急性心筋梗塞症に対する次世代血栓溶解療法の開発」 演者：斎藤 能彦 (奈良県立医科大学 教授) 司会：武岡 真司 (早稲田大学)	15:40-16:30 トピックス 2 「妊娠高血圧症候群に対する人工赤血球を用いた新しい治療法の開発」 演者：太田 英伸 (国立精神神経医療研究センター 室長) 司会：木下 学 (防衛医科大学校)
16:30		16:30 閉会の辞
17:00		
17:30	17:30- 懇親会 (1 階, 奈良迎賓館)	
18:00		

交通案内

奈良県新公会堂 案内図



年次大会会場

奈良県新公会堂

〒630-8212

奈良県奈良市春日野町101

Tel: 0742-27-2630

年次大会会場までのアクセス

■ 近鉄(奈良線・京都線)

「近鉄奈良駅」より、東へ徒歩20分
(タクシー利用の場合、約3分)

「近鉄奈良駅」からバスを利用する場合
近鉄奈良駅の地上出口から、国道369号線を挟んで向かい側の、1番バスのりば(奈良公園・東大寺大仏殿方面)から、奈良交通バス「系統番号2 市内循環バス(外回り)」に乗車、「大仏殿春日大社前」下車、大仏殿交差点を東へ徒歩3分

■ JR(関西本線・奈良線)

・「JR奈良駅」より、東へ徒歩30分
(タクシー利用の場合、約6分)

・「JR奈良駅」からバスを利用する場合
東口を出て、1番バスのりばから、奈良交通バス「系統番号2 市内循環バス(外回り)」に乗車、「大仏殿春日大社前」下車、大仏殿交差点を東へ徒歩3分

懇親会会場

奈良迎賓館

〒630-8212

奈良県奈良市春日野町101

奈良県新公会堂 1F

Tel: 0742-24-5115

第1日目 平成25年12月6日(金)

9:25 開会の辞

9:30-9:40 第20回年次大会を祝して

9:40-10:30 特別講演1

「わが国の血友病止血治療薬の歴史と展望」

演者：吉岡 章（奈良県立医科大学・学長）

司会：池田 康夫（早稲田大学）

10:30-11:30 一般演題1

司会：堀之内 宏久（さいたま市立病院）

1. 「リボソームの投与後の脾細胞から Con A 刺激により産生されるサイトカイン・ケモカイン動態の網羅的解析」
東 寛（旭川医科大学）
2. 「出血性ショック輸血後の肝障害に対する一酸化炭素付加赤血球の保護メカニズム」
丸山 徹（熊本大学）
3. 「出血性ショック心臓における致死性不整脈発生機序及び人工酸素運搬体による治療効果に関する検討」
高瀬 凡平（防衛医科大学校）
4. 「マイクロ・ナノバブル分散酸素富化液を用いた液体換気への応用」
垣内 健太（早稲田大学）

11:30-12:20 理事会（小会議室3）

12:20-12:50 評議員会（小会議室3）

12:50-13:00 休憩

13:00-13:30 総会（学会会場：会議室3-4）

13:30-16:00 シンポジウム1「人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）製剤の将来展望」

司会1：小林 紘一（慶應義塾大学），司会2：高折 益彦（東宝塚さとう病院）

1. 「肺切除周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与と HIF-1 α の発現について」
河野 光智（慶應義塾大学医学部）
2. 「人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）を構成する脂質二重膜のもつ免疫調節効果について」
東 寛（旭川医科大学）
3. 「一酸化炭素付加型ヘモグロビン小胞体の特発性肺線維症治療薬としての創製」
田口 和明（崇城大学薬学部）
4. 「人工赤血球を利用して port-wine stain のレーザー治療成績を向上させる研究」
力久 直昭（千葉労災病院形成外科）
5. 「ラット後肢移植モデルを用いた人工赤血球の有用性に関する検討」
荒木 淳（東京大学附属病院）

16:00-16:10 休憩

16:10-17:00 トピックス1

「TPA を内包するナノパーティクルを用いた、急性心筋梗塞症に対する次世代血栓溶解療法の開発」

演者：斎藤 能彦（奈良県立医科大学内科学・教授）

司会：武岡 真司（早稲田大学）

17:30-20:00 懇親会（奈良県新公会堂内，クイーンアリス 奈良迎賓館）

第2日目 平成25年12月7日(土)

9:30-11:00 一般演題2

司会1:小松 晃之(中央大学), 司会2:佐藤 高彰(信州大学)

1. 「ヒト(ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの合成と酸素結合能制御」
木村 拓矢(中央大学)
2. 「(ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの溶液物性と血液適合性」
春木 理沙(中央大学)
3. 「SPG膜乳化法を用いたヘモグロビン/アルブミン架橋型人工酸素運搬体の開発」
伊藤 大知(東京大学)
4. 「ヘモグロビン小胞体(HbV)の静的構造及び濃厚ヘモグロビン溶液中の蛋白質相互作用」
佐藤 高彰(信州大学)
5. 「水和ポリエチレングリコールの排除体積効果と分子機能:ミセル系とポリエチレングリコールを包摂した蛋白質系の比較検討」
赤羽 健(信州大学)
6. 「微小血管における人工赤血球の酸素運搬過程に関する数値解析」
百武 徹(横浜国立大学)

11:00-11:10 休憩

11:10-12:00 特別講演2

「重症マラリアの合併症とその治療」

演者:狩野 繁之(国立国際医療研究センター 研究所 部長)

司会:酒井 宏水(奈良県立医科大学)

12:00-12:05 休憩

12:05-12:55 教育講演(ランチョンセミナー)

「クモの糸のミステリー」

演者:大崎 茂芳(奈良県立医科大学・名誉教授)

司会:山本 恵三(奈良県立医科大学)

12:55-13:00 休憩

13:00-15:30 シンポジウム2「人工血小板/H12-(ADP)リポソームの前臨床」

司会1:武岡 真司(早稲田大学), 司会2:丸山 徹(熊本大学)

1. 「人工血小板:H12-(ADP)リポソームの設計」
岡村 陽介(東海大学)
2. 「人工血小板の品質評価に関する検討」
藤山 敦史(早稲田大学)
3. 「人工血小板H12-(ADP)リポソームの止血能評価(出血後投与による検討)」
土井 麻実(早稲田大学)
4. 「健常及び病態時における血小板代替物H12(ADP)リポソームの頻回投与が体内動態に及ぼす影響」
橋本 麻衣(熊本大学)
5. 「H12-ADP-liposomeの新たな適応:衝撃波による肺出血マウスに対するH12-ADP-liposomeの救命効果」
萩沢 康介(防衛医大)

15:30-15:40 休憩

15:40-16:30 トピックス2

「妊娠高血圧症候群に対する人工赤血球を用いた新しい治療法の開発」

演者:太田 英伸(国立精神神経医療研究センター・室長)

司会:木下 学(防衛医科大学校)

16:30 閉会の辞

特別講演 1

わが国の血友病止血治療薬の歴史と展望

吉岡 章

奈良県立医科大学 学長

血友病 A, B は, X 染色体上の *F8*, *F9* 異常に基づく血液凝固第Ⅷ因子 (FⅧ), 第Ⅸ因子 (FIX) 欠乏・異常症で, 生涯にわたって重篤な出血症状を反復する。出血時の唯一の治療は各因子の補充療法である。

【過去～現在】

1970 年以前：新鮮全血輸血や血漿輸注のみ。

血液型に依存の上, 十分な因子レベルを確保出来ず。

1960 年代後半～1980 年代前半：Cohn (1940s) の第 I 分画および Pool & Shannon (1964) のクリオプレシピテート。

国内血漿を材料とし, 良好な回収率 (50%以上)。凍結乾燥市販品, FⅧ活性 (FⅧ:C) =2～5 U/ml でアナフィラキシーの他, 反復投与で循環血漿量の増大や高フィブリノゲン血症。

1970 年代後半～現在：第Ⅷ因子濃縮製剤 (VWF 複合体製剤コンファクト F[®], FⅧ:C=25 U/ml), 第Ⅸ因子濃縮製剤 (第Ⅱ, Ⅶ, Ⅸ, X 因子複合体製剤 /PCC, PPSB-HT[®], FIX:C=20 U/ml)。

あらゆる手術や外傷にも有効, 家庭注射療法 (1983) にも適用。国外の大量プール血漿を材料としたことから, HIV・HBV・HCV 感染症。1985 年以降, 加熱, S/D, ナノ濾過等の処理によるウイルス不活化・除去。

1980 年代後半～現在：モノクローナル抗体精製第Ⅷ因子製剤 (クロスエイト M[®]1992, FⅧ:C=25～100 U/ml), 同第Ⅸ因子製剤 (クリスマシン M[®], ノバクト M[®]1992, FIX:C=50～100 U/ml)。

超高度精製製剤 (ヒトアルブミン添加) で携帯可能。定期補充 (予防) 療法にも適用。

1990 年代～現在：遺伝子組換え型第Ⅷ因子製剤 (rFⅧ, コージネイト FS[®], アドベイド[®], FⅧ:C=50～400 U/ml), 同第Ⅸ因子製剤 (rFIX, ベネフィックス[®], FIX:C=100～400 U/ml)。

超高度精製製剤で, 全工程で動物・ヒト由来蛋白無添加の製剤もあり。

※インヒビター保有血友病 A, B 止血療法薬：内因系凝固機序のバイパス止血能を持つ活性型 PCC (ファイバ[®]) と遺伝子組換え型活性型第Ⅶ因子製剤 (rFⅦa, ノボセブ[®])。この他, 血漿由来 FⅦa+FⅨ 製剤が開発中。

※デスマプレシン注[®] (合成バゾプレシン)：FⅧ/VWF 増加作用があり, 中等症～軽症血友病 A (type1, type2A VWD も) に有効。

【将来展望】

現在完成度の高い補充療法薬を使用中。定期補充 (予防) 療法の推進や医療経済上の問題を抱える。

1) 遺伝子工学的または蛋白生化学的手法による分子修飾型製剤：現在開発中で長時間作用型が目標。

2) 第Ⅷ因子代替抗体 (bispecific antibody to FIXa and FX) 製剤：奈良医大小児科と中外製薬との共同開発。リン脂質膜上で FIXa と FX とを会合させるヒト型モノクローナル抗体の作製に成功。FⅧ非存在下で FⅧ代替活性を発現する。

重症マラリアの合併症とその治療

狩野繁之

(独)国立国際医療研究センター研究所 熱帯医学・マラリア研究部 部長

マラリアとは、病原体である“マラリア原虫”が“ハマダラカ”の刺咬でヒトに感染して起こる病気である。ヒトを固有の宿主とする原虫種は4種（熱帯熱、三日熱、四日熱、卵形マラリア原虫）あり、あわせて世界のおよそ100ヶ国に流行して、年間罹患者数は1.5～2.9億人、死亡者数は49～84万人と見積もられている。一方、わが国の“輸入マラリア”患者数は年間60人ほどである。

急性期のマラリアの3大兆候としては、発熱、貧血、脾腫を認めるが、熱帯熱マラリアでは、進行すると様々な合併症を呈してくる。すなわち、ヒトに感染する4種のマラリア原虫のうち、熱帯熱マラリア原虫だけが、赤血球内で成熟してゆく過程で寄生赤血球膜表面上に突起（knob）を形成し、このknobを介して、寄生赤血球は血管内皮細胞や非感染赤血球と接着（cytoadherence）する。原虫寄生率が高くなるにつれ、感染赤血球は非感染赤血球とともに毛細血管に塞栓（sequestration）する。これが脳内で起これば、脳マラリアを起こし、肺胞周囲の毛細血管で起これば、呼吸障害や肺水腫を惹起する。

特に近年注目されている重症マラリアの治療法として、アルテミシニン誘導体の併用療法 ACT（artemisinin-based combination therapy）がある。アルテミシニン（qinghaosu 青蒿素）は *Artemisia annua*（qing hao 青蒿）からの抽出薬剤で、中国の古典的記述には、少なくとも紀元前2世紀からの抗マラリア薬としての利用が認められている。その極めて優れた有用性は、世界のマラリア対策に大きくインパクトを与えており、今後、わが国におけるマラリアの治療にも ACT が導入されることが期待される。

さらに、重症マラリアの合併症には、抗マラリア薬投与の他、電解質補正、尿量管理、呼吸管理など、個別に支持療法をおこなう必要がある。特に貧血がひどい場合には、輸血が必須となる。しかしマラリアの高度流行地域では、医療環境やインフラが不十分のため、安全な輸血が困難な場合が多い。そこで、重症マラリアに対する治療法として人工酸素運搬体（ヘモグロビン小胞体：Hb-V）の適用可能性を評価する研究を開始した。Hb-V の特徴は、1) 常温で2年間以上保存可能、2) 低い感染症惹起のリスク、3) 血液型不問、4) 原虫増殖を促す宿主細胞補給にならない、など、マラリアの補助療法としての有用性が期待される。現在、マウスマラリアの感染実験系を用いて、詳細なデータの収集とその分析・評価を行っている。

クモの糸のミステリー

大崎茂芳

奈良県立医科大学 名誉教授

最近の科学技術の発展には目を見張るものがある。特に、ハイテクノロジーが自然界を征服したというような風潮も見られるが、果たしてそうなのであろうか。ハイテクを駆使して、生き物などの仕組みを解き明かそうとしても、その奥深さを思い知らされることが多い。やはり、生き物が歩んできた進化の歴史の重みを見捨てることはできないのかもしれない。このようなことから、ここでは、4億年もの長い進化の歴史を空中で死と直面しながら生き延びてきたクモに焦点を当て、自然に学ぶという観点から、厚いベールに覆われた糸のミステリアスな秘密を解き明かしてみたい。

クモの糸は柔らかくて強いという、相反する機能を持っていることから、古くから注目され、最近では21世紀の夢の繊維とも称されるようになってきた。ところが、合成繊維が華やかであった40年も前は、クモ学では分類学が主流であり、糸の研究者は少なかった。演者は当時趣味の研究としての位置づけでクモの糸に焦点を当て、夢の繊維と言われる所以を提示してきた。その中で、クモの糸には素晴らしい耐熱性のあることや、進化と関係して昼行性のクモでは糸が紫外線で強化されることも見出した。また、細い糸にぶら下がって活動しているクモが分泌する糸（命綱）には、最近問題になっている危機管理や信頼性のしくみの原点が隠されていることなど（*Nature*, 1996）、驚くべき機能を持ち合わせていることも解き明かしてきた。

一方、実用化を目指した第一歩として、クモの糸の強度の実感を得るために、芥川龍之介の小説『蜘蛛の糸』のように「ヒトがクモの糸にぶら下がるのか？」に挑戦してみた。また、クモの糸の柔らかさと強さという究極の機能が発揮できるものとしてヴァイオリンの弦に求め、「クモの糸でヴァイオリンは弾けるのか？」の難題に挑戦してみることにした。失敗の日々が続いたが、予想外の独特な繊維構造が実現した結果、ストラディヴァリウスに匹敵するような音色を醸し出すことに成功した（*Phys. Rev. Lett.*, 2012）。その独特な音色はBBCを始め世界各国のマスコミから世界中に発信されたが、これらの挑戦過程を追ってみたい。

最後に、厚いベールに覆われたクモの糸の奥深さと人間の科学技術とのギャップについても触れたい。

トピックス 1

TPA を内包するナノパーティクルを用いた、急性心筋梗塞症に対する次世代血栓溶解療法の開発

斎藤能彦, 川田啓之

奈良県立医科大学 第一内科

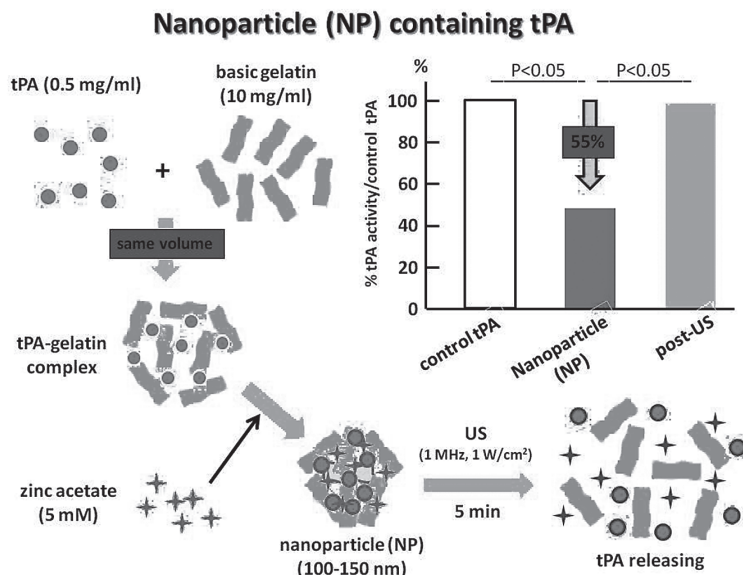
急性心筋梗塞 (AMI) では、超急性期の可及的速やかな (理想的には 1 時間以内) 閉塞冠動脈の再開通が、梗塞サイズの縮小ひいては慢性心不全の回避さらには生命予後の改善に重要な要因である。

現在 AMI の超急性期治療としては、カテーテルを使用した風船治療による冠動脈再開通療法がその再開通の確実性から主流となっているが、カテーテル実施可能な専門施設に搬送する時間的ロスが免れないという点が最大の欠点を有している。一方、血栓溶解療法は、簡便性と迅速性という観点からは理論的には救急車内で治療開始することも可能であるが、閉塞冠動脈の再開通率の低値、出血の副作用の危険性から、現在では殆ど実施されていない。

従って、従来の血栓溶解療法の迅速性と簡便性を担保しつつ、かつ、カテーテルによる再開通療法と同等の再開通能力を有し、出血の副作用を軽減させるための次世代血栓溶解療法の開発が待たれている。

今回我々は、組織プラスミノゲンアクティベーター (TPA) をゼラチンで内包化することにより、全身を循環中には TPA 活性を抑制しておき (ステルス化)、血栓部位にターゲティングし、超音波刺激により 100% TPA が再活性化されるナノパーティクルによる DDS の開発に成功した (図)。さらに、ブタ心筋梗塞モデルを用いて、この DDS の血栓溶解療法の有効性を確認した。

この DDS が臨床応用される可能性を示した。



妊娠高血圧症候群に対する人工赤血球を用いた治療法の開発

太田英伸¹，李コウ¹，田口和明²，大柿 滋²，泉 仁美¹，稲垣真澄¹，岡村州博³，小田切優樹⁴，酒井宏水⁵，八重樫伸生²

¹ 国立精神・神経研究センター 精神保健研究所 知的障害研究部，² 熊本大学大学院 薬学教育部，

³ 東北大学病院 周産母子センター，⁴ 崇城大学 薬学部 ⁵ 奈良県立医科大学 医学部 化学教室

輸血の代用として開発されてきたヘモグロビン小胞体（人工赤血球）は，期限切れのヒト赤血球からヘモグロビンを精製濃縮し，リン脂質小胞体に内包した小球粒子（直径 250 nm）である．これまでの私達の研究から，妊娠ラット・モデルにて慢性投与された人工赤血球が細網内皮系で適切に代謝され，妊娠母体・胎児ともに副作用を与えないことが確認された．私達は更に研究を進め，人工赤血球を妊娠高血圧症候群（PIH: pregnancy-induced hypertension）の治療に応用する検討を開始した．

これまでの PIH 治療開発では，胎盤の血流不全の原因であった子宮螺旋動脈の狭小化を誘導する生理機構を解明し，動脈狭小化を防ぐ戦略が取られてきた．しかし関連因子の同定は難しく，「妊娠高血圧症候群」に対する根本的な治療法は現在確立していない．そこで私達は視点を変え，これまでの「胎盤形成期における螺旋動脈の狭小化に対する予防治療」でなく「胎盤形成後の既に狭小化した螺旋動脈に対応する治療法」を開発した．具体的には，ラット PIH モデルにて，狭小化した螺旋動脈でも通過可能なナノマイクロ・サイズの人工赤血球にて胎盤に酸素供給を行い低酸素状態を解除することにより，胎児脳を保護できるかどうか，胎児発育を促すことができるかどうか，検討を行った．

肺切除周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与と HIF-1 alpha の発現について

河野光智¹, 重信敬夫¹, 神山育男¹, 渡辺真純¹, 堀之内宏久^{1,2}, 酒井宏水³, 小林紘一¹

¹ 慶應義塾大学医学部呼吸器外科, ² さいたま市立病院呼吸器外科, ³ 奈良県立医科大学化学教室

【背景】 人工酸素運搬体として開発されたヘモグロビン小胞体 (HbV) はヘモグロビンを内包させたリポソームで, 期限切れ輸血用ヒト赤血球よりヘモグロビンを抽出, 精製, ウィルス不活化を行ったのち, リポソームに内包, 膜表面を PEG 修飾して粒径を 250nm, P50 は 25~28 Torr に調製した粒子である. 血液中で酸素運搬体として機能することは, ラットやビーグルにおける交換輸血試験で確認され, 90%の脱血交換試験でも生存が可能であった. 出血性ショックの蘇生に用いた場合も良好な成績が得られている. 手術中の出血に対する投与により, 輸血の回避が可能となると期待されている.

【目的】 肺切除術中に大量出血する動物モデルとして, マウスに 40%交換輸血を行い, 同時に左肺全摘術を行うモデルを作成した. HbV 投与の有効性と安全性を検討し, 主要臓器の低酸素状態を組織学的及び低酸素誘導因子 hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) の発現で評価した.

【方法】 C57BL/6 マウスを麻酔後, 頸動脈にカテーテルを挿入し, 試料溶液で循環血液量の 40%を交換する. 人工呼吸器下に左肺全摘術を施行する. 輸血, 輸液を替え以下の 4 群を作成する. (1) Lactate Ringer 溶液 (LR) 群, (2) 5%アルブミン生食液 (rHSA) 群: 25%ヒトアルブミンを生理的食塩水に 5%濃度となるよう溶解した液体, (3) マウス保存血液 (sRBC 群): マウス洗浄赤血球を生理的食塩水に再分させ Hb 濃度を 8.6g/dl に調整した液体, (4) ヘモグロビン小胞体分散液 (HbV 群): Hb 小胞体を 5%アルブミンに分散した液体. Hb 濃度は 8.6g/dl に調整する. 術後 7 日目まで観察を行い, 血中のサイトカイン測定を行った. 肝臓および腎臓での HIF-1 alpha の発現を免疫染色で評価した.

【結果】 LR 群は術後 1 日までに全例が死亡した. rHSA 群は 7 日目の生存率が 50%であったのに対し, sRBC 群と HbV 群では全例が生じた. rHSA 群では術後 3 日目に体重が最低となったが, sRBC 群や HbV 群では減少率が低く, 回復が早い傾向を認めた. 組織学的に rHSA 群では肝細胞の空胞変性が著明で遷延したのに対し, sRBC 群や HbV 群では肝細胞の変性は限局的で 7 日目までには回復していた. HbV 群では肝臓および腎臓での HIF-1 alpha の発現が sRBC 群と同等に抑制されていた.

【考察】 HbV による 40%交換輸液では, 肺全摘術後にマウス全例が生じた. 主要臓器の低酸素も回避されていた. 肺全摘による呼吸機能低下状態でも HbV が有効に機能し, 外科的侵襲からの回復過程に深刻な影響を与えなかった. HbV 投与は肺切除手術での出血においても有効であると考えられた.

人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）を構成する脂質 2 重膜のもつ免疫調節効果について

東 寛¹, 酒井宏水²

¹ 旭川医科大学, ² 奈良県立医科大学

我が国の人工酸素運搬体は、脂質 2 重膜（リボソーム）にヒトヘモグロビンを内包した、いわゆる細胞型人工赤血球で、Hemoglobin vesicle (HbV) と呼称されている。その酸素運搬能は、ヒト赤血球のそれと遜色がない。実際に脱血モデル動物を用いた実験では血液代替物として安全に使用できることが示されている。その血液代替物としての使用を考えると、通常のリボソーム製剤での投与量を遥かに越える量のリボソームを投与することになり、予期せぬ副作用の合併が懸念された。その為に、開発に際して、大量投与に伴う合併症が様々な角度から検討されてきた。その結果、生命に危険を及ぼす重大な副作用や、軽微であっても長期に持続する無視できない副作用は観察されておらず、そのすぐれた生体適合性が示されてきた。筆者らは、投与された HbV が細網内皮系に速やかに取り込まれることから、そのことが免疫応答に与える影響について、詳細に検討を行ってきた。その結果 1) HbV あるいは空リボソームを投与後の脾細胞は Con A 刺激に対する増殖が抑制されている。2) リボソームを貪食した脾マクロファージが T 細胞の増殖を抑制する機能を一過性に獲得する。3) T 細胞の増殖抑制にはマクロファージと脾 T 細胞との接触が必要である。4) 増殖抑制にはマクロファージの産生する NO が関与している。5) HbV の投与は in vivo に於ける抗体産生反応を抑制しないこと等を明らかにしてきた。本シンポジウムでは、新たな知見として、6) リボソームを貪食したマクロファージが、T 細胞増殖反応系に於けるサイトカインやケモカインの産生動態を変化させうることを紹介する。

一酸化炭素付加型ヘモグロビン小胞体の特発性肺線維症治療薬としての創製

田口和明¹, 永尾紗理², 丸山 徹², 小田切優樹¹

¹ 崇城大学 薬学部, ² 熊本大学 薬学部

【緒言】 一酸化炭素 (CO) は赤血球中のヘモグロビンと結合し, 赤血球の酸素運搬を阻害する有毒ガスとして広く認識されている。その反面, CO は抗炎症, 抗酸化, 抗アポトーシス作用などの多くの生理活性を有する情報伝達ガス分子であることが近年の多くの基礎研究の結果から明らかとなった。そのため, CO は有望な創薬シーズと考えられるが, ガス分子の状態では CO を生体内コントロールすることは容易でなく, CO を用いた創薬は実現していない。我々は, 赤血球代替物製剤であるヘモグロビン小胞体 (HbV) を CO キャリアとして使用することで CO を用いた新薬の創製が可能ではないかという着想に至った。本研究は, CO 結合型 HbV (CO-HbV) の適応疾患候補として, 発症及び進展に炎症や活性酸素が関与し, また, 有効な治療薬が存在しない難治疾患である特発性肺線維症 (IPF) を対象とし, CO-HbV の IPF 治療薬としての有用性をブレオマイシン (BLM) 誘発 IPF マウスモデルを用い評価した。

【方法】 ICR マウスに BLM (5mg/kg) を経気道投与し, BLM 誘発 IPF マウスモデルを作製した。BLM 投与 30 分前及び 1 日後に, 生理食塩水, HbV または CO-HbV を尾静脈投与し, 各種病態関連パラメータを 3 群間で比較した。

【結果および考察】 まず初めに, CO-HbV を投与量依存的に投与し (0, 250, 500, 1000, 1400mg Hb/kg), BLM 誘発 IPF マウスモデル作製後 14 日目における肺組織中ヒドロキシプロリン量及び線維化部位の特異的染色法である Masson's trichrome 染色による線維化の評価を行い, 至適投与量の設定を行った。その結果, CO-HbV 投与量の増加に伴い肺組織の線維化は抑制され, その効果は 1000mg Hb/kg で頭打ちとなった。よって, 本研究における CO-HbV の投与量を 1000mg Hb/kg と設定した。また, この線維化は, HbV (1000mg Hb/kg) 投与では抑制されなかった。さらに, 肺機能検査 (努力肺活量, 肺組織の硬さ) について評価したところ, CO-HbV 投与群で肺機能の低下を有意に抑制していた。続いて, CO-HbV の線維化抑制メカニズムの解明を CO の抗炎症及び抗酸化作用に着目し, 検討した。その結果, CO-HbV 投与により気管支肺胞洗浄液中の白血球浸潤と肺組織中の炎症性サイトカイン産生量は有意に減少し, 抗炎症効果が認められた。また, 肺組織中酸化産物 (ニトロチロシン・8-OHdG) の免疫染色及びスーパーオキシドを反映する DHE 染色の結果より, CO-HbV 投与により肺組織中の酸化産物は著明に減少し, 抗酸化作用も認められた。加えて, CO-HbV 投与により, 線維化因子の一つである TGF- β の発現抑制も観察された。

【結論】 CO-HbV は CO の抗炎症・抗酸化作用により, BLM 誘発の肺線維化の進展に対して優れた抑制効果を発揮し, IPF の新規治療薬になりうる可能性が示された。

人工赤血球を利用して port-wine stain のレーザー治療成績を向上させる研究

力久直昭¹, 渡邊彰二², 佐藤兼重³, 酒井宏水⁴

¹千葉労災病院形成外科, ²埼玉小児医療センター形成外科, ³千葉大学, ⁴奈良県立医科大学

【緒言】色素レーザー照射法は赤アザ (port-wine stain) の治療方法として確立しており, 保険収載された治療である。照射されたレーザー光は異常血管内のヘモグロビンに吸収され熱エネルギーに変換される。この熱エネルギーが血管壁に伝わり血管内皮が破壊され, 最終的に血管が壊死し吸収されて port-wine stain が消失する。人工赤血球 (Hb-V) を投与しレーザー光のターゲットを増やしてから照射治療を行うことによって, レーザーの治療効果は向上すると考えられる。本研究はその基礎研究である。

【方法】①血液のレーザー光吸光度を Hb-V 投与前後で比較する (in vitro)。②レーザー光を照射したときに発生する熱量を血液と Hb-V で比較する (in vitro)。③ Hb-V 投与前後で毛細血管を顕微鏡で観察する (in vivo)。④ Hb-V 投与前後で鶏冠 (port-wine stain の動物モデル) の赤みを機器用いて測定する (in vivo)。⑤ Hb-V を静注したニワトリの鶏冠にレーザーを照射し Hb-V の効果を組織学的検討する (in vivo)。

【結果および考察】①ラットに循環血液量のおよそ 10% 量の Hb-V を静脈投与すると血液の 585nm の吸光度は投与前の 1.34 倍～1.40 倍となった。②同じヘモグロビン濃度に調整した人赤血球・Hb-V 溶液・二つの混合液の 3 種類の液体に, 同じ条件でレーザーを照射したところ, 同じ程度の液温上昇が観察され有意差を認めなかった。③ラットに循環血液量のおよそ 10% 量の Hb-V を静脈投与すると, 眼球結膜の毛細血管は拡張した。④ニワトリに循環血液量のおよそ 10% 量の Hb-V を静脈投与すると鶏冠の赤みは投与前の 1.05 倍となった (測定装置: Mexameter MX16 (568nm))。⑤ニワトリに循環血液量のおよそ 10% 量の Hb-V を静脈投与したうえで鶏冠にレーザーを照射したところ, 表皮損傷・真皮のフィブリノイド変性 (結合組織に変性したフィブリンを主体とする種々の血漿成分よりなる物質の滲み込み) は軽減し, 血管以外の皮膚構造物への熱影響は減少した。また Hb-V は血管内に留まる塞栓物質としても機能し, 血管の壊死吸収の時期において Hb-V 投与群ではレーザー光の吸収が促進され標的部位に強い炎症反応を生起することがわかった。

【結論】Hb-V の投与によってレーザー光の血管選択性が上がることが今回の研究から示唆された。レーザー光の血管選択性向上によって血管以外の皮膚構造物への熱作用は軽減する。熱傷・色素沈着・色素脱失などの照射合併症は少なくなり, 安全で効果の高い治療が可能となる。また, これまで報告されてきたヘマトポルフィリン・インドシアニンググリーンなどの色素を用いて血管内での薬剤酸化還元反応に基づいて治療を行う photodynamic therapy とは異なり, レーザー照射後に Hb-V 自体が血管塞栓物質として機能するため, レーザーと Hb-V を用いた本治療方法では標的血管を強く傷害することが可能となる可能性も示された。以上から Hb-V の臨床応用によって port-wine stain 治療は成績が向上すると期待できる。

【文献】力久直昭 ヘモグロビンを含んだ血液代替物を利用した単純性血管腫のレーザー治療の効果についての考察 人工血液, 2011; 18: 110-113.

Gu et al, Clinical study of 1949 cases of port wine stains treated with vascular dynamic therapy (Gu's PDT). Ann Dermatol Venereol 2007; 143: 241-244.

【謝辞】組織標本の作製および検鏡においてご指導して下さった松本皮膚科クリニック院長松本文昭先生, 千葉労災病院病理部市東功先生, また試料を提供して下さった, さいたま市立病院堀之内宏久先生に深謝申し上げます。

シンポジウム1-5

ラット後肢移植モデルを用いた人工赤血球の有用性に関する検討

荒木 淳¹, 酒井宏水², 加賀谷優¹, 光嶋 勲¹

¹ 東京大学医学部形成外科, ² 奈良県立医科大学医学部化学教室

【緒言】 外傷による切断四肢の再接着手術を行う際、切断されてから再接着されるまでの虚血時間や保存状態が、その生着の成否や術後の機能予後に大きくかかわってくる。また、切断部位が近位であり、切断端に筋肉が多く含まれる場合には、血流再開時の再灌流障害が大きな問題となる。これに対し現在は冷却保存しておくしか対処法がないため、我々は人工赤血球を用いた新たな組織保存法の開発を目指し、共同実験を進めている。

【方法】 ラット後肢の大腿動静脈および大腿神経を温存しつつ大腿骨幹部レベルで完全切断し、切断端の大腿動脈より人工赤血球を用いた組織保存液を灌流した。大腿静脈からの還流液を採取し、血液ガス分析を行った。一定時間（6～8時間）灌流保存を行った後、顕微鏡下に大腿動静脈および大腿神経を吻合し、切断肢再接着術を施行し、手術後の生着を評価した。

【結果および考察】 大腿静脈還流液の血液ガス分析において、灌流前よりも pO_2 が著明に減少し溶存酸素が組織内で使われていることが示唆された。また、数値の個体差はあるものの灌流直後は高値を示した Lactate が、灌流時間を経るごとに漸減した。Na, K, Cl などの電解質は比較的一定に保たれていた。これまで常温保存では4時間が再接着の限界とされていたが、中には7, 8時間の虚血時間をクリアして再接着に成功する例もあった。

【結論】 人工赤血球の組織保存液としての応用の可能性が示唆された。今後、従来の臓器保存液との比較や再接着後の長期機能予後の検討などを行っていく必要がある。本法は、肝・腎・心・肺・小腸・顔面・四肢・喉頭・子宮などの同種移植医療にも応用が可能であり、使用用途はますます広がっていくものと思われる。

人工血小板：H12-(ADP) リボソームの設計

岡村陽介¹，武岡真司²，池田康夫²，半田 誠³¹ 東海大学 創造科学技術研究機構 ナノ生体材料科学研究室，² 早稲田大学大学院 先進理工学研究科 生命医科学専攻，³ 慶應義塾大学医学部 輸血細胞療法センター

血小板は一次血栓形成を通じて生体の止血機構の中心的役割を果たす。現在、血小板の量的・質的異常により惹起される出血の予防や治療に対して唯一信頼できる手段は血小板輸血である。その供給量はここ5年間で急増しており¹⁾、高度医療に必要な血小板輸血の需要は将来も減少することはないと予想される。しかし、人口減少と高齢化に伴う献血者数の低下により確保できる血小板製剤の絶対量の減少が予想されること、その保存期間は日本では4日間と非常に短く厳密な保存条件が要求されることから、緊急時等の供給体制が極めて困難であるのが現状である。また、核酸増幅検査の導入により血液製剤の安全性は著しく向上したものの、未だにウイルス感染などのリスクは完全には払拭されてはいない。今後の先進医療において、感染の危険性がなく安定供給可能な人工血小板の開発は当然目指すべき方向であろう²⁾。しかし、血小板の止血機構は、接着・粘着・凝集・形態変化・顆粒放出・血液凝固系の活性化など、巧妙に制御された多段階反応が動的に連動しているため、これら全ての機能を模倣した人工系の構築は非現実的と思われる。

そのような背景のもと、我々は血小板凝集の分子機構に着目した。血管損傷部位へ粘着した活性化血小板を認識できる分子をナノ粒子の表面に担持させれば、それが損傷部位へ特異的に集積して血栓形成を誘導する起点となり、集積したナノ粒子が出血部位を充填する効果が期待できるとの発想に基づいて、極めて単純な人工血小板の設計に結びつけた。具体的には、フィブリノーゲン γ 鎖C末端ドデカペプチド (HHLGGAKQAGDV: H12) を担持させ、かつ止血能増幅効果を発現するアデノシン5'-二リン酸 (ADP) を内包したリボソーム (H12-(ADP) リボソーム) を新規に構築し、その止血効果に関する知見を集積してきた³⁾。本講演では、H12-(ADP) リボソームの設計方針、特に、H12の選定理由やADP内包に至った経緯を中心に紹介する。

1) 日本赤十字社ホームページ <http://www.jrc.or.jp/blood/shiryo/index.html>2) 半田 誠 他. 血栓止血誌 **19**, 774-778 (2008).3) Okamura, Y. *et al. J. Thromb. Haemost.* **7**, 470-477 (2009).

人工血小板の品質評価に関する検討

藤山敦史, 土井麻実, 池田康夫, 武岡真司

早稲田大学大学院先進理工学研究科

【緒言】 フィブリノーゲン由来ドデカペプチド (HHLGGAKQAGDV; H12) をポリエチレングリコール (PEG) 鎖末端に担持させ、かつ、リボソーム内に血小板凝集惹起物質である Adenosine 5'-diphosphate (ADP) を内包させたリボソーム (H12-(ADP)リボソーム) は、止血能を有し、血小板減少症モデル動物の出血時間を短縮することが報告されている¹⁾。調製した H12-(ADP)リボソームの *in vitro*, *in vivo* 評価をするためには、品質評価の検討が重要である。そこで、本研究では、品質評価法ならびにこれまで 19 ロットのリボソームの品質評価結果を報告する。

【方法】 混合脂質 (DPPC/cholesterol/DHSG/PEG-DSPE/H12-PEG-Glu2C₁₈=5/5/1/0.033/0.033) を ADP 水溶液 (1mM) にて水和した ([lipid]_{total}=20mg/mL) 後、エクストルージョン法 ($\phi=0.20\ \mu\text{m}$) にて粒径制御し、H12-(ADP)リボソームを調製した。調製した H12-(ADP)リボソームについて、粒子径、ゼータ電位、膜組成比、ADP 内包量および H12 担持量を測定し、異なるロット間での比較、検討を行った。

【結果および考察】 粒子径、ゼータ電位を測定したところ、各々、 $226 \pm 75\text{ nm}$, $-9.5 \pm 1.3\text{ mV}$ 程度に制御されていることがわかった。また、膜組成比を測定したところ、平均して、DPPC/cholesterol/DHSG/PEG_{total}=4.9/5/1.0/0.05 (by molar) と算出され、仕込みの組成比 (5/5/1/0.066) とほぼ一致していた。ADP 内包量および H12 担持量については、ロット間において多少のばらつきが認められた (変動係数 CV (= 標準偏差 / 平均) は、各々 0.24, 0.19)。そのため、人工血小板の機能評価や動物実験の結果などから、どの程度の範囲までが許容され得るのかどうか検討する必要がある。

【結論】 本研究により、本研究室で調製された 19 ロットの人工血小板について、5 項目の品質を確認したところ、ほぼ均質に調製されていることが確認できた。

【文献】 1) Okamura, Y. *et al.*, *J. Thromb. Haemost.*, **7**, 470-477 (2009).

【謝辞】 本研究は、厚生労働科学研究費補助金 (創薬基盤推進研究事業) の助成によって行われた。

人工血小板 H12-(ADP) リポソームの止血能評価（臓器損傷後投与による検討）

土井麻実¹, 木下 学², 萩沢康介³, 西川可穂子⁴, 柳川錬平⁵, 半田 誠⁶, 池田康夫¹, 武岡真司¹

¹ 早稲田大学大学院先進理工学研究科, ² 防衛医科大学校免疫微生物学, ³ 防衛医科大学校生理学, ⁴ 防衛医科大学校救急部, ⁵ 防衛医科大学校防衛医学講座, ⁶ 慶應大学医学部

【緒言】 H12-(ADP) リポソームは、その表面にフィブリノゲン γ 鎖 C 末端ペプチド (H12) を担持し、その内水相に血小板を活性化させる ADP を内包させた血小板代替物である。本剤はこれまでに、脱血と洗浄赤血球の輸血を繰り返し行い、作製した血小板減少病態モデルウサギにおいて臓器損傷前の予防投与による止血能を示してきた¹⁾。しかし臨床では出血後に血小板輸血が行われており、また本モデルでは凝固因子 Fibrinogen が低値のまま補正されず、H12-(ADP) リポソームの止血能を過小評価している問題点があった。そこで本研究では、より臨床に即して臓器損傷後に H12-(ADP) リポソームを投与し、急性期予後について評価した。さらに H12-(ADP) リポソームに Fibrinogen を併用した系についても検討した。

【方法】 NZW ウサギの大腿動静脈にカニューレーションを行い、1 回 25 mL の動脈血の脱血と洗浄赤血球の輸血を繰り返し行って、血小板数を $50 \times 10^3 / \mu\text{L}$ まで低下させた血小板減少病態モデルウサギを作製した。本モデルにおいて、肝臓の外傷性臓器損傷の作製と H12-(ADP) リポソームの静脈投与を行い、5 分間の圧迫止血の後に損傷部位からの出血量ならびに出血時間を測定した。また、閉腹後の生命予後を観察した。血小板を多く含む platelet-rich plasma (PRP) を陽性対照群、凝固因子は含むが血小板をほとんど含まない platelet-poor plasma (PPP) や ADP を内包していない H12-(PBS) リポソームの投与を陰性対照群とした。さらに H12-(ADP) リポソームと同時に Fibrinogen (70 mg/kg) を投与した群を H12-(ADP) リポソーム + Fibrinogen 投与群とし、急性期予後について比較した。

【結果および考察】 血小板減少病態モデルウサギを用いた肝臓損傷後の試料投与において、H12-(ADP) リポソーム、陽性対照群である PRP 投与群の救命率は 60% および 50% であったのに対し、陰性対照群である H12-(PBS) リポソーム、PPP 投与群の救命率は 10% および 17% であった。このことより H12-(ADP) リポソームは PRP と同様に陰性対照群に対して有意な止血能を有していることが確認された。H12-(ADP) リポソーム + Fibrinogen 投与群において救命率は 33% であった。H12-(ADP) リポソーム、PRP および H12-(ADP) リポソーム + Fibrinogen 投与群において救命率が 60% 以下に留まったのは、血小板減少症病態時（臓器損傷前）のヘモグロビン値が 6.4 g/dL と過度に低値で、それぞれの試料投与後の平均動脈圧が 60 mmHg 以下となりショック Grade3 の状態だったことが原因と考えられる。

【結論】 血小板減少病態モデルウサギを用いた肝臓損傷後投与において、人工血小板 H12-(ADP) リポソームは PRP 投与群と同等の救命効果を有することを確認した。

【文献】 1) Nishikawa K. *et al. J Thromb Haemost* **10**: 2137–2148 (2012)

【謝辞】 本研究は厚生労働科学研究費補助金の支援のもと行われた。

健常及び病態時における血小板代替物 H12(ADP) リポソームの頻回投与が体内動態に及ぼす影響

橋本麻衣¹, 大柿 滋¹, 氏平隼人¹, 田口和明², 渡邊博志¹, 藤山敦史³, 土井麻実³, 池田康夫³, 武岡真司³, 半田 誠⁴, 小田切優樹², 丸山 徹¹

¹ 熊本大学薬学部, ² 崇城大学薬学部, ³ 早稲田大学理工学術院, ⁴ 慶應義塾大学医学部

【緒言】 血小板減少時には濃縮ヒト血小板による輸血治療が施行されているが、ウイルス感染の危険性が否定できない上、保存期間が短いなど、解決すべき課題が残されている。H12(ADP)リポソームは、リン脂質二重膜表面にフィブリノーゲン γ 鎖C末端(H12)を担持し、内部にADPを内包した製剤であり、ヒト血小板に匹敵する止血効果を発揮することから、血小板代替物としての臨床応用が期待されている。しかしながら、本剤のようなPEGを修飾したリポソームでは、2回目投与において、主に肝臓への取り込みが亢進する結果、血中から速やかに消失するという“Accelerated Blood Clearance(ABC)現象”の存在が報告されている。また、この機序についてはIgM抗体の特異的産生によることが明らかにされている。そのため、前臨床の段階で、ABC現象との関連性を明らかにすることは、本剤の臨床応用を視野に入れる上で必要不可欠である。本研究では、ブスルファン誘発血小板減少症モデルラットを用いて、H12(ADP)リポソームを繰り返し投与した際のIgM抗体産生亢進及び体内動態の変動を解析し、ABC現象との関連性について検討した。

【方法】 健常及びブスルファン誘発血小板減少症モデルラットにH12(ADP)リポソーム(10mg lipid/kg)を投与し、血液を経時的に採取し、ELISA法を用いてIgM抗体の産生を検討した。また両ラットにH12(ADP)リポソーム(10mg lipid/kg)を投与し、5日後にリポソームの脂質膜を構成するコレステロールと内包されたADPを、それぞれ³H及び¹⁴Cで標識した³H・¹⁴C-H12(ADP)リポソーム(10mg lipid/kg)を投与して、経時的に血漿及び臓器中の放射活性を測定した。得られた結果をモーメント解析し、体内動態パラメータを算出した。

【結果及び考察】 健常ラットにH12(ADP)リポソームを投与したところ、IgM抗体の産生が4日目から観察され、その値は5-7日目以最も上昇した。健常ラットにH12(ADP)リポソームを繰り返し投与して体内動態を解析したところ、初回投与時に比べて、2回目の投与時には、血中濃度の顕著な低下が観察され、ABC現象が認められた。健常ラットとは対照的に、血小板減少症モデルラットの場合、IgM抗体値の大きな変化は観察されなかった。また、繰り返し投与時の体内動態を解析したところ、2回目投与時の場合は初回投与時に比べて、血中濃度が若干減少したが、その変化は小さく、明らかなABC現象は認められなかった。その際、H12(ADP)リポソームの代謝・排泄経路や臓器蓄積性は両動物間で違わなかった。加えて、健常及び病態時で観察された2回目投与時の体内動態の違いはIgM抗体産生の結果と良く対応していた。

【結論】 H12(ADP)リポソームの場合、想定される適応症の一つである抗癌剤誘発血小板減少症時には、繰り返し投与してもABC現象を生じにくい可能性が示され、H12(ADP)リポソームの有用性を動態学的観点から示すことができた。今後は、希釈性の血小板減少症においても、同様の検討を行う予定である。

シンポジウム2-5

H12-ADP-liposome の新たな適応：衝撃波による肺出血マウスに対する H12-ADP-liposome の救命効果

萩沢康介¹, 木下 学², 宮脇博基³, 佐藤俊一⁴, 鈴木英紀⁵, 土井麻美⁶, 武岡真司⁶, 斎藤大蔵⁷, 西田育弘¹

¹ 防衛医科大学校生理学講座, ² 同免疫微生物学講座, ³ 同救急部, ⁴ 防衛医科大学校・防衛医学研究センター情報システム研究部門,

⁵ 日本医科大学形態解析共同研究施設, ⁶ 早稲田大学先進理工学部, ⁷ 防衛医科大学校・防衛医学研究センター外傷研究部門

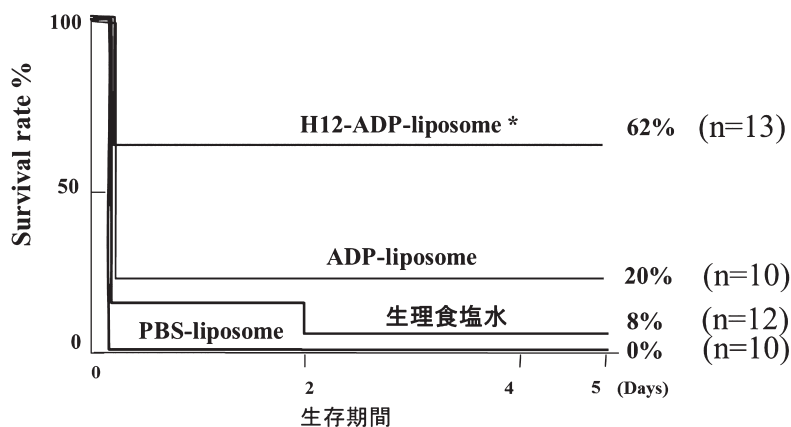
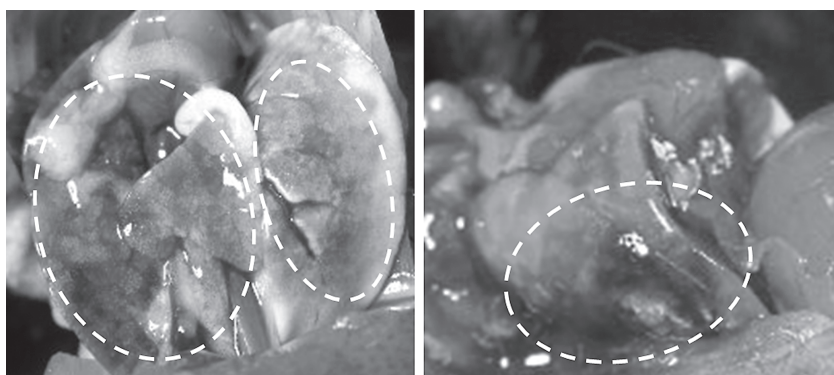
【緒言】 爆発等の衝撃による多発外傷では、心臓大血管・肝臓・腎臓等の重要臓器損傷とともに、肺出血が合併することが多い。我々はレーザー誘起衝撃波による致死的なマウス肺出血モデルを作成し、ヒトの Blast Lung Injury の病像に近似していることを確認している。(右楕円内が出血部位)

今回、H12-ADP-liposome の予防投与が救命効果を発揮するか検討した。

【方法】 H12-ADP-liposome をマウスの尾静脈から投与した後に、レーザー誘起衝撃波 (8J) を右側背から照射した (n=13)。生理食塩水を投与したもの (n=12)、分子標的性のない ADP-liposome を投与したもの (n=10)、PBS-liposome を投与したものを対照 (n=10) として、同様にレーザー誘起衝撃波を照射して、5 日後の生存率を比較した。

【結果】 5 日後の生存率は H12-ADP-liposome 群が 62%，生理食塩水投与群は 8%，ADP-liposome 投与群は 20%，PBS-liposome 投与群は 0%であった。病理学的検討では H12-ADP-liposome 群は生理食塩水投与群に比べて非照射側 (左側) 肺での出血面積が縮小していた。

【結論】 H12-ADP-liposome の予防投与は、衝撃波による致死肺出血の救命に有用である可能性が示唆された。



* p=0.014, mxn Chi square and Yates test

一般演題 1-1

リボソームの投与後の脾細胞から Con A 刺激により産生されるサイトカイン・ケモカイン動態の網羅的解析

東 寛¹, 高橋弘典¹, 永井一樹¹, 長森恒久¹, 高橋大輔², 藤原満博², 酒井宏水³

¹ 旭川医科大学, ² 北海道ブロック赤十字血液センター, ³ 奈良県立医科大学

【目的】 これまで、リボソーム（あるいは HbV）を投与後に摘出したラット脾臓においては、脾 T リンパ球の Con A 刺激による増殖反応が一過性に抑制されること、その現象は、リボソームを貪食した脾マクロファージが一過性に T 細胞増殖抑制能を獲得していることに起因する^k と、抑制効果の発現に NO が関与していることを報告してきた。一方、その際に、反応系で産生される各種サイトカイン・ケモカインの動態がどのように変化しているかは不明であった。今回は、そのことを明らかにする為に、反応系中のサイトカイン・ケモカインの動態の網羅的検討を行った。

【方法】 WKAH rat の尾静脈より循環血液量の 20% (V/V) 相当の空リボソームを注射し、翌日に脾臓を摘出して $1 \times 10^6/\text{ml}$ の単細胞浮遊液とした。それを、24 穴マイクロプレートに 1 ml ずつ分注し、Concanavalin A にて刺激を開始し、1, 2, 3 日後に上清を回収して、上清中のサイトカイン・ケモカイン（全 24 種類）の濃度変化を網羅的に検討した。コントロールは、生理食塩水を投与した後に摘出したラット脾細胞を用いた。

【結果および考察】 リボソーム投与ラット脾細胞がより高値を示し、かつ経時的に濃度が上昇したものは、ケモカイン（CCL-2,-3,-5）、TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-17, IL-2 であった。炎症性サイトカインである IL-1 β , IL-18, IL-1 α , IL-6 はコントロール群との差がなく、経時的な濃度変化も認めなかった。IFN- γ および IL-17 は NO の産生増加に寄与していると思われる。また IL-10 の増加も T 細胞の応答の抑制に関与している可能性がある。一方、IL-1 β , IL-18 の産生増加が認められないことから、リボソームは自然免疫系の活性化を誘導しないと考えられる。

【結論】 リボソーム（および HbV）投与後の免疫応答では、一部のケモカインの産生増強は認めるものの、TNF- α を除く炎症性サイトカインの産生増強は誘導されないと思われる。このことから、大量投与による炎症反応等の増悪の可能性は少ないものと推定される。

一般演題 1-2

出血性ショック輸血後の肝障害に対する一酸化炭素付加赤血球の保護メカニズム

丸山 徹¹, 大柿 滋¹, 田口和明², 前田仁志¹, 異島 優¹, 渡邊博志¹, 小田切優樹²

¹ 熊本大学薬学部大学院, ² 崇城大学薬学部

【緒言】我々は、出血性ショックの赤血球（RBC）輸血後に、肝臓内チトクローム P450（CYP）の発現量が低下すること、他方、一酸化炭素（CO）を RBC に付加した CO-RBC 輸血は肝 CYP に対して保護的に作用することを見出した。今回は、この CO-RBC 輸血時に観察される肝 CYP 保護効果の機序解明を目的として、CO-RBC の抗酸化・抗炎症作用の関与と、クッパー細胞との関連性について検討した。

【方法】血液量の 40% を脱血することで出血性ショックモデルラットを作成し、これを等容量の RBC または CO-RBC により蘇生した。クッパー細胞膜表面抗体である F4/80 抗体及び細胞内活性酸素（ROS）検出プローブである CM-H₂DCFDA を用いて単離肝単核球を染色し、フローサイトメトリーにて分析した。

【結果および考察】健常群と比較して、RBC 蘇生群では、蘇生後 1 時間における肝 CYP（CYP1A2, 2C11, 2E1, 3A2）発現量の有意な低下が観察された。また、この抑制は 48 時間持続していた。対照的に、CO-RBC 蘇生群では、CO 濃度に依存して CYP 発現量の低下が抑制された。同様な阻害効果は、塩化ガドリニウム（クッパー細胞阻害剤）及び Trolox（抗酸化剤）の前処置を施した RBC 蘇生群でも観察された。その際、RBC 蘇生群では、F4/80 陽性細胞が活性化し、ROS 産生が亢進していたものの、CO-RBC 蘇生群及び塩化ガドリニウム処置 RBC 蘇生群では、RBC 群のような ROS 産生の亢進は観察されなかった。また、RBC 蘇生群では、CYP の発現を抑制する炎症性サイトカイン（IL-6, TNF- α ）の血中濃度が上昇していたが、CO-RBC 蘇生及び塩化ガドリニウム処置 RBC 蘇生群ではそれらの変動が認められなかった。

【結論】大量出血に伴う RBC 輸血では、クッパー細胞の活性化に伴い ROS や炎症性サイトカインの産生が亢進し、これらにより肝 CYP の発現量が持続的に抑制されるものの、CO-RBC 輸血では、遊離した CO の抗酸化・抗炎症作用により、肝 CYP 発現量の変動が抑制される可能性が推察された。その際、CO によるクッパー細胞の活性化阻害が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

【文献】Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T. Carbon monoxide-bound red blood cells protect red blood cell transfusion-induced hepatic cytochrome P450 impairment in hemorrhagic-shock rats. *Drug Metab Dispos.* 2013;41:141-148.

一般演題 1-3

出血性ショック心臓における致死性不整脈発生機序及び人工酸素運搬体による治療効果に関する検討

高瀬凡平¹, 東村悠子¹, 田中良弘², 木下 学³

防衛医科大学校 ¹ 集中治療部, ² 救急部, ³ 免疫・微生物学

出血性ショックにより平均全身血圧が 40 mmHg 以下に低下遷延すると、不可逆性心筋障害が発生しいわゆる“出血性ショック心臓”といわれる致死性の病態を呈するとされている。SD rat に 30% 出血性ショック状態を作成し、リボソーム封入型人工酸素運搬体で蘇生した群と、生理食塩水、5% アルブミンで蘇生した群の 3 群間で心筋を摘出 Tyrode 液で灌流後 Na channel 感受性色素を用いた Optical Mapping System (OMP) で興奮伝播・Action potential duration dispersion (APDd)・致死性不整脈性を検討した。出血性ショックは、25%、5% の 2 回の脱血により 30 分間の平均血圧 40 mmHg 以下の状態を保持し、その後各蘇生液で蘇生した。3 群とも全例蘇生に成功した。しかし、生理食塩水、5% アルブミン群では OMP で著明な左心室伝導遅延と APDd の著明な延長、burst pacing による心室細動が全例で誘発されたのに対し、リボソーム封入型人工酸素運搬体蘇生群では、伝導遅延・APDd 延長・心室細動誘発ともに認められなかった。結語：出血性ショック心臓における致死性不整脈発生機序には心筋の伝導遅延・APDd 延長が関与し、リボソーム封入型人工酸素運搬体はこれら心臓の電氣的不安定性を予防し、出血性ショック蘇生後致死性不整脈の予防効果を有する可能性が示唆された。

一般演題 1-4

マイクロ・ナノバブル分散酸素富化液を用いた液体換気への応用

○垣内健太¹, 青木順子², 針井則一², 松田兼一², 武岡真司¹

¹ 早稲田大学大学院生命医科学研究科, ² 山梨大学医学部救急集中治療学講座

【緒言】 肺炎や胸部外傷により引き起こされる急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) は, 現在人工呼吸管理による治療がなされているものの未だ 4 割という高い死亡率を有する疾患である。既往研究として高い酸素溶解能を有する人工化合物 perfluorocarbon (PFC) を用いた完全液体換気 (TLV) が進められ, ARDS に対する有効性が確認されている。¹⁾ しかし, 材料自体の入手困難や高い比重などにより臨床への適用が進んでいないため新規酸素富化液の開発が望まれている。他方, 酸素マイクロ・ナノバブルはその微小サイズ効果による水中での高い滞留性から生理食塩水中の酸素含量の向上が期待される。本研究では, 生理食塩水中で酸素マイクロ・ナノバブルを発生・分散させた酸素富化液を調製し, その有用性を *in vitro*, *in vivo* 試験から評価した。

【方法】 重力差を利用した液体換気システムを構築し, *in vitro* 試験ではモデル肺を, *in vivo* 試験ではモデルラットを使用した実験Ⅰ～Ⅲを行った。(実験Ⅰ) *in vitro* 試験として液体の酸素含量を測定した。具体的にはヘモグロビンへの酸素結合率から, 気相状態で存在する酸素を含めた新規酸素含量測定法を開発し, 液中酸素含量を算出した。異なるバブル発生装置および添加物を組合せて純酸素からマイクロ・ナノバブルを発生させ, 酸素富化液を調製した。(実験Ⅱ) *in vivo* 試験として, 液体流入時間を変化させ, 換気される液体量をモデルラットの体重変化より算出し最適呼吸回数を決定した。(実験Ⅲ) 実験Ⅱで求めた最適呼吸回数を採用して TLV 試験を行った。A line よりモニタリングした血圧および心拍数よりラットの状態を確認し, 酸素富化液の酸素含量と生存時間との関係を評価した。

【結果および考察】 実験Ⅰから, マイクロ・ナノバブル分散酸素富化液は生理食塩水の約 7 倍もの酸素含量を有することを明らかにした。また, ポリビニルアルコールを起泡剤として添加すると酸素含量が上昇することも見出した。実験Ⅱより, 流入時間 4 秒, 排出時間 5 秒の換気条件において 1 分間あたりの換気量が最も大きくなることが分かった。実験Ⅲより酸素含量と生存時間に正比例の相関が確認された。さらに, 最も酸素含量が高い液体を用いたところ 40 分間以上のモデルラットの生存を達成した (生理食塩水では 6 分間のみ)。また, PVA 濃度が高い液体では相関から外れ, 約 25 分間の生存であったことから, 添加濃度にも最適値が存在していた。

【結論】 酸素含量の更なる増加により生存時間の延長が期待される。計算上必要とされる酸素含量は約 80 mg/L であることから, TLV を成功させるためには, 更に 2 倍の酸素含量の向上または 2 倍の換気量が必要となると思われた。

【文献】 1) Lijun Jiang et al., Ann Thorac Surg; 82: 124-130 (2006)

ヒト（ヘモグロビン-アルブミン）クラスターの合成と酸素結合能

○木村拓矢, 小松晃之

中央大学理工学部

【緒言】我々はごく最近, ウシヘモグロビン (HbBv) の分子表面に複数個のヒト血清アルブミン (HSA) を結合させたコア-シェル型の (ヘモグロビン-アルブミン) クラスター [HbBv-HSA_m (m=2~4)] を調製し, それが生理条件下で安定に酸素輸送できることを明らかにした¹⁾. 製造は簡便で, 特殊な装置も必要としない. 分子表面が血清蛋白質 HSA で覆われた新しい人工酸素運搬体として, その応用が期待されている. 本報では, 新たにヒト Hb (HbA) をコアとするヒト (ヘモグロビン-アルブミン) クラスター (HbA-HSA_m) を合成し, その構造・物性・酸素結合能を明らかにしたので報告する.

【実験】高純度 HbA の PBS 溶液 ([HbA]=0.1 mM) に, 過剰量の架橋剤 Succinimidyl-4 [N- maleimidomethyl] cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) を添加し, 2 時間攪拌後, ゲル濾過クロマトグラフィー (GFC, Sephadex G-25) で未反応の SMCC を除去した. 得られた HbA-SMCC を HSA の PBS 溶液 ([HSA]=1.0 mM) に滴下し, 4℃で 14 時間攪拌, GFC (Superdex 200pg) を用いて未反応 HSA を除去することにより, HbA-HSA_m (m=2~4) を得た. さらに, 低圧 GFC を用いて HbA-HSA_m の各成分 (m=2,3,4) を分離, 精製した. 各成分 (m=2,3,4) の蛋白質定量, ヘム定量, CD スペクトル測定から, それらの分子構造を明らかにするとともに, 動的光散乱法から粒径, 等電点電気泳動から等電点 (pI) を決定した. 酸素親和性の指標である P_{50} および Hill 係数 (n) は酸素結合解離曲線から算出した. また, 酸素錯体の安定度は自動酸化速度定数 (k_{ox}) より評価した.

【結果と考察】HbA-HSA_m (m=2~4) の総収率は 72% であり, HbA 1 分子に対する HSA の平均結合数は 3.0 であった. 低圧 GFC により HbA-HSA_m (m=2,3,4) の各成分をそれぞれ分離, 精製することができた. pI 値 (5.0) は HSA 結合数に依存せず, HSA と同程度の低い値を示した. 酸素親和性はいずれも HbA に比べ上昇した (P_{50} =8~9 Torr, n =1.4~1.5, 37℃). これは Hb の Lys-82 や Cys-93 に SMCC が結合しているためと考えられる. 以上の結果は, 先に報告している HbBv-HSA_m に見られる傾向と同様であった. HbA-HSA_m (m=2~4) の k_{ox} も HbBv-HSA_m と同等の値を示した. 低酸素親和性を有する HbA-HSA_m の合成についても併せて報告する.

【結論】HbA に HSA を共有結合させた HbA-HSA_m を新たに調製し, その構造・物性・酸素結合能を明らかにした. HSA の結合数 (m=2~4) に依存せず, HbA-HSA_m の等電点, 酸素親和性は一定であった.

【文献】

1) D. Tomita, T. Kimura, H. Hosaka, Y. Daijima, R. Haruki, K. Ludwig, C. Böttcher, T. Komatsu, *Biomacromolecules* **2013**, 14, 1816.

一般演題2-2

(ヘモグロビン-アルブミン) クラスターの溶液物性と血液適合性

○春木理沙¹, 木村拓矢¹, 神山育男², 河野光智², 小松晃之¹

¹ 中央大学理工学部, ² 慶應義塾大学医学部

【緒言】 前講演で報告したとおり, 我々はヘモグロビン (Hb) の分子表面に複数個のヒト血清アルブミン (HSA) を結合させたコア-シェル型の (ヘモグロビン-アルブミン) クラスター [Hb-HSA_m (m=2~4)] を開発し, それが生理条件下で安定に酸素輸送できることを明らかにしている¹⁾. この製剤を“HemoAct™”と名付け, 人工酸素運搬体としての機能評価を開始した. 本報では HemoAct™ の溶液物性と血液適合性について報告する.

【実験】 高純度 Hb と HSA を架橋剤 Succinimidyl-4 [N-maleimidomethyl] cyclohexane-1- carboxylate (SMCC) で結合した後, ゲルろ過クロマトグラフィー (GFC, Superdex 200pg) により Hb-HSA_m (m=2~4) を単離し, [Hb]=5 g/dL まで濃縮した (製剤名: HemoAct™). 酸素結合解離曲線から酸素親和性の指標である P_{50} , Hill 係数 (n) を決定. HemoAct™ と全血液の混合溶液 (1/1 (v/v)) を調製し, その溶液粘度, 赤血球 (RBC) 数, 白血球 (WBC) 数, 血小板 (PLT) 数, さらに活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT), プロトロンビン時間 (PT) を測定, 溶液物性と血液適合性を評価した. また, HemoAct™ を Wistar rat に投与 (尾静脈から 6 mL/kg) し, 7 日後までの状態観察と 7 日後の血液生化学的検査を実施した.

【結果と考察】 分子表面が HSA で覆われている HemoAct™ の等電点 (pI 値) は 5.0 と低く, HSA と同程度の値を示した. 従来の Hb 製剤に比べ, 血中滞留時間の延長, 血圧亢進の回避が期待できる. 酸素結合解離に伴う UV-Vis. スペクトル変化は, native Hb と同等であったが, 酸素親和性は増大した ($P_{50}=8$ Torr, $n=1.4$, 37°C). HemoAct™ の溶液粘度は 2.8 cP (at 230 s^{-1}), (HemoAct™/血液) 混合液の粘度は 3.3 cP であり, 沈殿・凝集は全く認められなかった. (HemoAct™/血液) 混合液の RBC, WBC, PLT 数は混合 6 時間後まで一定値を保った (37°C). また, APTT, PT にも変化は見られず, 血液凝固能にも影響はないことがわかった. HemoAct™ 投与後の rat に異常はなく, 7 日後までの体重増加量, 血液生化学的検査 (7 日後) の結果は, 未投与群, HSA 投与群と同等であった. これらの結果から, HemoAct™ の血液適合性と安全性が確認された.

【結論】 Hb-HSA_m の等電点, 酸素錯体安定度は Hb と同等, 酸素親和性は Hb に比べて高い. また, 粘度測定, 血球数測定, 血液凝固能検査から, Hb-HSA_m の高い血液適合性が明らかとなった.

【文献】

1) D. Tomita, T. Kimura, H. Hosaka, Y. Daijima, R. Haruki, K. Ludwig, C. Böttcher, T. Komatsu, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1816.

一般演題2-3

SPG 膜乳化法を用いたヘモグロビン／アルブミン架橋型人工酸素運搬体の開発

Yao-Tong Lai¹, 太田誠一⁴, 佐藤真優¹, 赤松憲樹², 中尾真一², 酒井康行³, 伊藤大知^{1,4}

¹ 東京大学・化学システム工学科, ² 工学院大学・環境エネルギー化学科, ³ 東京大学・生産技術研究所,

⁴ 東京大学・疾患生命工学センター

【緒言】組織工学において、体外での3次元組織構築と組織移植は究極の目標である。このためには培養組織中に十分な酸素を供給する運搬体が必要不可欠である。現在までに開発されてきた人工酸素運搬体としてはHb（ヘモグロビン）をリポソームに封入したタイプやPFCを封入したミセルが主に開発されてきた。しかしながら虚血性疾患治療を目標としてきたため、サイズが200nm程度以下であり、胎児肝細胞などに適用すると、毒性が高いことが報告されている。本研究では、高濃度・アルブミン混合液のSPG（シラス多孔ガラス）膜乳化法により、①サイズ制御によるエンドサイトーシス低減によって、細胞毒性が格段に低減し、②ウシ由来HbとBSAのみを用いてコストが格段に向上し、③スケラブルな膜乳化法の応用により将来大量生産供給が可能な、新規人工酸素運搬体の開発を行った（図1）。

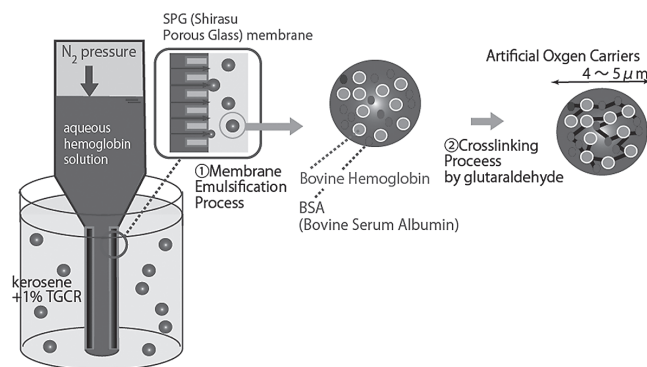


図1 SPG膜乳化による酸素運搬体作製プロセス

【方法】既往のプロトコル¹⁾を改変し、ウシ血液から抽出した新鮮Hbを10wt%に、BSAを5~20wt%と界面活性剤TGCR（テトラグリセリン縮合リシノレート）1wt%を混合した溶液を、連続相をケロシンとしてSPG膜乳化キット（SPGテクノ）により乳化した。膜乳化後、 1.25×10^{-4} wt%となるようにグルタルアルデド水溶液を添加架橋し、洗浄・凍結乾燥を行った後、SEM観察と酸素解離曲線の測定をヘモックスアナライザーで行った。

【結果および考察】Hbのみの水溶液は各種界面活性剤を用いても安定なエマルションを得ることができず、また膜乳化過程において膜のファウリングによる流束低下が顕著であった。一方でBSAを添加することによって、ファウリング抑制とエマルションの安定性が著しく向上することを見出し、均一な微粒子（図2）を得た。さらに酸素解離曲線を測定した所、Hillプロットにfittingして決定したP50値とnは、HA/BSAの混合比率によって変化した（表1）。

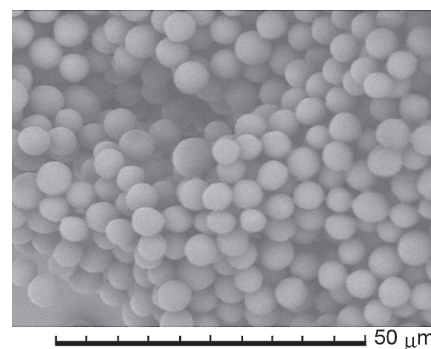


図2 Hb/BSA粒子SEM像

表1 Hb/BSA粒子のP₅₀とn

	PolyHeme	Hemopure	OxyVita	Liposome encapsulated Hb (LEH)	Human Blood	This work
Hb source	Human	Bovine	Bovine	Human	Human	Bovine
Hb content (g/dL)	10	12-14	6	10	12-17	10
P ₅₀ (mmHg)	20-22	40	5.95	32	27	8.08 - 11.60
Hill coefficient	1.5	1.2	1.3	2.2	2.8	1.20 - 1.37
MetHb	<5%	<10%	3.7%	<3%	<0.5	~10%

【結論】膜乳化法によって、Hb架橋マイクロ微粒子型酸素運搬体の大量作製法を確立した。

【文献】1) K. Akamatsu, T. Ito, S. Nakao *et al.*, *Langmuir* 2010 (26) 14854-14860

【謝辞】本研究は科学研究費補助金基盤研究（A）（代表者：酒井康行）、及び挑戦的萌芽研究（代表者：伊藤大知）のサポートを得て行った。また共焦点顕微鏡観察は東京大学ナノバイオ研究拠点にて行った。ここに感謝致します。

ヘモグロビン小胞体 (HbV) の静的構造及び濃厚ヘモグロビン溶液中の蛋白質相互作用

佐藤高彰¹, 酒井宏水²

¹ 信州大学, ² 奈良県立医科大学

【緒言】 ヘモグロビン小胞体 (HbV) は, Hb を高純度に精製することにより, 高濃度の Hb 溶液が内包され, 脂質被覆層数も少ないという構造的特徴を有する. 動物投与試験では, 高い Hb 濃度によって十分な酸素運搬効率を示すこと, 蓄積性が無く代謝排泄が容易であること, NO 結合が遅延され血管収縮を生起しないこと等が証明されてきた^[1]. 我々は, HbV 分散液に対して小角 X 線散乱法や動的光散乱法を適用し, (1) HbV の粒子サイズ及びサイズ分布の精密な制御 ($240 \pm 20 \text{ nm}$), (2) 脂質膜の平均被覆枚数 (平均 ~ 1 枚), (3) HbV の内部構造や内包された Hb の微細構造や溶存状態, (4) 代用血漿剤存在下における HbV の拡散ダイナミクスと分散安定性の関連性などについて明らかにしてきた^[2].

【方法】 HbV 分散液系の構造学的研究と平行して, 本研究では, 濃厚ヘモグロビン (Hb) 溶液や, 代用血漿として用いられる高分子溶液系のナノ物性を小角広角散乱法によって精査した. 蛋白質試料には, 日本赤十字社より提供された期限切れ血液から, HbV 調整と同様の手法で精製した Hb を用いた. 溶媒には 150mM PBS 溶液 (pH 7.4) を用いた.

【結果および考察】 Hb は, 体内で 300 mg mL^{-1} という例外的な高濃度で機能する特異な蛋白質である. この機能性 (の少なくとも 1 部) は, 水和状態を含めた広義の蛋白質間相互作用ポテンシャルによって実現されと考えられ, その変調は, 鎌型赤血球症など, 蛋白質凝集に起因する疾病発生に関与する学際問題である. 希薄系 Hb 溶液の小角・広角散乱強度 $I(q)$ (q は散乱ベクトルの大きさ) には, 空間スケールの大きい側 (q が小さい側) から, 分子量や分子の全体サイズ, 表面や形状, α ヘリックスのような二次構造, さらに動径分布 (分子内の原子間距離分布) といった階層的な構造的性が現れる. 希薄系の散乱強度 $I(q)$ に対し, 第一原理計算^[3]を適用し, 溶液中における Hb 分子の 3 次元立体構造の再構築を行った結果, 結晶構造解析で得られた立体構造と極めて近い立体構造を溶液中で維持していることが確認できた.

一方, 濃厚溶液系について, 単分子構造よりさらに大きな空間スケールで溶液構造の観測を行い, 実験的に構造因子 $S(q)$ を得ることが出来れば, 蛋白質間相互作用に関する定量情報を引き出すことが出来る. $S(q)$ の濃度依存性, 温度依存性, pH 依存性の詳細な検討から, 濃厚溶液中の Hb-Hb 相互作用は, 排除体積効果, 遮蔽された弱い静電反発, 弱い親和相互作用が共存して, 擬似的に剛体球相互作用に近い状態を維持していること, 温度変化や pH 変化に対しても, Hb 間の相互作用が僅かな変調しか受けない '屈強さ' が Hb の重要な特徴であることが分かった.

【文献】 [1] H. Sakai, H. Horinouchi, M. Yamamoto, E. Ikeda, S. Takeoka, M. Takaori, E. Tsuchida, K. Kobayashi, *Transfusion* **46**, 339 (2006). [2] T. Sato, H. Sakai, K. Sou, M. Medebach, O. Glatter, & E. Tsuchida, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 8418 (2009). [3] D.I. Svergun, M.V. Petoukhov, and M.H. J. Koch, *Biophys. J.*, **80**, 2946 (2001).

【謝辞】 本研究の一部は池谷科学技術振興財団による助成を受けて実施されたものである.

一般演題2-5

水和ポリエチレングリコールの排除体積効果と分子機能：ミセル系とポリエチレングリコールを包摂した蛋白質系の比較検討

赤羽 健¹, 佐藤高彰¹, Lok Kumar Shrestha², 酒井宏水³

¹ 信州大学, ² 物質材料研究機構, ³ 奈良県立医科大学

【緒言】 ポリエチレングリコール (PEG) は、最もよく知られた合成高分子の1つであるが、無毒・非免疫原性・非抗原性であり、FDAにも認可され、人体投与可能である点が、ユニークな物質系と言える^[1]。蛋白質のPEG修飾 (PEGylation) は、蛋白質の溶解度向上、抗原性の低減や、血中滞留時間延長に有効である^[1]。また、PEGによるリボソームの表面修飾は、癒合防止や、分散安定性の向上に寄与し、ヘモグロビン小胞体 (HbV)^[2]に代表されるリボソーム製剤の長期保存安定性にも重要な役割を果たす。しかし、この分子機序については、「薬剤分子表面に殻のような水分子の層が形成される」といった曖昧な説明がなされることが多く、分子レベルで定量的に説明した例には乏しい。

【方法、結果および考察】 本研究では、まず、基礎的なモデル物質系として、親水部にPEGを有する非イオン性界面活性剤であるポリオキシエチレンアルキルエーテル ($C_{12}E_9$) のミセルに注目した。密度測定、粘度測定、誘電分光法による水和数分析、小角散乱法による構造因子分析、動的光散乱法による協同拡散係数計測の結果から、(1) ミセルをグロビュール粒子と近似できること、(2) PEGに水和した水は、バルク水の協同配向運動 (誘電緩和時間 ~ 8 ps) と比べて3~4倍遅い再配向ダイナミクスを示すこと、(3) 「PEGに溶媒和した運動性の低い水 (= 水和水) が、あたかもミセルの構成要素のように振る舞い、ミセルの排除体積に寄与する」と考えると、浸透圧縮率、協同拡散係数、溶液粘度の濃度依存性が、統一的かつ定量的に理解できること等が明らかになった。

一方、ヘモグロビン (Hb) に分子量 5 kDa のPEGを平均6本包摂させたPEG-Hb (Hemospan[®]の類型) については、ミセルや通常の球状蛋白質とは異なり、一般のグロビュール粒子として理解することが難しく、いわば、グロビュール粒子とコイル高分子の中間のような物性を示すことが分かった。PEG鎖を含めた分子全体の広がりは顕著な濃度依存性を示し、高濃度領域では収縮する。蛋白質を覆うPEG鎖の数密度が小さいため、他の分子に属するPEG鎖の相互貫入によって、高分子鎖のメッシュサイズや分子鎖全体の広がりが減少するためと考えられる。

【結論】 ($C_{12}E_9$) ミセルはグロビュール粒子として振る舞い、バルク水と比べ運動性の低下したPEGへの水和水が、ミセルの排除体積に寄与する。一方、PEG-Hbは、グロビュール粒子とコイル高分子の中間のような性質を示し、Hbを覆うPEG鎖はコイル高分子特有の性質を色濃く残している。今後、ベシクル分散液についても精密な水和分析を行い検討する必要がある。

【文献】 [1] F.M. Veronese and G. Pasut, Drug Discovery Today, **10**, 1451 (2005). [2] H. Sakai, H. Horinouchi, M. Yamamoto, E. Ikeda, S. Takeoka, M. Takaori, E. Tsuchida, K. Kobayashi, *Transfusion* **46**, 339 (2006).

【謝辞】 本研究の一部は池谷科学技術振興財団による助成を受けて実施されたものである。

微小血管における人工赤血球の酸素運搬過程に関する数値解析

百武 徹

横浜国立大学大学院工学研究院

【緒言】近年、人工酸素運搬体の一つとして、カプセル型人工赤血球の開発が急速に進んでいる。このカプセル型人工赤血球はヘモグロビンをリボソームに封入した構造をしており、その直径は200-250ナノメートルとヒトの赤血球の1/30程度である。したがって、赤血球が到達しにくい非常に微小な血管内にも酸素を運搬できると考えられ、脳梗塞や狭心症といったような様々な循環器疾患への治療薬として利用が期待されている。微小循環系における人工赤血球の酸素輸送プロセスをより詳細に記述し、その作用機序を解明するためには、流体力学的観点に基づいた研究も重要であると考えられる。そこで本研究では赤血球、および人工赤血球の酸素運搬過程について数値シミュレーションを行い、微小血管における人工赤血球および酸素の組織への拡散の様子を調べた。

【方法】本研究では、流体力学的観点から血球を含む微小血管内を固液混相流と捉え、微小血管内における変形流動する赤血球の挙動解析に加えて、人工赤血球の拡散およびヘモグロビンの酸素解離を考慮した解析を行った。解析手法としては混相流に有力な手法である格子ボルツマン法 (Lattice Boltzmann Method : LBM) という流体解析手法を適用した。また、赤血球に関しては、Immersed boundary methodを用いて赤血球の変形を計算した。酸素の境界条件は、赤血球膜、血管壁を通過するようにし、また人工赤血球の境界条件は、赤血球膜、血管壁を通過せず血管内のみを流れるものとした。本研究では、微小血管内におけるヘモグロビンと酸素との化学反応を考慮した、酸素飽和度および酸素分圧の時間変化を求めることで、人工赤血球濃度、酸素濃度に関する化学反応のモデル化を行った。

【結果および考察】まず、初期酸素分圧を100mmHgとして計算を行った結果、時間の経過とともに人工赤血球内のヘモグロビンが酸素を放出することにより酸素飽和度は減少していき、血管内の酸素濃度は増加した。次に、人工赤血球の拡散係数を変化させた計算を行った。拡散係数が小さい場合、半径方向への移動があまり起こらない。つまり、化学反応のみによって濃度変化が起こるため、結果として半径方向の人工赤血球の濃度勾配が大きくなった。一方、拡散係数が大きい場合、化学反応による半径方向の濃度変化は半径方向への拡散によって緩和され、人工赤血球の半径方向の濃度勾配が小さくなる。その結果、壁面付近での濃度が大きくなるため、化学反応が起こりやすくなり、酸化した人工赤血球濃度は低下した。拡散係数の違いは、人工赤血球の粒子径の違いに相当する。解析結果は、粒子径の違いにより同じ酸素分圧でも酸素供給量が異なってくることを意味しており、組織への酸素供給という観点から人工赤血球の設計において重要な情報となり得るだろう。

輸血代替としての人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）製剤の 安全性試験

Safety Evaluation of Artificial Red Cells (Hemoglobin-Vesicles) as a Transfusion Alternative

酒井 宏水^{(1),(2)}, 堀之内 宏久^{(3),(4)}, 東 寛⁽⁵⁾, 小田切 優樹⁽⁶⁾, 小林 紘一⁽³⁾

Hiromi Sakai^{(1),(2)}, Hirohisa Horinouchi^{(3),(4)}, Hiroshi Azuma⁽⁵⁾, Masaki Otagiri⁽⁶⁾, Koichi Kobayashi⁽³⁾

和文抄録

輸血代替の創製を目的として開発されて来た人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）製剤は、血液と同等の濃厚な微粒子分散液である（ヘモグロビン濃度 10g/dL, 粒子占有体積 40%程度）。高純度高濃度ヘモグロビンをカプセル化することにより、ヘモグロビンの副作用を完全に遮断出来る。我々は1997年より厚生労働科学研究として本製剤の製造法、有効性と安全性について検討して来た。出血性ショック蘇生液としての利用や、体外循環回路補填液としての有効性などを動物投与試験から明らかにしている。更に、製剤の特性（小粒子径、酸素親和度の調整、比較的高い粘性、CO結合性）を活かし、輸血では対応の出来ない疾患や治療（がん、虚血性疾患、再灌流傷害、臓器保存）など、新しい臨床応用の可能性も実証してきた。他方、人工赤血球製剤の安全性については、投与量が一人当たり数リットル以上になることもあり得るので、生体に対する影響を動物投与試験などから注意深く検討してきた。人工赤血球製剤は従来に無い、大量投与を伴う製剤であるため、その安全性試験法のマニュアルは存在せず、研究班が中心になって試験法を考えるとところから先見的学術研究として進めてきた。本総説では安全性研究の概略をまとめた。これらの結果を総合すると、安全性は担保されており、次段階に進むべき製剤であると考えられるが、更に必要な安全性試験があれば是非ともご指摘を頂き早急に対応し、次段階 GLP, GMP 試料による非臨床・臨床試験への円滑な移行に備えたい。

Abstract

A fluid of artificial red cells (hemoglobin-vesicles, HbV) is being developed as a transfusion alternative that comprises concentrated particle dispersion ([Hb]=10g/dL, occupied particle volume=40%) with comparable characteristics to those of blood. Encapsulation of a concentrated Hb solution with phospholipid vesicles can shield the toxic side effects of Hb. We have studied production methods, safety and efficacy of artificial red cells since 1997 under Health and Labour Sciences Research Grants. Efficacies of HbV as a resuscitative fluid for hemorrhagic shock resuscitation, priming fluid for extracorporeal circuit, and other uses have been clarified through in vivo evaluation. Moreover, the unique HbV characteristics of small particles, adjustable oxygen affinity, high viscosity, and CO binding are especially effective for therapeutic and surgical treatments (tumor, ischemic disease, reperfusion injury, and organ transplantation). We have particularly devoted attention to HbV-related safety issues because it is expected that the injection amount of HbV as a transfusion alternative would result in a massive dose such as 2-3 liters per patient. In fact, artificial red cells will become a newly categorized pharmaceutical drug. There is no manual for a safety study. We have considered the optimal protocols of safety evaluations as prospective studies. This report summarizes preceding studies of the HbV safety evaluations. The obtained results attest to the safety of HbV. However, we welcome suggestions for

(1) 奈良県立医科大学医学部化学教室 〒634-8521 奈良県橿原市四条町 840 Department of Chemistry, Nara Medical University, 840 Shijo-cho, Kashihara, Nara 634-8521, Japan

(2) 早稲田大学重点領域研究機構

(3) 慶應義塾大学医学部外科学

(4) さいたま市立病院

(5) 旭川医科大学小児科学

(6) 崇城大学薬学部

論文受付 2013 年 8 月 19 日 論文受理 2013 年 8 月 19 日

additional necessary safety studies. Through confirmation of HbV safety as a prospective avenue of research step-by-step, we intend to prepare for the preclinical and clinical stages of HbV development with GLP and GMP standards.

Keywords

blood substitutes, artificial oxygen carriers, liposome, hemoglobin, hemoglobin-vesicles, preclinical studies

緒言

日本の献血－輸血システムの安全性は世界最高水準にあり、国民の医療と健康福祉に多大の貢献をしている。しかし、感染の可能性、過誤による血液型不一致輸血、保存期限が3週間と短く災害や有事の危機管理体制に不安を残している。また、少子高齢化により血液の需給バランスが崩れつつあり、日本赤十字社の試算によれば2027年には101万人分の献血量が不足すると報告されている。人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）は、これらの問題を解決するための一助となりうる新しい製剤としてその実現が期待されている（図1）。ヘモグロビンを用いる人工赤血球の研究は、期限切れ血液に最も多く含まれるHbの有効利用の観点から政策的に始まった¹⁾。期限切れ赤血球は諸工程を経て、感染源を含まず、血液型が無く、長期保存に耐え、輸血治療を「補完」する人工赤血球製剤に「再生」される²⁾。1997年から厚生労働科学研究として継続的に推進され（研究代表者：土田英俊、小林絃一、堀之内宏久、酒井宏水）³⁻⁸⁾、ヘモグロビン精製、ヘモグロビンの内包、脂質膜の構成成分の改良、投与実験により有効性と安全性を検討し、結果をフィードバックさせ現行の製剤を確立した^{9,10)}。病態モデル（出血性ショック、体外循環、血液稀釈、皮弁創傷治癒、担がん、血管性虚血性疾患など）で有効性を実証し（表1）¹¹⁻²⁹⁾、輸血代替としての利用のみならず、輸血では対応の出来ない疾患や外科的処置、Unmet Medical Needsへの対応も期待されている。

人工赤血球（Hb小胞体）製剤は、血液と同等の濃厚な微粒子分散液である（ヘモグロビン濃度10g/dL、粒子占有体積40%程度）⁹⁾。その投与量は一人当たり数リットル以上になることもあり得るので、生体に対する影響を動物投与試験などから明らかにすることは極めて重要である。人工赤血球製剤は従来に無い製剤であるため、開発者をはじめとするアカデミアが中心になって安全性試験法を考えるとところから先見的学術研究として進めてきた。実験に使用された試料は非GLPレベルの

ものであるが、人工赤血球が全くの新しい製剤であるので、その安全性を開発初期段階から明らかにすることは極めて重要と考え進めて来た。日本血液代替物学会で作成されたガイドライン「人工酸素運搬体作製に関する基本的留意事項」³⁰⁾も参考にしてきた。他方、平成24年3月に厚労省からICH合意に基づく新ガイドライン薬食審査発0323第1号「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」が発表された。ここでいうバイオ医薬品は、抗体医薬品が主な対象と考えられるが、ヒト血液由来のヘモグロビンを原料としているヘモグロビン小胞体は特定生物製剤であり、バイオ医薬品に該当する。記載されている試験項目のうち、我々アカデミアの研究班で既に検討済みの項目が多くあると考えられるものの、生殖発生試験やがん原性試験など、アカデミアのみでは実施困難な箇所もある。以下にこれまで我々の研究班で検討してきた安全性研究成果の概略（23報分）を列挙するが、結果の殆どは国際学術誌等で公表されているので、詳細はそちらを参照して頂きたい。更に必要な項目があれば是非ともご指摘を頂き早急に対応し、次段階GLP、GMP試料による非臨床試験への円滑な移行に備えたい。

ヘモグロビン小胞体の安全性試験結果の報告

1) 単回投与試験 (topload)

動物種：Wistar系ラット (♂)

投与試料：ヘモグロビン小胞体（プロトタイプ、負電荷脂質として1, 2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylglycerol : DPPGを使用), [Hb] = 10 g/dL

投与量：10 mL/kg, 20 mL/kg

麻酔：投与時および犠牲死時のみエーテル麻酔

投与経路：尾静脈

観察時間：投与後14日間

測定項目：体重、脾臓重量、食食能（カーボンクリアランス）、

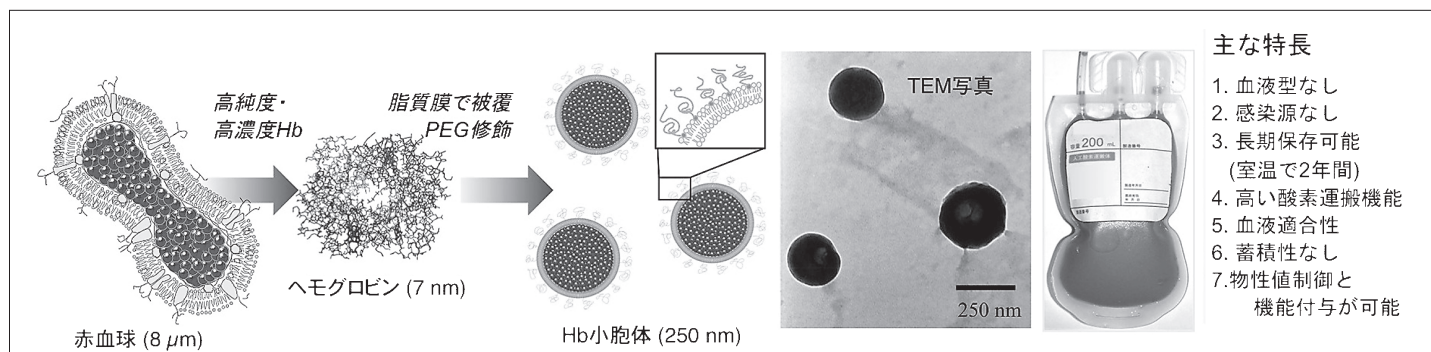


図1. ヘモグロビン小胞体製剤

表 1. 人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）製剤の有効性試験（論文掲載されたもの）

No.	動物試験	主な効能	掲載誌、発表年	引用文献番号
1	ラット, 90% 交換輸血	血圧維持, 赤血球と同等の酸素を運搬	ASAIO J 1998	11
			Bioconjugate Chem 2000	12
2	ラット, 50% 出血性ショック蘇生	出血性ショック蘇生に有効	Crit Care Med 2004	13
			Shock 2009	14
			JPET 2011	15
3	ウサギ, 40% 出血性ショック（反復出血）蘇生	サイトカイン TNF α 過剰産生の抑制	ASAIO J 2004	16
4	ビーグル犬, 50% 出血性ショック蘇生	中型動物での大量・急速蘇生	Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2012	17
5	ラット, 体外循環（人工心肺）充填液	高次脳機能を改善	Circulation 2003	18
6	ラット, 制御不能出血モデル蘇生	生存時間の延長	Shock 2012	19
7	ラット, 出血性ショック蘇生（CO 結合体の投与）	再灌流時における細胞保護効果の確認	Shock 2009	20
8	ハムスター, 50% 出血性ショック蘇生, 無麻酔	出血性ショック蘇生に有効, 微小循環の回復	Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002	21
9	ラット, 脳梗塞モデル	梗塞巣の拡大を抑制	Neurosci Lett 2007	22
10	マウス, 摘出小腸灌流	37℃, 2hr 灌流で組織構造を維持	Am J Physiol G 2008	23
11	ハムスター, 有茎皮弁虚血部位酸素化	側副経路を経由した酸素輸送を確認	Crit Care Med 2005	24
			Crit Care Med 2007	25
12	マウス, 皮弁モデル虚血領域酸素化	創傷治癒効果を確認	Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009	26
13	マウス, 担がんモデル	腫瘍重量の減少	J Surg Res 2009	27
14	ラット, ¹⁵ O-酸素結合 Hb 小胞体の脳梗塞モデルへの投与と PET 診断	脳梗塞領域のイメージング	Nuclear Med Biol 2010	28
			J Cereb Blood Flow Metab 2012	29

組織病理（H/E, 抗ヒト Hb 抗体免疫染色, バルリンブルー染色, 電子顕微鏡観察）

実施場所：慶應義塾大学医学部

論文報告：Sakai H, Horinouchi H, Tomiyama K, Ikeda E, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. Am J Pathol. 2001 Sep; 159(3): 1079-88.

主要結果：人工赤血球の投与によって、体重の増大、脾臓重量も増大。食能は1日後に低下、3、7日後の亢進のあと14日後には正常値に復する。抗ヒトヘモグロビン抗体免疫染色の結果、人工赤血球由来のヒト Hb は、肝臓・脾臓から7日以内に殆どが消失し、14日以内に完全に消失した。肝臓クッパー細胞、脾臓マクロファージに捕捉されて分解消失、ベモジデリンの沈着が僅かに観察された。腎臓や肺には異常は認められない。電子顕微鏡観察から、肝臓クッパー細胞、脾臓マクロファージの食胞内に捕捉された人工赤血球が観察されたが、完全に消失した。

2) 単回投与試験（topload）

動物種：Wistar 系ラット（♂）

投与試料：ヘモグロビン小胞体, [Hb] = 10 g/dL

投与量：20 mL/kg

麻酔：投与時および犠牲死させる時のみエーテル麻酔

投与経路：尾静脈

観察時間：投与後 14 日間

測定項目：体重、臓器重量（肝臓、脾臓）、血中 HbV 濃度、ヘマトクリット、血液生化学検査（総蛋白、アルブミン、AST、ALT、LDH、 γ -GPT、LAP、ChE、総ビリルビン、Fe、クレアチニン、BUN、UA、アミラーゼ、リパーゼ、CPK、K⁺、Ca²⁺、inorganic phosphate、総コレステロール、遊離コレステロール、コレステリルエステル、HDL コレステロール、 β リポ蛋白、TG、リン脂質、遊離脂肪酸、総脂質）、脾臓組織病理

実施場所：慶應義塾大学医学部

論文報告：Sakai H, Horinouchi H, Masada Y, Takeoka S, Ikeda E, 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 Aug; 25(18): 4317-25.

主要結果：人工赤血球の投与によって、脾臓重量が増大するが、体重も増加するので脾臓重量分率としてみると、7日に

後に正常値に復する。血中酵素濃度ではアミラーゼの若干の減少とリパーゼの増大が見られたが、脾臓病理では異常は観察されず、その他の項目には特に異常値は認められず、臓器機能に影響は無いと考えられた。血中のコレステロール、リン脂質濃度が増大したが、7日で正常値に復した。これは、人工赤血球の脂質成分が遊離したものと考えられた。

3) 単回投与試験 (topload)

動物種：シリアンゴールデンハムスター (♂)

投与試料：ヘモグロビン小胞体, [Hb]=10 g/dL (精製ヘモグロビン, 化学修飾ヘモグロビン)

投与量：7 mL/kg (循環血液量の10%)

麻酔：無麻酔

投与経路：頸静脈

観察時間：投与後24時間

測定項目：血圧、心拍数、皮下抵抗血管の径 (正常値約150 μ m) と血流速度

実施場所：カリフォルニア大学サンディエゴ校生体工学部

論文報告：Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E, Intaglietta M. Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000 Sep; 279(3): H908-15.

主要結果：化学修飾ヘモグロビンの投与によって血圧亢進や末梢循環不全が生起することが問題となっている。そこで、ハムスター皮下微小循環観測モデルを用い、人工赤血球と修飾ヘモグロビンの比較試験を行なった。修飾ヘモグロビンでは、投与と同時に抵抗血管の収縮と同時に、血圧亢進と心拍数の増大が認められたが、それに対して人工赤血球ではそのような反応は殆ど見られなかった。

4) 単回投与試験 (topload)

動物種：カニクイザル (♂)

投与試料：ヘモグロビン小胞体を5%リコンビナントアルブミンに分散, [Hb]=8.6 g/dL

投与量：17.5 mL/kg

麻酔：無麻酔

投与経路：橈側皮静脈

観察時間：投与後14日間

測定項目：摂餌量、体重変化、血圧、動脈血ガス組成、血液生化学検査 (Na, K, Ca, Cl, glucose, 無機リン, 総蛋白, アルブミン, AST, ALT, γ -GTP, ALP, CRE, BUN, UA, amylase, lipase, リン脂質, TG, 総コレステロール, HDL コレステロール, 総ビリルビン), 血中 Hb 小胞体濃度

実施場所：熊本大学薬学部, 新日本科学

論文報告：Taguchi K, Watanabe H, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Maruyama T, Otagiri M. A fourteen-day observation and pharmacokinetic evaluation after massive infusion of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers)

in cynomolgus monkeys. J Drug Metab Toxicol 2012; 3(4): 100128

主要結果：霊長類における安全性及び体内動態特性評価を目的とした。4匹のカニクイザル (オス, 4~8才, 5.57~5.93 kg) の静脈内にヘモグロビン小胞体を投与したところ、摂餌量・体重変化に特記する異常は確認されず、投与から観察終了まで、いずれのカニクイザルにおいても、異常行動・瀕死状態を示したものの、あるいは死亡した例はなかった。加えて、ヘモグロビン小胞体投与前後で収縮期血圧・拡張期血圧・血液ガスパラメータに変化は認められず、また、霊長類においてもヘモグロビン小胞体は十分な血中滞留性を維持していた。一方、12項目の生化学検査値の中でAST, ALTの一過性の上昇及び脂質関係のパラメータに経時的な上昇が確認された。今回得られた知見は、ヘモグロビン小胞体のヒトにおける安全性の予測に有用になるだけでなく、臨床試験の際のプロトコル作成の重要な基盤情報になると考えられる。

5) 単回投与試験 (topload) 長期生存試験

動物種：Wistar系ラット (♂)

投与試料：ヘモグロビン小胞体 ([Hb]=10 g/dL)

投与量：20 mL/kg

麻酔：投与時および犠牲死時のみエーテル麻酔

投与経路：尾静脈

観察時間：投与後365日

測定項目：体重、血液生化学検査 (総蛋白, アルブミン, AST, ALT, LDH, γ -GPT, CPK, クレアチニン, BUN, UA, アミラーゼ, リパーゼ, 総コレステロール, TG, リン脂質, 遊離脂肪酸, ビリルビン, Fe³⁺), 剖検, 組織病理 (H/E染色, Berlin Blue; 肝臓, 脾臓, 肺, 腎臓, 副腎, 膵臓, 睪丸, 胃, 筋肉, 皮膚)

実施場所：慶應義塾大学医学部

論文報告：Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K. One-year observation of Wistar rats after intravenous infusion of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers). Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 2007; 35(1): 81-91.

主要結果：人工赤血球投与後、体重は増加し続け、264 $\pm$ 8 g から821 $\pm$ 75 gにまで増大した。血液生化学では総蛋白や脂質濃度が増大したが、これは狭いケージの中に長期間飼われていたことによる肥満の影響と考えられた。過去の文献でパーフルオロカーボン微粒子を投与することにより肺に炎症が起る事が報告されているが、人工赤血球投与群では肺には全く異常は認められなかった。

6) 単回投与試験 (topload) 血液学的観察, 反復投与による疑似アレルギー性反応の有無

動物種：WKAH系ラット (♂), Brown Norway系ラット (♂)

投与試料：ヘモグロビン小胞体, [Hb]=10 g/dL

投与量：単回投与11.2 mL/kg, 反復投与4回 (2日間隔), 反

復投与3回(2週間後, 4週間後)

麻酔: 投与時および犠牲死時のみ

投与経路: 尾静脈

観察時間: 投与後7日

測定項目: 血球数(赤血球, 血小板, 白血球), リンパ球, 単球,

顆粒球, $CD4^+/CD8^+$ 比, 補体価, 疑似アレルギー反応の有無
実施場所: 北海道赤十字血液センター研究部

論文報告: Abe H, Azuma H, Yamaguchi M, Fujihara M, Ikeda H, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E. Effects of hemoglobin vesicles, a liposomal artificial oxygen carrier, on hematological responses, complement and anaphylactic reactions in rats. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2007; 35(2): 157-72.

主要結果: 単回投与試験において, ラットに投与したあと一週間, 血球数に著変は無かった。6時間後のみ, 一過性にリンパ球数の減少と顆粒球数の増大が認められたが, 1日後には正常値に復していた。 $CD4^+/CD8^+$ に著変なし。補体価は投与直後は変化しないが, 3日後に低下した。血液と混合しても補体価は変化しないことから, この低下はアレルギー反応とは関係は無い。反復投与4回(2日間隔)の試験においては, 補体価が最初の投与で低下したが, その後は上昇した。反復投与3回(2週間後, 4週間後)の試験において, 比較のovalbuminで感作させたラットではOVA投与によってアナフィラキシー様反応により死亡例が出たが, ヘモグロビン小胞体の反復投与では死亡例は無く, 異常は全く観測されなかった。

7) 単回投与試験(体内動態)

動物種: Sprague-Dawley系ラット(♂), New Zealand 白ウサギ(♂)

投与試料: ヘモグロビン小胞体, $[Hb] = 10 \text{ g/dL}$

投与量: 14 mL/kg (一部を ^{99m}Tc ラベル)

麻酔: isoflurane

投与経路: 尾静脈

観察時間: 投与後48時間

測定項目: 血中 ^{99m}Tc -HbV濃度, 全身の γ カメラ像, 脾臓と肝臓への移行量の時間変化, 48時間後の臓器分布

実施場所: テキサス大学サンアントニオヘルスサイエンスセンター放射線科

論文報告: Sou K, Klipper R, Goins B, Tsuchida E, Phillips WT. Circulation kinetics and organ distribution of Hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Feb; 312(2): 702-9.

主要結果: 半減期はラットで34.8h, ウサギで62.6時間, 48時間後において, 肝臓, 脾臓, 骨髄への移行が顕著であった。

8) 単回投与試験(体内動態)

動物種: Sprague-Dawley系ラット(♂), New Zealand 白ウサギ(♂)

投与試料: ヘモグロビン小胞体, $[Hb] = 10 \text{ g/dL}$

投与量: 14 mL/kg (一部Hbを ^{125}I -ラベル, コレステロールを ^3H -ラベル)

麻酔: isoflurane

投与経路: 尾静脈

観察時間: 投与後最長14日間

測定項目: 血中 ^{125}I -, ^3H -推移, 鉄濃度推移, 臓器分布, 糞尿中 ^{125}I -, ^3H -推移

実施場所: 熊本大学薬学部

論文報告: Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Maruyama T, Watanabe H, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, Kai T, Otagiri M. Pharmacokinetic study of enclosed hemoglobin and outer lipid component after the administration of hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier. *Drug Metab Dispos.* 2009 Jul; 37(7): 1456-63.

主要結果: マウス投与試験から, ヘモグロビンの半減期は小胞体により30倍に延長された。また血中の血中 ^{125}I -, ^3H -鉄濃度推移が同様であったことから, ヘモグロビン小胞体は血中では破壊されずに小胞体として循環していることが解った。ヘモグロビン小胞体は主に肝臓, 脾臓に移行し, 内部ヘモグロビンは5日以内に, 脂質膜成分(コレステロール)は14日以内に臓器より消失した。また, 内封されたヘモグロビン及び脂質膜成分(コレステロール)は分解された後にそれぞれ尿中及び糞中に排泄されることがわかった。

9) 反復投与試験

動物種: Wistar系ラット(♂)

投与試料: ヘモグロビン小胞体, $[Hb] = 10 \text{ g/dL}$

投与量: $10 \text{ mL/kg} \times 14 \text{ 日}$ (総投与量 140 mL/kg は, ラットの循環血液量 56 mL/kg の2.5倍)

麻酔: 投与時エーテル麻酔, その他はsevoflurane吸入麻酔

投与経路: 尾静脈

観察時間: 投与期間14日のあと更に14日

測定項目: 体重, 血球数, 血液凝固機能(APTT, PT, フィブリノゲン), 臓器重量(肝臓, 脾臓, 腎臓), 尿検査, 血中HbV濃度, ヘマトクリット, 血液生化学検査(総蛋白, アルブミン, AST, ALT, LDH, γ -GPT, LAP, ChE, 総ビリルビン, Fe, クレアチニン, BUN, UA, アミラーゼ, リパーゼ, アルドステロン, CPK, K^+ , Ca^{2+} , inorganic phosphate, 総コレステロール, 遊離コレステロール, コレステリルエステル, HDLコレステロール, β リポ蛋白, TG, リン脂質, 遊離脂肪酸, 総脂質), 乳酸値, グルコース, 血液ガス組成, 血圧, 心拍数, 組織病理(肝, 脾, 腎, 肺, 心臓; H/E, ヘモジエリン), 免疫抗体染色(HO-1抗体, ヒトHb抗体)

実施場所: 慶應義塾大学医学部

論文報告: Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, Ikeda E, Sou K, Takeoka S, Suematsu M, Takaori M, Kobayashi K, Tsuchida

E. Physiological capacity of the reticuloendothelial system for the degradation of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days. J Pharmacol Exp Ther. 2004 Dec; 311 (3): 874-84.

主要結果：14日間の連投によって循環血液量の2.5倍の人工赤血球の投与を受けた後も、ラットは体重増加し、全例が犠牲死させるまで（最長14日間）生存した。肝臓脾臓の肥大が顕著であったが、投与終了から14日経過した後には正常値に戻っていた。投与終了直後、血液生化学検査では、血中脂質・コレステロール濃度とリパーゼが一過性に上昇した他は特に異常なく、臓器機能にも問題は無いと考えられた。諸臓器のマクロファージに人工赤血球の貪食が認められたが、14日後には消失、ヘモジデリンの沈着が認められた。HO-1の発現が認められ、ヘムの代謝が亢進していると考えられた。ビリルビン濃度は上昇せず、血球数、尿検査には問題となる所見は無し。連投終了1日後にAPTTの延長傾向があったが有意差は無く、また14日後には正常値に復していた。Fibrinogenが若干増大した。血圧、心拍数、血液ガス組成に異常なし。以上のことから、大量投与した場合において、細網内皮系が人工赤血球の捕捉・分解をしており、十分に許容範囲内にあることが考えられた。

10) 反復少量投与 疑似アレルギー性反応の有無

動物種：NIBS ブタ (♂)

投与試料：ヘモグロビン小胞体, [Hb]=10 g/dL; 比較として空の小胞体, およびDPPGを含有する小胞体

投与量：1回目 0.05 mL/kg, 70分後に0.5 mL/kg

麻酔：N₂O : O₂ = 2 : 1 の混合ガス / 2-3% Isoflurane 吸入麻酔

投与経路：大腿静脈

観察時間：2回目の投与の後60分

測定項目：血圧（大腿動脈圧）、心拍数、心電図、肺動脈圧、左心室内圧、平均右心房圧、心拍出量、全身血管抵抗、全肺血管抵抗、血球数（血小板、白血球）、血中トロンボキサンB2、肺組織病理、肺組織電子顕微鏡検査

実施場所：日本バイオリサーチセンター

論文報告：Sakai H, Suzuki Y, Sou K, Kano M. Cardiopulmonary hemodynamic responses to the small injection of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) in miniature pigs. J Biomed Mater Res A. 2012 Oct; 100(10): 2668-77.

主要結果：実験動物の中でもブタは補体活性による循環動態の著変（疑似アナフィラキシー反応）が生じし易いことが良く知られている。そこで、ヘモグロビン小胞体（HbV）、Hbを含有しない空の小胞体（EV）、および補体活性が生じることが良く知られている脂質（DPPG）から成る従来の小胞体（CL）の投与を行なった。投与は1匹に対し2回行い、1回目は0.05 mL/kg, 70分後に10倍量の0.5 mL/kgを投与した。CLの投与では、一過性の肺動脈圧の上昇、体動脈圧の上昇、心拍数の低下、心拍出量の低下、肺血管抵抗の上昇、

全身血管抵抗の上昇が、1回目の投与、2回目の投与両方で同様にみられた。また同時に、血小板数の低下、白血球数の低下と、トロンボキサンB2（TXB2）の顕著な上昇が認められた。他方、HbV、EVでは、1回目の投与では肺動脈圧と体動脈圧が上昇したものの、心拍出量には変化はなかった。また、血小板数の低下は無く、TXB2の上昇も軽微であった。2回目の投与では、肺動脈圧の上昇も殆ど無く、CL投与とは明らかに異なっていた。HbV、EVは補体活性は軽微（または無し）と考えられるが、肺血管内マクロファージに捕捉される際に肺動脈圧が上昇したのと考えられた。従って、現行のHb小胞体組成では、より生体適合性に優れることが明らかになった。

11) 血液稀釈試験（出血に対する投与）、造血機能、代謝

動物種：Wistar系ラット (♂)

投与試料：ヘモグロビン小胞体を5%リコンビナントアルブミンに分散, [Hb]=8.6 g/dL

投与量：1 mLの脱血と、1 mLの試料投与を繰り返し、循環血液量の40%を置換する。結果的に22.4 mL/kgの投与量になる（循環血液量は56 mL/kg）。(対照群、アルブミン単独投与、14日間保存赤血球をアルブミンに分散させたもの)

麻酔：血液交換と犠牲死時のみSevoflurane 吸入麻酔

投与経路：頸動脈から脱血と投与

観察時間：血液稀釈完了後14日間

測定項目：体重、脾臓重量の体重に対する比率、ヘマトクリット、血球数、エリスロポエチン、血液生化学検査（アミラーゼ、リパーゼ、総コレステロール、遊離コレステロール、HDLコレステロール、βリポ蛋白、TG、リン脂質、遊離脂肪酸、総脂質、ビリルビン、Fe³⁺）、組織病理（脾、肝臓、骨髄；ギムザ染色、ベルリンブルー染色）、免疫抗体染色（HO-1抗体、ヒトHb抗体）、

実施場所：慶應義塾大学医学部

論文報告：Sakai H, Horinouchi H, Yamamoto M, Ikeda E, Takeoka S, Takaori M, Tsuchida E, Kobayashi K. Acute 40 percent exchange-transfusion with hemoglobin-vesicles (HbV) suspended in recombinant human serum albumin solution: degradation of HbV and erythropoiesis in a rat spleen for 2 weeks. Transfusion. 2006 Mar; 46(3): 339-47.

主要結果：血液稀釈後、体重は増加。脾臓重量率は3日後にピークを示し、その後減少。アルブミン投与群、保存赤血球投与群でも脾臓重量率の増大はみられた。ヘマトクリットは7日で正常値に復した。エリスロポエチンはアルブミン投与群で1日後に極めて高い値（300 mIU/L）を示したが、人工赤血球投与群ではその半分程度であった。血液生化学では、人工赤血球投与群で1、3日後にリパーゼの上昇、コレステロールの上昇が見られた他は特に異常は認められなかった。脾臓病理では、Hb小胞体が貪食されている像と、赤芽球が大量に観察された。ラットの場合、脾臓は造血も行なわれており、脾臓でヘモグロビン小胞体の捕捉分解と造血の両方が

行なわれていた。保存赤血球投与群、人工赤血球投与群ともに脾臓にヘモジデリンが観察されたことから、人工赤血球は老化赤血球の捕捉分解過程と同様の経路を辿ることが考えられた。

12) 出血性ショック蘇生試験

動物種：Wistar 系ラット (♂)

投与試料：ヘモグロビン小胞体を 5% リコンビナントアルブミンに分散, [Hb] = 8.6 g/dL

投与量：循環血液量の 50% の脱血 (28 mL/kg), 15 分後に同量の人工赤血球を投与, 比較群は脱血液の投与 (返血)

麻酔：出血性ショック蘇生後 6 時間, および犠牲死時のみ Sevoflurane 吸入麻酔

投与経路：大腿静脈

観察時間：蘇生完了後最長 14 日間

測定項目：生存率, 体重, 脾臓・肝臓重量の体重に対する比率, 血圧, 心拍数, 血液ガス組成, グルコース, ヘマトクリット, 血球数, エリスロポエチン, 血液生化学検査 (AST, ALT, LDH, アミラーゼ, リパーゼ, CRE, UA, BUN, 総コレステロール, β リポ蛋白, リン脂質, ビリルビン, Fe^{3+}), 組織病理 (脾, 肝臓, 骨髄; ギムザ染色, ベルリンブルー染色), 血漿中サイトカイン濃度 (IL-1 α , -1 β , -2, -4, -6, -10, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α), 組織病理 (H/E, Berlin blue, 抗 PEG 抗体免疫染色; 肝臓, 脾臓)

実施場所：慶應義塾大学医学部

論文報告：Sakai H, Seishi Y, Obata Y, Takeoka S, Horinouichi H, Tsuchida E, Kobayashi K. Fluid resuscitation with artificial oxygen carriers in hemorrhaged rats: profiles of hemoglobin-vesicle degradation and hematopoiesis for 14 days. Shock. 2009 Feb; 31 (2): 192-200.

主要結果：循環血液量の 50% を脱血することにより顕著な低血圧, 過換気になったが, 人工赤血球の投与によってこれらは改善され, 脱血前の値にまで戻り, 脱血液の投与と同等であった。生存率も脱血液の投与と同等であった。脾臓重量は 3 日後にピークを示したが, その後低下した。ヘマトクリットは人工赤血球の投与によって血液希釈の影響により半減するが, 1 週間で元に戻った。血小板数も希釈により低下するが, 3 日後には正常値に復した。AST, ALT, LDH が蘇生 1 日後に上昇するが, 脱血液投与群と同等であり, 出血性ショックの影響と考えられた。総コレステロール, β リポ蛋白が 1 日後に増大したがその後正常値に復した。サイトカインレベル低値を推移した。組織病理より, 人工赤血球を捕捉したマクロファージは 14 日後には消失していた。PEG も 14 日後には消失していた。

13) 出血性ショック蘇生一長期生存試験

動物種：ビーグル犬 (♂)

投与試料：ヘモグロビン小胞体を 5% リコンビナントアルブミンに分散, [Hb] = 8.6 g/dL

投与量：1) 急速期：循環血液量 (86 mL/kg) の 50% の脱血, 60 分後に同量の人工赤血球を投与, 比較群は脱血液の投与 (返血), 主に血行動態を観察, 2) 長期観察：循環血液量の 40% の脱血, 同量の人工赤血球を投与。

麻酔：出血性ショック蘇生後 4 時間, および犠牲死時のみ Sevoflurane 吸入麻酔

投与経路：大腿静脈

観察時間：蘇生完了後 365 日間

測定項目：(出血ショック-蘇生時) 血圧, 肺動脈圧, 中心静脈圧, 肺動脈楔入圧, 心拍数, 心拍出量, 肺血管抵抗, 全身血管抵抗, 酸素消費量, 酸素運搬量, (長期生存例) 体重, ヘマトクリット, 血球数, 血液生化学検査 (AST, ALT, LDH, アミラーゼ, リパーゼ, CPK, LAP, CRE, UA, BUN, 総コレステロール, β リポ蛋白, リン脂質, 遊離脂肪酸, ビリルビン, Fe, Cu, K, IP, Mg, Ca), 組織病理 (脾, 肝臓, 腎臓, 肺, 脾臓, 心臓)

実施場所：慶應義塾大学医学部

論文報告：Ikeda T, Horinouichi H, Izumi Y, Sakai H, Tsuchida E, Kobayashi K. Cellular-type Hemoglobin-based oxygen carrier as a resuscitative fluid for hemorrhagic shock: Acute and long-term safety evaluation using beagle dogs. In: Hemoglobin-based oxygen carriers -principles, approaches and current status (Kim HW, Greenburg AG eds) Springer-Verlag, Germany, in press.

主要結果：ヘモグロビン小胞体による蘇生で全例が生存。体重の増加が見られた。血液生化学では脂質成分の増大が投与後 1 週間で見られるが, その後低下する。比較の脱血液投与群と同等の推移を示した。その他著変なし。別途実施した脾臓を摘出したビーグル犬ではヘモグロビン小胞体投与後に肺動脈圧の一過性上昇が観察されたが¹⁷⁾, 脾臓を摘出していない本実験モデルでは, 肺動脈の上昇はなかった。

14) 妊娠モデル反復投与試験

動物種：Wistar 系ラット (♀) 妊娠 12 日後

投与試料：ヘモグロビン小胞体, [Hb] = 10 g/dL (比較群, 生理食塩水)

投与量：2 mL/kg x 7 日 (総投与量 14 mL/kg は, ラットの循環血液量 56 mL/kg の 25%)

麻酔：isoflurane 吸入麻酔

投与経路：頸静脈 (カテーテル留置)

観察時間：投与期間 7 日間のあと更に 1 日

測定項目：母体重, 胎児体重, 胎盤重量, 母体臓器重量 (肝臓, 脾臓, 腎臓), ヘマトクリット, 血球数, Hb 濃度, 血液凝固機能 (APTT, PT, フィブリノゲン), 尿検査, 血中 HbV 濃度, 血液生化学検査 (総蛋白, アルブミン, AST, ALT, LDH, γ -GPT, LAP, ChE, 総ビリルビン, Fe, クレアチニン, BUN, UA, アミラーゼ, リパーゼ, CPK, K^+ , Ca^{2+} , inorganic phosphate, UIBC, 総コレステロール, 遊離コレステロール, コレステリルエステル, HDL コレス

テロール, β リポ蛋白, TG, リン脂質, 遊離脂肪酸, 総脂質), 乳酸値, グルコース, 血液ガス組成, 血圧, 心拍数, 組織病理 (ヘモジデリン, 抗ヒト Hb 抗体免疫染色: 脾臓, 肝臓, 胎盤結合部位, 胎盤迷路層, 胎児肝臓), 125 I-ラベル Hb 小胞体の体内動態 (血漿, 脾臓, 肝臓, 腎臓, 肺, 心臓, 胎盤, 胎児肝臓), 胎児肺のサーファクタント蛋白 (SP-A) 発現量
実施場所: 東北大学医学部, 国立精神神経医療研究センター, 熊本大学薬学部

論文報告: Kaga M, Li H, Ohta H, Taguchi K, Ogaki S, Izumi H, Inagaki M, Tsuchiya S, Okamura K, Otagiri M, Sakai H, Yaegashi N. Liposome-encapsulated hemoglobin (hemoglobin-vesicle) is not transferred from mother to fetus at the late stage of pregnancy in the rat model. Life Sci. 2012 Oct 5; 91 (11-12): 420-8

主要結果: 妊娠ラットに対する 7 日間の連投によって循環血液量の 1/4 の人工赤血球の投与を受けた後も, ラットは体重増加し, 全例が生存した. 臓器重量, 胎児重量, 血液生化学, 血球数, 尿検査, 血行動態など, どの項目も比較の生理食塩水投与群と比較して有意な変化は無かった. 母体側の脾臓, 肝臓で Hb 小胞体を捕捉したマクロファージの像が認められたが, 体内動態評価では, 人工赤血球は胎盤までは移行するが, 胎児には移行していないことを確認した. 胎児肺のサーファクタント蛋白 (SP-A) 発現量にも異常は無く, 胎児への影響は見られなかった.

15) 脳内出血モデル

動物種: Wistar 系ラット (♂)

投与試料: ヘモグロビン小胞体を 5% リコンビナントアルブミンに分散, [Hb] = 8.6 g/dL (比較群, 洗浄赤血球を同様に分散させたもの)

投与量: 20 μ L

麻酔: sevoflurane 吸入麻酔

投与経路: 脳実質に 28G 針を経由して投与

観察時間: 28 日間

測定項目: 体重, 行動学的テスト (旋回の有無, 立毛の有無, 下肢の強さ, 驚愕反射, 前肢握力), 脳組織病理 (H/E, 抗ヒト Hb 抗体免疫染色, 抗 HO-1 抗体免疫染色, 抗 GFAP 抗体免疫染色, Berlin blue), 電子顕微鏡観察

実施場所: 慶應義塾大学医学部

論文報告: Sakai H, Okamoto M, Ikeda E, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Histopathological changes of rat brain after direct injection of Hb-vesicles (artificial oxygen carriers) and neurological impact in an intracerebral hemorrhage model. J Biomed Mater Res A. 2009 Sep 15; 90 (4): 1107-19.

主要結果: 脳に出血があり血液脳関門が破綻した状態で人工赤血球が投与された場合, 脳神経系と接触することになり, 何らかの影響を与える可能性がある. そこで, 脳内出血モデルとして少量の人工赤血球を脳実質に注入する実験を実施し

た. 比較としてはラット洗浄赤血球を用いた. 体重は増大し続け, 食餌に影響は無いと考えられた. 行動学的観察においても対照群と比較して特に問題はなかった. 組織病理では, 穿刺部位周辺に好中球が出現したが直ぐに消失した. 脳実質中には人工赤血球が 28 日後にも認められたが, 脳組織の修復過程 (gliosis) には特に影響は見られなかった. 本実験では人工赤血球による悪影響は認められなかった.

16) 肝硬変モデルへの単回投与試験

動物種: Sprague-Dawley 系ラット (♂) に対し, テトラクロロメタン (CCl₄) 400 mg/kg 腹腔内投与 (週 3 回) を 8 週間実施し肝硬変モデルを作成

投与試料: ヘモグロビン小胞体, [Hb] = 10 g/dL に rHSA を添加したもの.

投与量: 14 mL/kg (一部 3 H-cholesterol を添加)

麻酔: エーテル

投与経路: 大腿静脈

観察時間: 投与後 14 日

測定項目: 血液生化学検査 (総蛋白, アルブミン, AST, ALT, γ -GTP, ALP, BUN, CRE, lipase, TG, リン脂質, 総コレステロール, HDL-コレステロール, 総ビリルビン, 直接ビリルビン, 間接ビリルビン, Fe), 組織病理 (ベルリンブルー染色, 肝臓, 脾臓), 総抗酸化値 (Potential anti oxidant, PAO), チオバルビツール酸反応物質 (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS), 脾臓および肝臓内の還元型 / 酸化型グルタチオン比, 24 時間後および 48 時間後の 3 H 体内動態

実施場所: 熊本大学薬学部

論文報告: Taguchi K, Miyasato M, Ujihira H, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K, Maruyama T, Otagiri M. Hepatically-metabolized and -excreted artificial oxygen carrier, hemoglobin vesicles, can be safely used under conditions of hepatic impairment. Toxicol Appl Pharmacol. 2010 Nov 1; 248(3): 234-41.

主要結果: 肝硬変モデルラットにヘモグロビン小胞体を投与した後, 血液生化学検査では, リパーゼ, ビリルビン, コレステロールの一過性上昇が見られたが, 14 日後には低下した. その他のパラメータでは著変なし. 組織病理では, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 肺, 心臓に形態学的影響はなし. 肝臓と脾臓にヘモジデリン沈着が認められたが, 酸化的ストレスの指標パラメータに著変無し. 体内動態評価から, 3 H は主に肝臓, 脾臓に分布し, 7 日以内に糞中に排泄されることが解った. 以上より, 肝硬変モデルにおいても, ヘモグロビン小胞体は分解排泄されることが解った.

17) 血液稀釈試験 (出血に対する投与), 各種代用血漿剤との併用の影響

動物種: Wistar 系ラット (♂)

投与試料: ヘモグロビン小胞体, [Hb] = 10 g/dL, および各種

代用血漿剤（ヒドロキシエチルスターチ HES, 3 種, 修正ゼラチン MFG, リコンビナントアルブミン rHSA）

投与量：1 mL の脱血と, 1 mL の代用血漿剤の投与を繰り返し, 循環血液量の 60% を置換する（血液希釈）。そのあと, Hb 小胞体を 20 mL/kg 投与する。

麻酔：Sevoflurane 吸入麻酔

投与経路：頸静脈から投与

観察時間：Hb 小胞体投与後 4 時間

測定項目：ヘマトクリット, 血圧, 心拍数, 血液ガス組成 (PaO₂, PaCO₂, BE, pH, Lactate, PvO₂, PvCO₂, 血液粘度)

実施場所：慶應義塾大学医学部

論文報告：Sakai H, Miyagawa N, Horinouchi H, Takeoka S, Takaori M, Tsuchida E, Kobayashi K. Intravenous infusion of Hb-vesicles (artificial oxygen carriers) after repetitive blood exchange with a series of plasma expanders (water-soluble biopolymers) in a rat model. *Polymer Adv Technol* 2011 Nov; 22: 1216-22

主要結果：高分子量 HES 溶液や MFG 溶液にヘモグロビン小胞体を分散させると, 枯渇性相互作用 (depletion interaction: 非吸着性の巨大高分子鎖が粒子間の領域に存在できにくくなり (枯渇), その領域を少なくしようとする力 (凝集力) が発生する) によって小胞体が極めて弱い flocculation (凝集) を形成することが明らかになったので, それが血行動態に与える影響を調べるため, Hb 小胞体と代用血漿剤との併用試験を実施した。どの代用血漿剤を併用した場合もラットは 4 時間生存した。血行動態, 血液ガス組成ともに安定した値を推移した。従って, flocculation の影響は本モデル実験では認められなかった。

18) 免疫系への影響

動物種：WKAH ラット

投与試料：生理食塩水に分散したヘモグロビン小胞体 [Hb] = 10 g/dL

投与量：循環血液量の 20% (V/V)

麻酔：エーテル麻酔

投与経路：尾静脈

実験法：HbV (あるいは空リポソーム) を投与し, 翌日に脾臓を摘出し, 単細胞浮遊液としたのち, T 細胞の非特異的 mitogen (Concanavalin A; Con A) で刺激し, 脾 T 細胞の増殖反応を測定する。

測定項目：DNA への ³H-Thymidine の取り込み

実施場所：北海道赤十字血液センター

論文報告：Takahashi D, Azuma H, Sakai H, Sou K, Wakita D, Abe H, Fujihara M, Horinouchi H, Nishimura T, Kobayashi K, Ikeda H. Phagocytosis of liposome particles by rat splenic immature monocytes makes them transiently and highly immunosuppressive in ex vivo culture conditions. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011 Apr; 337(1): 42-9.

主要結果：ヘモグロビン小胞体を投与した翌日の脾 T 細胞の

増殖はコントロールと比べて有意に抑制されていた。この抑制は投与後 3 日目には観察されたが, 7 日目には完全に回復していた。蛋白抗原 KLH (Keyhole Limpet Hemocyanine) に特異的な T 細胞増殖反応も同様に投与後 3 日まで抑制されていたが 7 日には完全に回復していた。空リポソーム (ヘモグロビンを内包していないリポソーム) の投与でも同様の現象が観察された。この現象は, ヘモグロビン小胞体 (or 空リポソーム) を貪食したマクロファージが一過性に, 免疫抑制機能を発揮するようになることが原因であること, その抑制にはマクロファージの産生する NO が関与している可能性のあることを報告した。一方, 蛋白抗原である KLH に対する抗体産生反応は, ヘモグロビン小胞体投与による影響を受けなかった。以上のことから, ヘモグロビン小胞体の投与で生体内の一部のマクロファージが免疫抑制機能を獲得する可能性があるが, あくまでも一過性であり, 全身的な免疫反応に対して, 重篤な影響を与える可能性は極めて低いと推察された。

19) 血液学的検討 (1) ヒト多形核好中球への影響

細胞種：ヒト多形核好中球

試料：ヘモグロビン小胞体 (プロトタイプ, DPPG を使用), [Hb] = 10 g/dL

実験方法：ヒト末梢血から単離したヒト多形核好中球に, 最大 0.6% の濃度で 30 分間作用させ, 洗浄後, ヒト多形核好中球の活性化剤 N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) 刺激の反応への前処置の影響を調べる。

測定項目：走化能, 接着因子の発現, 活性酸素産生, 脱顆粒

実施場所：北海道赤十字血液センター

論文報告：Ito T, Fujihara M, Abe H, Yamaguchi M, Wakamoto S, Takeoka S, Sakai H, Tsuchida E, Ikeda H, Ikebuchi K. Effects of poly(ethylene glycol)-modified hemoglobin vesicles on N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced responses of polymorphonuclear neutrophils in vitro. *Artif Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnol*. 2001; 29(6): 427-437

主要結果：fMLP 刺激による好中球の機能評価として, 好中球の走化能, β_2 インテグリンである CD11b の膜発現, 脱顆粒にともなう matrix metalloproteinase-9 の放出, 活性酸素の産生のいずれの項目においても, ヘモグロビン小胞体の前投与の影響はみられなかった。

20) 血液学的検討 (2) ヒト臍帯血の造血幹細胞

細胞種：ヒト臍帯血の造血幹 / 前駆細胞

試料：ヘモグロビン小胞体, [Hb] = 10 g/dL

実験方法：ヒト臍帯血から分離した CD34 陽性細胞を含む単核球を, 造血に働く各種サイトカインを添加した半固形培地に播種し, 2 週間または 4 週間培養により形成したコロニーの数を測定する。さらに CD34 陽性細胞を液体培養下にてヘモグロビン小胞体を添加し, 赤芽球系または顆粒球系の細胞へ

の増殖の影響を調べる。添加するヘモグロビン小胞体の最大濃度は3% (v/v) とする。

実施場所：北海道赤十字血液センター

論文報告：Yamaguchi M, Fujihara M, Wakamoto S, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Azuma H, Ikeda H. Influence of hemoglobin vesicles, cellular-type artificial oxygen carriers, on human umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells in vitro. J Biomed Mater Res A. 2009 Jan; 88(1): 34-42.

主要結果：in vitro の閉鎖系において、Hb 小胞体を長期間にわたり造血前駆細胞と共存させると、造血前駆細胞のコロニー形成能や、赤芽球または顆粒球系の細胞への増殖を抑制したが、Hb 小胞体との共存期間が3日間までであれば、造血前駆細胞のコロニー形成能や、赤芽球または顆粒球系の細胞への増殖への影響は少ないことが示された。

21) 血液学的検討 (3) ヒト臍帯血の造血幹／前駆細胞

細胞種：ヒト臍帯血の造血幹／前駆細胞

試料：ヘモグロビン小胞体, [Hb] = 10 g/dL

実験方法：ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞と骨髓由来ストローマ細胞との14日間の共培養により、造血幹細胞／造血前駆細胞を増幅させる系にヘモグロビン小胞体を作用させ、未熟な造血幹／造血前駆細胞の活性を測定する。添加するヘモグロビン小胞体の最大濃度は3% (v/v) とする。

実施場所：北海道赤十字血液センター

論文報告：Yamaguchi M, Fujihara M, Wakamoto S, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Hamada H, Azuma H, Ikeda H. Biocompatibility study of hemoglobin vesicles, cellular-type artificial oxygen carriers, with human umbilical cord hematopoietic stem/progenitor cells using an in vitro expansion system. ASAIO J. 2009 May-Jun; 55(3): 200-5.

主要結果：ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞と骨髓由来ストローマ細胞の共培養系にヘモグロビン小胞体が培養期間14日間有る場合には、造血幹細胞／造血前駆細胞の増幅が抑制された。ヘモグロビンを含まない空の小胞体の場合は、抑制効果が軽減することから、ヘモグロビンの作用が示唆された。一方、ヘモグロビン小胞体との共存が3日間までの短期間であれば造血幹細胞／造血前駆細胞の増幅に影響をあたえないことを明らかとした。

22) 血液学的検討 (4) ヒト血小板

細胞種：ヒト血小板

試料：ヘモグロビン小胞体, [Hb] = 10 g/dL

実験方法：In vitro にてヒト血小板とヘモグロビン小胞体を0, 20, 40% (vol/vol) で1時間インキュベーションし、血小板のアゴニスト刺激による血小板活性化の評価を、血小板α顆粒中の RANTES と β-thromboglobulin (β-TG)、濃染顆粒に存在するセロトニンの各放出反応およびポジティブフィードバックによって血小板活性化を増幅する Thromboxane A₂ (TXA₂) の産生、さらにα顆粒由来の CD62P の膜表面への

発現と血小板膜糖タンパク (αIIbβ3) の構造変化を認識する抗体 PAC-1 (first procaspase activating compound) の結合を指標とした。

実施場所：北海道赤十字血液センター

論文報告：Wakamoto S, Fujihara M, Abe H, Yamaguchi M, Azuma H, Ikeda H, Takeoka S, Tsuchida E. Effects of hemoglobin vesicles on resting and agonist-stimulated human platelets in vitro. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 2005; 33(2): 101-11.

主要結果：アゴニスト刺激の無い場合は、血小板反応上清中の RANTES, セロトニン, β-TG, TXB₂ および血小板表面 CD62P のレベルの上昇はみられず、ヘモグロビン小胞体に血小板活性化作用は無いと考えられた。アゴニスト刺激により血小板の脱顆粒を惹起させると、いずれの濃度のヘモグロビン小胞体処理においても RANTES, セロトニン, β-TG の放出, TXB₂ の産生, および CD62P 発現が引き起こされ、そのレベルはヘモグロビン小胞体未処理のものと有意差はみられなかった。一方、PAC-1 の発現はヘモグロビン小胞体未処理では影響がないものの、ヘモグロビン小胞体処理により低濃度の ADP 刺激血小板において僅かな亢進がみられたが、この程度の変化の臨床的意義は少ないと考えられた。以上のことから、ヘモグロビン小胞体は低濃度のアゴニスト存在下で αIIbβ3 の構造変化を僅かに促進するものの、その他の活性化マーカーにはアゴニスト刺激の有無にかかわらず影響を与えないことから、ヒト血小板に悪影響を示さないことが明らかとなった。

23) 血液学的検討 (5) ヒト血漿タンパク

細胞種：ヒト血漿中の補体、凝固因子、キニン・カリクレイン

試料：ヘモグロビン小胞体, [Hb] = 10 g/dL; 比較として強陰性荷電の空の小胞体、および DPPG を含有する小胞体

実験方法：ヘモグロビン小胞体を健常人ヒト血清と20%あるいは40%で混合し、37℃にて24時間インキュベーション後、遠心により各種 HbV を除去し、その上清の補体価 (CH50) を測定した。凝固系に及ぼす影響は、対象を生食とし、ヒト血漿にヘモグロビン小胞体添加 (20%, 40%, 60%) した場合のプロトロンビン時間 (PT) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) を測定した。カリクレイン-キニン系に対する影響は、血漿にヘモグロビン小胞体または生食を添加し、37℃にて24時間インキュベーション後、血漿中高分子キニノーゲンの分解による低分子化された高分子キニノーゲンの出現をイムノブロットング法にて検出した。

実施場所：北海道赤十字血液センター

論文報告：Abe H, Fujihara M, Azuma H, Ikeda H, Ikebuchi K, Takeoka S, Tsuchida E, Harashima H. Interaction of hemoglobin vesicles, a cellular-type artificial oxygen carrier, with human plasma: effects on coagulation, kallikrein-kinin, and complement systems. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 2006; 34(1): 1-10.

主要結果：陽性対照として、強陰性荷電 PEG 未修飾リボソームを添加した群では著しい CH50（補体価）の低下がみられるのに対し、ヘモグロビン小胞体を 20%あるいは 40%で添加した群では、それぞれ生食を添加した場合に比べて、CH50 の減少はみられなかった。PT 時間については、ヘモグロビン小胞体は添加量のいずれの濃度でも、生食添加の場合より有意に短縮させたが、その差は 1 秒以内であった。APTT 時間はどの血漿比率の場合においても生食の場合と違いはみられなかった。血漿に対し 40%あるいは 60%にて DPPG-ヘモグロビン小胞体または PEG 未修飾の DPPG-ヘモグロビン小胞体を添加させた場合、intact な高分子キニノーゲンが減少と低分子化された高分子キニノーゲンの増加が顕著に観察されたが、現行のヘモグロビン小胞体ではいずれの血漿比率の場合においても生食の場合と違いはみられず、血漿中高分子キニノーゲンの分解を引き起こさないことがわかった。以上のことから、現行のヘモグロビン小胞体のヒト血漿タンパクへの高い生体適合性が示された。

まとめ

人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）分散液は、血液と同等の高濃度微粒子分散液である。そのため、血液と同等の粘性を有し、血液と同様にヘモグロビン濃度に応じた酸素運搬機能を有する。大量投与を伴うモデル実験においても動物は犠牲死させるまで生存し、外見上の著変は認められない。血液学的検討では、一般に微粒子分散液の投与は補体活性によるアナフィラキシー様反応を生起する場合があるが、ヘモグロビン小胞体では粒子表面の工夫によってこれが抑制されている。血小板や血液凝固系に与える影響も精査しているが、異常は認められない。血行動態についても、修飾ヘモグロビン溶液系で観測される血管収縮や血圧亢進は、ヘモグロビンをカプセル化することによって抑制される。これはヘモグロビンによる血管内皮由来弛緩因子である NO の捕捉がカプセル化によって遅延される物理化学的な現象に起因していると考えている^{31, 32)}。体内動態においては、ヘモグロビン小胞体は血液中中で分解することなく微粒子として血流に乗って循環し、最終的には細網内皮系（主に肝臓、脾臓）に移行し、そこで完全に分解され、その成分は糞、尿中に排泄されることが放射ラベル化合物の投与試験から解った。反復投与により循環血液量の実に 2.5 倍の人工赤血球を投与する試験において、肝臓脾臓にはヘモジデリン沈着が認められるが、それによる悪影響は観察されていない。肝臓脾臓の肥大は一過性であり、完全に回復し、可逆性があった。血中半減期は 3 日程度ではあるが、代謝分解の過程は献血液と同等と考えられた。人工赤血球は赤血球と同様に膠質浸透圧を持たず、大量投与に際しては代用血漿剤の併用も必要となるが、薬剤との併用による悪影響は見られなかった。脳内出血モデル、ビーグル犬を使った出血性ショック蘇生試験においても、全例が生存している。ラット制御不能出血モデルに対する大量投与に際しても、短期的に問題が無いことを確認しているなど¹⁹⁾、表 1 にまとめた効能評価試験においても、動物が犠牲死させる

まで特段の影響なく生存することが解っている。ラット妊娠モデル、カニクイザルを使った試験でも、著変は認められていない。つい最近、復帰突然変異試験（Ames 試験）でも遺伝子突然変異誘発性が無いことを確認した。このように、ヘモグロビン小胞体製剤は、多方面に亘り安全性が確認されている。

修飾ヘモグロビン溶液系では、投与後に血漿が赤くなるため、血液生化学検査において比色分析、比濁分析に干渉作用を与えることが問題となっている。これに対してヘモグロビン小胞体では血漿から容易に分離が出来るので、干渉作用を回避できることを確認している³³⁾。これも一つの安全性試験項目といえる。またこの分離技術によって、上述のように多項目に亘る血液生化学検査が可能となり、ヘモグロビン小胞体の安全性が明らかになっている。

ところで、これまで課題とされてきた製造法については、混錬法による簡便化が可能になり量産に目処がついた（2012 年に PCT 出願済）。また投与後のメトヘモグロビンの漸増については、生体内の電子供与系の活用によってメトヘモグロビンを繰り返し還元型ヘモグロビンに還元出来ることを出血性ショック蘇生モデルラットの実験から明らかにしているの、課題は解決できると考えている。

ヘモグロビン小胞体製剤は、アカデミアを中心に開発してきた、極めて完成度の高い医薬品の候補物質であると自負している。是非とも日本発の医薬品として実用化に繋げたい。読者の皆様からの引続きのご支援、ご協力をお願いしたい。

謝 辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金および日本学術振興会科学研究費補助金を受けて推進された。また、本研究班にご参画頂いた以下の多くの分担研究者、研究協力者の諸先生方のご貢献に心より感謝申し上げます。

（敬称略）

早稲田大学：土田 英俊(故)、西出 宏之、武岡 真司、宗 慶太郎
慶應義塾大学：四津 良平、末松 誠、武田 純三、相川 直樹、
村田 満、渡辺 真純、饗庭 了、泉 陽太郎、山崎 正敬、山本
学、河野 光智、池田 達彦、勢司泰久

山口大学：池田 栄二

北海道赤十字血液センター：関口 定美(故)、池田 久實、藤原
満博、高橋 大輔、阿部 英樹

東宝塚さとう病院：高折 益彦

崇城大学：田口 和明

熊本大学：丸山 徹

日本医科大学：小川 龍、坂本 篤裕、寺嶋 克幸

防衛医科大学校：大鈴 文孝

福井大学：藤林 康久、岡沢 秀彦

国立精神神経医療センター：太田 英伸

Univ. of California, San Diego: Marcos Intaglietta

Univ. of Texas, San Antonio: William T. Phillips

Weill Med. College of Cornell Univ.: Michiko Okamoto

Inselspital University Hospital, Bern: Dominique Erni

引用文献

1. 酒井宏水, 土田英俊. 人工赤血球の過去, 現在, 未来. *ファルマシア* 2009; 45: 23-28
2. Sakai H, Sou K, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers: Present Situation and future vision. *J Intern Med* 2008; 263: 4-15.
3. 厚生科学研究費補助金 (高度先端医療研究事業)「酸素運搬機能を有する人工赤血球の創製と その評価に関する研究」平成 9-11 年度 総合研究報告書, 主任研究者: 土田英俊. 2000 年 4 月 10 日提出
4. 厚生労働科学研究費補助金 (医薬安全総合研究事業)「臨床応用可能な人工赤血球の創製に関する研究」平成 12-14 年度総括研究報告書, 主任研究者: 土田英俊. 2003 年 3 月提出
5. 厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)「人工赤血球の安全性向上に関する研究」平成 15-17 年度 総合研究報告書, 主任研究者: 小林紘一. 2006 年 4 月提出
6. 厚生労働科学研究費補助金 (政策創薬総合研究事業)「人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究」平成 18-20 年度 総合研究報告書, 研究代表者: 小林紘一, 堀之内宏久. 2009 年 4 月提出
7. 厚生労働科学研究費補助金 (政策創薬総合研究事業)「人工赤血球の臨床応用を目指した至適投与法の策定と GMP 製造技術の確立」平成 21-23 年度 総合研究報告書, 研究代表者: 堀之内宏久. 2012 年 5 月提出
8. 厚生労働科学研究費補助金 (創薬基盤推進研究事業)「人工赤血球 (ヘモグロビン小胞体) 製剤の実用化を目指す研究」平成 24 年度 総括・分担研究報告書, 研究代表者: 酒井宏水. 2013 年 5 月提出
9. Sakai H, Sou K, Tsuchida E. Hemoglobin vesicles as a transfusion alternative. *Methods Enzymol* 2009; 465 (Liposomes Part G): 363-384.
10. Sakai H, Takeoka S, Kobayashi K. Gas bioengineering using hemoglobin-vesicles for versatile clinical application. *Curr Pharmaceut Design* 2011; 17: 2352-2359.
11. Izumi Y, Sakai H, Kose T, Hamada K, Takeoka S, Yoshizu A, Horinouchi H, Kato R, Nishide H, Tsuchida E, Kobayashi K. Evaluation of the capabilities of a hemoglobin vesicle as an artificial oxygen carrier in a rat exchange transfusion model. *ASAIO J.* 1997; 43: 289-97.
12. Sakai H, Takeoka S, Park SI, Kose T, Nishide H, Izumi Y, Yoshizu A, Kobayashi K, Tsuchida E. Surface modification of hemoglobin vesicles with poly (ethylene glycol) and effects on aggregation, viscosity, and blood flow during 90% exchange transfusion in anesthetized rats. *Bioconjug Chem.* 1997; 8: 23-30.
13. Sakai H, Masada Y, Horinouchi H, Yamamoto M, Ikeda E, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. *Crit Care Med.* 2004; 32: 539-45.
14. Sakai H, Seishi Y, Obata Y, Takeoka S, Horinouchi H, Tsuchida E, Kobayashi K. Fluid resuscitation with artificial oxygen carriers in hemorrhaged rats: profiles of hemoglobin-vesicle degradation and hematopoiesis for 14 days. *Shock.* 2009; 31: 192-200.
15. Taguchi K, Ogaki S, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Maruyama T, Otagiri M. Fluid resuscitation with hemoglobin vesicles prevents *Escherichia coli* growth via complement activation in a hemorrhagic shock rat model. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 337: 201-8.
16. Yoshizu A, Izumi Y, Park S, Sakai H, Takeoka S, Horinouchi H, Ikeda E, Tsuchida E, Kobayashi K. Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier, hemoglobin vesicle, maintains intestinal perfusion and suppresses the increase in plasma tumor necrosis factor-alpha. *ASAIO J.* 2004; 50: 458-63.
17. Yamamoto M, Horinouchi H, Kobayashi K, Seishi Y, Sato N, Itoh M, Sakai H. Fluid resuscitation of hemorrhagic shock with hemoglobin vesicles in Beagle dogs: pilot study. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2012; 40: 179-95.
18. Yamazaki M, Aeba R, Yozu R, Kobayashi K. Use of hemoglobin vesicles during cardiopulmonary bypass priming prevents neurocognitive decline in rats. *Circulation.* 2006; 114 (1 Suppl): I220-5.
19. Seishi Y, Horinouchi H, Sakai H, Kobayashi K. Effect of the cellular-type artificial oxygen carrier hemoglobin vesicle as a resuscitative fluid for prehospital treatment: experiments in a rat uncontrolled hemorrhagic shock model. *Shock.* 2012; 38: 153-8.
20. Sakai H, Horinouchi H, Tsuchida E, Kobayashi K. Hemoglobin vesicles and red blood cells as carriers of carbon monoxide prior to oxygen for resuscitation after hemorrhagic shock in a rat model. *Shock.* 2009; 31: 507-14.
21. Sakai H, Takeoka S, Wettstein R, Tsai AG, Intaglietta M, Tsuchida E. Systemic and microvascular responses to hemorrhagic shock and resuscitation with Hb vesicles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283: H1191-9
22. Komatsu H, Furuya T, Sato N, Ohta K, Matsuura A, Ohmura T, Takagi S, Matsuura M, Yamashita M, Itoda M, Itoh J, Horinouchi H, Kobayashi K. Effect of hemoglobin vesicle, a cellular-type artificial oxygen carrier, on middle cerebral artery occlusion- and arachidonic acid-induced stroke models in rats. *Neurosci Lett.* 2007; 421: 121-5.
23. Verdu EF, Bercik P, Huang XX, Lu J, Al-Mutawaly N, Sakai

- H, Tompkins TA, Croitoru K, Tsuchida E, Perdue M, Collins SM. The role of luminal factors in the recovery of gastric function and behavioral changes after chronic *Helicobacter pylori* infection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; 295: G664-70.
24. Contaldo C, Plock J, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Leunig M, Banic A, Erni D. New generation of hemoglobin-based oxygen carriers evaluated for oxygenation of critically ischemic hamster flap tissue. *Crit Care Med*. 2005; 33: 806-12.
 25. Plock JA, Tromp AE, Contaldo C, Spanholtz T, Sinovic D, Sakai H, Tsuchida E, Leunig M, Banic A, Erni D. Hemoglobin vesicles reduce hypoxia-related inflammation in critically ischemic hamster flap tissue. *Crit Care Med*. 2007; 35: 899-905.
 26. Plock JA, Rafatmehr N, Sinovic D, Schnider J, Sakai H, Tsuchida E, Banic A, Erni D. Hemoglobin vesicles improve wound healing and tissue survival in critically ischemic skin in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 297: H905-10.
 27. Yamamoto M, Izumi Y, Horinouchi H, Teramura Y, Sakai H, Kohno M, Watanabe M, Kawamura M, Adachi T, Ikeda E, Takeoka S, Tsuchida E, Kobayashi K. Systemic administration of hemoglobin vesicle elevates tumor tissue oxygen tension and modifies tumor response to irradiation. *J Surg Res*. 2009; 151: 48-54.
 28. Tiwari VN, Kiyono Y, Kobayashi M, Mori T, Kudo T, Okazawa H, Fujibayashi Y. Automatic labeling method for injectable ¹⁵O-oxygen using hemoglobin-containing liposome vesicles and its application for measurement of brain oxygen consumption by PET. *Nucl Med Biol*. 2010; 37: 77-83.
 29. Kobayashi M, Mori T, Kiyono Y, Tiwari VN, Maruyama R, Kawai K, Okazawa H. Cerebral oxygen metabolism of rats using injectable ¹⁵O-oxygen with a steady-state method. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012; 32: 33-40.
 30. 高折益彦. “人工酸素運搬体作製に関する基本的留意事項(案)”を概説する. *人工血液* 2005; 13: 104-111.
 31. Sakai H, Sato A, Masuda K, Takeoka S, Tsuchida E. Encapsulation of concentrated hemoglobin solution in phospholipid vesicles retards the reaction with NO, but not CO, by intracellular diffusion barrier. *J Biol Chem*. 2008; 283: 1508-17.
 32. Sakai H, Okuda N, Sato A, Yamaue T, Takeoka S, Tsuchida E. Hemoglobin encapsulation in vesicles retards NO and CO binding and O₂ release when perfused through narrow gas-permeable tubes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 298: H956-65.
 33. Sakai H, Tomiyama K, Masada Y, Takeoka S, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Pretreatment of serum containing hemoglobin vesicles (oxygen carriers) to prevent their interference in laboratory tests. *Clin Chem Lab Med*. 2003; 41: 222-31.

カプセル型人工酸素運搬体—リポソーム化ヘモグロビンの開発

Development of Capsule Type Artificial Oxygen Carrier —Liposome-encapsulated Hemoglobin

金田 伸一, 石塚 隆伸, 後藤 博, 粕川 博明

Shinichi Kaneda, Takanobu Ishizuka, Hiroshi Goto, Hiroaki Kasukawa

和文抄録

ヘモグロビンを利用した人工酸素運搬体 (HBOC) の赤血球代替物としての臨床応用は, 輸血に伴う諸問題の解決手段として期待が持たれてきた。また, 虚血性疾患における虚血組織への酸素供給の増加による治療への期待からも研究されてきた。HBOC については, 多くの研究が為されてきたが, それらは依然, 開発の途上にあり, いくつかの製剤については, 臨床試験の段階で, 副作用の問題から開発が中断されている。これに対して我々は, HBOC の問題点を解決出来る可能性のある, リポソーム化ヘモグロビン (LEH) の開発に取り組んできた。我々は, LEH の製造において必要な技術要素として, 脂質カプセル内へのヘモグロビンの高効率の封入, 血中安定性向上, 高効率の酸素運搬並びに保存安定性向上を達成するための技術確立した。さらに, 治験薬として LEH を製造するための, 無菌製造方法を確立し, GMP 対応の製造設備を構築した。また, 我々は, LEH の基本的な有効性や安全性を, 高度出血や脳梗塞の動物モデルを用いた実験系や, 複数動物種を用いた血中動態や安全性試験により確認した。LEH の製造技術については, 既に治験実施が可能な段階に達しているが, その酸素運搬能の持続性等の機能的な限界や製造コストの問題は, 医薬品として開発する際の課題として残されている。それでも, 我々は, これらの課題を解決することが出来れば, 臨床の場に LEH による有用な治療手段を新たに提供出来るものと確信している。

Abstract

Clinical application of hemoglobin based artificial oxygen carriers (HBOC) as a red blood cell substitute has long been expected to solve several problems associated with blood transfusion. Expected applications of HBOC for use in the treatment of ischemic disease by increasing oxygen supply to ischemic tissues have also been studied. Despite numerous investigations, however, hemoglobin-based artificial oxygen carriers remain under development, and studies of some HBOC candidates have been discontinued at the clinical trial stage due to adverse events. We have been persistently engaged in the development of liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) as an effective method to resolve the problems associated with HBOC. Our investigations established technologies for the manufacture of LEH that have yield encapsulation of hemoglobin with high efficiency, achievement of stability in blood, oxygen transportation with high efficiency and prolongation of shelf life, along with other beneficial features. We have also established aseptic manufacturing processes and constructed a GMP facility for LEH as an investigational new drug. Additionally, we confirmed the fundamental efficacy and safety of LEH as an HBOC in oxygen delivery studies using massive hemorrhage and ischemic stroke animal-models, and have conducted pharmacokinetics and safety studies using various animal species. The manufacturing technology for LEH as a medicinal product has almost reached the clinical trial use stage, however, functionality and manufacturing cost issues remain unresolved. We are nonetheless convinced that a technical break-through that overcomes these issues will provide a novel and useful therapeutic procedure by LEH.

Keywords

artificial oxygen carrier, red blood cell substitute, liposome-encapsulated hemoglobin, manufacturing process, efficacy, safety

1. 緒言

輸血は、現代の医療において必須の治療法のひとつであるが、輸血用血液製剤の供給量は献血者数に依存しており、高齢化社会の進行に伴う需給状態の変化が懸念されている。また、輸血医療は、副作用、合併症、過誤輸血、感染症等の問題も内包している。現在、輸血の安全性は、副作用、感染症への対策の努力により大幅に向上しているが、なお、輸血の抱えるこれらのリスクが完全に払拭されたとは言えないのが現状であろう。そのため、これらの問題の解決の一助となり、現行の輸血医療を補助するものとして、血液代替物の開発には期待が持たれている。血球成分のうちでも、赤血球についてはその不足が生命維持に直結することから、赤血球製剤の代替物への要望はとりわけ高い。また、人工酸素運搬体は虚血性疾患の酸素供給による治療への期待からも研究されてきた。

赤血球製剤の代替物としての人工酸素運搬体は、その技術的内容から、パーフルオロケミカル (Perfluorochemicals : PFC) を利用するもの、赤血球由来のヘモグロビンやその誘導体を利用するもの (Hemoglobin Based Oxygen Carrier : HBOC) に大別され、さらに、後者は、ヘモグロビン分子そのものを化学的に修飾あるいは重合化することにより安定化させて人工酸素運搬体として使用する非カプセル型 (非細胞型) と、ヘモグロビン分子を、赤血球に類似した形で、脂質膜などのカプセル内に封入して人工酸素運搬体とするカプセル型に分類される。

PFC は酸素を物理的に高濃度に溶解出来ることから、ヘモグロビンに代わる酸素運搬物質として利用が検討されてきた。しかしながら、同物質の酸素含有量は酸素分圧の変化に対して直線的に変化することから、吸気中の酸素分圧を非常に高く保たないと、赤血球に比べ、酸素運搬効率が低くなる。

一方、赤血球の酸素運搬能を担う本体である、ヘモグロビンを利用した人工酸素運搬体である HBOC では、赤血球と同様に、その酸素との結合、解離の特性から、常圧の酸素条件下でも効率の良い酸素の運搬が可能なものとなっている。HBOC については、非カプセル型の開発が先行したが、多くの開発が臨床段階で中断、中止を余儀なくされて来ている¹⁻³⁾。さらに、2008 年には、NIH の Natanson ら⁴⁾ が、それまでに行われた複数種の HBOC の臨床試験結果に関するメタ解析を行い、HBOC 投与群では有意に、死亡例や心筋梗塞発症例が多くなることを報告しており、その後の NIH の workshop でも、非カプセル型の HBOC のリスクについて議論が為されている⁵⁾。

一方、我々は、当初より、ヘモグロビンが脂質のカプセル内に封入されているという点で、より赤血球の生理的な条件に近いカプセル型 HBOC として、リポソーム化ヘモグロビン (Liposome Encapsulated Hemoglobin : LEH) の開発に取り組んできた⁶⁻⁹⁾。本稿では、我々が取り組んできた LEH の開発について、各技術項目別に開発の経緯並びに現状と、開発の過程で見出した課題について概説する。

2. LEH の構造的特徴並びに物理的・化学的特性について

Figure 1 に LEH の構造的特徴と構成成分を示した。また、LEH の典型的な物理的・化学的特性を Table 1 に示した。LEH は、Figure 1 のように、ヒト赤血球由来のヘモグロビン溶液を、アロステリック因子である、イノシトール 6 リン酸 (IHP) とともに、リポソーム膜成分である脂質からなるカプセル内に封入したものである。IHP は赤血球における 2, 3-diphosphoglycerate (2, 3-DPG) に代わり、酸素親和性の調節が可能なアロステリック因子として選択されたものであり¹⁰⁾、LEH の酸素運搬効率を高めることに寄与している。リポソームは平均粒子径として 200-250nm の大きさであり、脂質膜は生体膜に類似した構成成分として、水素添加大豆リン脂質 (HSPC)、コレステロール (Chol)、ステアリン酸 (SA) より構成されている。さらに、リポソームを血管内に投与した場合、細網内皮系に取り込まれ、速やかに血中から除去されてしまうことから、異物認識を防ぎ、生体内での安定性を高めるため、リポソーム膜の表面を親水性高分子である Polyethylene-glycol (PEG) で修飾している¹¹⁾。LEH の主たる原料となるヘモグロビンは、赤血球を溶血させ、抽出、精製して得るが、その過程で 2, 3-DPG が失

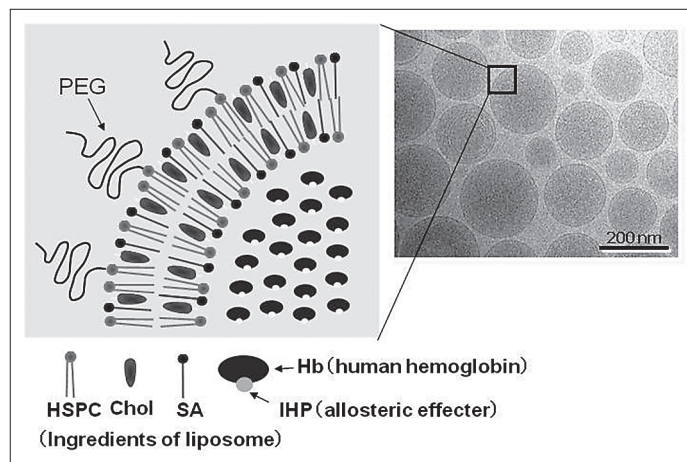


Figure 1. Structural and technical features of LEH

LEH is composed of a lipid component; HSPC, cholesterol, stearic acid, and purified human hemoglobin with IHP. The liposome's surface is modified with PEG5000-DSPE.

Table 1. Typical physicochemical properties of LEH

Property	Value
Relative osmolarity	1
pH	7.5
Hemoglobin (g/dL)	6
Total lipid (g/dL)	4
Hb/lipid (g/g)	1.5
Mean diameter (nm)	230
Methemoglobin (%)	<10
P ₅₀ O ₂ (torr)	40-50

われることにより、ヘモグロビンの酸素親和性が亢進して末梢組織相当の低酸素分圧下では酸素の解離が起こり難くなり、酸素運搬効率が低下する。さらに、ヘモグロビンが血管内に遊離状態で存在する場合、4量体のヘモグロビン分子は容易に2量体に解離し、腎糸球体でろ過されて血中での半減期が著しく短くなる。また、腎糸球体でろ過排泄された場合、ヘモグロビンの分解物が尿細管に蓄積し腎毒性を示すことも知られている。さらに、血中に遊離したヘモグロビンは血管内皮細胞の間隙から血管外に漏出し、血管内皮細胞が産生する一酸化窒素(NO)と結合する。NOは血管平滑筋細胞の緊張状態を調節する物質として知られているが、これがヘモグロビンに捕捉されることにより血管平滑筋細胞に作用出来なくなり、結果として、血管の緊張性が高まり収縮が引き起こされ、循環障害の原因となる。非カプセル型HBOCでは、ヘモグロビンを化学的に加工することにより、サブユニットの解離を防ぐ、重合化により分子量を大きくして、血管からの漏出を防ぐ等の考え方で開発されて来たが、血管収縮への影響は完全には回避されておらず、これが、非カプセル型HBOCの副作用の主要な因子ではないかと考えられている¹²⁾。また、この現象に対して、既存の薬剤の併用等で対処しようという試みも為されており、一定の効果も認められているようであるが、現状ではまだ、安全性の確保に十分な情報は提供されていない¹³⁾。

我々は、赤血球のリン脂質等で構成されている脂質二重膜からなる担体にヘモグロビンが担持されているという構造に着目し、リボソーム技術を応用しヘモグロビンをリボソーム内に封入したLEHの開発を行ってきた⁶⁻⁹⁾。LEHの持つ優位性として、ヘモグロビンが脂質の膜内に封入されているという点で赤血球に類似した構造を持つことにより、ヘモグロビンを化学的に加工することなく、生体内で、酸素運搬体として持続的に機能させること、また、前述の血管収縮等の問題点を解決出来る可能性があることが挙げられる¹⁴⁾。LEHの粒子径は、血中での滞留性と安全性面でのバランスを考慮して設定した。すなわち、血管からの漏出を防ぎ安定的に血中を循環させるとともにヘモグロビンの副作用を防ぐには、最低でも100nm以上の粒子径を有することが望ましいと考えられる。また、粒子径が小さいほど、内封されるヘモグロビン量に対するリボソーム膜の脂質成分の量比が大きくなり、生体に多量の脂質を付加することとなるため、この面からは、より大きな粒子径をもつことが望まれる。一方で、一般的にはリボソーム製剤を血中に投与した場合の血中滞留性は、粒子径が大きくなるほど短縮することが知られている¹⁵⁾。以上から、我々は両者の要素を満足させる限界として200~250nm程度の粒子径を目標とした。

LEHの酸素親和性は、カプセル内に封入するアロステリック因子の量を調節することによって制御している。前述のように、赤血球からのヘモグロビンの抽出過程で、2,3-DPGが失われるが、我々は、より強くヘモグロビンと相互作用し、安定的に酸素親和性を調整可能なアロステリック因子としてIHPを選択した。IHPについては、ヘモグロビンへの添加量比により、酸素親和性をかなり幅広く変化させることが可能で、赤血

球とは異なる、酸素解離のプロファイルを持たせることも可能であった^{16, 17)}。我々の得ている実績として、酸素親和性の指標としてのP50値を約10~50torrの範囲で制御することが出来ている。

3. LEHの製造

3-1. LEH調製

リボソームは、生体適合性に優れたリン脂質等で構成される閉鎖小胞体であり、薬物等がリボソーム内で安定に保持される性能を有する。そのため、薬物をリボソーム内に封入することで、治療標的部位以外の場所で薬物が作用することによる副作用の軽減と薬物血中滞留性向上が期待できることから、薬物送達担体として検討が進められ、複数のリボソーム製剤が実用化されている。

我々は、このリボソームの調製技術を応用して、リボソーム内にヘモグロビンが封入されたLEHの開発を進めてきた。リボソーム膜内への物質の封入法としては、リボソームを予め調製しておき、リボソーム膜内外の、pH勾配等を駆動力として、目的物質をリボソーム内に取り込むactive loading法と、リボソーム膜形成時に同時に内封物質を取り込ませる、passive loading法とがある。ヘモグロビンの様な高分子量の物質を、リボソーム膜を介して移動させるのは難しいと考えられることから、前者の方法は取り難く、後者を選択した。しかしながら、通常、このpassive loading法によるリボソーム内への物質の封入は、膜を構成する脂質の相転移温度以上の温度をかけた状態での処理を必要とされるが、タンパク成分であるヘモグロビンをリボソーム内へ封入する際に、そのような条件下での処理を行うことは、ヘモグロビンの変性をもたらすこととなる。また、この方法によるリボソーム内への物質封入効率は、一般的には10~20%程度と非常に低い事が知られている。そこで、我々は、様々な乳化方法の検討を行い、最終的には、脂質の膨潤体を調製することで、高速攪拌型乳化装置を利用した比較的温和な条件下での乳化処理法を確立し、ヘモグロビンの変性を抑えつつ、高効率にリボソーム膜内にヘモグロビンを封入し、LEHを調製することを可能とした^{9, 18)}。

3-2. ヘモグロビン調製

赤血球内には30g/dL程度という非常に高濃度の状態でヘモグロビンが含有されているが、赤血球に匹敵する酸素運搬能力を有するLEHを、効率良く調製するためには、赤血球内からヘモグロビンを抽出し、精製、濃縮する段階で、血液型を規定する成分を有する赤血球膜成分の除去や、ウイルスの不活化、除去処理といった必要な処理を行いつつ、可能な限り高濃度のヘモグロビン溶液とすることが求められる。

我々は、工業的生産を考慮し、可能な限り工程を簡素化することを検討し、Figure 2(図中左側)に示すようなヘモグロビンの抽出、調製工程を構築した。高濃度ヘモグロビン溶液の調製プロセスの概要は以下の通りである。

期限切れの赤血球製剤にpH調整と希釈洗浄のために等張の

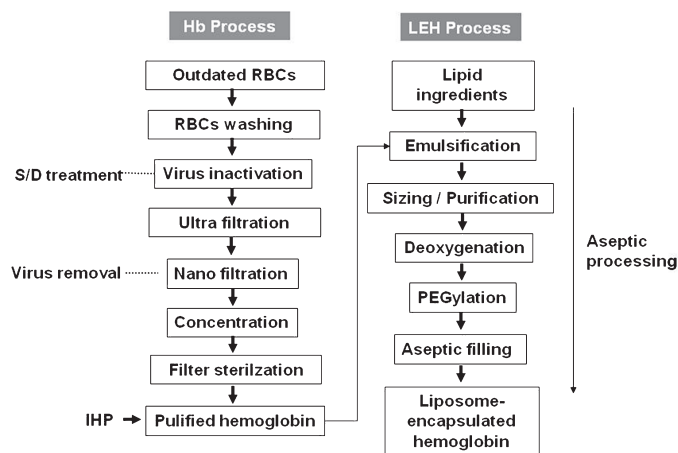


Figure 2. Manufacturing process of LEH

Purified human Hb solution is prepared from outdated human RBCs. RBCs are washed with sodium bicarbonate solution by centrifugation. The cells are then hemolyzed and treated by the S/D method. Hb is purified by ultrafiltration and then subjected to further nanofiltration as a virus removal step. Hb is then concentrated and sterilized components using a membrane filter. Purified Hb is then encapsulated by the lipid using high-speed emulsification. External free hemoglobin and large-sized particles are removed by cross-flow filtration. Finally, the LEH is deoxygenated, its surface is modified with PEG5000-DSPE, and then filled into plastic bags under aseptic conditions.

重炭酸ナトリウム溶液を添加し、遠心分離法により赤血球を分離洗浄した上で、赤血球膜の破壊（溶血）と、ウイルス不活化処理を同時に行うため S/D（solvent/detergent）処理を行う。続いて、イオン交換樹脂とクロスフロー型ろ過膜を用いて、S/D 成分と膜成分との除去を行い、さらに、ウイルス除去フィルターを用いたウイルス除去処理も行う。最終段階では、限外濾過フィルターを用い、所定の濃度まで濃縮する。その後、無菌フィルターにより無菌濾過を行い、LEH 調製用の原料とする。

なお、ヘモグロビンの精製、濃縮工程は、メトヘモグロビンの生成や、ヘモグロビンの変性を防ぐため、全て 10℃ 以下の低温下で実施することとした。製造プロセスでのメトヘモグロビン生成や、ヘモグロビンの変性を防ぐ手段については、武岡らにより、ヘモグロビンを一酸化炭素（CO）化する方法が報告されている¹⁹⁾。安定な CO 化ヘモグロビンとして精製、濃縮等の操作を行うことは、ヘモグロビンの変化を抑制する上で非常に有効な方法と考えられるが、一方で、CO ガスは毒性が強く、また可燃性のガスであるため、これを使用する場合、製造ラインでの防爆構造やガス検出設備等の安全対策への要求度が高くなり、製造コストへの影響が大きいと考えられたことから、我々は、温度制御を中心に対策を講じてきた。

3-3. ヘモグロビンのリポソーム化

カプセル型人工酸素運搬体の製造においては、いかにヘモグ

ロビンの機能を損なうことなく、効率良くヘモグロビンをリポソーム内に封入し、製剤化して提供出来るかという点が重要となる。我々は、本工程においても、スケールアップ、工業的生産を考慮して工程を確立してきた。LEH 調製プロセス Figure 2（図中右側）の概要は以下の通りである。

無菌的に工程に投入した混合脂質に純水を加えて、脂質の相転移温度以上まで加温することで、脂質の膨潤体を調製する。続いて、ヘモグロビン調製工程より得られた高濃度のヘモグロビン溶液にアロステリック因子である IHP を添加し、再度ろ過滅菌用フィルター処理を行った後、このヘモグロビン/IHP 溶液を一定の速度で、脂質の膨潤体に添加して、均一なヘモグロビン脂質混合物を調製する。このヘモグロビン脂質混合物を、高速攪拌型乳化装置を用いて、脂質成分の相転移温度以下で乳化処理を行い、リポソーム内へのヘモグロビンの封入を行う。続いて、膜を用いた整粒工程により粗大粒子を除去し、亜硫酸ナトリウム溶液の添加により工程液の脱酸素化を行い、次いでリポソーム外水相の液を置換することにより未封入のヘモグロビンを除去しつつ、同時に亜硫酸ナトリウム濃度を調整する。この LEH を予め滅菌されたプラスチックバッグに、脱酸素状態を維持しつつ、無菌接合装置を用いて無菌的に充填し、さらに、酸素不透過性の外包装内に入れて LEH 製剤とする。

リポソーム製剤の滅菌方法については、加熱による最終滅菌は、リポソーム膜や内封物質への影響のため困難であり、また、無菌フィルターによるろ過滅菌についても、しばしば困難を伴う。特に、LEH は前述のような理由から、平均粒子径を 200～250nm 程度としており、0.2μm の所謂、無菌フィルターでのろ過滅菌は困難である。また、γ線滅菌では、リポソーム膜の変質を来すことを確認しており²⁰⁾、適用困難であった。さらに、電子線滅菌は、LEH 製剤のような液性のものについては、その透過性の点から不適であり、仮に照射線量を高くする設定によりこの点を克服しても、照射線量の上昇によるリポソーム膜やヘモグロビンへの影響が避けられないと考えられ、LEH の滅菌法としては適用出来ないと考えられた。

以上のことより、LEH のリポソーム化工程は、無菌操作法による製造を行なう必要があると判断された。我々は、製造工程をクローズドシステム化し、定置洗浄（CIP）、定置滅菌（SIP）が可能な製造設備を構築することで、無菌的な LEH 製造の検討を行って来た。なお、当該設備では、ヘモグロビンのろ過滅菌後の製造工程で、添加される原料及び工程液類は、全ろ過滅菌操作を経て工程に投入される。

4. LEH の安定性

4-1. 保存中の安定性

LEH を輸血用血液の代替物、あるいは治療用の医薬品として用いる場合には、長期保存に耐えうることが必須の条件となる。LEH の保存中の変化として、最も注意すべき点はヘモグロビンのメトヘモグロビンへの変化（メト化）による酸素運搬能力の喪失である。

赤血球にはヘモグロビンのメト化を防ぐため、メトヘモグロ

ピン還元酵素系等の多重の機構が存在している。この機構は、赤血球内のエネルギー代謝²¹⁾を利用しており、我々は、抽出したヘモグロビン溶液に、これらのエネルギー代謝の基質となる物質を添加することで、赤血球の機構を再構築することが出来るのではないかと考え、検討を行ってきた。開発初期段階において、赤血球の粗抽出物にグルコース、ADP、NADHを添加することで、解糖系の代謝を介したメトヘモグロビン還元作用により、ヘモグロビンのメト化の抑性が可能であることを確認した²²⁾。しかしながら、その後に導入したウイルス不活化、ウイルス除去工程並びにヘモグロビンの精製工程は、解糖系並びにメトヘモグロビン還元酵素系酵素の喪失や不活性化をもたらした。ペントースリン酸経路を介したサルベージ回路による活性維持も試みたが、同様に関連酵素系の活性低下により、メト化抑制作用の再構築は困難であった。さらに、NADH等の還元物質によるヘモグロビンの直接的な還元作用についても検討したが、効果の持続には限界があり、添加物質の酸化体による逆反応の可能性も示唆されたことから、使用を断念することとなった。

以降、LEH 保存時のヘモグロビンのメト化抑制策としては、脱酸素化することによる対策を検討し、安定化に成功している。Figure 3に LEH 保存時の複数の指標の変化を示したが、メトヘモグロビンについては、むしろ経時的に減少する傾向を認めている。これは、脱酸素化した条件下で、ヘモグロビンの自動還元作用が働き、その結果としてメトヘモグロビンの減少が見られたものと考えられた。

その他、リポソーム膜脂質含量や平均粒子径には変化は認められず、リポソーム外水相のヘモグロビン量にも変化が見られ

ないことから、リポソームの形状は安定して保持され、ヘモグロビンの漏出も起こっていないものと考えられた。

4-2. 血中での安定性

LEH のリポソーム膜表面を PEG 修飾することにより、血中の蛋白質との相互作用が抑えられ、細網内皮系への取り込みが抑制された結果として、血中での滞留性が改善されることが明らかになっている。しかしながら、その異物認識が完全に回避されたわけではなく、血中での寿命は、赤血球のそれに比較して著しく短い。血中での動態には著しい種差が存在し、ラットとサルでは血中での滞留性に大きな違いが認められたが (Figure 4)、長期間血中に残留するサルの場合でも、1週間後には、血中での LEH の存在量は投与初期値の 1/10 以下まで低下した。

さらに、LEH におけるより大きな課題として、血中への投与後の、ヘモグロビンのメト化がある。製剤としての保存中のメト化は前述のように、脱酸素化して保存することにより回避可能であったが、これに対して、血中への投与後のメト化の進行については、防ぐ手段を持ち得ていないのが現状である。我々は、LEH の血中での働きを考えると、リポソーム製剤としての血中動態だけでなく、メトヘモグロビンの生成によるヘモグロビンの機能的面での変化を加味して考えるべきであるということを提案し²³⁾、検討を行って来た。血中でのメト化の進行についても、種差が見られてラットとサルでは大きな差があり、サルの方がメト化の進行が遅かったが (Figure 5)、サルの場合でも、投与後 48 時間後では、メトヘモグロビンの割合が 80% 余りとなった。すなわち、LEH の血中濃度の推移と

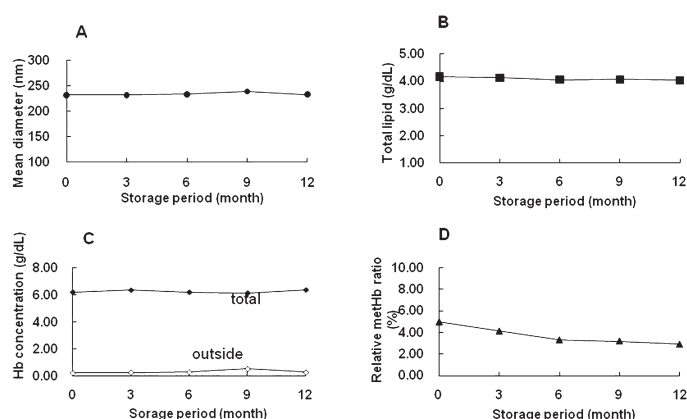


Figure 3. Stability of physicochemical properties during storage

A: Mean diameter of liposomes, B: Total lipid content, C: Total Hb concentration and Hb concentration outside of liposomes, D: Methemoglobin content. The diameter of the liposomes was determined by the dynamic light scattering technique. Contents of lipid ingredients were measured by HPLC with IR detection. Hemoglobin concentration and methemoglobin content were measured by the cyanmethemoglobin method.

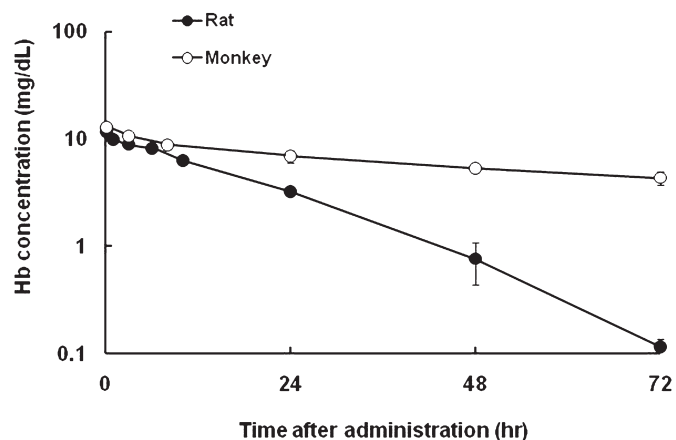


Figure 4. Retention of LEH in circulating blood in rats and monkeys: Evaluated as concentration of human hemoglobin. Male SD rats were administered 20 mL/kg of LEH via the tail vein, and the concentration of human hemoglobin in the blood was determined by ELISA. Male cynomolgus monkeys were also administered 20 mL/kg of LEH via the saphenous vein, and the concentration of human hemoglobin in the blood was determined by the same method.

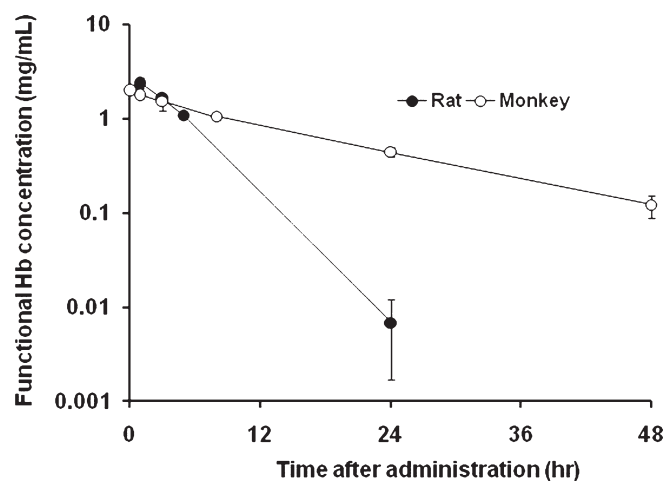


Figure 5. Changes in the functional hemoglobin (prior to conversion to methemoglobin) of LEH in the blood of rats and monkeys. Male SD rats and male cynomolgus monkeys were administered LEH at a dose of 5 mL/kg and 2 mL/kg respectively. The concentration of human hemoglobin in the LEH of rats and monkeys were determined by ELISA, and the methemoglobin ratio in LEH was determined by the cyanmethemoglobin method.

合わせて考えると、機能するヘモグロビン量はこの時点で、投与量の10%に満たなくなっていると考えられた。

ヘモグロビンのメト化はLEHの酸素運搬能力とその持続性を規定する重要な因子であり、生体内でその機能を長時間維持するには、血中に投与した場合にも、その効果を持続的に発揮出来る、ヘモグロビンの酸化防止、メトヘモグロビン還元機構の確立が必要と考えられる。しかしながら、それには、製造コストとの両立が可能な新たな技術開発も必要と考えられる。

5. LEHの有効性と安全性

5-1. LEHの有効性

LEHが人工酸素運搬体として、生体内でも、酸素運搬能力を発揮し得ることは、これまでに多くの実験により明らかになっている。その酸素運搬量は投与されたLEHの量と、供給される酸素濃度と生体側の状態に依存した組織酸素分圧により規定される酸素運搬の効率によって決まってくるが、少なくとも生体内で酸素運搬機能を発揮した結果と判断される効果を示すことを認めている。すなわち、出血による血中のヘモグロビン量の減少による酸素不足の状態のモデル動物における赤血球の代替物としての効果²³⁻²⁹⁾、体外循環時の併用効果³⁰⁻³²⁾や虚血性疾患の事例としての脳虚血モデル動物における病態抑性効果³³⁻³⁹⁾等が確認されている。

ところで、HBOCの酸素親和性については、その最適値はどこにあるのか、過去、有効性と安全性の両面から長きに渡り議論が行われてきた。少なくとも、非カプセル型HBOCについては、赤血球より酸素親和性が低い場合、すなわち高いP50

Table 2. Physicochemical properties of LEH with low or high oxygen affinity

Property	Type of LEH	
	H-LEH	L-LEH
Relative osmolarity	1	1
pH	7.2	7.2
Hemoglobin (g/dL)	6.2	6.2
Total lipid (g/dL)	3.9	4.3
Hb/lipid (g/g)	1.6	1.4
Mean diameter (nm)	236	241
Methemoglobin (%)	<7.0	<7.0
P50	12	48

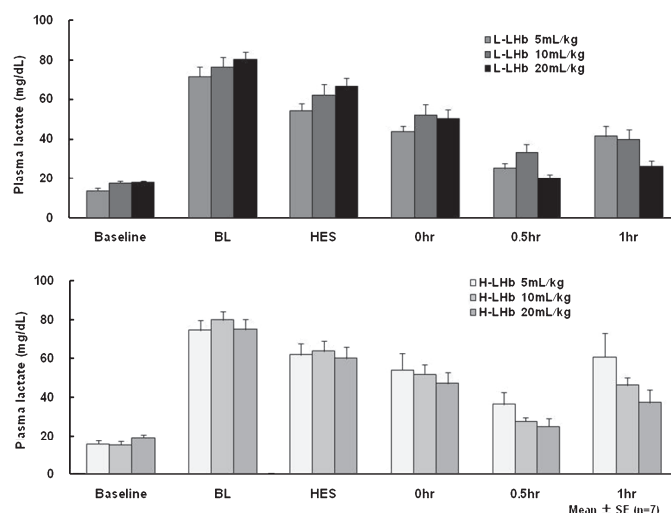


Figure 6A. Efficacy of LEH with different oxygen affinity in rats with massive hemorrhage

Anesthetized male SD rats were administered 20 mL/kg of LEH with low and high oxygen affinity after isovolemic hemodilution. Plasma lactate levels were determined sequentially.

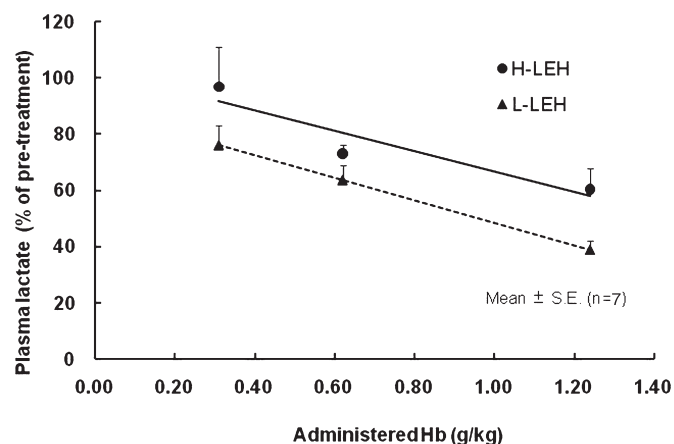


Figure 6B. Dose-dependent efficacy curve of LEH with different oxygen affinity in rats with massive hemorrhage

Plasma lactate levels in rats were exhibited the relative value of pre-treatment, just after hemodilution, in correlation with administered LEH dose.

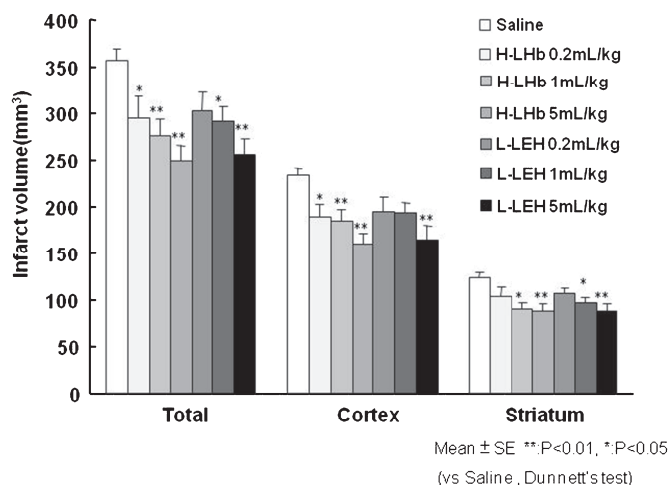


Figure 7. Efficacy of LEH with different oxygen affinity in a rat ischemic stroke model

Focal brain ischemia was induced by insertion of nylon filament suture in the middle cerebral artery. After 2hr of ischemia, the brain was reperfusion by removal of the suture. LEH was administered 0.5hr after starting ischemia, and stroke volume was determined and estimated with 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride staining sliced brain tissue.

値を持つ場合、比較的高い酸素分圧の状態から酸素を解離し始めることによる、血管収縮のリスクが懸念されている^{40, 41)}。また、酒井らは、カプセル型 HBOC においても、高い酸素親和性を持たせることの利点を提唱している⁴²⁾。これに対し、HBOC の酸素親和性の最適条件は、その物性や病態により異なる可能性を指摘する意見もあり⁴³⁾、現状では、未だ明確な結論は得られていないと我々は考えている。そこで、我々も、ラットの高度出血モデル、脳梗塞モデルという、異なる条件の病態モデルを用い、異なる酸素親和性の LEH について、その効果を検討した。実験に供した、酸素親和性の異なる 2 種類の LEH の特性値を Table 2 に、Figure 6 及び Figure 7 に夫々、高度出血モデル、脳梗塞モデルでの LEH の効果に関する結果を示した。図のように、高度出血モデルにおける酸素不足の指標である血中乳酸値の改善効果でも、脳梗塞モデルにおける虚血組織への酸素供給の結果としての梗塞巣体積の縮小効果についても、我々の検討の結果からは、その効果には酸素親和性による明確な違いは見出し得なかった。一方、福本ら³⁶⁾は、脳梗塞モデルにおいて、高い酸素親和性の LEH の優位性を報告している。このように、酸素親和性について異なる見解が示され、結論づけが難しい理由は、酸素を必要とする病態やその際の組織の酸素要求の多様性が考えられる。さらに病態モデルによる実験系での結果については、実験条件、評価指標の違いによる影響も考えられる。実態としては、病態により最適条件は異なる可能性もあるが、今後、実際の組織の酸素要求性も含めた適切な酸素運搬の特性や、用法、用量が、複数の病態や病態組織において、さらに検討、議論されていくことが必要であ

らう。

5-2. LEH の安全性

LEH の安全性については、これまで、特に出血モデル等を用いて、有効性との関係の中で検討して来た。輸血の代替物として想定されるレベルの用量範囲内の単回使用においては、LEH の投与に伴い、その使用を困難にするような問題は見出されていない。一方、先に述べたように、LEH は短時間に、細網内皮系に取り込まれていくため、超大量投与や、反復投与を行った場合には、細網内皮系の臓器、組織への負荷が大きくなり、これらの臓器、組織の機能障害を招来するリスクも想起される。これらの点を踏まえ、我々は、これまでに、医薬品として臨床試験に供するために必要な非臨床試験としての試験を GLP 基準ないしは信頼性基準に則り実施してきた。

LEH の反復投与試験においては、リボソームの血中での滞留性を考慮し、ラットでは 3 日に 1 回の頻度で 5 回静脈内間歇反復投与を行う 14 日間静脈内間歇反復投与毒性試験を、サルでは週に 1 回の頻度で 4 回静脈内間歇反復投与を行う、4 週間静脈内間歇反復投与毒性試験を実施した。トキシコキネティクス (TK) データについては、ラット、サルの何れにおいても、想定される臨床使用量の範囲において、投与用量に対して非線形性を示した。リボソーム製剤の非線形的な動態に関しては、細網内皮系組織でのリボソームの取り込みの飽和が原因と考えられ、LEH に関しても細網内皮系組織への取り込み飽和が生じている可能性が示唆された。

実際に、病理組織学的検索では、ラット、サルの何れにおいても、細網内皮系組織での泡沫化像を認めており、また、組織内分布の検討でも、主たる分布先は細網内皮系組織であり、TK 試験から想起された現象が裏付けられている。これらの変化は、投与をやめることにより回復することを確認しているが、LEH の場合、特に、一般のリボソーム製剤より投与されるリボソームの量が多くなることを考えると、これらの現象には注意が必要であり、基本的には、LEH は単回もしくは短期的な使用目的で用いられるべきものであり、長期の反復投与には適さないものと考えられた。

一方、安全性薬理試験では、リボソーム製剤投与時に一定頻度で生じると報告されている、投与時間関連反応 (IRRs) と呼ばれる一過性の反応に関するリスクアセスメントとして、サルを用いたコアバッテリー試験 (心血管系) に加え、リボソーム製剤に対して高感受性の動物であるイヌを用いた検討を実施した。サルでは臨床想定投与量では循環変動を認めなかった。一方、イヌでは投与直後に一過性の循環動態の変動 (血圧低下) が認められたものの、その程度は投与速度依存的に低減されることも示された。

IRRs の詳細な発症メカニズムは不明であるが、有力な仮説の一つとして Szebeni ら⁴⁴⁾ が提唱している CARPA (Complement Activation-Related Pseudoallergy) がある。これはリボソームに血漿成分が反応することで補体系が活性化されることに起因する現象と説明されており、動物種間での反応

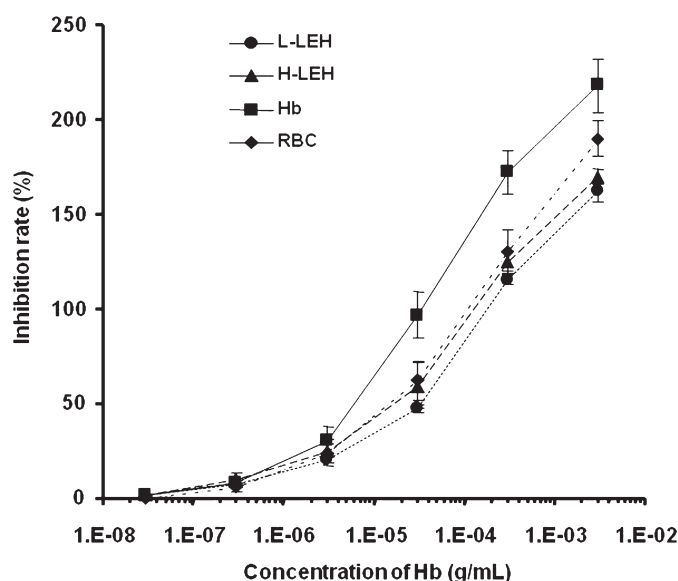


Figure 8. Dose-dependent inhibition of LEH of different oxygen affinity on acetylcholine-induced vasodilation

Isolated rat carotid artery rings were pre-contracted with 3×10^{-7} mol/L phenylephrine in Krebs-Henseleit solution bubbling with a gas mixture consisting of 95%O₂+5%CO₂. 10^{-6} mol/L of acetylcholine was added to the organ bath, followed by the cumulative addition of L-LEH, H-LEH, Hb or RBC. Inhibition rates were calculated as the percentage of maximum relaxation induced by acetylcholine. IC₅₀ values were calculated by non-linear regression analysis.

Table 3. Inhibitory effects of LEH with different oxygen affinity on acetylcholine-induced vasodilation

Sample	IC ₅₀ (Hb concentration)	
	g/mL	(nM)
L-LEH	3.08×10^{-5}	(477.5)
H-LEH	1.33×10^{-5}	(206.2)
Hb	4.63×10^{-6}	(71.8)
RBC	1.30×10^{-5}	(201.6)

の差が大きい事も知られている。そこで、ヒト、サル及びイヌの血漿を用いた in vitro の補体系活性化の検討を行ったところ、イヌの血漿では活性化が認められたものの、ヒト及びサルの血漿では活性化が認められなかった。

以上の in vivo および in vitro の検討結果から、イヌで起こった IRRs については、ヒトではその発生リスクが低いことを示唆するものと考えられた。しかしながら、既存のリボソーム製剤については、臨床的に IRRs 様の反応を認めた報告もあることから、first in man の臨床試験実施に際しては、投与速度についても、十分に注意深く検討していく試験設計が必要と考えられた。

また、ヘモグロビンをカプセル化したことの意義を確認する

ことに加え、非カプセル型 HBOC の臨床試験における副作用との関連が推測されているヘモグロビンによる NO 捕捉の影響について検討するための補足的な実験を実施した。すなわち、ラット摘出血管のアセチルコリンによる弛緩反応に対する抑制作用について、前述の2種類の酸素親和性の異なる LEH を用いて検討した。その結果、酸素親和性には関わりなく、何れの LEH も、血管弛緩反応の抑性は、ヘモグロビンより弱く、赤血球と同程度以上という結果となり、LEH の特徴が示されたものと考えられた (Figure 8, Table 3)。

6. GMP 製造と品質保証

LEH の実用化に向けては、医薬品としての製造を行う上で、医薬品 GMP に対応した生産設備が必要であり、前述のように、汎用される滅菌法での最終滅菌が困難な LEH について、無菌保証可能な工程で製造を遂行できることが重要となる。

具体的には、施設面ではバイオハザードの観点からの封じ込めの要求としての陰圧条件での管理と、無菌医薬品製造のための陽圧管理という背反的な要求を満たす構造要件を満たし、かつリボソーム調製の全工程を無菌操作工程として、培地充填試験の定期実施も含めた無菌保証を行うことが求められる。

これらは、LEH の品質保証上不可欠なものであるが、実用化に向けては、製造コストへの影響が大きな課題であり、このような条件下で、品質を損なうことなく、製造コストを適当な水準に納めることが必要となる。

我々も、高品質の製剤を、出来る限り低コストで供給するためのコストダウンに取り組み、一定の成果を上げてきたが、現状では、完全に、その課題を解決するには至っていない。

さらに、規制面では、人工酸素運搬体に関しては、FDA や日本血液代替物学会からガイドラインの案が提示されているが^{45, 46)}、これらを踏まえるとともに、リボソーム製剤と生物製剤の二つの側面を持つことも考慮し、適正なデータ取得や管理を行う方法について、規制当局とも十分な協議を行うことが必要であろう。

そのためにも、前述のような要件の製造設備において、無菌操作医薬品の指針⁴⁷⁾に則った製造、品質管理を実施し、製造設備並びに施設の管理を適正に行うことを条件として品質の保証を行って行くことが求められる。

7. LEH の臨床応用

カプセル型人工酸素運搬体の機能を規定する要件は、酸素運搬能力、体内(血中)動態であり、これを規定する要素としては、酸素運搬能とその持続性、また、その機能を臨床の場にて十分に発揮させるためには、適切な用法と用量の設定が重要である。従来検討されて来た、輸血代替物としての応用のみならず、虚血性疾患治療用の医薬品として適用する場合、前にも述べたように、病態組織の酸素要求量は必ずしも明確ではなく、適用する病態に即した動物実験からの推定により設定する必要があり、検討と議論が必要である。近年、PET 等、組織酸素代謝を直接把握出来る評価方法^{34, 37, 48)}や、組織酸素分圧を直接

測定する等の方法^{38, 39)}を用いた検討も進められているが、このような評価手段も含め、更なる詳細検討の中からより、適切な LEH の使用条件が見出されていくものと考えている。

また、臨床応用に際しては、前に述べたように、安全性面での LEH の特性も踏まえ、最適な用法、用量の設定が進められる必要がある。

さらに、臨床応用に際しては、臨床検査値への影響についても詳細な検討が必要である。LEH は比重の関係上、通常の高漿や血清の分離を行う遠心条件では沈降せず、上清に残り、粒子体であることから、光を散乱し、光学的な臨床検査には影響を与えてしまう。また、体内で血中に存在する状態でも、パルスオキシメーターの様な測定においては影響を与えることが判っている。そのため、これらの問題への対処方法について検討が行われており^{49, 50)}、我々も、臨床生化学検査については、デキストランを用いて弱遠心で LEH を分離する方法を、動物実験で応用している²³⁾。また、同様の方法により、臨床検査への影響回避に利用することを検討してきたが⁵¹⁾、現状では、全ての項目についての影響を完全に排除する方法は見いだせておらず、今後、更なる検討が必要と考えられる。

8. 結語

以上のように、LEH の開発は実用化の一手前まで到達しているが、同時にその実用化、すなわち医薬品として、臨床の場に一定した品質のものを、安定的、継続的に供給するには、その原料の供給も含め、未だ残された課題が存在している。ヘモグロビンを抽出する原料としての赤血球は、これまで、期限切れの赤血球製剤を活用して来た。一方、現在、関係機関の努力の結果として期限切れの血液は著しくその数が減っていることは周知のことであり、将来的に、LEH の実用化を目指す場合には、赤血球の確保を如何にするかは、非常に重要な問題である。遺伝子組み換え技術によりヘモグロビンを産生することが技術的に可能であることは既に確認している⁵²⁾が、ここにもコストの問題が立ちはだかっている。

我々は、1980 年代の前半より本研究に着手し、その後、血液由来物質に関する安全対策等、規制や社会的な要求の変化を受けて、種々の新たな技術開発や対策を行い開発を続けて来たが、これまでに論じたように、依然として解決出来ていない課題があることも事実である。しかしながら、これだけの長きに渡る開発期間を経てもなお、人工酸素運搬体には、間違いなく医療のために実用化を待ち望む声があり、これらの課題が乗り越えられたあかつきには、LEH は、必ずや臨床の場において、多くの命を救う手段となるものと信じている。

謝辞

本研究開発の一部は平成 15 年度課題設定型産業技術開発費助成事業（新エネルギー・産業技術総合開発機構：NEDO）「ナノカプセル型人工酸素運搬体製剤の製造技術開発プロジェクト」によった。

本研究開発において、人工酸素運搬体製造に用いるヘモグロ

ビンの調製のための期限切れ赤血球製剤は、日本赤十字社血液事業本部並びに関係各血液センターのご協力の基に、ご提供頂いた。

本研究開発の過程において、日本血液代替物学会に「血液代替物前臨床試験専門委員会（1994 年 10 月～1996 年 1 月）が組織され、LEH の物性、品質並びに有効性、安全性の見地からご評価を頂いた。

本研究開発において、特に、臨床的な有効性や、安全性の観点からの評価については、以下の各研究機関には共同研究を通じて多大なるご支援、ご指導を頂いた。東海大学医学部（研究代表者：川口 章先生）、国立循環器病センター（研究代表者：妙中義之先生）、北海道大学医学部（吉岡充弘先生）、防衛医科大学校防衛医学研究センター（研究代表者：石原雅之先生）。

また、その他にも、長きに渡る研究開発の過程にて、主に人工酸素運搬体の応用研究を通じて、大変多くの先生方よりご支援、ご指導を頂いた。

以上、ここに記して、謹んで感謝の意を表します。

引用文献

1. Squires JE. Artificial blood. *Science* 2002; 295: 1002-1005.
2. Kim HW and Greenburg AG. Artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: A selected review and current status. *Artif Organs* 2004; 28(9): 813-828.
3. Winslow RM. Current status of oxygen carriers ('blood substitutes'): 2006. *Vox Sang* 2006; 91: 102-110.
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. *JAMA* 2008; 299(19): 2304-2312.
5. Public Workshop: Safety of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers (HBOCs), April 29-30, 2008 (<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/NewsEvents/WorkshopsMeetingsConferences/ucm091975.htm>, 2013. 04. 29)
6. Takahashi A. Characterization of Neo Red Cells (NRCs), Their Function and Safety in vivo tests. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1995; 23(3): 347-354.
7. Ogata Y. Characteristics and function of human hemoglobin vesicles as an oxygen carrier. *Polym Adv Technol* 2000; 11: 205-209.
8. Ogata Y. Evaluation of human hemoglobin vesicle as an oxygen carrier: Recovery from hemorrhagic shock in rabbits. *Polym Adv Technol* 2000; 11: 301-306.
9. Kaneda S, Ishizuka T, Goto H, Kimura T, Inaba K, Kasukawa H. Liposome-encapsulated Hemoglobin, TRM-645: Current Status of the Development and Important Issues for Clinical Application. *Artif Organs* 2009; 33(2): 146-152
10. 鈴木一比好, 宮内雄二, 岡本 武, 高橋 晃, 沢本二郎, 大崎健一, 土田英俊, 大野弘幸. ネオレッドセルの特徴と性能. *人工臓器* 1988; 17(2): 708-711

11. Yoshioka H. Surface modification of hemoglobin-containing liposomes with polyethylene glycol prevents liposome aggregation in blood plasma. *Biomaterials* 1991; 12: 861-4.
12. de Figueiredo LF. Vasoactive properties of synthetic blood substitutes. *Medicina* 1998; 58: 403-10.
13. Kim HW, Hai C, Greenburg AG. Acellular Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Induced Vasoactivity: a Brief Review of Potential Pharmacologic Remedies. *人工血液* 2009; 17(4): 147-159
14. Rudolph A, Supizio L, Hieble P, Macdonald V, Chavez M, Feuerstein G. Liposome encapsulation attenuates hemoglobin-induced vasoconstriction in rabbit arterial segments. *J Appl Physiol* 1997; 82: 1826-1835
15. Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirproten DB, Papahdjopoulos D. Optimizing Liposomes for Delivery Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors *Pharmacol Rev* 1999; 51(4): 691-743
16. 坂口圭介, 後藤彰久, 宮内雄二, 鈴木一比好, 沢本二郎, 高橋 晃, 大野弘幸, 土田英俊. ネオレッドセルの酸素運搬能制御. *人工臓器* 1989; 18(1): 369-372
17. 緒方嘉貴. 赤血球のバイオミメティックテクノロジーとしてのヘモグロビン小胞体の機能設計. *オレオサイエンス* 2001; 1(2): 139-146
18. 後藤 博, 緒方嘉貴, 鈴木一比好, 上谷利治. NRC の製造と量産化の展望. *人工血液* 1995; 3(2): 54-59
19. 武岡真司, 酒井清孝, 西出宏之, 土田英俊, 酒井宏水, 梅津光生. 細胞型酸素輸液の製造工程の確立. 科学研究費 Research Project Number: 12558112, 2000~2001 年 (<http://kaken.nii.ac.jp/d/p/12558112.en.html>, 2013.04.29)
20. テルモ株式会社社内データ
21. 藤井寿一. 赤血球の代謝. 大野仁嗣, 尾崎由基男, 小澤敬也, 金倉 譲, 鈴木宏治, 直江知樹, 中尾眞二, 中原一彦, 平井久丸, 三谷絹子編. 三輪血液病学 第3版. 東京: 文光堂, 2006; 214-220
22. 緒方嘉貴, 岡本 武, 鈴木一比好, 上谷利治. Methemoglobin還元機構を有した人工赤血球 (NRC) の開発 *人工血液* 1994; 2(3): 62-66
23. 筒井洋治, 木村哲寛, 石塚隆伸, 大森伸二, 志澤 隆, 後藤 博, 緒方嘉貴, 金田伸一. ラット hemodilution モデルにおける NRC (Neo Red Cell) の効力持続性評価. *人工血液* 2002; 10(2): 36-41
24. 福井 明, 高折益彦. ネオレッドセルの循環動態, 循環血液量, 並びに酸素消費量維持効果. *人工血液* 1996; 4(4): 98-104.
25. Usuba A, Osuka F, Kimura T, Sato R, Ogata Y, Goto H, Kimura T, Fukui H. Effect of liposome encapsulated-hemoglobin, Neo Red Cells, on hemorrhagic shock. *Surg Today* 1998; 28: 1027-1035
26. Oda T, Nakajima Y, Kimura T, Ogata Y, Fujise Y. Hemodilution with liposome-encapsulated low-oxygen affinity hemoglobin facilitates rapid recovery from ischemic acidosis after cerebral ischemia in rats. *J Artif Organs* 2004; 7: 101-106
27. Pape A, Kertsecho H, Meier J, Horn O, Laout M, Steche M, Lossen M, Theisen A, Zwissler B, Habler O. Improved short-term survival with polyethylene glycol modified hemoglobin liposomes in critical normovolemic anemia. *Intensive Care Med* 2008; 34(8): 1534-43.
28. Nogami Y, Kinoshita M, Takase B, Ogata Y, Saitoh D, Kikuchi M, Ishihara M, Maehara T. Liposome-encapsulated hemoglobin transfusion rescues rats undergoing progressive hemodilution from lethal organ hypoxia without scavenging nitric oxide. *Ann Surg* 2008; 248(2): 310-319.
29. 木下 学, 庄野 聡, 野上弥志郎, 高瀬凡平. 人工血液のオーバービューと出血性ショックへの人工血液の経骨輸血による救命対策. *人工血液* 2008; 16(1): 10-17
30. Kansaku R, Mizuno T, Tatsumi E, Ogata Y, Ishizuka T, Taenaka Y. Oxygen metabolism during cardiopulmonary bypass with hemodilution using liposome-encapsulated hemoglobin in kid goats. *J Artif Organs* 2008; 11: 24-28
31. Ota K, Mizuno T, Tatsumi E, Katagiri N, Taenaka Y, Ishizuka T, Ogata Y, Ujiike Y. Experimental study of a novel method of cardiopulmonary resuscitation using a combination of percutaneous cardiopulmonary support and liposome-encapsulated hemoglobin. *Acta Medica Okayama* 2008; 62(4): 235-239
32. 水野敏秀, 石塚隆伸, 金田伸一, 巽 英介, 妙中義之. 体外循環時におけるリポソーム型人工酸素運搬体 (TRM645) の有用性と安全性に関する研究. *人工血液* 2008; 16(4): 205-220
33. 富樫広子, 佐久間一郎, 掛端 仁, 山口 拓, 尾谷 浩, 緒方嘉貴, 石塚隆伸, 仲井邦彦, 北畠 顕, 吉岡充弘. 虚血—再開通モデルラットにおける脳機能不全の多角的評価と人工酸素運搬体の有効性について. *人工血液* 2004; 12(4): 121-126
34. Kawaguchi AT, Fukumoto D, Haida M, Ogata Y, Yamano M, Tsukada H. Liposome-encapsulated hemoglobin reduces the size of cerebral infarction in the rat: evaluation with photochemically induced thrombosis of the middle cerebral artery. *Stroke* 2007; 38(5): 1626-32.
35. Kawaguchi AT, Kurita D, Furuya H, Yamano M, Ogata Y, Haida M. Liposome-encapsulated hemoglobin alleviates barin edema after permanent occlusion of middle cerebral artery in rats. *Artif Organs* 2009; 33(2): 153-158
36. Fukumoto D, Kawaguchi A T, Haida M, Ymano M, Ogata Y, Tsukada H. Liposome-encapsulated hemoglobin reduce the size of cerebral infarction in rats: effect of oxygen affinity. *Artif Organs* 2009; 33(2): 159-163

37. Kawaguchi AT, Haida M, Yamano M. Liposome-encapsulated hemoglobin ameliorate ischemic stroke in nonhuman primates: an acute study. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 32 (2): 429-436
38. Kakehata J, Yamaguchi T, Togashi H, Sakuma I, Otani H, Morimoto Y, Yoshioka M. Therapeutic potential of an artificial oxygen-carrier, liposome-encapsulated hemoglobin, for ischemia/ reperfusion-induced cerebral dysfunction in rats. *J Pharmacol Sci* 2010; 114: 189-197..
39. Hamadate N, Yamaguchi T, Sugawara A, Togashi H, Izumi T, Yoshida T, Ohmura Y, Yoshioka M. Liposome-Encapsulated Hemoglobin Ameliorates Impairment of Fear Memory and Hippocampal Dysfunction After Cerebral Ischemia in Rats. *J Pharmacol Sci* 2010; 114: 409-419.
40. Armin Schubert, Current Artificial Oxygen Carriers and Their Potential Role in the Management of hemorrhage. *Int TraumaCare* 2008; 18(1): 86-93
41. Creteur J and Vincent JL. Potential Uses of Hemoglobin-based Oxygen Carriers in Critical Care Medicine. *Crit Care Clin* 2009; 25: 311-324
42. Sakai H, Sou K, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Haemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers: present situation and future visions. *J Intern Med* 2007; 263(1): 4-15
43. 織田 禎二. 人工酸素運搬体の脳虚血に対する効果. *人工血液* 2005; 13(3): 112-121
44. Szebeni J, Alving CR, Rosivall L, Bünger R, Baranyi L, Bedöcs P, Tóth M, Barenholz Y. Animal Models of Complement Mediated Hypersensitivity Reactions to Liposomes and Other Lipid-Based Nanoparticles. *J Liposome Res* 2007; 17: 107-117
45. U.S. Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. Draft Guidance for industry: Criteria for safety and efficacy evaluation of oxygen therapeutics as red blood cell substitutes. (<http://www.fda.gov/biologicsbloodvaccines/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/blood/ucm074920.htm>, 2013. 04. 30)
46. 高折益彦. “人工酸素運搬体に関する基本的留意事項 (案)” を解説する. *人工血液* 2005; 13(3): 104-111
47. 無菌操作法による無菌医薬品の製造に関する指針」の改訂について. 厚生労働省医薬食品局・麻薬対策課 事務連絡 (平成 23 年 4 月 20 日)
48. Urakami T, Kawaguchi AT, Akai S, Hatanaka K, Koide H, Shimizu K, Asai T, Fukumoto D, Harada N, Tsukada H, Oku N. In vivo distribution of liposome-encapsulated hemoglobin determined by positron emission tomography. *Artif Organs* 2009; 33(2): 164-168
49. 宗 慶太郎, 小峰 梨沙, 酒井 宏水, 小林 紘一, 土田 英俊, 村田 満. ヘモグロビン小胞体を含む血液検体の臨床検査—デキストラン添加による干渉作用の回避—. *人工血液* 2009; 17(1): 6-15
50. 須崎 裕典, 酒井宏水, 小林直樹, 池田達彦, 堀之内宏久, 小林 紘一, 武田 朴, 戸川 達男, 土田英俊. 多波長パルス分光法を用いた Hb 小胞体用パルスオキシメータに関する研究. *人工血液* 2009; 16(4): 198-204
51. 金田伸一. カプセル型人工酸素運搬体の臨床試験実施に向けた課題. *人工血液* 2008; 16(2): 49
52. 「ナノカプセル型人工酸素運搬体製造プロジェクト」事後評価報告書 (平成 19 年 2 月) 独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 研究評価委員会 (<http://www.nedo.go.jp/content/100096494.pdf>, 2013.07.01)

人工血小板 H12(ADP) リポソームを用いた 急性血小板減少病態への止血・救命対策

Hemostasis and Resuscitation by Transfusion of Platelet-function Enhancer, Nano-particle, H12(ADP)-liposome to Thrombocytopenic Rabbits which Sufferd Liver Injury

西川 可穂子⁽¹⁾, 萩沢 康介⁽²⁾, 柳川 鍊平⁽³⁾, 土井 麻美⁽⁴⁾, 鈴木 英紀⁽⁵⁾,
齋藤 大蔵⁽⁶⁾, 阪本 敏久⁽¹⁾, 武岡 真司⁽⁴⁾, 半田 誠⁽⁷⁾, 木下 学⁽⁸⁾

Kahoko Nishikawa⁽¹⁾, Kohsuke Hagizawa⁽²⁾, Rempei Yanagawa⁽³⁾, Mami Doi⁽⁴⁾, Hidenori Suzuki⁽⁵⁾,
Daizoh Saitoh⁽⁶⁾, Toshihisa Sakamoto⁽¹⁾, Shinji Takeoka⁽⁴⁾, Makoto Handa⁽⁷⁾, Manabu Kinoshita⁽⁸⁾

和文抄録

外傷などによる大量出血に対して大量輸液が行われることが多いが、一方でこれにより血液稀釈と血液凝固障害をきたす場合も少なくない。出血制御が困難な場合に投与される輸血用血小板濃厚液は、保存期間が4日と短く、常時 22℃ の振盪保存が必要であるため、すべての病院で常備するのは難しく、取扱い上の改善が期待されている。そこで、このような点を改善した安全な血小板代替物の開発が急務である。我々は臨床で期待される「止血困難な患者の止血制御」をサポートする機能を持たせた完全合成系のナノ粒子人工血小板 H12 (ADP) リポソームを開発した。血小板減少により止血制御が困難になったウサギ急性易出血性病態モデルを用いて、本製剤の効果を検討した。自己血由来の血小板輸血と同等の止血制御および救命効果を認めた。危惧される血栓の副作用も検出されなかった。今後の製剤化への期待が高まる。また、海外の動向として、米軍の戦闘地域での止血制御対策について触れ、今後の血小板代替物の臨床応用への展望を述べる。

Abstract

Fluid resuscitation after massive hemorrhage in major surgery and trauma may result in extensive hemodilution and coagulopathy. In this case, platelet concentrate is considered the mainstay hemostatic therapy in hospitals. However, platelet concentrate requires tightly controlled settings; temperature control at 22℃ with agitation, and is biological availability for only 4 days. It is not always easy to have platelets ready for hospitals. In order to improve this situation, a new platelet substitute resolving such difficulties, and being safe for patients has been expected. We developed a platelet substitute using nanotechnology, H12(ADP)-liposome, which was designed to augment the aggregation of platelets and enhance the hemostasis at the bleeding site. The efficacy of H12(ADP)-liposome was investigated using thrombocytopenic rabbit of treating liver hemorrhage. Our

(1) 防衛医科大学校救急部 〒359-8513 埼玉県所沢市並木 3-2 Traumatology and Critical Care Medicine, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513, JAPAN.

(2) 同生理学講座 Department of Physiology, National Defense Medical College

(3) 同防衛医学講座 National Defense Medical College, Defense Medicine

(4) 早稲田大学先進理工 Department of Life Science and Medical Bioscience, School of Advanced Science and Engineering, Waseda University, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan.

(5) 日本医科大学形態解析共同研究施設 Division of Morphological and Biomolecular Research, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School, Bunkyo-ku, Tokyo.

(6) 防衛医大外傷部門 Division of Traumatology Research Institute, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama, Japan.

(7) 慶応大学病院輸血・細胞療法部 Department of Transfusion Medicine and Cell Therapy, School of Medicine, Keio University, Shinjuku, Tokyo, Japan.

(8) 防衛医大免疫微生物学講座 Immunology and Microbiology, National Defense Medical College

論文受付 2013 年 6 月 19 日 論文受理 2013 年 6 月 28 日

results indicated that H12(ADP)-liposome had a hemostatic effect and survival rate as well as platelet-rich plasma (PRP) with neither microthrombi nor macrothrombi in some organs. H12(ADP)-liposomes appear to be a safe and effective therapeutic tool for acute thrombocytopenic trauma patients with massive bleeding. In addition, we discussed downsides to platelet products and introduced our vision of platelet substitutes for the future.

Keywords

hemostasis, liver hemorrhage, nanotechnology, platelet substitute, rabbits, thrombocytopenia.

1. はじめに

多発外傷などによる大量出血患者は、循環血液量が大幅に減少することに加え、血小板や凝固因子等の血液凝固に関与する成分も消費、流出してしまうことで、これらが不足した状態となる。大量出血患者への緊急治療対策としては、まず循環動態の安定を目的として大量輸液や輸血が行われるのが一般的である。しかし、大量輸液は循環動態を安定にする作用がある一方で、血液希釈を生じさせる側面もあり、止血制御をより困難にする場合も少なくない^{1, 2)}。臨床現場では、このような病態に対して凝固因子の補充と共に血小板輸血を行うが^{3, 4)}、現在使用されている血小板濃厚液には、感染リスクと取扱い上の不便さといった点に関して改善すべき余地が残されているという印象がある。すなわち、ドナーから提供される輸血用血小板には、感染リスクを最小限に抑えるための措置は施されてはいるものの、感染の可能性を100%無くすることは事実上不可能である。また、細胞の生物学的活性を保つ有効期間が極めて短く(本邦では4日間)、さらに22℃に温度を管理しながら持続的な水平振盪を必要とするなど一般の医療機関では常時備蓄することが事実上困難であると考えられる。したがって、大災害や大規模な事故などで緊急に大量需要が生じた場合は、対応が極

めて難しく極端な欠乏が懸念される^{5, 6)}。それゆえ、血小板製剤におけるこれらの欠点を回避できる新しい血小板代替製剤の開発が急務である。現在までにいくつかの血小板代替製剤が報告されているが、未だに実用化に至っていない。そこで、我々は本邦で止血機能の強化を目的としてデザインされたリン脂質膜小胞体(リポソーム)製剤⁷⁾に注目し、血小板代替製剤としての効果を検討した。また、血小板を含む血液代替物の開発は、米国が戦場における止血救命目的でいち早く開発に着手した歴史を持つ。現在の米軍での止血制御の施策についても触れ、今後の血小板代替物の運用についての展望も述べたい。

2. 人工血小板 H12(ADP) リポソーム製剤の開発

現在まで開発された人工血小板製剤については、既に詳細な報告が幾つかあり、そちらを参照されたい⁸⁾。本稿では、我々が使用している人工血小板製剤 H12(ADP) リポソームについて紹介する。

(1) H12(ADP) リポソームの構造

平均粒子径 250nm のリン脂質膜小胞体でアデノシン三リン酸(ADP)を内包し、その表面にはポリエチレングリコールの残基が修飾されている。そのポリエチレングリコール残基の先端に活性化血小板の GPIIb/IIIa 受容体に特異的に結合するフィブリノゲン γ 鎖カルボキシ末端にある 12 個のアミノ酸配列(⁴⁰⁰HHLGGAKQAGDV⁴¹¹) (H12)^{9, 10)} を共有結合させていることが特徴である(図 1a)。

(2) H12(ADP) リポソームの機能

H12(ADP) リポソームの最も重要な機能は、血中にわずかに残存している血小板を傷害局所で集めて架橋し、血小板血栓を効率よく形成させることで止血作用を増強することにある。これを担う構造が、リン脂質膜表面上のポリエチレングリコール末端に配した H12 である(図 1b)。この H12 は、活性化した

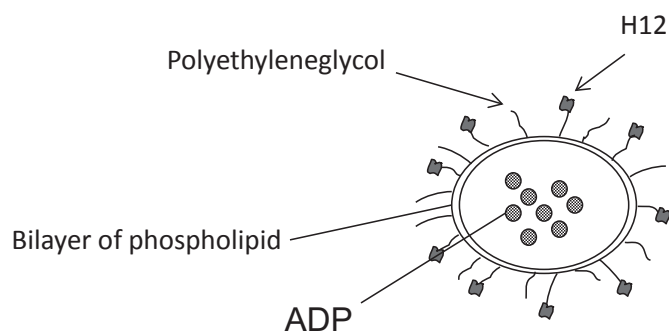


図 1 a. Drug design of H12(ADP) liposome



図 1 b. 人工血小板の止血制御機能

血小板上の GPIIb/IIIa 受容体と特異的に結合し、活性化血小板同士を架橋し集積するが、循環血中を流れる通常の活性化していない血小板とは決して結合しない。加えて、血小板同士の架橋に伴う物理的なストレスにより、生理的な血小板活性化物質である ADP が内包されていたリボソーム内より漏出し、周囲の血小板の活性化を促し、さらに凝集を促進させる仕組みとなっている。

3. 家兎での急性血小板減少病態に続発する臓器易出血モデルにおける止血救命効果の検討

(1) 実験方法

NZW ウサギ (雄) 2.0-2.5kg を使用した。H12(ADP) リボゾー

ムが本来の血小板と同様の止血制御効果を有するかについて検討を行うため、脱血と洗浄赤血球輸血により作製した家兎の急性血小板減少モデルを用いた (図 2)。本モデルは脱血した血液を遠心分離により、PRP 分画、さらに PPP 分画を分離し (図 3)、残った赤血球成分を洗浄した後、Lactated Ringer (5%) で容量が 25mL となるように調整し、これを静脈内投与する。さらに同時に動脈より等量の脱血 (25mL) を行う操作を繰り返すことで作製した。脱血と洗浄赤血球分画輸血操作を合計 8 回繰り返した。これにより血小板数が $50,000/\mu\text{L}$ 以下となったのを確認し、急性血小板減少病態モデルとした。本モデルを使用して、H12(ADP) リボゾーム投与群 (H12(ADP)-liposome/PPP)、PRP 投与群 (PRP)、PPP 投与群 (PPP)、

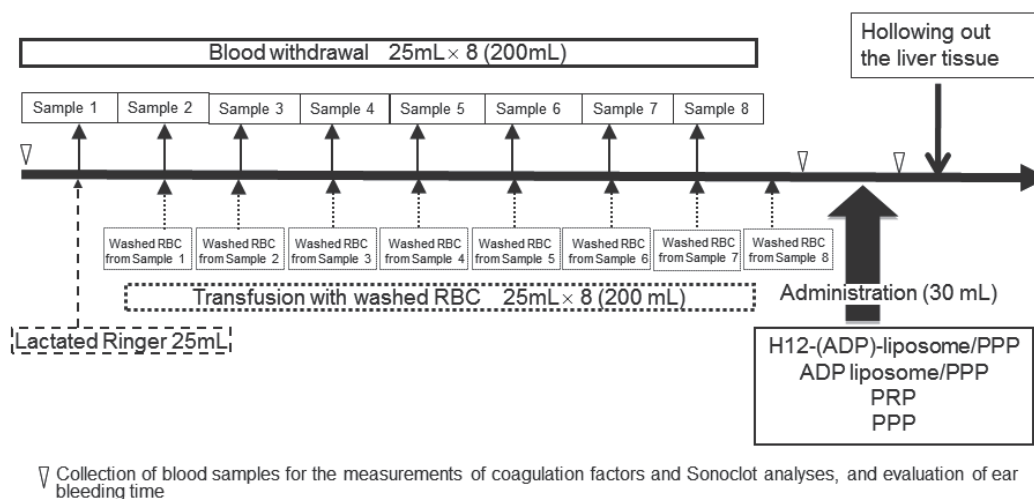


図 2. ウサギ急性血小板減少モデルの作製 脱血-輸液プロトコルと薬物投与

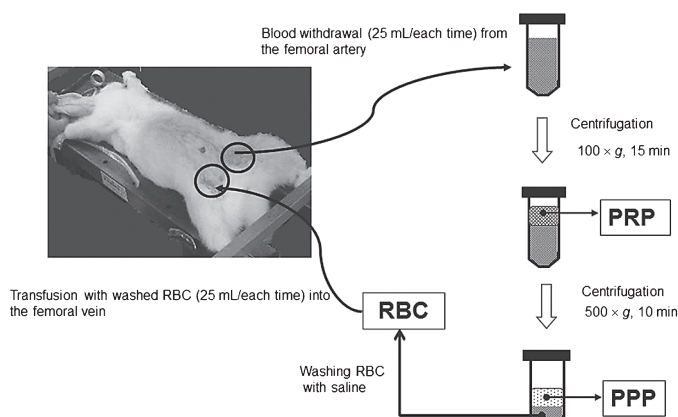


図 3. ウサギからの脱血と輸液スキーム: PRP (platelet rich plasma) と PPP (platelet poor plasma) 画分の分取

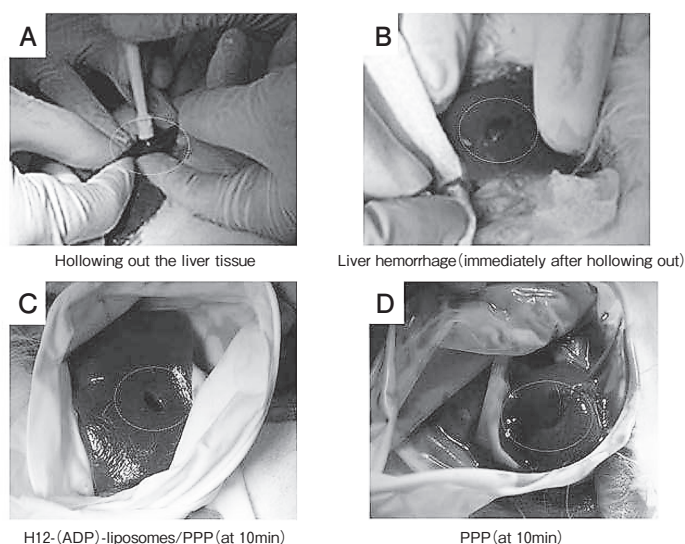


図 4. ウサギ血小板減少症モデルにおける肝損傷。(A) デルマパンチで直径 5mm の円柱状損傷を作製、(B) 肝損傷作製直後、(C) 肝損傷 10 分後の H12(ADP) リボソーム/PPP 投与した肝臓、(D) 肝損傷 10 分後の PPP 投与した肝臓

ADP リポゾーム (H12(ADP) リポゾーム (ADP-liposome/PPP) と同じ組成であるが、リポゾームの外側に fibrinogen γ 鎖 C 末端 (H12) が付加していないリポゾーム) 投与群を設定し、耳介出血時間を測定した後、開腹し、肝臓にデルマパンチ® で直径 5mm の円柱状の組織欠損による臓器損傷を作製し、臓器出血モデルとした (図 4)。臓器損傷作製時より最初の 5 分間の出血量、続く 5 分間の出血量を順次測定した。その後はさらに 10 分間 (損傷作製時より 20 分後まで)、止血の有無を観察した。閉腹後は 72 時間まで予後を観察した。

(2) 結果と考察

本研究では、急性の血小板減少による易出血性病態を家兔で作製し、H12(ADP) リポゾームの止血制御効果について、PRP 投与群、PPP 投与群、ADP リポゾーム群と比較検討を行った。

体重 2kg 前後の家兔の循環血液量にほぼ相当する 200mL の脱血と脱血検体から得られた赤血球成分のみを返却すること

で、血小板数は 50,000/ μ L と低下したものの (図 5 A)、循環動態 (図 5 B) の安定やヘモグロビン濃度を 8g/dL に維持出来るモデルを作製し得た (図 5 C)。また、脱血と輸液を繰り返すことで惹起される可能性がある炎症反応も懸念されたが、白血球数の上昇も認められず、その可能性は低いと考えられた (図 5 D)。本モデルでは、易出血性病態の指標でもある耳介出血時間と 1 次血栓の形成能を反映する active clotting time (CT) の顕著な延長、および 2 次血栓の形成能を反映する clot rate (CR) の顕著な低下が認められ、血栓形成能の増悪が示唆された (図 6 A, B)。しかし、本モデルでは凝固因子も血小板と同様に著明に低下したこと (表 1)、易出血性病態の発現には血小板低下のみならず、凝固因子の低下も関与していることが考えられた。そこで、凝固因子の補充を念頭に H12 (ADP) リポゾームや ADP リポゾームの投与時には PPP も合わせて投与することとした。PPP には血小板成分がほとんど含まれていないことを確認している。このモデルに肝臓損傷を作製したところ、凝固因子のみの補充となる PPP 投与群では、臓器出血の止血が出来ずにほとんどが死亡した (致死率 90%, 図 7)。一方、H12(ADP) リポゾーム投与群では血小板投与の PRP 投与群と同様に全例を救命し得た (図 7)。また、H12 (ADP) リポゾーム投与では肝臓損傷部位からの出血量や止血時間も、PRP 投与と同等で顕著な止血救命効果が認められた (図 8 A, B)。しかしながら、Fibrinogen γ 鎖 C 末端 (H12) が付

表 1. 血液交換前後における凝固因子の変化

	Before blood exchange	After blood exchange
Fibrinogen (mg/dL)	180 $\pm$ 8	52 $\pm$ 2 *
AT III activity (%)	121 $\pm$ 3	41 $\pm$ 2 *
PT (sec)	9.7 $\pm$ 0.2	27 $\pm$ 2 *
APTT (sec)	24 $\pm$ 2	38 $\pm$ 3 *

Coagulation factors were measured in rabbits before and after blood exchange. Data are mean $\pm$ SE from forty rabbits, * p<0.01 vs before blood exchange.

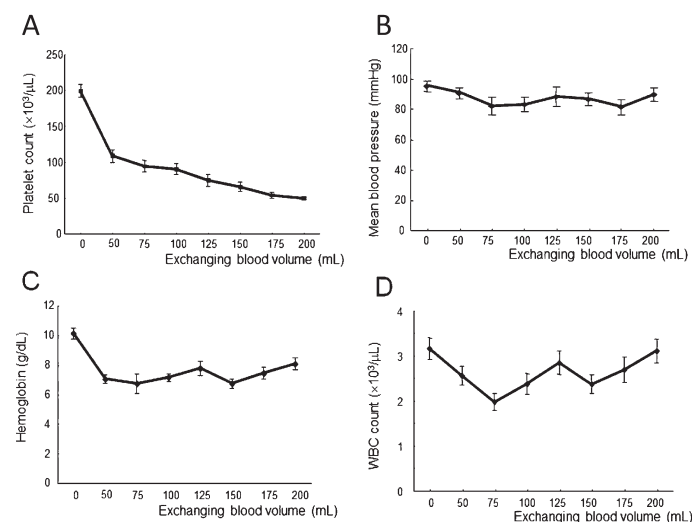


図 5. 血液交換中のパラメーターの変化. (A) 血小板, (B) 動脈血, (C) ヘモグロビン濃度, (D) 白血球数
mean $\pm$ S.E.

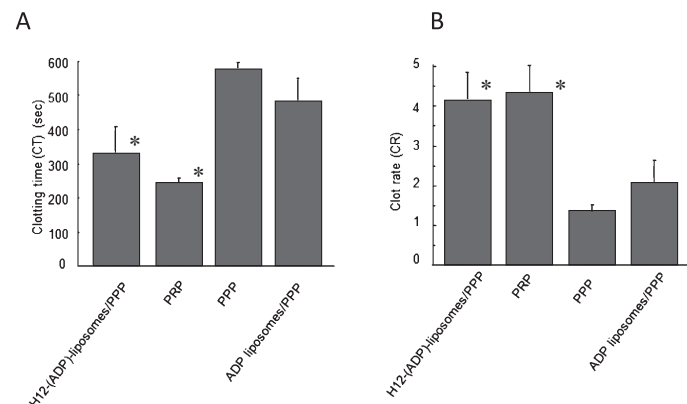


図 6. 全血凝固能. (A) 各輸液投与後の Clotting time (CT), (B) 各輸液投与後の Clot rate (CR)

* P<0.01, +P<0.05 vs. PPP or ADP liposome/PPP mean $\pm$ S.E.

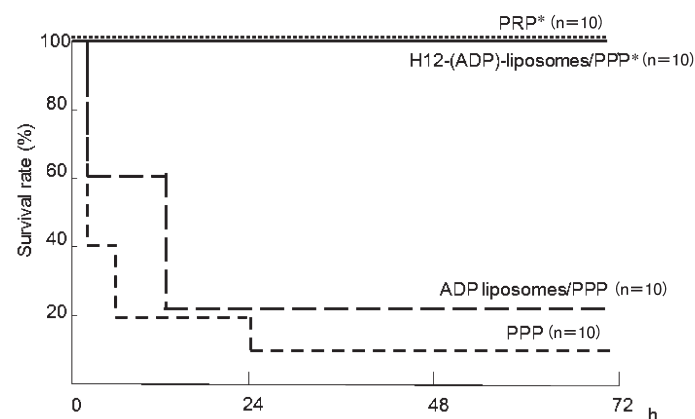


図 7. 救命率

* P<0.01 vs. PPP

加していない ADP リボゾーム投与群では有効な止血制御が認められなかった。これらの結果より、1) PRP 投与による血小板補充が止血制御に顕著に有効に働き救命できることが確認され、2) H12(ADP)リボゾームの特に H12 の部位が活性化血小板同士の架橋を助け、止血制御に重要な役割を果たすことが示唆された。PRP 投与群 (図 9 A) と同様に H12(ADP)リボゾーム投与群の肝損傷部位で血栓が形成されていることや (図 9 C)、H12(ADP)リボゾームが血栓形成部位に存在していることから (図 9 D, E&F)、H12(ADP)リボゾームが有効に出血部位に血小板を集積、血栓形成を促したことが示唆された。また、PRP 投与群と同等に H12(ADP)リボゾーム投与群の 1 次血栓形成能を反映する active clotting time が短縮したことは大変興味深い。PPP 投与によって凝固因子を投与して fibrinogen や AT III 濃度を上昇させても血小板により引き起こされる 1 次血栓が形成されないと、引き続き起こる fibrin による 2 次血栓も形成されないことは、血小板減少時の止血制御を考えるうえで示唆に富む所見である。実際の臨床現場でも血小板減少による易出血性病態を呈する症例では、新鮮凍結血漿によって凝固因子を補充しても血小板を輸血しなければ、止血制御が不可能であることが推察される。また、H12(ADP)リボゾームの止血効果が出血直後から現れるのではなく、ある程度出血した後に顕著に発揮される点も興味深い (図 8 A)。血小

板輸血 (PRP 投与) では、出血直後の止血制御効果は高いが、その後の止血効果は H12(ADP)リボゾームの方がより顕著であった。これは、H12(ADP)リボゾームが直接止血機能を発揮するのではなく、出血部位に集積した血小板を足場に血小板同士を架橋することで、減少した血小板の集積を活性化し、1 次血栓形成を促進したためではないかと考えられる。この作用機序は、出血部位以外では血栓形成が起こらないことを反映するのではないだろうか。病理学的所見でも血栓形成は認められなかった (図 10)。このように現時点では、副作用として最も除外しなければならない血栓症の合併は全く認められていない¹¹⁾。

(3) 結論

人工血小板 H12(ADP)リボゾームは、家兎急性血小板減少症モデルにおける致死性の肝臓出血に対して、出血作製前投与ではあるが血小板輸血と同等の顕著な止血救命効果を有することが明らかになった。引き続き、臨床現場を想定し、外傷直後の本剤投与による止血救命効果の検討を現在行っている。

4. 戦場での止血凝固管理

最近のイラク、アフガンでの戦闘地域で亡くなる米国の兵士の約 50% は外傷による出血死であったとされる。そのため、戦闘地域での外傷出血に対する実践的でかつ有効な止血対策が常に精査研究され、改良されている。米国防総省が行っている“The armed services blood program”による広報誌¹²⁾ (2012 年 4 月) では、活動報告をすると共に一般市民を含めた多くの人々に献血を呼びかけている。実際の活動に基づいた記載も豊富で、兵士が戦場で外傷を負った際の止血対策の詳細についても掲載されており、参考となる。本稿では、これに基づき米軍の戦場での外傷出血に対する方策、特に止血制御に重要な血小板輸血をどのようにおこなっているかを一部紹介する。

(1) 戦場での外傷処置の方策

戦場での外傷処置も、一般の臨床現場で行われている処置と基本的には同じである。外傷の第一処置は、まず外傷損傷部位の止血である。外傷部位に直接あてて出血を止める止血剤を塗布した止血帯や外傷表面に振り掛けると止血を促す表面止血剤が開発され、これを兵士が携帯をしている。外傷を受けたら、まず身の安全を確保した後に、直ちに携帯しているこれらの装備品で止血を行う。止血が不十分な場合に、第二の処置として、血管容積と凝固機能の回復のため、血液成分 (血漿、クリオプレシピテート、赤血球、血小板) 輸血または、新鮮血輸血を行う。これは、最前線より少し後方に下がった医療救護ができる後方医療部隊で行われる処置である。更に将来の目標としてではあるが、状態によっては酸素運搬能を持つ人工酸素運搬体を投与し、生命予後改善の処置を行うことも想定されているようである。

(2) 使用されている血小板製剤と使用実績

第二次世界大戦時には、重症外傷を負った兵士の 22% が死

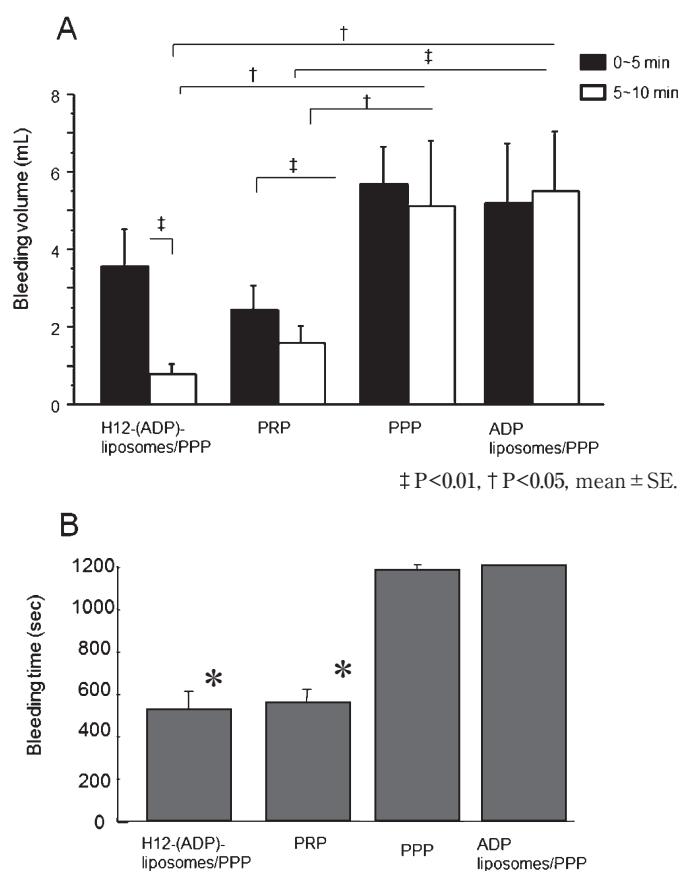


図 8. 出血量 (A) と止血時間 (B)
* P<0.01 vs. PPP, ADP liposome/PPP

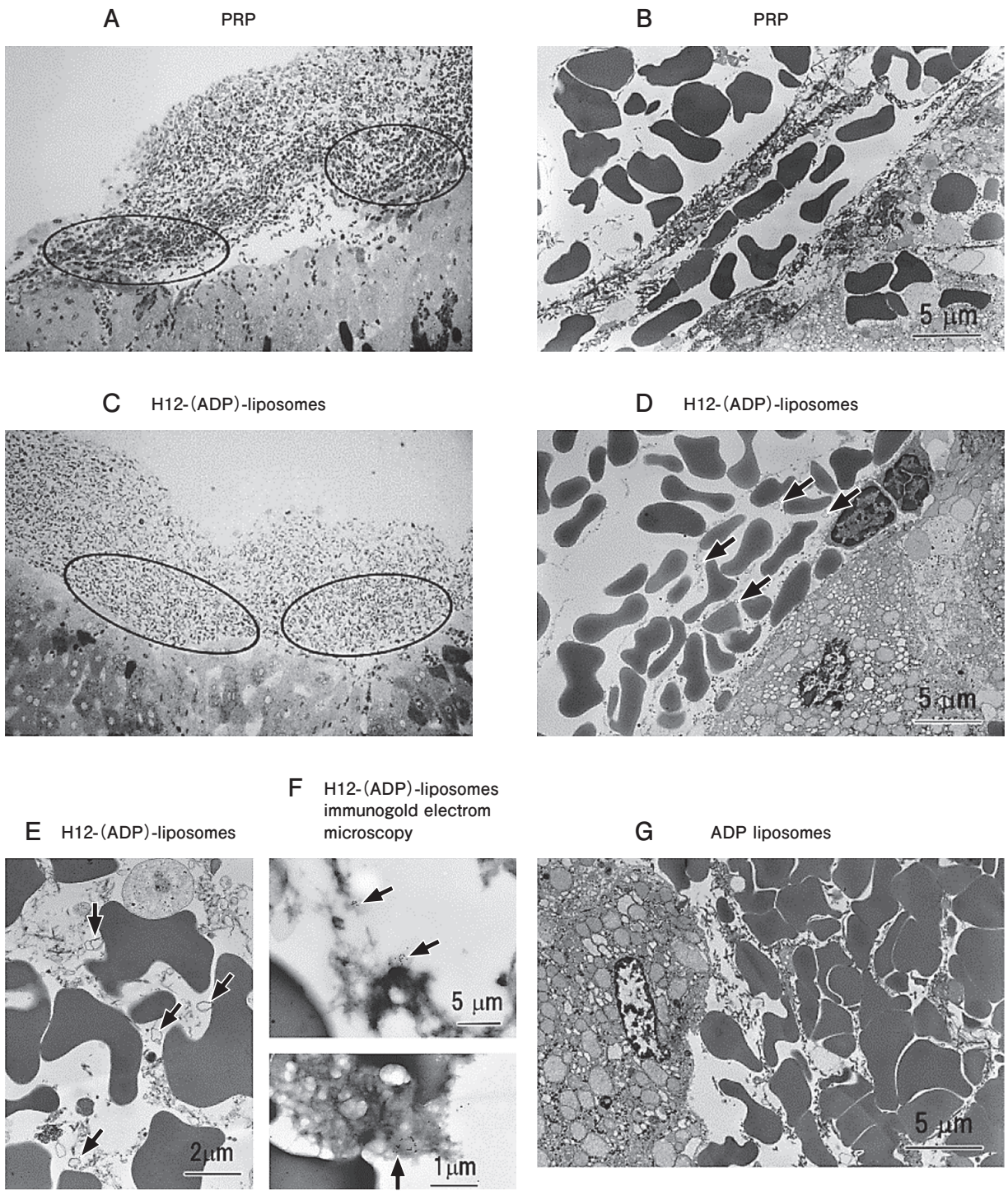


図9. 肝損傷部位の顕微鏡観察. PRP 投与後の顕微鏡写真(A)と透過型電子顕微鏡写真(TEM)(B). H12(ADP)リボソーム投与後の顕微鏡写真(C)と TEM(D, E). H12(ADP)リボソーム免疫電子顕微鏡写真(F). ADP リボソーム投与後の TEM(G). Arrow head(図 D, E) ; H12(ADP)リボソーム, Arrows(図 F) ; H12 標識部位

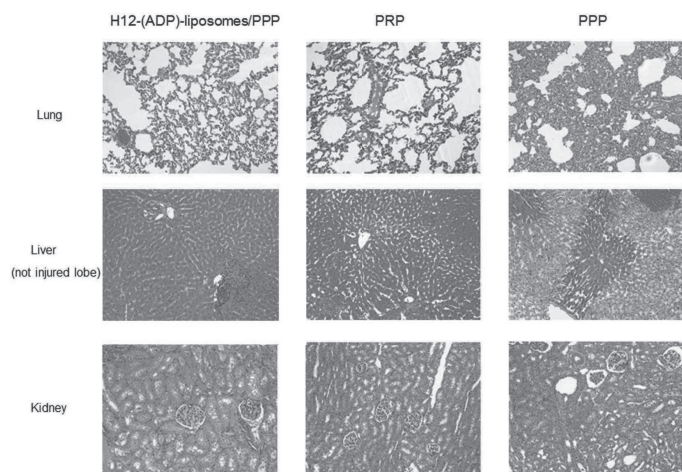


図 10. 肺，肝臓および腎臓の病理学的所見

に至っていたが，現在では9%にとどまっている．その背景として，血液供給システムの整備，血液製剤輸送のための容器改良など輸送技術の発達によって血液製剤の品質維持が向上した事に加え，血液製剤そのものの品質改良も治療成績向上の重要な要因の1つと考えられている．戦場で使用する血液製剤は，使用する状況や場所によって大まかに3つに分類（Level 1-3）されている（表2）^{13）}．血液製剤の中でも血小板を含む製剤（platelet-derived systemic agents）に注目すると，現在使用されているものは以下の3つである．

1. 新鮮全血（血小板を含む）・・・Level 2b and 3
2. 血小板成分輸血・・・Level 3：2005年バグダット（イラク），2007年アフガニスタンで使用実績がある．
3. 凍結血小板 Cryopreserved (frozen) platelets (CPP)：北大西洋条約機構での作戦の一環として派遣されたバルカンとアフガニスタンで使用された．これらは，オランダ軍配備によるCPPを血漿成分で調整して使用した．米国では食品医薬品局（FDA）による承認をまだ受けていない．

上記にあげた3つの血小板製剤の他に凍結乾燥血小板（Lyophilized Platelets）も製品化されたものがある（Thrombosomes™: Cellphire, Inc, Stasix™; Entegriion, Inc）が，効果が不確かと評価されており，使用実績は報告されていない．重症外傷を負った兵士への血小板製剤の投与は，実際にはLevel 2b以上での適用となる．イラク・アフガニスタンでの戦闘経験から，まず新鮮な凍結血漿を輸血するが，最も救命効果が高かった輸血は，pRBC (packed red blood cell): FFP (fresh frozen plasma): platelets の混合輸血であった．pRBCは酸素を運搬し，FFPは凝固因子を供給し，plateletsは血液凝固を促進するが，その割合は，1:1:1が良いとされる．

(3) 現状の血小板製剤の問題と期待される新しい血小板製剤の姿

米軍が使用している血小板製剤にも，本邦で抱えているもの

表 2. 戦場における血液製剤の適用*

Level	使用場所	血液製剤
1	Combat medic and battalion aid station（最前線）	None
2a	Medical company（衛生中隊：応急処置）	・ Type O pRBC
2b	Forward surgical team/ forward resuscitative surgical suite（医療部隊：初期外科治療）	・ Type O pRBC ・ Thawed plasma ・ Untested fresh whole blood
3	Combat support hospital（野戦病院：外科治療）	・ Type-specific pRBC ・ FFP ・ Thawed plasma ・ Untested fresh whole blood and apheresis platelets
4/5	OCONUS/ major medical centers（後方病院）	・ All approved products

* 資料 13 の情報から作成した．

と共通の問題点が存在する．新鮮全血は戦闘地域にドナーの存在が必要であるし，血小板成分は有効期限が短く，保存等の条件が厳しいことから，遠路にある炎天下の前線へ供給することは難しく，品質維持にコストと労力が必要である．一方，オランダ軍が供給するCPPは， -65°C で2年間， -20°C であれば4週間以上保存が可能であるという点で従来のものよりも優れている．外科的手術（心臓バイパス）における無作為前向き研究の結果では，CPP使用のほうが，血小板濃厚液使用に比べ，出血量や術後に必要となる輸血が少ないと報告されており^{14）}，止血制御能も高く評価されている．しかし，CPPを使用するにはイラク等の地域でも -20°C を保つ設備が必要となる他，使用前の解凍にも十分な注意が必要であり，運用の面での垣根は低いとは言いがたい．とくに緊急事態が想定されるCPP使用現場では，煩雑な解凍作業はその使用を事実上不可能であると考えさせる程の欠点との印象を受ける．この種の薬剤は，現場で簡便に使用出来るものでないと，ユーザーの信頼を勝ち得ないものである．また，上記3つの血液製剤は，ドナーから供給されるものである以上，感染リスクを現状ではゼロにすることはできない．米軍で血液製剤開発に携わっているマクドナルド博士は2012年の年頭挨拶で，「我々のゴールは，室温保存が可能で容易に運べ，すぐに効果がでる感染のない万能な血液製品を持つことである．」と述べている．これは戦闘地域のみならず，一般の臨床でも必要とされる理想の血液製剤を端的に表している．我々が検討している人工血小板 H12(ADP) リポソームは，室温保存が6か月可能，容易に運べ，ナノ粒子であるため常に均一な溶液状態である．このため，解凍などの手間が不要ですぐに使用可能である．止血作用を持ち，100%人工物であるために感染リスクがない．従って，理想的な血小板製剤として必要とされる条件のいくつかを既にクリアしており，今後の実用

化が強く期待される。今後は、懸念される血栓症や副作用がないことをさらに徹底的に検証し、pRBC、FFP などとの混合輸液としての投与や臨床現場での効果的な適用の検討などの知見を蓄積し、臨床応用への可能性を広げていきたいと考える。

参考文献

1. Gonzalez EA, Moore FA, Holcomb JB, Miller CC, Kozar RA, Todd SR, et al. Fresh frozen plasma should be given earlier to patients requiring massive transfusion. *J Trauma*. 2007; 62(1): 112-9.
2. Ho AM, Karmakar MK, Dion PW. Are we giving enough coagulation factors during major trauma resuscitation? *Am J Surg*. 2005; 190(3): 479-84.
3. Cinat ME, Wallace WC, Nastanski F, West J, Sloan S, Ocariz J, et al. Improved survival following massive transfusion in patients who have undergone trauma. *Arch Surg*. 1999; 134(9): 964-8; discussion 8-70.
4. Johansson PI, Stensballe J, Rosenberg I, Hilslov TL, Jorgensen L, Secher NH. Proactive administration of platelets and plasma for patients with a ruptured abdominal aortic aneurysm: evaluating a change in transfusion practice. *Transfusion*. 2007; 47(4): 593-8.
5. Blajchman MA. Substitutes for success. *Nat Med*. 1999; 5(1): 17-8.
6. Vamvakas EC. Risk-reduction strategies for platelet transfusion in the United States. *Sci World J*. 11: 624-40.
7. Takeoka S, Okamura Y, Teramura Y, Watanabe N, Suzuki H, Tsuchida E, et al. Function of fibrinogen gamma-chain dodecapeptide-conjugated latex beads under flow. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 312(3): 773-9.
8. 半田誠. 人工血小板. *anesthesia 21 century* 2009; 11(3-35): 43-18.
9. Andrieux A, Hudry-Clergeon G, Ryckewaert JJ, Chapel A, Ginsberg MH, Plow EF, et al. Amino acid sequences in fibrinogen mediating its interaction with its platelet receptor, GPIIb/IIIa. *J Biol Chem*. 1989; 264(16): 9258-65.
10. Weisel JW, Nagaswami C, Vilaire G, Bennett JS. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J Biol Chem*. 1992; 267(23): 16637-43.
11. Nishikawa K, HAGISAWA K, KINOSHITA M, KATSUNO S, DOI M, YANAGAWA R, et al. Fibrinogen γ -chain peptide-coated, ADP-encapsulated liposomes rescue thrombocytopenic rabbits from non-compressible liver hemorrhage. *J. Thromb Haemost*. 2012; 10(10)2137-48.
12. Armed Services Blood Program (ASBP). as of April 2012. URL; http://www.militaryblood.dod.mil/articleArchive/PressKit_04_01_13.pdf
13. VICTOR W, Cryopreserved Platelets (CPP) ATACCC 2009. URL; <https://ccc.amedd.army.mil/conferences/2009/blood/B12.pdf>
14. Khuri SF, Healey N, MacGregor H, Barnard MR, Szymanski IO, Birjiniuk V, et al. Comparison of the effects of transfusions of cryopreserved and liquid-preserved platelets on hemostasis and blood loss after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1999; 117(1): 172-83; discussion 83-4.

日本血液代替物学会 総会

1. 日 時：
平成24年10月25日（木）13：10～
2. 場 所：
旭川市大雪クリスタルホール（大会議室）
〒070-8003 北海道旭川市神楽3条7丁目
3. 議 題：① 第19回年次大会の報告
② 会員動向
③ 平成23年度事業報告
④ 平成23年度会計報告
⑤ 平成24年度事業計画（経過報告）

以下審議内容を略記します。

①年次大会の開催状況として下記事項が報告された。

- 1) 事業名 第19回日本血液代替物学会年次大会
（大会長 東 寛）
- 2) 開催年月日 平成24年10月25日（木）・26日（金）
- 3) 開催場所 旭川市神楽3条7丁目 旭川市大雪クリスタルホール
- 4) 参加範囲 日本血液代替物学会会員、臨床医学・理工学研究、国内の大学および医療機関臨床医、血液センター関係者

②会員状況は以下の通り

- 1) 維持会員：1社
- 2) 賛助会員：1社
- 3) 正会員：111名
- 4) 購読会員：11箇所

③平成23年度事業報告（平成23年4月1日～平成24年3月31日） が行なわれ各々承認された。

- 1) 定期総会の開催
平成23年10月27日（木） 北海道大学医学部学友会館フラテにて開催。
- 2) 第18回年次大会の開催（大会長 米川元樹）
平成23年10月27日（木）・28日（金） 於 北海道大学医学部学友会館フラテ
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第19巻1号、2号

④平成23年度収支決算報告が行なわれ承認された。

平成23年度会計 収支決算
（自 平成23年4月1日 至 平成24年3月31日）

収 入		支 出	
摘 要	金 額	摘 要	金 額
前期繰越金	6,501,583	会誌出版費	1,651,390
正会員会費	350,000	集会・委員会費	1,270,495
入会金	0	年会補助金	2,000,420
維持会員会費	8,000,000	ホームページ維持費	223,650
賛助会員会費	※0	事務人件費	2,001,050
購読会員会費	30,000	事務費	267,368
学生会員会費	0	国際学会表彰賞金	81,170
雑収入	14,430	次期繰越金	7,403,935
利息	3,465		
計	14,899,478	計	14,899,478

※賛助会員からの平成23年度年会費（200,000円）の振込が、平成24年4月10日であったため、平成24年度会計に組み込むこととする。

⑤平成24年度事業（経過報告）

- 1) 定期総会の開催
平成24年10月25日（木）13：10～
於 旭川市大雪クリスタルホール（大会議室）
- 2) 第19回年次大会の開催（大会長：東 寛）
平成24年10月25日（木）・26日（金）
於 旭川市神楽3条7丁目 旭川市大雪クリスタルホール
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第19巻3号、第20巻1号、2号

会誌「人工血液」刊行数の変更についてのお知らせ：

これまで、年間の刊行数は3～4回でしたが、今年度より年間の刊行数を1回とさせて頂きます。会員の皆様には何卒ご理解を頂きたく宜しく御願い申し上げます。

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 武岡 真司 殿

To: Dr. Shinji Takeoka

President

The Society of Blood Substitutes, Japan

日本血液代替物学会 会誌「人工血液」に投稿した論文

表題

Manuscript Title:

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

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

平成 年 月 日

Date:

代表著者（署名）

Corresponding Author (Signature) _____

連絡先

Contact Address:

（本用紙はコピーしたものを使用されても結構です。）

This form may be photocopied for use.

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

Artificial Blood Editorial Office
The Society of Blood Substitutes, Japan
Department of Chemistry Nara Medical University
840 Shijo-cho, Kashihara Nara 634-8521, Japan
E-mail : artifical-blood@naramed-u.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 Nov. 20, 2013)

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

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

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

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

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

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

ii) Submission by post of four sets of hardcopies.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

12) References should be cited numerically in order of appearance in the text using superscript letters as follows: ²⁾, ³⁻⁵⁾, ^{1, 4-6)}, etc. References should be listed using the Vancouver style as follows: Names of all authors. Title of paper. Title of journal. Year of publication; volume number: inclusive page numbers. Abbreviations of journal names should be in accordance with *Index Medicus*. References to books should be given as follows: Names of all authors. Title of paper. Name of editor(s). Book title. Place of publication: Publisher, year; inclusive page numbers.

References to electronic sources should be given as follows:

Name of website.

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

Examples:

1. Wong NS, Chang TM. Polyhemoglobin-fibrinogen: a novel oxygen carrier with platelet-like properties in a hemodiluted setting. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007; 35: 481-489.
2. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *J Am Med Assoc* 2008; 299: 2304-2312.
3. Sakai H, Sou K, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin vesicles as a Molecular Assembly. Characteristics of Preparation Process and Performances of Artificial Oxygen Carriers. In: Winslow RM, ed. *Blood Substitutes*. London: Academic Press (Elsevier), 2006; 514-522.
4. Department of Chemistry, Nara Medical University, Japan. http://www.naramed-u.ac.jp/~chem/ENGLISH_PAGE/e_invest_blood.html (last accessed Nov. 2013)

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

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

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

16) Address for manuscripts to be sent:

Prof Hiromi Sakai

Editor of Artificial Blood

Department of Chemistry

Nara Medical University

840 Shijo-cho, Kashihara Nara 634-8521, Japan

E-mail : artificial-blood@naramed-u.ac.jp

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

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

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

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

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

ii) ハードコピー4部を郵送する。

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

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

4) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著

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

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

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

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

8) 論文中の略語は初出の際に省略しないこと。薬品、医薬品、測定装置等は、外国語名の場合は言語のまま用い、日本語化しているものはカタカナとする。型式、販売（製造）元とその所在地も記入すること。

（例）Rhodamine B (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), ポリグラフィシステム (LEG-1000; 日本光電工業, 東京)

9) 句読点はコンマ（,）ピリオド（.）とする。

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

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

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

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

(例)

1. 高折益彦. 人工酸素運搬体:その将来への期待. 人工血液 2007;15:90-98.
2. 橋本正晴. 単回投与毒性試験. 野村 護, 堀井郁夫, 吉田武美 編. 非臨床試験マニュアル. 東京: エルアイシー, 2001;37-48.
3. Wong NS, Chang TM. Polyhemoglobin-fibrinogen: a novel oxygen carrier with platelet-like properties in a hemodiluted setting. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 2007; 35: 481-489.
4. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. J Am Med Assoc 2008; 299: 2304-2312.
4. Sakai H, Sou K, Takeoka S, Kobayashi K, Tsuchida E. Hemoglobin vesicles as a Molecular Assembly. Characteristics of Preparation Process and Performances or Artificial Oxygen Carriers. In: Winslow RM, ed. Blood Substitutes. London: Academic Press (Elsevier), 2006; 514-522.
5. Department of Chemistry, Nara Medical University, Japan. http://www.naramed-u.ac.jp/~chem/ENGLISH_PAGE/e_invest_blood.html (last accessed Nov. 2013)

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

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

- a) すでに掲載された論文であること.
- b) 著者は両方の雑誌の編集者より許可を得ていること. 二

次掲載する編集者に最初に掲載されたもののコピー, 別刷, もしくは原稿のいずれかを添付すること.

- c) 論旨を変えないこと. 執筆者は同一(順不同)であること.
- d) 二次掲載版のタイトル・ページに掲載される脚注には, その論文の全体もしくは一部分がすでに掲載されている旨を明記し, 更に初出文献も示すこと. 適切な脚注の例を以下に示す. 「This article is based on a study first reported in the [...]雑誌タイトル(完全な典拠情報を添えたもの) [...]」(訳: この論文記事は, [...] に最初に報告された研究に基づくものである)」.

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

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

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

18) 原稿の送付先

〒634-8521

奈良県橿原市四条町840

奈良県立医科大学化学教室内

「人工血液」編集委員長 酒井宏水 宛

E-mail: artificial-blood@naramed-u.ac.jp

M E M O

[illegible]

WAKENYAKU CO., LTD.

ホームページをリニューアル致しました。

キャンペーン情報・研究支援情報 etc
情報満載です。是非アクセスしてください。

和研薬株式会社



関西一円をカバーする拠
点を持ち、様々な研究分
野の試薬・理化学機器の
販売を致します。
豊富な実績と経験を備
えたスタッフがお客様の
ニーズにお答え致します。

皆様に最新の情報提供と
お役に立つツール
そして、信頼される和研薬を目指しております

ワケングループ各社のHPもリニューアルしております。
グループTopページより和研薬へアクセス!!!

こちらから→



HPへアクセス!



技術と信頼でライフサイエンスの明日を担う

和研薬株式会社
WAKENYAKU CO., LTD.

本社営業部 〒606-8171 京都市左京区一乗寺西水干町17番地
TEL(075)721-8111/FAX(075)721-8189
京阪営業部 〒610-0343 京都府京田辺市大住池ノ邊6番地5
TEL(0774)65-2521/FAX(0774)65-2557
滋賀営業部 〒525-0029 滋賀県草津市下笠町945番地1
TEL(077)568-2481/FAX(077)568-2410

神戸営業部 〒650-0047 兵庫県神戸市中央区港島南町5丁目2番5
TEL(078)306-6060/FAX(078)306-6070
大阪営業部 〒562-0035 大阪府箕面市船場東1丁目12-8
TEL(072)749-5200/FAX(072)749-5230

<http://www.wakenhd.co.jp>

バイオテクノロジー・ライフサイエンス製品の総合商社

キャンペーン情報

毎日、各社メーカーキャンペーン情報を更新中!
ここから全てのキャンペーン情報が検索できます。

和研薬株式会社
機器総覧Web 2012-2013

予算申請の際、機器の価格がすぐ知りたい!
カテゴリーから予算にあった機材を探したい!
ここから検索できます。

取り扱いメーカー一覧

弊社が販売しております、各社メーカーのH
Pリンク集です。ライフサイエンスのメーカー
HP集約の集大成!!! 掲載の無いメーカーも
是非お問い合わせください。

製品ブランド一覧

このブランドの製品は日本ではどこの販売元が
取り扱っているのか? 留学先で使用していたあの
ブランド製品は日本でも購入できるのか? .
あらゆるメーカーのブランド一覧を網羅し、掲載
しております。

研究支援リンク集

研究に役立つ情報リンク集です。お役にたつリン
ク先を常に探して更新! ご要望ございましたら弊
社まで



編集委員

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

日本血液代替物学会 会誌

■発行 日本血液代替物学会

■編集・制作「人工血液」編集委員会

■印刷 株式会社 研恒社

人工血液 vol.21(1) 2013年11月20日発行

〒162-8480 東京都新宿区若松町2-2 Twins 2F

早稲田大学先進理工学部生命医科学専攻

生体分子集合科学／ナノ医工学研究室内

TEL & FAX (03) 5369-7324

〒634-8521 奈良県橿原市四条町840

奈良県立医科大学化学教室内

TEL & FAX (0744) 29-8810

〒102-0073 東京都千代田区九段北1-1-7

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