

人工血液

VOLUME 22
NUMBER 1
2014

日本血液代替物学会 会誌

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



第21回年次大会プログラム

総説:わが国の血友病止血治療薬の進歩と展望

トピックス:

脳虚血再灌流傷害に対するLiposome-Encapsulated Hemoglobinの経動脈的投与による治療戦略

事務局より

The 21st Annual Meeting Program

Review:

Recent Progress and Perspectives of Hemostatic Therapeutics in Patients with Hemophilia in Japan

Topics:

Therapeutic Strategy against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Using Trans-Arterial Administration of Liposome-Encapsulated Hemoglobin

Artificial Blood

The Society of Blood Substitutes, Japan

JASCO Corporation

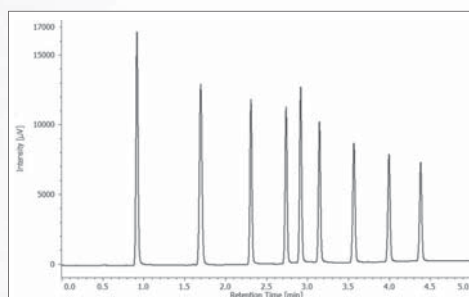
New Concept!!

EXTREMA

RHPLC ラピッドセパレーションシステム

新たな高速分離システムの誕生!!

EXTREMA ラピッドセパレーションシステムは、粒子径 5 ~ 10 μ m のコンベンショナル HPLC カラムから、粒子径 2 ~ 3 μ m 充填剤やコアシェル充填剤カラムまで使用可能な HPLC システムです。
次世代の主流になると予想される「RHPLC」を実現する「耐圧性能」「高感度」「高精度」「高速応答」を兼ね備えたハードウェア性能をリーズナブルな価格で実現しています。



ラピッドセパレーションクロマトグラフィー (RHPLC) システムによる分析例

移動相: A: Water, B: Acetonitrile リニアグラジエント
流 速: 0.8mL/min
カラム: Unifinepak C18 (3.0mm I.D. x 100mm, 1.9 μ m)
カラム温度: 40 $^{\circ}$ C
検出波長: 254nm
サンプル: アルキルフェノン類 9 成分



Debut

LC System/ 高速液体クロマトグラフ

EXTREMA

日本分光の最新情報はここから <http://www.jasco.co.jp>

光と技術で未来を見つめる

日本分光

日本分光株式会社

〒192-8537 東京都八王子市石川町 2967-5
TEL 042(646)4111 代
FAX 042(646)4120

北海道S-C 011(741)5285
北日本S-C 022(748)1040
筑波S-C 029(857)5721
東京S-C 03(3294)0341
西東京S-C 042(646)7001

神奈川S-C 045(989)1711
名古屋S-C 052(452)2671
大阪S-C 06(6312)9173
広島S-C 082(238)4011
九州S-C 092(588)1931

ISO 9001 ISO 14001



CMS EMS
JIS Q 9001 JIS Q 14001
JIS Q 2999 JIS A 024
本社・工場

JASCO

JASCO は日本分光株式会社の登録商標です。
本広告に記載されている装置の外観および各仕様は、
改善のため予告なく変更することがあります。

人工血液

第22巻 第1号 2014年11月

第21回年次大会プログラム

大会長挨拶	3
お知らせとお願い	4
大会日程表	6
交通案内図	7
プログラム	8
抄録	10

総説 わが国の血友病止血治療薬の進歩と展望

..... 吉岡 章 38

トピックス 脳虚血再灌流傷害に対する Liposome-Encapsulated Hemoglobin の経動脈的投与による治療戦略

..... 鎌谷 武雄 他 43

事務局たより

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 22 No. 1 November, 2014

The 21st Annual Meeting Program

Address from the President	3
Information	4
Schedule	6
Venue and Access	7
Program	8
Abstracts	10

Review : Recent Progress and Perspectives of Hemostatic Therapeutics in Patients with Hemophilia in Japan

..... Akira Yoshioka 38

Topics : Therapeutic Strategy against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Using Trans-Arterial Administration of Liposome-Encapsulated Hemoglobin

..... Takeo Abumiya, et al. 43

第21回日本血液代替物学会年次大会

The 21st Annual Meeting of the Society of Blood Substitutes, Japan

「血液代替物（人工血液）開発の新戦略」

大会長：小松晃之（中央大学理工学部 応用化学科 教授）

会 期：平成26年12月 8 日（月）、 9 日（火）

会 場：中央大学理工学部（後樂園キャンパス） 3 号館 3 階小ホール
（東京都文京区春日1-13-27）

【年次大会事務局】

中央大学理工学部 応用化学科 小松研究室内

〒 112-8551 東京都文京区春日1-13-27

Tel & Fax : 03-3817-1910

e-mail : sbsj21@tamacc.chuo-u.ac.jp

大会長挨拶

この度、中央大学理工学部（後楽園キャンパス）において、第21回日本血液代替物学会年次大会を開催させて頂くこととなりました。日本血液代替物学会は、昨年設立20周年を迎え、記念大会を奈良で成功裏に実施致しました。今年は第21回、つまり次のステージへの新たな一歩を踏み出す重要な大会となります。

現在日本では、輸血用血液の85%が50歳以上の患者さんに使用されています。今後少子高齢化が進み、輸血を必要とする高齢者の数が増え続け、献血者層（若年層）人口が減少すると、13年後の2027年には“年間100万人分の血液が不足する”と予測されています（日本赤十字社推計、政府広報）。さらに先の大震災以降、危機管理の主要施策として血液代替物の実現がますます強く望まれる状況になってきました。

我国における人工赤血球の開発は、安全性と有効性の確認されたヘモグロビン小胞体が臨床試験体制の確立を急ぐ段階にきています。人工血小板の開発は、H12-(ADP)リボソームの非臨床データが着実に蓄積されています。そのような時期に少し視野を広げ、新しい応用／物質／技術を積極的に提案・議論することは、次の扉を開く重要な鍵となるのではないのでしょうか。そこで本大会は、主題を『血液代替物（人工血液）開発の新戦略』とし、人工血液の用途展開のさらなる拡充、新しい化合物の可能性にも焦点をあてながら、血液代替物研究の裾野を広げる企画を盛り込みました。産官学の研究者・医師たちが横断的に実用化の具体策や次世代物質に関する意見交換を行うことにより、これまでとは少し違った切り口から血液代替物の最新動向と今後を展望したいと思います。是非皆様方の活発な討論により、本大会が実り多きものになるよう願っております。

第21回日本血液代替物学会年次大会
大会長 小松 晃之
(中央大学理工学部 応用化学科 教授)

お知らせとお願い

■会員・参加者の皆様へ

●会場

中央大学理工学部（後楽園キャンパス）3号館3階小ホール（東京都文京区春日1-13-27）

●受付

平成26年12月8日（月）AM8:30より

平成26年12月9日（火）AM8:30より

クロークは受付と同じフロア（3階）にあります。

●参加登録

一般：10,000円，学生：3,000円

事前参加登録は行いませんが、本年次大会ホームページ（<http://www.blood-sub.jp/kaikoku.php>）より参加申込書（pdfファイル）をあらかじめダウンロード、印刷して頂き、必要事項を御記入の上、当日年次大会受付にお持ちください。

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

●入会受付

受付にて日本血液代替物学会の入会手続きも行っております。会費は、正会員10,000円，購読会員6,000円，学生会員5,000円です。

●年次大会予稿集

第21回年次大会の予稿集（会誌「人工血液」2014年号に含まれる）は、発表者の方には事前送付させて頂いております。当日はお忘れなくお持ちください。また、年次大会受付にて一部1,500円で販売しております。

●懇親会について

懇親会を開催いたします。ふるってご参加ください。

参加費：2,000円

（年次大会受付にて、参加登録費と一緒に現金でお支払い下さい。）

日 時：平成26年12月8日（月）17:45頃より

会 場：中央大学理工学部（後楽園キャンパス）3号館10階31008室（同じ建物の10階）

■発表者の皆様へ

●発表時間

基調講演，特別講演，トピックス，海外招待講演	45分
教育講演	40分
大会長講演	30分
シンポジウム講演	発表15分+討論4分（交代1分）
計	20分
一般演題	発表10分+討論4分（交代1分）
計	15分

発表は時間厳守をお願いいたします。

発表と討論における使用言語は日本語または英語とします。

■発表者へのお願い

1. 発表形式は、液晶プロジェクターを用いたプレゼンテーションのみとします。発表内容は、PowerPoint等のプレゼンテーションソフトを使用して御用意ください。OHPは準備していません。
2. 発表時に使用するパーソナルコンピューター（PC）は各自で御準備ください。発表者は、事前の休憩時間に御自分のPC

を指定された端末に接続し、液晶プロジェクターから問題なく投影されることを必ず確認願います。

3. 念のため事務局で PC (Windows 7, PowerPoint2007, 2010, 2013 対応) を用意しますが、あくまでも予備となります。
4. PC のトラブルに備えて、発表原稿ファイルを USB メモリ等の一般的なメディアにバックアップして御持参ください。
5. プロジェクター画面の解像度は XGA (1,024×768 ピクセル) ですので画面の設定を XGA に合わせてください。
6. 動画ファイルは Windows Media Player で再生できるものをお願いします。事前に再生できるか御確認ください。
7. 御使用いただく PC は mini D-sub 15pin のモニター出力端子が必要です。この端子がない PC を御使用の場合は、必ず別途変換コネクタを御持参ください。
8. Mac を使用される発表者は必ず外付けのコネクタを御持参ください。
9. 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ください。

■学生講演賞について

本年次大会では「学生講演賞」を設けて、優れた講演を顕彰します。

選考方法：審査委員の審査結果をもとに、審査委員会において選考・決定する。

選考基準：発表内容、プレゼンテーション、質疑応答などにおいて優れた講演であり、講演者の今後の一層の研究活動発展の可能性を有すると期待されるもの。

授 与：賞状を授与。賞状は本年次大会の閉会時に大会長から本人に授与する。

■各種会議日程

理 事 会：平成 26 年 12 月 8 日 (月) 12:00~12:40 3 号館 10 階 31000 会議室

評議員会：平成 26 年 12 月 8 日 (月) 12:40~13:10 3 号館 10 階 31000 会議室

総 会：平成 26 年 12 月 8 日 (月) 13:15~13:45 3 号館 3 階小ホール

■大会事務局

〒112-8551 東京都文京区春日 1-13-27

中央大学理工学部 応用化学科 小松研究室内

TEL & FAX 03-3817-1910

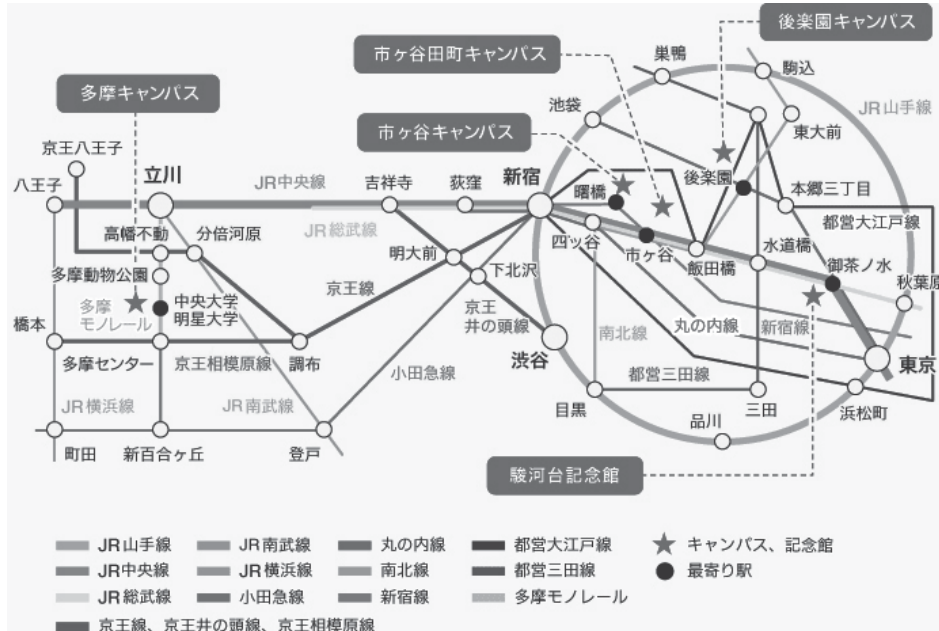
E-mail: sbsj21@tamacc.chuo-u.ac.jp

大会日程表

	12/8(月) 3号館 3階小ホール	12/9(火) 3号館 3階小ホール
9:00	8:30~ 受付	8:30~ 受付
9:30	9:25-9:30 開会の辞 9:30-10:15 基調講演 (小林紘一) 酒井宏水(奈良医大) 「人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の特徴と実用化に向けた試み」	9:30-10:50 シンポジウム3 人工血小板製剤のフロンティア (武岡真司) S11 武岡真司(早稲田大) 9:30-9:50 S12 橋本麻衣(熊本大) 9:50-10:10 (木下 学) S13 鈴木英紀(日本医大) 10:10-10:30 S14 萩沢康介(防衛医大)
10:00	準備(5分)	休憩(10分)
10:30	10:20-12:00 シンポジウム1 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の効能と安全性 (酒井宏水) S1 東 寛(旭川医大) 10:20-10:40 S2 田口和明(崇城大) 11:00 (堀之内宏久) S3 高瀬凡平(防衛医大) 11:20 S4 河野光智(慶応大) 11:30 11:20-11:40 S5 荒木 淳(東京大) 11:40-12:00	11:00-11:45 トピックス 中村遊香(共立製薬㈱) (秋山元英) 「獣医療における輸血と代替物への期待」
12:00	12:00-12:40 理事会 (10階 31000会議室)	11:45-13:00 昼 食 (10階 31008室)
12:30	12:40-13:10 評議員会 (10階 31000会議室)	
13:00	13:15-13:45 総会	13:00-13:40 教育講演 木平清人(JAXA) (佐藤高彰) 「国際宇宙ステーション・「きぼう」を利用した高品質タンパク質結晶生成及び構造解析」
13:30	13:45-14:15 大会長講演 小松晃之(中央大) (東 寛) 「人工酸素運搬体 “HemoAct™” の開発」	準備(5分)
14:00	14:15-15:55 シンポジウム2 人工酸素運搬体の新物質戦略 (小松晃之) S6 根矢三郎(千葉大) 14:15-14:35 S7 北岸宏亮(同志社大) 14:35-14:55 (丸山 徹) S8 春木理沙(中央大) 15:00 14:55-15:15 S9 Yao-Tong Lai(東京大) 15:15-15:35 S10 垣内健太(早稲田大) 15:30 15:35-15:55	13:45-15:00 一般演題2 (高折益彦) G3 松田信作(慶応大) 13:45-14:00 G4 鋳谷武雄(北海道大) 14:00-14:15 G5 丸山 徹(熊本大) 14:15-14:30 G6 大柿 徹(熊本大) 14:30-14:45 G7 佐藤高彰(信州大) 14:45-15:00
15:00		休憩(10分)
15:30		15:10-15:55 海外招待講演 黄 宇彬(中国科学院) (小松晃之) 「Development of Hemoglobin-Loaded Polymer Assemblies and Recent Situation of Artificial Blood in China」
16:00	休憩(10分) 16:05-16:35 一般演題1 (田口和明) G1 山田佳奈(中央大) 16:05-16:20 G2 迫田 龍(神奈川工大) 16:20-16:35	16:00 学生講演賞発表 閉会の辞
16:30	16:35-17:20 特別講演 Takashi Yonetani (Univ. of Pennsylvania) (武岡真司) 「How Does Hemoglobin (Hb) Regulate its Oxygen-Affinity and Cooperativity?」	
17:00		
17:30		
18:00	17:45-19:45 懇親会 (10階 31008室)	

交通案内

中央大学への交通アクセス



中央大学理工学部（後楽園キャンパス）へのアクセス



- 東京メトロ丸ノ内線・南北線
『後楽園駅』出口4から徒歩5分
- 都営三田線・大江戸線
『春日駅』出口6から徒歩7分
- JR総武線『水道橋駅』から徒歩15分

住所：〒112-8551
東京都文京区春日1-13-27
TEL：03-3817-1711



- キャンパスへは春日通り（東門）からお入り下さい。

年次大会会場：3号館3階
中央大学高等学校小ホール
3号館に入りましたら奥（南側）のエレベーターで3階までお上がり下さい。
懇親会会場：3号館10階 31008室

第 1 日目 平成26年12月8日(月)

- 9 : 25 開会の辞
- 9 : 30-10 : 15 **基調講演** [司会：小林 紘一（慶応義塾大学）]
人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）製剤の特徴と実用化に向けた試み
酒井 宏水（奈良県立医科大学）
= 準備 5 分 =
- 10 : 20-12 : 00 **シンポジウム 1「人工赤血球（ヘモグロビン小胞体）製剤の効能と安全性」**
[司会：酒井 宏水（奈良県立医科大学），堀之内 宏久（さいたま市立病院）]
- 10 : 20-10 : 40 S1 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（旭川医科大学）
- 10 : 40-11 : 00 S2 病態モデル動物におけるヘモグロビン小胞体の体内動態と安全性評価
田口 和明（崇城大学）
- 11 : 00-11 : 20 S3 出血性ショックにおける致死性不整脈発生機序とリボソーム封入人工酸素運搬体の効果に関する実験的検討
高瀬 凡平（防衛医科大学）
- 11 : 20-11 : 40 S4 外科周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与の効果と安全性
河野 光智（慶応義塾大学）
- 11 : 40-12 : 00 S5 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）
- 12 : 00-12 : 40 理事会（10 階 31000 会議室）
- 12 : 40-13 : 10 評議員会（10 階 31000 会議室）
- 13 : 15-13 : 45 総会
- 13 : 45-14 : 15 **大会長講演** [司会：東 寛（旭川医科大学）]
人工酸素運搬体“HemoAct™”の開発
小松 晃之（中央大学）
- 14 : 15-15 : 55 **シンポジウム 2「人工酸素運搬体の新物質戦略」**
[司会：小松 晃之（中央大学），丸山 徹（熊本大学）]
- 14 : 15-14 : 35 S6 ミオグロビンをを用いた人工酸素運搬体の開発戦略
根矢 三郎（千葉大学）
- 14 : 35-14 : 55 S7 完全合成化合物による酸素錯体の形成とその薬物動態
北岸 宏亮（同志社大学）
- 14 : 55-15 : 15 S8 HemoAct™ の血液適合性および安全性評価
春木 理沙（中央大学）
- 15 : 15-15 : 35 S9 Size Effect of Hemoglobin-Albumin Microspheres on Cellular Uptake and Cell Viability
Yao-Tong Lai（東京大学）
- 15 : 35-15 : 55 S10 酸素マイクロ・ナノバブル分散液を用いた完全液体換気への応用
垣内 健太（早稲田大学）
= 休憩 10 分 =
- 16 : 05-16 : 35 **一般演題 1** [司会：田口 和明（崇城大学）]
- 16 : 05-16 : 20 G1 （ヘモグロビン-アルブミン）クラスター“HemoAct™”の分子構造調節
山田 佳奈（中央大学）
- 16 : 20-16 : 35 G2 ポリリン酸修飾ヒアルロン酸ゲルを用いた新規局所止血材の開発
迫田 龍（神奈川工科大学）
- 16 : 35-17 : 20 **特別講演** [司会：武岡 真司（早稲田大学）]
How Does Hemoglobin (Hb) Regulate its Oxygen-Affinity and Cooperativity?
Takashi Yonetani（Univ. of Pennsylvania）
- 17 : 45-19 : 45 **懇親会**（10 階 31008 室）

第2日目 平成26年12月9日(火)

- 9:30-10:50 シンポジウム3「人工血小板製剤のフロンティア」
[司会：武岡 真司（早稲田大学）、木下 学（防衛医科大学）]
- 9:30-9:50 S11 人工血小板／H12 (ADP) リボソームの製造工程・品質の管理
武岡 真司（早稲田大学）
- 9:50-10:10 S12 血小板減少状態における血小板代替物 H12 (ADP) リボソームの体内動態解析
橋本 麻衣（熊本大学）
- 10:10-10:30 S13 人工血小板／H12 (ADP) リボソームの超微形態的検討— in vitro および in vivo における人工血小板の挙動に関する電顕的観察—
鈴木 英紀（日本医科大学）
- 10:30-10:50 S14 出血性ショック時の蘇生輸血（赤血球：血小板：血漿の1：1：1輸血）と血液代替物使用の可能性
萩沢 康介（防衛医科大学）
- = 休憩 10分 =
- 11:00-11:45 トピックス [司会：秋山 元英（中央大学）]
獣医療における輸血と代替物への期待
中村 遊香（共立製薬㈱）
- 11:45-13:00 昼 食（10階 31008室）
- 13:00-13:40 教育講演 [司会：佐藤 高彰（信州大学）]
国際宇宙ステーション・「きぼう」を利用した高品質タンパク質結晶生成および構造解析
木平 清人（宇宙航空研究開発機構（JAXA））
- = 準備 5分 =
- 13:45-15:00 一般演題2 [司会：高折 益彦（東宝塚さとう病院）]
- 13:45-14:00 G3 ラット肺切除術後出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与後の循環動態
松田 信作（慶応義塾大学）
- 14:00-14:15 G4 脳虚血再灌流傷害に対する人工酸素運搬体の経動脈的投与による治療戦略
鎧谷 武雄（北海道大学）
- 14:15-14:30 G5 CD68⁺CD206⁺クッパー細胞選択的ナノ酸化剤のポリチオール付加マンノースアルブミンは急性肝障害を抑制する
丸山 徹（熊本大学）
- 14:30-14:45 G6 横紋筋融解症誘発急性腎障害に対するアルブミン-チオレドキシン融合体の治療効果と機序解明
大柿 滋（熊本大学）
- 14:45-15:00 G7 小角・広角X線溶液散乱法によるヘモグロビンの立体構造再構築と濃厚ヘモグロビン溶液中の蛋白質間相互作用に対するpH効果の精密評価
佐藤 高彰（信州大学）
- = 休憩 10分 =
- 15:10-15:55 海外招待講演 [司会：小松 晃之（中央大学）]
Development of Hemoglobin-Loaded Polymer Assemblies and Recent Situation of Artificial Blood in China
黄 宇彬（中国科学院 长春応用化学研究所）
- 16:00 学生講演賞発表
閉会の辞

人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の特徴と実用化に向けた試み

酒井宏水

奈良県立医科大学 医学部 化学教室

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、現行の医療に多大の貢献をしている。しかし、少子高齢化社会により献血の需給バランスが崩れることが懸念されているし、緊急時や大規模災害時の救命医療においては、血液型検査、感染の可能性、短い保存期限などが、危機管理体制の不安要素になりうる。人工赤血球(Hb小胞体)は感染源を含まず、血液型が無く、長期間の備蓄ができ、現行の輸血治療を補完する技術として期待されている。更に、脆弱な赤血球と比べ化学的に安定で、物性値の調節が可能なので、輸血では対応のできない疾患の治療や外科の治療への可能性も検討されている。

Hb小胞体の特徴は、①日赤から提供されたNAT検査済み非使用赤血球を原料とし、加熱処理(ウイルス不活化)とナノフィルトレーション(ウイルス除去)を経た高純度Hbを用いている(ウシ、ブタ由来Hbの使用も可能)、②粒子表面のPEG修飾と脱酸素化により保存期間中の化学的安定性を確保できる、③細胞型構造により内因性NOとの反応を抑制し血管収縮と血圧亢進を生起しない、血管外漏出の防止など、裸のHbの毒性をカプセルで遮蔽できる、④血液適合性が高く、老化赤血球と同様に最終的に細網内皮系に捕捉され支障なく分解、排泄される、⑤微粒子(250nm)のため血漿層に均一に分散して流動し、赤血球が通過しにくくなった毛細血管なども通過でき、脳梗塞や有茎皮弁の虚血性領域、腫瘍組織にも酸素を運搬出来ること、⑥高いHb濃度(10g/dL)により、出血性ショック、あるいは制御不能出血に対する投与では赤血球輸血と同等の酸素運搬効果(蘇生効果)を示す、他方、⑦CO結合Hb小胞体の投与では、COの徐放により細胞保護効果を示す、⑧摘出小腸や切断下肢などの酸素運搬灌流液として有効である。これらの効能、大量投与時の安全性について、膨大な非臨床成績が蓄積され、ほぼ全てが学術誌などに公表されている。製造法もここ数年で簡略化が進んでいる。これまでアカデミア中心で研究を進めてきたHb小胞体製剤は、いよいよ次の段階に進むべき医薬品の候補物質であると考えている。

日本には半世紀以上に及ぶ「人工血液」開発の歴史があるが、未だ十分な性能のものは実用化されていない。人工赤血球は特定生物製剤に分類されることもあり実用化までのハードルが高いものの、人工赤血球が必要であることは明白であり、関連諸機関の協力も得て、是非とも日本発の医薬品として実用化に繋げたい。

【謝辞】

本研究の推進にあたり、実に多くの諸先生のご協力を頂いている。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)を受けて推進されている。

【関連文献】

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;45:23-8.
2. Sakai H, Takeoka S, Kobayashi K. Gas bioengineering using hemoglobin-vesicles for versatile clinical application. *Curr Pharmaceut Design* 2011;17:2352-9.
3. 酒井宏水, 堀之内宏久, 東寛, 小田切優樹, 小林絃一. 輸血代替としての人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の安全製試験. *人工血液* 2013;21:36-48.
4. 酒井宏水. 人工赤血球の開発状況と将来展望. *Anesthesia Network* 2014;18:37-41.
5. 高折益彦. 細胞型人工酸素運搬体の治験, 第1相計画. *人工血液* 2011;19:3-11.

人工酸素運搬体 “HemoAct™” の開発

小松晃之

中央大学理工学部 応用化学科

少子高齢化により献血者層(若年層)人口が減少すると、安定した血液の備蓄が難しくなる。日本赤十字社の推計によれば、平成 39 年(13 年後)には年間 100 万人分の血液が不足すると予測されている。血液型に関係なくいつでも使用できる人工酸素運搬体の実現が、危機管理の主要施策としてはもちろん、輸血治療を補完するための医療対策の一環として強く望まれる状況になってきている。1980 年代以降、人工酸素運搬体研究の主力であった修飾 Hb 製剤は、米国で臨床試験が Phase III まで進んだが、副作用(血圧上昇)や有効性に問題があり実用化には至っていない。

ごく最近、我々は Hb の分子表面に 3 個のヒト血清アルブミン(HSA)を共有結合したコア-シェル型の(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター(Hb-HSA₃, 図 1, 製剤名 “HemoAct™”)を合成し、それが新しい赤血球代替物として機能することを見出した^{1,2)}。Hb を HSA で包み込むことにより、安全性と有効性を兼ね備えた製剤、つまり“酸素輸送能を持った血漿タンパク質”ができるに違いないという着想に基づいて設計されたユニークな人工酸素運搬体である。クラスター状分子を合成する上で最も難しい点は、いかに 1 つの Hb に複数の HSA をつなぎとめるかにある。我々は HSA に存在する唯一の還元型システイン(Cys-34)に着目し、それと Hb 表面のリシン(Lys)を選択的に結合させることで、目的のクラスター構造を取率高く合成することに成功した。AFM 像には三角形分子がはっきりと見られ(図 1A)、予想通りの形状であることがわかった。さらに、電子顕微鏡写真(図 1B)をもとに三次元再構成を行い、クラスターの立体構造を明らかにした。

HemoAct™の特筆すべき特徴の一つは、等電点(pI=5.1)が低いことである。そのため HemoAct™は血中滞留性に優れ、血圧上昇を起こさない。HemoAct™の酸素親和性は赤血球に比べ高いが($P_{50}=9$ Torr), 窒素雰囲気中で調製すると低酸素親和性の製剤($P_{50}=27$ Torr)も得られる。粒径は約 10nm で赤血球(8 μ m)の 1/800 以下。梗塞部位にも入り込み酸素を運ぶことができるので、酸素治療薬としても有用である。原料は Hb(分解能 1.1 Å で X 線結晶構造解析が可能なほど純度が高い)、HSA、架橋剤のみ。製造工程は 2 ステップと少なく(コストの高い試薬は一切不要)、特殊な装置も必要ない。HemoAct™の赤色溶液([Hb]=5 g/dL)の粘度は 2.8 cP(全血液は 4.0 cP)、血液適合性もよく、動物実験から安全性を確認している。

また、HSA は様々な疎水性分子を結合する能力を持つため、外側の HSA ユニットに機能性分子を包接することができる。例えば、活性酸素消去能を有する分子を結合させると、自動酸化が大きく抑制されることがわかった^{3,4)}。これは虚血性組織に血流が戻った際、活性酸素が放出されても中心 Hb 部位は酸化されないことを意味する。

HemoAct™は既存製剤で指摘されている欠点を持たず、しかも多くの機能を付与することができる新しい人工酸素運搬体である。赤血球代替物の実現がまもなく我々が直面する深刻な血液不足の危機を乗り越えるための切り札になることを願い、現在 HemoAct™の実用化に向けた展開を急ピッチで進めている。

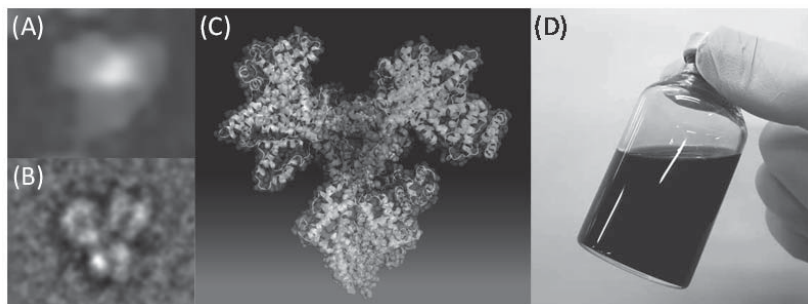


図 1 HemoAct™: (A) AFM 像, (B) TEM 像, (C) 三次元再構成により得た立体構造, (D) ガラス瓶に入った赤色の製剤

【文献】

- 1) D. Tomita, T. Kimura, H. Hosaka, Y. Daijima, R. Haruki, K. Ludwig, C. Böttcher, T. Komatsu, *Biomacromolecules* **2013**, 14, 1816.
- 2) 小松晃之, *化学と工業*, **2014**, 67, 677.
- 3) H. Hosaka, R. Haruki, K. Yamada, C. Böttcher, T. Komatsu, *PLOS ONE* **2014**, 9, e110541.
- 4) Y. Daijima, T. Komatsu, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 14716.

How Does Hemoglobin (Hb) Regulate its Oxygen-Affinity and Cooperativity?

○ Takashi Yonetani (米谷 隆)¹, Kenji Kanaori (金折賢二)²¹ Univ. of Pennsylvania, Perelman School of Medicine, ² Kyoto Inst. of Technology, Bioengineering.

Introduction: The widely-held mechanism of allostery of hemoglobin (Hb) has been that the changes from the R-quaternary/tertiary structures of oxy-Hb to the T-quaternary/tertiary structures of deoxy-Hb exert certain constraints on the coordination structure of the heme group, leading to a lower oxygen-affinity of the hemes and thus that of Hb [1]. However, we found that there is no causal correlation between the static T/R-quaternary structure and the oxygen-affinity of Hb [2]. We explore an alternative mechanism of the regulation of the ligand-affinity and cooperativity in Hb.

Results and Discussion: The oxygen-affinities of free Fe[II]- and Co[II]-protoporphyrins in organic solvents are very low ($P_{50} > 10^2 \sim 10^3$ torr), whereas the apparent oxygen-affinities of these metalloporphyrins, which are incorporated in proteins such as apo-myoglobin, apo-Hb, serum albumin, etc., increase substantially to $P_{50} < 10^{-1} \sim 10^1$ torr, though their coordination structures are apparently unchanged [3]. Such substantial increases in the apparent ligand-affinities of metalloporphyrin-containing proteins are accomplished by preventing/interfering with the dissociation of the ligand by protein matrix, since the interior of globin is nearly fully packed by protein matrix. In Hb and Co-substituted Hb (Co-Hb), the dissociation process of the ligand proceeds through the “caged” state [4-6], which can be produced by cryogenic photolysis of the ligated-states at 4.2K and in which the metal-ligand bond is broken and the un-bonded ligand is trapped near the bonding site within the globin moiety. This “caged” state has spectral features distinct from those of either deoxy- or ligated states of the respective hemoproteins. The apparent ligand-affinities of Hb and Co-Hb are regulated by heterotropic effectors without detectable changes in either static quaternary/tertiary structures of the globin moiety or the coordination/electronic structures of the metalloporphyrin moiety and thus the ligand-affinity of the metalloporphyrins themselves [7-9]. The reduction of the apparent ligand-affinities of Hb and Co-Hb may be caused by increase in the dissociation rate of ligands from the “caged” state, resulting from the effector-linked, enhanced high-frequency thermal fluctuations which increase the transparency of the globin matrix toward small diatomic ligands such as oxygen, CO, and NO [7-9], which may concomitantly reduce the rate of geminate-recombination of the ligand to the metalloporphyrins.

Conclusion: The ligand-affinity of Hb is regulated through protein dynamics by heterotropic effectors, rather than static quaternary/tertiary structural changes, as proposed by Perutz [1]. Thus, the “caged” state of Hb acts as a critical transition state in regulation of the affinity for small diatomic ligands in Hb and Co-Hb [9].

References:

[1] M.F. Perutz, *Nature* **1970** 228, 726; [2] T. Yonetani, *et al.*, *JBC* **2002** 277, 34508; [3] H. Yamamoto *et al.*, *Bioinorg. Chem.* **1977** 7, 189; [4] T. Iizuka, *et al.*, *BBA* **1974** 351, 182; [5] Iizuka, *et al.*, *BBA* **1974** 371, 126; [6] T. Yonetani, *et al.*, *JBC* **1974** 249, 2168; [7] T. Yonetani, M. Laberge, *BBA* **2008** 1784, 1146; [8] M. Laberge, T. Yonetani, *Biophys. J.* **2008** 94, 2737; [9] T. Yonetani, K. Kanaori, *BBA* **2013** 1834, 1873.

獣医療における輸血と代替物への期待

中村遊香

共立製薬株式会社 営業技術部

犬と猫に対する日常診療における輸血療法の適用頻度は年々増加傾向にあるが、血液型や血液の供給を始めとして、人の医療との相違点を一つ一つ克服しながらの治療を強いられている。そこで、我が国における、飼育犬および猫の現況と、犬と猫の輸血療法における基礎(血液型、ドナー動物の選択基準、ドナーからの採血方法)を概説し、供血液の人工代替物が期待される現状を説明する。

1. 血液型

- 1) 犬血液型：国際的に認知された犬赤血球抗原(Dog Erythrocyte Antigens)を用いるが、輸血療法では DEA1 型のサブタイプである DEA1.1 型か否かを鑑別する。DEA1.1 陽性犬の出現頻度は、犬種によらず概ね 70% 前後で、残り 30% 程度が陰性犬である。
- 2) 猫血液型：A, B, AB の 3 種から成る AB システムを使用している。猫の輸血療法では、初回の輸血時には既に自然発生の同種異型抗体を有していることに注意する必要がある。国内の研究などにおいて、90% 近くが A 型、残り 10% の殆どは B 型であり、対立遺伝子として存在する AB 型は非常に稀な血液型であることが知られている。

2. ドナーの選択基準

- 1) 犬では DEA1.1 陰性が適しており、出血性ショックの危険性を勘案すると、**体重 10 kg**($\approx 90\text{mL/kg} \times 10\text{kg} \times 25\% = 225\text{mL}$)以上の犬が、体格の最低条件であると思われる。
- 2) 猫では他の血液型に対する自然抗体の存在が知られているため、同種血液型のみがドナーと成り得る。猫の血液量は約 65mL/kgBW であり、**体重 5 kg**の猫からは約 80mL($\approx 65\text{mL/kg} \times 5\text{kg} \times 25\%$)の採血が限度であると思われる。

3. 採血法

- 1) 器具：新鮮全血をそのまま短時間で輸血する場合は、特殊な器具は不要であるが、供血液を保存して使用する場合は人血用の保存バッグ(全血用 CPDA 液、テルモ株式会社)を使用する。採血針は可能な限り太いもの(犬：18G, 猫：21G)を使用し、溶血させないように留意する。
- 2) 採血：採血部位を毛刈りし、外科手術野と同様に消毒処置する。重力による自然落下で採血バッグに採血できるようにバッグは術台下に確保しておく。

【参考データ】

1. 犬の飼育頭数：1,087 万頭 猫の飼育頭数：974 万頭(ペットフード協会調べ、H25 年度)
2. 小動物診療施設数：11,032 病院(平成 25 年 12 月末現在、農林水産省発表)

教育講演

国際宇宙ステーション・「きぼう」を利用した高品質タンパク質結晶生成および構造解析

○木平清人，山田 貢，和田理男，太田和敬，松本邦裕，田崎一行，三好 寛

宇宙航空研究開発機構 有人宇宙ミッション本部 宇宙環境利用センター

宇宙航空研究開発機構(JAXA)は国際宇宙ステーション(ISS)の「きぼう」日本実験棟の船内実験室を利用して「高品質タンパク質結晶生成実験(JAXA PCG)」を行っている。

宇宙空間では，溶液を密度の違いによって上下左右に流れさせる対流や，重いものを沈下させる沈降がない．このためタンパク質の分子が規則正しく並び，高品質な結晶が生成すると考えられている．高品質な結晶から得られる精密なタンパク質立体構造の情報は，生命現象の理解を深めるとともに，応用面においても医薬品・産業用酵素等の研究開発に利用されている。

JAXA では，国際宇宙ステーションのロシアのサービスモジュールを利用して，2003 年からタンパク質結晶生成実験を行い，宇宙で高品質なタンパク質結晶を生成する技術の開発を進めてきた．「きぼう」打上げ後の 2009 年からは，引き続き高品質結晶生成技術の獲得を推進するとともに，打上げ／回収時ならびに「きぼう」において適切な温度管理のもと実験を行う技術確立しながら，ロシア連邦宇宙局との協力に基づき，定常的にタンパク質試料を国際宇宙ステーションに向けて打ち上げている。

本講演では，まずタンパク質結晶構造解析について簡単に解説し，次いで「きぼう」利用高品質タンパク質結晶生成実験についての概要をこれまでの経緯，宇宙実験の現状，研究成果事例などを踏まえて紹介させて頂きたい．さらには，人工酸素運搬体の結晶構造解析に関する期待についてもお話したい。

Development of Hemoglobin-Loaded Polymer Assemblies and Recent Situation of Artificial Blood in China

Yubin Huang

Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, 5625 Renmin Street, Changchun, P.R.China

Due to the feasibility and safety issues of clinical blood transfusion, a blood substitute with high safety, high efficacy and large-scale production is needed. However, the severe adverse effects of hemoglobin-based oxygen carriers (HBOCs) during clinical studies highlight the importance of the cellular structure of RBCs in regulation of oxygen delivery, metabolism and functions of organs. Carriers with micro/nanostructures show great potential to be applied as next generation of artificial oxygen carriers due to the superior properties, such as adjustable diameters, versatile functions, avoidance of the contact of Hb with blood and long circulation time *in vivo*.

With the advantage of biodegradability, non-antigenic nature and ease of scale up, aliphatic polyesters are promising materials for construction of sustained release system. The extension of polymeric systems into HBOCs can endow the carriers with superior performance. Generally, hemoglobin can be immobilized within polymeric systems through chemical conjugation and physical encapsulation. By optimization of the material structure and loading process, the HBOCs can be fabricated with high Hb content and well-preserved bioactivity. Preclinical studies have revealed the safety and effectiveness of the Hb/polymer systems on animal ischemia models.

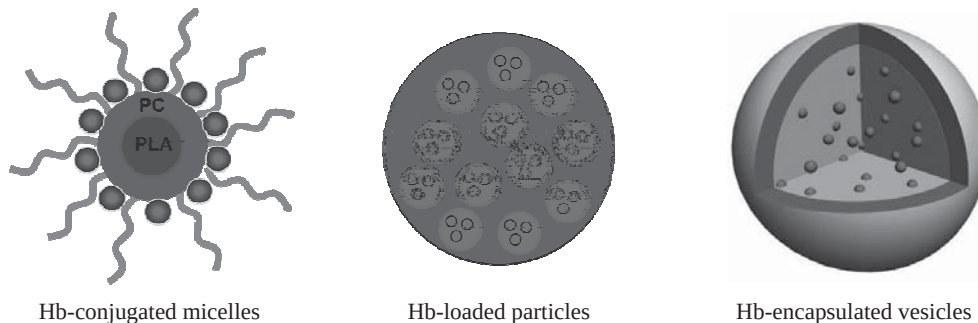


Figure Different types of Hb-loaded polymer assemblies

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²¹ 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(リポソーム)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。しかしながら、赤血球輸血の代替となるには、リポソーム製剤での投与量を遥かに越える量のリポソームを投与することになる。そのために、大量投与に伴う生体反応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。一方で、一般にリポソームは、細網内皮系に速やかに取り込まれることから、特に大量投与した場合に、免疫応答に何らかの影響を与える可能性がある。この観点からリポソーム大量投与が脾細胞の免疫応答へ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 あるいは空リポ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) リポ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。これらは、主として、T 細胞の増殖に焦点をおいた解析であり、サイトカイン・ケモカインの産生動態がいかなる影響を受けるのかについての詳細な検討はなされてこなかった。そこで、脾細胞の Con A 刺激下での培養中に反応系に分泌されてくるケモカイン・サイトカインの動態がリポソーム投与後にどのように影響を受けるのかについて詳細に検討を加えた。その結果、一部のサイトカイン・ケモカインは、リポソームの投与後に、産生量が増加するという結果を得た。さらに、IL-1b の産生量を指標にして、脾細胞の LPS 刺激に対する反応性に与えるリポソームの影響も検討したが、LPS に対する反応性はリポソーム投与により変化しないという結果が得られた。これらの結果から、リポソームにより、T 細胞の増殖は一過性に抑制を受ける可能性がある一方で、サイトカイン・ケモカインの産生の観点からは、少なくとも産生の低下はなく、かつ、自然免疫系の過剰な反応が誘導される可能性は低いと推定される。

病態モデル動物におけるヘモグロビン小胞体の体内動態と安全性評価

○田口和明¹, 丸山 徹², 酒井宏水³, 小田切優樹¹

¹ 崇城大学薬学部, ² 熊本大学薬学部, ³ 奈良県立医科大学

【緒言】 人工酸素運搬体であるヘモグロビン小胞体(HbV)は大量出血時の他, 外科的手術中の血液補充としての利用が期待されている。そのため, HbV は万人へ安全かつ有効に使用することが必要不可欠であると考えられる。これまでに我々は, HbV の体内動態における基盤情報と臨床使用状況下でのデータを構築し, HbV の安全性・有効性を評価してきた。本講演では, 病態モデル動物を用いた HbV の体内動態特性と安全性について紹介する。

【実験】 出血性ショックモデルラットは全血液量の 40% を脱血することで作製した。四塩化炭素誘発慢性肝障害モデルラットは, ミネラルオイルに溶解した四塩化炭素(CCl₄: mineral oil = 1:4)を週3回, 8週間腹腔内投与し作製した。高脂血症モデルマウス(ApoE 欠損マウス)は九動より購入した。体内動態の検討は, HbV の内部ヘモグロビンを標識した ¹²⁵I-HbV または脂質膜を標識した ³H-HbV を用い評価した。

【結果と考察】 出血性ショック時における HbV の体内動態を評価したところ, 主要分布臓器や排泄経路は健常時と同様のプロファイルを示し, 生体蓄積性も確認されなかった。四塩化炭素誘発慢性肝障害モデルラットにおいて体内動態評価を行ったところ, 肝障害が悪化するにつれて, 肝臓への分布量及び Kupffer 細胞の貪食能低下が生じる結果, 血中クリアランスは低下し, また, 肝実質細胞が障害を受けることで, 排泄量の低下が起こることが示唆された。このような体内動態の変動は生体に悪影響を及ぼす可能性が懸念されるため, 生化学的及び病理組織学的検討を行ったところ, HbV 投与により一時的な血漿パラメータの変動や臓器へのヘモジデリンの沈着はあるものの, 著しい悪影響は確認されなかった。さらに, 高脂血症モデル動物として ApoE 欠損マウスを用い HbV の体内動態, 生化学的及び病理組織学的検討を行った結果, HbV 投与により一時的な脂質関連の血漿パラメータの変動が起こるものの, HbV は十分な代謝排泄性を有していることが確認された。

【結論】 以上, 体内動態特性解析の結果より, HbV は健常時のみならず, 代謝・排泄能が低下した状態や出血性ショック時においても, 十分な代謝・排泄性を有しており, 生体蓄積性はないことが示唆され, 様々な臨床使用条件下においても安全に使用できると考えられた。

【文献】

- 1) Taguchi K et al. *J Control Release*. **2009**, 136, 232-9.
- 2) Taguchi K et al. *Toxicol Appl Pharmacol*. **2010**, 248, 234-41.
- 3) Taguchi K et al. *J Pharm Sci*. **2011**, 100, 775-83.
- 4) Taguchi K et al. *Drug Metab Rev*. **2011**, 43, 362-73.

シンポジウム1 S3

出血性ショックにおける致死性不整脈発生機序とリポソーム封入人工酸素運搬体の効果に関する実験的検討

○高瀬凡平, 田中良弘, 東村悠子, 木下 学

防衛医科大学校集中治療部, 救急部, 免疫微生物学

出血性ショック心臓では致死性不整脈が発生しやすい. その機序検討するとともにリポソーム封入人工酸素運搬体(Hemoglobin-Encapsulated Liposome [LHb])の効果を実験的に検討した.

【方法】 1) SD rat に 85% 脱血致死性出血性ショック状態を作成し, 洗浄赤血球(RBC)蘇生した群(n=14)と, 5% アルブミン(5%Alb)蘇生した群(n=14)及び LH b 群(n=14)で蘇生した群の 3 群間で心拍変動指標(LF, HF, LF/HF)及び血中 norepinephrine (NE) を測定した. 2) SD rat に 30% 再出血性致死性ショックを作成し, RBC 群(n=14), 5%Alb 蘇生群(n=14)及び LH b 群の 3 群間の摘出心で Optical Mapping System (OMP)の興奮伝播・Action potential duration dispersion (APDd), 致死性不整脈性を検討した.

【結果】 1) RBC 群及び LHb 群では LF/HF・NE が正常に対し 5%Alb 群では上昇し, 全例死亡した. 2) 5%Alb 群では OMP で左心室伝導遅延と burst pacing による心室細動が全例で誘発され APDd 値が増大した. RBC 群及び LH b 群では認めなかった.

【結語】 出血性ショック心臓では, 自律神経活動異常・細胞的心筋不整脈性増大から致死性不整脈が誘発されると示唆された. また, リポソーム封入人工酸素運搬体(LHb)は洗浄赤血球と同様の効果が期待される可能性が考えられた.

外科周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与の効果と安全性

○河野光智¹, 神山育男¹, 松田信作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 奈良県立医科大学医学部化学教室

【緒言】 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、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後、リポソームに内包、膜表面をPEG修飾して粒径を250nm、P50は32Torr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、動物の交換輸血試験で確認され、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。将来、手術中出血に対する臨床応用も見込まれている。

【目的】 肺切除周術期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。保存血などと比較してHbV投与の有効性と安全性を検討した。また、ラットに対して肺切除術を行い、同時に循環血液量の30%を脱血するモデルでは、観血的動脈圧モニタリングを行い、HbVが循環動態に及ぼす影響を評価した。

【実験】 マウスで循環血液量の40%を試料溶液で交換した後、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, (3) マウス保存血液(sRBC)群, (4) ヘモグロビン小胞体分散液(HbV)群: HbV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。主要臓器での低酸素誘導因子(HIF)-1alphaの発現を免疫染色で評価した。ラットモデルでは頸動脈にカニューレを挿入後、人工呼吸器に接続して左肺を切除する。カニューレより循環血液量の30%を脱血する。脱血量と等量のHbVを頸静脈ラインから輸液する。その間、動脈圧の連続モニタリングを継続し記録する。閉胸し手術を終了して人工呼吸器から離脱する。血圧モニタリングは術後1時間まで継続した。

【結果と考察】 マウスモデルのLR群は全例が死亡した。rHSA群は生存率が50%であったのに対し、sRBC群とHbV群では全例が生じた。sRBC群やHbV群では体重の減少率が低く、回復が早い傾向を認めた。TNF-alphaなどの炎症性サイトカイン濃度は、HbV群とsRBC群とで同等であった。HbV群では肝臓および腎臓でのHIF-1alphaの発現がsRBC群と同等に抑制された。肺切除後のラットの平均血圧は105±30mmHgであった。30%の脱血により45±1mmHgまで低下したが、HbVの投与により速やかに血圧は上昇し回復した。投与後10分での血圧は120±20mmHgであった。その後も血圧は1時間以上維持され、閉胸して手術を終了し、人工呼吸器からの離脱も可能であった。

【結論】 マウス及びラット左肺全摘モデルにおける呼吸機能低下状態でもHbVが有効に機能した。外科的侵襲からの回復過程に深刻な影響を与えず、明らかな炎症の惹起も認められなかった。HbV投与は肺切除手術での出血に対しても有効であると考えられた。

シンポジウム1 S5

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, 武内 大¹, 加賀谷優¹, 内藤宗和³, 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, ³ 愛知医科大学解剖学

【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「ヘモグロビン小胞体(HbV)」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。

【実験】 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従来の臓器保存液「ET-Kyoto」およびHbV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。一定時間灌流保存を行った後、顕微鏡下にて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、総虚血時間が8時間となるように血液を再灌流した。また手術後3か月までの生着と機能を評価した。

【結果と考察】 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おり、また「ET-Kyoto」よりもHbVにおいて有意に pO_2 は低値を示した。また、虚血時間4, 5, 6時間の時点においてLactateもHbVにおいて有意に低値であり、HbVを用いると好氣的代謝が保たれていると考えられた。長期的な生着に成功したのはHbVを用いたもののみであり、3か月後の機能回復も良好であった。

【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。

【文献】

- 1) Araki J, Sakai H, Takeuchi D, Kagaya Y, Naito M, Mihara M, Narushima M, Iida T, Koshima I. Normothermic preservation of the rat hind limb with artificial oxygen-carrying hemoglobin vesicles. *Transplantation, in press (TPA-2014-0748)*.

ミオグロビンを用いた人工酸素運搬体の開発戦略

○根矢三郎¹, 川口 章², Takashi Yonetani³¹千葉大学薬学研究院, ²東海大学医学部, ³University of Pennsylvania, School of Medicine.

【緒言】 高齢化社会を迎えて医療現場での血液需要は増加している。一方、若年層人口は減るとともに献血率は年々低減している。そのため、ヘモグロビン(Hb)以外にも酸素運搬物質を広く求めることは有意義である。ミオグロビン(Mb)の酸素親和性は高く、酸素運搬体として機能しない。私たちはMbの酸素親和性を下げて酸素運搬体に変換するために、ヘム分子構造を多様に変える試みを続けている。ヘムの化学修飾は容易で、遺伝子工学によるグロビンの化学修飾に比べて費用もかからない。また、分子構造が簡単なMbはHbよりも安定であり、長期保存にも向いている。ここでは酸素親和性を変えるヘム構造因子の解明とMbを用いた人工酸素運搬体の開発について述べる。

【結果と考察】 Mbの酸素親和性を変えるため、ヘムを入れ替えた三種類の再構成Mb類を調べて以下の結果を得た。

- 1) ヘム-グロビン接触の大幅な改変 Mbヘムポケット中のヘムはグロビンに取り囲まれ、百か所余りのヘム-グロビン接触で固定されている。ヘム側鎖を小さくしてグロビンとの接触減らすと、ヘムはMb内部で鉄-ヒスチジン結合まわりに動的回転する現象を見つけた¹⁾。すなわち、小さいヘムは揺らいで安定性を失う。しかし、揺らぐヘムと安定したヘムをもつ二種類のMbで酸素親和性を比較したところ、酸素親和性はほとんど変わらないと判明した。
- 2) ヘム分子形の改変 ヘムはピロール四分子からなる正方形分子である。ピロール環の配列を正方形から長方形・台形・不等辺四角形などに変えたさまざまなポルフィリン異性体をつくった。それらの鉄錯体をMbに組み込んだところ、酸素親和性は100万倍以上の範囲で変動した。とくに、台形ヘム(鉄コルフィセン)Mb類の場合、 $P_{50}=7\text{ Torr}$ および 37 Torr が得られた。これらのMbの酸素運搬能力は赤血球のものと同様であり、Mbにもとづく酸素運搬体創製への素材となる²⁾。
- 3) コバルト Mb 鉄をコバルト(Co)に置換したコバルトヘムは、ヘム自身が有機溶媒中でも可逆的に酸素結合する。Co(II)ヘムを組み込んだコバルトMbの酸素親和性は $P_{50}=50\text{ Torr}$ と低く、酸素放出能力が天然Mbよりも格段に向上している。生理的条件での酸素放出能力は23%と赤血球なみに大きい。Co(II)Mbのもうひとつの特徴は、一酸化炭素(CO)と結合しないことである。ヘム分解でできるCOは生体内でシグナル伝達分子として機能する。生理的濃度のCOを消去しないCo(II)Mbは、この点でも優れた特性をもつ³⁾。

【結論】 ヘムを置換した再構成Mbは人工酸素運搬体として有望である。とくに台形ヘムやコバルトヘムではMbの酸素運搬能力が赤血球なみに向上する。

【文献】

- 1) S. Neya; N. Funasaki, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 6725-6728.
- 2) S. Neya, *Molecules* **2013**, 18, 3168-3182.
- 3) S. Neya; T. Yonetani; A. T. Kawaguchi, *Artificial Organs* **2014**, 38, 715-719.

完全合成化合物による酸素錯体の形成とその薬物動態

○北岸宏亮, 加納航治

同志社大学理工学部

1973年, J. P. コールマンらによって酸素分子を可逆的に結合する初のミオグロビンモデル錯体“ビケットフェンスポルフィリン”が合成され, それ以来, 様々なポルフィリン鉄(II)錯体を用いた酸素錯体がつくられてきた。しかしながら, 既報のモデル錯体はいずれも無水の有機溶媒中でのみ酸素を結合し, 生体内と同じ環境である水を媒体とした成功例は, 現在までにほとんど報告されていない。水分の混入により, 中心鉄(II)の自動酸化反応が著しく加速されることが原因である。天然のグロビンタンパク質と同じように, 水中で中心鉄(II)周辺にミクロな疎水環境を構築することは極めて困難であった。

メチル化シクロデキストリン(CD)は水中においてポルフィリン鉄(II)錯体を包接し, ポルフィリン環周辺に強い疎水場をつくり出す。我々の研究グループでは, この現象に注目し, 配位子を組み込んだCDダイマー(Py3CD, 下図)を用いて, 水中・室温で可逆的に酸素を結合するモデル錯体“hemoCD”の合成に成功した(下図)¹⁾。現在までに, このhemoCDの分子構造に改変を施すことによって, さまざまな特徴を有する酸素錯体を構築してきた¹⁻⁵⁾。本講演では, hemoCD およびその類縁体の酸素親和性, 一酸化炭素親和性, 自動酸化速度, ラットを用いた薬物動態などのデータを示し, 最近の研究の進捗状況について紹介する。

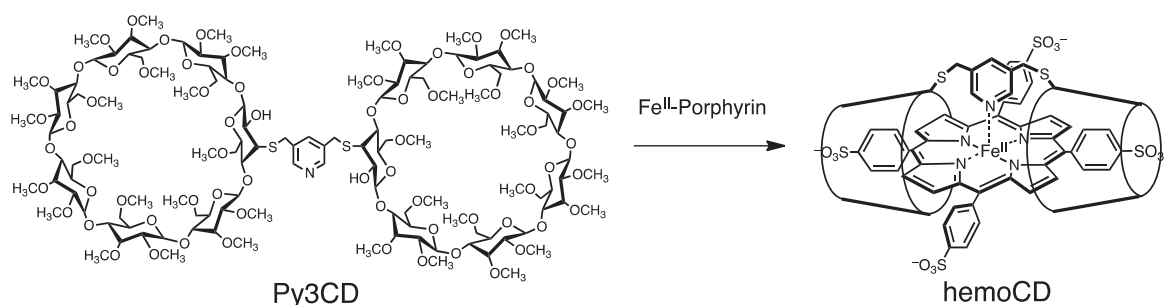


Figure 1. Structure of Py3CD and its inclusion complex, hemoCD.

【文献】

- 1) K. Kano, H. Kitagishi, M. Koder, S. Hirota, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 435.
- 2) 北岸宏亮, 加納航治, *人工血液*, **2009**, *17*, 160.
- 3) H. Kitagishi, S. Negi, A. Kiriya, A. Honbo, Y. Sugiura, A. T. Kawaguchi, K. Kano, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1312.
- 4) K. Kano, S. Chimoto, M. Tamaki, Y. Itoh, H. Kitagishi, *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 453.
- 5) K. Karasugi, H. Kitagishi, K. Kano, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 2365.

HemoAct™ の血液適合性および安全性評価

○春木理沙¹, 神山育男², 松田信作², 河野光智², 田口和明³, 永尾紗理⁴, 丸山 徹⁴, 小田切優樹³, 小松晃之¹

¹ 中央大学理工学部, ² 慶應義塾大学医学部, ³ 崇城大学薬学部, ⁴ 熊本大学薬学部

【緒言】 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-HSA₃, 製剤名“HemoAct™”)を開発し, 新しい人工酸素運搬体としての実用化を目指した研究を進めている¹⁻⁴⁾. 本報では HemoAct™ の血液適合性および安全性評価を実施したので報告する.

【実験】 高純度 bovine Hb と HSA を二官能性架橋剤 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 (Superdex 200pg) により Hb-HSA₃ (HemoAct™) を単離した ([Hb]=5 g/dL). Hemox Analyzer を用いて酸素結合解離曲線を測定, 酸素親和性の指標である P_{50} , Hill 係数(n)を決定した. HemoAct™/血液 (1/1 (v/v)) 混合溶液の溶液粘度, 赤血球(RBC)数, 白血球(WBC)数, 血小板(PLT)数, 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)から血液適合性を評価した. また, Wistar 系雄性ラットに HemoAct™ を投与 (6 mL/kg) した後の血圧変化を観測, 状態観察 (7 日間) と血液生化学的検査を実施した. さらに ¹²⁵I 標識した HemoAct™ を Wistar 系雄性ラットに投与 (2.0×10^6 cpm/匹) し, 血中濃度の推移を観測した.

【結果と考察】 HemoAct™ の P_{50} は 9 Torr, n は 1.5 であった. 自動酸化速度定数(k_{ox})は 0.035 h^{-1} であり, 酸素錯体の安定度は native Hb ($k_{ox}=0.037 \text{ h}^{-1}$) より増大した. 一般に修飾 Hb 製剤の k_{ox} は native Hb より高くなるが, HemoAct™ では中心 Hb が HSA で覆われているため, ヘム鉄の酸化が抑制されていると考えられる.

HemoAct™/血液 (1/1 (v/v)) 混合液のずり速度-粘度曲線は非ニュートン性を示し, ずり速度 230 s^{-1} における粘度は 3.3 cP であった. RBC, WBC, PLT 数は混合比に依存して変化し, 混合 6 時間後まで一定値を保った. 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™ 投与直後に一過性の血圧変化が見られたものの, 10 分以内には HSA (20 g/dL) 投与群と同等値を示した. 投与後 7 日間の体重増加量, 7 日後の血液生化学的検査の結果は, 未投与群, HSA 投与群と同等であった. HemoAct™ の血中半減期 ($t_{1/2}=18.5 \text{ h}$) は HSA ($t_{1/2}=11.0 \text{ h}$) よりも長く, 高い血中滞留性が明らかとなった.

【結論】 HemoAct™ の粘度測定, 血球数測定, 血液凝固能検査から, 高い血液適合性が明らかとなった. また血液生化学的検査, 血圧測定から HemoAct™ の安全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.
- 2) H. Hosaka, R. Haruki, K. Yamada, C. Böttcher, T. Komatsu, *PLOS ONE* **2014**, 9, e110541.
- 3) Y. Daijima, T. Komatsu, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 14716.
- 4) 小松晃之, 化学と工業, **2014**, 67, 677.

Size Effect of Hemoglobin-Albumin Microspheres on Cellular Uptake and Cell Viability (ヘモグロビン／アルブミンマイクロスフィア型人工酸素運搬体の細胞取り込みと生体適合性を与えるサイズの影響)

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

¹ 東京大学大学院工学系研究科, ² 東京大学大学院医学系研究科,

³ 工学院大学環境エネルギー化学科, ⁴ 東京大学生産技術研究所

Introduction Artificial hemoglobin-based oxygen carriers (HBOCs) are required for regeneration of large 3D tissues in vitro. However, cytotoxicity may occur due to the cellular uptake of nano-sized HBOCs [1]. Shirasu Porous Glass (SPG) membrane emulsification technique is an efficient method to fabricate uniform emulsions due to the narrow pore size distribution feature. In this study, we apply this technique to prepare uniform micron-sized hemoglobin-albumin (Hb-BSA) microspheres with different diameters, and investigate the size effect on cellular uptake and cell viability.

Materials and methods The disperse phase (2 mL, contain 10 wt% Hb and 10 wt% BSA) was pressurized by N₂ through the SPG membrane (pore size: 0.5 - 10 μm) to the continuous phase (20 mL kerosene with 1% TGCR), subsequently cross-linked with 10 μL glutaraldehyde (25%). The size distribution was determined by WinROOF software. Oxygen dissociation curve and Hill plots were measured by Hemox analyzer. Raw264.7, HepG2 and HUVEC cells were used for the following experiments. Cellular uptake study was performed by flow cytometry by measuring the autofluorescence from Hb. Cells were loaded with hydroxyphenyl fluorescein then treated with microspheres to perform the reactive oxygen species (ROS) assay. The biocompatibility of the microspheres was examined by MTT assay.

Results and discussion Uniform Hb-BSA microspheres were successfully fabricated with diameters ranged from 1.2 to 18.3 μm, CV values were below 13%. The P₅₀ values and Hill coefficients of each size of microspheres were around 9.5 mmHg and 1.4, respectively. Raw264.7 phagocytosis microspheres below 5 μm as well as the detection of corresponding ROS; while HepG2 and HUVEC cells do not uptake micro-sized microspheres. Size dependency of the microspheres was observed in viability of the three cell lines. Therefore, the effect of the microspheres from the outside of the cells such as lipid oxidation might play an important role in interaction between cells and the present microspheres.

Reference

1) K. Montagne, H. Huang, K. Ohara, K. Matsumoto, A. Mizuno, K. Ohta, Y. Sakai, *J. Biosci. Bioeng.*, **2011**, 112, 485.

シンポジウム2 S10

酸素マイクロ・ナノバブル分散液を用いた完全液体換気への応用

○垣内健太¹, 松田兼一², 針井則一², 青木順子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)が進められたが、材料自体の問題により現在研究全体が縮小傾向にある。そこで、我々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マイクロ・ナノバブル(MNB)に注目し、MNB 分散液を PFC の代替液として TLV への応用を目指した。今回は、MNB 液の有用性をガス運搬能及び TLV からの復帰を目指して評価した。

【方法】 重力差を利用した TLV 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それぞれ使用した実験を行った。(実験Ⅰ)*in vitro* 試験としてモデル肺への流入部位より得た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。(実験Ⅱ)*in vivo* 試験では構築した TLV システムを用いて 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性を評価した。(実験Ⅲ)6 分間以上の TLV を行いその後人工呼吸器に付け替えを行い TLV からの復帰を試みた。実験Ⅱで用いた評価項目に加え A line より採血した血液のガス分析を行った。

【結果および考察】 実験Ⅰから、酸素マイクロ・ナノバブル分散液は生理食塩水の約7倍もの酸素含量を持つことが明らかとなった。実験Ⅱ試験から、TLV モデルラットの40分間以上の生存を達成した(生理食塩水では6分のみ)。また、酸素含量と生存時間に正の相関が認められたことから酸素含量のさらなる増加により生存時間の延長が期待される。実験Ⅲから TLV 復帰後人工呼吸器による呼吸管理で血中酸素飽和度および血圧の回復が確認できた、しかし、二酸化炭素分圧および pH を正常値まで回復させることができなかった。これは、肺内部の液体が完全には除去されなかったため換気障害が生じたと考えられる。

【結論】 酸素マイクロ・ナノバブル分散液は肺内部でも酸素キャリアーとして機能することを確認できた。TLV 後の肺には生理食塩水が残存しているため酸素ガスは拡散するものの二酸化炭素の拡散に障害が残ることが分かった。肺内部から液体を効率よく除く工夫が今後必要となる。

人工血小板／H12 (ADP) リボソームの製造工程・品質の管理

武岡真司

早稲田大学理工学術院

【緒言】 我々は、合成ペプチド(H12)を表面に担持し、ADP を内包させた H12(ADP)リボソームを、止血能を有するリボソーム製剤として開発してきた。本リボソームは、異なる機能を有する 6 種類の分子が集合して特定の集合構造を形成することによって成る製剤である。そのため定められた方法によって得られた試料の構造の確認や成分の定量を厳密に行い、規格範囲内にあることを確認した上で種々の試験に供されなければならない。今回は、大学の 1 研究室内の限られた条件の中でリボソーム製剤の製造工程・品質の管理をするためのシステムの構築について報告する。

【方法】 本リボソーム製剤の調製工程は、H12 結合 PEG 脂質の有機合成、混合脂質の調製、ADP 内包リボソームの調製ならびに未内包 ADP の除去と濃度の調整、の大きく 3 工程からなる。スケールアップを鑑みて、大型エクストルーダーと限界ろ過膜を導入した。各工程は標準操作手順書(SOP)として文書化し、更にこれを実施する際のチェックリストを整備した。

本リボソーム製剤の仕様は、粒子径とその分布(動的光散乱法)、ゼータ電位(ゼータサイザー)、脂質組成(NMR)、H12 の定量(蛍光)、内包 ADP / 未内包 ADP の定量(HPLC)によって求め暫定版として定めた。各測定においても SOP を定め、チェックリストならびに生データをエクセル上にて管理し、各項目が自動計算によって仕様表に反映される様にした。これらの SOP やチェックリスト、エクセルデータはクラウド上で管理され、複数によるチェックならびに確定するプロセスを整えた。

【結果および考察】 大学の研究室は担当学生の入替わりが激しく、また個々の研究テーマには創造的なものが求められる。従って、既に確立された試料の大量製造を管理するためには、誰でも行える様な分かり易い SOP の構築が必要である。経験値の異なる複数の学生に SOP とチェックリストを使ってもらい、ヒアリングを重ねて誤解の生ずる余地をできるだけ排除し、画像や動画を取り込んだ分かり易い SOP を構築することができたと思われる。また、チェックリストも紙媒体から電子媒体へと移行し、その管理体制を構築した。あらゆるレベルの失敗を共有し、解決策を確定できたら文書化し、SOP やチェックリストを随時バージョンアップできる体制を重視した。この様な変更は管理上望ましくないとの考えもあるが、大学の性格上創造的な活動による課題解決と文書による共有化は意義があると考えた。

【結論】 大学の研究は兎角研究者個人のスキルや能力に依存する 경우가多いが、共同研究者に試料を配布したり企業に技術移転する段階になると製造工程や品質の管理が重要となり、個人に依存する体制には無理がある。そのために分かり易い SOP やチェックリストの構築による大学の技術の標準化は今後益々重要となると思われる。

シンポジウム3 S12

血小板減少状態における血小板代替物 H12 (ADP) リポゾームの体内動態解析

○橋本麻衣¹, 田口和明², 大柿 滋¹, 異島 優¹, 渡邊博志¹, 西川可穂子³, 木下 学³, 武岡真司⁴, 池田康夫⁴, 半田 誠⁵, 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防衛医大, ⁴早稲田大学理工学術院, ⁵慶応義塾大医学部

【緒言】 H12 (ADP) リポゾームは、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。薬物の体内動態は、非臨床試験及び初期の臨床試験において必須な情報であり、臨床適用で想定される種々の条件下で、血中滞留性、臓器分布、代謝性及び臓器蓄積性を評価する必要がある。実際、ナノ医薬品の開発に関する厚生労働省/欧州医薬品庁の共同リフレクションペーパーにも、安全性の観点から体内動態解析の重要性が明記されている。このような背景のもと、H12 (ADP) リポゾームの体内動態解析に取り組んできた^{1,2)}。今回は、H12 (ADP) リポゾームの適応症を考慮し、血小板減少状態における体内動態について検討した。

【実験】 血小板減少症モデル動物として、ブスルファン誘発血小板減少症ラットと希釈性血小板減少症ラットを用いた。H12 (ADP) リポゾームの体内動態は、脂質膜部分のコレステロールを³Hで、内封したADPを¹⁴Cで標識化し、放射活性をモニタリングすることで解析した。

【結果と考察】 血小板減少症時におけるH12 (ADP) リポゾームの体内動態を解析したところ、健常時と比べて、血中滞留性が若干低下していたものの、主に肝臓と脾臓に分布して代謝された後に、脂質膜は糞中へ、内包されたADPは尿中へ排泄された。また、臓器蓄積性も認められなかった。繰り返し投与したところ、健常動物では、PEG化リポゾーム製剤の臨床応用における課題の一つである“Accelerated Blood Clearance (ABC) 現象”が観察されたものの、血小板減少状態では、ABC現象の原因となるIgM抗体の産生亢進が減弱化し、顕著なABC現象は認められなかった。

【結論】 H12 (ADP) リポゾームは、適応症である血小板減少状態でも、血小板代替物として求められる体内動態特性を保持していた。また、繰り返し投与時においても、ABC現象を引き起こしにくい可能性を見出すことができた。これからの知見は、H12 (ADP) リポゾームの臨床応用を視野に入れる場合、有用な基礎的情報になると思われる。現在、サル及びヒトにおける体内動態解析の実施で必要とされる放射活性に依存しない新たな評価法の確立を試行している。

【文献】

- 1) Pharmacokinetic study of the structural components of adenosine diphosphate-encapsulated liposome coated with fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute, *Drug Metab Dispos*, **41**, 1584-91 (2013).
- 2) Pharmacokinetic study of adenosine diphosphate-encapsulated liposome coated with fibrinogen γ -chain dodecapeptide as a synthetic platelet substitute in an anticancer drug-induced thrombocytopenia rat model, *J Pharm Sci*, **102**, 3852-9 (2013).

人工血小板 /H12 (ADP) リボソームの超微形態的検討 — in vitro および in vivo における人工血小板の挙動に関する電顕的観察—

○鈴木英紀¹, 萩沢康介², 木下 学², 武岡真司³, 半田 誠⁴

¹ 日本医科大学共同研究センター・形態解析共同研究施設, ² 防衛医科大学,

³ 早稲田大学理工学術院, ⁴ 慶應義塾大学医学部輸血・細胞療法センター

【緒言】 フィブリノゲン g 鎖 C 末端のドデカペプチド (H12) を結合させた人工血小板 H12-リボソームは、ヒト血小板浮遊液のコラーゲンおよび ADP により惹起される血小板凝集を促進させることを報告してきた。今回、トロンビン刺激凝集または非凝集時における H12-リボソームの挙動および ADP を内包させた H12 (ADP) リボソームのウサギ肝出血モデルでの人工血小板の分布を電顕的に観察した。

【方法】 1) in vitro の検討は、3.8% クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として健常人ボランティアの肘静脈から採血し、遠心して多血小板血漿 (PRP) を得て、さらに遠心してペレットを HEPES-Tyrode 液で洗浄した血小板浮遊液を用いた。これに H12-リボソーム (最終濃度 2mg/ml) を加え、トロンビン (最終濃度 0.1 U/ml) を加えて 37℃ で攪拌または非攪拌で、10, 30 秒および 5 分間静置し、固定後、電顕試料とした。凍結超薄切片を作製し、ウサギ抗 H12 抗体、さらにコロイド金標識二次抗体を使う免疫電顕法で観察した。一部は急速凍結レプリカ法で観察した。2) in vivo の検討では、血小板数を $19.5 \pm 5.8 \times 10^4/\text{ml}$ ~ $5 \pm 0.6 \times 10^4/\text{ml}$ に減少させたウサギで行った。すなわち、右大腿動脈および左大腿静脈にカニューレションを行い、動脈は脱血と動脈圧測定用、静脈は輸液および輸血用とし、脱血と低分子デキストラン液および洗浄赤血球の輸血を繰り返し、血小板数を減少させた。この後、ウサギを開腹し、肝臓の一葉に Derma punch (直径 5mm) を刺して貫通、損傷させ、oozing 出血を持続させた。バルーンカテによる圧迫止血を行いながら、直ちに H12-(ADP) リボソームを体重当たり 20mg/kg 投与した。同時に、損傷 0 分から 5 分経過後、および 5 分から 10 分経過後の出血量を測定し、止血を確認できたものは閉腹し、臓器出血量と 24 時間の生命予後について比較した。このようなウサギの一部は肝出血部を切り出し、電顕検索試料とした。

【結果】 1) H12-リボソームを凍結超薄切片法で観察すると、直径 100~400nm 前後の粒子状を示し、リボソームに特徴的な二重膜も観察された。免疫電顕法では、H12 の存在を示す金粒子がリボソーム上に特異的に分布した。凍結レプリカ法では、リボソームは球状に観察された。血小板に H12-リボソーム、さらにトロンビンを加えて攪拌すると凝集が起こる。血小板間には大きな隙間が見られた。この隙間には免疫電顕法で観察すると金粒子でラベルされたリボソームが分布していた。急速凍結エッチングレプリカ法では、血小板間にリボソームが多数観察され、大部分のリボソームは楕円体を示した。非凝集の血小板では、リボソームは血小板表面および開放小管系中に見られた。2) 肝損傷部では多くの赤血球、少数の白血球が見られ、損傷部からやや遠い部位にフィブリンに囲まれた血小板凝集塊が観察された。凝集塊中には in vitro の凝集塊と同じように隙間が見られ、この中にリボソームが多く観察された。

【考察】 in vitro および in vivo の実験で、人工血小板のリボソームはともに血小板凝集塊に巻き込まれることを観察した。これらの結果は、人工血小板が血小板減少状態であっても、血小板凝集塊を大きくすることによって生体の止血に強く関与するものと考えられた。

シンポジウム3 S14

出血性ショック時の蘇生輸血(赤血球：血小板：血漿の1：1：1輸血)と血液代替物使用の可能性

○萩沢康介¹, 木下 学², 西川可穂子³, 柳川鍊平⁴, 多喜川真人⁵, 土井麻美⁵, 武岡真司⁵, 半田 誠⁶, 斎藤大蔵⁷, 関 修司², 西田育弘¹

¹ 防衛医科大学校生理学講座, ² 免疫微生物学講座, ³ 救急部, ⁴ 防衛医学講座, ⁵ 早稲田大学先進理工学部, ⁶ 慶應大学医学部, 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】 我々は低血小板状態で進行する出血に対して, H12 (ADP) リボソーム投与が血小板輸血と同等の止血救命効果を発揮し, 血小板代替物として機能することを報告してきた¹. 一方で最近, 出血性ショックの蘇生には赤血球：血小板：血漿を1：1：1でバランス良く投与することが推奨されている. 今回は易出血性病態における出血性ショックが血小板のみならず赤血球輸血が必要となるような重篤な出血病態を作製し, この救命対策に着目したモデル開発を紹介する.

【実験】 2kgの家兎で脱血と, 血小板・血漿成分を遠心分離し赤血球のみの返血を繰り返し, 循環血液量のほぼ2倍となる400mlの血液交換を行う. この過程でHb値が6g/dlを下回った場合に, あらかじめドナー家兎から用意した濃厚赤血球を輸血する(平均投与量8ml). 400mlの血液交換終了後に, 肝臓に臓器損傷を作成し臓器出血を起こさせる. 出血部位にdamage control(圧迫止血)を行いながら, 血小板・凝固因子の輸血(補充)を行ない, 急性期予後を比較する.

【結果と考察】 400mlの脱血返血で, 平均血圧(MAP)36mmHg, Hb 5.7g/dl, 血小板数 $44 \times 10^3/\mu\text{L}$ に低下した. 赤血球輸血後はHb 7.3g/dlまで上昇した. 肝損傷部の出血量(損傷から10分間)は平均25mlとなり, 凝固因子(+赤血球輸血)のみ補充した群では止血不能で全例が数時間以内に出血死した. 血小板補充(凝固因子+赤血球輸血)群は平均25分で止血され75%が救命できた. 今後は赤血球：血小板：血漿の蘇生輸血を各代替物で置換できるかを検討していく予定である.

【文献】

- 1) Hagsawa K, Nishikawa K, Yanagawa R, Kinoshita M, Doi M, Suzuki H, et al. Treatment with fibrinogen γ -chain peptide-coated, adenosine 5'-diphosphate-encapsulated liposomes as an infusible hemostatic agent against active liver bleeding in rabbits with acute thrombocytopenia. *Transfusion*. 2014 Aug 22. doi: 10.1111/trf.12829. [Epub ahead of print]

一般演題 1 G1

(ヘモグロビン-アルブミン) クラスター “HemoAct™” の分子構造調節

○山田佳奈¹, 春木理沙¹, 田口和明², 永尾紗理³, 丸山 徹³, 小田切優樹², 小松晃之¹

¹ 中央大学理工学部, ² 崇城大学薬学部, ³ 熊本大学薬学部

【緒言】 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)を共有結合した(ヘモグロビン-アルブミン)クラスター(Hb-HSA₃, 製剤名 “HemoAct™”)を開発し, 人工酸素運搬体製剤としての実用化を目指した研究を進めている¹⁻³⁾. 本報では, 従来のHb-HSA₃に加え, HSA 結合数を増やした Hb-HSA₄, さらに Hb の Cys-93(β) を分子内架橋した $\beta\beta$ Hb-HSA₃ を新たに合成し, その構造と酸素結合能を明らかにしたので報告する. また, これら 3 種の製剤をラットに投与した後の血中滞留性についても評価したので併せて報告する.

【実験】 高純度 bovine Hb の PBS 溶液([Hb]=0.1 mM)に架橋剤 Succinimidyl-4-[N-maleimido- methyl]cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) を加え, Hb の分子表面にマレイミド基を構築した後, 過剰量の HSA ([HSA]/[Hb]=40 (mol/mol)) と反応させることにより Hb-HSA₄ を合成した. また, 二官能性架橋剤 1,11-Bis(maleimido)triethyleneglycol [BM(PEG)₃]を用いて Hb の β 鎖にある Cys-93 を分子内架橋した $\beta\beta$ Hb を作成し, それをコアとした $\beta\beta$ Hb-HSA₃ を合成した. Hb 定量/蛋白質定量から平均 HSA 結合数を決定, 等電点電気泳動から pI 値を測定した. 酸素親和性の指標である P_{50} 及び Hill 係数(n)は Hemox Analyzer を用いて決定した. また ¹²⁵I 標識した Hb-HSA₃, Hb-HSA₄, $\beta\beta$ Hb-HSA₃ を Wistar 系雄性ラット(8 週令)に投与(2.0 × 10⁶ cpm/ 匹)し, 血中濃度の経時変化を観測した.

【結果と考察】 SMCC 及び HSA の添加量を従来法の 2 倍にすることで, Hb-HSA₄ を合成することができた(Hb1 分子当たりの平均 HSA 結合数は 4.2). 等電点(pI=5.0)は Hb-HSA₃(pI=5.1)よりも HSA (pI=4.9)に近づき, 酸素親和性は Hb-HSA₃ と同値(P_{50} =9 Torr)であった. 一方, SDS-PAGE から Cys-93(β) が分子内架橋した $\beta\beta$ Hb の生成を確認. この $\beta\beta$ Hb をコアとして合成した $\beta\beta$ Hb-HSA₃ の等電点(pI=5.1)は Hb-HSA₃ と同等であり, 酸素親和性, 酸素錯体安定度は Hb-HSA₃ よりやや増大した(P_{50} =6 Torr).

Hb-HSA₃, Hb-HSA₄, $\beta\beta$ Hb-HSA₃ の血中半減期($t_{1/2}$)はそれぞれ 18.5 h, 19.1 h, 13.8 h であり, HSA($t_{1/2}$ =11.0 h)よりも長いことがわかった. これは大きな分子サイズによるものと考えられる.

【結論】 HSA 結合数を増やした Hb-HSA₄, Hb の Cys-93(β) を分子内架橋した $\beta\beta$ Hb-HSA₃ を合成し, その特徴, 酸素結合能を明らかにした. ラット投与後の血中濃度推移から Hb-HSA₃, Hb-HSA₄ および $\beta\beta$ Hb-HSA₃ の $t_{1/2}$ を測定, いずれも高い血中滞留性を有することがわかった.

【文献】

- 1) D. Tomita, T. Kimura, H. Hosaka, Y. Daijima, R. Haruki, K. Ludwig, C. Böttcher, T. Komatsu, *Biomacromolecules* **2013**, 14, 1816.
- 2) H. Hosaka, R. Haruki, K. Yamada, C. Böttcher, T. Komatsu, *PLOS ONE* **2014**, 9, e110541.
- 3) 小松晃之, *化学と工業*, **2014**, 67, 677.

一般演題1 G2

ポリリン酸修飾ヒアルロン酸ゲルを用いた新規局所止血材の開発

○迫田 龍¹, 穂積卓朗², 金子 誠³, 太田誠一⁴, 市村重俊¹, 矢富 裕³, 伊藤大知^{2,4}

¹ 神奈川工科大学大学院工学研究科, ² 東京大学大学院工学系研究科, ³ 東京大学医学部附属病院, ⁴ 東京大学大学院医学系研究科

【緒言】 現在, 臨床現場では酸化セルロースやフィブリン糊などが外科用局所止血材として使用されるが, 炎症の増大や感染症のリスクがある^{[1],[2]}. このため我々は, これら副作用の可能性が低い生体親和性に優れたヒアルロン酸(HA)を用いた2液混合型のゲルであるHAXゲルと, 止血作用を示す材料であるポリリン酸(PolyP)に注目した^[3]. HAXはHAの一部にヒドラジド基を修飾したHA-ADHとアルデヒド化したHA-CHOから成り, 両者を混合することで架橋が形成され, 局所で速やかにゲルを作製できる. またPolyPは, 血小板の濃染顆粒に存在し, 出血時に放出されて血液凝固カスケードの複数のステップに関与し, 止血効果を示すことが近年明らかになりつつある. 本研究では, PolyPで修飾したHAXゲルを作製し, 2液混合型の新規局所止血材の開発を目指した.

【実験】 HA-ADH(HA分子量800kDa, 修飾率56.3%)のヒドラジド基の一部に対し, イミダゾールで活性化したヘキサメタリン酸(重合度13)を用いて, PolyP修飾HA(HA-PolyP)を合成した. FT-IRにて合成の確認を行い, モリブデンブルー法によるリンの滴定によって, PolyPの修飾率を算出した. そして, 止血効果を検討するためにヒト標準血漿(コアグトロールN: シスメックス製)と凝固により形成されるフィブリン塊の弾性変化を継続的に測定可能なソノクロット(IMI社)を用いて, 活性化剤が存在しない系でフィブリン塊の弾性変化を評価した.

【結果と考察】 PolyPがADHに対して7.06%, HA全体のカルボキシル基に対しては3.97%修飾されたHA-PolyPの合成に成功した. 血漿を用いた止血効果を検証した結果, HA-PolyPの添加による弾性率の上昇が確認された. よって, HA-PolyPの一部がフィブリン繊維形成時に取り込まれてフィブリン架橋を補強することが示唆され, クロット弾性率上昇が加速し, 最終的に弾性率が増加していると考えられた. 以上よりHA-PolyPを用いた2液混合型の新規局所止血材としての利用が期待される.

【文献】

- [1] Jean E. Bjorenson *et al.*, *Journal of Endodontics*, 1986, **12** (7), 289-292.
- [2] Hardean E. Acheck *et al.*, *Annals of Surgery*, 2010, **251** (2), 217-228.
- [3] Stephanie Smith, James H. Morrissey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006, **103** (4), 903-908.

【謝辞】 ソノクロット装置をお貸しいただいたIMI株式会社に感謝致します.

一般演題2 G3

ラット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後の循環動態

○松田信作¹, 神山育男¹, 河野光智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 奈良県立医科大学医学部化学教室

【緒言】 血液代替物として開発されたヘモグロビン小胞体(HbV)はヘモグロビンを期限切れのヒト赤血球から精製濃縮し、リン脂質小胞体に内包した小球粒子(直径 250nm)である。血液型がなく、ウィルスなどの感染源を排除し、室温で2年以上の保存が可能であり、これまでに動物実験において酸素運搬体として機能する事が確認され、出血性ショック蘇生液としての効果と安全性が実証されている。我々は手術中の大量出血に対する投与により、赤血球輸血の回避が可能となると期待されている。これまでに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 HbV 投与の有効性と安全性を確認しているが、本実験ではラットに対して肺切除術を行い、同時に循環血液量の30%を脱血する肺切除周術期出血モデルを作成した。観血的動脈圧モニタリングを行い、ヘモグロビン小胞体投与が循環動態に及ぼす影響を評価し、ヘモグロビン小胞体投与の有効性と安全性を検証する。

【実験】 Wistar ラット(雄性, 8 週齢, 体重 250~300g)に麻酔をかけた後、頸動脈と頸静脈にカニューレを挿入する。動脈圧連続モニタリングを開始する。経口挿管し、人工呼吸器に接続して一回換気量 10ml/kg body weight, 呼吸回数 80/min, PEEP 2~3cmH₂O, FiO₂ 0.21, セボフルレン 0.5~1.0% で維持する。第5肋間開胸し、肺門を一括結紮した後、左肺を切除する。血圧の変動に注意し、頸動脈カニューレより全循環血液量の30%を脱血する。脱血量と等量のヘモグロビン小胞体分散液を頸静脈ラインから輸液する。その間、動脈圧の連続モニタリングを継続し記録する。閉胸し手術を終了する。人工呼吸器を止め、自発呼吸を確認後、抜管する。血圧モニタリングは術後1時間まで継続する。

【結果と考察】 肺切除後のラットの収縮期血圧は100mmHg 前後であった。30%の脱血により30~50mmHg 程度の血圧低下を認めたが、ヘモグロビン小胞体の投与により速やかに血圧は上昇し回復し、投与後10分での血圧は110mmHg 前後であった。その後も血圧は1時間以上維持され、閉胸して手術を終了し、人工呼吸器からの離脱も可能であった。

【結論】 ラット肺切除周術期出血モデルを作成し、ヘモグロビン小胞体の投与により血圧が維持され循環動態が安定した。ヘモグロビン小胞体投与は外科的侵襲に加え、呼吸機能が低下する肺切除手術時の出血においても有効である可能性が示唆された。

一般演題2 G4

脳虚血再灌流傷害に対する人工酸素運搬体の経動脈的投与による治療戦略

○鏡谷武雄, 新保大輔, 七戸秀夫, 中山若樹, 数又研, 宝金清博

北海道大学脳神経外科

【緒言】 我々はラットの一過性中大脳動脈閉塞モデル(tMCAO)を用いて, 虚血再灌流(I/R)傷害の治療目的で人工酸素運搬体 Liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) を再灌流領域に経動脈選択的に投与し, 良好な脳保護効果を得ることが出来た¹⁾ので, その機序の考察も含めて報告する.

【実験】 雄のSDラットで糸栓子によるtMCAO(2時間)を行い, 通常の再灌流をする群(control群), 再開通内頸動脈よりLEHを灌流する群(LEH群), 生理食塩水を灌流する群(vehicle群)を作成した. LEHはHb濃度が6g/dlのものを20ml/kgで投与した. 投与速度の違いで, ①白血球の流入抑制に重きを置いた2時間投与実験, ②酸素投与に重きを置いた15分投与実験の二つのシリーズの実験を行った. 各ラット群とも24時間後に神経障害度を評価した後, 脳組織を摘出して, 脳梗塞, 浮腫の範囲をTTC染色で評価し, 好中球の脳内浸潤をmyeloperoxidase (MPO) のWestern blottingで評価し, MMP-9の発現, 活性をWestern blotting, Zymographyで評価し, 脳血液関門(BBB)の破綻をEvans Blueの脳内浸潤量で評価した. LEHと自己赤血球の組織灌流の状態を検討するため, それぞれヒトHb抗体とラットHb抗体で免疫染色を行い, その灌流範囲を比較検討した.

【結果と考察】 神経障害度はLEH群でcontrol群より有意に軽く, 脳梗塞体積はcontrol群, vehicle群に対して, LEH群で有意に縮小し, また脳浮腫もLEH群で縮小した. MPOの発現, MMP-9の発現と活性もLEH群で抑制された. またLEHの投与によりBBBの破綻も減少した. これらの脳保護効果は2時間投与実験と15分投与実験ではほぼ同等であった. Hbの免疫染色の結果では, I/R領域微小血管内においてLEHの方が自己赤血球に比べて, より微小な血管を灌流しており, LEHは病的に狭窄を来した微小血管においても効果的に灌流する可能性が考えられた.

【結論】 今回の検討から, 経動脈的LEH投与が白血球の流入を部分的には抑制し, また, より微小な血管に効果的に酸素を運搬することにより, 脳保護効果を発揮していると考えられた. 血管再開通後に虚血再灌流傷害の可能性のある重症脳梗塞に対しては, このLEH投与が新たな治療戦略の一つの候補になりうるものと考えられた.

【文献】

1) Shimbo D, Abumiya T, Shichinohe H, Nakayama N, Kazumata K, Houkin K. *Brain Res.* **2014**, 1554, 59.

一般演題2 G5

CD68⁺CD206⁺クッパー細胞選択的ナノ抗酸化剤のポリチオール付加マンノースアルブミンは急性肝障害を抑制する

○丸山 徹¹, 前田仁志¹, 田口和明², 異島 優¹, 渡邊博志¹, 木下 学³, 小田切優樹²

¹熊本大学薬学部, ²崇城大学薬学部, ³防衛医大

【緒言】 近年, クッパー細胞由来の活性酸素種が種々の肝疾患の発症や進展において重要な役割を果たしていることが明らかとなっている. 本研究では, クッパー細胞表面のマンノース受容体に着目し, マンノース残基を有する組換え型ヒト血清アルブミン (Man-HSA)¹⁾ に, ラジカル消去基としてチオールを導入したクッパー細胞指向型ナノ抗酸化剤を新たに作製し, その治療効果と作用機序を急性肝障害モデルマウスを用いて検討した.

【実験】 Man-HSA はピケア酵母発現系より調整した. Man-HSA を 2-イミノチオランで SH 修飾することで, SH-Man-HSA を作製した (SH 付加度: 7.5 mol SH/ mol Man-HSA). 1) コンカナバリン A (Con-A) 誘発肝炎マウスの作成は Con-A (0.25 mg/mouse) を静脈内単回投与して, 2) アセトアミノフェン (APAP) 誘発肝炎マウスの作成は APAP (300 mg/kg) を腹腔内単回投与して作成した.

【結果と考察】 SH 基を導入したことで, SH-Man-HSA のラジカル消去能は著しく亢進した. SH-Man-HSA の体内動態を検討した結果, 静脈内投与された SH-Man-HSA は速やかに血中から消失し, 肝臓に分布すること, また肝臓内では大部分がマンノース受容体を介してクッパー細胞に移行することが明らかとなった. 興味深いことに, SH-Man-HSA はクッパー細胞 (KC) の中でも CD68⁺/CD206⁺ 細胞に選択的に分布していた. 致死性 Con-A 肝炎マウスに, SH-Man-HSA を静脈内投与したところ, その生存率を有意に改善した. SH-Man-HSA は, Con-A 肝炎マウスの肝障害を有意に抑制したが, その構成要素である HSA, Man-HSA 及び SH-HSA では十分な保護効果が認められなかった. このことから, SH-Man-HSA の場合, SH 基とマンノース残基の両方が肝保護効果に必須であることを確かめることができた. その際, SH-Man-HSA は肝臓中の酸化ストレスマーカーを顕著に抑制していた. フローサイトメトリーにより, F4/80⁺ROS⁺KC 由来の ROS 量を測定したところ, Con-A 処理により陽性細胞の割合と ROS 量が増加したものの, SH-Man-HSA はそれらの増加を有意に抑制した. SH-Man-HSA は, APAP 肝炎マウスに対しても, Con-A 肝炎と同様な機序で肝保護効果を発揮した. 最後に臨床応用を考慮して, 後投与での治療効果を検討したところ, 標準薬として繁用されている N-アセチルシステイン (NAC) とは対照的に, SH-Man-HSA は Con-A 及び APAP 投与後の 4 時間目に投与しても優れた肝保護効果を発揮した. これらの結果から, SH-Man-HSA は CD68⁺CD206⁺KC へ選択的に分布し, それより産生される ROS を効率よく除去することで, 優れた肝保護効果を発揮することを明らかにした.

【結論】 今回の検討から, 個々の急性肝疾患で病態発症機序あるいは初期段階における進展機序は異なるものの, CD68⁺CD206⁺KC 由来の ROS が肝障害の進展において重要な役割を果たしている可能性を見出すことができた. クッパー細胞指向型ナノ抗酸化剤である SH-Man-HSA は, この CD68⁺CD206⁺KC 由来の ROS を効率よく除去することができるため, 種々の急性肝障害に対する治療薬としての応用が期待される.

【文献】

- 1) Genetically engineered mannosylated-human serum albumin as a versatile carrier for liver-selective therapeutics, *J Control Release* **2010**, 145, 9-16.

一般演題2 G6

横紋筋融解症誘発急性腎障害に対するアルブミン-チオレドキシン融合体の治療効果と機序解明

○大柿 滋¹, 田口和明², 西田健人¹, 小玉あずさ¹, 渡邊博志¹, 異島 優¹, 深川雅史³, 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東海大学医学部

【緒言】 横紋筋融解症に伴う急性腎障害(AKI)は、横紋筋の融解に伴う大量の活性酸素種の産生と炎症により誘発される予後不良な酸化ストレス疾患である。しかしながら、現在の治療法は対症療法のみで未だ有効な治療戦略の確立はない。最近、我々は抗酸化・抗炎症蛋白質であるチオレドキシン(Trx)とヒト血清アルブミン(HSA)を融合し、優れた血中滞留性を有した融合蛋白質(HSA-Trx)を作製した。本研究では、横紋筋融解症 AKI に対する HSA-Trx の治療効果と機序解明について、グリセロール誘発横紋筋融解症 AKI マウスを用いて評価した。

【実験】 HSA-Trx は Pichia 酵母発現系より作製した。横紋筋融解症 AKI モデルは 24 時間絶水したマウスに 50% グリセロール(10mL/kg)を筋肉内投与することで作製した。致死性 AKI モデルでは 50% グリセロールを 13mL/kg で投与した。グリセロール投与直前に、PBS, HSA, Trx 及び HSA-Trx を尾静脈投与し、腎機能、腎組織、腎組織中酸化ストレスに加え、炎症性サイトカイン発現量を評価した。また、FITC 標識 HSA-Trx の静注後の腎切片を用いて腎臓内局在を検討した。

【結果と考察】 生食投与群では、グリセロール誘発横紋筋融解症に合併する AKI の発症を反映して、血清尿素窒素(BUN)及び血清クレアチニン(Cr)の有意な上昇と、クレアチニークリアランス(CCr)の有意な低下が観察された。一方、HSA-Trx 投与群では、それらパラメータの変動が健常レベルまで改善していた。その際、腎機能の回復を反映して、HSA-Trx 投与群では、尿量の正常化と、横紋筋融解症 AKI に特徴的な褐色尿の軽減化が認められた。これとは対照的に、HSA 及び Trx 単独投与群では腎機能の回復は観察されなかった。このことから、HSA-Trx による保護効果は、HSA と Trx の融合化によることが判明した。腎組織学的評価から、生食投与群では、尿細管の核脱落、円柱の形成、TUNEL 陽性細胞の増加に加えて腎組織中の酸化ストレスが亢進していたが、HSA-Trx の投与はこれらの変動を有意に抑制した。また、HSA-Trx 投与群では、生食投与群で認められる炎症性サイトカインの産生増加を有意に抑制していた。さらに、致死性 AKI モデルを用いて 10 日間の生存観察を行ったところ、生食投与群に比べて、HSA-Trx 投与群の生存率は有意に上昇した(20% vs 57%)。最後に、FITC-HSA-Trx を投与して融合体の腎臓内動態について検討した結果、投与 1 時間後において、尿管上皮細胞に FITC 由来の蛍光が観察された。ここで抗 HSA 抗体及び抗ヒト Trx 抗体を用いた検討から、この蛍光が HSA-Trx に由来することを確認した。従って、HSA-Trx は血液及び間質側で生物活性を発揮するだけでなく、一部は腎尿細管上皮細胞に取り込まれ、細胞内からも作用するものと推察された。本研究では、HSA-Trx が、血中及び腎臓内の両面で、Trx の有する抗酸化・抗炎症及び抗アポトーシス作用を持続的に発揮する結果、横紋筋融解症 AKI に対する治療薬としての可能性を見出した。

一般演題2 G7

小角・広角 X 線溶液散乱法によるヘモグロビンの立体構造再構築と濃厚ヘモグロビン溶液中の蛋白質間相互作用に対する pH 効果の精密評価

○佐藤高彰¹, 酒井宏水²

¹ 信州大学繊維学部, ² 奈良県立医科大学医学部

【緒言】 酸素運搬を担う球状蛋白質であるヘモグロビン(Hb)は、赤血球細胞質液の主成分であり、 300 mg mL^{-1} という例外的な高濃度で機能する。一般に、蛋白質間相互作用の変調は、蛋白質凝集に起因する疾病発生に関与する重要な問題である。疾病ヘモグロビン(HbS)の繊維形成による鎌型赤血球症はその一例である。我々は、小角散乱法を用いて濃厚 Hb 溶液中の Hb 間相互作用の解明に取り組み、生理条件(150mM PBS, pH7.4)の水溶液中では、 300 mg mL^{-1} 以上の高濃度であっても Hb は疑似的な剛体球のように振る舞うことを示唆してきた。本研究では、pH を 6.0~8.0 の範囲で変化させた際の Hb 間相互作用の変調について詳細に議論する。

【実験】 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、ヘモグロビン小胞体(HbV)調整^[1]と同様の手法で精製した Hb を用いた。溶媒には 150mM PBS 溶液(pH7.4)を用い、少量の HCl または NaOH を加えることで、溶液 pH の調整を行い、pH6.0, 7.0, 7.4, 8.0 の4つの溶液条件で Hb 溶液を調整した。重篤なケトアシドーシスでは血液の pH が 7.0 を下回ることも起こりえるため、本検討は生理学的にも意味がある。Hb の濃度範囲は、 $c=487\text{ mg mL}^{-1}$ まで拡張した。小角・広角 X 線散乱測定には、Anton Paar 社の SAXSess カメラを用い、 $0.08 \leq q/\text{nm}^{-1} \leq 28$ (q は散乱ベクトル)を網羅する絶対強度測定を実現した。

【結果と考察】 仮想的アミノ酸残基の集合体を最適化して溶液散乱データから蛋白質立体構造を再構築する手法^[2]に対し、干渉性散乱の効果を解析的に除去した濃厚系の散乱曲線を積極的に利用したり、希薄系と濃厚系の散乱関数を異なる q -range で融合させて分析に用いる等、新しい適用法を提案した。これにより、溶液中の Hb は結晶構造と極めて近い立体構造を維持していることを証明した。pH 変化に伴い(微差ではあるが)測定精度から十分判別可能な特徴的な差異を小角領域に観測した。しかし、既存の分析法では、これを定量的に説明することは困難であった。そこで、規格化した散乱強度 $I(q)/c$ を低濃度(5 mg mL^{-1})で決定した形状因子 $P(q)^{\text{exp}}$ で除して実験的構造因子 $S(q)^{\text{eff}}$ を求め、これにポテンシャルモデルを一切仮定せず二体相関関数 $g(r)^{\text{eff}}$ を算出する逆フーリエ変換分析法(SQ-IFT法)^[3]を適用して、pH 変化を反映した Hb 間相互作用の変調を可視化することに成功した。溶液 pH を 7.4 から Hb の pI に近い 7.0 へと低下されると、静電反発の無効化により Hb 分子間の最近接距離は接触距離近くまで減少し、 $g(r)^{\text{eff}}$ の第一ピークが有意に鋭くなる。その際、第一配位殻は収縮し、配位数は 15% 程度低下する。同時に浸透圧縮率に比例する $S(q \rightarrow 0)$ の値は僅かに増加する。このように、pH 変化に対し、Hb 間相互作用は変調されるが、なおも剛体球相互作用に近い状態を維持しており、多くの蛋白質が等電点(pI)付近で、凝集体を形成したり、沈殿を生じるのと対照的である。このような分子間相互作用の‘堅牢さ’が恒常性維持に重要な役割を果たしていると予想される。

【文献】

- [1] H. Sakai, H. Horinouchi, M. Yamamoto, E. Ikeda, S. Takeoka, M. Takaori, E. Tsuchida, K. Kobayashi, *Transfusion* **46**, 339 (2006).
[2] D.I. Svergun, M.V. Petoukhov, and M.H. J. Koch, *Biophys. J.* **80**, 2946 (2001).
[3] T. Fukasawa and T. Sato, *PCCP* **13**, 3187 (2011).

【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。

第 21 回日本血液代替物学会年次大会の開催につきましては、各企業、財団法人より
ご支援をいただいております。ここに社名、法人名を記して謝意を表します。

The 21st Annual Meeting of the SBSJ is partially supported by the following
companies and foundation.

エーザイ 株式会社

一般財団法人 化学及血清療法研究所

共立製薬 株式会社

旭光通商 株式会社

島津サイエンス東日本 株式会社

株式会社 十條合成化学研究所

株式会社 高長

日本分光 株式会社

後援：中央大学

わが国の血友病止血治療薬の進歩と展望

Recent Progress and Perspectives of Hemostatic Therapeutics in Patients with Hemophilia in Japan

吉岡 章

Akira Yoshioka

和文抄録

血友病治療の歴史は、その「光」である止血治療薬（補充療法剤）の進歩と「影」であるヒト免疫不全ウイルス・肝炎ウイルスの感染および高額医療費の中で大きな変遷を遂げてきた。本稿では、第Ⅷ因子・第Ⅸ因子製剤の進歩について、血漿やクリオプレシピテートから最近のモノクローナル抗体精製製剤や遺伝子組換え型製剤までレビューするとともに、増大する止血治療薬の使用量とその高額医療費に言及した。止血治療薬の重要な合併症であるインヒビターの発生について、インヒビター用の止血治療薬は有効ではあるが高額であることを述べ、その使用ガイドライン（日本血栓止血学会）を紹介した。加えて、次世代の血友病止血治療薬の展望について解説した。

Abstract

The history of hemophilia treatment has drastically changed with regard to prognosis in patients with hemophilia, namely, novel therapeutics for hemostatic replacement therapy ("light") on one hand, and infections from human immunodeficiency virus and hepatitis B/C viruses as well as enormous costs ("shadow") on the other hand. Biomedical technologies have developed factors Ⅷ and Ⅸ concentrates from plasma/cryoprecipitate to monoclonal antibody-purified products/recombinant products. The quantitative use of these products has recently been on the marked increase. Inhibitor development is one of the severe complications in hemophilia treatment. The characteristics of inhibitor-bypassing agents are useful, but extremely costly and treatment guidelines designated by the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis are revealed. In addition, hemostatic therapeutics in the next generation of hemophilia treatment with or without inhibitor are discussed.

Keywords

hemophilia, hemostatic therapeutics, factor Ⅷ concentrates, factor Ⅸ concentrates, inhibitor-bypassing agents

I. 緒 言

血友病は X 連鎖劣性遺伝性の血液凝固障害症で、第Ⅷ因子 (FⅧ) 遺伝子異常による血友病 A と第Ⅸ因子 (FⅨ) 遺伝子異常による血友病 B とに大別される。その頻度は男子出生 1 万人に 1~2 人で、わが国の生存患者数は A：約 4000 人、B：約 1000 人である。FⅧ凝固活性 (FⅧ：C) または FⅨ凝固活性 (FⅨ：C) の欠如~低下は生涯にわたる重篤な出血症状をもたらす。主な症状は、反復性の皮下、関節、筋肉出血で、適切な止血治療が行われないと、歩行障害などの肢体運動機能障害を来す。時に、頭蓋内出血や消化管出血、尿路出血など致命的な出血や後遺症をもたらすこともある。

血友病の止血治療の根幹は欠乏する FⅧ (FⅨ) の経静脈的補充療法である。その歴史は、「光」である止血治療薬の進歩と「影」である止血治療薬によるヒト免疫不全ウイルス (HIV) や肝炎ウイルス (HBV/HCV) などの感染症および高額医療費であり、これら光と影の歴史の中で大きな進歩を遂げてきた¹⁾。

本稿では、主に、止血治療薬（補充療法剤）の進歩の歴史と今後の先進的治療薬開発の展望について解説する。

II. 止血治療薬の進歩

1. 血友病 A 止血治療薬の変遷 (表 1)

止血治療薬の変遷は血友病の医学・医療の進歩の歴史であ

奈良県立医科大学名誉教授・前学長 〒634-8521 奈良県橿原市四条町 840 Nara Medical University, 840 Shijo-cho, Kashihara, Nara 634-8521, Japan
Emeritus Professor, Former President, Nara Medical University
論文受付 2014 年 8 月 29 日 論文受理 2014 年 9 月 3 日

る²⁾。現在、国内で市販されている治療薬を表2に示す。

1) Cohn 分画 I, クリオプレシピテート製剤

1970 年代に初めて Cohn 分画 I や Pool & Shanonn (1964) のクリオプレシピテート（以下、クリオ製剤）が凍結乾燥された市販品として登場し、それ以前の全血輸血や血漿輸注に代わって画期的な変革をもたらした。しかし、クリオ製剤（2 単位(U)/mL, 1 単位とは正常血漿中の FⅧ:C 量である）には大量のフィブリノゲンなどの夾雑蛋白が存在し、純度は FⅧの比活性で 0.25 U/mg 程度であった。実際の治療現場では注射筒（当時はガラス製が主流）が進まないほど粘稠で、点滴輸注が必要場合も多かった。アナフィラキシー反応の他、頻回反復投与を必要とする大出血や手術では循環血漿量の増大や高フィブリノゲン血症もしばしばみられた。なお、本剤は 2 人以下の国内有償ドナー由来であったことから HIV 感染はなかった。

2) FⅧ濃縮製剤

1979 年にはクリオ製剤の欠点を補う形で、FⅧ濃縮製剤 (25 U/mL, 比活性 0.41-0.86 U/mg) が承認、販売された。濃縮度が高いことから、少用量投与で患者血中の FⅧ:C を短時間のうちに正常化することが可能となり、大出血や手術時の止血管理を確実なものにした。また、本製剤によって 1983 年以降自己注射（家庭注射）療法が本格化し、血友病患者の QOL は飛躍的に改善した（光）。

本製剤は、FⅧと von Willebrand 因子（VWF）の複合体製剤で、クリオ製剤よりは少なくなったものの、なお、フィブリノゲンや抗 A・抗 B 凝集素（溶血性貧血の原因）などの混在もあった。また、本剤は輸入品または輸入された大量プール血漿（数千～数万人規模）を原材料として製造された非加熱製剤（当時は加熱処理技術が未開発）であった。その結果、1970 年代後半から 1980 年代前半にかけて HIV や B 型・C 型（当時は非 A 非 B）肝炎ウイルスの混入があり、その後のエイズや慢性活動性肝炎や肝硬変・肝がん発症の原因となった。このことは血友病診療の最も深刻な悲劇となった（影）。

3) 加熱等ウイルス不活化 FⅧ濃縮製剤

ヒト血漿由来ウイルスによる感染症対策として 1985 年には加熱処理法（凍結乾燥前または後）が導入された。加熱以外にも蒸気加熱や S/D（有機溶媒／界面活性剤）処理などが施され、以後、上記ウイルス感染は皆無となった。しかし、一部の耐熱性ウイルスや外殻（envelope）を持たないウイルスに対する殺ウイルス効果は乏しかった。現在市販中のこの種の FⅧ/VWF 製剤（コンファクト F/化血研・アステラス、コンコエイト HT/日本血液製剤機構）はスクリーニング検査（ウイルス核酸増幅検査、NAT）によって厳選された国内献血血漿を材料に製造されており、ナノフィルトレーションでさらなるウイルス除去が図られており、安全である。

4) モノクローナル抗体精製 FⅧ製剤

従来の欠点をほぼ全て克服しうる画期的な血漿由来製剤として、1988 年に抗 FⅧモノクローナル抗体精製製剤（ヘモフィル M/バクスター、1992 年からクロスエイト M/日赤、2013 年からは現クロスエイト MC/日本血液製剤機構）が導入され、

表 1. 第Ⅷ因子製剤の純度の変遷

製剤	承認 (年)	第Ⅷ因子活性 (U/mL)	比活性 (U/mg)
血漿		1	0.012~0.015
クリオ製剤	1970	2	0.25
濃縮製剤	1979	25	0.41~0.86
加熱濃縮製剤	1985	25	0.52~1.015
モノクローナル抗体精製製剤	1988	25, 50, 100, 200	~3,000*
遺伝子組換え型製剤	1993	62.5~750	~3,000* >22,500**

* ヒトアルブミン添加前

** ヒトアルブミン無添加

表 2. 国内で市販されている血友病止血治療薬（2014 年）

	血友病 A	血友病 B	インヒビター保有 血友病
血漿由来	クロスエイト MC (日本血液製剤機構)	ノバクト M (化血研/アステラス)	ファイバ (バクスター)
	コンファクト F ¹⁾ (化血研/アステラス)	クリスマシン M (日本血液製剤機構)	バイクロット ⁵⁾ (化血研)
	コンコエイト HT ¹⁾ (日本血液製剤機構)	PPSB-HT ³⁾ (ニチヤク)	
遺伝子組換え型	コージネイト FS バイ オセット (バイエル)	ベネフィックス (ファイザー)	ノボセブン HI (ノボノルディスク ファーマ)
	アドベイト (バクスター)	オルプロリクス ⁴⁾ (バイオジェン・アイ デック・ジャパン)	
	ノボエイト (ノボノルディスク ファーマ)		
合成	デスマプレシン注 ²⁾ (協和発酵キリン)		

1) FⅧ/VWF 複合体製剤, VWD にも有効

2) 軽症型（一部中等症）血友病 A および VWD type 1 に有効

3) 第Ⅱ, Ⅶ, Ⅸ, X 因子複合体

4) rFⅨFc 領域融合タンパク質製剤（市販予定）

5) 活性型第Ⅷ因子と第Ⅸ因子の配合製剤（市販予定）

現在まで安全に使用されてきている。この製剤は最終添加のヒトアルブミンや残存の少量 VWF 以外にはほとんど夾雑蛋白はなく、FⅧ:C 25-200 U/mL, 比活性約 3,000 U/mg と飛躍的に向上したものである。ナノフィルトレーション（現クロスエイト MC は 19nm）などウイルス不活化・除去処理も行われており、過去 25 年間みるべき副作用の報告はない。

5) 遺伝子組換え型 FⅧ製剤（rFⅧ）³⁾

1993 年には、Chinese hamster ovary (CHO) 細胞や Chinese hamster kidney (CHK) 細胞に正常ヒト FⅧ遺伝子を導入して製造された rFⅧ製剤が承認された。本製剤は基本的には血漿由来製剤の問題点を完全に克服し、かつ、高純度（FⅧ:C 62.5-750 U/mL, 比活性: 3,000-22,500 U/mg 以上）の全く新し

い概念の止血薬である。その後、最終工程でのヒトアルブミン無添加のコージネイト FS バイオセット / バイエルや製造工程におけるヒト・動物由来蛋白無添加の製剤（アドベイト / パクスター）が開発され、市販されている。rFⅧ製剤の導入によって、インヒビター（後述）発生率が上昇する可能性といった新しい課題が危惧されたが、これまでのところ血漿由来製剤と大差なく、安全に使用されている⁴⁾。

6) デスモプレシン注

合成バゾプレシン (1-diamino-8-D-arginine vasopressin) で、視床下部-脳下垂体系を介して FⅧ/VWF の貯蔵部位から FⅧと VWF を放出させ、血中濃度を 2~4 倍上昇させるので中等症~軽症血友病 A および von Willebrand 病 (VWD) type 1 に有効である。

2. 血友病 B 止血治療薬の変遷

1) FⅨ複合体製剤 (表 2)

1972 年からは血漿由来の FⅨ複合体製剤（非加熱）が使用されていたが、1985 年には加熱処理製剤が導入された。現在市販中のものには PPSB-HT（ニチヤク）がある。本製剤中には FⅨ以外にビタミン K 依存性凝固因子（FⅡ, FⅦ, FⅩ）と抗血栓因子（PC, PS）のほか、微量の活性型凝固因子（FⅡa, FⅦa, FⅨa, FⅩa）も含有している。

2) モノクローナル精製 FⅨ 製剤 (表 2)

1993 年にノバクト M/ 化血研とクリスマシン M/ 日本血液製剤機構（FIX：C 50-100 U/mL）が認可され、安全性や至便性が大きく改善した。後者は筆者が作成した FIX モノクローナル抗体を用いている⁵⁾。

3) 遺伝子組換え型 FⅨ 製剤 (表 2)

欧米ですでに使用されていた rFIX 製剤（ベネフィックス / ファイザー）（FIX：C 100-400 U/mL）のわが国での承認・販売は 2010 年と遅れた。本製剤は、血漿由来（pd）FIX に比べて生体内回収率が低いことから、投与量は pdFIX 製剤の約 1.3-1.5 倍量を要する。その原因は CHO 細胞内での FIX 遺伝子翻訳後の分子修飾がヒトの場合と異なることに起因すると推定されている。

3. 止血治療薬の使用量と高額医療費 (表 2)

FⅧ, FIX 製剤の使用量（供給量）は、年度ごとに右肩上がりである。FⅧ製剤では pdFⅧ製剤のシェアが 20% 以下と減少してきている（図 1, 図 2）。患者数（2009 年）が血友病 A 4,317 人、同 B 933 人であることと各止血治療薬の供給量の集計から、血友病 A, B およびインヒビター患者数と製剤使用量および製剤費を算定した（表 3）⁶⁾。患者一人当たりの製剤費のみで、A で年間 600 万円超、B で 300 万円超、インヒビター患者では 2,500 万円超となっている。これらの使用量は、EU の主要国や米国、カナダに比較すると低い。使用量の増加は、患者の安全と QOL の改善や社会進出、社会貢献に大きく寄与してきている点は大きな成果である。しかし、ほぼ全額が公費負担であるわが国では、極めて高額な医療費が投入さ

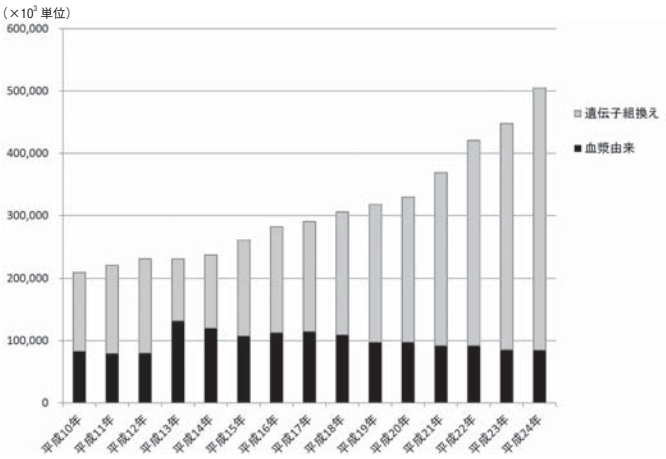


図 1. 血液凝固第Ⅷ因子製剤の供給量および献血由来製剤比率の推移 (日本血液製剤調査機構)

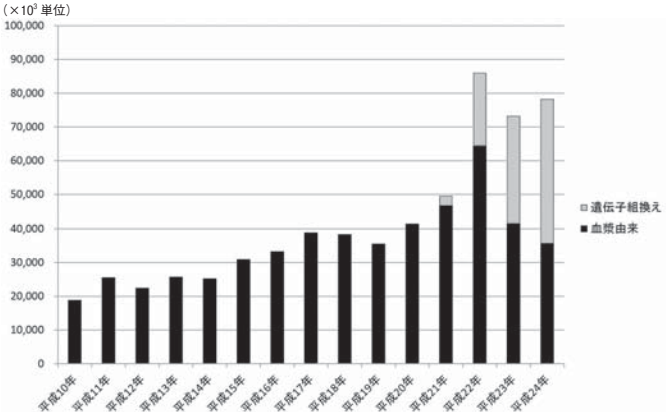


図 2. 血液凝固第Ⅸ因子（複合体を含む）製剤の供給量の推移 (日本血液製剤調査機構)

表 3. 患者一人あたりの年間製剤使用量と製剤費の算定（2009 年度，吉岡）

	患者数 (人)	使用量 (×10 ³ 単位)	単位/人	製剤費 (千円/人/年)
血友病 A	4,317	369,540	85,600	6,180
血友病 B	933	46,796	50,200	3,170
インヒビター保有患者 (A+B)*	330			
ファイバ**		164,000	497,000	10,230
ノボセブン**		56,344(mg)	171(mg)	15,400
				25,630

* A: 4317(人) × 6.5(%) + B: 933(人) × 5.2(%) ÷ A: 281(人) + B: 49(人) = 330(人)

** 血友病インヒビター患者の他に後天性血友病患者への使用も含む

れている点は問題意識をもって直視しなければならない。特に、市販後一定期間が経過した遺伝子組換え型製剤については薬価引き下げが妥当であると考えられる。

4. On demand 補充療法と定期補充療法

出血時に、欠乏する因子を補充して早期止血を図り、関節症などの出血に伴う後遺症を食い止めることが補充療法の目的である。これを on demand 治療（出血時補充療法）という⁷⁾。この場合、可能な限り早期の補充が止血のコツである。この考え方を進化させたものとして自己注射療法（家庭治療）（1983年）があり、2007年の調査では血友病 A 患者の 73% が実施している⁸⁾。

さらに、出血を待たずに一定量の補充を継続する、いわゆる定期補充療法がある。その目標は標的関節（target joint）の回避と重篤出血の予防である。生涯にわたって行われるため膨大な医療費を要するが、その費用対効果が期待されている。すでに欧米では、著しい効果のあることが報告されている。わが国の 2007 年度時点の実施率は 36% であったが、その後増加傾向である⁸⁾。

Ⅲ. インヒビター患者の止血療法

1. インヒビターとは

主として重症血友病患者に FVIII（FIX）補充療法を反復すると、血友病 A 患者の 20～30% に、B 患者の 3～5% にインヒビターである同種中和抗体（IgG4 主体）の発生することがある。インヒビター力価の高いハイレスポンダー（HR, ≥ 5 ベテスタ単位（BU/mL））とローレスポンダー（LR, <5 BU）とに分類されるが、一旦インヒビターが発生すると、従来の補充療法による止血効果は著明に減退～消失し、以後の止血管理が困難となる⁹⁾。

なお、一旦発生したインヒビターは一定期間 FVIII（FIX）製剤を使用しないとその力価は低下するが、HR では製剤の再投与によって 4～7 日後には再上昇する既往免疫反応（anamnestic response）がみられる。

2. インヒビター患者用止血治療薬

現在市販中の製剤を示した（表 4）。1984 年に血漿由来の活性型プロトロンビン複合体製剤であるファイバ（バクスター）が導入された。第 II, VII, IX, X 因子の他、活性型の各因子を含有していることから、FVIII（FIX）をバイパスした止血機序を利用して止血を図るものである。遺伝子組換え型活性型第 VII 因子（rFVIIa）であるエプタコグ アルファ（ノボセブン / ノボノルディスクファーマ）の止血機序は、損傷血管部位に露出、出現した組織因子（TF）が FVIIa と複合体を形成し、これが血小板を活性化し、FXase とプロトロンビナーゼ活性を亢進させ、爆発的なトロンビン形成をもたらすというものである。

インヒビター患者の止血管理ガイドライン（改訂版）が日本血栓止血学会学術標準化委員会の血友病部会から提唱されており、有用である¹⁰⁾。

3. インヒビター患者の免疫寛容導入療法（ITI）¹¹⁾

一旦発生したインヒビターを消失～低下させ、再び通常の補

表 4. インヒビター保有血友病患者用バイパス止血製剤（2014 年）

製剤名(会社名)	1 バイアル (薬価)	使用量・使用法	備考
ファイバ (バクスター)	500 単位 (106,991 円) 1000 単位 (205,823 円)	50～100単位/kg 8～12 時間毎	200 単位/kg/日を越えないこと、トラネキサム酸との併用は避ける、既往免疫反応あり
ノボセブン HI (ノボノルディスクファーマ)	1mg (98,024 円) 2mg (189,000 円) 5mg (450,177 円)	初回 90 μ g /kg, その後60–120 μ g/kgを 2～3 時間毎	トラネキサム酸との併用が有効 (腎尿路出血を除く)、既往免疫反応なし
バイクロット(MC710)* (化血研)	市販予定		

*(FVIIa + FX) 配合製剤

充療法を可能にさせる目的で、FVIII 製剤を反復投与する免疫寛容導入（immune tolerance induction, ITI）療法が行われる。1970 年代に Bonn 大学の Brackmann ら¹²⁾ によって開発された。ITI の奏効率、著者らが参加した国際 ITI 研究¹³⁾ を含め、血友病 A では 70～80% であり、行うべき価値があるが、血友病 B では奏効率が低い。アナフィラキシーやネフローゼ症候群といった危険な合併症もあり、推奨的ではない。

Ⅳ. 次世代止血治療薬

FVIII, FIX の生体内半減期（T_{1/2}）を延長する目的で、既存の FVIII, FIX 製剤に化学修飾や遺伝子改変を施すことで、いわゆる長時間作用型とした製剤が精力的に開発されている。これらは利便性で優れ、医療経済的にも期待できるが、分子構造の改変による新しい抗原基の出現、すなわち、新しいインヒビター出現のリスクなど未解決の問題も多い。FIX 製剤では有力な製剤が出現しつつあるが、FVIII 製剤については現時点では革新的とまでは言えない状況である。

1. 化学修飾による長時間作用型製剤

表 2 の血友病 B 止血治療薬のうち、rFIX と遺伝子組換え IgG1Fc 部分を融合させた糖蛋白（MW 約 10,9000）エフトレノコグ アルファ（オルプロリクス, rFIXFc / バイオジェン・アイデック・ジャパン）は製造販売承認を取得済みである。T_{1/2} β は 82.1 時間と既存の rFIX の 33.8 時間に比べて約 2.5 倍と著明に長い。トラフレベル 1% への低下に要する日数は rFIXFc は 11.2 日で、rFIX 5.1 日に比べて 2 倍強である。なお、この製剤はヒト胎児由来腎細胞により産生されている¹⁴⁾。他の PEG 修飾やアルブミン融合製剤は開発中である。

2. 遺伝子改変による長時間作用型製剤

FVIIa, FVIII, FIX について各社が試作しているが、未成功である。新規抗体（インヒビター）産生の可能性が危惧される。

3. インヒビター患者用新規止血治療薬

1) MC710

FVIIa と FX の配合剤である MC710(バイクロット, 化血研) は FVIIa 単独よりも止血効果に優れているとの考えから、血漿由来 FVIIa プラス FX の配合製剤としてわが国で開発され、治験を終了し製造販売承認を取得済みである¹⁵⁾。

2) ACE910

FVIII の持つ血液凝固補因子作用を代替するヒト化 bispecific 抗体 (ACE910) を最近中外製薬と奈良医大小児科が開発した¹⁶⁾。この抗体は FVIII がリン脂質膜上で演じる FIXa と FX の橋渡しによる FXase 作用を、本モノクローナル抗体 (2 本の Fab のそれぞれが FIXa 結合作用と FX 結合作用を保有) が代替して行うことにより、FVIII の非存在下に血液凝固が進行するという全く新しい概念に基づくものである。従って、インヒビターの有無にかかわらず、1 週間に 1 回程度の皮下注射で出血抑制効果～止血効果があり、定期補充療法薬としても、また、インヒビター患者用止血治療薬としても期待されている。ACE910 は従来の FVIII 製剤の持つ止血治療上の問題点、すなわち、頻回の静脈内投与とインヒビター産生のリスクを同時に回避しうる画期的な製剤で、国際的にも大きな注目を浴びている。すでに、前臨床試験は終了し、ex vivo での血液凝固改善機能は十分である。次いで、第 I 相臨床試験 (二重盲検個体間容量漸増試験) が終了しており、有望である。

謝 辞

本総説論文の概要は、第 20 回日本血液代替物学会年次大会 (2013 年 12 月 6-7 日、奈良市) の特別講演 1 として講演した。指名いただいた大会長酒井宏水奈良医大化学教室教授に深謝いたします。

引用文献

1. Lee CA. Historical introduction. In Lee CA, Berntorp E, Hoots K. ed. Textbook of Hemophilia. 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010; 1-6.
2. 吉岡 章. 血友病治療の過去と未来. 日児誌 1994 ; 98 : 999-1002.
3. Yoshioka A. Products used to treat hemophilia: recombinant products. In Lee CA, Berntorp E, Hoots K. ed, Textbook of Hemophilia. 2nd ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010; 146-152.
4. 日本血栓止血学会学術標準化委員会血友病部会, 凝固因子製剤の種類がインヒビター発現に及ぼす影響, 血栓止血誌, 2007 ; 18 : 87.
5. 吉岡 章, 血友病 B の Translational research —私の血友

病診療と研究の軌跡—, 日児誌, 2009 ; 113 : 1365-1372.

6. 吉岡 章, 血友病治療の進歩と今後の展望, 日小血・がん誌, 2012 ; 49 : 16-23.
7. 日本血栓止血学会, インヒビターのない血友病患者に対する止血治療ガイドライン, 2013 年改訂版, 東京: 一般社団法人日本血栓止血学会, 2013 ; 1-21.
8. 血液凝固異常症全国調査運営委員会, 厚生労働省委託事業 血液凝固異常症全国調査 平成 19 年度報告書, 主任研究者: 瀧 正志, (財)エイズ予防財団, 2008.
9. 嶋 緑倫, 血友病におけるインヒビターの発生機序とその治療戦略, 日小血会誌 1999 ; 13 : 399-409.
10. 日本血栓止血学会, インヒビター保有先天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン, 2013 年改訂版, 東京: 一般財団法人日本血栓止血学会, 2013 ; 1-19.
11. 櫻井嘉彦, 免疫寛容導入療法, 白幡 聡編, みんなに役立つ血友病の基礎と臨床, 大阪: 医薬ジャーナル社, 2009 ; 236-245.
12. Brackmann HH, Gormsen J, Massive factor-VIII infusion in haemophiliac with factor-VIII inhibitor. Lancet 1977; 2: 933.
13. Hay CR, DiMichele DM. The principal results of the International Immune Tolerance Study: a randomized dose comparison. Blood 2011; 119: 1335-1344.
14. Powell JS, Pasi KJ, Ragni MV, Ozelo MC, Valentino LA, Mahlangu JN, Josephson NC, Perry D, Manco-Johnson M, Apte S, Baker RI, Chan GC, Novitzky N, Wong RS, Krassova S, Allen G, Jiang H, Innes A, Li S, Cristiano LM, Goyal J, Sommer JM, Dumont JA, Nugent K, Vigliani G, Brennan A, Luk A, Pierce GF. Phase 3 study of recombinant factor IX Fc fusion protein in hemophilia B. N Engl J Med 2013; 369: 2313-2323.
15. Nakatomi Y, Nakashima T, Gokudan S, Miyazaki H, Tsuji M, Hanada-Dateki T, Araki T, Tomokiyo K, Hamamoto T, Ogata Y. Combining FVIIa and FX into a mixture which imparts a unique thrombin generation potential to hemophilic plasma: an in vitro assessment of FVIIa/FX mixture as an alternative bypassing agent. Throm Res 2010; 125: 457-463.
16. Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, Muto A, Kojima T, Soeda T, Yoshihashi K, Okuyama-Nishida Y, Saito H, Tsunoda H, Suzuki T, Adachi H, Miyazaki T, Ishii T, Kamata-Sakurai M, Iida T, Harada A, Esaki K, Funaki M, Moriyama C, Tanaka E, Kikuchi Y, Wakabayashi T, Wada M, Goto M, Toyoda T, Ueyama A, Suzuki S, Haraya K, Tachibana T, Wakabe Y, Shima M, Yoshioka A, Hattori K. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. Nat Med 2012; 18: 1570-1574.

トピックス

脳虚血再灌流傷害に対する Liposome-Encapsulated Hemoglobin の経動脈的投与による治療戦略

Therapeutic Strategy against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Using Trans-Arterial Administration of Liposome-Encapsulated Hemoglobin

鎧谷 武雄, 新保 大輔

Takeo Abumiya, Daisuke Shimbo

和文抄録

脳梗塞治療では血管を再開通させることが治療の第一歩であるが、再開通が得られても、虚血が深く長い場合は、虚血再灌流 (ischemia reperfusion: I/R) 傷害を引き起こす。I/R 傷害は微小血管レベルの傷害がその病態の主体であり、no-reflow 現象、透過性亢進、壁構造破綻などがみられる。これらの微小血管傷害の形成には白血球の働きが大きく、白血球を抑制することで梗塞縮小効果が得られることが動物モデルで明らかになっている。しかし、白血球の全般的な機能抑制は感染症のリスクを上げる懸念がある。そこで、我々は白血球の流入抑制を目的として、血球成分を含まない人工酸素運搬体である liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) を再灌流領域へ経動脈的に選択的に灌流するという治療戦略を着想した。ラットの一過性中大脳動脈閉塞モデル (2 時間虚血 / 24 時間再灌流) において、再灌流開始時に LEH を再灌流領域へ局所選択的に 2 時間灌流することで、I/R 障害を軽減できるかを検討した。その結果、LEH を投与することで、神経症状の改善、脳梗塞体積の減少、好中球マーカーの myeloperoxidase (MPO)、MMP-9 の減少を認めた。これらの結果から、LEH 投与が白血球の再灌流領域での組織浸潤を抑え、MMP-9 発現を抑制して、脳保護効果を発揮したものと考えられた。次いで、白血球の流入抑制効果がより低いと考えられる LEH の 15 分間投与モデルの実験も行った。15 分間 LEH 投与でも、2 時間投与とほぼ同等の神経・血管保護効果を認め、LEH が自己赤血球に比較してより微小な血管に流入している所見を認めた。今回の検討から、経動脈的 LEH 投与が白血球の流入を部分的には抑制し、より微小な血管に効果的に酸素を運搬することにより、神経・血管保護効果を発揮していると考えられた。血管再開通後に虚血再灌流傷害の可能性のある重症脳梗塞に対しては、この LEH 投与が新たな治療戦略の一つの候補になりうるものと考えられた。

Abstract

Revascularization of the occluded artery is the primary step in treatment of cerebral infarction. Despite successful revascularization, reperfusion after prolonged severe ischemia causes ischemia reperfusion (I/R) injury. I/R injury is thought to be caused mainly by microvascular disorders consisting of no-reflow phenomenon, hyperpermeability, and loss of vascular wall integrity. Many studies have shown that systemic suppression of leukocytes attenuated I/R injury in animal transient ischemic models. However, systemic leukocyte suppression may increase the risk of infection. We therefore developed a new therapeutic strategy to infuse liposome-encapsulated hemoglobin (LEH), an artificial oxygen carrier without blood cells, intra-arterially into I/R region for inhibition of leukocyte influx. We examined whether 2-hour intra-arterial LEH infusion at the beginning of reperfusion could reduce I/R injury in a rat transient middle cerebral artery occlusion (2-hour ischemia/24-hour reperfusion) model. Two-hour intra-arterial LEH infusion mediated neurological improvement, decrease of infarct volume, and lowering of MPO and MMP-9 protein levels. These results suggest that the LEH infusion can reduce I/R injury through reducing leukocyte

北海道大学大学院医学研究科 脳神経外科 〒060-8638 札幌市北区北 15 条西 7 丁目

Department of Neurosurgery, Hokkaido University Graduate School of Medicine, North 15 West 7, Kita, Sapporo 060-8638, Japan.

論文受付 2014 年 8 月 29 日 論文受理 2014 年 9 月 18 日

infiltration with MMP-9 production. Thereafter, we examined the therapeutic effects of 15-minute intra-arterial LEH infusion which would be less effective in terms of inhibition of leukocyte influx. Fifteen-minute intra-arterial LEH infusion showed approximately similar neuro- and vascular-protective effects as 2-hour intra-arterial LEH infusion. Compared with erythrocytes, LEH was infused more into the narrow microvessels. These results suggest that intra-arterial LEH infusion suppress leukocyte infiltration partially and supply oxygen to smaller microvessels effectively, resulting in neuro- and vascular-protective effects. This therapeutic strategy may be a promising candidate to prevent I/R injury after revascularization.

Keywords

artificial oxygen carrier, ischemia reperfusion injury, cerebral microvessel, leukocyte, ICAM-1, MMP-9

はじめに

脳梗塞治療では血栓もしくは塞栓による血管閉塞を解消することが治療の第一歩であり、血管再開通の目的で tissue plasminogen activator (tPA) の点滴投与や血栓除去デバイスを用いた血管内治療が行われる。これらの治療によって再開通が得られた場合、再開通までの時間が短いと虚血に伴う変化は可逆的であるが、その時間が長いと再開通が得られても不可逆的な組織傷害が生じる¹⁾。tPA では4.5時間まで、血管内治療では最大8時間までがそれぞれの治療のタイムリミットであるが、脳血流低下が大きい程、また、再開通までの時間が長くなる程、これらの治療による脳組織のレスキューが難しくなる。特に、主幹動脈閉塞による重症脳梗塞においては再開通が得られても予後不良となる症例が少なくなく、未だ治療に困難を極めている。

虚血再灌流傷害とは

組織の可逆性が失われた状態で再開通があることで逆に組織傷害の悪化を来す現象を虚血再灌流 (ischemia-reperfusion : I/R) 傷害と呼ぶ。I/R 傷害は一過性脳虚血の動物モデルで詳細に研究されているが、活性酸素の産生亢進による脳組織内での細胞レベルの傷害の他に、微小血管レベルの傷害がその病態の主体であると考えられている²⁾。この微小血管傷害のメカニズムとしては、no-reflow 現象、透過性亢進、壁構造破綻があり、それらが複合して循環不全を来し、さらなる梗塞の拡大、重篤な脳浮腫、出血を引き起こす。

no-reflow 現象は、1990年代初めに動物モデルを用いた電子顕微鏡による検討で、脳微小血管内に白血球が固着し、さらに血栓が形成されて血管が閉塞する像として認められた³⁾。その後の分子生物学的な検討では、この画像所見を裏付ける実験結果として、血管内皮細胞において白血球の接着分子である ICAM-1 の発現亢進⁴⁾ や血液凝固のイニシエーターである組織因子の発現亢進⁵⁻⁶⁾ を微小血管レベルで認めている。一方、近年の電子顕微鏡の形態学的な検討では、上記以外の別な要因による微小血管閉塞の所見も得られている。これは虚血後の再灌流3~6時間において微小血管周囲に存在するアストロサイトの終足が一過性に膨化して微小血管を狭小化、もしくは閉塞させる現象である⁷⁾。このアストロサイト終足膨化の病態はまだ十分に解明されていないが、水分子の移動に関わるアクアポリン4の関与の可能性が考えられている。透過性亢進について

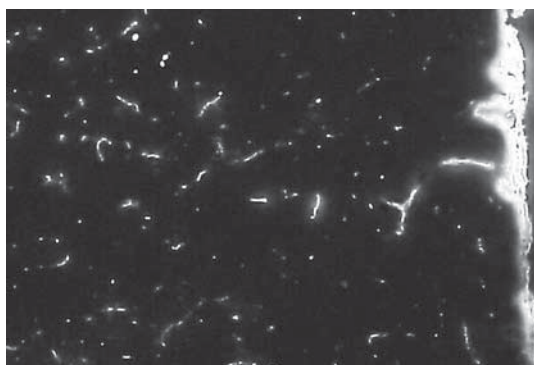
は、血管内皮細胞増殖因子である VEGF の細胞増殖以外の機能としての血管透過性亢進作用によるものと考えられている。I/R 傷害において VEGF を急性期に投与すると脳浮腫の悪化⁸⁾ や出血変化の悪化⁹⁾ が生じ、一方、抗 VEGF 抗体を投与すると浮腫や出血の程度が軽減されることが報告されている¹⁰⁻¹¹⁾。壁構造の破綻については、基底膜の構成蛋白であるコラーゲン type IV の消失が認められ、この変化には白血球から産生されるマトリックスメタロプロテアーゼ MMP-9 が作用している¹²⁾。これらの壁構造の崩壊は血液成分の漏出、すなわち出血の出現に関与する。これらの微小血管傷害の形成をまとめると炎症性変化としての白血球の働きが大きいことが分かる。

脳 I/R 傷害に対する治療戦略

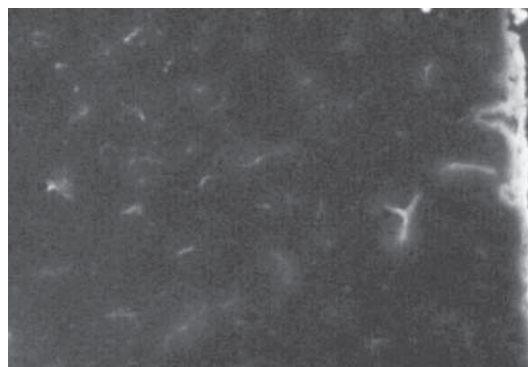
上記の I/R 障害の発生メカニズムから、動物実験では、遺伝子改変、もしくは特異的中和抗体を用いて ICAM-1¹³⁾、MMP-9¹²⁾ を単独で、もしくは白血球¹⁴⁾ を抑制することで梗塞縮小効果が得られることが明らかになっている。しかしながら、この治療戦略をヒトで応用する場合、白血球の全般的な機能抑制につながる可能性があり、感染症のリスクを上げる懸念がある。そこで我々は、I/R が生じる部位に局限して物理的に白血球を流入させないようにできれば、全身の免疫能の低下をみることなく同じような梗塞縮小効果が期待できると考え、血球成分を全く含まない人工酸素運搬体である liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) を再灌流領域へ局所選択的に灌流するという治療戦略を着想した。ラットの一過性中大脳動脈閉塞モデルにおいて、再開通後の内頸動脈から LEH を灌流することで、白血球の流入を抑制して I/R 障害を軽減できるか検討した¹⁵⁾。

人工酸素運搬体としての LEH の特性

人工酸素運搬体として、酸素運搬の効率の良さや安全性からヘモグロビンを基剤とするものが長年に渡り研究されてきた。その中で LEH は高濃度の精製ヘモグロビンをリボソームに内封させたカプセル型の人工酸素運搬体である。我々の使用した LEH はテルモ社で開発されたもので、期限切れの赤血球製剤より抽出・精製したヒトヘモグロビンを平均粒子径が200~250nm の liposome 内に封入したものである¹⁶⁾。製剤化された状態でヘモグロビン濃度が6g/dL、 $P_{50}(O_2)$ が40-50 torr であり、生体内でも良好な酸素運搬能を発揮することが各種動物実験で



LEH (ヒト Hb 免疫染色) の分布



自己赤血球 (ラット Hb 免疫染色) の分布

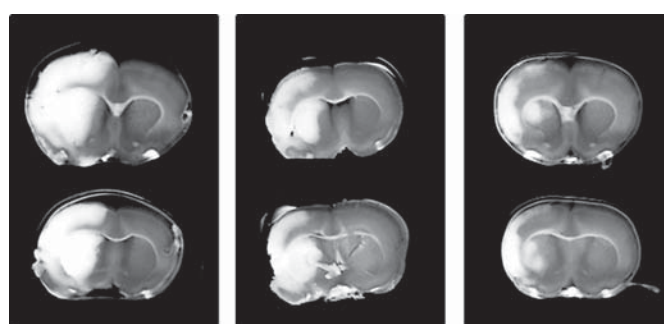
図 1. LEH と自己赤血球の I/R 領域での分布

証明されている。特に LEH は粒径が赤血球の 1/30~40 程度であることより、微小循環領域において赤血球に比べてより効果的に酸素を供給できると考えられている。この特性が脳虚血に対して治療効果を生むものと期待され、全脳虚血モデル¹⁷⁻¹⁹⁾、局所脳虚血モデル²⁰⁻²⁴⁾ に対して LEH の投与実験が行われ、その有効性が報告されている。

脳 I/R 傷害に対する LEH の治療効果の検討

糸栓子によるラットの一過性中大脳動脈閉塞モデル (2 時間虚血 / 24 時間再灌流) を用いて、脳 I/R 傷害に対する LEH の治療効果の検討を行った。2 時間の虚血後に糸栓子を抜いて再灌流を図った後、内頸動脈に選択的カニューレーションをして、そこから LEH を再灌流領域へ局所選択的に投与した (LEH 群)。LEH の溶媒である生理食塩水のみを投与したもの (Vehicle 群)、通常の再灌流のみを行ったもの (Control 群) も作成し、LEH 群と比較した。

白血球の流入を抑制して I/R 障害を軽減できるかを検討する実験では、LEH の投与時間は安定した麻酔管理を行い得る限度から判断し、2 時間と設定して投与量と速度は 10 ml/kg/h とした¹⁵⁾。LEH 投与中の I/R 領域の LEH の灌流の程度を蛍光免疫染色で検討したが、自己赤血球より良好に微小血管内に灌流していることが確認できた (図 1)。自己赤血球の灌流が抑制されていることより、目的とした白血球の物理的な流入抑制もされているものと考えられた。再灌流 24 時間後の評価で、LEH 群では Vehicle 群、Control 群と比較して、神経症状の有意な改善があり、さらに脳梗塞体積 (大脳半球体積に対する % 表示) の有意な減少 (LEH 群: $34.3 \pm 7.9\%$, Vehicle 群: $51.4 \pm 5.2\%$, Control 群: $49.6 \pm 6.4\%$, $p < 0.01$) を認めた (図 2)。また、ウェスタンブロッティングによる患側半球の蛋白定量の検討において、LEH 群で好中球のマーカーである myeloperoxidase (MPO)、蛋白分解酵素の MMP-9 の蛋白量が他の 2 群と比較して有意に減少しており (図 3)、また、ザイモグラフィによる MMP-9 活性の検討でも LEH 群で有意な活性低下を認めた。これらの結果より、LEH を経動脈的に再灌流領域へ選択的に 2 時間投与することは、白血球の再灌流領域での組織浸潤



control vehicle LEH

図 2. LEH 投与による脳梗塞体積の減少

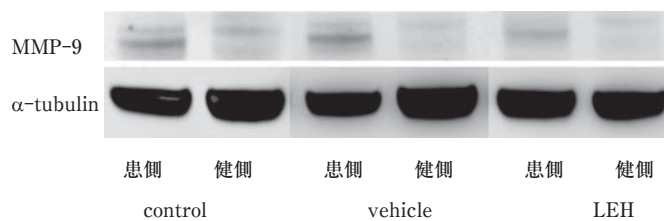


図 3. LEH 投与による MMP-9 発現の減少

を抑え、さらには MMP-9 発現を抑制して、微小血管の機能形態が維持することにより、脳保護効果を発揮するものと考えられた¹⁵⁾。

本実験モデルは、再灌流領域への白血球の物理的な流入抑制を意図するものであったが、LEH の灌流時間は 24 時間続く再灌流の中の最初の 2 時間のみであること、側副血流流入の可能性もあることより (図 1 の免疫染色の結果でも自己赤血球の流入は完全に消失しているわけではない)、白血球流入が完全に抑制されているモデルとは言い難かった。すなわち、白血球の流入抑制以外に LEH 自体が持つ脳保護効果についても検討する必要があると考えられた。この目的で白血球の流入抑制効果がより低くなると考えられる LEH の 15 分間投与モデルの実験を次に行った。

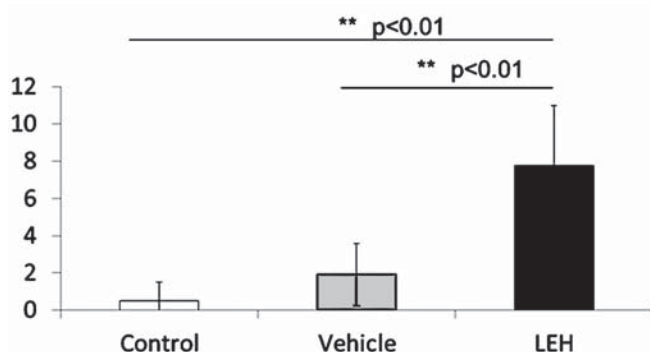


図4. I/R 領域内の Hb が存在した5 μ m 以下の微小血管の数

15 分間投与モデルでは LEH を同じ方法で 80 ml/kg/h で 15 分間投与した。2 時間投与モデルと同様に、LEH 群、Vehicle 群、Control 群の 3 群を設けて比較検討した。まず、LEH 群で他の 2 群と比較して、神経症状の改善、脳梗塞と浮腫体積の減少を認めた。また LEH 群で患側半球の MPO の蛋白量の低下を認め、また、MPO の免疫組織染色でも他の 2 群で認められた好中球浸潤をほとんど認めなかった。Evans Blue 色素の脳内への漏出量は LEH 群で低く、微小血管の壁構造の破綻が抑制されていると考えられた。また LEH 群で MMP-9 の発現と活性の減少、ICAM-1 の発現の減少を認めた。これらの所見は 2 時間投与モデルとはほぼ同等の神経・血管保護効果と言えた。15 分間投与終了後のラット脳を用いて、Hb の免疫染色を用いて微小血管の灌流の程度を各群で比較してみると、他の 2 群の自己赤血球の灌流している微小血管と比較して、LEH 群では血管径のより小さい微小血管にまで LEH が灌流していることが明らかとなった (図 4)。これらの結果から、LEH が虚血再灌流傷害の no-reflow 現象でみられるような内腔が狭小化している微小血管の場合でも、効果的に酸素を運搬することにより、内皮細胞障害が抑えられて、ICAM-1 発現抑制→白血球の接着活性化抑制→MMP-9 発現抑制という一連の現象が生じ、最終的に神経・血管保護効果を発揮している可能性が考えられた。

おわりに

我々の今回の検討からは、I/R 時の LEH の経動脈的投与は、選択的カニューレーションによる投与中は白血球の再灌流領域への流入をある程度部分的には抑制し、投与終了後も LEH が径の縮小した微小血管を循環し続け、効果的に酸素を運搬していると考えられた。これらの LEH による効果が、微小血管の構造機能を維持し、ひいては神経・血管保護効果を発揮したものと考えられた。一方、過去の報告では経静脈投与でも脳保護効果が示されており、今後、いずれの方法がより効果的であるか検討が必要と考えられる。いずれにしても、tPA 点滴治療もしくは血管内治療後に、虚血再灌流傷害の可能性のある重症脳梗塞症例に対しては、この LEH 投与が新たな治療戦略の一つの候補になりうるものと考えられた。

引用文献

1. Shi ZS, Liebeskind DS, Xiang B, Ge SG, Feng L, Albers GW, Budzik R, Devlin T, Gupta R, Jansen O, Jovin TG, Killer-Oberpfalzer M, Lutsep HL, Macho J, Nogueira RG, Rymer M, Smith WS, Wahlgren N, Duckwiler GR; Multi MERCI, TREVO, and TREVO 2 Investigators. Predictors of functional dependence despite successful revascularization in large-vessel occlusion strokes. *Stroke*. 2014; 45: 1977-1984.
2. Wong CH, Crack PJ. Modulation of neuro-inflammation and vascular response by oxidative stress following cerebral ischemia-reperfusion injury. *Curr Med Chem*. 2008; 15: 1-14
3. del Zoppo GJ, Schmid-Schönbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke*. 1991; 22: 1276-1283.
4. Zhang RL, Chopp M, Zaloga C, Zhang ZG, Jiang N, Gautam SC, Tang WX, Tsang W, Anderson DC, Manning AM. The temporal profiles of ICAM-1 protein and mRNA expression after transient MCA occlusion in the rat. *Brain Res*. 1995; 682: 182-188
5. Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, Koziol JA, del Zoppo GJ. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focalcerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*. 1994; 25: 1847-1853
6. Niino M, Nagayama T, Yunoue S, Obara S, Hirano H. Changes in tissue factor and the effects of tissue factor pathway inhibitor on transient focalcerebral ischemia in rats. *Thromb Res*. 2008; 122: 247-255.
7. Ito U, Hakamata Y, Kawakami E, Oyanagi K. Temporary cerebral ischemia results in swollen astrocytic end-feet that compress microvessels and lead to delayed focal cortical infarction. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011; 31: 328-338.
8. Valable S, Montaner J, Bellail A, Berezowski V, Brillault J, Cecchelli R, Divoux D, Mackenzie ET, Bernaudin M, Roussel S, Petit E. J VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-I. *Cereb Blood Flow Metab*. 2005; 25: 1491-1504.
9. Abumiya T, Yokota C, Kuge Y, Minematsu K. Aggravation of hemorrhagic transformation by early intraarterial infusion of low-dose vascular endothelial growth factor after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 2005; 1049: 95-103.
10. van Bruggen N, Thibodeaux H, Palmer JT, Lee WP, Fu L, Cairns B, Tumas D, Gerlai R, Williams SP, van Lookeren Campagne M, Ferrara N. VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J Clin Invest*. 1999; 104: 1613-1620.
11. Kanazawa M, Igarashi H, Kawamura K, Takahashi T, Kakita A, Takahashi H, Nakada T, Nishizawa M, Shimohata T.

- Inhibition of VEGF signaling pathway attenuates hemorrhage after tPA treatment. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011; 31: 1461-1474.
12. Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, Chan PH, Park TS. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005. 289, H558-H568
 13. Connolly ES Jr, Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan SD, Stern DM, Solomon RA, Gutierrez-Ramos JC, Pinsky DJ. Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest.* 1996; 97: 209-216.
 14. Gautier S, Ouk T, Petrault O, Caron J, Bordet R. Neutrophils contribute to intracerebral haemorrhages after treatment with recombinant tissue plasminogen activator following cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol.* 2009; 156: 673-679.
 15. Shimbo D, Abumiya T, Shichinohe H, Nakayama N, Kazumata K, Houkin K. Post-ischemic intra-arterial infusion of liposome-encapsulated hemoglobin can reduce ischemia reperfusion injury. *Brain Res.* 2014; 1554: 59-66.
 16. 金田伸一, 石塚隆伸, 後藤 博, 粕川博明. カプセル型人工酸素運搬体ーリポソーム化ヘモグロビンの開発. *人工血液* 2013; 21: 49-59.
 17. 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. 虚血ー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: 121-126.
 18. Kakehata J, Yamaguchi T, Togashi H, Sakuma I, Otani H, Morimoto Y, Yoshioka M. Therapeutic potentials of an artificial oxygen-carrier, liposome-encapsulated hemoglobin, for ischemia/reperfusion-induced cerebral dysfunction in rats. *J Pharmacol Sci.* 2010; 114: 189-197.
 19. 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.
 20. Kawaguchi AT, Kurita D, Furuya H, Yamano M, Ogata Y, Haida M, . Liposome-encapsulated hemoglobin alleviates brain edema after permanent occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Artif Organs.* 2009; 33: 153-158.
 21. 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: 1626-1632.
 22. 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: 164-168.
 23. Kawaguchi AT, Haida M, Yamano M, Fukumoto D, Ogata Y, Tsukada H. Liposome-encapsulated hemoglobin ameliorates ischemic stroke in nonhuman primates: an acute study. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010; 332: 429-436.
 24. Kawaguchi AT, Haida M, Ohba H, Yamano M, Fukumoto D, Tsukada H. Liposome-encapsulated hemoglobin ameliorates ischemic stroke in nonhuman primates: longitudinal observation. *Artif Organs.* 2013; 37: 904-912.

日本血液代替物学会 総会

1. 日 時：平成25年12月6日（金）13：00～
2. 場 所：奈良県新公会堂（2階会議室）
〒630-8212 奈良県奈良市春日野町101
3. 議 題：① 第20回年次大会の報告
② 会員動向
③ 平成24年度事業報告
④ 平成24年度会計報告
⑤ 平成25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20回日本血液代替物学会年次大会
（大会長 酒井 宏水）
- 2) 開催年月日 平成25年12月6日（金）・7日（土）
- 3) 開催場所 奈良県奈良市春日野町101 奈良県新公会堂
会議室3・4
- 4) 参加範囲 日本血液代替物学会会員、臨床医学・理工学
研究者、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：3社
- 3) 正会員：86名
- 4) 購読会員：3箇所

③ 平成24年度事業報告（平成24年4月1日～平成25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24年10月25日（木）旭川市大雪クリスタルホールに
て開催。
- 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、20巻1号

④ 平成24年度収支決算報告が行なわれ承認された。

平成24年度 収支決算
（自 平成24年4月1日 至 平成25年3月31日）

収 入		支 出	
摘 要	金 額	摘 要	金 額
前期繰越金	7,403,935	会誌出版費	1,436,620
正会員会費	580,000	集会・委員会費	884,143
入会金	25,000	年会補助金	2,000,000
維持会員会費	4,000,000	ホームページ維持費	918,750
賛助会員会費	※ 600,000	謝金	20,000
購読会員会費	30,000	事務費(消耗費)	202,549
学生会員会費	0	事務費(通信費)	71,010
雑収入	1,382,139	雑役務費	57,343
利息	2,944	次期繰越金	8,433,603
計	14,024,018	計	14,024,018

※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年度会計に繰り入れ
た。

⑤ 平成25年度事業（経過報告）

- 1) 定期総会の開催
平成25年12月6日（金）13：00～13：30
於 奈良県新公会堂（会議室3・4）
- 2) 第20回年次大会の開催（大会長：酒井 宏水）
平成25年12月6日（金）・7日（土）
於 奈良県新公会堂（会議室3・4）
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第21巻1号



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: artificial-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

投稿規定（平成25年11月20日改訂）

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

共著者がいる場合には、共著者全員の承諾を得てから投稿する。論文の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, 46)}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

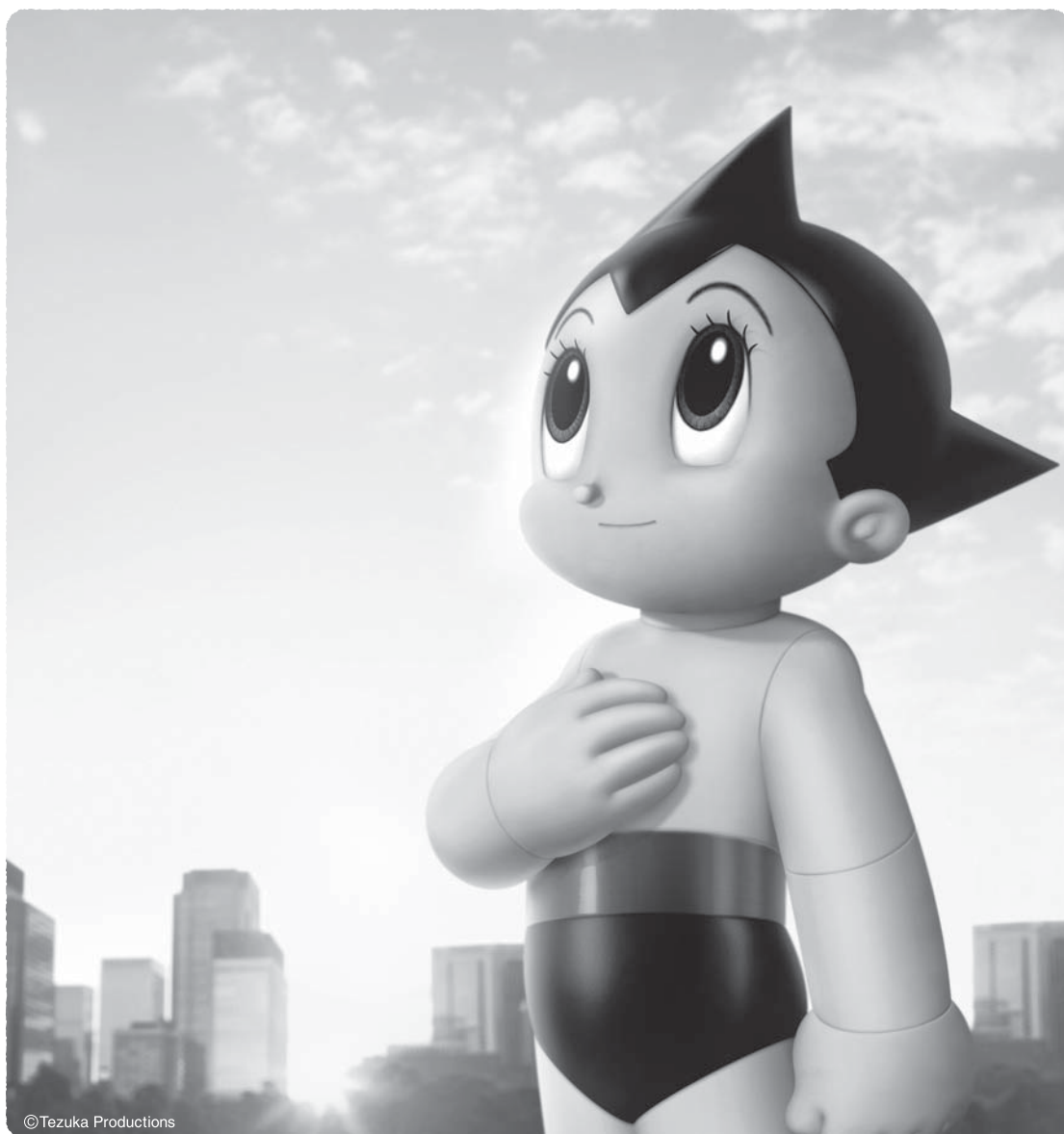
〒634-8521

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



処方せん医薬品：注意一医師等の処方せんにより使用すること
 プロトンポンプ阻害剤

[薬価基準収載]

パリエット[®] 錠10mg
 錠20mg

〈ラベプラゾールナトリウム製剤〉 www.pariet.jp

- 効能・効果、用法・用量及び禁忌を含む使用上の注意等については添付文書をご参照ください。

製造販売元



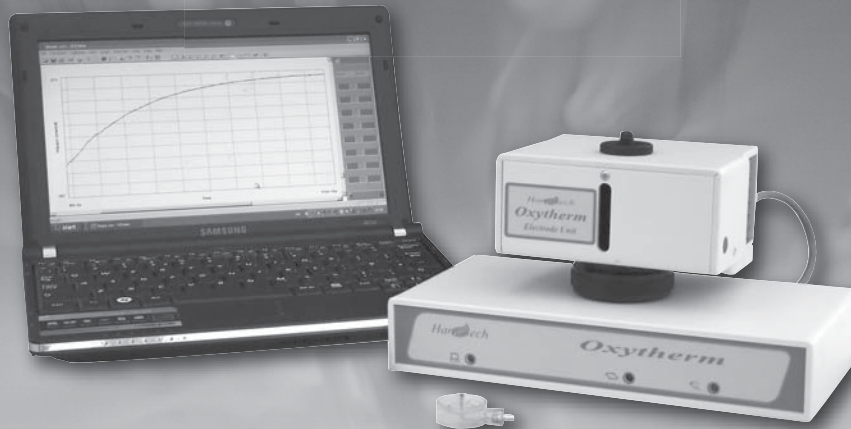
エーザイ株式会社

東京都文京区小石川4-6-10

製品情報お問い合わせ先：エーザイ株式会社 お客様ホットライン
 フリーダイヤル 0120-419-497 9～18時(土、日、祝日 9～17時)

PRT1206M01

温度制御付・溶存酸素測定システム OXYT-1

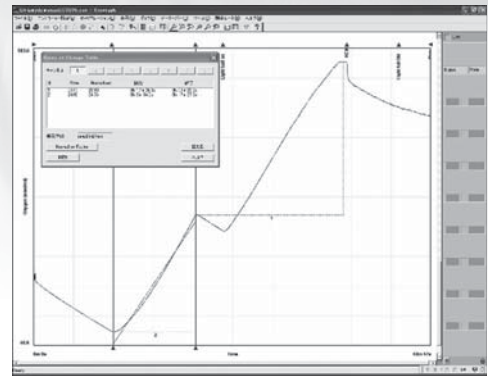


■ OXYT-1 オキシサーモの特長

- 内蔵の温度制御システムにより3～40℃の範囲内を±0.5℃の精度で温度管理ができます
- 測定中の酸素量はリアルタイムでグラフ表示され、指定範囲の酸素速度が自動計算されます。
- コントローラーとスターラーが一体化設計
- プランジャーにはサンプルへの試薬等の追加ができるよう小さな穴が開いています。
- ソフトウェアはWindows XP以上、8.1に対応
- 専用ソフトウェアによる校正及びデータの比較・解析
- 最大8台までコントローラーを接続ができ、同時に測定可能

■ 酸素測定

OXYT-1はサンプルが呼吸、または消費する微妙な酸素量を高速で測定します。クラーク型酸素電極を用い、スターラー付きのコントローラーをパソコンで制御します。測定値はグラフで表示され、速度の計算、拡大・縮小、選択範囲の拡大等ズーム機能も充実しています。



コントロールユニット

スターラー速度	150～900 RPM (ソフトウェアよりコントロール)
寸法	250×125×150 mm (チャンバー含む)
重量	約 600 g
電源	AC100～240V (ACアダプター DC12V)

PELTER チャンバー

サンプル量	200μl～2.5ml
-------	-------------

アクセサリ、消耗品

S4	メンブレン
A2	メンブレンアダプター
S2/P	スターラーバー
S16	電極クリーニングキット

付属品

ACアダプター、シリアルケーブル、アプリケーションソフト

デザイン及び仕様は、予告なしに変更される場合があります。



www.kyokko.com

旭光通商株式会社

本社

〒150-0012 東京都渋谷区広尾1-1-39 恵比寿プライムスクエア2F
TEL:03-6418-6908 FAX:03-6418-6933

光学試験校正室 (商品受入窓口)

〒105-0014 東京都港区芝1-14-4 芝樹田ビルB1F
TEL: 03-6418-6908 FAX:03-6418-6944

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.22(1) 2014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

TOTAL SOLUTION

トータルソリューション

当社は島津製作所を中心に、様々なメーカーの製品を組み合わせることにより、
お客様のお仕事をトータルでサポートいたします。

実験室の設計・製作

前処理

分 析

移 設



島津サイエンス東日本株式会社
SHIMADZU SCIENCE EAST CORPORATION

〒111-0053 東京都台東区浅草橋5-20-8 (CSタワー5階)
TEL:03-6858-4740 FAX:03-6858-4741

<http://www.sse-shimadzu.co.jp>

日本血液代替物学会
<http://www.blood-sub.jp/>