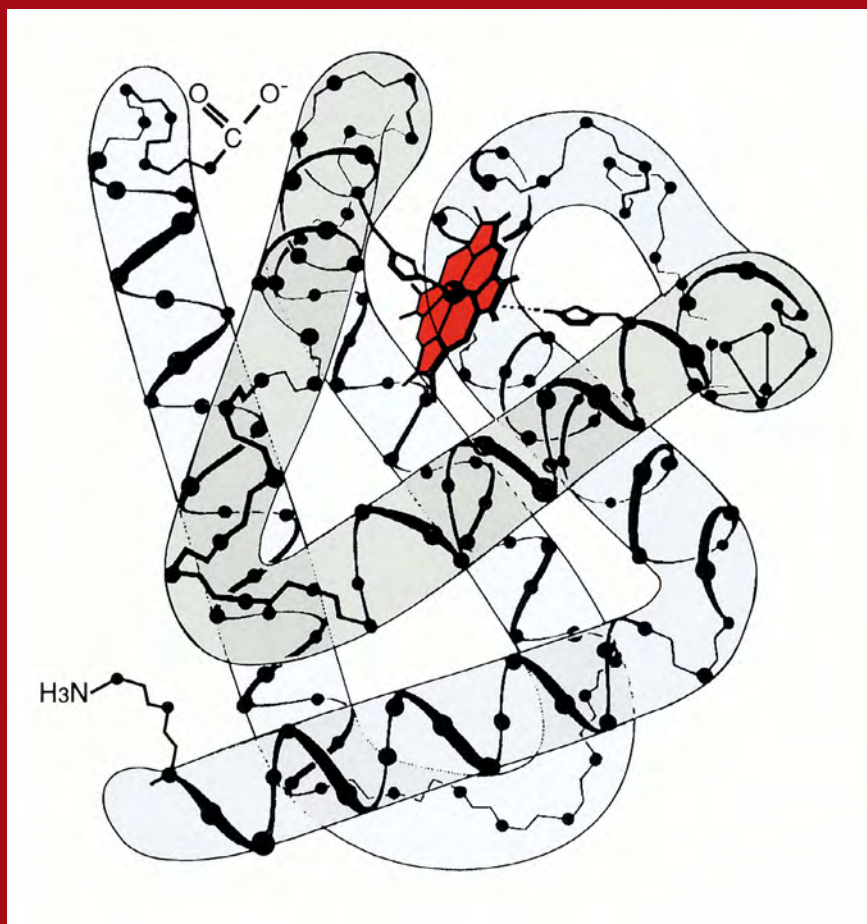


人工血液

VOLUME 31
NUMBER 1
2023

日本血液代替物学会 会誌

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



追悼 高折益彦先生 (1930-2023)

第30回年次大会プログラム

総説:

いまさらヘモグロビン? ヘモグロビンのアロステリーを再考する

トピックス:

獣医学領域における人工血液製剤の必要性和今後の展望

トピックス:

毛細血管ネットワークにおける人工酸素運搬体の分配特性に関する研究

事務局たより

Obituary: Dr. Masuhiko Takaori (1930-2023)

The 30th Annual Meeting Program

Review:

Hemoglobin Now? Hemoglobin Allostery Revisited

Topics:

Necessity and Prospects of Artificial Blood Products in Veterinary Medicine

Topics:

Study on the Partitioning Properties of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers in Capillary Networks

Artificial Blood

The Society of Blood Substitutes, Japan

循環モニタリング All in one システム

HemoSphere Advanced Monitoring Platform

「ヘモスフィア」1台で、
全身および局所の循環を把握、
治療判断をサポートします。

・ All in one システム

モジュール式デザインにより、使用状況に応じた
モニタリングデバイスの選択が可能

・ 多様な画面で見える、分かる

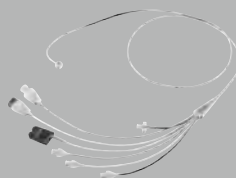
目的に応じて11種類の画面から選択、
血行動態(最大8パラメータ)をリアルタイムで表示



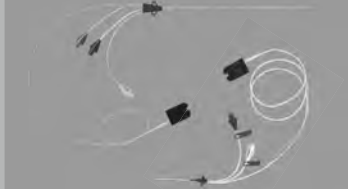
接続可能なモニタリングデバイス



フロートラック センサー



スワンガンツカテーテル



エドワーズオキシメトリーCVカテーテル/
CVオキシメトリーカテーテル・ベディアセット



ForeSight センサ

販売名/承認・認証番号
ヘモスフィア アドバンスドモニタリングプラットフォーム/30200BZX00403
フロートラック センサー/21700BZY00348
スワンガンツ・サーモダイリュション・カテーテル(CCO/CEDV)/22800BZX00144
エドワーズオキシメトリーCVカテーテル/22800BZX00169
CVオキシメトリーカテーテル・ベディアセット/22800BZX00195

※ご使用の際には製品の添付文書を必ずお読みください。
記載事項は予告なく変更されることがありますので予めご了承ください。

Edwards, エドワーズ, Edwards Lifesciences, エドワーズライフサイエンス, 定型化されたEロゴ, FloTrac, フロートラック,
ForeSight, ForeSight Elite, HemoSphere, ヘモスフィア, PediaSat, Swan, Swan-Ganzおよびスワンガンツは
Edwards Lifesciences Corporationまたはその関係会社の商標です。その他の商標はそれぞれの商標権者に帰属します。

© 2022 Edwards Lifesciences Corporation. All rights reserved. EW2022027-4

製造販売元 エドワーズ ライフサイエンス株式会社

本社: 東京都新宿区西新宿6丁目10番1号 Tel.03-6894-0500 edwards.com/jp



Edwards

人工血液

第31巻 第1号 2023年12月

目次

追悼 高折益彦先生 (1930-2023)	3
第30回年次大会プログラム	
大会長挨拶.....	5
大会日程表.....	9
プログラム.....	11
抄録.....	13
総説：いまさらヘモグロビン？ ヘモグロビンのアロステリーを再考する 柴山 修哉	43
トピックス：獣医学領域における人工血液製剤の必要性和今後の展望 富安 博隆	54
トピックス：毛細血管ネットワークにおける人工酸素運搬体の分配特性に 関する研究 百武 徹	59
事務局たより	

ARTIFICIAL BLOOD

Vol. 31 No. 1 December, 2023

Contents

<i>Obituary: Dr. Masuhiko Takaori (1930-2023)</i>	3
<i>The 30th Annual Meeting Program</i>	
<i>Address from the President</i>	5
<i>Schedule</i>	9
<i>Program</i>	11
<i>Abstracts</i>	13
<i>Review: Hemoglobin Now? Hemoglobin Allostery Revisited</i> Naoya Shibayama	43
<i>Topics: Necessity and Prospects of Artificial Blood Products in Veterinary Medicine</i>	Hiroataka Tomiyasu 54
<i>Topics: Study on the Partitioning Properties of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers in Capillary Networks</i>	Toru Hyakutake 59

故高折益彦先生 ご逝去を追悼して

本学会で理事を長らくお勤めくださいました、高折益彦先生が令和5年7月20日に享年94歳でご逝去されました。ご葬儀はご家族のみで執り行われたとのこと。高折先生は、日本血液代替物学会の設立以来、本学会の活動にご貢献くださいました。2009年には第16回年次大会を東京で開催されました。厚労科研の研究班にも長年に亘りご参画いただき、麻酔科医の立場から、人工血液の有効性や安全性、また臨床試験の進め方について重要なご助言をいただきました。微小循環、血液希釈、代用血漿剤に非常に詳しく、本誌にも極めて頻繁にご寄稿いただき(下記参照)、年次大会では、いつも鋭い質問を多くされるなど、ご意見番としてご活躍され、学会の活性化に繋がっておりました。しかし、2017年の年次大会における特別講演「本学会と私の四半世紀」を最後に、学会活動から引退されておりました。個人的には、それまで東宝塚さとう病院には何度も訪問をさせていただき、臨床での使用に即した安全性試験の進め方について、高折先生からご教授いただきました。厳しさの中に優しさを感じておりました。徹底した文献調査に基づいた執筆(下記の著書を開くとご理解いただけます)、筆まめでFAXやメールを何通いただいたことか。今になってみれば、何かと気にかけていただき、感謝しております。高折先生から最後にご連絡をいただいたのは、本年1月19日、新年のご挨拶に対するメールでの返信でした。視力が相当低下していたご様子でしたが、文章に覇気を感じておりました。9月に訃報に接し大変驚き、また本学会の指導者を一人失い、残念に思いました。これまでの本学会に対する並々ならぬご貢献に感謝申し上げるとともに、心よりご冥福をお祈り致します。

日本血液代替物学会 会長 酒井宏水

【高折先生のご略歴】

1960年 大阪大学医学部 卒、医学博士
ピッツバーグ大学麻酔科 留学
1973年 川崎医科大学医学部・麻酔科 初代教授
1996年 岡山県赤十字血液センター・所長
2001年 東宝塚さとう病院・名誉院長

主な著書(いずれも克誠堂出版の発行):
「代用血漿剤と臨床」高折益彦 編著、小堀正雄 著 2004年
「周術期輸血」高折益彦 著 2007年
「代用血漿剤 HES」高折益彦 著 2010年



2017年12月6日、班会議の後に撮影

本誌に掲載された論文:
高折益彦. 内容と名称. 人工血液 28 (1), 57-58 (2020)
高折益彦. 本学会と私の四半世紀. 人工血液 25 (1), 12 (2017)
高折益彦. 人工酸素運搬体とその臨床応用. 人工血液 25 (1), 51-54 (2017)
高折益彦. 人工酸素運搬体制剤の適正粘度. 人工血液 24 (1), 56-62 (2016)
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 19 (1), 3-11 (2011)
高折益彦. 人工酸素運搬体: その将来への期待. 人工血液 15 (3/4), 90-98 (2007)
高折益彦. “人工酸素運搬体作製に関する基本的留意事項(案)”を解説する. 人工血液 13 (3), 104-111 (2005)
高折益彦. 酸素運搬体の臨床治験へ. 人工血液 12 (3), 67-73 (2004)
高折益彦. 人工血液(HbV)安全性, 有効性に関する治験計画 10 (4), 99-106 (2002)
高折益彦. 赤血球代替物の臨床応用をめざして. 人工血液 8 (4), 85-89 (2000)
高折益彦. 前臨床試験でクリアすべき課題. 人工血液 6 (4), 94-100 (1998)
高折益彦. 代用血漿剤. 人工血液 5 (1), 1-9 (1997)
ほか、多数

第30回日本血液代替物学会年次大会

The 30th Annual Meeting of the Society of Blood Substitutes, Japan

『～基礎と臨床をつなぐ～』

大会長：照井 克生（埼玉医科大学総合医療センター）

会 期：2023年12月8日（金）・9日（土）

会 場：埼玉医科大学かわごえクリニック 大講堂6階

埼玉県川越市脇田本町 21-7

【年次大会事務局】

埼玉医科大学総合医療センター 産科麻酔科医局内

〒350-8850 埼玉県川越市鴨田 1981

Tel：049-228-3654 Fax：049-226-2237

E-mail：30sbsj@gmail.com

大会長挨拶

第30回日本血液代替物学会の大会長を務めます、埼玉医科大学総合医療センター産科麻酔科の照井克生です。30回を迎える記念すべき大会を、埼玉県川越市で開催することができますことを大変光栄に存じます。

本学会は1993年に設立され、年1回の学術集会を日本全国で開催してまいりました。歴代の大会長並びに理事、幹事、会員の皆様に心より感謝とお祝いを申し上げます。

私の所属する埼玉医科大学総合医療センターは、総合周産期母子医療センターと高次救命救急センター、そしてドクターヘリを備える大学病院です。産科麻酔科は其中で、産後過剰出血等で一次施設より搬送される患者を診療してまいりました。産科危機的出血の特徴は、消費性凝固障害が急激に進行することであり、搬送時点ではフィブリノゲンが枯渇していることもしばしばです。産科危機的出血の治療には凝固因子補充が重要であることが周知され、産科一次施設でも新鮮凍結血漿が常備されるようになりましたが、稀に低リスク妊婦に突発する危機的出血に備えて、保存期間の短い赤血球製剤を常備しておくことは現実的ではありません。実際に、新鮮凍結血漿を輸血しながら搬送された患者の循環は改善できたにもかかわらず、赤血球製剤輸血が到着後になったために、低酸素性脳症で救命できなかった患者さんを経験しました。それが人工赤血球の研究に着手した契機でした。本学会の多くの先生方や研究室のご指導とご支援を頂戴して、その成果を今回の大会でもシンポジウムとして発表できますことを、大変ありがたく存じます。

本大会のテーマを、「基礎と臨床をつなぐ」といたしました。医療の現場では血液代替物に切実なニーズがあることを、基礎研究者の皆様と共有する機会となることを祈念しております。テーマを反映して招請講演として、国境なき医師団の白川優子様にご経験をお話しいたします。

特別講演として、埼玉医科大学総合医療センター輸血部の山本晃士先生には輸血用血液製剤の需給の現状と課題を、高度救命救急センター井口浩一先生には宗教的理由により輸血を拒否する患者での救急医療の実際についてお話しいたします。教育講演の武岡真司先生には、ご自身の研究歴を含めてお話しいたします。登壇を快諾くださいました皆様、演題を登録くださいました多くの皆様に、心よりお礼申し上げます。

1日目のプログラムの後に、4年ぶりの懇親会も開催いたします。本学会の30年間の歩みを振り返る機会にしたいと存じます。2日間にわたり、活発な質疑と交流をどうぞよろしく願い申し上げます。

第30回日本血液代替物学会年次大会

大会長 照井 克生

(埼玉医科大学総合医療センター産科麻酔科 教授)

日本血液代替物学会 30 年のあゆみ

会 合 名	会 期	大 会 長	会 場
日本血液代替物学会 設立	1993.7.21		明治記念館 (東京)
血液代替物シンポジウム	1993.12.3-4		フォーシーズンズホテル (東京)
第 1 回年次大会	1994.6.16-17	小林 紘一 (慶應義塾大学医学部)	ホテルオークラ (東京)
第 2 回年次大会	1995.6.19-20	阿岸 鉄三 (東京女子医科大学)	フォーシーズンズホテル (東京)
第 3 回年次大会	1996.6.18-19	元木 良一 (福島県立医科大学)	福島ビューホテル (福島)
第 4 回年次大会 第 7 回血液代替物 国際会議 (7-ISBS) 同時開催	1997.9.7-10	土田 英俊 (早稲田大学理工学部)	早稲田大学国際会議場 (東京)
第 5 回年次大会	1998.9.4-5	関口 定美 (北海道赤十字血液センター)	かでの 2・7 (札幌)
第 6 回年次大会	1999.9.10-11	池田 康夫 (慶應義塾大学医学部)	京王プラザホテル (東京)
第 7 回年次大会	2000.9.7-8	北畠 顕 (北海道大学医学部)	かでの 2・7 (札幌)
第 8 回年次大会	2001.9.4-5	清水 勝 (東京女子医科大学)	シェンバツハ・サボー (東京)
第 9 回年次大会	2002.9.4-5	西 勝英 (熊本大学医学部)	熊本国際交流会館 (熊本)
第10回年次大会 第 9 回血液代替物 国際会議 (9-ISBS) 同時開催	2003.3.3-5	小林 紘一 (慶應義塾大学医学部)	京王プラザホテル (東京)
第11回年次大会	2004.7.13-14	川村 明夫 (札幌北楡病院)	北方圏センター (札幌)
第12回年次大会	2005.6.6-7	武岡 真司 (早稲田大学理工学部)	早稲田大学国際会議場 (東京)
第13回年次大会	2006.8.24-25	末松 誠 (慶應義塾大学医学部)	慶應義塾大学信濃町キャンパス (東京)
第14回年次大会	2007.6.14-15	半田 誠 (慶應義塾大学医学部)	慶應義塾大学三田キャンパス (東京)
第15回年次大会	2008.10.23	堀之内 宏久 (慶應義塾大学医学部)	慶應義塾大学信濃町キャンパス (東京)
第16回年次大会	2009.10.16-17	高折 益彦 (東宝塚さとう病院)	慶應義塾大学信濃町キャンパス (東京)
第17回年次大会	2010.10.18-19	小田切 優樹 (熊本大学薬学部)	熊本国際交流会館 (熊本)
第18回年次大会	2011.10.27-28	米川 元樹 (札幌北楡病院)	北海道大学医学部学友会館フラテ (札幌)
第19回年次大会	2012.10.25-26	東 寛 (旭川医科大学)	旭川大雪クリスタルホール (旭川)
第20回年次大会	2013.12.6-7	酒井 宏水 (奈良県立医科大学)	奈良県新公会堂 (奈良)
第21回年次大会	2014.12.8-9	小松 晃之 (中央大学理工学部)	中央大学後楽園キャンパス (東京)
第22回年次大会	2015.10.22-23	丸山 徹 (熊本大学薬学部)	熊本大学大江キャンパス (熊本)
第23回年次大会	2016.11.24-25	木下 学 (防衛医科大学校)	早稲田大学西早稲田キャンパス (東京)
第24回年次大会	2017.12.7-8	武岡 真司 (早稲田大学先進理工学部)	早稲田大学西早稲田キャンパス (東京)
第25回年次大会	2018.10.18-19	東 寛 (旭川医科大学)	旭川大雪クリスタルホール (旭川)
第26回年次大会 第17回血液代替物 国際会議 (17-ISBS) 同時開催	2019.11.21-23	酒井 宏水 (奈良県立医科大学)	奈良春日野国際フォーラム薨 (奈良)
第27回年次大会	2020.12.3-4	河野 光智 (埼玉医科大学)	WEB開催 (COVID-19のため)
第28回年次大会	2021.10.14-25	田口 和明 (慶應義塾大学薬学部)	WEB開催 (COVID-19のため)
第29回年次大会	2022.12.5-6	小松 晃之 (中央大学理工学部)	中央大学後楽園キャンパス (東京)
第30回年次大会	2023.12.8-9	照井 克生 (埼玉医科大学)	埼玉医科大学かわごえクリニック (川越)

お知らせとお願い

■会員・参加者の皆様へ

●会場

埼玉医科大学かわごえクリニック 大講堂 6階（埼玉県川越市脇田本町 21-7）

●受付

1. 場所

2. 受付時間

12月8日（金）AM 8：30～16：00

12月9日（火）AM 8：30～16：00

※クロークのご用意はありません。予めご了承ください。

●参加登録

1. 参加費

一般：10,000円（懇親会含む）、学生：3,000円（懇親会含む）

・本年次大会ホームページ（<https://www.blood-sub.jp/kaikoku.php>）の事前参加登録サイトより事前参加登録（参加者の情報入力）の上、ご来場ください。

・参加登録費は、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。

・参加証（兼領収書）に所属・氏名をご記入し、会期中、会場内では必ずご着用してください。

●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。

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

●年次大会予稿集

第30回年次大会の予稿集（会誌「人工血波」2023年号に含まれる）は、発表者の方には事務局より事前送付しております。当日はお忘れなくお持ちください。また、受付にて一部1,500円で販売しております。

■発表者の皆様へ

●発表時間

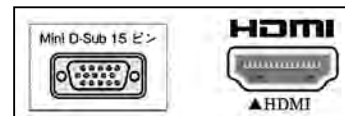
・特別講演、教育講演、招待講演		計 50分
・シンポジウム 1	発表 15分+質疑応答 5分	計 120分
・シンポジウム 2	発表 15分+質疑応答 5分+総合討論 15分	計 120分
・シンポジウム 3	発表 15分+質疑応答 5分	計 60分
・一般演題	発表 10分+質疑応答 5分	計 15分

ご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、PCプレゼンテーションに限定いたします。
2. プロジェクターの解像度は1920×1080（フルHD）です。映像サイズは4：3または16：9です。
3. 発表時に使用するPCは各自でご準備ください。発表者は、事前の休憩時間にご自分の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確認願います。
4. 念のため事務局でPC（Windows 10、PowerPoint対応）を用意しますが、あくまでも予備となります。
5. PCのトラブルに備えて、必ずバックアップデータをUSBメモリにてご持参ください。
バックアップデータはWindows対応のものに限ります。
6. 動画を使用する場合は、Windows：Windows Media Player/Macintosh：Quick Time Playerで再生可能な動画をご用意ください。
7. プロジェクターへの映像出力はHDMIまたはミニD-sub 15pinです。
この形状に変換するコネクタを必要とされる場合は必ずご持参ください。
8. 「発表者ツール」は使用できません。発表原稿が必要な方は予め資料をご準備ください。
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おいてください。



■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式（2023年12月9日（土））において大会長から本人に授与する。

■各種会議日程

理事会・評議員会	：2023年12月8日（金）12：40～13：45	5階会議室
総会	：2023年12月8日（金）13：50～14：00	6階大会議室
懇親会	：2023年12月8日（金）17：00～	ラ・ボア・ラクテ川越 川越市脇田本町 22-5 https://www.lvl.co.jp

■大会事務局

〒350-8850 埼玉県川越市鴨田1981
埼玉医科大学総合医療センター 麻酔科医局内
Tel：049-228-3654 Fax：049-226-2237
E-mail：30sbsj@gmail.com

大会日程表

	2023年12月8日(金)	2023年12月9日(土)
8:00		
9:00	9:20-9:30 開会の辞	9:00-9:50 特別講演 「輸血用血液製剤の需給の現状と将来予測」 演者：山本晃士 座長：小松晃之
9:30	9:30-11:30 シンポジウム1 「人工赤血球製剤の最新開発状況」 座長：酒井宏水、河野光智 演者：酒井宏水 河野光智 荻沢康介 長森恒久 田口和明 竹下泰史	10:00-10:45 一般演題2 座長：田口和明 演者：鶴田啓亮 野口勇夢 Xiao Da
10:00		10:55-11:45 教育講演 「新しい医療モダリティとして脂質分子集合体を用いる戦略」 演者：武岡真司 座長：酒井宏水
10:30		
11:00		
11:30	11:40-12:30 特別講演1 「宗教上の理由で輸血治療を忌避する患者に対する救命救急治療」 演者：井口浩一 座長：堀之内宏久	11:55-12:55 ランチョンセミナー 「人工血液の有効性検証—動物実験モデルの確立—」 座長：金子恒樹 演者：荻沢康介
12:00		
12:30	12:40-13:25 理事会・評議会（5階会議室）	
13:00		13:00-13:50 招待講演 「紛争地の看護師」 演者：白川優子 座長：照井克生
13:30	13:30-13:40 総会	
14:00	13:50-15:50 シンポジウム2 「産科危機的出血における血液代替物への期待」 座長：亀井良政、木下 学 演者：松永茂剛 阿南昌弘 山下智幸 結城由香子 金子恒樹	14:00-15:00 シンポジウム3 「人工血小板製剤の実用化」 座長：武岡真司、松田祐典 演者：Mao Maunick 佐々瑠花 石田 治
14:30		
15:00		15:10-16:10 一般演題3 座長：河野光智 演者：久禮智子 高瀬凡平 藤田真悠花 高山夏実
15:30		
16:00	16:00-16:45 一般演題1 座長：山田大雅 演者：松平 崇 石井幸太 藤澤隼矢	16:10- 学生講演賞、閉会の辞
16:30		
17:00	17:00- 懇親会 ラ・ボア・ラクテ	

交通案内

交通アクセス



周辺の地図



フロアのご案内

埼玉医科大学
かわごえクリニック



第1日目 2023年12月8日(金)

- 9:20~9:30 開会の辞 大会長 照井 克生 (埼玉医科大学総合医療センター産科麻酔科)
- 9:30~11:30 シンポジウム1「人工赤血球製剤の最新開発状況」
座長: 酒井 宏水 (奈良県立医科大学医学部化学教室)
河野 光智 (埼玉医科大学総合医療センター呼吸器外科)
- SY1-1「備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤の実用化を目指す研究」
酒井 宏水 (奈良県立医科大学医学部化学教室)
- SY1-2「ヘモグロビン小胞体の呼吸器外科手術における臨床使用を目指して」
河野 光智 (埼玉医科大学総合医療センター呼吸器外科)
- SY1-3「人工酸素運搬体投与で重炭酸イオン動態を制御して急性腎障害を防止する」
萩沢 康介 (防衛医科大学校生理学講座)
- SY1-4「リポソームによるマクロファージのMDSC様細胞変容プロセスの詳細解明」
長森 恒久 (旭川医科大学小児科学講座)
- SY1-5「ヘモグロビン小胞体投与が薬物動態関連タンパク質に与える影響」
田口 和明 (慶応義塾大学薬学部)
- SY1-6「人工赤血球が包括的止血機能に及ぼす影響の ex vivo 解析」
竹下 泰史 (奈良県立医科大学小児科)
- 11:40~12:30 特別講演1
「宗教上の理由で輸血治療を忌避する患者に対する救命救急治療」
座長: 堀之内宏久 (さいたま市立病院)
演者: 井口 浩一 (埼玉医科大学総合医療センター高度救命救急センター)
- 12:40~13:25 理事会・評議会
- 13:30~13:40 総会
- 13:50~15:50 シンポジウム2「産科危機的出血における血液代替物への期待」
座長: 亀井 良政 (埼玉医科大学病院産婦人科)
木下 学 (防衛医科大学校免疫微生物学講座)
- SY2-1「産科危機的出血の特徴とその治療戦略」
松永 茂剛 (埼玉医科大学総合医療センター産婦人科)
- SY2-2「産科的危機的出血を支える輸血部の役割」
阿南 昌弘 (埼玉医科大学総合医療センター輸血部)
- SY2-3「産科危機的出血 一著しい出血・凝固障害とどう戦うかー」
山下 智幸 (日本赤十字社医療センター救命救急センター)
- SY2-4「Hemoglobin Vesicle で産科危機的出血を制御する」
結城由香子 (北里大学メディカルセンター麻酔科)
- SY2-5「産科危機的出血における血小板代替物 (H12-ADP-リポソーム) の有効性」
金子 恒樹 (埼玉医科大学総合医療センター産科麻酔科)
- 16:00~16:45 一般演題1
座長: 山田 大雅 (中央大学理工学部 応用化学科)
- O1-1「ヘモグロビンを架橋点に持つ超分子ポリマーゲルの刺激応答性」
松平 崇 (奈良県立医科大学医学部化学教室)
- O1-2「ポリオキサズリン結合数の異なる“Hemoxa™”(人工酸素運搬体)の合成と機能」
石井 幸太 (中央大学理工学部)
- O1-3「ポリオキサズリン結合数の異なる Aloxa™ (動物用人工血漿)の合成と機能」
藤澤 隼矢 (中央大学理工学部)
- 17:00~ 懇親会 ラ・ボア・ラクテ

第2日目 2023年12月9日(土)

- 9:00~9:50 特別講演2
「輸血用血液製剤の需給の現状と将来予測」
座長：小松 晃之（中央大学理工学部）
演者：山本 晃士（埼玉医科大学総合医療センター輸血細胞医療部）
- 10:00~10:45 一般演題2
座長：田口 和明（慶応義塾大学薬学部）
O2-1 「人工赤血球 Hemoglobin Vesicles による心停止後の脳蘇生」
鶴田 啓亮（奈良県立医科大学化学教室）
O2-2 「抗がん剤誘発骨格筋 - 精神障害に対する一酸化炭素搭載型赤血球の有用性評価」
野口 勇夢（熊本大学薬学部薬剤学分野）
O2-3 「Development of PEG-coated PFOB/PLC core-shell AOCs via SPG membrane emulsifications technique」
Xiao Da (Graduate School of Engineering, The University of Tokyo)
- 10:55~11:45 教育講演
「新しい医療モダリティとして脂質分子集合体を用いる戦略」
座長：酒井 宏水（奈良県立医科大学医学部化学教室）
演者：武岡 真司（早稲田大学理工学術院）
- 11:55~12:55 ランチョンセミナー
「人工血液の有効性検証 —動物実験モデルの確立—」
座長：金子 恒樹（埼玉医科大学総合医療センター産科麻酔科）
演者：萩沢 康介（防衛医科大学校生理学講座）
- 13:00~13:50 招待講演
「紛争地の看護師」
座長：照井 克生（埼玉医科大学総合医療センター産科麻酔科）
演者：白川 優子（国境なき医師団）
- 14:00~15:00 シンポジウム3「人工血小板製剤の実用化」
座長：武岡 真司（早稲田大学理工学術院）
松田 祐典（埼玉医科大学総合医療センター産科麻酔科）
SY3-1 「Development of liposomal thrombolytic drug delivery system」
Mao Maunick (Waseda University, Department of Life Science and Medical Bioscience)
SY3-2 「頭部外傷後の凝固障害モデル開発と H12-(ADP)-リポソームの治療効果」
佐々 瑠花（防衛医科大学校防衛医学研修センター外傷研究部門）
SY3-3 「治験実施にむけた H12-(ADP)-リポソームの *in vitro* 安全性評価」
石田 治（防衛医科大学校外科）
- 15:10~16:10 一般演題3
座長：河野 光智（埼玉医科大学総合医療センター呼吸器外科）
O3-1 「人工赤血球 (Hb-V) 製剤の長期保存による脂質膜への影響」
久禮 智子（奈良県立医科大学医学部化学教室）
O3-2 「片肺全摘術期重症出血性ショックモデルにおける人工酸素運搬体 (HbV) の蘇生・抗不整脈効果；
Optical Mapping による検討」
高瀬 凡平（防衛医科大学校集中治療部）
O3-3 「ユニバーサル赤血球としてのポリオキサゾリン結合赤血球の合成と酸素親和性」
藤田真悠花（中央大学理工学部）
O3-4 「人工酸素運搬体 “ストロマフリーヘモグロビンナノ粒子” の有効性評価（50%出血性ショックラットの
蘇生試験）」
高山 夏実（中央大学理工学部）
- 16:10~ 学生講演賞、閉会の辞

特別講演 1

宗教上の理由で輸血治療を忌避する患者に対する救命救急治療

井口浩一

埼玉医科大学総合医療センター 高度救命救急センター 外傷センター

inok_k@saitama-med.ac.jp

絶対的無輸血の方針で診療を行う病院は少ない。緊急手術を要する可能性のある外傷患者に対し、救急隊が病院選定をする際、たらい回しになるケースが多い。しかし信教の問題で、病院到着前に絶命することがあってはならない。唯一の解決策は、救命センター、周産期母子医療センターに限定して絶対的無輸血の道を確保しつつ、病院全体としては相対的無輸血の方針を打ち出すことである。

当院では相対的無輸血の方針を打ち出しながら、救急搬送患者が重篤でかつ転院させることができない場合において、絶対的無輸血の方針で治療を行うケースがこれまでにあった。幸い大部分のケースが無輸血治療でも生命の危機が訪れなかったが、絶対的無輸血の方針で死亡した症例が3例、Hb 6.0以下に低下し極めて危険な状態に陥ったものが3例あった。

絶対的無輸血の道を閉ざすことは問題があり、少なくとも3次医療圏内に1箇所は宗教上の理由で輸血治療を忌避する患者であっても遅滞なく救急患者を受け入れる病院が必要である。当院におけるルール作り、これまでの症例供覧、解決すべき問題点などを解説する。

略歴

生年月日：昭和36年10月9日

昭和63年3月 東京大学医学部医学科卒業

昭和63年4月 東京大学医学部附属病院整形外科研修医

平成元年7月 日立総合病院整形外科

平成2年7月 都立北療育医療センター整形外科

平成3年7月 横浜労災病院整形外科

平成5年1月 都立墨東病院救命センター

平成6年7月 東京大学医学部附属病院整形外科助手

平成8年1月 埼玉医科大学総合医療センター高度救命救急センター助手

令和2年4月 同 教授

専門：整形外傷、救急外傷、脊椎外傷、骨盤外傷

資格：日本整形外科専門医、日本救急科専門医・指導医、脊椎脊髄外科専門医

輸血用血液製剤の需給の現状と将来予測

山本晃士

埼玉医科大学総合医療センター 輸血細胞医療部

kojiy@saitama-med.ac.jp

言うまでもなくわが国における輸血用血液製剤はすべて献血によってまかなわれている。昨年度の全供給量はおよそ、赤血球製剤 650 万単位、血漿製剤 210 万単位、血小板製剤 865 万単位であり、金額にして総額約 1400 億円にものぼる。この 10 年間における供給量はほぼ横ばいで、臨床現場での需要に 100% 応えられている状況であるが、それは日本赤十字社のたゆまぬ努力に支えられている。新型コロナウイルス感染症の影響で献血量の減少が心配されたが、実際にはその影響は小さく、現在ではほぼ回復している状況である。日本赤十字社では現在、赤血球製剤は 3 日分、血漿製剤は 1.5 ヶ月分、血小板製剤は当日供給分を目安に在庫を確保し、需要とのバランスを取るよう努めているとのことである。ただ、献血者の年齢別内訳をみると、40~50 代の献血者が増加しているのに対し 16~30 代の献血者は減少傾向であり、特に 26~36 歳までの献血者数は全体の年代の中でもっとも低い数となっている。約 10 年後の延べ献血者数のシミュレーションでは、今より約 60 万人(現在の約 12%に相当)もの減少が予測されている。少子高齢化が進む中、この状況では将来的な血液製剤の安定供給を維持できないと危惧されており、日本赤十字社もさらなる対策を講じつつある。しかし、どの程度の成果が上がるかは未知数であって、献血に代わる新たな血液代替物の開発が期待されている。なかでも輸血治療の主体をなす赤血球と、止血に欠かせない血小板については必要性が高いと言える。特に重症外傷や産科出血など緊急大量出血の場合には、救命までのゴールデンタイムを逃がさない両製剤の迅速な供給が不可欠であり、実際に輸血までに要した時間と救命率との間には密接な関係があるようだ。地方や離島など血液製剤が届きにくい地域では、より一層、緊急時に血液代替物が望まれている。一方、血漿製剤はその主な用途が凝固因子補充による止血用であり、最近では主に濃縮フィブリノゲンの補充を目的とするクリオプレシピテート(血漿製剤から病院内にて製造)の使用も増えつつある。また、緊急時での利便性が非常に高い凍結乾燥血漿の開発も進んではいるが、産科領域でのフィブリノゲン製剤適用拡大など凝固因子分画製剤で代用できる部分も出てきている¹⁾。むしろ、右肩上がりに使用量が増加している免疫グロブリン製剤を製造するための原料血漿の需要が高まっており、血漿交換用の使用と相まって、引き続きその確保は重要であろう。このように臨床現場はもちろん、日本赤十字社が担う血液事業の面からも、一刻も早い血液代替物の開発~供給が待望されている。

文献

1) 山本晃士. 危機的出血時のクリオ/フィブリノゲン製剤による止血療法. 日本輸血細胞治療学会誌 2021, 67, 559.

新しい医療モダリティとして脂質分子集合体を用いる戦略

武岡真司

早稲田大学 理工学術院総合研究所
takeoka@waseda.jp

私どもの研究室では、脂質分子集合体(リポソーム)を脂質合成、分子集合制御、そして DDS 製剤としての機能化に取り組んできた。ここでは、脂質分子集合体を用いた戦略が医療における新規なモダリティにどのように繋がるのかを3つの例を挙げて紹介する。

COVID-19 によるパンデミックにより我々はライフスタイルの変更を余儀なくされたが、5 類となりウイズコロナの時代に入った。これは、mRNA ワクチンのブースター接種によるところが大きい。本ワクチンは mRNA のキャリアとしてカチオン性脂質集合体(脂質ナノ粒子)を用いており、mRNA の安定担持と効率の高いデリバリーが可能となった。一方で、様々な副反応が報告されカチオン性脂質に由来することも明らかにされつつある。当研究室でもカチオン性脂質リポソームが免疫細胞に対して優れた抗原デリバリーとアジュバンドとしての免疫活性を報告¹⁾し、さらにはエンドサイトーシス機構のみならず膜融合機構²⁾で内包物質を効率高く細胞内にデリバリーすることが期待されている。

脂質分子集合体の相転移挙動を利用した温度応答性イミヌノリポソームを、ELISA アッセイにおける酵素の代わりに用いる短時間で高感度に抗原(SARS-CoV-2 の N 抗原)を定量検出できることを見出した³⁾。リポソームは表面に複数の抗体を担持した多価の状態となっており、さらに数千の蛍光分子を二分子膜中に担持した状態で同時に発光する分子集合体の特性がこれらの機能に繋がっている。

最後に、人工血小板として開発している H12 修飾 ADP 内包リポソームを紹介する。これはリポソーム表面を活性化血小板のインテグリンを特異的に認識するフィブリノーゲンのペプチド(H12)で修飾し、血小板を活性化する作用を持つ ADP を内包したリポソーム製剤である。活性化した血小板の凝集塊に特異的に ADP をデリバリーし、リリースすることで血小板凝集を増強・維持し、安定な止血の足場を形成する機構が提唱されている。現在、止血機能の評価の研究⁴⁾と共に臨床試験を開始するための準備が進められている。

脂質分子集合体を用いた製剤は、両親媒性の脂質の分子集合挙動を利用するために製造が難しい。本講演ではマイクロ流体デバイスを用いた新しい調製法のポイント⁵⁾についても触れたい。

文献

- 1) Li, Tolksdorf, Sung *et al. Int. J. Pharm.*, **623**, 121917, 25.07.2022.
- 2) Hotta, Hayase, Kitanaka *et al. Biochem. Biophys. Rep.*, **34**, 101483, 07.2023.
- 3) Hu, Hotta, Maruyama *et al. ACS Omega*, **7 (30)**, 02.08.2022, p. 26936-26944.
- 4) Hagusawa, Kinoshita, Takeoka *et al. RPTH*, **6 (2)**, e12659, 02.2022.
- 5) Ota, Mochizuki, Sou, and Takeoka, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **11**, 22 August 2023.



紛争地の看護師

白川優子（しらかわ・ゆうこ）

国境なき医師団（MSF）手術室看護師

7歳の時にテレビで観たMSFに感銘を受ける。高校卒業後、4年制(当時)の坂戸鶴ヶ島医師会立看護専門学校に入学。卒業後は埼玉県内の病院で外科、手術室、産婦人科を中心に約7年間看護師として勤務。2003年にオーストラリアに渡り、2006年にオーストラリアン・カソリック大学看護学部を卒業。その後約4年間、メルボルンの医療機関で外科や手術室を中心に看護師として勤務。2010年、MSFに参加。2018年7月、著書『紛争地の看護師』（小学館刊）、2022年4月に『紛争地のポートレート』（集英社刊）を上梓。2020年10月より朝日新聞デジタルにて、『国境なき衣食住』を連載中。2018年10月よりMSF日本のフィールド人事部にて海外派遣スタッフの採用業務に従事。1973年11月7日生まれ。埼玉県出身。

MSF 活動歴

- | | |
|---------------------|-------------------|
| 1. スリランカ（ポイント・ペドロ） | 2010年8月～2011年4月 |
| 2. パキスタン（ベシャワール） | 2011年7月～2012年1月 |
| 3. イエメン（アデン） | 2012年6月～2012年8月 |
| 4. シリア（イドリブ県） | 2012年9月～2012年12月 |
| 5. シリア（イドリブ県） | 2013年6月～2013年9月 |
| 6. 南スーダン（マラカル） | 2014年2月～2014年4月 |
| 7. フィリピン（レイテ島） | 2014年12月～2014年12月 |
| 8. ネパール（カトマンズ・アルगत） | 2015年4月～2015年5月 |
| 9. イエメン（ハミール） | 2015年10月～2015年12月 |
| 10. パレスチナ（ガザ） | 2015年12月～2016年4月 |
| 11. イエメン（イップ） | 2016年5月～2016年6月 |
| 12. イラク（モスル） | 2016年10月～2016年11月 |
| 13. イエメン（イップ） | 2016年11月～2017年3月 |
| 14. イラク（モスル） | 2017年6月～2017年7月 |
| 15. シリア（ラッカ県） | 2017年7月～2017年10月 |
| 16. シリア（ハサカ県） | 2017年11月～2017年12月 |
| 17. イラク | 2018年6月 |
| 18. アフガニスタン（ヘルマンド州） | 2021年8月～9月 |

2023年3月現在

SY1-1 備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤の実用化を目指す研究

酒井宏水

奈良県立医科大学 化学教室

hirosakai@narmed-u.ac.jp

輸血治療は現行の医療に不可欠であり、国民の医療と健康福祉に多大の貢献をしている。しかし、危機的出血にある傷病者に対し輸血が出来ない状況が今なお存在する。我々は輸血治療を「補完」する役割が期待される人工赤血球製剤(ヘモグロビン ベシクル, HbV)を開発し、その性能を多角的に研究してきた。献血由来の非使用赤血球からウイルス不活化・除去工程を経てヘモグロビン(Hb)を精製単離し、これをリポソームでカプセル化し、ガス反応の工程等を経て、備蓄・緊急投与が可能な人工赤血球製剤に「再生」できる^[1]。使われずに廃棄される献血血液を有効利用し、献血者の善意を無駄にしないこと、これが本製剤の研究開発の契機である。また現場医師からの本製剤に対する切実な思いが研究開発の Driving force である。2015 年から AMED の支援を受け、輸血の代替物として HbV の安全性・有効性について先見的研究を継続するとともに、PMDA 薬事戦略面談を重ね、製造工程の確立と GLP 非臨床安全性試験を順次進めた。そして 2020-21 年度に治験薬 NMU-HbV の GMP の製造と Phase 1 (First-in-human, FIH) 試験を実施した^[2]。これらの成果を踏まえて、2021 年度からの 3 年間は AMED 橋渡し研究プログラム(シーズ B)として次相に向けた準備に並行して、先見的有効性、安全性研究を進めてきた^[3]。最終年度を迎え、これまでの成果について報告したい。

文献

1. Kure T, Sakai H. Preparation of artificial red blood cells (hemoglobin vesicles) using the rotation-revolution mixer for high encapsulation efficiency. *ACS Biomater Sci & Eng.* 2021; 7: 2835-44.
2. Azuma H, Amano T, Kamiyama N, Takehara N, Jingu M, Takagi H, Sugita O, Kobayashi N, Kure T, Shimizu T, Ishida T, Matsumoto M, Sakai H. First-in-human phase 1 trial of artificial red blood cells and hemoglobin vesicles developed as a transfusion alternative. *Blood Adv.* 2022; 6 (21): 5711-5.
3. Sakai H, Kure T, Taguchi K, Azuma H. Research of storable and ready-to-use artificial red cells (hemoglobin vesicles) for emergency medicine and other clinical applications. *Frontiers Med Technol.* 2022; 4: 1048951

SY1-2 ヘモグロビン小胞体の呼吸器外科手術における臨床使用を目指して

○河野光智¹, 小野沢博登², 橋本 諒², 大岩加奈², 鹿島田寛明¹, 山口雅利¹, 杉山亜斗¹, 井上慶明¹, 青木耕平¹, 羽藤 泰¹, 福田祐樹¹, 岩崎正之², 儀賀理暁¹, 中山光男¹, 渡辺真純³, 堀之内宏久⁴, 酒井宏水⁵, 小林紘一³

¹ 埼玉医科大学総合医療センター 呼吸器外科, ² 東海大学 医学部 外科学系 呼吸器外科学, ³ 慶應義塾大学 外科,

⁴ さいたま市立病院 外科, ⁵ 奈良県立医科大学 医学部 化学教室

kohno@saitama-med.ac.jp

ヘモグロビン小胞体(HbV)は期限切れの献血赤血球から抽出, 精製したヘモグロビンをリポソームにカプセル化した構造である。すべての血液型に使用でき, 感染リスクがなく, 長期保存が可能で, 日本医療研究開発機構(AMED)の支援で第1相臨床試験が終了し, 第2相試験が計画されている。一方, 肺癌などに対する呼吸器外科手術では肺動脈などの損傷で大量出血した場合, 輸血が数分遅れることによって心停止に陥り, 蘇生しても低酸素性脳症の後遺症のリスクがある。手術室で遅滞なく使用できる人工赤血球の臨床応用が望まれている。HbVはその特徴から手術室に常備でき, 突然の大量出血に即座に使用できると考えられる。これまでの実験で, マウスやラットに循環血液量の30%を脱血して左肺全摘術を行うモデルでは, HbV投与は循環動態を安定させ, 術後生存率やその後の体重や自発運動量の回復が赤血球輸血と同等であった。ビーグル犬に左肺全摘術を行うモデルでは, スワンガンツカテーテルで詳細な血行動態の解析を実施し, HbV投与は30%脱血を代償して血液や組織の酸素化に寄与し, 循環動態を安定させることが確認された。また, アロステリック因子を調整した高酸素親和性のHbV($P_{50}=9$ Torr)は組織の酸素分圧を上昇させる効果を示した。一方, 赤血球と比較して粒子径が小さいHbVは, 虚血に陥った組織の毛細血管を効率よく灌流できる。マウス気管移植モデルにおける上皮下毛細血管内の電子顕微鏡での観察では, 赤血球の再灌流が始まらない移植後4時間という時点で, 径250nmのHbV粒子が確認された。移植された虚血組織では血管新生機序により, 血管網が再構築されて再灌流につながる。HbVが赤血球よりも先んじて再吻合部位を通過することが明らかになった。移植組織でのHbVによる毛細血管の早期再灌流は, 虚血障害を軽減し, 縫合不全や移植臓器の機能不全の予防に寄与する可能性がある。また, 一酸化炭素を付加したCO-HbVには抗炎症や免疫抑制効果も認められた。HbVの応用は呼吸器外科手術に様々な効果ももたらす可能性がある。

シンポジウム 1

SY1-3 人工酸素運搬体投与で重炭酸イオン動態を制御して急性腎障害を防止する

○萩沢康介¹, 木下 学², 酒井宏水³

¹ 防衛医科大学校 生理学講座, ² 防衛医科大学校 免疫微生物学講座, ³ 奈良県立医科大学 化学教室
hagisawa@ndmc.ac.jp

緒言

出血性ショックにしばしば急性腎障害(AKI)が合併する。その病態は、尿細管上皮細胞内の H^+ 上昇を契機とし、細胞内 Na^+ 貯留から2次的に発生する細胞内 Ca^{2+} 過負荷とされている。本研究では、Hemoglobin Vesicle(HbV)投与が血中 HCO_3^- を低減し、 Na^+/HCO_3^- 共輸送体(NBCe1)機能を促進することで、細胞内 Na^+ 貯留を抑制し、AKIを防止できるか検討した。

実験

家兔に急速脱血を行い平均動脈圧が20mmHgまで低下し、血清クレアチニン値がbaselineの1.5倍以上に上昇するAKI状態を作成した。20分間のショック状態の後、HbV投与、赤血球輸血、細胞外液(Lactated Ringer)輸液を行い、血行動態、血清クレアチニン値や血中 HCO_3^- 濃度の経時変化を観察した。4時間後に犠死させ、腎臓の免疫組織学的評価を行った。

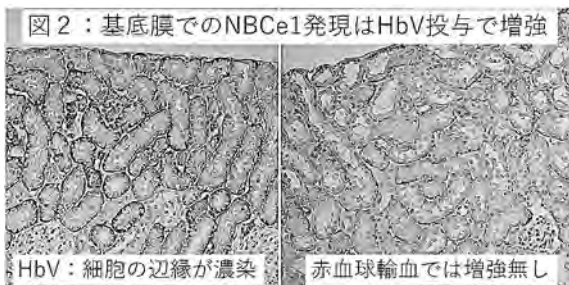
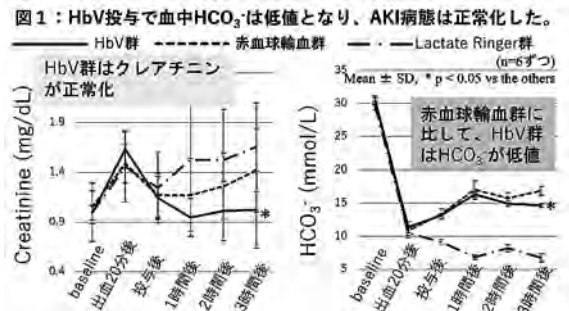
結果と考察

赤血球輸血、細胞外液(Lactated Ringer)輸液では、数時間後に血清クレアチニン値の再上昇が認められた。いっぽう、HbV投与では血清クレアチニン値は正常化した(図1左)。赤血球輸血群に比してHbV投与群では、血中 HCO_3^- 濃度が有意に低値であった(図1右)。また、AKI後のHbV投与で、近位尿細管基底膜側でNBCe1発現が顕著であった(図2)。

上記の結果より、以下の機序が推測された。すなわち、HbV投与は虚血治療として酸素を供給し腎組織の H^+ を処理したうえで、AKI後の腎間質・血中 HCO_3^- 濃度を15mM前後の低値にした。尿細管細胞内外での HCO_3^- 濃度勾配が、NBCe1を介した HCO_3^- と Na^+ の細胞外への共輸送を起動させて細胞内 Na^+ 貯留を抑制し、 Na^+/Ca^{2+} 交換担体(NCX)を介した Ca^{2+} 流入からの細胞内 Ca^{2+} 過負荷を回避するに至ったと考えられる。

結論

HbV投与は、出血性ショックに伴うAKIモデルにおいて、ショック病態を改善するとともに、腎尿細管においてNBCe1機能を促進し、AKIを防止することが示唆された。



SY1-4 リポソームによるマクロファージの MDSC 様細胞変容プロセスの詳細説明

○長森恒久¹, 東 寛¹, 酒井宏水²

¹ 旭川医科大学 小児科学講座, ² 奈良県立医科大学 医学部 化学教室

我々は、リポソームの生体適合性を評価する目的で行った研究を初端に、以下の知見を得た。① ラットに対し、ヘモグロビン小胞体あるいは外殻であるリポソームを静注すると、脾臓リンパ球でリンパ球増殖反応が強力かつ一過性に抑制される事、② T細胞機能抑制の背景として、リポソームが脾臓マクロファージに捕捉され、これを骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC: myeloid-derived suppressor cell) 様に変容させるために起こること、③ マクロファージはリポソーム捕捉により i) MDSC に発現する免疫チェックポイント分子 B7-H3 を発現し、ii) NF- κ B 活性化から iNOS 誘導、NO 産生を亢進させる。これらが総合的に T細胞増殖抑制を起こす事、④ 免疫学的修飾作用は長鎖脂肪酸そのものを投与しても起こらず、逆にリポソームを形成していれば DPPC 以外の長鎖脂肪酸を結合したリン脂質でも起こる事、等である。また、マクロファージ系細胞株を用いた *in vitro* のシグナル伝達解析において、⑤ NF- κ B 活性化の上流をレポーターアッセイと各種阻害剤で検索し、リポソーム捕捉マクロファージ内で小胞体ストレス反応が誘導され、これが微弱な NF- κ B 活性化に関わる事、も同定している。

ヘモグロビン小胞体や、既に臨床応用されている他のリポソーム製剤にも免疫不全の副作用報告はなく、上記は臨床的に軽微な変化と考えられる。しかしヘモグロビン小胞体の何らかの副作用が明らかになった際に対処や予防法を考慮する上で重要で、かつリポソームの未知の薬理作用として重要な知見であると考えている。

SY1-5 ヘモグロビン小胞体投与が薬物動態関連タンパク質に与える影響

○田口和明¹, 酒井宏水², 松元一明¹, 小田切優樹³

¹ 慶應義塾大学 薬学部, ² 奈良県立医科大, ³ 崇城大学 DDS 研究所
taguchi-kz@pha.keio.ac.jp

ヘモグロビン小胞体(HbV)は、赤血球輸血と同様に大量出血患者に対する使用が想定される。大量出血患者においては、輸血と並行して、全身状態のコントロールを目的とした麻酔薬や全身合併症の予防または治療を目的とした薬物が投与される。そのため、大量出血患者にHbVを投与する場合においても、様々な薬物が並行して使用されることが予想される。これまでに赤血球輸血を受けた大量出血患者において、薬物動態関連タンパク質であるチトクローム P450(CYP)基質薬物の代謝物が減少することが示され¹⁾、大量出血に伴う赤血球輸血時にはCYP代謝能が低下することが示唆されている。この事実より、大量出血患者にHbVを投与した際においても、赤血球輸血と同様に併用薬物の代謝や排泄などの体内動態に何らかの影響を受ける可能性は否定できない。このような背景の下、これまでに我々は、健常ラット及び出血性ショックモデルラットを用いて、HbV投与(蘇生)が肝臓中および腎臓中の薬物動態関連タンパク質発現や機能に与える影響について*in vitro*及び*in vivo*にて評価してきた。本発表では、HbV投与が肝臓中CYP4分子種(1A2, 2C11, 2E1, 3A2)の発現や機能、さらにはそれらの基質薬物の体内動態に与える影響について紹介する。また、現在検討を進めているHbV投与が肝臓中および腎臓中の薬物トランスポーターの発現に与える影響についても紹介する。

文献

- 1) Harbrecht BG, Frye RF, Zenati MS, Branch RA, Peitzman AB. *Crit Care Med.* **2005**, 33 (3), 541-546.
- 2) Tokuno M, Taguchi K, Sakai H, Ohtsuki S, Yamasaki K, Otagiri M. *Drug Metab Pharmacokinet.* **2020**, 35 (5), 417-424.
- 3) Tokuno M, Taguchi K, Sakai H, Ohtsuki S, Yamasaki K, Otagiri M. *Drug Metab Pharmacokinet.* **2020**, 35 (5), 425-431.

SY1-6 人工赤血球が包括的止血機能に及ぼす影響の ex vivo 解析

○竹下泰史^{1,2}, 萩原建一¹, 酒井宏水³, 野上恵嗣¹

¹ 奈良県立医科大学 小児科, ² 市立奈良病院 小児科, ³ 奈良県立医科大学 医学部 化学教室
pedtake@gmail.com

緒言

人工赤血球 (hemoglobin vesicle, Hb-V) 製剤は緊急時大量投与が想定されているが, 粒子径が極めて小さく, 赤血球が持つ止血機能¹⁾は有していないため, 止血機能に負の影響を与える可能性がある。今回, Hb-V 製剤が包括的止血機能に及ぼす影響を, 血流下血栓形成能, 全血凝固能, 耐線溶能の観点から ex vivo 実験で評価した。

実験

健常ボランティア (n=8) のクエン酸加全血に, Hb-V あるいは緩衝液を容積比率 10%, 25%, 50% となるように混和し, 血流下血栓形成試験 (T-TAS[®], 藤森工業), トロンボエラストグラフィ (ClotPro[®], フィンガルリンク社) を用いた血液粘弾性検査 (全血凝固能・耐線溶能解析) を行った。各パラメータについて非希釈全血との比で表し, 希釈による影響を評価した。また, 同一希釈条件における Hb-V 添加時と緩衝液添加時の相違を評価するために, 同一希釈時の各パラメータ値の Hb-V/ 緩衝液比を検討した。

結果と考察

血流下血栓形成試験では, 希釈によって流路内圧上昇開始時間および流路閉塞時間は有意に延長し, 50% 希釈時には非希釈血と比べて 2-4 倍程度に延長した。次に血液粘弾性検査では, 組織因子 (TF) で惹起された全血凝固能は, 血液希釈によって凝固開始時間, 凝固形成時間の著明な短縮がみられ, 最大凝固堅固度は軽度低下した。このことから 50% までの血液希釈では, 凝固能が亢進する可能性が示唆された。さらに, 血液粘弾性検査において, TF と同時に線溶惹起因子である組織プラスミノゲンアクチベータを添加する耐線溶能解析では, 耐線溶能を示すパラメータ値は希釈により低下し, 希釈性凝固障害でみられる線溶能亢進を反映していると考えられた。いずれの測定においても Hb-V/ 緩衝液比による評価では, 血栓形成能に与える影響について緩衝液と Hb-V の間に有意な差を認めなかった (非劣性)。

結論

10%~50% までの血液希釈では, 全血凝固時間が短縮し, 耐線溶能が低下 (線溶能亢進) する傾向にあり, 総合的な止血機能は低下した。Hb-V による血液希釈は緩衝液との比較において止血機能において非劣性であり, Hb-V は止血機能に負の影響を与えることなく赤血球の酸素運搬機能を代替することが期待される。

文献

1) Weisel JW, Litvinov RI. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost.* **2019**; 17: 271–82.

SY2-1 産科危機的出血の特徴とその治療戦略

松永茂剛

埼玉医科大学総合医療センター 産婦人科
shige_m@saitama-med.ac.jp

緒言

産科危機的出血は依然として母体死亡の主要な原因となっており、我が国でも肺血栓塞栓症や脳血管疾患などを抑えて妊産婦死亡の18%が産科危機的出血による死亡と報告されている。妊産婦末期には循環血液量は増大し希釈される一方で、代償的に第13因子を除くほぼ全ての凝固因子活性は増加し線溶系は抑制されて過凝固状態となる。その背景から産科危機的出血を発症すると、容易に凝固因子が消費される特性を有している。

産科危機的出血における凝固障害の病態は主に出血が先行する希釈性凝固障害と、組織因子による凝固因子の消費を主体とする消費性凝固障害がある。希釈性凝固障害を主体とした病態では、shock index (SI)などのバイタルサインが輸血開始基準としての有用性は高く、迅速に算出できるため、優れた評価項目である。しかし、SIが産科危機的出血のすべての病態を正確に反映しているわけではなく、消費性凝固障害では、出血量が多くなる前にフィブリノゲンをはじめとした凝固因子の低下が著明となるため、SIは輸血の必要性を効率的に予測できるとは限らず、血中フィブリノゲン値や産科DICスコアの方が正確に病態を反映できる。双方に共通の大量輸血の予測因子として優れたパラメーターは血中フィブリノゲン値であるため¹、フィブリノゲン値の測定可能な施設では血中フィブリノゲン値を優先的に測定し、経時的に評価することが重要である。近年ではPoint of care testingを用いて迅速にその結果を参照することが可能になってきている。

希釈性凝固障害の成立過程において、血圧の維持のために行われる大量の輸液は血液の希釈によって血液中の凝固因子の濃度を低下させ凝固障害を重篤化させる可能性があるが、大量輸液やRBC輸血などによる凝固因子の希釈が発生する前に、すでに組織低灌流による血管内皮傷害によって凝固障害が発生している可能性がある²。したがって先制的に新鮮凍結血漿(FFP)の投与を行い、凝固障害を改善させる。消費性凝固障害では前述のようにフィブリノゲンをはじめとした凝固因子の低下が著明となるため、濃縮凝固因子製剤の優先度が高くなることは言うまでもない。

実際には前述のように積極的な凝固因子の補充を行い、並行して止血術を行っていくわけであるが基本的にはDCS (damage control surgery)の概念に則り、全身状態の改善を優先し低侵襲な止血術から段階的に止血を行っていくことで高い母体救命率が実現されている可能性がある。

文献

1. Era S, Matsunaga S, Matsumura H, Murayama Y, Takai Y, Seki H. Usefulness of shock indicators for determining the need for blood transfusion after massive obstetric hemorrhage. *J Obstet Gynaecol Res* 2015; **41**: 39-43.
2. Matsunaga S, Takai Y, Seki H. Fibrinogen for the management of critical obstetric hemorrhage. *J Obstet Gynaecol Res* 2019; **45**: 13-21.

SY2-2 産科的危機的出血を支える輸血部の役割

阿南昌弘

埼玉医科大学総合医療センター輸血部
an2@saitama-med.ac.jp

産科領域においては、危機的出血により患者生命が脅かされる状況に陥ることがしばしば発生する。その際は可及的速やかに輸血を含む血液製剤を投与する必要があるが、そのためには輸血部を含むコメディカル部門が適切かつ迅速に対応できる体制を常に整えておく必要がある。

輸血部門で対応すべき業務としては、以下のものが考えられる。① MTP (Massive Transfusion Protocol) : 危機的出血が予想される場合、患者の血液型が判明する前にパッケージとして血液製剤を準備、出庫する。当院では、O型赤血球製剤6単位とフィブリノゲン製剤3グラムをパッケージとしている。赤血球製剤は、患者来院前に準備することで患者到着と同時に投与することが可能である。しかし、院内在庫が不足しているような状況では血液センターから製剤を取り寄せる必要があるため、血液の搬送時間を臨床現場と共有しておくことが重要である。② 血液凝固因子製剤の投与 : 近年、産科的出血に対してフィブリノゲン製剤の使用が保険適用となった。当院では、MTPによりあらかじめ製剤を出庫しておき、後述のPOCT (point of care test) を用いてフィブリノゲン値が150mg/dLを下回っている場合には速やかに製剤を投与できる体制を整えている。また、きわめて高度な低フィブリノゲン血症が認められた場合は3グラムもしくは6グラムを追加投与する。フィブリノゲン製剤は使用時に溶解する必要があるが、新鮮凍結血漿 (FFP) を解凍するよりも速やかに投与することが可能であり、フィブリノゲンの補充効果はFFPよりも高い。③ POCTの導入 : 当院ではFibCareを用いて検査を行っている。遠心不要の全血検体で5分以内にフィブリノゲン値が得られるため、検査部での凝固検査結果を待つよりも患者の状態を速やかに把握することが可能である。検査の性質上、検査技師が機器を操作することは困難であるため、実際は医師や看護師など臨床現場のスタッフが検査を行う。臨床検査技師は、機器のメンテナンスや使用方法のレクチャーなどを担当することが理想である。

危機的出血が発生もしくは予想される場合、輸血部門には適切なタイミングで適切な血液製剤を準備、出庫することを求められる。そのためには、常日頃から臨床サイドや薬剤部門、検査部門と情報を共有し、円滑に治療が進められるようにしておくことが重要である。

SY2-3 産科危機的出血 ―著しい出血・凝固障害とどう戦うか―

○山下智幸, 乃美 証, 吉田由惟

¹ 本赤十字社医療センター 救命救急センター・救急科
yamashita_tomoyuki@med.jrc.or.jp

緒言

わが国の出生数約 80 万人のうち、妊産婦死亡は約 40 例であり 10 例弱が出血による死亡である。かつてより大幅に出血死は減少したが依然母体の死亡原因である。

産科危機的出血の病態

妊娠に伴って循環血液量は増加し凝固系が亢進し通常は分娩後自然に止血が得られるが、現在も致死の経過を辿ることがある。特に胎盤早期剥離では凝固因子の消費が著しくフィブリノゲン (Fg) 値は著減し凝固障害に至る。羊水塞栓症も母体にとって半自己である胎児成分が血管内に流入することで Fg は枯渇する。出血量増加に伴い血小板 (Plt) 数の低下も問題となる。

産科危機的出血は凝固障害を来しやすく、凝固障害は止血困難性を増しさらに出血量が増加する悪循環に至るため、臨床現場では極めて厄介な存在である。

産科危機的出血の治療戦略

重症度と出血原因の種別により詳細は異なるが、治療は大きく 1) 出血制御、2) 全身管理に分けられ、両者が適切に組み合わせられて初めて治療成功につながる。

1) 出血制御 (hemorrhage control) = 止血 (hemostasis)

子宮収縮薬、経腔アプローチ、画像下治療 (IVR)、手術を組み合わせる。しかし、凝固障害があると出血が続き、完全止血が得られないことが多い。

2) 全身管理 (critical care) = 安定化 (stabilization)

AB (airway 気道, breathing 呼吸) 管理に気管挿管と人工呼吸を行う。C (circulation 循環) 管理では循環血液量、組織灌流、酸素運搬を維持するため、初期には輸液を行い、速やかに異型適合血を用いた急速大量加温輸血 (赤血球液 RBC O 型 RhD+, 新鮮凍結血漿 FFP AB 型 RhD+) に移行する。輸血開始までに、製剤の準備、融解、輸送など多くの時間を要することが課題である。C 管理は止血能の維持も兼ねており、トラネキサム酸による線溶抑制、Fg とその他の凝固因子の補充、カルシウム製剤の投与、Plt 補充、低体温の回避が重要である。

1)2) 両者に関連する介入として REBOA (蘇生的大動脈内バルーン遮断) が存在する。

血液代替物への期待

院内の輸血準備や血液センターからの血液製剤輸送には相当の時間を要し、治療初期の輸液の代替として即時的に血液型無関係に使用できる RBC 代替物や、入手に時間を要する Plt 代替物を投与できることは、生命維持・早期止血に寄与する可能性がある。保存期間が長ければ、高次施設に限らず転院前の分娩取扱施設からの治療開始も可能であろう。

長期に時間を要するかもしれないが、母体救急の現場でも血液代替物を活用できる日を待ち望み、一人でも多くの母体を救命できるようにすることを期待したい。

SY2-4 Hemoglobin Vesicle で産科危機的出血を制御する

○結城由香子¹, 照井克生², 萩沢康介³, 木下 学⁴

¹北里大学メディカルセンター麻酔科, ²埼玉医科大学総合医療センター産科麻酔科, ³防衛医科大学校生理学講座,

⁴防衛医科大学校免疫微生物学講座

yukako0827@yahoo.co.jp

緒言

産科危機的出血は、本邦の妊産婦死亡の原因の2割を占め、第一位である。低リスク妊婦の経膈分娩でも突然発症する可能性がある。日本では分娩の半数以上が、輸血準備が十分ではない、産科一次施設で行われており、産科危機的出血が起こった際、初期治療に遅れ、死に至ることもある。我々は、産科一次施設における産科危機的出血に対し、母体を高次施設へ搬送するまでに、赤血球輸血の代替としてHbVを投与することが、妊産婦の救命率向上につながるのではないかと考えた。本研究では妊娠末期のウサギを使用して、産科危機的出血を生起させ、凝固障害・低血小板状態・貧血を伴う出血性ショックの病態モデルを確立し、赤血球輸血の代替としてHbVを投与し、急性期の母体の救命効果を検証するとともに、止血凝固能や体液代謝調節への影響を明らかにすることを目的とした。

実験

妊娠末期のウサギを開腹し、右側の子宮動静脈を切断して出血させた。出血から60分間、5分毎に出血量と等量のHbVと25%アルブミンを4:1で混合したものを静脈内投与して血行動態を維持した。60分後、または出血量が200mLを超えた時点で、切断した子宮動静脈を結紮して止血した。陽性対照群として、濃厚赤血球と乏血小板血漿(PPP)の1:1混合液投与を行い、陰性対照群として5%アルブミン投与を行った。各々の母体への影響について比較検討した。

結果と考察

HbV群とRBC群は平均動脈圧 >50 mmHgを維持したが、アルブミン群は平均動脈圧40mmHg以下まで低下した。RBC群およびHbV群は8時間以上生存したが、アルブミン群はすべて8時間以内に死亡した。RBC群では、他の2群に比べて総出血量が有意に減少した。RBC群とHbV群はHb濃度 >9 g/dLを維持したが、アルブミン群では、重度の低Hb血症(2g/dL)となった。RBC群の血漿中フィブリノーゲン濃度は、出血60分後でも 106 ± 10 mg/dLに維持された。いっぽうHbV群とアルブミン群のフィブリノーゲン濃度は、それぞれ 62 ± 27 および 48 ± 23 mg/dLまで低下し、重症な凝固障害が起こった。

結論

赤血球輸血の代替としてHbV投与により、産科危機的出血のショックを防止しうることを、ならびに産科危機的出血に陥った場合でもHbV投与によって救命しうることを明らかにした。

文献

1) Yuki Y, Hagsisawa K, Kinoshita M, et al., Am J Obstet Gynecol. 2021 224, 398.e1-398.e11.

シンポジウム 2

SY2-5 産科危機的出血における血小板代替物(H12-ADP-リポソーム)の有効性

○金子恒樹¹, 照井克生¹, 萩沢康介², 木下 学³

¹ 埼玉医科大学総合医療センター産科麻酔科, ² 防衛医科大学校生理学講座, ³ 防衛医科大学校免疫微生物学講座
anesth.k@gmail.com

産科危機的出血は本邦の妊産婦死亡原因の第一位であり, 発症が突発で急激, 低リスク妊婦でも起こり予測が困難である. 急激な出血に伴う凝固因子の喪失と輸液や赤血球輸血による“希釈性凝固障害”と, 羊水や胎児胎盤成分の母体内流入にともなう高度な線溶亢進状態による“消費性凝固障害”という2つの経路で進むことが多く, 短時間で高度な凝固障害(低フィブリノゲン状態)に至ってしまうため, 早期の凝固因子の補充が重要である. しかし, 本邦の分娩の半数以上はクリニックなどの一次施設で行われており, 院内に輸血が備蓄されていない施設が大半であり, 産科危機的出血において改善の余地が多いものとして輸血の遅れが一番に挙げられている.

血小板代替物である H12-ADP-リポソームは, 脂質二分子リポソーム膜上に GP II b/III a 受容体と結合する 12 個のアミノ酸基(H12)を持ち, リポソーム内に ADP(アデノシン二リン酸)を内包しており, 活性化 GP II b/III a 受容体が発現した血小板に結合して凝集を促進させる. これまでの報告において, 外傷性凝固障害モデルにおける有効性について示唆されており¹⁾²⁾, 昨年我々は妊娠兔における羊水塞栓症モデルに対する H12-ADP-リポソームの有効性についても報告した.

H12-ADP-リポソームは輸血と比べ長期保存が可能であり, 血液型が関係なく使用できるなどの利点があり, 本邦における産科危機的出血の現場(発症が急激, 予測が困難, 一次施設での分娩が多い)での有用性が期待できると考えている.

文献

1) K. Hagiwara, et al., Res. Pract. Thromb. Haemost 2022, 6, e12659

SY3-1 Development of liposomal thrombolytic drug delivery system

Mao Maunick

Waseda University, Department of Life Science and Medical Bioscience
maunick@fuji.waseda.jp

Pulmonary Embolism (PE) is a common cardiovascular disease with high mortality rates and despite its prevalence, treatment methods have not evolved significantly over the past 30 years. Thrombolytic therapy being typically used as the first-line treatment for acute massive PE where blood clots are readily broken down via fibrinolysis bring with it severe side effects; over 20% of patients experience post-treatment bleeding complications (1). To increase its safety, regionalising drug delivery will reduce bleeding complications and increase efficacy due to higher concentration present at site. The proposed method of localisation is to encapsulate the thrombolytics in liposomes, a non-toxic biocompatible drug carriers that can modulate drug release and are versatile for specific ligand targeting. The liposomes will encapsulate tPA released through enzymatic destabilization of secreted phospholipase-A2 (sPLA₂) and have heteromultivalancy features, binding to multiple target markers enhancing site specificity and binding stability (2).

For current stages of experiments, small liposomes between 100 – 200 nm with zeta potential around -15 mV was prepared referring to the methods from the artificial platelets produced by our laboratory. They have been modified to encapsulate calcein, a fluorescent molecule at self-quenching concentrations to allow the measurement and visualisation of binding and content release. The parameters for the PLA₂ hydrolysis experiments have also been established optimising its activity to have better measurements and higher release percentage. The experiment used Porcupine pancreas PLA₂ with high enzymatic activity (>600 U/mg), hence liposomes and PLA₂ concentration, volumetric ratio and temperatures have been carefully selected to slow the reaction rate: six minutes to reach plateau which initially was within the first one to two minutes and release percentage of just under 50%.

The following steps will be to incorporate the peptides, RDG, EWVDV, cRDG and H12 (dodecapeptide) (3) singularly and in combinations targeting GPIIb/IIIa and P-selectin on the surface of the activated platelets and determine the optimal molar ratios of the components for both binding and release.

文献

- (1) Sekhri V, Mehta N, Rawat N, Lehrman SG, Aronow WS. Management of massive and nonmassive pulmonary embolism. Vol. 8, Archives of Medical Science. Termedia Publishing; 2012. p. 957–69.
- (2) Pawlowski, C. L., Li, W., Sun, M., Ravichandran, K., Hickman, D. S., Kos, C., Kaur, G., & sen Gupta, A. (2017). Platelet microparticle-inspired clot-responsive nanomedicine for targeted fibrinolysis. *Biomaterials*, 128, 94–108.
- (3) Okamura, Y., Eto, K., Maruyama, H., Handa, M., Ikeda, Y., & Takeoka, S. (2010). Visualization of liposomes carrying fibrinogen gamma-chain dodecapeptide accumulated to sites of vascular injury using computed tomography. *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine*, 6 (2), 391–396.

シンポジウム 3

SY3-2 頭部外傷後の凝固障害モデル開発と H12-(ADP)-リボソームの治療効果

○佐々瑠花¹, 萩沢康介², 木下 学³, 戸村 哲¹, 武岡真司⁴

¹ 防衛医科大学校防衛医学研究センター 外傷研究部門, ² 防衛医科大学校 生理学講座, ³ 防衛医科大学 校免疫・微生物学講座,

⁴ 早稲田大学 理工学術院

sasa33@ndmc.ac.jp

緒言

頭部外傷 (Traumatic brain injury : TBI) は統計学的に約 35% に凝固障害を引き起こす¹⁾が, TBI 後凝固障害の動物モデルは未確立であり, TBI と凝固障害の因果関係の詳細についても未解明である. 本研究では, 中等度以上の TBI 後凝固障害モデルを確立する. また, TBI 作製後に血小板代替物である H12-(ADP)-リボソームを投与し, 治療効果を検証する.

実験

雄性 SD ラットの頭頂部正中にレーザー誘起衝撃波 (laser-induced shock wave : LISW) を経皮的に連続 3 回照射して頭部外傷を作製し, 5 分後に生理食塩水 (以下, NS) または H12-(ADP)-リボソーム (以下, H12) を単回静注 (1 mL/kg) した. 照射前および 24 時間後に血液検体を採取し, 血算, Sonoclot[®] を用いた活性化凝固時間 (Activated Clotting Time : ACT), プロトロンビン時間 (PT), 血漿フィブリノゲン値 (Fbg) を測定した. より重症度の高い LISW 連続 5 回照射についても実施し, 8, 16, 24 時間後に同様の解析を行った. 5 回照射 24 時間後群については HE 染色脳標本を作製して脳挫傷の重症度を検証した.

結果と考察

いずれの群も, TBI 後に血小板数減少をみとめなかった. 5 回照射 NS 投与群で 24 時間後の生存率は 63% であったが, H12 投与群では 100% であった. 3 回照射 NS 群の 24 時間後と 5 回照射 NS 群の 16, 24 時間後で ACT, PT がともに有意に延長した. Fbg は 5 回照射 NS 群の 8 時間後, 3 回照射 NS 群と H12 群の 24 時間後で有意に低下した. HE 染色脳標本では, 脳挫傷の横径は NS 群 8.3 ± 1.6 mm, H12 群 6.5 ± 1.7 mm と有意差があった.

	5 回照射						3 回照射	
	8h 後		16h 後		24h 後		24h 後	
	NS	H12	NS	H12	NS	H12	NS	H12
生存率	8/8	8/8	8/8	8/8	19/30 [†]	16/16	21/23	11/11
血小板数 ($10^4/\mu\text{L}$)	n=8	n=8	n=8	n=8	n=10	n=15	n=13	n=8
baseline	56 ± 9	59 ± 7	58 ± 7	52 ± 5	62 ± 8	58 ± 8	52 ± 6	57 ± 7
post	49 ± 9	52 ± 12	57 ± 5 [†]	46 ± 6	59 ± 5	57 ± 8	56 ± 5 [†]	52 ± 3
ACT (秒)	n=8	n=8	n=8	n=8	n=10	n=15	n=13	n=8
baseline	55 ± 5	56 ± 12	47 ± 8	57 ± 10	62 ± 10	56 ± 11	58 ± 14	53 ± 15
post	51 ± 9	56 ± 14	71 ± 18*	64 ± 13	97 ± 10*	98 ± 9*	76 ± 16*	84 ± 7*
PT (秒)	n=5	n=6	n=5	n=7	n=6	n=7	n=12	n=5
baseline	7.6 ± 0.2	7.7 ± 0.2	7.8 ± 0.3	7.8 ± 0.1	8.0 ± 0.4	8.0 ± 0.3	7.9 ± 0.5	8.0 ± 0.2
post	9 ± 2.1*	8.1 ± 0.3*	8.3 ± 0.2*	8.8 ± 1.1*	9.6 ± 1.3*	8.9 ± 0.7	8.6 ± 1.1*	8.2 ± 0.1
Fbg (mg/dL)	n=8	n=8	n=8	n=8	n=7	n=9	n=13	n=8
baseline	148 ± 66	151 ± 60	152 ± 50	170 ± 61	131 ± 35	149 ± 43	130 ± 45	148 ± 58
post	133 ± 50*	143 ± 60	149 ± 56	176 ± 63	138 ± 27	122 ± 28	108 ± 29*	112 ± 41*

すべて生存例のみでの解析

* p<0.05 vs baseline, [†] p<0.05 NS vs H12, (MEAN ± SD)

結論

ラットの TBI 後凝固障害モデルを確立した. また, H12-(ADP)-リボソーム投与により凝固障害を軽減し, 脳挫傷を低減して死亡率低下をみとめ, 治療効果が示唆された.

文献

1) Daniel S Epstein, et al., *Injury*. **2014**, *45*, 819-824.

SY3-3 治験実施にむけた H12-(ADP)-リポソームの *in vitro* 安全性評価

○石田 治¹, 萩沢康介², 木下 学³, 武岡真司⁴

¹ 防衛医科大学校外科, ² 同生理学, ³ 同免疫微生物学, ⁴ 早稲田大学先進理工学研究科
oishida2000@gmail.com

緒言

人工血小板 H12-(ADP)-リポソームは、これまで薬剤誘導性血小板減少モデルや肝損傷出血性ショックモデル等においてその有用性が示されてきた。将来の臨床応用を視野に入れ、より安定した治験実施計画が立てられる心臓血管外科手術後の人工心肺後凝固障害に着目し、ウサギ人工心肺モデルを用いた前臨床実験において H12-(ADP)-リポソーム投与の有用性を示した。今回、H12-ADP-リポソーム投与の安全性につき、患者血液検体を用いて *in vitro* で検討した。

実験

人工心肺を使用した心臓血管外科手術患者 10 症例を対象に、①人工心肺前②人工心肺後③血小板輸血後、の 3 点で全血検体を採取した。H12-ADP-リポソーム (H12 群) または PBS (コントロール群) を加え反応させて後、血液凝固能、血小板機能、血小板活性化、および血小板-白血球凝集体 (PLA) 形成について評価した。

結果と考察

H12 群の患者血液は、どの時点においても、血液凝固能 (TEG; CK-R, CRT-MA)、血小板機能 (TEG; AA-MA)、血小板活性化の程度 (FACS; CD62P/CD61)、PLA 形成 (FACS; CD45/CD41a) に関してコントロール群と差がなかった。

結論

H12-ADP-リポソームは異常凝固、血小板活性化、PLA 形成を引き起こさなかったことから、人工心肺使用心臓血管外科手術患者に安全に使用でき、重大な副作用を引き起こすことなく出血部位の止血に貢献できることが示唆された。

一般演題 1

O1-1 ヘモグロビンを架橋点に持つ超分子ポリマーゲルの刺激応答性

松平 崇, 酒井宏水

奈良県立医科大学 医学部 化学教室

mattu@naramed-u.ac.jp

緒言

私たちはこれまでに、Hbを配列・集積する新たな方法として、両末端官能性PEGをHbの β 鎖に選択的に結合し、繰り返し配列を持つ鎖状の超分子ポリマーの合成を報告した^{1), 2)}。また前回の年次大会では、四分岐PEGをHbに結合させると超分子ポリマーゲル(Hb-PEG gel, 図1)が得られることを報告した³⁾。Hb-PEG gelでは $\alpha\beta$ サブユニット間に働く非共有結合性の相互作用が、網目構造を保持する架橋点となっている。本研究では、この相互作用の強さに変化をもたらすことが想定される外部刺激をHb-PEG gelに加え、レオロジー特性の変化を調べた。

実験

末端にマレイミド基を有する40kDaの四分岐PEGを、蒸留水中で1.5mMのヒト由来のoxyHbまたはcarbonylHbのCys-93(β)とそれぞれ結合させ、超分子ポリマーゲルHb-PEG gelのoxy体およびcarbonyl体を合成した。得られたoxy体のHb-PEG gelに対し、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ または $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を溶かしたリン酸緩衝溶液(pH 7.4)を体積比2:1で加え、deoxy体とmet体のHb-PEG gelをそれぞれ調製した。また、pHの影響を調べるため、carbonyl体のHb-PEG gelに対し、pHが2.6~12.5まで異なるリン酸緩衝溶液を体積比2:1で加えて均一化した。得られたHb-PEG gelについて動的粘弾性測定を行い、貯蔵弾性率 G' と損失弾性率 G'' の角速度 ω に対するプロットの交点から緩和時間 τ をそれぞれ算出した。

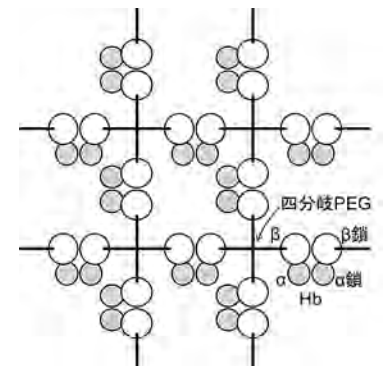


図1. 四分岐PEGをHbと反応させて得られる超分子ポリマーゲル(Hb-PEG gel)の模式図。

結果と考察

pH 7.4におけるoxy, carbonyl, deoxy, およびmet体のHb-PEG gelの緩和時間 τ を比較しところ、 $\text{met}(6\text{s}) < \text{oxy}(29\text{s}) < \text{carbonyl}(51\text{s}) < \text{deoxy}(390\text{s})$ の順で増大し、報告されている $[2\alpha\beta \rightleftharpoons \alpha_2\beta_2]$ の会合定数 K_a との相関がみられた。また、carbonyl体のHb-PEG gelのpHを2.6から12.5まで変化させると、 τ はpH 9付近で最大値(120s)を示し、高pH(>11)、低pH(<6.4)で顕著に低下した。さらに、 τ は温度上昇により低下し、粘性支配的な挙動を示した。これら一連の結果は、酸素分圧、配位子、鉄イオンの価数、pH、温度などの条件により、架橋点に配置されたHbの $\alpha_2\beta_2$ 構造の解離平衡を制御すれば、ゲル全体の粘弾性に増幅して応答される可能性を示唆しており、Hbの特性を利用した新しいスマートマテリアルの開発が期待される。

謝辞

本研究は科研費(基盤C, 課題番号21K12688)の補助を受けて進められた。

文献

- 1) Matsuhira, T. and Sakai, H., *Biomacromolecules* **2021**, 22 (5), 1944–1954.
- 2) Matsuhira, T., Yamamoto, K., and Sakai, H., *Biomacromolecules* **2019**, 20 (4), 1592–1602.
- 3) Matsuhira, T. and Sakai, H., *Artif. Blood* **2022**, 30 (1), 41.

O1-2 ポリオキサゾリン結合数の異なる“Hemoxa™”(人工酸素運搬体)の合成と機能

○石井幸太, 小松晃之

中央大学 理工学部

komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

緒言

ポリオキサゾリン(POx)は生体適合性と免疫学的ステルス性を有する擬ポリペプチド構造の水溶性高分子であり, ポリエチレングリコール(PEG)の有力な代替物として期待されている¹⁾. ごく最近, 我々はブタヘモグロビン(Hb)の分子表面にPOxを結合したポリオキサゾリン結合ヘモグロビン(Hemoxa™)を開発し, ヒト用および動物用人工酸素運搬体としての安全性と有効性を明らかにした²⁾. コアHbのPOx結合数は平均6本であるが, POx結合数と構造, 機能の相関は解明されていない. 本研究は, POx結合数の異なるHemoxaを合成し, その構造, 膠質浸透圧(COP), 酸素結合能を明らかにすることを目的とした.

実験

Hb溶液に*N*-Succinimidyl 3-maleimidopropionate(SMP) ($[Hb]/[SMP]=17\sim 43$ mol/mol)を加え, Hb分子表面にマレイミド基を導入後, 末端スルフヒドリル基をもつPOx-SHを結合することにより, Hemoxaを合成した. POx結合数(*n*)は乾燥重量法で算出した. *n*が平均6, 11, 16本のHemoxa(6), Hemoxa(11), Hemoxa(16)について, CDスペクトル, COP, 酸素結合能を測定した.

結果と考察

Hb1分子当たりのマレイミド基導入数は最大24個であったのに対し, POx結合数は最大18本であった. POxは高分子鎖どうしの立体障害により全てのマレイミド基に結合しないが, この時, Hb分子表面はPOxで十分に被覆されていると考えられる. そこで本研究では, Hemoxa(6), Hemoxa(11), Hemoxa(16)を合成し, その構造と特性を比較した.

サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)および電気泳動(Native-PAGE)から, Hemoxaの分子量がPOx結合数に比例して増大することを確認した. 各製剤のCDスペクトルがHbと一致したことから, コアHbの二次構造に変化はないことがわかった. 酸素親和性の指標である P_{50} は8~9 Torr(pH7.4, 37°C), 協同性の指標であるHill係数(*n*)は1.4であり, POx結合数は酸素結合能に影響しないことが明らかとなった. Hemoxa(6), Hemoxa(11), Hemoxa(16) ($[Hb]=5$ g/dL)のCOPはそれぞれ35 mmHg, 72 mmHg, 107 mmHgであった. 高POx結合数の製剤は出血性ショックにおける蘇生において, 少量投与でも循環血液量の確保に有効と考えられる.

結論

POx結合数の異なるHemoxaを合成し, その構造, 酸素結合能を明らかにした. POx結合数の違いによる酸素結合能の変化はなく, いずれも人工酸素運搬体としての応用が期待される.

文献

- 1) T. X. Viegas, *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **2011**, 22, 976.
- 2) T. Komatsu, *et al.*, *ACS Appl. Bio Mater.*, **2023**, 6, 3330.

O1-3 ポリオキサゾリン結合数の異なる Aloxa™ (動物用人工血漿)の合成と機能

○藤澤隼矢¹, 岡本 航¹, 河野光智², 小松晃之¹

¹中央大学 理工学部, ²埼玉医科大学総合医療センター
komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

緒言

近年, 愛玩動物(ペット)としてのイヌやネコの高齢化が進み, 動物医療に対する需要は益々高まってきている。しかし, 輸血治療に関しては血液バンクが存在しないため, 赤血球製剤はもとより, アルブミン製剤も入手することはできない。ごく最近, 我々はブタ血清アルブミン(PSA)の分子表面にポリオキサゾリン(POx)を結合した動物用人工血漿“Aloxa™”を開発し, その高い安全性と有効性を明らかにした¹⁾。POxは免疫学的ステルス性に優れた生体適合性の高い水溶性高分子である。本研究は, POx結合数の異なる Aloxaを合成し, その構造, 膠質浸透圧(COP), 血中滞留性を明らかにすることを目的とした。

実験

PSAに架橋剤 N-succinimidyl 3-maleimidopropionate(SMP)を加え($[SMP]/[PSA]=12\sim 100[mol]/[mol]$), PSA表面にマレイミド基を導入した後, 末端スルフヒドリル基を有する POx-SH(MW:5kDa)を結合することにより, Aloxaを合成した。POx結合数(n)が平均6, 10, 14本の Aloxa(6), Aloxa(10), Aloxa(14)について, DLS測定, CDスペクトル測定, COP測定を行った。また, Cy5.5で蛍光標識した Aloxaをラットに投与し, 血漿層における蛍光強度の減衰から血中滞留性を評価した。

結果と考察

PSA 1分子当たりのマレイミド基導入数は最大16個であった。この値がPSA表面に存在する Lys残基の数と一致したことから, 架橋剤SMPは表面Lysの全てに結合していることがわかった。また, PSA 1分子当たりの POx結合数は最大15本であり, 導入したマレイミド基のほぼ全てに POxが結合することが明らかとなった。そこで本研究では, Aloxa(6), Aloxa(10), Aloxa(14)を合成し, その構造と特性を比較した。粒径は POx結合数に依存して増大した。全製剤の CDスペクトルがPSAと一致したことから, コアPSAの二次構造に変化はないことがわかった。COPは POx結合数の増大に伴い上昇した。POx結合数を調節することにより, COP値の異なる製剤を作ることができる。Aloxa(6), Aloxa(10)の血中消失半減期はそれぞれ15hr, 20hrであり, POx結合数の増大に伴い延長した。

結論

POx結合数の異なる Aloxaを合成した。Aloxa製剤はCOP, 血中滞留性が高いので, 少量投与でも循環血液量の確保に有効である。

文献

1) W. Okamoto, J. Fujisawa, T. Komatsu, *et al.*, *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 9512.

一般演題 2

O2-1 人工赤血球 Hemoglobin Vesicles による心停止後の脳蘇生

○鶴田啓亮^{1,2}, 酒井宏水¹, 福島英賢²

¹ 奈良県立医科大学 化学教室, ² 奈良県立医科大学 救急医学教室

kei610805@gmail.com

緒言

心停止は最も致死的で生命予後が悪い疾患である。蘇生に成功しても、低酸素血症とその後の再灌流障害によって脳死・植物状態となることも多い。意識が改善しても、心停止後症候群によって神経学的後遺症が残ることも多い。その一因が、心停止時に脳へ血液が送られず、酸素が運搬されないことである。蘇生時から酸素化した濃厚赤血球を使用することも考慮されるが、血液型が不明であることや、様々な副作用の面から治療方法に至っていない。また、蘇生後に高用量の酸素を投与すると、フリーラジカルの形成によって、虚血領域の細胞が遅発性にアポトーシスを起こして壊死する。そのため、蘇生後に高用量の酸素投与をしても効果がないだけでなく有害である。

我々は、人工赤血球 Hemoglobin Vesicles (HbV) によって、これまで出血性ショックへの利用だけではなく、脳梗塞領域の増大の抑制や肺線維化症の酸化的障害の軽減などを報告している。蘇生開始時から人工赤血球を投与することで、低酸素血症・低酸素脳症を改善することで、心停止後の神経学的予後を改善できる可能性があると考えた。

実験

8~9 週のおス 370~400g の Wistar 系ラットを使用して実験した。2.5% のイソフルレンによる麻酔下に、気管挿管して人工呼吸開始した。右内頸静脈にカテーテルを挿入し、左大腿動脈から動脈圧ラインを確保した。ベクロニウムを 2mg/kg 投与して自発呼吸を消失させてから、人工呼吸器を停止した。収縮期血圧が 25mmHg 以下となった段階を心肺停止とし、呼吸停止状態となってから 8 分後に、介入群として人工赤血球を 5ml/kg、コントロール群として生理食塩水 5ml/kg を投与した。また、アドレナリンを 0.01mg/kg とメイロン 1mEq/kg を投与した。その後、1 分後に人工呼吸管理を再開した。5 分以上平均動脈圧が 50mmHg 以上を維持できた段階で蘇生成功とし、自発的な循環が維持できなければ、蘇生中止とみなして除外とした。意識改善後に抜管し、7 日後に Y-maze 回路で行動評価し、安楽死させて病理学的評価を施行した。行動評価は自発行動量と空間作業記憶を評価し、two-way ANOVA を用いて解析した。

結果と考察

蘇生時に HbV を使用した群 (n=7) は、生理食塩水を使用したコントロール群 (n=7) と比べて自発行動量が (13.7 回に対して 10.8 回) と空間作業記憶 (76% に対して 55%) とともに有意に差を認めた ($p < 0.01$)。また、病理組織学的評価でも、HbV を使用した群で、神経細胞のアポトーシスとミクログリアの増殖が少なかった。HbV を投与することで低酸素脳症を改善し、その結果蘇生後の神経学的予後が改善された可能性がある。

結論

蘇生時に HbV を投与することで、蘇生後の神経学的予後を改善できる可能性がある。

一般演題 2

O2-2 抗がん剤誘発骨格筋 - 精神障害に対する一酸化炭素搭載型赤血球の有用性評価

○野口勇夢¹, 前田仁志¹, 永崎太清¹, 小林一樹¹, 田口和明², 酒井宏水³, 小田切優樹⁴, 渡邊博志¹, 丸山 徹¹

¹熊本大学 薬学部 薬剤学分野, ²慶應義塾大学 薬学部 薬効解析学講座

³奈良県立医科大学 医学部 化学教室, ⁴崇城大学 薬学部

220y3005@st.kumamoto-u.ac.jp

緒言

抗がん剤により惹起される精神障害は、QOL を損なう恐れがあるため、その予防法も含めた対策が望まれている。抗がん剤の多くが血液脳関門によって脳内への移行が強く制限されていることから、抗がん剤による精神障害の発症には末梢組織が関与していると推察される。抗がん剤は、精神障害だけでなく骨格筋障害も惹起する。興味深いことに、骨格筋における神経障害物質キヌレニンの代謝不全は精神障害を惹起する¹。そこで本研究では、精神障害が多数報告されているドキソルビシン(DOX)を対象薬とし、DOX 誘発精神障害においても骨格筋キヌレニン代謝不全が関与をしているか否かを調査した。さらに、一酸化炭素(CO)の吸入はキヌレニン代謝酵素(KAT1)誘導能を有する PGC-1 α の発現を増加させることから²、キヌレニン代謝促進剤として、輸血赤血球(RBC)を CO デリバリー担体として応用した CO 搭載型 RBC(CO-RBC)を作成し、DOX 誘発の骨格筋 - 精神障害に対する有効性を検証した。

実験

雄性 C57BL/6J マウスに対して、DOX(3mg/kg)を週 3 回、4 週間に渡って投与することで病態モデルマウスを作成した。マウス精製 RBC に CO ガスをバブリングすることで、100% のヘモグロビン(Hb)に CO が結合した CO-RBC を作成した。DOX 処置マウスに対して、CO-RBC を臨床の RBC 輸血 1 単位分に相当する 1,400mg Hb/kg 体重で 3 週目から週 2 回、2 週間に渡って投与した。

結果と考察

高架式十字迷路試験により、開放領域の移動距離が DOX 処置マウスで減少したため、DOX による不安障害の惹起が確かめられた。このとき、筋力及び筋量の低下とともに、骨格筋における PGC-1 α 及び KAT1 の発現低下が認められた。さらに、血中キヌレニン濃度が増加したことから、DOX によって、骨格筋障害ならびにキヌレニン代謝不全が惹起されることが明らかとなった。CO-RBC は、その静脈内投与により骨格筋中 CO 濃度を有意に増加させたため、骨格筋への CO 送達能を有することが確認された。CO-RBC は、DOX 処置マウスに対して、筋力増強因子の活性化及び筋萎縮因子の発現減少を伴って筋力及び筋量を回復させるとともに、骨格筋における PGC-1 α 及び KAT1 の発現を回復させた。さらに、CO-RBC は、血中キヌレニン濃度を低下させ、高架式十字迷路試験における開放領域の移動距離を回復させたことから、CO-RBC が、骨格筋におけるキヌレニン代謝を活性化させ、DOX 誘発の精神障害を軽減することが示された。

結論

骨格筋 PGC-1 α /キヌレニン代謝を標的とした CO-RBC は、DOX が誘発する骨格筋 - 精神障害に対する新規細胞療法となりうる。

文献

- 1) Agudelo LZ, et al., *Cell*. **2014** Sep; 159 (1): 33-45.
- 2) Pecorella SR, et al., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **2015** Oct; 309 (8): L857-71.

O2-3 Development of PEG-coated PFOB/PLC core-shell AOCs via SPG membrane emulsification technique

○Xiao Da¹, Natsuko F. Inagaki², Arvind S.Chandel¹, Taichi Ito^{1, 2}

¹Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

²Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

xiaoda0817@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

Introduction

Red blood cell not only transports oxygen to organs, but also has great circulation profile of 120 days in our body. Therefore, synthetic RBC analogues have gained increasing attention to be a new generation of oxygen carriers¹. Previously, we utilized the biocompatible and biodegradable polymer, polylactide-co-caprolactone (PLC) as shell, and Perfluorooctyl bromide (PFOB) as core successfully developed PFOB/PLC core-shell artificial oxygen carriers (AOCs) via Shirasu porous glass membrane emulsification technique (SPGME), which has great biocompatibility and excellent capacity of carrying oxygen². However, coating of the particles was not investigated. Experimental Polyethylene glycol (PEG)-coated PFOB/PLC core-shell AOCs were prepared via SPG membrane emulsification by adding PEG-based triblock copolymers to PLC and PFOB in disperse phase. Their size distribution was measured by laser scattering particle size distribution analyzer. The shape and surface structure of MPs were observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) and SEM. ¹H NMR and ¹⁹F NMR measured the dissolution of MPs in CDCl₃. The interaction of the MPs with RAW 264.7 macrophages and phagocytosis index were investigated using CLSM. PEG-coated PFOB/PLC AOCs were cultured with EGFP-Hela cells to analyze their ability to delivery oxygen.

Results and Discussion

PEG-coated PFOB/PLC AOCs were monodispersed, of which the mean size was $7.0 \pm 2.3 \mu\text{m}$ with 32.8% coefficient variation (CV). ¹H NMR spectra of MPs showed a peak at 3.6ppm, proving the existence of the EO group and indicating the successful coating of PEG. CLSM and SEM images of the cross-section of MPs and ¹⁹F NMR spectra of MPs verified that PFOB was successfully encapsulated in the PLC shell and formed a core-shell structure. Furthermore, the phagocytosis index of PEG-coated AOCs significantly decreased compared to non-coated AOCs. And PEG-coated PFOB/PLC AOCs enhanced the oxygen supply to cells, indicating their potential for future applications.

Conclusion

In this study, we successfully prepared PEG-coated PFOB/PLC core-shell MPs via SPG membrane emulsification for the first time. Moreover, PEG coating proved beneficial for MPs to be protected from being uptake by macrophages and to be a promising AOC.

Reference

- 1) Christa L. Modery-Pawlowski, et al., *Biomacromolecules*. 2013, 14, 939.
- 2) Xiaoting Fu, Ito T., et al., *Adv. Mater. Technol.* 2021, 7, 2100573.

一般演題 3

O3-1 人工赤血球 (Hb-V) 製剤の長期保存による脂質膜への影響

○久禮智子, 酒井宏水

奈良県立医科大学 医学部 化学教室

kure@naramed-u.ac.jp

緒言

人工赤血球 (Hemoglobin vesicles, Hb-V) 製剤は, 期限切れ赤血球製剤から単離・精製したヘモグロビン (Hb) 液を人工の脂質膜からなるリポソームに内包した人工酸素運搬体である¹⁾. Hb は脱酸素化処理をして不活性ガス (N₂) 下で deoxy-Hb として保存することにより, 酸化による不活化を抑え長期間 (2 年以上) の保存に耐えうる. 一方, リン脂質を主成分とする人工の脂質膜の構成成分 (DPPC/cholesterol/DHSG/DSPE-PEG=5/4/0.9/0.03, by mol) は, Hb の内包効率や生体適合性, 分散性を高めることを目的に選択され, 保存中 (室温, 2 年間) の粒子径や遊離 Hb 値に大きな変化は見られないことを以前に報告した²⁾. しかし, 生理食塩水中で分散液として長期保存される Hb-V は, 脂質膜成分の加水分解等の懸念がある. そこで, Hb-V 製剤を長期間保存した場合の脂質膜成分への保存の影響について調べることを目的とした.

実験

Hb-V 製剤を 4, 25, 40°C の温度管理下で保存後, 界面活性剤 (*n*-octyl- β -D-glucopyranoside) と 2-propanol を用いて脂質成分を分解・抽出し, HPLC を用いて脂質膜の構成成分比 (DPPC/cholesterol/DHSG/DSPE-PEG) を算出した. 脂質膜成分のうち極めて安定な cholesterol を基準値 4.0 (モル比) とした. HPLC 測定条件は, カラム: Cadenza 5 CD-C18 column (150 x 4.6 mm (length x i.d.)), 移動相: methanol/THF/H₂O/TFA=950/30/20/0.5, 流速: 1.0 mL/min とした. また, LC-MS 測定を行ない, 保存後の脂質分解物の同定を試みた. Hb-V 保存中の期間・温度による影響について比較した.

結果と考察

4°C 保存では 2.4 年後で 99.1%, 4.4 年後でも 96.5% の脂質膜成分が未分解であった. 同様に 25°C 保存での未分解の脂質残存率は 6 ヶ月後で 98.2%, 1.5 年後で 92.0%, 40°C 保存では 3 ヶ月後で 95.8%, 6 ヶ月後で 85.6% であった. 長期保存で生成する分解物は主にエステル結合分解産物である DPPC 由来の lyso-PC とバルミチン酸, DHSG 由来の一本鎖の HSG と 1-hexadecanol, DSPE-PEG 由来のステアリン酸と推定された. コレステロール由来の分解物は確認できなかった. 血中投与後の血管内での Hb-V の強度を評価するために行なった剪断応力負荷試験 (1500 s⁻¹, 37°C, 2hr) では, 4°C 保存で 4.4 年保存後, 25°C で 1.5 年保存後および 40°C で 0.5 年保存後と保存前の Hb 遊離率に顕著な差は無かった.

結論

Hb-V の長期保存による脂質成分の分解に対する影響は保存温度が高いほど, また保存期間が長いほど大きかった. 長期保存により脂質膜の一部が分解した Hb-V であっても, リポソームの強度の低下はほとんどみられなかった.

文献

- 1) Sakai H, *J. Funct. Biomater.* **2017**, 8, 10.
- 2) Kure T, Sakai H, *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2021**, 7 (6), 2835.

一般演題 3

O3-2 片肺全摘周術期重症出血性ショックモデルにおける人工酸素運搬体 (HbV) の蘇生・抗不整脈効果； Optical Mapping による検討

○高瀬凡平^{1,4}，東村悠子¹，真崎暢之¹，木下 学²，酒井宏水³

防衛医科大学校 集中治療部¹，免疫微生物学²，奈良県立医大³，入間ハート病院⁴

dui15772004@yahoo.co.jp

緒言

周術期出血は胸部手術の主要な合併症の1つであり，出血性ショックから急性循環不全，さらには死に至るまでの大量出血が起こりうる。また，全肺切除症例の0.3-1.8%が輸血を必要とすると報告されている。これまで，人工酸素運搬体(Liposome-encapsulated hemoglobin vesicles [HbV])の出血性ショックモデルにおける抗不整脈効果を発表してきた。そこで，臨床治験を想定し，全肺切除ラットモデルにおける HbV の蘇生効果及び抗不整脈作用を Optical Mapping 解析(OMP)から検討した。

方法

SD ラット(N=20)を対象として，左片肺全摘手術を実施した。直後に大腿動脈脱血蘇生による50%血液交換モデルを作成した。Sham 群(NL 群)，HbV 投与群(HbV 群)，洗浄赤血球投与群(wRBC 群)及び5%albumin 投与群(ALB 群)を作成し，肺動脈圧を反映する右室圧を測定するとともに，心拍数・平均血圧(MBP)変化を記録した。また，貧血の程度をHb濃度にて確認するとともに，脱血蘇生後約20分間観察後に心摘出し，不整脈誘発法(EPS)を含むOMPを実施した。平均血圧の変化とOMPにおける電気生理指標とEPSによるHbVの抗不整脈効果を検討した。

結果

左片肺全摘手術後肺動脈圧を反映する右室収縮期圧は 52 ± 20 mmHgまで増加した。大腿動脈脱血蘇生後20分間の観察で，HbV 群・wRBC 群ではMBPは正常に保たれたが，ALB 群では蘇生直後よりMBPは有意に低下し，循環障害が認められた(MBP: HbV 群，wRBC 群 vs. ALB 群: 125 ± 30 , 128 ± 28 vs. 68 ± 20 mmHg, $P < 0.059$)。また，大腿動脈脱血蘇生中のモニター心電図の心室性不整脈の頻度は，ALB 群で頻繁に認められた。その頻度はALB 群に比較し，HbV 群ではwRBC 群と同程度に抑制された。OMPで求めたAction potential duration dispersion(APDd)とEPSによる致死性不整脈抑制度はHbV 群とwRBC 群では同定度であった。EPSによる致死性不整脈誘発率もHbV 群・wRBC 群で抑制されていた。

結論

HbV は全肺切除周術期出血性ショックモデルにおいて有効な心循環機能保持と抗不整脈効果の維持が認められた。これらの知見は，HbV の臨床治験を実施するうえで有用な知見と示唆される。

一般演題 3

O3-3 ユニバーサル赤血球としてのポリオキサゾリン結合赤血球の合成と酸素親和性

○藤田真悠花, 小松晃之

中央大学 理工学部

komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

緒言

血液型は赤血球(RBC)表面に存在する血液型抗原(ABO抗原, Rh抗原)の有無により決まる。Rh抗原は複雑であるが、免疫原性の高いRhD抗原がある場合をRh陽性、ない場合をRh陰性としている。日本人のRhD-の頻度は0.5%と低く、稀少なRh陰性の輸血液は常に不足状態にある。血液型を持たない人工赤血球(ユニバーサルRBC)が実現すれば、誰にでも投与可能な製剤として大きな医療イノベーションになると期待される。Acharyaらは、RhD抗原をポリエチレングリコール(PEG)で遮蔽したPEG結合RBC(PEG-RBC)を報告している¹⁾。しかし、PEGは体内に蓄積し、抗PEG抗体を産生する。一方、ポリオキサゾリン(POx)は優れた免疫学的ステルス性を持ち、体内に蓄積しない生体適合性の高い水溶性高分子である。本研究は、RBC(O型, RhD+)膜表面にPOxを共有結合した3種類のPOx結合RBC(POx_{5k}-S-RBC, POx_{25k}-S-RBC, POx_{5k}-M-RBC)を合成し、ユニバーサルRBCとしての特性と酸素親和性を明らかにすることを目的とした。

実験

【POx-S-RBCの合成】RBC(O型, RhD+)分散液に二官能性架橋剤である3-Sulfo-N-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate sodium salt(Sulfo-SMCC)を加え、RBC表面にマレイミド基を導入した後、末端スルフヒドリル基を有するPOx(POx_{5k}-SH(Mw:5kDa), POx_{25k}-SH(Mw:25kDa))を反応させ、POx_{5k}-S-RBC, POx_{25k}-S-RBCを合成した。

【POx-M-RBCの合成】RBC(O型, RhD+)分散液に架橋剤2-Iminothiolan hydrochloride(IT)を加え、RBC表面にスルフヒドリル基を導入した後、末端マレイミド基を有するPOx(POx_{5k}-MA(Mw:5kDa))を反応させ、POx_{5k}-M-RBCを合成した。

血液型検査では抗A, B, RhD抗体と混合し、凝集の有無を確認した。また、酸素親和性および保存安定性を評価した。

結果と考察

血液型検査において、3種類のPOx結合RBCはいずれも抗RhD抗体と反応せず凝集を生じなかった。POxの結合によりRhD抗原は完全に遮蔽されていることが明らかとなった。また、酸素親和性の指標であるP₅₀はPOx_{5k}-S-RBCが25 Torr(pH7.4, 37°C), POx_{25k}-S-RBCが28 Torrであり、RBC(25 Torr)と同等の値を示した。分子サイズの大きな架橋剤Sulfo-SMCCはRBC膜を透過しないため、HbのP₅₀に影響を及ぼさない。一方、POx_{5k}-M-RBCのP₅₀は7 Torrであり、酸素親和性は増大した。小さなITはRBC膜を透過しHbと結合するため、酸素親和性が上昇したと考えられる。また、調製28日目における溶血率の増加は、POx_{5k}-S-RBCが約10%, POx_{25k}-S-RBCが<1%, POx_{5k}-M-RBCが約50%であり、POx_{25k}-S-RBCが最も安定であることがわかった。

結論

2種類の架橋方法により合成したPOx_{5k}-S-RBC, POx_{25k}-S-RBC, POx_{5k}-M-RBCは、RhD抗原を遮蔽したユニバーサルRBCである。なかでも、POx_{25k}-S-RBCはRBCと同等の酸素親和性、保存安定性を有することがわかった。稀少血液型患者や貧血患者の治療に有効であると考えられる。

文献

1) A. Acharya, *et al.*, *Transfusion* **2005**, *45*, 374-383.

一般演題 3

O3-4 人工酸素運搬体“ストロマフリーヘモグロビンナノ粒子”の有効性評価(50%出血性ショックラットの蘇生試験)

○高山夏実¹, 藤田真悠花¹, 河野光智², 小松晃之¹

¹中央大学 理工学部, ²埼玉医科大学総合医療センター

komatsu@kc.chuo-u.ac.jp

緒言

ヘモグロビン(Hb)を用いた人工酸素運搬体が抱える課題の一つにHbの自動酸化に伴う酸素輸送能の低下がある。一方、赤血球からストロマ(赤血球膜)成分のみを除去したストロマフリーヘモグロビン(SFHb)は、過酸化水素不均化酵素(カタラーゼ(Cat))を含有している。我々は、抗酸化能を有する人工酸素運搬体として、SFHb微粒子の表面にヒト血清アルブミン(HSA)を結合したストロマフリーヘモグロビンナノ粒子(SFHbNP, Fig. 1)を合成した。本講演では、SFHbNP製剤の安定性およびラット出血性ショックモデルを用いた有効性評価の結果について報告する。



Fig. 1 Structure of SFHbNP.

実験

SFHbを架橋剤N-succinimidyl 3-maleimidopropionateとDithiothreitolを用いて重合した後、微粒子表面にHSAを結合することでSFHbNP(粒径:30nm)を合成した。oxySFHbNP溶液を冷蔵保存(4℃)し、metHbの割合を経時的に測定することにより、oxy体の安定性を評価した。

【有効性評価①】ラット(麻酔下)の動脈カテーテルより全血液量の50%を脱血することで出血性ショック状態とした。15分後に静脈カテーテルより同容量のSFHbNP溶液([Hb]=5g/dL)を投与し、蘇生を行った。試料投与2時間後まで、循環動態観察、血球数測定、血液ガス分析を含む経過観察を実施した。2時間後に動脈血(5mL)を採血し、血液生化学検査を行った。対照群は、自己血(SAB)群、乳酸リンゲル液(RL)群とした。

【有効性評価②】上記ラット出血性ショックモデルをSFHbNP溶液投与により蘇生した後、覚醒させ7日間観察した。7日後に動脈血(5mL)を採血し、血球数測定、血液生化学検査を行った。

結果と考察

3ヶ月保存後のoxySFHbNP溶液のmetHb率は約9%であった。SFHbNPは粒子内に含まれるCatの作用により高い抗酸化能を有し、oxy体で長期保存可能であることが示された。

【有効性評価①】RL群では5例中3例のラットが2時間以内に死亡したのに対し、SFHbNPおよびSAB群ではすべてのラットが2時間後まで生存した。50%脱血により30mmHg程度まで低下した平均動脈血圧(MAP)はSFHbNP溶液の投与により初期値と同程度まで回復し、RL群よりも有意に高い値を推移した。また、アシドーシスと乳酸値の上昇もSFHbNP溶液の投与により改善された。血液生化学検査においても肝臓および腎機能に異常は見られなかった。

【有効性評価②】SFHbNP溶液で蘇生したラットは、7日後まで全例が生存し、一般状態に異常は認められなかった。50%脱血により初期値の半分に減少した赤血球数、ヘマトクリット値は初期値と同程度まで回復した。

結論

高い抗酸化能を有するSFHbNP製剤は、oxy体で長期保存が可能である。ラットを用いた有効性評価より、SFHbNPが出血性ショック状態の蘇生液として有効であることが明らかとなった。

人工血液の有効性検証 ー動物実験モデルの確立ー

萩沢康介

防衛医科大学校生理学講座

hagisawa@ndmc.ac.jp

新規薬剤を開発する際に、薬効を確認するためには、各種疾患(病態)を再現しつつ、作用機序を検証できる最適な動物モデルが不可欠になる。

我々は、人工酸素運搬体や血小板代替物のプレホスピタルでの治療応用を前提として、マウス・ラット・ウサギを用いて、外傷性肺出血モデル・頭部外傷モデル・敗血症性ショックモデル・大量出血後希釈性凝固障害モデル・重症(血管虚脱)出血性ショックモデル・産科危機的出血モデル・羊水塞栓症モデルを確立してきた。

それぞれ、どのような狙いで臨床病態を再現しようとしてきたかについてご紹介したい。

謝 辞

第30回日本血液代替物学会年次大会の開催にあたり、多くの企業・団体よりご支援、ご協力を賜りました。ここに深甚なる感謝の意を表します。

第30回日本血液代替物学会年次大会

会長 照井 克生

株式会社大塚製薬工場

アコマ医科工業株式会社

エドワーズライフサイエンス株式会社

富士フイルムメディカル株式会社

丸石製薬株式会社

2023年10月現在

いまさらヘモグロビン？ ヘモグロビンのアロステリーを再考する

Hemoglobin Now? Hemoglobin Allostery Revisited

柴山 修哉

Naoya Shibayama

和文抄録

アロステリックタンパク質の機能調節に関わる構造変化は、ヘモグロビンの事例を引き合いに出して T (tense) 状態と R (relaxed) 状態の構造平衡を仮定した 2 状態モデルで説明されることが多い。しかし、肝心のヘモグロビンでは、2 状態モデル的な理解が定性的にはともかく、定量的には成功していない。2 状態モデルの問題点は、溶液条件に依存して大幅に変化する T 状態ヘモグロビンの O₂ 親和性を説明する構造基盤が欠落していることにある。研究者の間でも、O₂ 結合と共役したヘモグロビンの高次構造平衡の実体についてはまだ議論が続いている。最近、筆者らの研究グループは、特異な性質を持つ Hb 結晶を駆使した X 線構造解析と結晶の O₂ 平衡曲線測定を行い、ヘモグロビンの 4 次構造変化は単純な 2 状態転移ではなく、多状態の間を行き来する複雑な過程であることを、単一結晶型中の 9 種類の異なる 4 次構造を解くことで実証した。また、多くの研究者がこれまで数 10 年間探し求めていた T と R の中間的な構造と機能を持つ新しいアロステリック状態を捕らえることにも初めて成功した。本稿では、ヘモグロビンの構造と機能に関する最新の知見を解説するとともに、ヘモグロビンのアロステリーを再考する。

Abstract

Structural changes involved in the regulation of allosteric proteins are often explained by the two-state model that assumes an equilibrium between the T (tense) and R (relaxed) states, with hemoglobin as a classic example. However, quantitative understanding of the allostery of hemoglobin has not been reached by using the two-state model, although qualitatively understood to some extent. The problem with the two-state model lies in the lack of the structural basis to explain the wide variation in O₂ affinity of the T-state hemoglobin under various solution conditions. Even among researchers, controversy still exists as to the true nature of hemoglobin conformational equilibria coupled with O₂ binding. Recently, our research group performed X-ray structural analysis and O₂ equilibrium measurements of hemoglobin crystals with unique properties, and demonstrated that the quaternary structural changes of hemoglobin are not a simple two-state transition but rather a complex process involving transitions among multiple states by resolving nine different quaternary structures within a single crystal form. Furthermore, for the first time we succeeded in capturing a new allosteric state with intermediate structure and function between T and R, which many researchers have been seeking for over decades. In this review, I will illustrate the latest findings regarding the structure and function of hemoglobin while revisiting hemoglobin allostery.

Keywords

hemoglobin, allostery, two-state model, MWC model, X-ray crystallography

自治医科大学医学部 生理学講座 生物物理学部門

〒329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1 Department of Physiology, Division of Biophysics, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan

E-mail: shibayam@jichi.ac.jp

論文受付日 2023 年 8 月 21 日 論文受理日 2023 年 9 月 3 日

はじめに

ヘモグロビン (Hb) は X 線結晶構造解析が最初に適用されたタンパク質の一つであり、その成果を基礎とした Perutz の立体化学的メカニズム¹⁾と Monod-Wyman-Changeux (MWC) の 2 状態モデル²⁾が多くの教科書に取り上げられている。一部には、Hb の構造機能相関の完全理解は既に達成されたかの誤解もある。しかしながら、2 状態の平衡を仮定した単純なモデルでは、溶液条件に依存して大幅に変化する Hb の O₂ 平衡曲線を包括的に記述することはできない^{3,4)}。このことは、Hb 研究者の間ではよく知られている。では、Hb の構造変化の実体を我々は今、どのように理解すればよいのであろうか。

2010 年に筆者は、Hb のアロステリーを記述する MWC2 状態モデルの修正方向に関する総説を本誌に発表した⁵⁾。あれから 10 年余り。この間に何がわかり、何が課題として残されたのか、本稿にまとめてみる。Hb は言うまでもなく血液ガス運搬の主役であり、人工血液研究において最も関心が深い血液構成成分の一つであろう。本稿がそのような応用研究の一助となれば幸いである。

アロステリーとは

生命の秩序はタンパク質分子の機能が目的に応じて調節されることで維持されている。タンパク質分子がリガンドやイオンの結合によりその高次構造を変化させ、分子上の別の部位の活性を大幅に変えることで実現されている調節法がある。これをアロステリック調節またはアロステリーと呼ぶ。アロステリーは酵素の活性調節⁶⁾のみならず、遺伝子制御⁷⁾、シグナル伝達⁸⁾などに関与する数多くのタンパク質が示す普遍的生命現象⁹⁾として近年更なる注目を集めている。

アロステリーのメカニズムについてはあまりたくさんのごことはわかっていないが、多くの事例に共通のメカニズムがあると考えられている。その解明を目指して数多くの研究者が Hb 研究にしのぎを削ってきた長い歴史がある。

Hb のアロステリー

本稿では特に断らない限り、最もよく研究されてきたヒトの Hb について言及する。

Hb は、 α 、 β と呼ばれる 3 次構造のよく似た 2 種類のサブユニットが 2 つずつ会合した $\alpha_2\beta_2$ 型の 4 量体である。構造的に等価な 2 つの $\alpha\beta$ 量体 (Fig.1 の $\alpha_1\beta_1$ と $\alpha_2\beta_2$) が 2 回回転対称軸で関係づけられた $\alpha\beta_2$ 量体の 2 量体 (dimer of $\alpha\beta$ dimers) である (Fig. 1a, left)。各サブユニットは、N 末端から順に A, B, ……、H と名付けられた α ヘリックス部分とそれらをつなぐ比較的短い NA, AB, ……、HC と呼ばれる非ヘリックス部分とから成る (Fig. 1b, c)。各サブユニットにはヘムが一つずつ含まれている。このヘムの中心金属の Fe(II) が F ヘリックスの 8 番目の His (F8) (近位 His と呼ぶ) と配位結合で繋がれ、反対側の配位座に O₂ が 1 個脱着する仕組みになっている (Fig. 1a, right)。T 状態デオキシ Hb 中の Fe(II) は、高スピン状態 (S=2) でイオン半径が大きくピロール窒素平面に

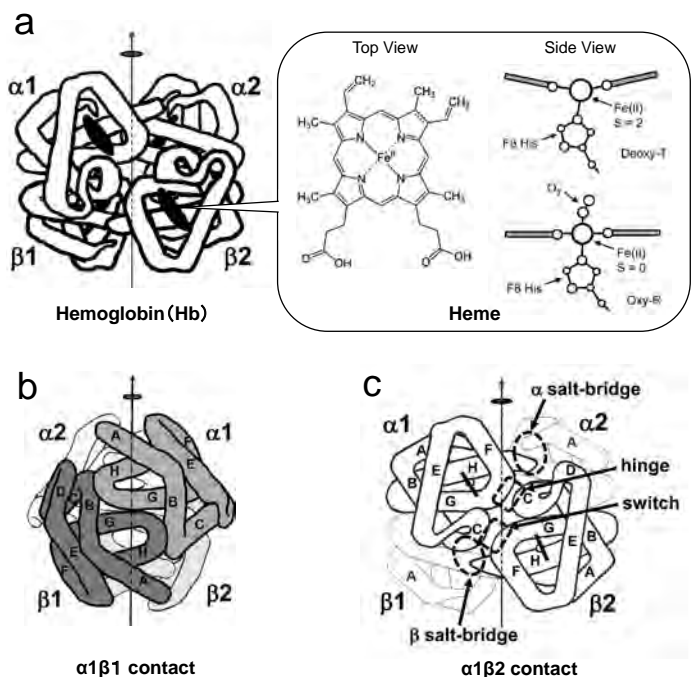


Fig. 1. Human Hb. a) Schematics of Hb (left) and its heme group (right). The Hb tetramer consists of two identical $\alpha\beta$ dimers (i.e., $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_2$) related by a twofold axis of symmetry (arrowed). Heme is protoporphyrin IX containing Fe(II) (see top view). One molecule of heme is attached to each subunit of Hb via coordination with the imidazole portion of His F8 (see side view). A single O₂ molecule binds reversibly to the six-coordinate position of Fe(II) of the heme, so that each Hb molecule can carry up to four O₂ molecules. b) The $\alpha_1\beta_1$ intra-dimer contact in Hb. The α helices are labeled as A to H from the N to C terminus. The B, G, H helices of both subunits act as the intra-dimer packing contacts that hold the $\alpha\beta$ dimer together. c) The $\alpha_1\beta_2$ inter-dimer contact in Hb. In the T state, two $\alpha\beta$ dimers are constrained by the α and β salt-bridges involving the C-terminal residues, whereas these constraints are absent in the R state. The T-R transition is also accompanied by changes in the packing interactions in the $\alpha_1\beta_2$ contact, in which there is a “switch region” consisting of residues of the C-helix in α_1 and those of the FG-corner in β_2 , along with a “hinge region” consisting of residues of the FG-corner in α_1 and those of the C-helix in β_2 .

収まらず His (F8) 側へ約 0.4 Å 飛び出している¹⁰⁾。一方、R 状態オキシ Hb 中の Fe(II) は、低スピン状態 (S=0) でヘムはほぼ平面となる^{11,12)}。

Hb のアロステリーは 2 種類に大別できる。一つは、ヘム間相互作用と呼ばれる正のアロステリック調節である。Hb に初めの方に付く O₂ が後から結合する O₂ を付きやすくする協同作用のことである。溶液条件にもよるが、Hb に 4 個目に付く O₂ は 1 個目の O₂ に比べ 100 倍以上も付き易くなる⁴⁾。このヘム間相互作用のおかげで、Hb の O₂ 平衡曲線は S 字型となり O₂ 濃度の低い末梢組織へより多くの O₂ を供給することが可能となる。もう一つのアロステリーは、ヘムとは別の部位に結合する水素イオン、塩素イオン、有機リン酸、CO₂ などの非ヘムリガンドがヘムの O₂ 親和性を低下させる負のアロステリック調節

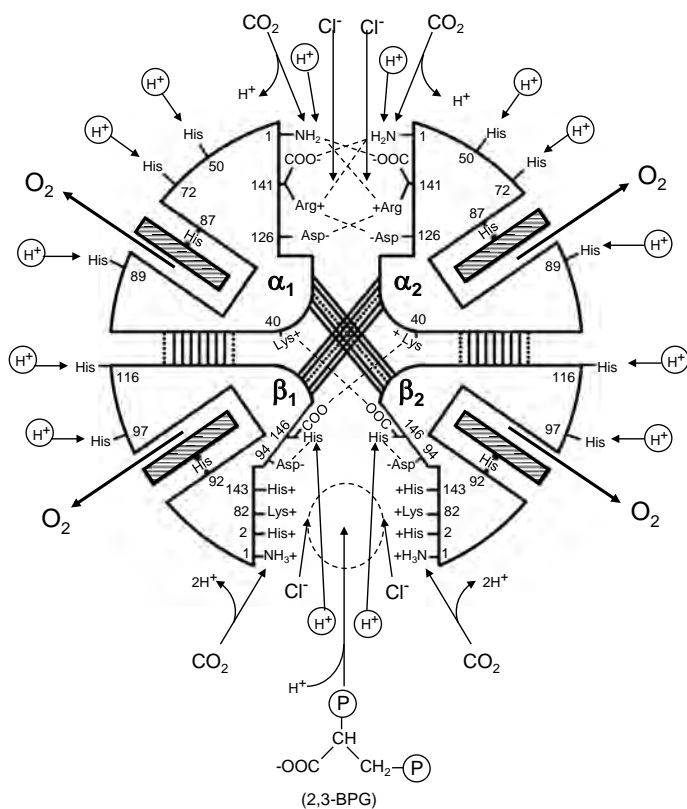


Fig. 2. Schematic representation of the reactions of hemoglobin with ligands. Arrows indicate the directions of the reactions of non-heme ligands upon O₂ dissociation. The numbers attached to the residues are the sequence numbers. The α -amino groups and the α -carboxyl groups are represented by $-\text{NH}_2$ (or $-\text{NH}_3^+$) and $-\text{COO}^-$, respectively. Circled protons are those binding to the Bohr groups¹⁴⁾. Salt bridges (dashed lines), van der Waals contacts (solid lines), and hydrogen bonds (dotted lines) are also shown. Note that all the salt bridges are present in T-state deoxyhemoglobin but absent in R-state oxyhemoglobin. The $\alpha 1$ - $\beta 2$ (or $\alpha 2$ - $\beta 1$) interface contains less bonds or contacts than the $\alpha 1$ - $\beta 1$ (or $\alpha 2$ - $\beta 2$) interface, and can undergo significant changes upon the quaternary structure change. Reproduced with slight modifications from Ref. 5.

である (Fig. 2). Hb は、これら 2 種類のアロステリーを発現することにより、各組織の生理学的需要に応じた O₂ 運搬を実現している。

2 状態モデル

教科書的には、上述の 2 種類のアロステリーはいずれも、X 線結晶構造解析で明らかにされた T 構造 (緊張が架かったという意味の Tense) と R 構造 (緊張が緩んだという意味の Relaxed) の間の平衡を仮定した 2 状態モデルで定性的に説明されている。ここで言う 2 状態モデルは、Monod-Wyman-Changeux (MWC) が 1965 年に提唱した MWC アロステリックモデル²⁾ の 2 状態版のことである。ここで敢えて“2 状態版”と書いたのは、Monod らのオリジナルの論文に書かれている状態数は“(at least) two”という幅を持たせた表現になっているからである²⁾。MWC2 状態モデルの特徴と歴史に関しては 2010 年の本誌の総説⁵⁾で詳し

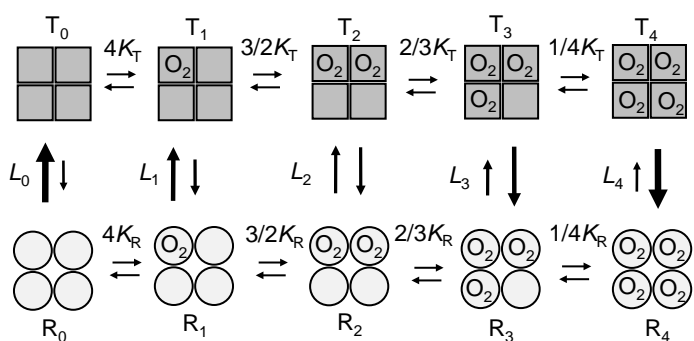


Fig. 3. An equilibrium diagram of four-step binding of O₂ in Hb as predicted by the MWC two-state model²⁾. The MWC model assumes an equilibrium between the two affinity conformations of the entire molecule, T and R; T denotes the tense or low-affinity quaternary structure and R denotes the relaxed or high-affinity quaternary structure (the subscripts indicate the numbers of bound O₂ molecules). The definition of the parameters is as follows: K_T is the intrinsic O₂ association equilibrium constant for the low-affinity T-state, K_R is that for the high-affinity R-state, and L_i is the equilibrium constant for the conformational equilibrium between T_i and R_i, where $L_i = [\text{T}_i]/[\text{R}_i] = L_0 (K_T/K_R)^i$ where i is the number of ligand bound. Note that the macroscopic O₂ equilibrium constant at each step can be represented as the product of an intrinsic O₂ equilibrium constant and a statistical factor that takes into account the number of ways determined by the numbers of filled and empty binding sites.

く述べているので、ここでは要点のみをおさらいしておく。

Monod らの最も斬新なアイデアは、リガンド親和性の異なる 4 次構造の平衡 (pre-existing equilibrium) をモデルに取り入れたことである。Hb の場合、4 段階の O₂ 結合平衡と共役した T と R の構造平衡を仮定することで、O₂ 結合の協同性をすっきりと表現することができる (Fig. 3)。2 状態モデルの優れた点は、簡潔性 (少数パラメータ) と各パラメータの物理的意味の明確性にある。具体的には、T と R それぞれの O₂ 結合の平衡定数 K_T と K_R 、および O₂ が結合していないデオキシ Hb における T と R の相対的安定性を定める平衡定数 $L_0 (= [\text{T}_0]/[\text{R}_0])$ の 3 パラメータのみで Hb の 4 段階 O₂ 結合の全てが記述される。O₂ が 1~4 個結合した Hb の T と R の構造平衡 ($L_1 \sim L_4$) は閉じた平衡の関係から全て定まる (Fig. 3, caption)。

ここで忘れてはならないのは、モデルの簡潔性の前提となる「各 4 次構造の非協同性の仮定」が設けられていることである。すなわち、T と R はそれぞれ一定の親和性 (K_T または K_R) で 1 個目から 4 個目までの O₂ を結合する、という仮定である。Fig. 3 中の K_T または K_R の前に付けた 4, 3/2, 2/3, 1/4 は各結合段階における 4 量体 Hb の巨視的な平衡定数を表現するための統計的ファクターであり (Fig. 3, caption), 4 量体中の各ヘムの平衡定数は O₂ の結合数によらず一定である。ヘム間相互作用は、4 段階 O₂ 結合が R を徐々に安定化し、T と R の構造平衡が R に傾いてゆくこと ($L_0 > L_1 > L_2 > L_3 > L_4$) で生み出される。また、 K_T , K_R 不変の仮定は非ヘムリガンドのアロステリーにも適用されている。すなわち、水素イオンなどの非ヘ

ムリガンドの結合は、 K_T または K_R を変化させずに L_0 を大きくする (T を安定化する) ことで Hb の O_2 親和性を低下させる、という仮定である。以上をまとめると、Hb の 2 種類のアロステリーは、いずれもリガンド (ヘムリガンドまたは非ヘムリガンド) の結合に伴う T と R の相対的安定性の変化による 2 状態の population-shift として理解される。

以後の議論がクリアになるよう、Hb の MWC2 状態モデルの要点を次の 5 点にまとめたい。

1. O_2 親和性の異なる 4 次構造は T と R の 2 種類。
2. T と R の間の構造平衡の存在 (pre-existing equilibrium)。
3. 各 4 次構造の O_2 結合は非協同的 (K_T , K_R 不変)。
4. 非ヘムリガンド結合は T と R の相対的安定性のみ寄与 (K_T , K_R 不変)。
5. アロステリーの構造基盤は 2 状態の population-shift。

2 状態モデルの問題点と修正の方向

Hb の機能は O_2 平衡曲線で表される。ある溶液条件の Hb の O_2 平衡曲線は 2 状態モデルの 3 つのパラメータで精度よく記述できることが知られているが、これはモデルの記述能力の必要条件であって十分条件ではない。Hb のアロステリーには非ヘムリガンド効果 (溶液依存性) があるので、色々な溶液条件下の O_2 平衡曲線と同じ K_T と K_R のまま L_0 のみを変化させて包括的にフィットできることが要求される (要点 4)。

1974 年に Minton と Imai はこのような検証を行い 2 状態モデルの不完全性を指摘している³⁾。最大の問題は、状態数 2 を仮定したモデル (要点 1) では溶液条件に依存して K_T が大幅に変化してしまうことである^{3,4)}。実際、 K_T の値は溶液条件に依存して 50 倍近くも変化する (Fig. 4)。これは自由エネルギーに換算すると Hb の全 O_2 親和性変化の自由エネルギーの約半分に相当するので到底容認できない。一方、 K_R は inositol hexakisphosphate (IHP) や bezafibrate (BZF) などの強力なアロステリック・エフェクターが存在しない溶液条件ではほぼ一定の値をとると言われている (Fig. 4)。ただし、pH 6.5 では K_R が 2~3 倍低下するボーア効果を示すことが知られている (Fig. 4)。

Minton と Imai はこの問題に対して、 O_2 親和性の異なる 4 次構造の状態数を 3 に増やした 3 状態モデルを提案している³⁾。つまり、MWC モデルの本質的な要素 (要点 2~5) は残したまま、T と R 以外に、T と R の中間の O_2 親和性を持つ第 3 の構造状態を追加した MWC3 状態モデルである。こうすることで、色々な溶液条件の O_2 平衡曲線を包括的に記述できることが論文では示されている。先に注意したように、Monod らは状態数に関して“(at least) two”と幅を持たせているので状態の追加はオリジナルの MWC モデル²⁾には抵触しない。Minton と Imai の論文では、中間的な O_2 親和性を持つ第 3 状態に関する構造知見は何も得られていないが、この状態は 2 状態モデルの K_T 値が大きくなる低塩条件 (塩素イオンなどの陰イオンの非ヘムリガンドが存在しない条件) のデオキシ Hb 溶液中に T との平衡状態として、数 10% の濃度で存在することが予想されている³⁾。

2010 年の本誌の総説に書いた通り、当時の筆者は自身の実験

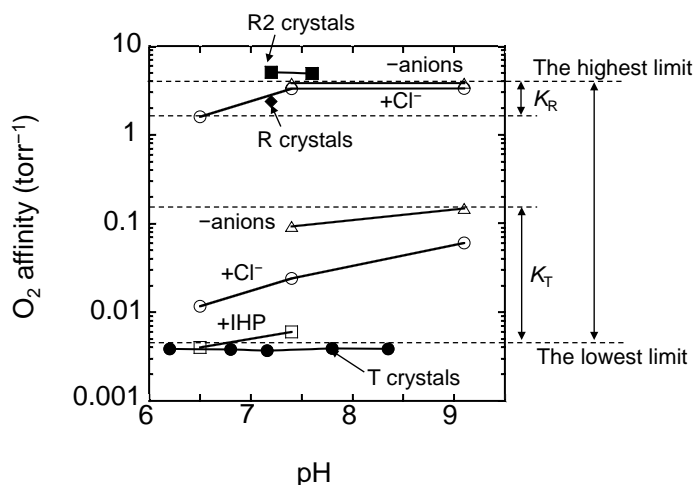


Fig. 4. Variations in K_T and K_R of Hb under various solution conditions at 25 °C (open symbols)⁴⁾. Open circles indicate the presence of 0.1 M Cl^- , and open triangles indicate a minimal anion concentration in the buffer solutions. For K_T , open squares indicate the presence of 2 mM IHP. Note that in the presence of strong allosteric effector(s), such as IHP or BZF, where Hb binds O_2 with a very low affinity and a relatively low cooperativity, K_R is difficult to determine accurately due to an effect of compensation between K_R and L_0 ⁴⁵⁾. For comparison, the O_2 affinities of T²³⁾, R³⁰⁾, and R2³⁰⁾ crystals (filled symbols) were presented.

結果を基に MWC3 状態モデルを推していた⁵⁾。ここでは詳細は割愛し、実験結果のみ簡単に紹介する。1995 年に筆者は、水に溶けた Hb 分子を溶液ごと多孔性シリカゲルの細孔中に閉じこめ、その構造変化を凍結したまま O_2 平衡曲線を測定する独自の実験技術を開発し、報告した¹³⁾。この手法を低塩条件のデオキシ Hb に適用した結果、 O_2 親和性の非常に低い T 状態と、T と R の中間の O_2 親和性を持つ未知の状態が共存することを見出したのである^{14,15)}。これはまさしく 3 状態モデルの予想通りの結果である。しかしながら、当時このような第 3 の状態の存在を示唆する構造的証拠が無かったこともあり、3 状態モデルを支持する Hb 研究者は筆者を含めた極少数であった¹⁴⁻¹⁶⁾。

Hb の K_T の変動幅を説明するモデルは 3 状態モデル以外にもいくつか報告されている¹⁷⁻²⁰⁾。最近では、Henry らの TTS モデル (Tertiary Two-State model)¹⁹⁾ が一大潮流となりつつあるので、ここに簡単に紹介する。

TTS モデルは、MWC2 状態モデルの骨子となる要点 1~3 (4 次構造は T と R の 2 種類、T-R 平衡の存在、T、R の非協同的 O_2 結合) を継承しつつ、各 4 次構造中の個々のサブユニットに O_2 親和性の異なる 2 つの 3 次構造の平衡 (pre-existing tertiary two-state equilibrium) を取り入れたモデルである¹⁹⁾。すなわち、T、R いずれの 4 次構造中においても個々のサブユニットは低親和性の 3 次構造 t と高親和性の 3 次構造 r の 2 状態平衡 ($t-r$ 平衡) にあり、サブユニットの O_2 親和性はこの $t-r$ 平衡のみで決まる、という仮定が設けられている。ただし、TTS モデルにおける 4 次構造 T と R は、含有するサブユニットの $t-r$ 平衡を T は t に、R は r にそれぞれ傾けることで O_2 親和性に異な

る影響を与える。その結果として、 O_2 結合の協同性は T から R への 4 次構造変化 ($t-r$ 平衡に与えるバイアスの変化) により生じることになる。また、2 状態 MWC モデルで問題となる K_T の溶液依存性は、TTS モデルでは非ヘムリガンド結合が T 中のサブユニットの $t-r$ 平衡を t に傾けることで表現され、 K_R の溶液依存性も同様に記述できる。まとめると、TTS モデルは K_T と K_R が可変の MWC2 状態モデルと見ることもできるが、 O_2 親和性の直接決定因子を 4 次構造状態からサブユニットレベルの 3 次構造状態に移した点が MWC モデルとの決定的な違いである。

TTS モデルは、平衡データと速度論的データの両方に対応できるよう 16 個の独立なパラメータ (平衡用 5 個と速度論用 11 個) から構成され、極めて高い記述能力を持つ¹⁹⁾。実際、TTS モデルは、Hb の CO 平衡データ²¹⁾、結晶中²²⁻²⁴⁾ およびゲル中^{25, 26)} での O_2 平衡データを記述することができ、更には CO 結合型 Hb の CO 光解離後の再結合速度論的データ²⁷⁾ もフィットすることができる。しかしながら、パラメータ数が多いモデルの記述能力の高さは、必ずしもそのモデルのメカニズムが正しいことを意味する訳ではない。また、TTS モデルが仮定する 3 次構造状態 t と r の構造基盤が何も示されていないことにも注意が必要である。

Hb の状態数と結晶学の歴史

Hb の状態数の議論に関しては結晶学の歴史を抜きに語れないので、ここに簡単に紹介する。1960-80 年代に Perutz を筆頭とするタンパク質結晶学者たちが行った Hb の X 線結晶解析によって、 O_2 の結合していないデオキシ T 型結晶構造と、 O_2 や CO などのヘムリガンドが 4 個結合したオキシ R 型結晶構造との間の 4 次構造の差異が原子レベルで明らかになった^{1, 10-12)}。T から R への 4 次構造変化を一言で表すと「一つの $\alpha\beta 2$ 量体ももう一つの $\alpha\beta 2$ 量体に対して約 14 度回転する 2 量体の再配置」となる (Fig. 5a)。このとき、各 2 量体 ($\alpha 1\beta 1$ または $\alpha 2\beta 2$) 自体の構造は、 α と β の間に形成されている B, G, H ヘリックス同士の強固な接触 (BGH frame) のおかげであまり変わらない (Figs. 1b)。一方、T 構造の 2 量体間接触を安定化する α , β の C 末端塩橋および $\alpha 1\beta 2$ スイッチ領域の水素結合は T-R 転移に伴い全て壊れ、ヒンジ (蝶番) 領域でも水素結合の組み換えが起こる (Fig. 1c)。このような全か無かの構造スイッチングの発見に裏打ちされて、2 状態モデルは構造基盤を伴ったアロステリックモデルとして研究者達から信頼を勝ち取ったことは想像に難くない。それに加えて、Hb の結晶解析が行われた最初の数 10 年もの間 T と R 以外の結晶構造が見つからなかったことも、状態数 2 のモデルが深く浸透した理由の一つとして挙げられる。

1990 年代に入ると 2 つの進展があった。一つは、第 3 の 4 次構造の発見である。この新規 4 次構造は CO 結合型 Hb 溶液から結晶化されたこともあり、Relaxed 状態の一種と考えられ、第 2 の R 構造という意味の R2 が名付けられた²⁸⁾。しかしながら、構造的には R2 は従来の R 構造とは完全に別物である。実

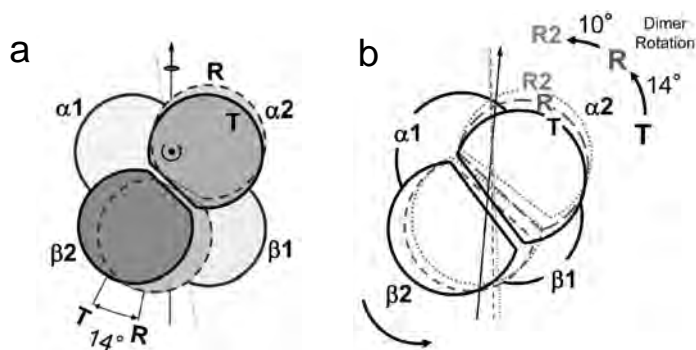


Fig. 5. The quaternary structural change in Hb. Schematic representation illustrating the rotational movement of the $\alpha 2\beta 2$ dimer relative to the $\alpha 1\beta 1$ dimer, based on known crystal structures until (a) and after (b) the structure of the R2 state was reported in 1992²⁸⁾. The subunits are represented as spheres for simplicity. Solid, dashed, and dotted lines indicate T-state deoxy Hb, R-state CO -bound Hb, and R2-state CO -bound Hb, respectively. a) Only two quaternary structures, T and R, were believed to have existed in Hb until 90's. c) In T to R2 transition, the $\alpha 2\beta 2$ dimer turns relative to the $\alpha 1\beta 1$ dimer by nearly 10° beyond R, suggesting that R2 is the end state in an ensemble of relaxed conformations.

際、R と R2 の間の構造的差異の大きさは、R と T の間の差異と同程度に大きい (Fig. 5b)。第 3 の 4 次構造の発見は 2 状態モデル支持者に若干の混乱を与えたが、Relaxed 状態の構造多形性は 2 状態モデルの要点 1 に抵触するものではない、という考えが今は主流である。つまり、T 状態とは違い Relaxed 状態では、サブユニット間の塩橋や水素結合による構造的制約がないので、 O_2 親和性の高い Relaxed 状態の中に構造多形性が表れても不思議ではない、という考えである。大事なことは、R2 と R の O_2 親和性の差がどの程度の大きさかという点であろう。この点に関しては後述する。

Fig. 5b に示したように、T から R2 への構造変化では一つの 2 量体ももう一つの 2 量体に対して R を超えて約 10 度過剰に回転する。このため、R2 は T \rightarrow R \rightarrow R2 の構造変化経路における終状態、すなわち Relaxed 状態アンサンブルの末端構造と考えられている。実際、 ^{15}N - 1H 残余双極子相互作用 (residual dipolar coupling) を利用した NMR で得られた CO 結合型 Hb の溶液構造は、R と R2 の混ざり (動的平衡) あるいはこれらの中間構造と報告されている²⁹⁾。一方、色々な結晶化条件で得られたデオキシ Hb の全ての結晶構造は、従来の T 構造と基本的に同じである。

1990 年代におけるもう一つの進展は、顕微分光を用いた Hb 結晶の O_2 平衡曲線の測定が可能になったことである。1991 年にデオキシ型 Hb 結晶 (T) に対する O_2 平衡曲線の測定が初めて報告され、T 結晶構造の O_2 結合には協同性がほとんど見られず、 O_2 親和性は溶液条件によらず非常に低い一定の値をとることが示された²²⁾ (Fig. 4)。これは、Hb の構造と機能を直接関係づける画期的な研究成果である。一方、Relaxed 状態 Hb 結晶 (R と R2) に対する同測定は難易度が高く難航したが、2011 年に筆者らのグループが成功した³⁰⁾。この研究から、R 結晶と

R2 結晶の O₂ 結合には協同性がほとんどなく、共に非常に高い O₂ 親和性を示すことが明らかになった (Fig. 4). また、R と R2 の O₂ 親和性の差は数倍程度であり (Fig. 4), 両 4 次構造は共に O₂ 親和性の高い Relaxed 状態アンサンブルの構成要素であることが強く示唆された。

Hb 結晶の O₂ 平衡曲線測定の結果は、オリジナルの MWC2 状態モデルの何を残し、何を修正すべきかを考える上で重要なヒントを与えてくれる。まず、Hb 結晶が示す非協同的な O₂ 結合は、2 状態モデルが前提とする各 4 次構造の非協同性の仮定 (要点 3) と矛盾しない。更に大事なことは、R (または R2) 結晶と T 結晶の O₂ 親和性がそれぞれ、溶液 Hb の O₂ 親和性の上限値と下限値に定量的に一致する事実である (Fig. 4). 溶液 Hb の O₂ 親和性の上限と下限の存在は、それぞれに対応する溶液中の 2 状態の存在を強く示唆している。したがって、溶液中のそれら 2 状態の構造基盤は従来の R 結晶構造 (または R2 結晶構造) と T 結晶構造で与えられる、と考えるのが自然であろう³¹⁾。

まとめると、Hb の両極の O₂ 親和性を持つ 2 状態の構造は既知の T, R 結晶構造と考えてよいだろう。しかし、T 状態 Hb の O₂ 親和性 (K_T) の変動幅を生み出す構造状態は正体不明のままである。中間的な O₂ 親和性を持つ Hb 状態の構造基盤は一体何なのか。MWC3 状態モデルが予想する未知の 4 次構造³⁾が存在するのか、TTS モデルが予想する 3 次構造レベルの構造変化¹⁹⁾が重要なのか、あるいはもっと複雑な描像なのか、Hb 研究者の間でも意見は割れている。筆者は、この Hb 研究に残された謎を解き明かすため「T と R の中間的な O₂ 親和性を持つ未知の Hb 構造」の結晶解析に長年挑戦し続けてきた。その詳細については次章で紹介する。

新しい結晶学的知見

筆者が T と R の中間的な Hb 構造の結晶解析に専心した最初の 10 年間は困難と失敗の連続であった。研究開始当初は Minton と Imai の予想⁴⁾に従い、中間的な O₂ 親和性を持つ Hb 構造が数 10% の濃度で (T との平衡状態として) 存在する低塩条件デオキシ Hb にターゲットを絞り、polyethylene glycol (PEG) を結晶化剤として種々のデオキシ Hb の結晶化を行った。結晶化試料としては、溶液中に共存する T が結晶化しにくい Hb を選んだ。具体例を挙げると、T の相対的溶解度が高いウマの Hb, T を安定化する C 末端塩橋を部分的に切除したウマの Hb, T の相対的溶解度を上げるアミノ酸変異を分子表面に持つ異常 Hb C [$\beta 6\text{Glu} \rightarrow \text{Lys}$] などである。また、R 結晶が析出し易い Hb 試料に対しては IHP や BZF などの強力なアロステリック・エフェクターが共存する結晶化条件も試みた。これらの試行錯誤の結果、計 10 種類以上の新規空間群の Hb 結晶を得たが、解かれた構造は全て T, R, R2 のいずれかに分類されるものであった。T 結晶を避けると R 結晶 (または R2 結晶) が析出し、R 結晶を避けると T 結晶が析出する、という堂々巡りである。もし仮に T と R の中間的な構造が溶液中に存在したとしても、それと動的平衡にある T または R が先に結晶化してしまう本質的な難

しさがあるようだ。

2010 年当時の筆者に残された最後の一手は、部分的にヘムリガンドの結合した中間段階 Hb 分子 (ヘムリガンドが 1~3 個結合した Hb) の結晶化であった。Hb の分子対称性と α , β サブユニットの違いを考慮すると、Hb の O₂ 結合平衡には 8 種類の

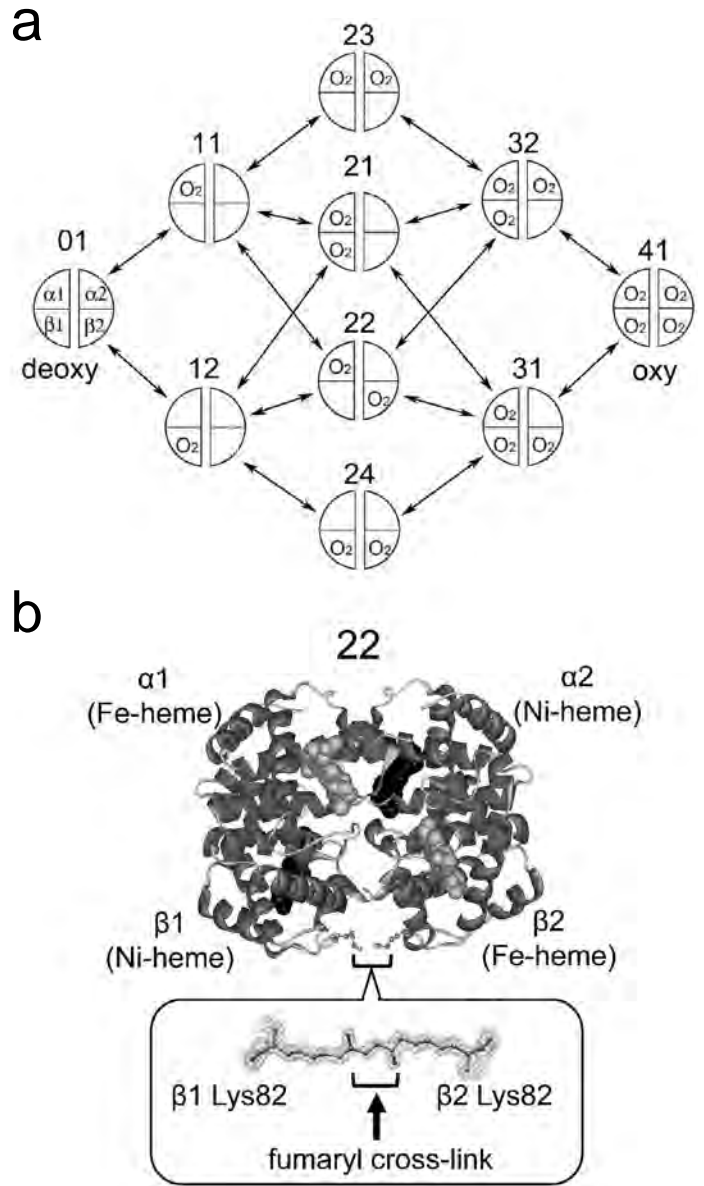
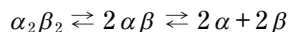


Fig. 6. O₂ equilibria of tetrameric Hb consisting of the $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 2$ dimers. a) Schematic representation of ten distinct molecular species that appear in O₂ equilibria of Hb. The index of two numbers, ij , denotes the number of ligand(s) bound ($i = 0, 1, 2, 3$, or 4) and the individual specie ($j = 1, 2, 3$, or 4). Among them eight partially O₂-bound forms are difficult to study directly. b) An example of stable, partially ligand-bound Hbs. The $\alpha 1\beta 2$ doubly-liganded Hb (species 22) can be modeled by Fe(II)-Ni(II) hybrid Hb containing Fe(II) hemes in the $\alpha 1$ and $\beta 2$ subunits and Ni(II) hemes (that bind neither O₂ nor CO) in the adjacent $\alpha 2$ and $\beta 1$ subunits, in which two Lys residues at the $\beta 82$ position are cross-linked by a fumaryl group to prevent the dimer exchange reaction.

中間段階分子が出現する (Fig. 6a). T と R の中間的な Hb 構造を中間段階分子に求めるのは自然な発想であろう. ただし, 個々の中間段階分子を単離するには, 金属置換混成 Hb のモデルと 2 量体間の化学架橋を組み合わせた独自の Hb 分子が必要となる. ここで, 化学架橋について簡単に補足しておく. 4 量体 Hb ($\alpha_2\beta_2$) には次のスキームの解離会合平衡がある³²⁾.



オキシ Hb の場合, 4 量体の 2 量体への解離の時定数は秒オーダーなので, 架橋が無い非対称な中間段階分子 ($\alpha_1\beta_1$ と $\alpha_2\beta_2$ のリガンド結合状態が異なる 6 分子種) では速やかに 2 量体の組み換えが起こり, 元の状態を維持することはできない. これが, 2 量体間の化学架橋を必要とする理由である. ちなみに, 単量体への解離は上記スキームにしたがい 2 量体からしか起こらず, かつ 2 量体の単量体への解離速度は著しく遅い ($3\sim 5 \times 10^{-3} \text{h}^{-1}$) ことが知られている^{32, 33)}. したがって, 単量体への解離を介したサブユニット交換は架橋 Hb では全く起こらないし, 通常の未架橋 Hb でも事実上無視できる.

筆者は, 4 量体 Hb 中の特定の Fe(II)ヘムを O_2 や CO と結合しない Ni(II)ヘムで置き換えた Fe(II)-Ni(II)混成 Hb と, 両 β サブユニットの 82 番目の Lys 残基間のフマル基架橋を組み合わせた各中間段階 Hb 分子³⁴⁾を調製し (Fig. 6b に 1 例を示す), 系統的に結晶化実験を行った. Fe(II)ヘムのリガンドとしては, 協同性が O_2 と同等で, 結合親和性が高い CO を用いた. ここで, デオキシ Fe(II)ヘムのモデルとしての Ni(II)ヘムの妥当性は色々な物理化学的測定で十分検証されている³⁵⁻³⁷⁾. また, ここで用いた β_1 - β_2 間フマル基架橋は Hb の O_2 平衡曲線に全く影響を与えないこと³⁸⁾, すなわち, Hb のアロステリーに影響を与えないことが実験的に確認されている. 具体的には, 0.1 M Cl^- 存在下 pH 6.4, 7.4, 8.4, 9.1 の 4 条件で β_1 - β_2 架橋 Hb の O_2 平衡曲線は未修飾 Hb のそれとほぼ一致する³⁸⁾. また, 7 mM Cl^- 存在下 pH 7.4 の低塩条件でも一致が確認されている³⁸⁾. すなわち, β_1 - β_2 架橋 Hb のボーア効果と塩素イオン効果は未架橋 Hb とほぼ同じである. ただし, 架橋部位である $\beta\text{Lys}82$ (Fig. 6b) は Hb の有機リン酸結合部位を構成するアミノ酸残基の一つなので (Fig. 2) β_1 - β_2 架橋 Hb の有機リン酸効果は完全に消失する³⁸⁾.

筆者にとって幸運だったのは, Fig. 6a の分子種 21 と 22 に対応する中間段階分子から得られた C2 空間群の結晶が極めて有用な性質を持っていたことである. この結晶は, 非対称単位に異なる 4 次構造を持つ 3 個の Hb 分子を含み, しかもこれら 3 構造が溶液条件 (非ヘムリガンド) に依存して変化するという, 他に類を見ない性質を持つことがわかった³⁹⁾. 換言すると, この C2 結晶は平衡状態にある複数の 4 次構造を丸ごと結晶化したような結晶であり, 内包する Hb 分子の構造変化を許容する結晶でもある. またおもしろいことに, 天然のメト Hb (Fe(III)ヘムに H_2O が配位した Hb) でも同型の C2 結晶が得られることが過去の構造解析 (3.2 Å 分解能) で示されていた⁴⁰⁾. そこで, このメト Hb の同型結晶も高分解能データ収集を目指して構造解析をやり直すことにした.

この C2 結晶を利用すると, Hb のとり得る色々な 4 次構造を単一結晶型で網羅的に構造・機能解析することができる. 具体的には, Fig. 6b に示した α_1 と β_2 の Fe(II)ヘムに CO が結合した Fe(II)-Ni(II)混成 Hb (リン酸存在下と非存在下低塩条件の 2 結晶) と全ての Fe(III)ヘムに H_2O が結合したメト Hb (リン酸存在下 1 結晶) の計 3 個の同型 C2 結晶の X 線構造解析 (2.5-2.8 Å 分解能) と結晶の O_2 平衡曲線の測定を行った³⁹⁾. これら 3 個の同型結晶を比較すると, ヘムリガンドの個数, リン酸イオン (非ヘムリガンド) の有無に応じた構造平衡の差異を反映し, 内包する 9 個の Hb の 4 次構造は全て異なっていた (Fig. 7a, d)³⁹⁾. 既知の T, R, R2 との比較で見ると, 9 個の 4 次構造は T から R を経て R2 に到るまでの Hb の全構造空間にほぼ連続的に分布しており (Fig. 7a, d), Hb の 4 次構造変化は単純な 2 状態転移ではなく, 多状態の間を行き来する複雑な過程であることが強く示唆された.

そして, 更に大事なことは, 低塩条件の CO が 2 個結合した Fe(II)-Ni(II)混成 Hb 結晶構造の中に, 長年探し求めていた T と R の中間的な構造 (TR と命名) が含まれていたことである (Fig. 7d, conformation 2). Fig. 7b, c の拡大図に示したように, TR の 4 次構造は T と R のちょうど中間である. 筆者は, この TR 結晶構造の O_2 親和性が T と R の中間であることを直接の O_2 平衡曲線測定から示し (Fig. 7e, conformation 2), T と R の中間的な構造と機能 (O_2 親和性) を持つ 4 次構造の存在を実証した³⁹⁾. また, R と R2 の間にも中間的な 4 次構造が複数個観測されたが (Fig. 7b, conformations 3-9), これらは全て R, R2 と同程度の非常に高い O_2 親和性を示した (Fig. 7e, conformations 3-8). したがって, 機能の観点で 4 次構造を分類すると, 最低 O_2 親和性を持つ T, 中間的な O_2 親和性を持つ TR, 最高 O_2 親和性を持つ R から R2 までの Relaxed 状態アンサンブル, の少なくとも 3 種類が存在することがわかった. TR が示す中間的な O_2 親和性の構造基盤はまだ完全には解明されていないが, T 構造の束縛の一部を担う $\alpha_1\beta_2$ ヒンジ (蝶番) 領域 (Fig. 1c) の水素結合によるものと推測されている³⁹⁾. 実際, TR では T 構造を安定化する α , β の C 末端塩橋および $\alpha_1\beta_2$ スイッチ領域 (Fig. 1c) の水素結合は全て壊れているが, $\alpha_1\beta_2$ ヒンジ領域にある $\alpha 94 \text{ Asp}-\beta 37 \text{ Trp}$ の水素結合は保持されている (Fig. 7f).

ここで一つ注意しなければならないのは, Fig. 7a-d の構造データは 4 次構造を同定するには十分な分解能 (2.5-2.8 Å 分解能) を持つが, 個々のサブユニットの 3 次構造の詳細な議論はできない点である. この理由を以下に述べる. 結晶化に使用した Hb は, α_1 と β_2 の Fe(II)ヘムに CO が結合した非対称な Fe(II)-Ni(II)混成 Hb である. この Hb 中の 2 つの 2 量体の 3 次構造は等価ではないが ($\alpha_1\beta_1 \neq \alpha_2\beta_2$), 結晶格子中の Hb 分子はランダムな向きに ($\alpha_1\beta_1$ と $\alpha_2\beta_2$ を区別せずに) 充填されていることが, 結晶の吸収スペクトルデータの詳細解析からわかっている³⁹⁾. すなわち, 筆者たちが見つけた C2 結晶は, 様々な Hb 構造を許容する有用性を持つ反面, 非対称な Hb 分子の $\alpha_1\beta_1$ と $\alpha_2\beta_2$ を識別しない緩さを併せ持つ結晶である.

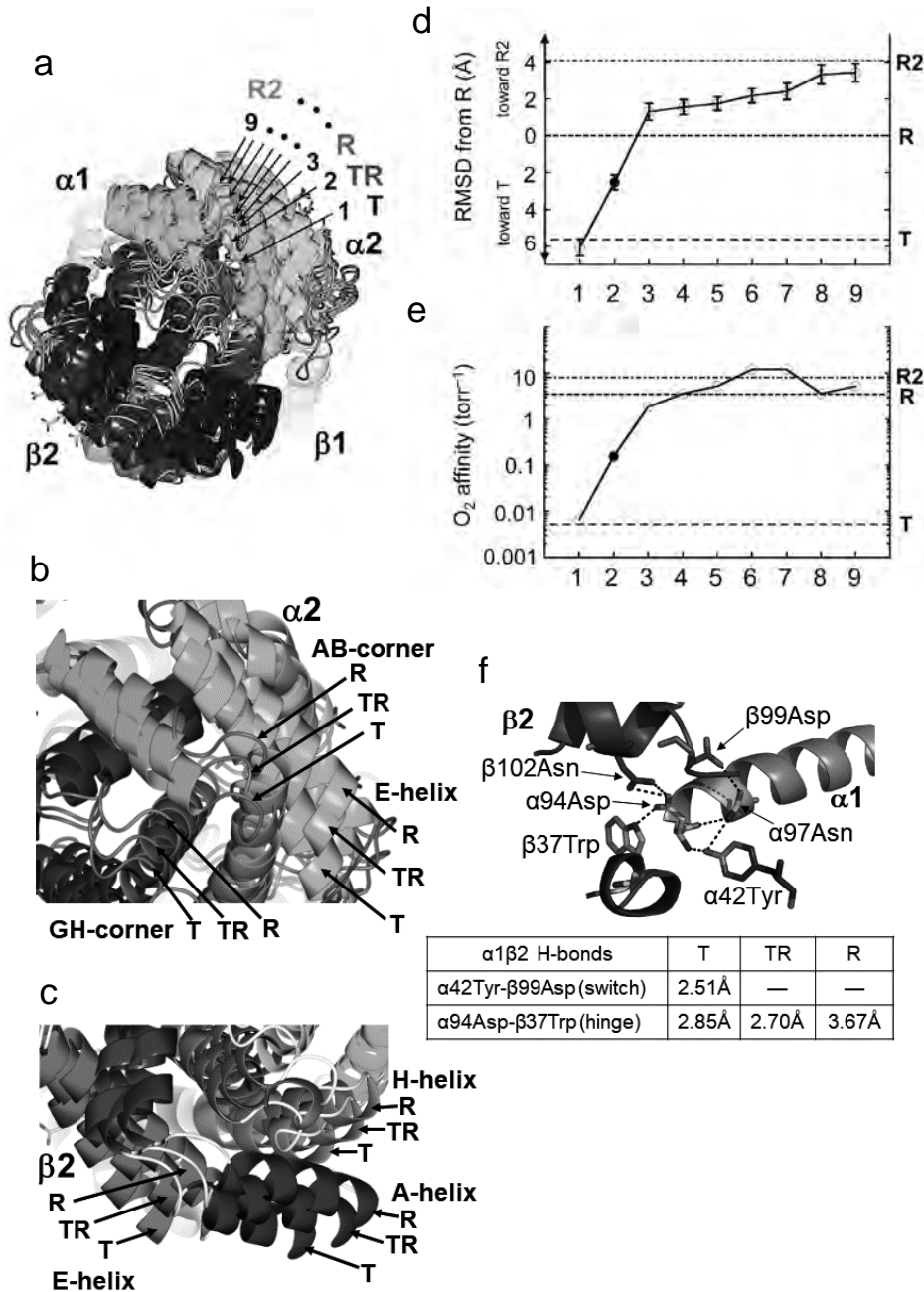


Fig. 7. Quaternary structures (a-d, f) and O_2 affinities (e) of nine distinct conformations of Hb in three isomorphous $C2$ crystals, each containing three independent Hb molecules³⁹. The conformations are numbered from 1 to 9 according to increasing deviation from T. a) Comparison of quaternary structures of conformations 1-9 by showing the orientation of the $\alpha2\beta2$ dimer relative to the $\alpha1\beta1$ dimer as a ribbon diagram. The $\text{C}\alpha$ atoms for the $\alpha1\beta1$ dimers in all the structures are superimposed. b) Close-up view of the $\alpha2$ subunits in T, TR (conformation 2), and R. The $\text{C}\alpha$ atoms for the $\alpha1\beta1$ dimers are superimposed. c) Close-up view of the $\beta2$ subunits in T, TR (conformation 2), and R. The $\text{C}\alpha$ atoms for the $\alpha1\beta1$ dimers are superimposed. d) Root-mean-square-deviation (RMSD) in the $\text{C}\alpha$ atoms for the $\alpha2\beta2$ dimer after superimposing the $\text{C}\alpha$ atoms for the $\alpha1\beta1$ dimer of each structure to those of R-state CO-bound Hb (PDB ID 2DN3). Each bar represents RMSD in the $\text{C}\alpha$ atoms of the superimposed $\alpha1\beta1$ dimer. Dashed, dotted, and dashed dotted lines indicate the RMSD values of T-state deoxy Hb (PDB ID 2DN2), R-state CO-bound Hb (PDB ID 2DN3), and R2-state CO-bound Hb (PDB ID 1BBB), respectively. The conformation 2 (closed circle) is a new intermediate (named TR) that lies right between T and R. e) O_2 affinities of nine conformation in crystals at 20°C determined by microspectrophotometry. Dashed, dotted, and dashed dotted lines indicate the O_2 affinities of T-state Hb crystals, R-state Hb crystals, and R2-state Hb crystals, respectively. The conformation 2 (closed circle) shows an intermediate O_2 affinity right between T and R. f) Structure around the $\alpha1\beta2$ interface of TR (conformation 2). The residues involved in hydrogen bonds (dashed lines) are shown as a stick model. Distances between the residues involved in hydrogen bonds in the switch and hinge regions are also shown.

まとめと今後の課題

教科書的な T と R の構造平衡を仮定した 2 状態モデルでは、色々な溶液条件の Hb のアロステリーを統一的に説明することはできない。この問題を克服するために提案されているモデルとしては、第 3 の 4 次構造を追加した MWC3 状態モデル³⁾や、T と R の中に 3 次構造レベルの 2 状態平衡を取り入れた TTS モデル¹⁹⁾などがあり、状況は混沌としている。これらのモデルの妥当性はデータ記述能力のみでは保証されない。それよりもむしろ、モデルの核となる要素、すなわち、第 3 の 4 次構造や 3 次構造レベルの 2 状態平衡の存在証拠を構造と機能の両面から示すことが重要である。

本稿で紹介した Hb の新しい結晶学的知見は、O₂ 親和性の異なる Hb の 4 次構造が少なくとも 3 種類存在することを強く示唆している (Fig. 7e)³⁹⁾。これは、MWC3 状態モデルの考えと矛盾しないが、Hb のリガンド結合と共役する構造平衡はこれまで考えられていたよりもはるかに複雑であり、中間的構造の種類は半端なく多いことに注意が必要である (Fig. 7a, d)。また、TTS モデルが提唱する 3 次構造レベルの小さな構造変化の有無と重要性に関しては、現時点では否定も肯定もできない。50 Å 以上の大きさを持ち、0.1 Å の桁で原子の位置を精密にコントロールしている Hb のアロステリーのメカニズムを完全に理解するためには、まだ中間的構造に関する知見が決定的に不足している。

Hb の構造解析の王道は X 線結晶解析である。しかしながら、結晶化を前提とするこの方法は、複数の構造が混在する系の解析には基本的に向かない。本稿で紹介した C2 結晶は極めて稀なケースである。最近、この問題に一つの光明が見えてきたので最後に紹介したい。それは、クライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) による高分解能単粒子構造解析の実現可能性である。一昔前の Cryo-EM 構造解析の対象は分子量 200kDa 以上の大きなタンパク質に限られていたが、近年急速な技術革新により適用幅が広がり⁴¹⁾、分子量 64.5kDa の Hb もその測定対象となっている^{42, 43)}。2017 年に報告された Cryo-EM によるメト Hb の単粒子構造解析 (3.2 Å 分解能) の論文⁴²⁾を皮切りに、2019 年にはメト Hb 溶液中に混在する 2 構造の単粒子像を分類して 2.8 Å と 3.2 Å 分解能解析に成功した論文⁴³⁾も報告された。興味深いことに、これら 3 つの溶液構造は筆者らが結晶中に観測した R と R2 の間に現れる中間的構造 (Fig. 7 の conformations 5, 8, 9) とよく一致することが両論文中で述べられている^{42, 43)}。今後、Cryo-EM による色々な溶液条件の中間段階分子の高分解能単粒子構造解析が実現されれば、Hb のアロステリーの完全理解に近づくことができるであろう。そのような知見が蓄積すれば、Hb の分子メカニズムの解明はもとより、多くの人々が未だ根強く持っているアロステリックタンパク質全般の調節メカニズムに対する時代遅れの 2 状態モデル的考えを払拭できるのではないかと期待している。

謝辞

10 年以上に渡って Hb の X 線結晶構造解析を共に進めてくれた横浜市立大学大学院の朴三用教授に心より感謝致します。本稿で紹介した研究の一部は JSPS 科研費の助成 (23570197, 19K06601) を受けて行われたものです。

引用文献

1. Perutz MF. Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin: haem-haem interaction and the problem of allostery. *Nature* 1970; 228: 726-739.
2. Monod J, Wyman J, Changeux JP. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol* 1965; 12: 88-118.
3. Minton AP, Imai K. The three-state model: a minimal allosteric description of homotropic and heterotropic effects in the binding of ligands to hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 1418-1421.
4. Imai K. *Allosteric Effects in Haemoglobin*. Cambridge: Cambridge Univ Press 1982.
5. 柴山修哉. MWC2 状態モデルはヘモグロビンのアロステリーといかに調和しうるか. *人工血液* 2010; 18: 102-109.
6. Perutz MF. Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. *Quat Rev Biophys* 1989; 22: 139-236.
7. Bell CE, Lewis M. The Lac repressor: a second generation of structural and functional studies. *Curr Opin Struct Biol* 2001; 11: 19-25.
8. Swain JF, Gierasch LM. The changing landscape of protein allostery. *Curr Opin Struct Biol* 2006; 16: 102-108.
9. Gunasekaran K, Ma B, Nussinov R. Is allostery an intrinsic property of all dynamic proteins? *Proteins* 2004; 57: 433-443.
10. Fermi G, Perutz MF, Shaanan B, Fourme R. The crystal structure of human deoxyhaemoglobin at 1.74 Å resolution. *J Mol Biol* 1984; 175: 159-174.
11. Baldwin J, Chothia C. Haemoglobin: The structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. *J Mol Biol* 1979; 129: 175-220.
12. Shaanan B. Structure of human oxyhaemoglobin at 2.1 Å resolution. *J Mol Biol* 1983; 171: 31-59.
13. Shibayama N, Saigo S. Fixation of the quaternary structures of human adult haemoglobin by encapsulation in transparent porous silica gels. *J Mol Biol* 1995; 251: 203-209.
14. Shibayama N, Saigo S. Direct observation of two distinct affinity conformations in the T state human deoxyhemoglobin. *FEBS Letters* 2001; 492: 50-53.
15. Shibayama N. Functional Dissection of the Oxygen-Binding Intermediates of Human Hemoglobin. In: Nagai M, ed. *Hemoglobin: Recent Developments and Topics*. Kerala: Research Signpost 2010.
16. Colombo MF, Seixas FAV. Novel allosteric conformation of human HB revealed by the hydration and anion effects on

- O₂ binding. *Biochemistry* 1999; 38: 11741-11748.
17. Szabo A, Karplus M. A mathematical model for structure-function relations in hemoglobin. *J Mol Biol* 1972; 72: 163-197.
 18. Lee, AW-M, Karplus M. Structure-specific model of hemoglobin cooperativity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 7055-7059.
 19. Henry ER, Bettati S, Hofrichter J, Eaton WA. A tertiary two-state allosteric model for hemoglobin. *Biophys Chem* 2002; 98: 149-164.
 20. Eaton WA, Henry ER, Hofrichter J, Bettati S, Viappiani C, Mozzarelli A. Evolution of Allosteric Models for Hemoglobin. *IUBMB Life* 2007; 59: 586-599.
 21. Perrella M, Colosimo A, Benazzi L, Ripamonti M, Rossi-Bernardi L. What the intermediate compounds in ligand binding to hemoglobin tell about the mechanism of cooperativity. *Biophys Chem* 1990; 37: 211-223.
 22. Mozzarelli A, Rivetti C, Rossi GL, Henry ER, Eaton WA. Crystals of haemoglobin with the T quaternary structure bind oxygen noncooperatively with no Bohr effect. *Nature* 1991; 351: 416-419.
 23. Rivetti C, Mozzarelli A, Rossi GL, Henry ER, Eaton WA. Oxygen binding by crystals of hemoglobin. *Biochemistry* 1993; 32: 2888-2906.
 24. Mozzarelli A, Rivetti C, Rossi GL, Eaton WA, Henry ER. Allosteric effectors do not alter the oxygen affinity of hemoglobin crystals. *Protein Sci* 1991; 6: 484-489.
 25. Bruno S, Bonaccio M, Bettati S, Rivetti C, Viappiani C, Abbruzzetti S, Mozzarelli A. High and low oxygen affinity conformations of T state hemoglobin, *Protein Sci* 2001; 10: 2401-2407.
 26. Bettati S, Mozzarelli A. T state hemoglobin binds oxygen noncooperatively with allosteric effects of protons, inositol hexaphosphate, and chloride. *J Biol Chem* 1997; 272: 32050-32055.
 27. Jones CM, Ansari A, Henry ER, Christoph GW, Hofrichter J, Eaton WA. The speed of intersubunit communication in proteins. *Biochemistry* 1992; 31: 6692-6702.
 28. Silva MM, Rogers PH, Arnone A. A third quaternary structure of human Hb at 1.7 Å resolution. *J Biol Chem* 1992; 267: 17248-17256.
 29. Lukin JA, Kontaxis G, Simplaceanu V, Yuan Y, Bax A, Ho C. Quaternary structure of hemoglobin in solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 517-520.
 30. Shibayama N, Sugiyama K, Park SY. Structures and oxygen affinities of crystalline human hemoglobin C ($\beta 6$ Glu \rightarrow Lys) in the R and R2 quaternary structures. *J Biol Chem* 2011; 286: 33661-33668.
 31. Miyazaki G, Morimoto H, Yun KM, Park SY, Nakagawa A, Minagawa H, Shibayama N. Magnesium(II)- and zinc(II)-protoporphyrin IX's stabilize the lowest oxygen affinity state of human hemoglobin even more strongly than deoxyheme. *J Mol Biol* 1999; 292: 1121-1136.
 32. Shaeffer JR, McDonald MJ, Turci SM, Dinda DM, Bunn HF. Dimer-monomer dissociation of human hemoglobin A. *J Biol Chem* 1984; 259: 14544-14547.
 33. Mrabet NT, Shaeffer JR, McDonald MJ, Bunn HF. Dissociation of dimers of human hemoglobins A and F into monomers. *J Biol Chem* 1986; 261: 1111-1115.
 34. Shibayama N, Imai K, Morimoto H, Saigo S. Oxygen equilibrium properties of nickel(II)-iron(II) hybrid hemoglobins cross-linked between $82\beta 1$ and $82\beta 2$ lysyl residues by bis(3,5-dibromosalicyl)fumarate: determination of the first two-step microscopic Adair constants for human hemoglobin. *Biochemistry* 1995; 34: 4773-4780.
 35. Shibayama N, Morimoto H, Miyazaki G. Oxygen equilibrium study and light absorption spectra of Ni(II)-Fe(II) hybrid hemoglobins. *J Mol Biol* 1986; 192: 323-329.
 36. Shibayama N, Morimoto H, Kitagawa T. Properties of chemically modified Ni(II)-Fe(II) hybrid hemoglobins: Ni(II) protoporphyrin IX as a model for a permanent deoxy-heme. *J Mol Biol* 1986; 192: 331-336.
 37. Shibayama N, Inubushi T, Morimoto H, Yonetani T. Proton nuclear magnetic resonance and spectrophotometric studies of nickel (II)-iron(II) hybrid hemoglobins. *Biochemistry* 1987; 26: 2194-2201.
 38. Shibayama N, Imai K, Hirata H, Hiraiwa H, Morimoto H, Saigo S. Oxygen equilibrium properties of highly purified human adult hemoglobin cross-linked between $82\beta 1$ and $82\beta 2$ lysyl residues by bis(3,5-dibromosalicyl)fumarate. *Biochemistry* 1991; 30: 8158-8165.
 39. Shibayama N, Sugiyama K, Tame JRH, Park SY. Capturing the hemoglobin allosteric transition in a single crystal form. *J Am Chem Soc* 2014; 136: 5097-5105.
 40. Biswal BK, Vijayan M. Structure of human methaemoglobin: the variation of a theme. *Curr Sci* 2001; 81: 1100-1105.
 41. Merk A, Bartesaghi A, Banerjee S, Falconieri V, Rao P, Davis MI, Pragani R, Boxer MB, Earl LA, Milne JLS, Subramaniam S. Breaking Cryo-EM Resolution Barriers to Facilitate Drug Discovery. *Cell* 2016; 165: 1698-1707.
 42. Khoshouei M, Radjainia M, Baumeister W, Danev R. Cryo-EM structure of haemoglobin at 3.2 Å determined with the Volta phase plate. *Nat Commun* 2017; 8: 16099.
 43. Herzik Jr MA, Wu M, Lander GC. High-resolution structure determination of sub-100 kDa complexes using conventional cryo-EM. *Nat Commun* 2019; 10: 1032.
 44. Fang TY, Zou M, Simplaceanu V, Ho NT, Ho C. Assessment of roles of surface histidyl residues in the molecular basis of the Bohr effect and of $\beta 143$ histidine in the binding of 2,3-bisphosphoglycerate in human normal adult hemoglobin.

Biochemistry 1999; 38: 13423-13432.

45. Marden MC, Bohn B, Kister J, Poyart C. Effectors of hemoglobin: separation of allosteric and affinity factors. Biophys J 1990; 57: 397-403.

獣医学領域における人工血液製剤の必要性と今後の展望

Necessity and Prospects of Artificial Blood Products in Veterinary Medicine

富安 博隆

Hiroataka Tomiyasu

和文抄録

犬や猫などの伴侶動物に向けた医療の高度化に伴い、全血輸血や血漿輸注も重要な処置の一つとして頻繁に実施されるようになってきている。このような処置は犬や猫に特有の血液型やその分布、さらには同種自然抗体の存在など様々な因子を考慮しながら実施する必要がある。しかしながら、このような処置に関しては日本全体で安定的に実施できるような状況には至っていない。本稿では、全血輸血や血漿輸注などの輸血療法に関する獣医学領域における課題とその解決に向けた取り組みを紹介しながら、人工血液製剤の必要性とその展望に関して紹介したい。

Abstract

As the medical treatments for companion animals have evolved, whole blood transfusion and plasma transfusion are often performed as essential procedures. When veterinarians perform these procedures, they must consider various factors such as the blood types and their distribution that are unique to dogs and cats and the presence of homologous natural antibodies. However, the situation has not yet reached the point where treatment with blood products can be performed anywhere in Japan. Here, I would like to introduce some of the challenges in the field of veterinary medicine related to blood product treatments and the efforts being made to solve them, as well as the need for and prospects of artificial blood products for dogs and cats.

Keywords

Artificial plasma expander, Blood bank, Blood transfusion, Blood type, Cat, Dog

1. 諸言

犬や猫を含む伴侶動物（ペット）に向けた医療に対する社会的要求が高まるとともに、その高度化と細分化が進んでいる。本学においても二次診療施設および教育病院として東京大学附属動物医療センターが機能しており、全血輸血や血漿輸注といった輸血療法は当センターにおいて重要な処置の一つとして実施されている。このような処置は犬や猫に特有の血液型やその分布、さらには同種自然抗体の存在も考慮しながら実施する必要がある。しかしながら、現状では各症例に適合する血液の投与が日本全体で安定的に実施できるような状況には至っていない。また、特殊な血液型に関しては当センターにおいても実施が困難な状況は少なくない。

その大きな要因の一つとして、全国的な動物血液バンクが実現できていないという点が挙げられる。この実現には法的整備も含めて多くの課題が存在するため長期的な取り組みが必要である。その他の解決策として第一に挙げられるのが、当然ではあるが輸

東京大学 大学院農学生命科学研究科 獣医学専攻 獣医内科学教室

〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1 Laboratory of Veterinary Internal Medicine, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, the University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, JAPAN

E-mail: atomi@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

論文受付日：2023年7月3日 論文受理日：2023年7月14日

血が必要となる各種疾患の詳細な病態解明と新規治療法の確立である。我々は本邦で特に発生頻度の高い骨髄疾患に関してその臨床的特徴や分子生物学的病態の解析に取り組んでおり、同定された分子異常を標的とした新規治療の開発を目指している。このような取り組みは重要ではあるものの、手術や外傷による大量出血や血漿成分の不足など、全血輸血や血漿輸注が必要不可欠な処置となる状況も存在する。そのため、犬や猫のための人工血液製剤の開発および臨床応用が急務となっている。現在我々は中央大学理工学部応用化学科生命分子化学研究室との共同研究の中で、犬に应用可能な人工血液製剤の評価を行っており、その安全性を確認している。

本稿では、獣医学領域における全血輸血や血漿輸注といった輸血療法に関するこのような課題とその解決に向けた取り組みを具体的に紹介しながら、動物用人工血液製剤の必要性とその展望に関して述べる。

2. 犬と猫に対する全血輸血・血漿輸注の実情

犬と猫に対する輸血療法の適応は、手術などによる大量出血や種々の原因による貧血、先天性凝固因子欠乏症、低タンパク血症など非常に多岐にわたる。本来このような処置はあくまで対症療法として実施されるものであり、その原因に対する根治的治療も併せて行うべきである。しかしながら、犬や猫に発生する疾患には根治的治療が確立していない疾患が多いため、実際には生命維持のために継続的な輸血が必要となってしまう症例も存在する。著者は本学附属動物医療センターにおいて血液内科を担当しており、日常的に全血輸血や血漿輸注を実施している。その中で、稀なケースとして、あらゆる治療に反応を示さない非腫瘍性の骨髄疾患が原因で継続的な全血輸血が必要となり、のちに発生した悪性腫瘍が原因で最終的に死亡するまでに計70回以上の全血輸血が必要となった犬の症例を経験している。しかしながら、このような極めて頻回の輸血を実施する上では、考慮しなければいけない現実的・倫理的な課題が存在する。

3. 犬と猫における血液型の種差と分布、同種自然抗体の存在

この現実的・倫理的な課題の詳細は後述するが、初めに犬や猫に対する輸血療法を行う上での実際の手順を概説する。まず、新鮮血液の投与であれ保存血の投与であれ、ほとんどの場合は

まず供血動物（ドナー）の確保が必須となる。これは先述のように全国的に稼働している犬や猫のための血液バンクが存在しないためである。この血液ドナー動物の一般的な条件を Table 1 に示すが、ドナーとレシピエントの血液型が一致することが当然ながら重要である。次にこのドナーと輸血療法が必要である症例（レシピエント）のそれぞれの血液を用いて交差適合試験を実施し、これらの血液の適合性を確認する。レシピエントの血液に適合するドナーが確保できれば、このドナーからの輸血用血液を確保し、レシピエントに輸血開始前の種々の処置を行った上で輸血を開始し投与終了まで慎重なバイタルモニターを継続する。

適合するドナーを確保するためには、犬や猫の血液型の種差とその分布を知ることが重要となる。まず犬においては、犬赤血球抗原 (Dog erythrocyte antigen: DEA) のうち、DEA1.1 が血液型決定に最も重要な赤血球抗原であり、血液型は DEA1.1 (+) あるいは DEA1.1 (-) と呼称される。DEA1.1 (-) の犬は DEA1.1 (+) の赤血球に対する同種自然抗体を持たない。この2種類の血液型の分布は国により多少異なるものの DEA1.1 (+) の割合は概ね 50-65% と報告されており¹⁾、極端な偏りはない。次に猫においては、N-グルコリルノイラミン酸が赤血球表面に発現している A 型、N-アセチルノイラミン酸が赤血球表面に発現している B 型、その両方が発現している AB 型の三つの血液型に分類される。A 型の猫は B 型の赤血球に対する同種自然抗体を持ち、B 型の猫は A 型の赤血球に対する同種自然抗体を持つ。また、B 型の猫が持つ抗 A 型赤血球抗体は高い力価を持つことが知られている。これらの血液型の分布は品種によっても異なるが、猫の血液型には大きな偏りが存在する²⁾。まず最も一般的な血液型が A 型である。雑種の猫では 90% 前後が A 型とされており、シャム種では 100% の個体が A 型であったとする報告も存在する^{3,4)}。一方、B 型は一般的には稀であるものの特定の品種ではその割合が高く、代表例として近年人気の品種となっているブリティッシュ・ショートヘアでは 20-60% 程度が B 型である²⁾。AB 型は極めて稀であり、正確な割合は不明であるが著者はこれまでに 1 例のみ遭遇したことがある。

このような血液型の種差と分布、同種自然抗体の有無を踏まえてレシピエントとドナーの間の血液型適合性を考えていきたい (Fig. 1)。まず犬では先述の通り血液型の分布に大きな偏りがいないため、レシピエントの血液型と同じ血液型のドナーを確

Table 1. General requirements of canine and feline blood transfusion donors.

Healthy adult dogs and cats aged 1-8 years
Never had a blood transfusion in the past
Vaccinated against representative infectious diseases
Not suffer from any infectious diseases
Dog: heartworms, Babesia, etc.
Cat: feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus, mycoplasma, etc.
Not pregnant
Same blood type as the recipient

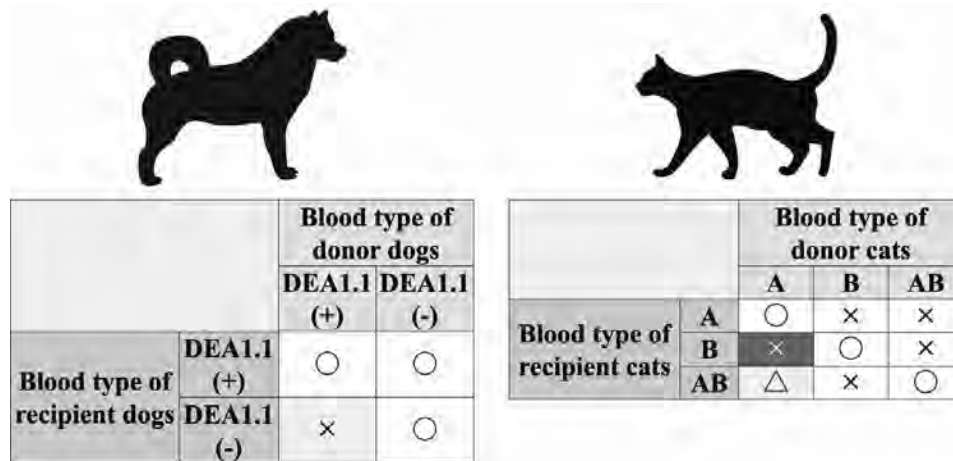


Figure 1. Blood type matching for donors and recipients of dogs and cats.

保するよう努力し、このような組み合わせで交差適合試験に進む。また、DEAI.1 抗原だけを考慮すれば DEAI.1 (+) のレシピエントに DEAI.1 (-) のドナーの血液を投与することも問題ないと考えられるため、交差適合試験の候補とできる。一方で、DEAI.1 (-) のレシピエントに DEAI.1 (+) のドナーの血液を投与することは原則不可である。ただし、DEAI.1 (-) の犬は DEAI.1 (+) の赤血球に対する同種自然抗体を持たないため、レシピエントが妊娠犬である場合などを除き、このような組み合わせでも交差適合試験さえ問題なければ初回輸血時には免疫反応が起きる可能性は低いと考えられる。次に猫では、A 型のレシピエントの場合は A 型のドナーを確保するよう努力し、このような組み合わせで交差適合試験に進む。一方で、猫には血液型分布に大きな偏りがあるため、B 型のレシピエントのために B 型のドナーを見つけることは極めて困難である。しかしながら、仮に B 型のレシピエントに A 型のドナー血液を投与した場合、たとえ少量の輸血であっても B 型のレシピエントがもつ高力価の抗 A 型赤血球抗体によって激しい急性免疫反応が起き生命に関わる状況となる。そのため B 型の猫に輸血処置が必要となった場合にそのドナーを確保することが極めて困難なのが現状である。極めて稀な血液型である AB 型の猫がレシピエントとなる場合、当然 AB 型のドナーを確保するのは不可能である。一方で、A 型の濃厚赤血球液のみの投与であれば AB 型のレシピエントは抗 A 型赤血球抗体を持たないため免疫反応が起きる可能性は低いと考えられるが、筆者は AB 型の猫に輸血療法を行った経験がない。

4. 全血輸血や血漿輸注を実施するための現状での取り組みと問題点

先述のように、輸血療法を必要とするレシピエントがいる場合、まずは血液型が適合するドナーを確保できるよう努力するが、常に安定的に入手することは困難である。特に猫の B 型ドナーに関しては当センターにおいても確保することが困難なことが多い。この背景には、まず全国的に稼働している犬と猫のための血液バンクがないことが挙げられる。血液バンク設立の

大きな壁となっているのが法的な問題である。犬や猫の輸血用血液や血漿は、わが国では薬機法（医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律）で承認されておらず、販売ができない。また、医薬品販売業の許可がない動物病院が確保している血液を、輸血を必要としている動物病院に提供することも難しい。それは、輸血用血液や血漿を反復継続して提供していれば、たとえ無償であっても医薬品販売業の許可がないのに医薬品を他の動物病院に提供しており販売業とみなされる可能性があるためである。そのため、各動物病院においてボランティアとなってくれる犬や猫を募集し、輸血処置が必要となったときに連絡をして来院していただく、あるいは来院された際に適宜血液を採取させていただきストックしておく、さらには各動物病院の獣医師やスタッフが飼育している動物からもボランティアとして血液を採取させていただく、というような取り組みによって輸血処置に必要な血液がまかなわれている。一方で、このような取り組みだけで未だ十分な血液を確保できる状況には至っておらず、またドナー動物からの採血に伴うドナー自身への健康被害やボランティアを申し出ていただいた飼い主と動物病院との間に何らかのトラブルが起りかねないという懸念も存在する。そのため、輸血が必要な症例が来院しているにも関わらずすぐに輸血ができない、あるいはそのような症例が複数来院しているが全ての症例に輸血できないため、より輸血を必要としている症例に優先的に行う選択をしなければならぬ、といった状況に遭遇することが決して少なくない。

5. 今後取り組むべき課題

著者はこのような現状を打破するための方策はいくつかあると考えている。まず、犬や猫の全国的な血液バンクを確立することである。これには先述の法的課題も存在するため行政の理解と協力を得る必要があり、またボランティアの継続的な協力を得られるような仕組みも検討していく必要がある。

次に、輸血処置が必要となる各種疾患の詳細な病態解明と新規治療法の確立も重要な取り組みと認識している。我々は本邦で特に発生頻度の高い骨髄疾患に関してその臨床的特徴や分子

生物学的病態の解析に取り組んでおり、同定された分子異常を標的とした新規治療の開発を目指しているため、本稿ではその一部を紹介する。犬においては骨髓疾患が非再生性貧血をもたらす主要な要因の一つであり、骨髓疾患全体のうち非腫瘍性の骨髓疾患が60%以上を占めると報告されている⁵⁾。我々はまず本学動物医療センターの医療記録をもとに様々な非腫瘍性の骨髓疾患に罹患した症例情報を調査したところ、ミニチュア・ダックスフントが非腫瘍性骨髓疾患の好発品種であること、また他の犬種に発生するこれら疾患と比較して、ミニチュア・ダックスフントでは貧血のみを呈し白血球減少や血小板減少はほとんどの症例で認められないこと、そして治療に反応する症例の割合が低いことを見いだした⁶⁾。そこで、同犬種に発生する非腫瘍性骨髓疾患に焦点を絞り詳細に調査したところ、同犬種の症例は骨髓検査の所見が極めて類似していること、一方で画一的な治療に反応した群と反応が認められなかった群の間では治療開始前末梢血中の血小板数や血液細胞の異形成所見検出率、末梢血液細胞のクローン性検出率が大きく異なることも明らかとなった⁶⁾。このことから、上記のような治療反応群と治療抵抗群ではその病態が異なるものと考え、次世代シーケンサーなどを用いて網羅的にゲノム異常を解析しその分子病態を解析した。その結果、既存の治療に抵抗性を示すミニチュア・ダックスフント症例の骨髓細胞においては、*SFRP2* 遺伝子と *AXIN2* 遺伝子の発現量低下に伴い細胞内シグナル経路の一つである Wnt シグナル経路が活性化状態にあることが示唆され、このシグナル経路が標的とする *CCND2* 遺伝子の発現量が増加していることが示された (Fig. 2)。今後はより詳細にこの分子病態を解明するとともにこの細胞内シグナル経路を標的とした新たな治療を確立したいと考えている。

このような取り組みは臨床的・学術的にも重要と考えているが、手術や外傷による大量出血や血漿成分の不足など、全血輸血や血漿輸注が必要不可欠な処置となる状況も存在する。そのため、犬や猫のための人工血液製剤の開発および臨床応用が急

務となっている。

6. 犬と猫に投与可能な人工血液製剤の展望

我々は中央大学理工学部応用化学科生命分子化学研究室との共同研究の中で、犬に応用可能な人工血液製剤の安全性を確認しているため、ここではその概要を述べる。

犬では種々の基礎疾患に伴うタンパク喪失性腸症やタンパク喪失性腎症がしばしば自然発生する。これらの症候群に罹患した症例はしばしば重度の低タンパク血症を呈し、このことがこれらの症例に対する検査や治療に伴い必要となる全身麻酔のリスクを増大させる。また、たとえ重篤な疾患を抱えていない犬であっても、手術等の処置時に多量の出血が発生した際に急激な血圧低下を認めることも少なくない。このような場面においては血漿輸注やヒドロキシエチルデンプン含有製剤などの人工膠質液を投与することとなるが、すぐに投与可能な血漿を常に確保している動物病院は少なく、また人工膠質液の使用に関しては急性腎障害やアレルギー反応、凝固異常、組織への蓄積など種々の副作用が生じる可能性があることも報告されている⁷⁾。しかしながら、本邦では犬アルブミン製剤は入手不可能であり、犬に人のアルブミン製剤を投与した場合には当然ではあるがアレルギー反応が生じる可能性が指摘されている^{8,9)}。

そこで、中央大学理工学部応用化学科生命分子化学研究室において開発されたポリオキサゾリン被覆ブタアルブミン製剤 (POx-PSA) が、人工血漿増量剤として犬に使用可能であるか、その安全性を検討することとなった。ブタアルブミン (PSA) および POx-PSA を健康犬にそれぞれ投与した場合、PSA 投与群では全頭で活動性や食欲低下、嘔吐、下痢が認められ、また免疫反応に由来すると考えられる急性腎障害や低アルブミン血症も認められた一方で、POx-PSA 投与群では炎症マーカーである CRP の上昇は認められたものの重篤な有害事象は認められなかった¹⁰⁾。このことは、POx-PSA が PSA に比べて免疫原性が明らかに低下していることを示しており、今後 POx-PSA の反

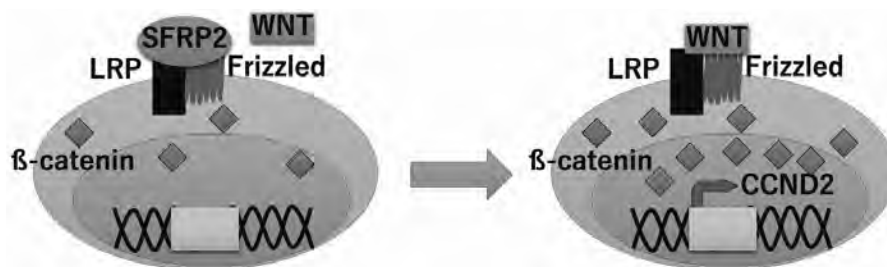


Figure 2. A Schematic illustration showing the activation of Wnt signaling pathway that may occur in bone marrow cells from Miniature Dachshunds with treatment-resistant bone marrow diseases. Under normal conditions, the interaction of WNT with Frizzled is inhibited by SFRP2, and cytoplasmic β -catenin is continuously degraded by the Axin complex. However, in the cases described above, the expressions of *SFRP2* and *AXIN2* were decreased, which should result in the promotion of the interaction of WNT with Frizzled and the suppression of the degradation of cytoplasmic β -catenin. The cases also showed the increased expression of *CCND2*, which is one of the target genes of Wnt signaling pathway, and its increased expression was thought to be derived from the increased amounts of β -catenin in the cytoplasm and nucleus.

復投与の安全性や犬の体内でアルブミンとしての機能を保持しているかなど、既存の治療法に比較した利点を明らかにしていきたいと考えている。

7. 結語

著者は臨床獣医学の大きな意義には、犬や猫などの伴侶動物に対する医療を提供することによる社会貢献と、人に発生する種々の疾患の自然発生モデル動物という観点からの病態解析や治療法確立、という2つが含まれると考えている。本稿において紹介したように、獣医学領域においても人工血液製剤に対する需要と期待は非常に高い。今回紹介したような人工血漿増量剤だけでなく、今後は動物に投与可能な人工酸素運搬体などの開発にも期待が高まっている。著者も犬や猫に対する医療と臨床獣医学研究に携わる者として、微力ながらこのような人工血液製剤の開発に貢献していきたいと考えている。

引用文献

- 1) Proverbio D, Lubas G, Spada E, Medina Valentin AA, Viñals Florez LM, Del Rosario Perlado Chamizo M, Perego R, Pennisi MG, Ferro E, Baggiani L, Gavazza A, Blais MC. Prevalence of Dal blood type and dog erythrocyte antigens (DEA) 1, 4, and 7 in canine blood donors in Italy and Spain. *BMC Vet Res* 2020; 16: 126.
- 2) Taylor S, Spada E, Callan MB, Korman R, Leister E, Steagall P, Lobetti R, Seth M, Tasker S. 2021 ISFM Consensus Guidelines on the Collection and Administration of Blood and Blood Products in Cats. *J Feline Med Surg* 2021; 23: 41-432.
- 3) Forcada Y, Guitian J and Gibson G. Frequencies of feline blood types at a referral hospital in the south east of England. *J Small Anim Pract* 2007; 48: 570-573.
- 4) Malik R, Griffin DL, White JD, Rozmanec M, Tisdall PL, Foster SF, Bell K, Nicholas FW. The prevalence of feline A/B blood types in the Sydney region. *Aust Vet J* 2005; 83: 38-44.
- 5) Weiss DJ. A retrospective study of the incidence and the classification of bone marrow disorders in the dog at a veterinary teaching hospital (1996-2004). *J Vet Intern Med* 2006; 20: 955-961.
- 6) Tani A, Tomiyasu H, Ohmi A, Ohno K, Tsujimoto H. Clinical and clinicopathological features and outcomes of Miniature Dachshunds with bone marrow disorders. *J Vet Med Sci* 2020; 82: 771-778.
- 7) Wong C, Koenig A. The Colloid Controversy: Are Colloids Bad and What Are the Options? *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2017; 47: 411-421.
- 8) Cohn LA, Kerl ME, Lenox CE, Livingston RS, Dodam JR. Response of healthy dogs to infusions of human serum albumin. *Am J Vet Res* 2007; 68: 657-63.
- 9) Francis AH, Martin LG, Halderson GJ, Lahmers KK, Luther TY, Alperin DC, Hines SA. Adverse reactions suggestive of type III hypersensitivity in six healthy dogs given human albumin. *J Am Vet Med Assoc* 2007; 230: 873-9.
- 10) Okamoto W, Usui T, Hasegawa M, Kobayashi T, Fujisawa J, Taguchi K, Matsumoto K, Kohno M, Iwazaki M, Shimano S, Nagao I, Toyoda H, Matsumura N, Tomiyasu H, Tochinai R, Komatsu T. Polyoxazoline-conjugated porcine serum albumin as an artificial plasma expander for dogs. *Sci Rep* 2023; 13: 9512.

毛細血管ネットワークにおける人工酸素運搬体の分配特性に関する研究

Study on the Partitioning Properties of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers in Capillary Networks

百武 徹

Toru Hyakutake

和文抄録

本稿では、毛細血管ネットワークを対象とした赤血球、および人工酸素運搬体の分配特性を調査した研究例について紹介する。赤血球以外の血漿部分に人工酸素運搬体が均一に分布していると仮定することで、赤血球の分配特性を対象とした Pries の経験式をもとに、人工酸素運搬体の分配特性を算出した。マイクロ流体デバイスを用いた *in vitro* 実験を行った結果、単一分岐では Pries の経験式をよく再現したが、分岐が連続する場合、分岐同士の距離に起因する分岐直前での赤血球分布の偏りが、実験結果と経験的モデルの不一致を引き起こした。したがって、実際の毛細血管ネットワークでは経験的モデルによる予測以上に酸素不均一性が生じている可能性がある。流体シミュレーションは Pries の経験式をよく再現した。また、壁面付近の血漿層に多く分布している人工酸素運搬体の存在が、分岐後の酸素不均一性の軽減をもたらすことを示した。これらの結果は、微小循環障害に対する人工酸素運搬体投与効果を適切に評価するための重要な知見となるだろう。

Abstract

This paper describes research that investigated the partitioning properties of red blood cells (RBCs) and hemoglobin-based oxygen carriers (HBOCs) in a capillary network. Assuming that HBOCs are uniformly distributed in the plasma component other than RBCs, the partitioning properties of the HBOCs were calculated based on Pries' empirical equation targeting the partitioning properties of RBCs. *In vitro* experiments using a microfluidic device showed that the results agreed well with Pries' empirical equation for a single branch, but for a series of branches, the bias of RBC distribution just before the branch due to the distance between branches caused a discrepancy between the experimental results and the empirical model. Therefore, the actual capillary network may have more oxygen heterogeneity than predicted by the empirical model. Fluid simulations demonstrated that the results agreed well with Pries' empirical equation, and that the abundance of HBOCs in the plasma layer near the vessel wall before bifurcation leads to a reduction in oxygen heterogeneity after bifurcation. These results may provide important information for the appropriate evaluation of the effects of HBOCs on microcirculatory disturbances.

Keywords

Hemoglobin-based oxygen carrier, red blood cell, Pries' empirical model, microfluidic device, *in vitro* experiment, Fluid simulation

横浜国立大学 大学院工学研究院

〒240-8501 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台79-5 Faculty of Engineering, Yokohama National University, 79-5 Tokiwadai, Hodogaya-ku, Yokohama, Kanagawa 240-8501, Japan.

E-mail: hyaku@ynu.ac.jp

論文受付日：2023年8月28日 論文受理日：2023年9月19日

1. はじめに

毛細血管は分岐を繰り返すことで複雑なネットワークを形成しており、末梢組織の各細胞へ酸素と栄養を供給する役割を担っている。酸素は主に赤血球内のヘモグロビンと結合しており、徐々に放出されて組織に供給される。つまり、毛細血管ネットワークを通じた酸素の輸送と組織の酸素化は、赤血球の流動特性に強く依存している。一般に、赤血球は血管内の速度勾配および自身の変形により軸集中をするため、血管壁付近に血漿層が形成される。その結果、分岐後に赤血球は均一には分配されず、条件によっては血漿分離が起こる。Priesらは生体内における血漿分離の影響を調べ、微小血管分岐部での赤血球分配を記述する経験式を提案した¹⁻³⁾。このモデルは、微小循環に関わる広範囲の血管における赤血球分配の予測に有用である。一方で、血管径が10 μ m以下の毛細血管レベルの分岐部ではPriesの経験式から逸脱する場合も報告されている⁴⁻⁵⁾。したがって、このような毛細血管分岐部におけるより詳細な赤血球分配特性の調査としてはin vitro実験や数値解析が有効である。

微小血管分岐部においてヘマトクリット値は低流量分岐では減少し、高流量分岐では増加する。この現象はZweifach-Fung効果として知られている⁶⁻⁷⁾。結果として、分岐部では赤血球の偏った分配が行われるため、毛細血管ネットワークにおける酸素の時間的・空間的分布は非常に不均一となる。加えて、好中球などによる血流の遮断によっても不均一性は生じる。このような微小循環における酸素不均一性は微小循環障害を引き起こし、虚血性心疾患⁸⁾、がん⁹⁾、アルツハイマー病¹⁰⁻¹¹⁾など、様々な病態に深く関与していると言われている。したがって、毛細血管ネットワークにおける赤血球不均一性のメカニズムの理解することは、このような病態の解明に対して重要な知見を提供できると考えられる。

現在、急速な少子高齢化に伴う慢性的な輸血用血液製剤不足の解消や、血液製剤に対するリスク軽減を目的として、ヘモグロビンを利用した様々な種類の人工酸素運搬体 (Hemoglobin-based oxygen carrier, HBOC) が開発されている¹²⁻¹⁵⁾。本邦では、ヘモグロビンをリン脂質ベシクルに封入した細胞型人工酸素運搬体 (Hemoglobin vesicle, HbV)¹⁶⁻¹⁷⁾を始め、ヘモグロビンにヒト血清アルブミンを結合させたコア-シェル型の人工酸素運搬体¹⁸⁾や、マイクロサイズの凹型形状に変形可能な人工酸素運搬体¹⁹⁾なども開発されている。緊急時の輸血としての利用に加えて、赤血球よりも直径の小さい毛細血管に容易に流入できることを利用し、最近では、前述のような微小循環障害に対する有効な治療薬としての研究も行われている²⁰⁻²⁷⁾。ここで、微小循環障害に対する人工酸素運搬体投与効果を適切に評価するためには、毛細血管ネットワークにおける赤血球および人工酸素運搬体の分配特性に対する理解が重要となる。このような背景のもと本稿では、まずPriesの経験式について解説を行い、次に毛細血管ネットワークにおける赤血球および人工酸素運搬体の分配特性に関するin vitro実験や流体シミュレーションの研究例を紹介する。

2. Priesの経験式に基づいた赤血球および人工酸素運搬体の分配特性

図1に示すような分岐部モデルを考える。親管を流れる血流量を Q_p 、娘管1, 2を流れる血流量をそれぞれ Q_1, Q_2 とする。また、親管を通過する赤血球数を N_p 、娘管1, 2の径を通過する赤血球数をそれぞれ N_1, N_2 とする。Priesらはラット腸間膜の細動脈分岐部における赤血球の分配特性を調べ、血流分配比 Q_2/Q_p と赤血球分配比 N_2/N_p の間に次のような経験式を導いた¹⁻³⁾。

$$\text{logit}(N_2/N_p) = A + B \text{logit}\left(\frac{Q_2/Q_p - X_0}{1 - 2X_0}\right) \quad (1)$$

ここで、 $\text{logit } x = \ln[x/(1-x)]$ である。 A, B, X_0 は次に示すように血管径とヘマトクリット値に関するパラメータである。

$$A = -13.29 \left(\frac{D_1^2 - D_2^2}{D_1^2 + D_2^2} \right) (1-H) / D_p, \quad B = 1 + 6.98 \left(\frac{1-H}{D_p} \right), \\ X_0 = \frac{0.964(1-H)}{D_p} \quad (2)$$

ここで、 H は親管から排出後のヘマトクリット、 D_p, D_1, D_2 はそれぞれ親管と2つの娘管1, 2の直径である。式から分かる通り、Priesの経験式には分岐角度のパラメータは入っていない。Fahraeus効果により親管内のヘマトクリット値 H_p と親管から排出後のヘマトクリット値 H は異なっており、その関係式は、以下のように示される。

$$\frac{H_p}{H} = H + (1-H)(1 + 1.7e^{-0.415D} - 0.6e^{-0.011D}) \quad (4)$$

また、娘管のヘマトクリットは以下のように表すことができる。

$$H_1 = \frac{N_1/N_p}{Q_1/Q_p} H_p, \quad H_2 = \frac{N_2/N_p}{Q_2/Q_p} H_p \quad (5)$$

次に、この経験式を用いて人工酸素運搬体の分配比を算出する。親管を通過する人工酸素運搬体の数を N_p^H 、娘管1, 2を通過する人工酸素運搬体の数をそれぞれ N_1^H, N_2^H とする。人工酸素運搬体が赤血球以外の血漿内に一様に分布していると仮定し、人工酸素運搬体が赤血球に与える影響を無視すると、人工酸素運搬体の分配比 N_2^H/N_p^H は以下のように表すことができる。

$$\frac{N_2^H}{N_p^H} = \frac{(1-H_2)Q_2}{(1-H_1)Q_1 + (1-H_2)Q_2} \quad (6)$$

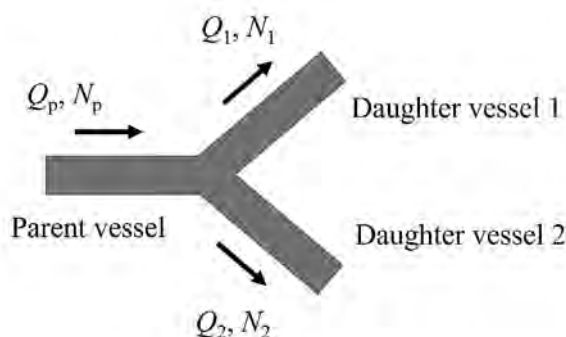


図1 Priesの経験式における微小血管分岐部のパラメータ

また、血液中に人工赤血球が占める割合を人工赤血球の体積分率と定義し、赤血球のヘマトクリットと同様に以下の式で算出した。

$$H_1^H = \frac{N_1^H/N_p^H}{Q_1/Q_p} H_p^H, \quad H_2^H = \frac{N_2^H/N_p^H}{Q_2/Q_p} H_p^H \quad (7)$$

Pries の経験式を用いて算出された結果の一例を示す。図 2(a) は、流量分配比に対する各娘管の赤血球のヘマトクリットを示している。ここで、横軸は娘管 2 の流量分配比、縦軸は娘管 1, 2 の無次元ヘマトクリット（親管のヘマトクリットに対する娘管のヘマトクリット）で、3 種類の排出後のヘマトクリット値 $H=10, 20, 30\%$ における比較を示している。分岐形状の条件としては、 $D_p=D_1=D_2=10\mu\text{m}$ の場合である。 $Q_2/Q_p=0.5$ は親管から娘管 1 と 2 に均等に分配されていることを意味しており、親管のヘマトクリットと娘管 1, 2 のヘマトクリットは同一となる ($H_1=H_2=H_p$)。図より、娘管 2 への流量分配比 Q_2/Q_p が減少するにつれて、娘管 2 のヘマトクリットは大きく減少しているのに対して、娘管 1 のヘマトクリットは増加している。これ

は Zweifach-Fung 効果を意味している。図 2(b) は、流量分配比に対する各娘管の人工酸素運搬体の体積分率を示している。図より、ヘマトクリットの場合と異なり、 Q_2/Q_p が減少するにつれて、娘管 2 の体積分率は増加し、娘管 1 の体積分率はわずかに減少していることが分かる。図 2(c) は娘管 2 への流量分配比 Q_2/Q_p と赤血球分配比 N_2/N_p の関係を示している。図より、 Q_2/Q_p と N_2/N_p との間には大きな解離がみられ、赤血球分布の不均一性を表していることが分かる。特に、 $Q_2/Q_p < 0.1$ では、娘管 2 へは全く赤血球が分配されておらず、完全な血漿分離が起きている。図 2(d) は娘管 2 への流量分配比 Q_2^H/Q_p^H と人工酸素運搬体の分配比 N_2^H/N_p^H の関係を示している。赤血球分配比と異なり、人工酸素運搬体の分配比 N_2^H/N_p^H は、流量分配比 Q_2/Q_p よりもわずかに大きな値を示している。これは娘管 2 の赤血球のヘマトクリットが減少した分を補完するかたちで娘管 2 に人工赤血球が多く分布しているためであると考えられる。つまり、人工酸素運搬体投与が微小循環における酸素不均一性軽減に貢献していることを示唆している。このように Pries の経験式を

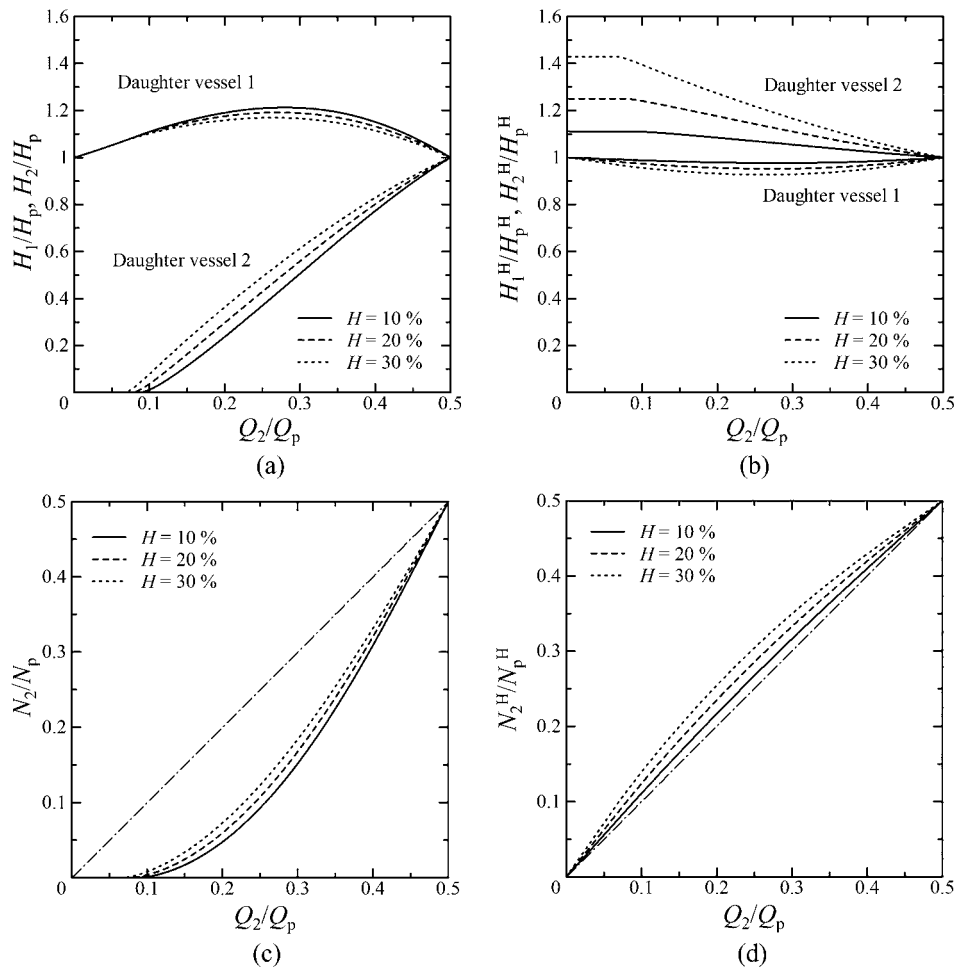


図 2 Pries の経験式の結果 (a) 流量分配比に対する娘管 1, 2 の赤血球のヘマトクリット。ここで、横軸は娘管 2 の流量分配比、縦軸は娘管 1, 2 の無次元ヘマトクリット（親管のヘマトクリットに対する娘管のヘマトクリット）で、3 種類の排出後のヘマトクリット値 $H=10, 20, 30\%$ における比較を示している。分岐形状は $D_p=D_1=D_2=10\mu\text{m}$ である。(b) 流量分配比に対する娘管 1, 2 の人工酸素運搬体の体積分率。(c) 娘管 2 への流量分配比 Q_2/Q_p と赤血球分配比 N_2/N_p の関係。(d) 娘管 2 への流量分配比 Q_2^H/Q_p^H と人工酸素運搬体の分配比 N_2^H/N_p^H の関係。

用いて、単一の分岐に対して赤血球や人工酸素運搬体の分配特性をある程度予測することが可能となる。

3. マイクロ流体デバイスを用いた分配特性の In vitro 実験

毛細血管ネットワークのような微細パターンを流れる赤血球の分配特性を定量的に調査するには、マイクロ流体デバイスによる In vitro 実験が有効である。これにより、Pries の経験式が毛細血管ネットワークの赤血球分配に対して適用可能かどうかを検証することができる。ここでは、マイクロ流体デバイスの製作工程、及び実験方法について簡単に説明する。まず、毛細血管ネットワークを模した微細パターンを設計後、フォトマスクを作成する。次に、シリコンウエハ上にフォトレジスト (SU-8 3010; KAYAKU Advanced Materials, Inc.) をパターンニングすることによって膜厚 $10\mu\text{m}$ のマスターモールドを製作した。その後、PDMS 樹脂 (Sylgard 184 Silicone Elastomer; Dow Corning Toray Co.) を用いて、主剤と硬化剤を 10:1 の割合で混合し、モールド上に流し込み硬化させた後、PDMS をモールドから剥がし、穴あけ加工 (チャンネル作成)、プラズマ照射による親水処理後にスライドガラスに貼り付けてマイクロ流体デバイスの完成となる。以上の製作工程は標準的なソフトリソグラフィ技術²⁸⁾として幅広く利用されている。

本研究では 2 種類のモデルを用意した。図 3(a)(b)に、それぞれ単一モデル、およびネットワークモデルを示す。いずれも入口 1 カ所、出口 1 カ所の閉回路としている。ここで、白のスケールバーは $10\mu\text{m}$ を表している。単一モデルは、分岐が 1 つあるモデルで、1 つの親チャンネルと 2 つの娘チャンネルで構成されている。親チャンネル幅 W_p 、娘チャンネル 1 の幅 W_1 を $10\mu\text{m}$ 一定としたのに対して、娘チャンネル 2 の幅 W_2 については、 $3\sim 10\mu\text{m}$ の間で変化させ、合計 7 種類のマイクロ流体デバイスを作製した。これにより様々な流量分配比の実験を行うことが可能となる。娘チャンネル 1, 2 の長さ (分岐点から合流点までの距離) はともに $200\mu\text{m}$ とした。チャンネル高さはすべて $h=10\mu\text{m}$ である。なお、毛細血管内の流れは流体力学的にはストークス流れと呼ばれ、粘性の影響が支配的であるため、分岐角度の違いが血球の分配特性に与える影響はほとんどないと考えられる。

親チャンネルと娘チャンネル 1, 2 の流量をそれぞれ Q_p, Q_1, Q_2 とし、各流量は、チャンネルの断面積と図 3 の点線枠で示した ROI 内を流れる複数の赤血球の平均流速から求めた。さらに、親チャンネルと娘チャンネル 1, 2 を通過する赤血球の数を、それぞれ N_p, N_1, N_2 とした。ここでは、分岐直前の親チャンネルを流れる赤血球をカウントし、 $N_p=100$ とした。カウントされた赤血球は分岐後まで追跡され、 N_1 と N_2 が決定された。

各チャンネルのヘマトクリット H については、ROI 内の画像解析から以下のように求めた：

$$H = \frac{N_{\text{RBC}} V_{\text{RBC}}}{V_{\text{ROI}}} \quad (8)$$

ここで、 N_{RBC} は ROI 内の赤血球数、 V_{RBC} は赤血球 1 個の平均体積、 V_{ROI} は ROI 内の流路体積である。実験では赤血球のみを流しているが、人工酸素運搬体が赤血球以外の血漿内に一様に分布していると仮定し、かつ、人工酸素運搬体が赤血球に与える影響を無視すると、人工酸素運搬体の分配比、および体積分率は Pries の経験式の場合と同様に式 (6), (7) で求めることができる。

ネットワークモデルは、4 つの連続した分岐と合流で構成されている。親チャンネルの後、分岐間のチャンネルに対して 4 つの領域 (ランク A, B, C, D) を定義した。親チャンネル幅 $10\mu\text{m}$ に対して、ランク A, B, C, D のチャンネル幅は、Murray の法則に従って分岐するごとに減少しており、それぞれ $8, 6.3, 5, 4\mu\text{m}$ とした。ランク A, B, C, D のチャンネル長さは、それぞれ $97.1, 51.6, 40.3, 68.4\mu\text{m}$ とした。ここで、画像解析の対象は、図 2 点線枠内のチャンネル上半分の分岐領域としている。

実験では日本赤十字社から提供された献血血液を使用した。人の血液を用いた実験の実施に関しては、横浜国立大学の医学系倫理専門委員会による倫理審査を受け、承認を得ている。最初に、血液を 3000rpm で 15 分間遠心分離し、その後上清を除去した。残った溶液にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加えた。このプロセスを数回繰り返すことにより、血液から赤血球を単離した。最後に、単離した赤血球にウシ血清アルブミン (1 wt%) とデキストラン 40 (5 wt%) 入りの PBS 溶液を添加することによって赤血球サスペンションを作成し、ヘマトクリット値を 20% に調

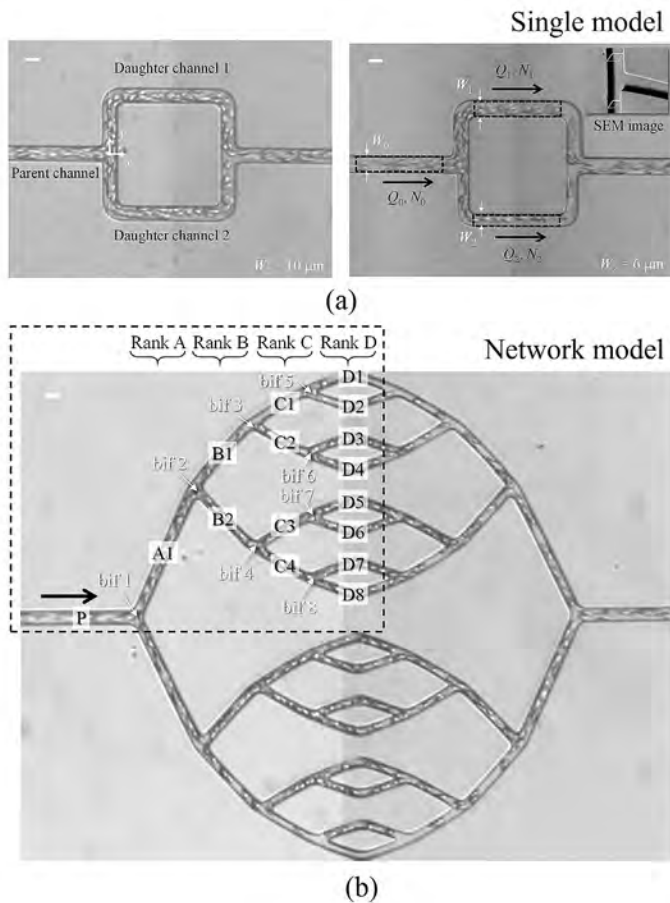


図 3 In vitro 実験で用いたマイクロチャンネルの形状 (a) 単一モデル (b) ネットワークモデル

整した。図4に実験装置の概略図を示す。赤血球サスペンションを流入させるマイクロチャンネルの接続部は、PDMSに穴あけ加工（チャンネル作成）後、出口部にシリコンチューブが取り付けられている。マイクロチャンネル内の流量は、シリコンチューブに接続させたシリジポンプ（Legato11P; KdScientific Inc.）により陰圧をかけて吸引することで制御した。赤血球の運動は

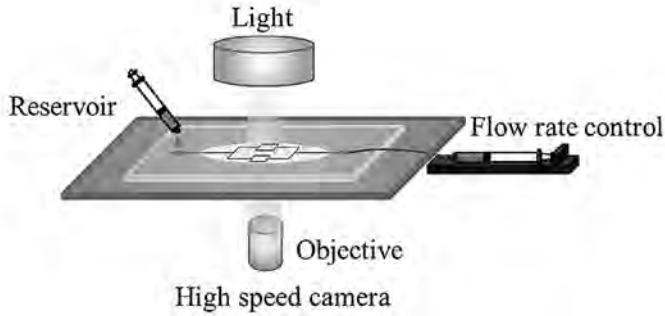


図4 実験装置の概略

倒立顕微鏡（IX71; オリンパス株式会社）を用いて観察した。画像はすべて高速カメラ（K-9; カトウ光研株式会社）を用いて200fpsで取得し、2次元運動解析ソフトウェア（DIPP-Motion V/2D; 株式会社ディテクト）を用いて解析した。

まず、単一モデルにおける分岐前後の赤血球のヘマトクリットの変化を調べた。図5(a)に各流量分配比に対する娘チャンネル1, 2の無次元ヘマトクリットを示す。比較のためPriesの経験式も載せている。Priesの経験式にある D_p , D_1 , D_2 の値には、流路幅と高さを用いて得られた水力直径を適用した。娘チャンネル1, 2のヘマトクリット(H_1 , H_2)は、親チャンネルのヘマトクリット H_p で無次元化している。 Q_2/Q_p が0.5（すなわち対称分岐）のとき、 H_1/H_p と H_2/H_p はほぼ1であったが、 Q_2/Q_p が減少するにつれて、 H_1/H_p と H_2/H_p に有意な差が生じた。すなわち、 H_1/H_p が増加したのに対し、 H_2/H_p は減少した。これはPriesの経験式でも見られたZweifach-Fung効果である。実験結果とPriesの経験式を比較してみると、低い Q_2/Q_p において娘チャンネル2で若干違いがみられるものの、ほぼ同様の結果となった。

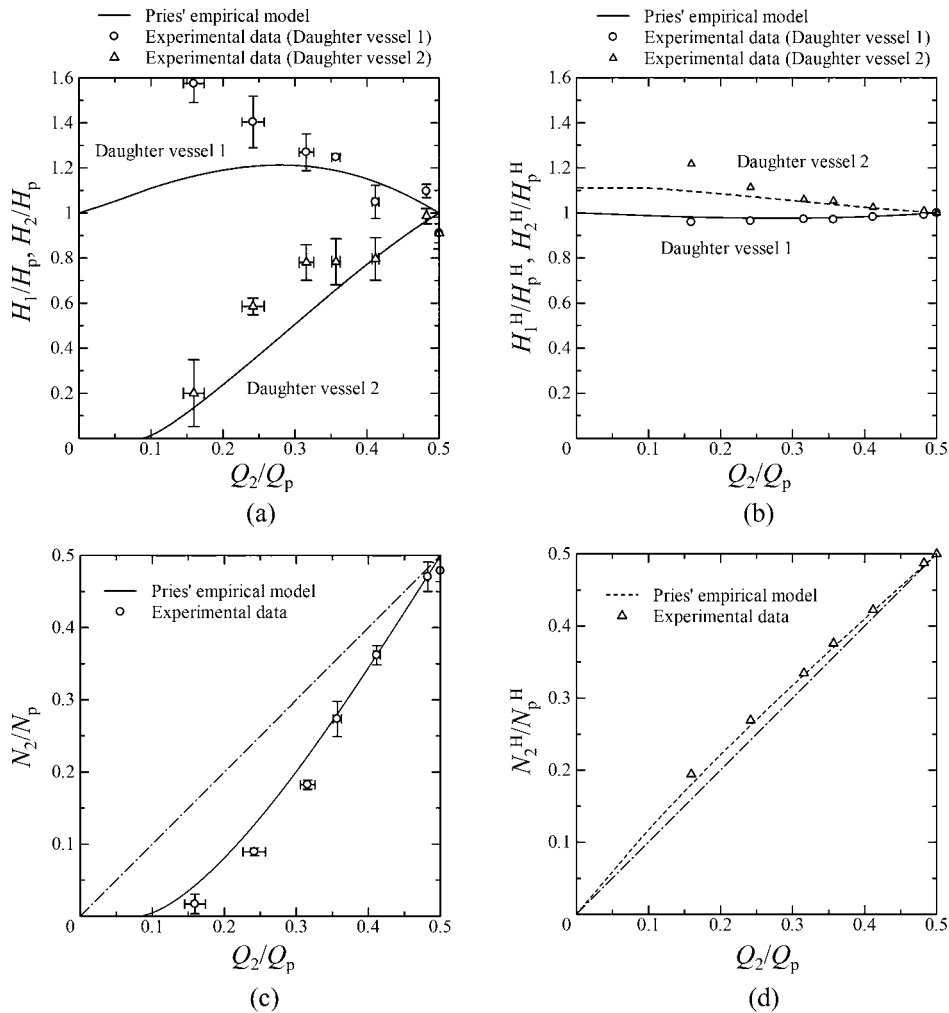


図5 単一モデルの In vitro 実験結果 (a) 流量分配比に対する娘チャンネル1, 2の赤血球のヘマトクリット。ここで、横軸は娘チャンネル2の流量分配比、縦軸は娘チャンネル1, 2の無次元ヘマトクリット（親チャンネルのヘマトクリットに対する娘チャンネルのヘマトクリット）を示している。(b) 流量分配比に対する娘チャンネル1, 2の人工酸素運搬体の体積分率。(c) 娘チャンネル2への流量分配比 Q_2/Q_p と赤血球分配比 N_2/N_p の関係。(d) 娘チャンネル2への流量分配比 Q_2^H/Q_p^H と人工酸素運搬体の分配比 N_2^H/N_p^H の関係。

図5(b)は娘チャンネル1, 2における人工酸素運搬体の体積分率の比較である。図より、分岐後の体積分率は分岐前に比べて低下することなく、Priesの経験式をよく再現していることが分かる。

次に、単一モデルにおける赤血球、および人工酸素運搬体の分配特性を調べた。図5(c)は、娘チャンネル2への流量分配比 (Q_2/Q_p) と赤血球分配比 (N_2/N_p) の関係を示している。ここで、実線はPriesの経験式を示している。図より、実験結果は、Priesの経験式と同様に、赤血球分配の大きな偏りを示していることが分かる。図5(d)は、娘チャンネル2への流量分配比 (Q_2/Q_p) と人工酸素運搬体の分配比 (N_2^H/N_p^H) の関係を示している。図より、 N_2^H/N_p^H は Q_2/Q_p よりもわずかに大きな値を示していた。これは、人工酸素運搬体投与により、単一モデルにおいて分岐後の酸素不均一性が軽減していることを意味している。

ネットワークモデルについても、単一モデルと同様に赤血球サスペンションを流すことで分岐後のランク A, B, C, D の各チャンネルにおけるヘマトクリットや分配特性について調査を行った。図6(a)は、各ランクのチャンネルにおける赤血球のヘマトクリットの比較を示す。ランク B, C, D の各ヘマトクリットはチャンネル A1 のヘマトクリット値で無次元化されている。チャンネル A1 は分岐 bif 2 にてチャンネル B1 と B2 に分岐するが、チャンネル B1 と B2 のチャンネル幅と長さは同じであるにもかかわらず、チャンネル B1 よりも B2 のヘマトクリットが高くなっている。これはチャンネル A1 内の赤血球分布の偏りに起因する。チャンネル P (親チャンネル) での赤血球分布は中心軸に対して対称であるが、bif 1 にて分岐後、赤血球分布はチャンネル内側に偏った分布になる。その後、赤血球の軸集中による中心への移動が十分でないまま分岐 bif 2 に到達し、結果としてチャンネル B1 と B2 ではヘマトクリットに違いが生じたと考えられる。つまり、分

岐同士の距離が分配特性に大きく影響を与えていることを示唆している。この傾向はランク B → C, ランク C → D と分岐を繰り返す毎に増大していく。最終的には、チャンネル D1 と D6 のヘマトクリットの差は15倍以上に広がった。図6(b)は、各ランクのチャンネルにおける人工酸素運搬体の体積分率の比較を示す。図6(a)のヘマトクリットの大きな変動に対して、人工酸素運搬体はチャンネル内での分布の偏りがほとんど生じないため大きな変動は見られないことが分かる。

次に、ネットワークモデルにおける赤血球、および人工酸素運搬体の分配特性を調べた。図6(c)は、ランク A, B, C, D の各チャンネルにおける赤血球分配比の比較を示しており、これらはすべてチャンネル A1 に対する分配比となっている。ヘマトクリットの場合と同様に、チャンネル A1 内の赤血球分布の偏りが、分岐 bif 2 後でのチャンネル B1 と B2 の非等分配につながっている。分岐が繰り返されるたびにこの現象が起こるため、結果としてランク D ではチャンネル D1 と D6 の赤血球分配比は約10倍の差となり、著しい不均一分布となっている。加えて、ヘマトクリットの低下は、チャンネル内における赤血球間の相互作用の低下ももたらすため、分岐部での赤血球分配の偏りを促進させる。図6(d)は、各ランクのチャンネルにおける人工酸素運搬体の分配比の比較を示す。図6(d)の赤血球で観察された分配比の大きな偏りに対して、人工酸素運搬体はランク毎に分配特性に偏りがあまり生じていないことが分かる。このことは、人工酸素運搬体の灌流が毛細血管ネットワーク内の酸素不均一性を低減させる効果を持つことを示唆している。

ここで、Priesの経験式をネットワークモデルに適用した場合を考えてみる。各ランクの流路幅と長さは等しいため、赤血球は各分岐点で等分配されることになる。したがって、経験式に基づけば、各ランクのヘマトクリット値や分配比は等しくな

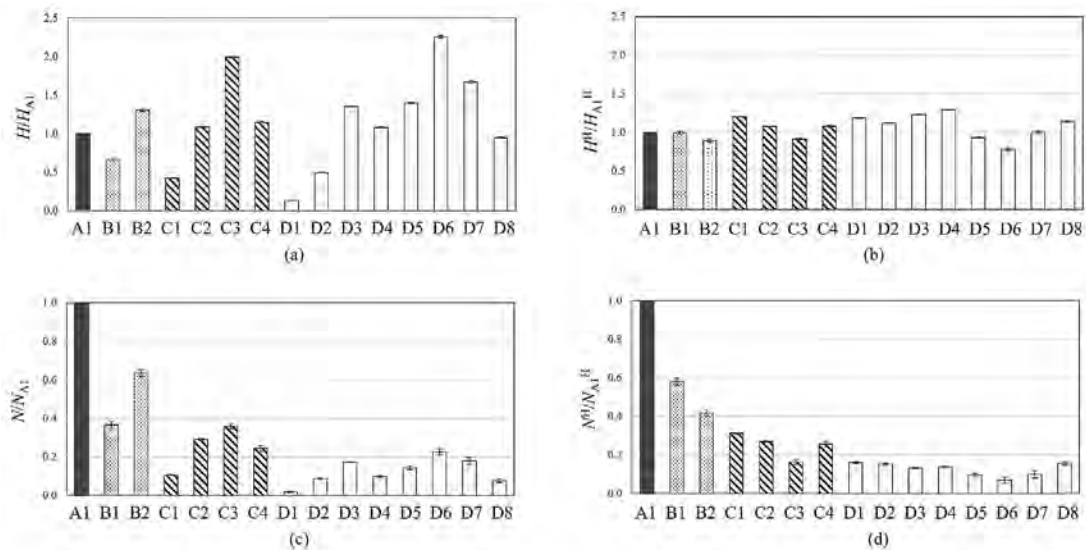


図6 ネットワークモデルの In vitro 実験結果 (a) 各ランクのチャンネルにおける赤血球のヘマトクリットの比較。ここで、ランク B, C, D の各ヘマトクリットはチャンネル A1 のヘマトクリット値で無次元化されている。(b) 各ランクのチャンネルにおける人工酸素運搬体の体積分率の比較。(c) 各ランクのチャンネルにおける赤血球分配比の比較。(d) 各ランクのチャンネルにおける人工酸素運搬体の分配比の比較。

るはずである。しかしながら、今回の *in vitro* 実験では、分岐点手前の赤血球分布の偏りにより、赤血球分配が均等ではなく、ヘマトクリットや分配比が同じランク間で大きく変化することが示された。Pries の経験式は血管径 $8\sim 65\mu\text{m}$ の幅広い範囲での *in vivo* 実験結果から導き出されており、分配特性をある程度予測することは可能である。一方で、毛細血管ネットワークのような血管径が赤血球と同程度のオーダーに限定して分配特性を考えると、経験的モデルでは不十分で、このような毛細血管網では経験的モデルによる予測以上に酸素不均一性が生じている可能性があることを示唆している。

4 流体シミュレーションによる分配特性の評価

より詳細に微小血管分岐部における赤血球や人工酸素運搬体の分配特性を調査する方法として、流体シミュレーションがある^{29), 30)}。微小血管内を赤血球が変形しながら流れる系を対象とした流体シミュレーション手法にはいくつかあるが、ここでは著者が採用している格子ボルツマン法 (Lattice Boltzmann method, 以下 LBM)³¹⁾ をベースにした手法について解説を行う。図7に概要を示す。LBM とは、連続体である流体を各格子点上にある仮想的な粒子の集合体と仮定し、この仮想粒子の速度分布関数を用いて衝突と並進の計算を繰り返すことにより、流体の巨視的変数を求める手法である。LBM の特徴として、1) アルゴリズムが簡単であるため並列計算に適している、2) 複雑な形状に対して境界条件の設定が容易である、3) 質量および運動量の保存性に優れているなどがあり、特に液滴や気泡などを含む

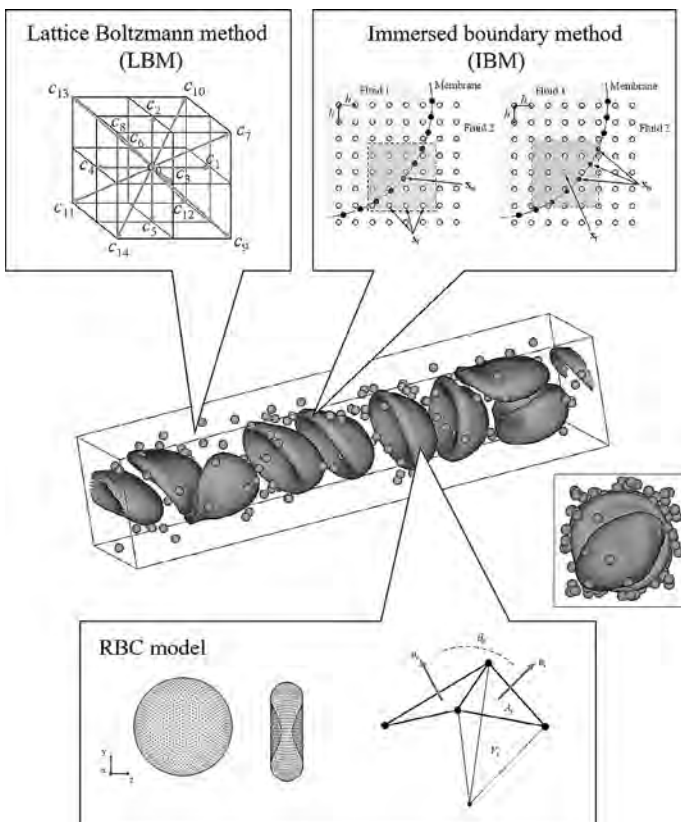


図7 流体シミュレーションの概要。

混相流の解析に適した手法とされている。したがって、本研究の対象となっている変形する赤血球を含む流体解析に対して有効であると考えられる。赤血球に関しては、応力のない赤血球の形状として Evans と Fung³²⁾ によって提案された両凹形状を採用した。赤血球膜は三角形要素の集合として離散化され、赤血球が変形するときの膜エネルギーであるひずみエネルギー、曲げエネルギー、そして、膜面積と体積の非圧縮性によるエネルギーを考慮して赤血球膜の各節点にかかる力を算出した³³⁾。赤血球膜に関するパラメータは文献 (34) に従った。赤血球膜と流体は互いに干渉をしながら血管内を流れていく。このような赤血球膜と流体との連成問題に対して、本研究では埋め込み境界法 (Immersed boundary method: IBM)³⁵⁾ を適用した。なお、赤血球内部の粘性は血漿の5倍と仮定した。人工酸素運搬体については、赤血球に比べて非常に小さいために赤血球と同等の取り扱いが困難である。本解析は One way coupling を採用し、人工酸素運搬体は流体に追従して移動するものとした。

ここでは、*in vitro* 実験で用いた単一モデル形状を対象とした解析結果を示す。まず始めに、親チャンネル内の解析を行うことにより、分岐部内に入流してくる各血球のチャンネル断面分布を調べた。解析の結果、赤血球は軸集中するため、チャンネル壁面付近に血漿層の形成が見られた。一方、人工酸素運搬体の多くが血漿層に分布していた。次に、娘チャンネル2の幅 W_2 を $3\sim 10\mu\text{m}$ と変化させて赤血球および人工酸素運搬体の分配特性を調査した。図8に $W_2 = 7.5$, および $5.0\mu\text{m}$ における流れの様子を示す。図より、娘チャンネル2の幅が狭くなるにつれて、分配される赤血球の数が大きく減少していることが分かる。これに対して、人工酸素運搬体は、親チャンネル内にて壁面付近の血漿層に多く分布していることから、分岐後も娘管に偏りなく分配されている。図9(a) (b) にそれぞれ、親チャンネルと娘チャンネル1におけ

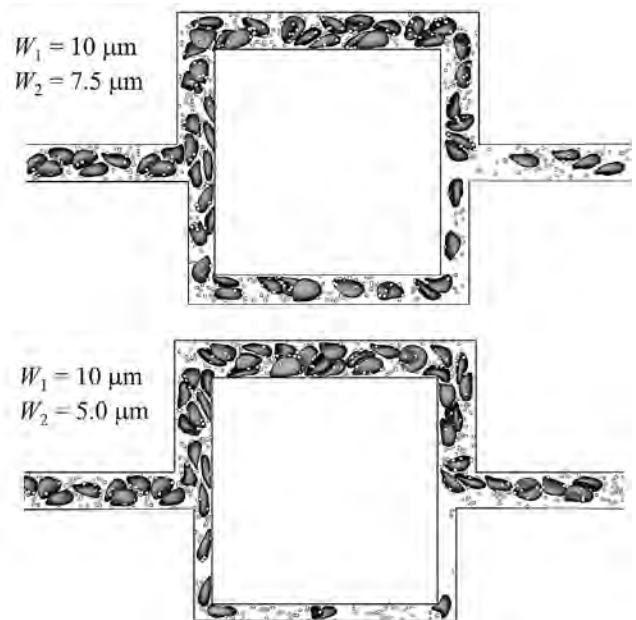


図8 単一分岐モデルにおける流体シミュレーションでの赤血球および人工酸素運搬体の流れの様子。

るチャンネル断面の赤血球分布を示す。ここで、娘チャンネル幅は $W_1 = W_2 = 10 \mu\text{m}$ である。また、娘チャンネル1の断面位置は分岐点から $100 \mu\text{m}$ であり、左が娘チャンネルの内側である。図より、親チャンネルでは軸集中を起こしているが、娘チャンネルでは赤血球分布は内側に偏っており軸集中が十分回復していないことが分かる。これは、ネットワークモデルを用いたIn vitro実験で示さ

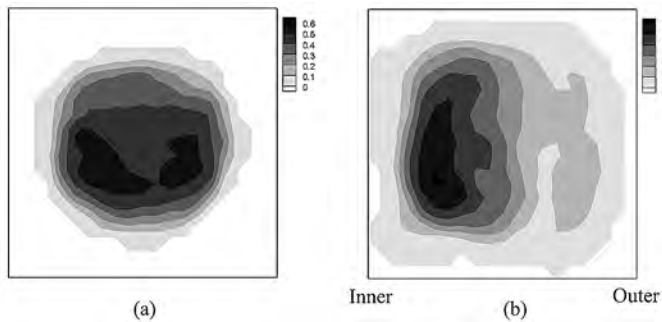


図9 (a) 親チャンネルにおけるチャンネル断面の赤血球分布.
(b) 娘チャンネル1におけるチャンネル断面の赤血球分布.

れたように、分岐間距離が短い場合、分岐前の赤血球の偏りが次の分岐における分配特性に大きな影響を与えることを意味している。次に赤血球と人工酸素運搬体の分配特性を定量化するため、in vitro実験の場合と同様に、親チャンネルに対する各娘チャンネルのヘマトクリット比や分配比を求めた。図10(a)(b)は、それぞれ各流量比に対する赤血球のヘマトクリット比、および人工酸素運搬体の体積分率を示す。図よりin vitro実験で見られた赤血球のZweifach-Fung効果の再現、および、流量比にかかわらず安定した人工酸素運搬体の体積分率の結果を得ることができた。図10(c)(d)は、それぞれ各流量比に対する赤血球、および人工酸素運搬体の分配比を示す。図より、Priesの経験式、およびin vitro実験結果と同様に、酸素不均一性の原因となる分岐部での赤血球の偏り、および、人工酸素運搬体投与による酸素不均一性軽減を示す結果を得ることができた。このように、in vitro実験と同形状を用いた解析を通して、毛細血管ネットワークにおける赤血球、および人工酸素運搬体の分配特性に対する流体シミュレーションの有効性を示すことができた。

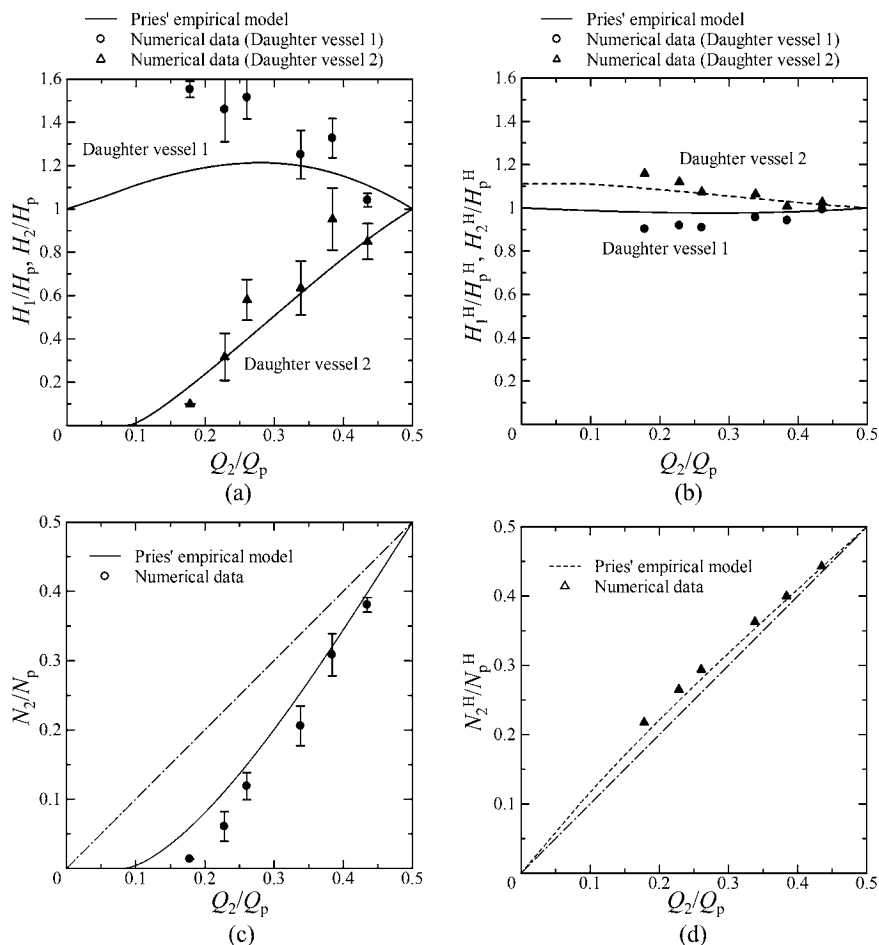


図10 流体シミュレーションの結果 (a) 流量分配比に対する娘チャンネル1, 2の赤血球のヘマトクリット. ここで、横軸は娘チャンネル2の流量分配比、縦軸は娘チャンネル1, 2の無次元ヘマトクリット(親チャンネルのヘマトクリットに対する娘チャンネルのヘマトクリット)を示している。(b) 流量分配比に対する娘チャンネル1, 2の人工酸素運搬体の体積分率。(c) 娘チャンネル2への流量分配比 Q_2/Q_p と赤血球分配比 N_2/N_p の関係。(d) 娘チャンネル2への流量分配比 Q_2/Q_p と人工酸素運搬体の分配比 N_2^H/Λ_p^H の関係.

6. 結言

本研究では、Priesの経験式、In vitro実験、および流体シミュレーションを用いて、毛細血管ネットワークを対象とした赤血球、および人工酸素運搬体の分配特性を調査した。まず、Priesの経験式をもとに、簡易的に分岐部における赤血球および人工酸素運搬体の分配特性を示した。次に、実際の赤血球サスペンションを用いてマイクロ流体デバイスによるin vitro実験を実施した結果、分岐を繰り返すことにより、経験的モデルよりも赤血球の不均一性が増大した。これは分岐間距離に起因する分岐直前の赤血球分布の偏りが原因であると考えられる。したがって、経験式モデルのみでは、毛細血管ネットワーク全体における赤血球分布の不均一性、および人工酸素運搬体による酸素不均一性軽減効果を過小評価する可能性がある。流体シミュレーションを実施した結果、分配特性に関してin vitro実験結果をうまく再現した。また、壁面付近の血漿層に人工酸素運搬体が多く分布していることが、分岐後の酸素不均一性の軽減をもたらすことを示した。今後、人工酸素運搬体が様々な分野への適用が広がることが期待される中、本研究の知見がこのような人工酸素運搬体の実用化に向けて一助になれば幸いである。

謝辞

実験で使用した血液は日本赤十字社から提供された。また、マイクロ流体デバイス作製の一部は、神奈川県産業技術総合研究所 (KISTEC) の実験装置を用いて行った。ここに感謝の意を表す。

参考文献

1. Pries AR, Ley K, Claassen M, Gaehtgens P. Red cell distribution at microvascular bifurcation. *Microvasc Res* 1989; 38; 1: 81-101.
2. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P, Gross JF. Blood flow in microvascular networks: experiments and simulation. *Circ Res* 1990; 67; 4: 826-834.
3. Pries AR, Reglin B, Secomb TW. Structural response of microcirculatory networks to changes in demand: information transfer by shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284; H2204-H2212.
4. Shen Z, Coupier G, Kaoui B, Polack B, Harting J, Misbah C, Podgorski T. Inversion of hematocrit partition at microfluidic bifurcations. *Microvasc Res* 2016; 105; 40-46.
5. Hyakutake T, Abe H, Miyoshi Y, Yasui M, Suzuki R, Tsurumaki S. In vitro study on the partitioning of red blood cells using the microchannel network. *Microvasc Res* 2022; 140; 104281.
6. Fung YC. Stochastic flow in capillary blood vessels. *Microvasc Res* 1973; 5; 34-48.
7. Doyeux V, Podgorski T, Peponas S, Ismail M, Coupier G.

- Spheres in the vicinity of a bifurcation: elucidating the Zweifach-Fung effect. *J Fluid Mech* 2011; 674; 359-388.
8. Østergaard L, Kristiansen SB, Angleys H, Frøkiær J, Hasenkam JM, Jespersen SN, Bøtker HE. The role of capillary transit time heterogeneity in myocardial oxygenation and ischemic heart disease. *Basic Res Cardiol* 2014; 109; 3: 409.
 9. Bernabeu MO, Köry J, Grogan JA, Markelc B, Beardo A, d'Ávezac M, Enjalbert R, Kaeppler J, Daly N, Hetherington J, Krüger T, Maini PK, J. Pitt-Francis M, Muschel RJ, Alarcón T, Byrne HM. Abnormal morphology biases hematocrit distribution in tumor vasculature and contributes to heterogeneity in tissue oxygenation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019; 27811-27819.
 10. Cruz-Hernández JC, Bracko O, Kersbergen CJ, Muse V, Haft-Javaherian M, Berg M, Park L, Vinarsik LK, Ivasyk I, Kang Y, Cortes-Canteli M, Peyrounette M, Doyeux V, Smith A, Zhou J, Otte G, Beverly JD, Davenport E, Davit Y, Strickland S, Iadecola C, Lorthois S, Nishimura N, Schaffer CB. Neutrophil adhesion in brain capillaries reduces cortical blood flow and impairs memory function in Alzheimer's disease mouse models. *Nature Neuroscience* 2019; 413-420.
 11. Goirand F, Le Borgne T, Lorthois S. Network-driven anomalous transport is a fundamental component of brain microvascular dysfunction. *Nat Commun* 2021; 12; 7295.
 12. Squires JE. Artificial blood. *Science* 2002; 295; 1002-1005.
 13. Chang TM. Hemoglobin-based Red blood cell substitutes. *Artif Organs* 2004; 28; 789-794.
 14. Winslow RM. Red cell substitutes. *Semin. Hematol* 2007; 44; 51-59.
 15. Meng F, Tsai AG, Intaglietta M, Acharya SA. PEGylation of *aa*-Hb using succinimidyl propionic acid PEG 5K. Conjugation chemistry and PEG shell structure dictate respectively the oxygen affinity and resuscitation fluid like properties of PEG *aa*-Hbs. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2015; 43; 270-281.
 16. Sakai H, Sou K, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Haemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers: present situation and future visions. *J Intern Med* 2008; 263; 4-15.
 17. Sakai H, Sou K, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E. Review of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers. *Artif Organs* 2009; 33; 139-145.
 18. Tomita D, Kimura T, Hosaka H, Daijima Y, Haruki R, Ludwig K, Bottcher C, Komatsu T. Covalent Core-Shell Architecture of Hemoglobin and Human Serum Albumin as an Artificial O₂ Carrier. *Biomacromolecules* 2013; 14; 1816-1825.
 19. Fu X, Ohta S, Kawakatsu T, Kamihira M, Sakai Y, Ito T. Bioinspired perfluorocarbon-based oxygen carriers with concave shape and deformable shell. *Adv Mater Technol* 2021; 2100573.

20. Oda T, Nakajima Y, Kimura T, Ogata Y, Fujise Y. Hemodilution with liposome-encapsulated low-oxygen-affinity hemoglobin does not attenuate hypothermic cerebral ischemia in rats. *J Artif Organs* 2004; 7; 101-106.
21. Matsumoto T, Asano T, Mano K, Tachibana H, Todoh M, Tanaka M, Kajiya F. Regional myocardial perfusion under exchange transfusion with liposomal hemoglobin: in vivo and in vitro studies using rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288; H1909-H1914.
22. George I, Yi G-H, Schulman AR, Morrow BT, Cheng Y, Gu A, Zhang G, Oz MC, Burkhoff D, Wang J. A polymerized bovine hemoglobin oxygen carrier preserves regional myocardial function and reduces infarct size after acute myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291; H1126-H1137.
23. Kawaguchi AT, Fukumoto D, Haida M, Ogata Y, Yamano M, Tsukada H. Liposome-encapsulated hemoglobin reduces the size of cerebral infarction in the rat. *Stroke* 2007; 38; 1626-1632.
24. Isaka M, Imamura M, Sakuma I, Shiiya N, Ishizuka T, Ogata Y, Yasuda K. Experimental study of pegylated liposomal hemoglobin on norepinephrine release and reperfusion arrhythmias in isolated guinea pig hearts. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 13; 391-395.
25. Plock JA, Rafatmehr N, Sinovic D, Schnider J, Sakai H, Tsuchida E, Banic A, Erni D. Hemoglobin vesicles improve wound healing and tissue survival in critically ischemic skin in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297; 3: H905-H910.
26. 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.
27. 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.
28. Duffy DC, McDonald JC, Schueller OJ, Whitesides GM. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly (dimethylsiloxane). *Anal Chem* 1998; 70; 4974-4984.
29. Hyakutake T, Nagai S. Numerical simulation of red blood cell distributions in three-dimensional microvascular bifurcations. *Microvasc Res* 2015; 97; 115-123.
30. Hyakutake T, Tominaga S, Matsumoto T, Yanase S. Numerical study on flows of red blood cells with liposome-encapsulated hemoglobin at microvascular bifurcation. *J Biomech Eng-T ASME* 2008; 130; 1: 011014.
31. Succi S. *The lattice Boltzmann equation: for fluid dynamics and beyond.* Oxford. 2001.
32. Evans EA, Fung YC. Improved measurements of the erythrocyte geometry. *Microvasc Res* 1972; 4; 4: 335-347.
33. Krüger T. *Computer simulation study of collective phenomena in dense suspensions of red blood cells under shear.* Springer. 2012.
34. Oulaid O, Saad AKW, Aires PS, Zhang J. Effects of shear rate and suspending viscosity on deformation and frequency of red blood cells tank-treading in shear flows. *Comput Method Biomec* 2016; 19; 6: 648-662.
35. Peskin CS. *Numerical analysis of blood flow in the heart.* *J Comput Phy* 1977; 25; 3: 220-252.

日本血液代替物学会 総会

- | | |
|---|---|
| <p>1. 日 時：
令和4年（2022年）12月5日（月）12：30～12：40</p> <p>2. 場 所：
中央大学理工学部</p> | <p>3. 議 題：
① 第29回年次大会の報告
② 会員動向
③ 令和3年度事業報告
④ 令和3年度会計報告
⑤ 令和4年度事業計画（経過報告）</p> |
|---|---|

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29回日本血液代替物学会年次大会
(大会長 小松晃之)
- 2) 開催年月日 令和4年12月5日（月）～6日（火）
- 3) 開催場所 中央大学理工学部
- 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、製薬企業等

② 会員状況は以下の通り

- 1) 施設会員：2社
- 2) 正会員：74名
- 3) 購読会員：2箇所

③ 令和3年度事業報告（令和3年4月1日～令和4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
令和3年10月14日（木）WEB開催
- 2) 第28回年次大会の開催（大会長：田口 和明）
令和3年10月14日（木）～15日（金）WEB開催
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第29巻1号

④ 令和3年度収支決算報告が行なわれ承認された。

令和3年度 会計報告 収支決算表
(自 令和3年4月1日 至 令和4年3月31日)
(単位:円)

収 入		支 出	
摘 要	金 額	摘 要	金 額
前期繰越金	5,168,972	会誌出版費	514,850
正会員会費	430,000	集会・委員会費	0
施設会員会費	200,000	年会補助金	800,000
購読会員会費	6,000	ホームページ維持費	330,000
学生会員会費	0	謝金	72,000
雑収入	1,320	事務費(消耗費)	41,671
年次大会費補助金 残金と次回繰越金	806,571	雑役務費	6,050
利息	152	次期繰越金	4,848,444
計	6,613,015	計	6,613,015

⑤ 令和4年度事業計画（経過報告）（令和4年4月1日～令和5年3月31日）

- 1) 定期総会の開催
令和4年12月5日（月）12：30～12：40
於 中央大学理工学部
- 2) 第29回年次大会の開催（大会長：小松 晃之）
令和4年12月5日（月）～6日（火）
於 中央大学理工学部
- 3) 会誌「人工血液」の発行：第30巻1号

事務局からのお知らせ

一般社団法人「血液を大切にする会」からの寄付について

「血液を大切にする会」(代表理事：小林紘一)の閉会にあたり、残余財産80万円を日本血液代替物学会に寄付したいとの申し入れが2023年5月17日に行われました。そして、この申し入れをありがたく受け入れることに致しました。小林紘一先生からは、「血液を大切にする」思いを、日本血液代替物学会の会員に受け継いでいただきたい、とのメッセージを頂いております。この思いは、廃棄血を有効利用することを目的とする、当学会設立当初からの目指すところにも関係しており、会員の皆様とともに、実用化を目指し研究開発を進めてゆきたいと思っております。

第19回 血液代替物国際会議 (International Symposium on Blood Substitutes, ISBS) の開催について

会期：2024年11月14-18日

会場：Gaylord National Resort, National Harbor, MD, USA

大会長：Jonathan Jahr (UCLA)

Allan Doctor (Univ. Maryland)

URL：<https://isbs2024.org/agenda/>

2019年に奈良にて、The 17th ISBSが開催されました。2年後の2021年にドイツでの開催が予定されていた、The 18th ISBS (大会長：Dr. Baumler) は、COVID-19の影響で開催できず、Dr. Bülow (Lund Univ.) によって2022年に延期して開催されることが検討されました。しかしCOVID-19の影響が長引き、開催が中止されました。そしてこの度、米国でのThe 19th ISBSの開催について、大会長より案内がありましたのでお知らせ致します。

日本血液代替物学会 会則

第1章 総則

第1条：(名称) 本会は日本血液代替物学会 (The Society of Blood Substitutes, Japan) と称する。

第2条：(事務局) 本会の事務局は当分の間、会長の所属機関内に置く。

2. 事務局は会長の統括のもと本会の事業および会計に関する一般事務を司る。

第3条：(目的) 本会は、血液代替物およびその関連分野の研究の進歩ならびに普及を計るものである。会員の研究発表、知識の交換、連絡提携の場となり、血液代替物の評価や今後の適正使用の指針を提言する活動を通して、学際、国際間に広く貢献することを目的とする。

第4条：(事業) 本会は前条の目的達成のため、次の事業を行う。

- 1) 総会、年次大会 (一般演題も含める)、研究講演会、シンポジウムなど。
- 2) 会誌“人工血液”の刊行。
- 3) その他本会の目的に沿った事業。

第2章 会員

第5条：(種別) 本会員は次の分類とする。

- 1) 正会員 本会の目的に賛同する個人で所定の手続きを行い、会費を納入した者とする。
- 2) 購読会員 本会の会誌を購読する団体または個人とする。
- 3) 学生会員 本会の目的に賛同する学生で所定の手続きを行い、会費を納入した者とする。
- 4) 施設会員 本会の目的に賛同する施設とする。

第6条：(会費) 会員は、つぎの種別に従って会費を納めなければならない。

- 1) 年会費 (年額)
 - 1) 正会員 1万円
 - 2) 購読会員 3千円
 - 3) 学生会員 3千円
 - 4) 施設会員 1口以上 (1口5万円)
- 2) 既納の会費はいかなる理由があっても、これを返還しない。

第7条：(入会) 本会に入会希望者は、所定の入会申込書を事務局宛に提出し、入会審査を経なければならない。

第8条：(退会) 退会しようとする会員は、理由とその旨を届出て、理事会の承認を経なければならない。

第9条：(未納者) 年会費未納の会員には、年度末に催促する。2年間未納の場合には会誌の送付を停止する。入金確認後会誌の送付を再開する。

第10条：(除名) 本会の目的に反する行為あるいは本会の名誉を損なう行為のあった会員は、評議員会の議決によってこれを除名することができる。

第3章 役員、顧問、評議員および職員

第11条：(設置および定数) 本会に次の役員を置く。

- 1) 会長 1名
- 2) 副会長 1名以上5名以内
- 3) 理事 5名以上15名以内 (会長、副会長を含む)
- 4) 監事 2名
- 5) 顧問 若干名

第12条：(役員を選任) 役員は、正会員の内から評議員会で選出し、監事は正会員の中から総会で選出する。

2. 顧問は、会長が委嘱し、その任期は役員に準ずる。

第13条：(任期) 役員および監事の任期は2年とし、再任を妨げない。

第14条：(会長) 会長は、各事業を司り本会を代表統括する。

第15条：(副会長) 会長を補佐し会長に事故があるときはその代理となる。

第16条：(理事) 理事は理事会を組織して、この会則に定められた事項のほか、評議員会および総会の権限に属する事項以外の事項を評議し、施行する。

第17条：(監事) 監事は、資産の状況および理事の会務執行状況を監査する。

第18条：(顧問) 顧問は、理事会および評議員会に出席して、意見を述べることができる。

第19条：(評議員) 評議員は正会員、施設会員の中から総会で選出し、任期は2年とする。ただし再任を妨げない。

2. 評議員は、評議員会を組織し、この会則に定められた事項を決議するほか、会長を補佐して本会の運営を助ける。

第20条：(事務局および職員) 本会の事務を処理するため、事務局および職員を置く。

2. 職員人事は会長が任命権者となり、有給とする。

第4章・年次大会長

第21条：(大会長と職務) 本会に年次大会を主宰する大会長1名をおく。また、大会長を補佐し、大会長に事故があったとき、または欠けたときには、その職務を代行する副大会長1名をおくことができる。

第22条：(選任) 大会長および副大会長は、評議員の中から、理事会の議決によって選任される。

2. 理事会の議決によって、副大会長を次年度の大会長とすることができる。

第23条：(任期) 大会長および副大会長の任期は、選任された日に始まり、学会年次大会が終了した日に終わる。

第5章 会議

第24条：(会議) 本会の会議は、つぎの3種とする。

- 1) 理事会
- 2) 総会
- 3) 評議員会

第25条：(理事会) 理事会は、理事をもって構成する。

2. 理事会は年2回以上会長が召集する。ただし、会長が必要と認めるとき、または、理事の3分の1が会議の目的および事項を示して請求したときは、臨時理事会を召集することができる。
3. 理事会の議長は会長とする。
4. 理事会は、理事会構成現在数の3分の2以上が出席しなければ、議事を開き、議決することができない。ただし、当該議事について文書によってあらかじめ意志を表示した者は、これを出席者とみなす。持ち回りで理事会を開催する場合には、理事会構成現在数の3分の2以上の意思表示により成立する。
5. 監事は、理事会に出席して、本会の運営について意見を述べることができる。

第26条：(総会) 総会は、通常総会、臨時総会の2種とし、会長が召集する。

2. 総会は、正会員をもって構成する。
3. 通常総会は、年一回開く。
4. 臨時総会は、次の場合に召集する。
 - 1) 理事会で必要と認められた場合
 - 2) 監事、または会員50名以上から会議の目的を示して請求があった場合

第27条：(総会議長) 通常総会の議長は会長とし、臨時総会の議長は、会議の都度会員の互選で定める。

第28条：(総会の通知) 総会の召集は、その開会期日1週間前までに、総会に付すべき事項、日時および場所を記録した書面

または会誌で、会員に通知しなければならない。

2. 出席会員の3分の2以上の同意があったときは、あらかじめ通知しなかった事項について審議し、議決することができる。

第29条：(審議事項) 次の事項は、通常総会の承認を求めなければならない。

- 1) 事業報告および会員の異動状況書
- 2) 収支決算、財産目録、貸借対照表
- 3) 事業計画および収支予算
- 4) 前記各項のほか、理事会で必要と認めた事項

第30条：(総会の定足数) 総会は、正会員現在数の5分の1以上出席しなければ、議事を開き、議決することができない。ただし、当該議事について、あらかじめ書面をもって意志を表示したものは出席者と見なす。

2. 総会に出席できない正会員は、出席正会員を代理人として、その権限を委任することができる。
3. 総会の議決は、出席会員の過半数をもって決し、可否同数のときは議長の決するところによる。

第31条：(総会議事録の通知) 総会の議事の要領および議決した事項は、会誌および学会ホームページに掲載する。

第32条：(評議員会) 評議員会は、評議員で組織し、必要がある場合に会長が召集する。

2. 会長は評議員会の議長となる。

第33条：(審議事項) 評議員会は、この会則に定めるもののほか、理事会で必要と認めた事項を審議する。

第34条：(評議員会の定足数) 評議員会は、評議員現在数の2分の1以上の出席がなければ、議事を開き、議決することができない。ただし、当該議事について、あらかじめ書面をもって意志を表示したものは出席者と見なす。

2. 評議員会の議事は、出席評議員の過半数をもって決し、可否同数のときは、議長の決するところによる。評議員会に出席できない評議員は、出席評議員を代理人として、その権限を委任することができる。
3. 会長は、書面で評議員の意見を求め、評議員会の召集および前項の議決にかえることができる。

第35条：(議事録の保存) 全ての会議には議事録を作成し、これを事務局に保存する。

第6章 資産及び会計

第36条：(資産) 本会の資産は次の通りとする。

- 1) 会費
- 2) 寄付金

- 3) 事業にともなう収入
- 4) 資産から生じる果実
- 5) その他の収入

第37条：(資産の管理) 本会の資産は、会長が管理し、現金は理事会の議決によって、確実な有価証券を購入するか、または定期郵便貯金とするか、もしくは確実な信託銀行に信託するか、あるいは定期預金として会長が保管する。

第38条：(寄付の受領) 寄付金品は、理事会の議決を経てこれを受領する。

第39条：(経費) 本会の経費は、会費、刊行物に対する購読料、寄付金、資産から生じる果実などの運用資産をもって支弁する。

第40条：(事業計画および収支予算) 本会の事業計画およびこれにともなう収支予算は、毎年会計年度開始前に会長が編成し、理事会、評議員会の議決を経て、総会の承認を受けなければならない。

第41条：(収支決算) 会計報告は会長が毎年一回、会計報告書を作成し、監事の監査を経て、評議員会および総会の承認を得る。

第42条：(会計年度) 本会の会計年度は4月1日より翌年3月31日までとする。

第7章 会則の変更ならびに解散

第43条：(会則の変更) 本会の会則の変更には理事会の発議と総会の議決を要する。

第44条：(解散) 本会の解散は、理事会、評議員会および総会の各々において出席会員の4分の3以上の同意を得なければならない。

第45条：本会の解散にともなう残余財産は、理事会、評議員会および総会の各々において出席会員の4分の3以上の議決を経て、本会の目的と同種または類似の公益事業に寄付するものとする。

第8章 補則

第46条：この会則を施行するために必要とされる細則は、理事会および評議員会の議決を経て、別に定める。

第47条：(専門委員会の設置と委員の選任) 学会運営に伴う専門委員会の設置ならびに委員の選任は理事会の承認を経て行うことができる。

委員には会員の他に非会員の学識経験者もなることができる。

付則 この会則は、平成5年7月21日設立総会において議決され、当日から施行する。

平成16年10月15日改定

平成26年12月8日改定

令和5年度 日本血液代替物学会役員名簿

顧問	小林 紘一	慶應義塾大学 名誉教授
会長	酒井 宏水	奈良県立医科大学医学部 教授
副会長	堀之内 宏久	さいたま市立病院 病院長
理事	池田 康夫	根津育英会武蔵学園 学園長
	河野 光智	埼玉医科大学医学部 教授
	小松 晃之	中央大学理工学部 教授
	田口 和明	慶應義塾大学薬学部 准教授
	武岡 真司	早稲田大学理工学術院 教授
	丸山 徹	熊本大学薬学部 教授
監事	東 寛	旭川医科大学 名誉教授
	小田切 優樹	崇城大学薬学部 特任教授

歴代会長：

土田 英俊（早稲田大学 名誉教授）	1993年7月～1999年3月
小林 紘一（慶應義塾大学 名誉教授）	1999年4月～2013年3月
武岡 真司（早稲田大学 教授）	2013年4月～2018年3月
酒井 宏水（奈良県立医科大学 教授）	2018年4月～

日本血液代替物学会 評議員名簿

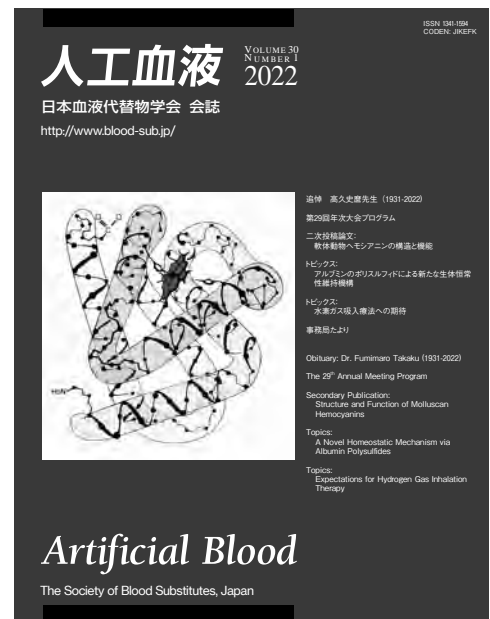
(五十音順)

東 寛	旭川医科大学 名誉教授	小林 紘一	慶應義塾大学 名誉教授
阿部喜代司	筑波大学 名誉教授	小松 晃之	中央大学理工学部 教授
池田 康夫	根津育英会武蔵学園 学園長	酒井 宏水	奈良県立医科大学医学部 教授
池淵 研二	埼玉医科大学 教授	高橋 英嗣	佐賀大学大学院 教授
石田 竜弘	徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授	田口 和明	慶應義塾大学薬学部 准教授
伊藤 大知	東京大学大学院工学系研究科 教授	武岡 真司	早稲田大学理工学術院 教授
伊藤 俊之	京都府赤十字血液センター	照井 克生	埼玉医科大学医学部 教授
大柳 治正	近大姫路大学 副学長	長澤 俊郎	筑波記念病院 院長
奥 直人	帝京大学薬学部 教授	西出 宏之	早稲田大学 名誉教授
小田切優樹	崇城大学薬学部 特任教授	萩沢 康介	防衛医科大学校 准教授
北岸 宏亮	同志社大学理工学部 教授	福島 昭二	神戸学院大学薬学部薬学科 教授
木下 学	防衛医科大学校 教授	堀之内宏久	さいたま市立病院 病院長
河野 光智	埼玉医科大学医学部 教授	丸山 徹	熊本大学薬学部 教授

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、原稿の修正を求められる場合がある。修正論文（Revised Manuscript）の投稿に際しては、送付状に「査読意見に対する回答」を添え、意見に対して一つ一つ回答をするとともに、修正箇所がある場合にはこれを明記する。

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

4) 原稿はA4版の大きさとし、第1頁には表題、英文表題、著

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

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

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

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

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

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

9) 句読点はコンマ（,）ピリオド（.）とする。

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

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

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

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

(例)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

18) 原稿の送付先

〒634-8521

奈良県橿原市四条町840

奈良県立医科大学化学教室内

「人工血液」編集委員長 酒井宏水 宛

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

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 酒井 宏水 殿

To: Dr. Hiromi Sakai

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.

令和 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

生命のリレー

善意の献血に支えられた、生命のお薬。

皆さまの温かい想いが込められた大切なバトンを、
必要とされる人たちへ、私たちがしっかりとつなぎます。



善意と医療のかけ橋

JB 一般社団法人
日本血液製剤機構

東京都港区芝浦3-1-1

<https://www.jbpo.or.jp>

アコマ麻酔システム

PROVIDEND



アコマ医科工業株式会社 <https://www.acoma.com/>

本社 〒113-0033 東京都文京区本郷 2-14-14
TEL : 03-3811-4151

営業所 札幌・東北・北関東・東関東・南関東・中京・
大阪・四国・広島・福岡・鹿児島

ACOMA



5-HT₃受容体拮抗型 制吐剤

薬価基準収載


オンダンセトロン注4mgシリンジ「マルイシ」

Ondansetron Injection 4mg syringe "Maruishi" オンダンセトロン塩酸塩水和物注射液

劇薬、処方箋医薬品（注意—医師等の処方箋により使用すること）

効能・効果、用法・用量、禁忌を含む使用上の注意等については、電子添文をご参照ください。

製造販売元（文献請求先及び問い合わせ先を含む）

 **丸石製薬株式会社**
大阪市鶴見区今津中2-4-2

【製品情報お問い合わせ先】

学術情報部 TEL : 0120-014-561

【販売情報提供活動に関するご意見】

kantokubumon@maruishi-pharm.co.jp

2022年2月作成

FUJIFILM

Value from Innovation

Always for all patients.

急性期医療から慢性期医療のシーンで活躍する
Point-of-care 超音波。
安全で快適な医療環境を提供するために
追求されたコンセプトデザイン超音波診断装置
Sonosite PX。



超音波画像診断装置

NEW

SONOSITE PX

販売名：Sonosite PX シリーズ 認証番号：302ADBZ100086000 一般名称：汎用超音波画像診断装置

大画面
15.6
インチ

5
YEAR

TECHNOLOGY DRIVEN
5-YEAR STANDARD WARRANTY
MADE IN THE USA

本体・プローブともに5年保証



ノイズをおさえ、コントラストを効果的に強調し高画質を実現

富士フィルムの画像処理技術「Clear Visualization」の搭載により、ノイズをおさえ、コントラストを効果的に強調し、組織の境界や小さな構造も明瞭に描出された画像を提供します。また、本製品に対応するプローブは、3種の構造層により体に厚みがある患者の体内深部も鮮明に観察することができる深さ方向の分解能の向上と高感度化を実現。診断・処置の効率を高めます。



様々な場面での使いやすさを追求したデザイン

操作パネルは高さや角度が自由に調整できるため、スペースが限られた手術室やベッドサイドでも、より自然な体勢での操作が可能。また、操作パネルは、凹凸や隙間をなくしたフラットなタッチパネルで、清掃がしやすい構造です。さらに、タッチパネルの操作部は、カバーの上から、手袋を装着したままでも操作が可能です。



日本語対応のラーニング機能

装置の使い方や麻酔科、整形、救急領域のスキャン方法を100本以上の3D動画で解説。動画を再生しながら、スキャンを行うことも可能です。



編集委員

●酒井 宏水(委員長), 東 寛, 武岡 真司, 堀之内 宏久, 杉山 直樹, 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.31(1) 2023年12月1日発行

〒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

〒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



オラネジン®

保険適用



外用殺菌消毒剤 (オラネキシジングルコン酸塩液)

オラネジン® 消毒液1.5%

Olanedine. Antiseptic Solution 1.5%

Olanedine. Solution 1.5% Antiseptic Applicator 10mL・25mL

オラネジン® 液1.5%消毒用アプリケーター10mL・25mL

オラネジン® 消毒液1.5% OR

Olanedine. Antiseptic Solution 1.5% OR

Olanedine. Solution 1.5% OR Antiseptic Applicator 10mL・25mL

オラネジン® 液1.5% OR消毒用アプリケーター10mL・25mL



効能又は効果、用法及び用量、禁忌を含む注意事項等情報等については、電子添文をご参照ください。



製造販売元
株式会社大塚製薬工場
徳島県鳴門市撫養町立岩字芥原115

販売提携
大塚製薬株式会社
東京都千代田区神田司町2-9

文献請求先及び問い合わせ先
株式会社大塚製薬工場 輸液DIセンター
〒101-0048 東京都千代田区神田司町2-2

〈'23.07作成〉

日本血液代替物学会
<http://www.blood-sub.jp/>