

別添 2

厚生労働科学研究費補助金

医薬安全総合研究事業

人工赤血球の安全性向上 に関する研究

(研究課題番号 : H15-医薬-016)

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小林 紘一

(慶應義塾大学 医学部 外科)

平成 16 (2004) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告書	1~ 4
小林絃一（慶應義塾大学医学部 教授）	
II. 分担研究報告書	
1. 小林絃一（慶應義塾大学医学部 教授）	5~ 9
2. 池田久實（北海道赤十字 血液センター 所長）	10~13
3. 小田切優樹（熊本大学 医学薬学研究部 教授）	14~20
4. 村田 満（慶應義塾大学医学部 講師）	21~23
5. 合田亘人（慶應義塾大学医学部 講師）	24~26
6. 高折益彦（東宝さとう病院 名誉院長）	27~28
7. 土田英俊（早稲田大学 名誉教授／理総研 顧問研究員）	29~36
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37~41
IV. 研究成果の刊行物・別冊	42~

人工赤血球の安全性向上 に関する研究

主任研究者 小林 紘一 慶應義塾大学医学部 外科 教授

研究要旨

本研究では、体内での呼吸活動に伴う酸素需要に相当する十分量の酸素運搬を有し、感染源や血液型が無く安定度の高い人工赤血球の安全性に関する評価法を検討するとともに、対象となる試料に適応して安全性の確認を行うことを目的としている。期限切れ赤血球から精製した高純度/高濃度ヘモグロビン(Hb)溶液をリン脂質二分子膜で被覆した Hb 小胞体(250 nm ϕ)は、厚生労働科学研究(1997-2003, 研究代表者: 土田英俊)として、主に物性規格の決定、製造方法の効率化、ラットを用いた効能と安全性に関する評価を中心に検討された。この研究を通して Hb 小胞体は、末梢組織への酸素運搬を満足する物性規格を持ち、室温にて2年間の保存が可能、修飾 Hb と比較して小胞体構造により安全度の極めて高い製剤として評価された。

本安全性評価に用いる Hb 小胞体は、期限切れ赤血球から精製された高純度/高濃度 Hb 溶液をリン脂質二分子膜で被覆した製剤で、純度、不純物の除去、大量供給の観点から 5L/バッチの製造設備を用いて安定製造が可能であることを実証した。そこで本製剤は他の薬剤とは異なり大量投与を伴うため、これを考慮した安全性評価プロトコルの作成が最優先課題とされた。

まず、安全性評価プロトコルの 1 項目として細菌の製品への混入について検索方法の確立がなされた。次に中動物を用いた安全性試験方法として、試料の安全性とともに有効性も証明しうる動物モデルを開発した。すなわちビーグル犬を用い、脾摘を行った後 50%の脱血によりショックを作成、1 時間経過した後蘇生液として Hb 小胞体分散液あるいは 5%アルブミン生食を投与するモデルが最適と考えられた。また、Hb 小胞体投与後の体内動態を明らかにし、血液内および臓器内のクリアランスを検討するため、マウスおよびラットにアイソトープ標識した Hb 小胞体を用いた。Hb 小胞体はオキシヘモグロビンと比較して半減期の延長と各臓器への取り込みの抑制が観察された。さらに、投与による血液中のサイトカイン産生への影響を検討し、Hb 小胞体投与そのものはサイトカイン産生を増強するものでないことが明らかとなり、エンドトキシン投与後の Hb 小胞体分散液の投与はエンドトキシンの単独投与に比してサイトカイン産生への影響が少ないことが明らかとなった。また、Hb 小胞体は血球や血液凝固線溶に与える影響は血液凝固検査および Georg's Thrombositest(GTT)で検討し、血小板機能への影響が無いことを確認した。

免疫系に対する影響についてはラットに Hb 小胞体分散液を静脈内投与して検討した。ConA 刺激に対する T リンパ球の幼弱化によって判定したところ、Hb 小胞体投与 6 時間後で低濃度 ConA 刺激に対する応答性が低下していたが、高濃度刺激での応答性は保たれていた。この変化は一過性であり、投与 3 日後には対照群と同じレベルに回復していた。

ラットに全血液量の 40%相当の脱血ショックを導入後、同量の Hb 小胞体分散液を投与することで認められる全身血圧、肝微小循環動態および胆汁排泄流量の経時的な変化を検討したところ、

Hb 小胞体投与による全身性ショックの改善効果は、Hb 小胞体をアルブミンに分散することでの適合性と有用性が更に上昇することが明らかとなった。

分担研究者

池田 久實	北海道赤十字血液センター	所長
小田切優樹	熊本大学薬学部	教授
村田 満	慶應義塾大学医学部	講師
合田 亘人	慶應義塾大学医学部	講師
高折 益彦	東宝塚さとう病院	名誉院長
土田 英俊	早稲田大学 理総研	顧問研究員

A. 研究目的

何時でも何処でも血液型に関係なく、必要量を安全に供給できる人工赤血球の完成は、次世代医療に不可欠の課題である。先の厚生省科学研究、厚生労働省科学研究を通して、ヘモグロビン(Hb)小胞体の物性を検討し、基本物性と製造方法を決定した。本研究では、この結果を踏まえ、高効率、大量で均質な製造方法を GLP(Good Laboratory Practice)レベルで確立し、出来上がった試料を用いて動物試験を行い輸血代替製剤としての安全性を検討することにある。

平成 15 年度の研究項目は、① Hb 小胞体の無菌的製造技術の確立と試料供給、② ラットを用いた Hb 小胞体投与後のサイトカイン放出過程の解析、③ Hb 小胞体の体内動態特性の解析、④ Hb 小胞体による 40%交換輸血後の細網内皮系(脾臓)の組織病理学的変化、⑤ 中型動物を用いた安全性試験を行うための実験モデルの策定、⑥ Hb 小胞体投与後の免疫系機能変動の解析、⑦ 肝臓機能および臓器血流に与える Hb 小胞体投与の影響の検討、Hb 小胞体投与による血球および凝固線溶機能に与える影響の予測、⑧ 内外研究者が人工血液の安全性の確保の上で必要と考えている事項についてのアンケート調査である。

B. 研究方法

Hb 小胞体はクリーンルーム内で調製し、得られ

た試料について界面活性剤可溶化による L P S 定量(リムルス試験)、無菌試験(BML 社提出)を実施した。

また、輸送と保存を行った試料の細菌混入の可能性について、試料を液体培地、寒天培地にて検討した。人工血液開発に関係する内外主要施設にアンケートを送り、人工血液の安全性に関する検討項目について調査を行なった。

Hb 小胞体をラットに投与し、投与前、投与後、1,3,6,12,24 時間後に採血を行い、血清中のサイトカインをビーズ固層サンドイッチ ELIZA 法フローサイトメトリーにより 9 種類のサイトカインの同時定量を行なった。Hb 小胞体を用いて 40%の血液交換を実施、交換後 1,3,7,14 日後に犠牲死させ、血清中のエリスロポエチンを定量、同時に脾臓を摘出して、造血の状態について検討した。

中型動物への投与による Hb 小胞体の安全性を確認するため、ビーグル犬を用い、試料の有効性と安全性を同時に評価できる出血性ショック蘇生モデルについて検討した。出血の程度、出血前の Hb 濃度を変化させて循環動態、酸素運搬を検討した。蘇生時の対照試料として 5%アルブミン生食を用いた。

ラットの 40%出血ショックモデルの蘇生液として用い、肝臓における微小循環の変化を生体顕微鏡で観察、同時に胆汁排泄機能の変化を観察した。

Hb 小胞体の投与後の代謝経路を明らかとするために Hb をアイソトープ標識(^{125}I)して Hb 小胞体を作成、対照として標識した Hb 溶液を用い、マウスおよびラットに経静脈的に投与した。マウスでは経時的に犠牲死させ、採血と臓器の切除を行い、ラットでは尾静脈より経時的に採血を行なった。ガンマカウンターを用いて血液内および臓器のクリアランスを算出した。

クエン酸採血のヒト全血に Hb 小胞体を添加し

た後に血漿を分離し、DIC の診断に用いられる検査項目について Hb 小胞体の干渉の有無を検討した。Goerog Thrombosis Test を用いて総括的に止血能・線溶能を評価した。PFA100 を用いて血小板機能検査を行い、Hb 小胞体の影響を検討した。

C. 研究結果および考察

平成 15 年には無菌的製造法を使用して、4 バッチの Hb 小胞体分散液を作成、いずれのバッチでも製造直後の無菌性試験に合格、また、エンドトキシン混在量は 0.2EU/ml 以下であることが確認された。得られた試料は安全度評価のために当研究班員に配布した。また、この試料は冷蔵保存の状態で国内を搬送され、ロットごとに無菌性試験が行われた。この結果いずれの製品についても完全無菌であることが確認され、保冷輸送に耐えられることが明らかとなった。

研究者へのアンケートの集計の結果、安全性については、反復投与に伴う抗体産生についての検討や中動物での検討が必要であるとの指摘がなされた。

Hb 小胞体をラットに単回投与した後のサイトカインの産生は認められなかった。また、エンドトキシンを投与すると、炎症反応により各種サイトカインの顕著な増大が認められたが、エンドトキシンと Hb 小胞体を同時投与するとサイトカイン産生量が顕著に低下し、Hb 小胞体に細胞傷害性を失わせる効果があると考えられた。

リコンビナントアルブミンに Hb 小胞体を分散させた溶液でラットの循環血液量の 40% を交換すると、脾臓重量の増大が認められるが、組織病理学的検討により、Hb 小胞体が細網内皮系細胞(マクローファージやクッパー細胞)に捕捉されるだけでなく、造血作用の亢進により脾臓内の赤芽球系細胞が増加していることも理由として考えられた。投与 7 日後にはヘマトクリット値が正常に復すことから、Hb 小胞体の投与が造血作用に悪影響を及ぼさないと判断された。

中動物に対する Hb 小胞体の安全性と効果を検討するために、出血性ショックモデルについてショック導入前の Ht 値、出血量に関して検討したところ、50%脱血によるショックとその状態を Hb 小胞体あるいは蘇生液にて蘇生するモデルが、安全性、酸素運搬の評価のみならず、臨床プロトコールの作成を行なう上でも有用であると考えられた。

マウスを用いた Hb 小胞体の体内動態では血中半減期は Hb 溶液の約 8 倍に延長しており、血中に長時間存在することが示唆された。また、臓器分布では、緩やかな肝臓への取り込みと、比較的速い脾臓への取り込みが観察された。各臓器のクリアランスは脾臓において顕著な増大が認められた。ラットを用いた実験では Hb 小胞体の半減期は 79 時間と Hb 溶液に比べて著しく長く血中に滞留することが示唆された。各臓器クリアランスおよび尿中排泄では Hb 溶液が 24 時間以内にほぼ尿中に排泄され、肝臓に若干の分布が認められるのみであったのに対し、Hb 小胞体では肝臓および脾臓への取り込みが大きく、24 時間を最大として蓄積が減少することが明らかとなった。今後動態特性を考慮した有効かつ安全な投与設計の確立が可能となるものと考えられた。

Hb 小胞体の微小循環における挙動を肝微小循環の観察から解析すると、Hb 小胞体を生理塩水に分散した場合、全身血圧の回復は速やかであり、胆汁分泌も改善を認めたが、有効類洞数は減少した。Hb 小胞体を 5%アルブミン生理塩水に分散した場合では全身血圧の回復、胆汁分泌の改善を速やかに認めた。また、有効類洞数の減少は認められなかった。これらの結果より Hb 小胞体はショック改善目的で使用する場合、アルブミンに分散することでその適合性、有用性がさらに上昇するものと考えられた。

Hb 小胞体が血球、凝固線溶系に与える影響を *in vitro* で検討した。クエン酸採血したヒト全血との混和試験では、発色基質を用いた検査

(PLNG, α 2PI)に影響があることが明らかとなった。その他の凝固系の検査には大きな影響を与えないと思われた。総括的止血能/線溶の評価では Hb 小胞体は *in vitro* で止血能や血栓溶解能に大きな影響が無いことが明らかとなった。

D. 結論

Hb 小胞体の無菌製造技術が確立され、大量製造と安定供給が可能となっている。今後 5L バッチによる製造が可能となるよう設備を設計し、試製委託のできる体制を構築する。無菌的でエンドトキシンフリーの製剤の投与ではサイトカイン産生挙動に大きな変化を与えなかったが、エンドトキシ

ンと同時投与では炎症性変化を抑制することが明らかとなり、今後エンドトキシン血症を呈する動物に対する Hb 小胞体投与による治療効果も検討する必要がある。アイソトープを用いた体内動態に関する検討では脾臓への取り込みが顕著であり、24 時間後に最大となり、以後減少した。今後動態特性を考慮した安全な投与計画の検討が必要である。Hb 小胞体を 5% アルブミン生理塩水に分散することによってショック蘇生後の肝微小循環の改善が可能であった。血小板機能、凝固線溶系機能に対しては、Hb 小胞体は大きな影響を与えないと考えられた。今後、中動物、霊長類を対象とした安全性の研究が必要である。

分担研究報告書

人工赤血球の安全性向上に関する研究

分担課題： 中型動物による出血性ショックモデル作成と人工赤血球の蘇生効果の評価

主任研究者	小林 紘一	慶應義塾大学医学部 外科	教授
研究協力者	堀之内 宏久	慶應義塾大学医学部 外科	講師
	渡辺 真純	慶應義塾大学医学部 外科	助手
	泉 陽太郎	慶應義塾大学医学部 外科	助手
	山本 学	慶應義塾大学医学部 外科	助手

研究要旨

小胞体型人工赤血球であるヘモグロビン小胞体 (以下 Hb 小胞体) の中型動物における安全性を証明するとともに、循環動態、酸素運搬に関する能力を検証する。7 kg 程度のビーグル犬を用い、臨床での使用方法として手術室で管理された麻酔下に予期せぬ出血が起こった場合の循環動態の安定と酸素需給の改善を目的として使用する Hb 小胞体の投与効果と安全性を調べることを目的とした。平成 15 年度は対照群の設定を行った。出血量、Baseline の Hb 濃度を変更し、検討した後 50%の出血後にアルブミンあるいは Hb 小胞体分散液を輸注するモデルを作成した。対照群となった 5%アルブミン生食を投与する群でも循環血液量を改善することにより酸素運搬の改善と循環動態の改善が認められたが、回復にかかる時間は約 90 分かかり、また、平均血圧も低値を取っていた。4 時間の観察範囲でショック状態を離脱し、安定な状態とすることが可能であった。平成 16 年度は GLP レベルの Hb 小胞体を使用して中型動物の実験を行う。

A. 研究目的

人工赤血球の中で、小胞体型の Hb 小胞体の安全性、効能に関しては小動物ではよく調べられてきた。中型動物にこの製剤を安全に投与することが可能であることを明らかとするモデルを作成することを第 1 の目的とする。また、その際に急性の大量出血に対する Hb 小胞体輸注の効果についても検討することとした。モデル作成に当たって臨床で想定される手術中の持続出血を想定してモデルを作成することとした。

B. 研究方法

ビーグル犬(約 7kg)を用い、前日夕より絶食とし、実験当日ケタミン 40mg/kg 筋注による麻酔後に気

管内挿管を行ない、セボフルレン 1~2%によって麻酔を維持した。呼吸器は酸素濃度 33%、一回換気量 15mL/kg、換気回数 15 回/分、PEEP3cmH₂O にて換気を維持した。筋弛緩剤は使用しなかった。四肢に心電図記録用の電極を装着、右大腿動脈に血圧モニター用の動脈ライン、左大腿動脈に脱血用の動脈ラインを設け、右大腿静脈より混合静脈血酸素飽和度連続測定の可能な Swan-Ganz カテーテル(5Fr,Baxter Medical)を肺動脈内に挿入留置し、心拍数、血圧、脈拍、動脈圧、肺動脈圧、混合静脈血酸素飽和度を連続測定できるようにした。出血の際、脾臓は収縮して Autotransfusion の機能を果たすと考えられているため、これをあらかじめ切除するべきかについて、また、出血量

についての検討を行うため、以下の予備実験を行った。

- (ア) 40%脱血、30分経過観察後に出血と同量の輸液を行う。
- (イ) 50%脱血、30分経過観察後に出血と同量の輸液を行う。
- (ウ) 脾摘を行い、計算で求めた循環血液量の50%を交換輸血の手技を用いて5%アルブミン生食にて希釈した後40%の脱血を行い、1時間の間隔をおいて出血と同量の輸液を行う。
- (エ) 脾摘を行い、計算で求めた循環血液量の70%を交換輸血の手技を用いて5%アルブミン生食にて希釈した後30%の脱血を行いショックとした後に30分の間隔をおいてから出血量と同量の輸液を行う。

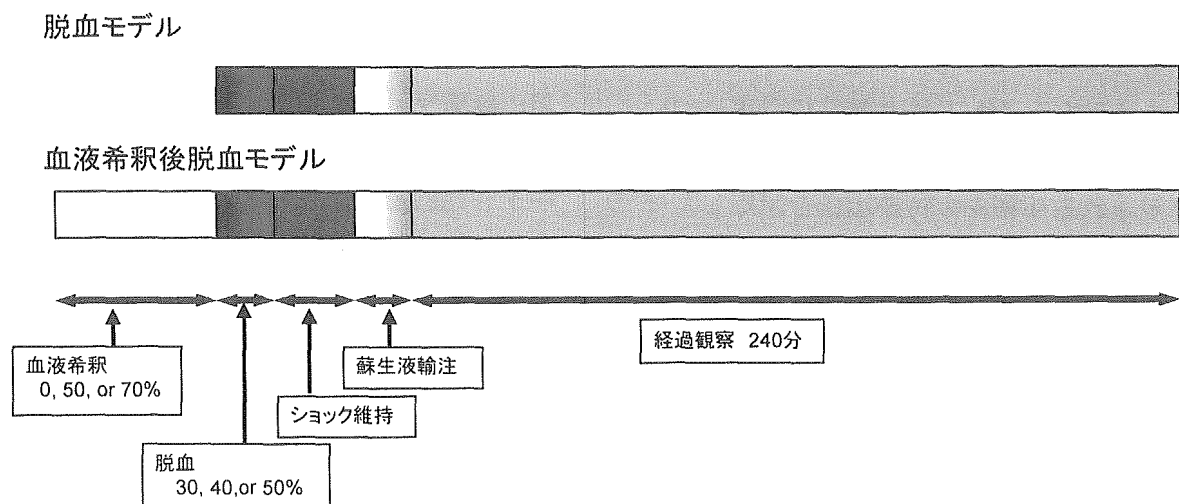
C. 研究結果

循環動態の推移: 動脈圧は各群で脱血により一様にショック状態を呈するようになった。ショック維持期間において脾摘を行わない群では血圧の回復が良好であったが、脾摘を行った群でも血圧が回復するのが認められた(図 1, a)。蘇生液として5%アルブミン生食を使用した。出血量と等量の蘇生液を輸注することにより、どの群でも平均血圧は回復し、安定した。平均肺動脈圧も脱血後は低下し、蘇生液投与直後より、脱血前値にまで

回復し、以後安定した(図 1, b)。中心静脈圧、肺動脈楔入圧も同様の経過をたどり、蘇生液投与後は安定した。心拍数は、脱血量が多くなると、一時的に減少したが、蘇生液投与後増加し、最終的には脱血前より頻脈となった。心拍出量は脱血後、脱血前値の40%以下に低下したが、蘇生液投与後すべての系で心拍出量の増加を認めた(図 1, c)。末梢血管の収縮の有無を表す体血管抵抗は脱血後急激に低下したが、ショック維持時間終了までには脱血前値まで上昇し、蘇生液投与後は脱血前値より低値を取った。これに比し、肺血管抵抗は脱血後より一貫して高値を示した。70%希釈を行った動物は出血性ショック作成後循環動態が維持できず、死亡した。

血液ガス、pHの推移: 動脈血のpHは脱血後低下したが、蘇生液の輸注により徐々に上昇し、安定したが、術前値までには改善しなかった。BEはショック維持後には低値を取り、蘇生後、改善を認めたが、脱血前値にまで回復する系は無かった。動脈血液pO₂、pCO₂の値は人工換気の内容が一定であったことから一定の値で変化は少なかった。混合静脈血における血液ガス検査所見上、脱血の多い症例、脱血前の血液希釈率の高い症例では、蘇生液投与直後より改善が認められた。

Hb小胞体の安全性の評価のための出血性ショックモデルの評価



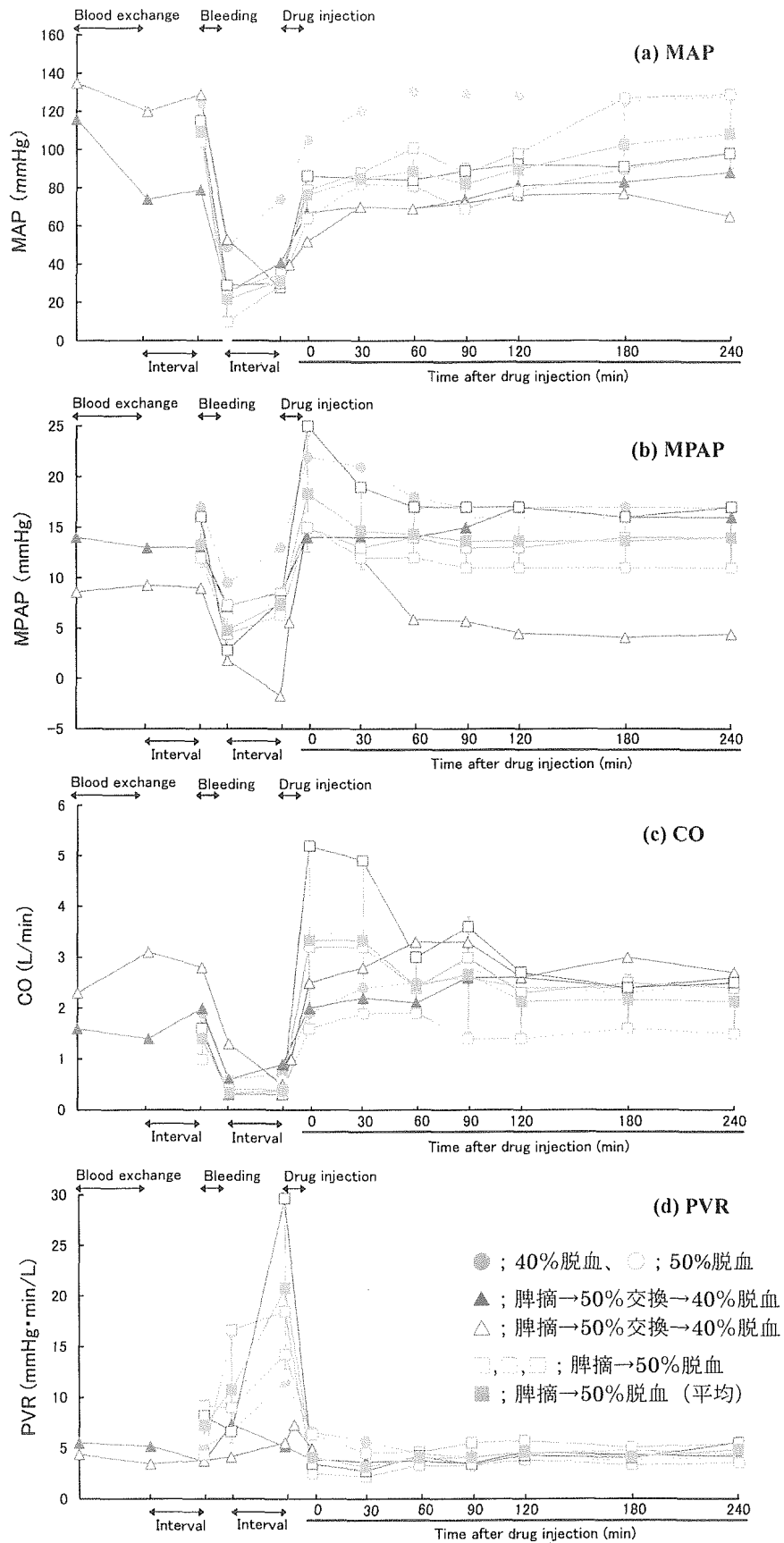


図1 出血性ショックモデル（ビーグル犬）における循環系パラメータの推移。蘇生は5%アルブミン生食で行い、出血量と等量を輸注している。

D. 考察

出血性ショックの研究では現在まで種々のモデルが開発されており、蘇生液、蘇生法、血管透過性の変化を中心とした研究が主体を占めていた。今回、人工赤血球の出血性ショックに対する効果を検証するに当たり、臨床に即した形での出血性ショックモデルの作成を主眼とした。モデルとして考えられたのは、出血後 1 時間のショック状態を維持し、その後に蘇生液を用いて蘇生を行うことを基本とし、出血量、ショック維持時間、脾摘の有無を変更して検討を行った。

脾臓は腹腔内にある、血液の reservoir として働き、出血時には脾臓が収縮することによって赤血球を補充する体内貯血部位となっているとの考え方があり、脾摘を行うことの効果を検証する必要がある。50%脱血犬で比較してみると、あらかじめ脾摘を行ったモデルでは、脱血直後の血圧の低下が著しく、ショック維持時間中の血圧の回復を認めるが、その程度は脾摘を行わない動物に比して軽度であった。この事実は、脾臓の収縮により、プールされていた赤血球が血中に現れたと考えてよく、出血ショックの実験を行なう際には脾摘を行うことに合理性があることが明らかとなった。また、脱血前に脾摘を行い脾臓の重量を計測すると、120g 程度の重量があったが、実験終了後に脱血犠牲死させ、臓器を摘出した際には脾臓の重量は 20 から 30g となっており、血圧の低下に伴って脾臓が収縮していることが明らかとなった。

次に出血量については 40%脱血、50%脱血、50%血液希釈後 40%脱血、70%希釈後 30%脱血、70%希釈後 60%脱血、80%希釈後 30%脱血のモデルを作成した。80%希釈後 30%脱血および 70%希釈後 60%脱血を行うモデルではショック状態を維持中に血圧の低下をきたして死亡した。血圧の維持を行なうためにアルブミン生食にて補液を行なっても血圧が回復することはなく、pH の低下、Base excess の増加、血清乳酸値の増加を認め、嫌気代

謝の亢進が明らかとなったためと考えられ、Hb の消失に伴う酸素需給の破綻が原因となったものと考えられた。以上の結果から、Hb 小胞体の安全性と効果を同時に検討するためには 50%脱血を行ない、血圧の低い(最高血圧が 50Torr を超えない)状態を 1 時間維持した後に失われた量と同量の補液を行うプロトコールが評価を行なう上で有効であろうと考えられた。

酸素運搬量を検討すると、いずれのプロトコールでも出血とともに酸素運搬量は減少したが、ショック維持時間を過ぎて輸液が行なわれると同時に心拍出量の改善の効果もあって酸素運搬量は改善した。しかし、ショック蘇生後の血液中の Hb 量が減少する血液希釈後の脱血ショックのプロトコールでは酸素運搬量の減少が認められた。一方、酸素消費量を検討すると、脱血の直前ではいずれの個体でも 30~70mL/min であったが、70%希釈をした動物以外では出血後も酸素消費量の変化は少なかった。また、ショックから蘇生させた後も酸素消費にはほとんど変化がなかった。70%希釈を行なった動物では血液希釈により酸素消費が著しく低下し、脱血とともに一段と低下して死亡する動物が存在した。

E. 結論

出血性ショックに対する人工赤血球の安全性を評価するためには、安全性およびショック蘇生の能力の双方を検証する必要があり、この目的のためには、脾摘後に 50%脱血ショック後 1 時間のショックの維持を行ない、蘇生液を輸注するモデルが適当と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, M. Yamamoto, I. Ikeda, S. Takeoka, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats. *Crit. Care*

Med. **32**, 539-545 (2004).

2. H. Sakai, H. Horinouchi, Y. Masada, S. Takeoka, M. Takaori, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Metabolism of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) and their influence on organ functions in a rat model.” *Biomaterials* **25**, (2004) (in press, Oct. 27th, 2003).
3. A. Yoshizu, Y. Izumi, S. Park, H. Sakai, S. Takeoka, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. “Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier Hemoglobin Vesicle (HbV) maintains intestinal perfusion and suppresses the increase in plasma necrosis factor alpha (TNF α). *ASAIO J.* (2004) (in press).
4. M. Kohno, A. Ishizaka, M. Sawafuji, H. Koh, Y. Hirayama, E. Ikeda, T. Shiomi, A. Ohashi, Y. Okada, K. Kobayashi. Hyperoxia-induced Emphysematous Changes in Subacute Phase of Endotoxin-induced Lung Injury in Rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (2004) (in press).

(総説、著書など)

5. 土田英俊、宗慶太郎、酒井宏水、小松晃之、武岡真司、堀之内宏久、末松誠、小林絃一。“酸素輸液(人工赤血球)の安全度と体組織への酸素供給” *麻酔* 53(増刊号) S55-S66 (2003)
6. 土田英俊、酒井宏水、武岡真司、宗慶太郎、小林絃一。“酸素輸液(人工赤血球)” *医学のあゆみ* 205, 558-566 (2003)
7. K. Kobayashi, H. Horinouchi, M. Watanabe, Y. Izumi, Y. Teramura, A. Nakagawa, Y. Huang, K. Sou, H. Sakai, T. Komatsu, S. Takeoka, E. Tsuchida. Safety and efficacy of hemoglobin-vesicles and albumin-hemes. In: *Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine* Vol. 12, Elsevier Science (Tokyo, 2004). (印刷中)

2. 学会発表

1. 小林絃一／(会長講演) 青年期を迎える日本呼吸器外科学会／第 20 回日本呼吸器外科学会／2003.5.8／東京

2. 小林絃一／(会長講演) 人工酸素運搬体の開発／第 56 回日本胸部外科学会／2003.11.20／東京
3. 小林絃一／(イブニングセミナー) 人工酸素運搬体の臨床応用を目指して／第 12 回日本形成外科学会基礎学術集会／2003.10.9／東京
4. 堀之内 宏久、泉陽太郎、渡辺真純、武岡真司、小松晃之、酒井宏水、土田英俊、小林絃一／臨床応用を目指した人工酸素運搬体の開発研究：現状と展望／第 8 回 日本心臓血管麻酔学会 学術大会・総会／2003. 9. 27-28／奈良県新公会堂
5. 酒井宏水、武岡真司、堀之内宏久、小林絃一、土田英俊／人工赤血球 (ヘモグロビン小胞体) の反復投与による安全度評価／第 41 回日本人工臓器学会大会／2003.10.30 - 11.1／仙台市民会館
6. H. Sakai, K. Sou, S. Takeoka, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Physicochemical properties of Hb-vesicles (HbV) and their O₂ transporting efficiency in vivo. / 7th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies / 2003.9.21-24 / Fort Lauderdale, Florida
7. H. Sakai, K. Sou, S. Takeoka, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Rheological properties of PEG-modified Hb-vesicles (HbVs) and their oxygen-transporting capacity in vivo. / The Spring 2004 ACS National Meeting / March 28-April 1, 2004 / Anaheim, CA, USA.

(新聞報道)

読売新聞朝刊「感染不安ない人工血液：早・慶大など開発、2年後の実用化目指す」(H16.1.25)

毎日新聞朝刊「感染血液すり抜けなぜ？：-研究進む人工血液-まずは赤血球 実用化の期待」(H16.3.13)

日本経済新聞朝刊「人工赤血球を量産：ニプロなど、安定供給に道」(H16.3.19)

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

分担研究報告書

人工赤血球の安全性向上に関する研究

分担課題：ヘモグロビン小胞体が免疫系に及ぼす影響

分担研究者	池田 久實	北海道赤十字血液センター	所長
研究協力者	東 寛	北海道赤十字血液センター	研究部長
	藤原 満博	北海道赤十字血液センター	研究部
	阿部 英樹	北海道赤十字血液センター	研究部
	山口 美樹	北海道赤十字血液センター	研究部
	若本志乃舞	北海道赤十字血液センター	研究部

研究要旨

ヘモグロビン(Hb)小胞体投与が免疫系に及ぼす影響について、ラットを用いて検討した。ラットの循環血液量の20%に相当するHb小胞体をエーテル麻酔下尾静脈より投与し、6時間、1、3、7日後に脾臓を摘出した。脾細胞中のT、Bリンパ球、MHC class II陽性細胞の割合をフローサイトメーターでみたところ、Hb小胞体投与6時間後にはTリンパ球の割合が減少し、MHC class II陽性細胞の増加がみられた。その後、両者とも7日目には未投与と同等のレベルに戻った。また、Bリンパ球の割合は若干増加したが、ほとんど変化がなかった。この単核細胞の割合の変化は生食投与においても同様にみられた。

コンカナバリンA刺激によるT細胞増殖反応をみたところ、Hb小胞体投与6時間後の細胞では高濃度ConAに対する応答性は維持していたが、低濃度ConAに対する応答性が低下した。応答性の低下は経時的に回復し、投与3日後の脾細胞では生食投与群と同等の反応性を示した。Hb小胞体投与により、脾臓重量の増加、低濃度ConA刺激に対するTリンパ球反応性の低下がみられたが一過性であり、生体の免疫系に及ぼす影響は少ないものと思われる。

A. 研究目的

これまで、ヘモグロビン小胞体(Hb小胞体)の安全性についてヒト及びラット血液を用いた*in vitro*の検討、ラットを用いた*in vivo*の検討を行ってきた。その結果、血漿凝固系、カリクレイン-キニン系、補体系および血小板機能にほとんど影響を与えないことを示してきた。またラットへの投与では、血球細胞の割合や補体価に変化がみられたものの、いずれも小さく一過性の変化であった。今回、更に安全性を確認するため、ラットへ

のtopload輸注モデルを用い、免疫系への影響について検討を行った。Hb小胞体は細網内皮系により循環血液中から排除されると考えられることから、脾臓細胞を用い、単核球の割合やマイトジェン刺激に対する応答性を観察した。

B. 研究方法

WKAHラット、♂、7・8週齢、体重約160・180gを用い、循環血液量の20%(v/v)に相当するHb小胞体(約2mL)をエーテル麻酔下、尾静脈より輸

注した。コントロールとして生理食塩水を輸注した。投与 6 時間、1、3、7 日後にエーテル麻酔で犠牲死させ、無菌的に脾臓を摘出した。重量を測定した後、培地 (RPMI/FCS/2-ME: RPMI1640/10%FCS /50 μ M 2-mercaptethanol) 5 mL に浸した脾臓をディッシュ中ですりつぶし、その懸濁液を遠心チューブに移して静置することにより、大きな組織塊を沈降させた。上清を 2,000 rpm \times 5 min 遠心し、沈殿した細胞を RPMI1640 で洗浄した後、塩化アンモニウム・トリス緩衝液 (IBL 免疫生物研究所) 5 mL にて 3-5 分間溶血処理をした。溶血処理細胞液に 5 mL の RPMI/FCS/2-ME を加えた後、遠心、洗浄を行い、最後に RPMI/FCS/2-ME に懸濁して脾細胞とした。

脾細胞中に含まれる単核球の割合を、FITC 標識抗 CD3 抗体 (BD) と PE 標識抗 MHC class II 抗体 (Immunotech) を用い、フローサイトメーター (LSR、日本ベクトンディッキンソン) にて測定した。陰性コントロールには FITC 標識マウス IgG₁、PE 標識マウス IgG₁ (DAKO) を用いた。約 3 \times 10⁵ 個の脾細胞を含む懸濁液に CD3 抗体および MHC class II 抗体を 5 μ L ずつ加え、4 $^{\circ}$ C、暗所で 10 分間インキュベーションした。陰性コントロール抗体を加えた細胞も同様に処理した。インキュベーション後 PBS で洗浄、遠心し、2 カラーフローサイト解析を行った。単核球画分、リンパ球画分をそれぞれゲートし、CD3 陽性細胞、MHC class II 陽性細胞の割合を解析した。

T リンパ球の機能として、コンカナバリン A (ConA) 刺激による増殖反応をみた。丸底 96 穴プレートに RPMI/FCS/2-ME に懸濁した脾細胞を 2 \times 10⁵ 個/100 μ L/ウェルに triplicate で分注し、終濃度 0.03、0.1、0.3、1.3 μ g/mL になるように ConA 100 μ L を添加して、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ にて培養した。培養 72 時間後に各ウェルに 18.5 kBq の ³H-チミジン (アマシヤム) 10 μ L を添加し、その 24 時間後にセルハーベスタにて細胞を回収した。細胞 DNA に取り込まれた ³H-チミジン量を液体シンチ

レーションカウンタにて測定した。

C. 研究結果

脾臓重量の変化： 体重に対する脾臓重量の割合は、未投与時には 0.23% だったのが Hb 小胞体投与後徐々に増加し、3 日後には 0.32% に増加した (図 1)。その後、割合は低下し、投与 7 日後には未投与時の割合とほぼ同じになった。生食投与群では脾臓重量の割合に変化はみられなかった。

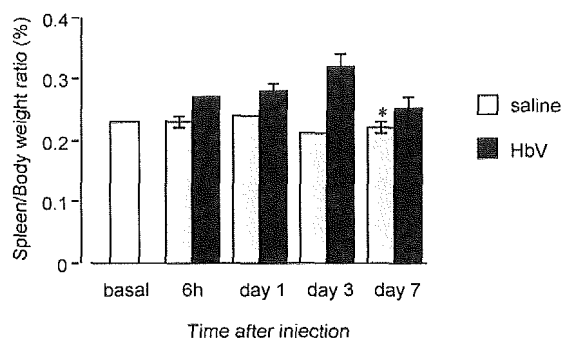


図1. HbV投与によるラット脾臓重量比の変化。N=3, mean \pm SEM. *N=2.

T リンパ球、MHC class II 陽性細胞の変化： 脾細胞中の T、B リンパ球の割合をフローサイトメーターで観測したところ、Hb 小胞体投与、生食投与のいずれにおいても、投与後 6 時間目から CD3 陽性細胞の割合が低下し、MHC class II 陽性細胞の割合が増加した (図 2)。また CD3、class II 二重陽性細胞の割合も増加した。いずれの細胞も投与後 7 日目には規定値と同じパターンに回復した。T リンパ球の割合は、規定値の 47% から投与後 1 日目に 25% と最も低値となり、その内の class II 陽性細胞は 5% であった (図 3)。これに反して、MHC class II 陽性細胞は規定値の 45% から投与後 1 日目に 68% と最も高値を示し、その後減少して 7 日目には規定値とほぼ同じレベルに回復した (図 4)。MHC class II 陽性細胞中に占める B リンパ球の割合は、40-45% と規定値 37% よりやや増加したが、ほとんど変化無かった。これらの変化は、Hb 小胞体群と生食群で差はみられなかった。

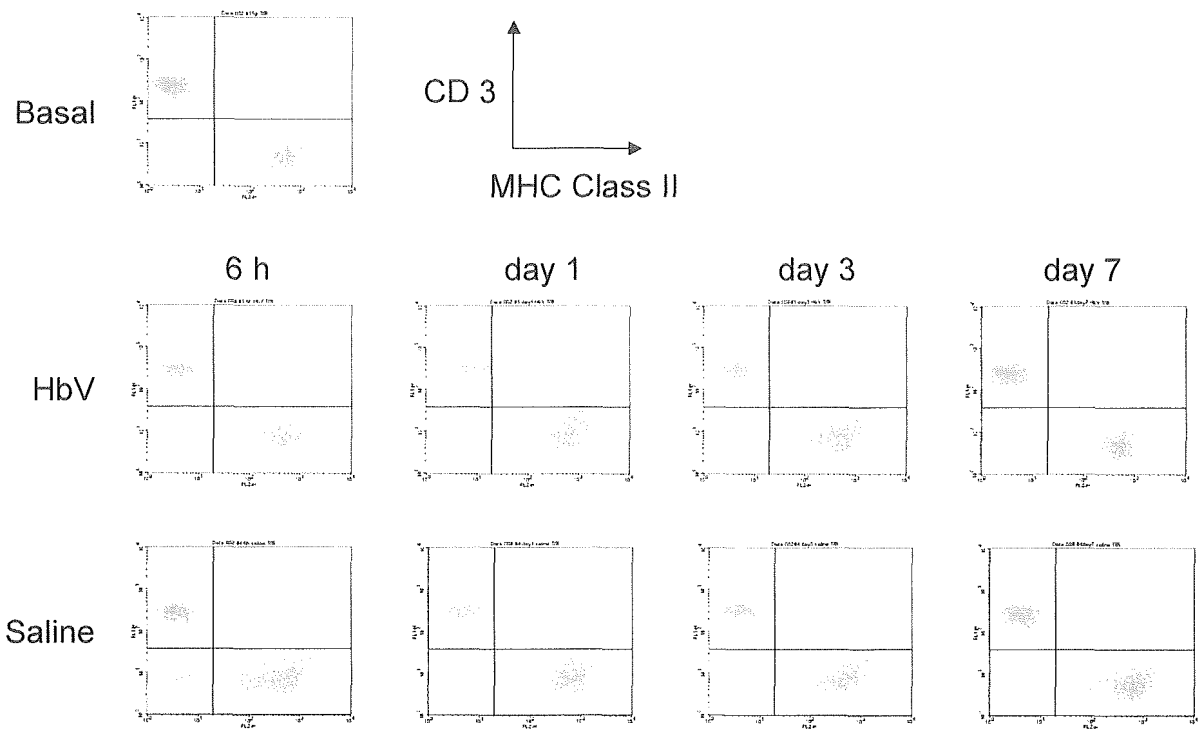


図2. HbV投与後のラット脾臓中単核細胞のフローサイトメトリーによる解析。3例中典型的な1例を示す。

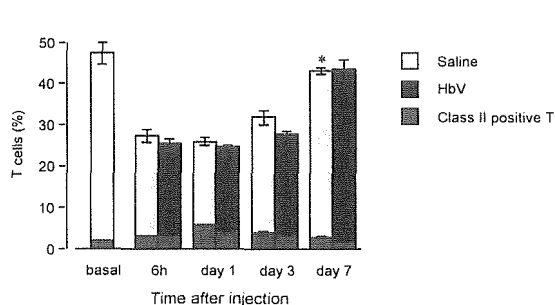


図3. HbV投与後のラット脾臓中Tリンパ球の変化。N=3, mean ± SEM. *N=2.

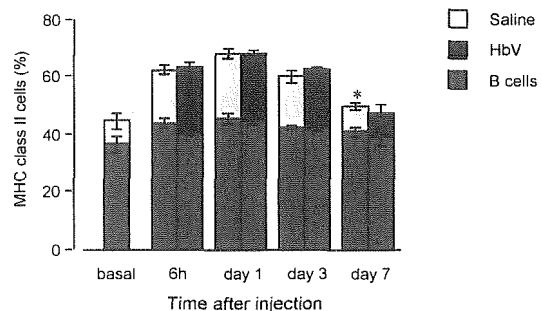


図4. HbV投与後のラット脾臓中MHC class II陽性細胞の変化。N=3, mean ± SEM. *N=2.

Tリンパ球の機能： 生食群の脾細胞では、ConA濃度 0.03-3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で濃度依存性に ^3H -チミジン取り込み量の増加が観察された(図5)。一方、Hb小胞体群では、投与後6時間目、1日目の脾細胞では、低濃度 ConA 刺激 (0.1, 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) による ^3H -チミジン取り込み量の抑制が見られた。しかし、3日目以降は生食群と同等の反応性を回復した。また、投与後6時間目、1日目においても、高濃度 ConA 刺激 (1, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) では反応性の変化はみられなかった。

D. 考察

Hb小胞体投与が免疫系に及ぼす影響について、細網内皮系として重要な臓器である脾臓を解析した。Hb小胞体投与後6時間目、1日目、3日目に脾臓重量は増加した。またこのとき脾細胞中のMHC class II陽性細胞の割合が増加していた。このことからHb小胞体を貪食したマクロファージ等の細胞が脾臓に集積し、そのために重量が重くなり、またTリンパ球の割合も減少したと考えることができる。

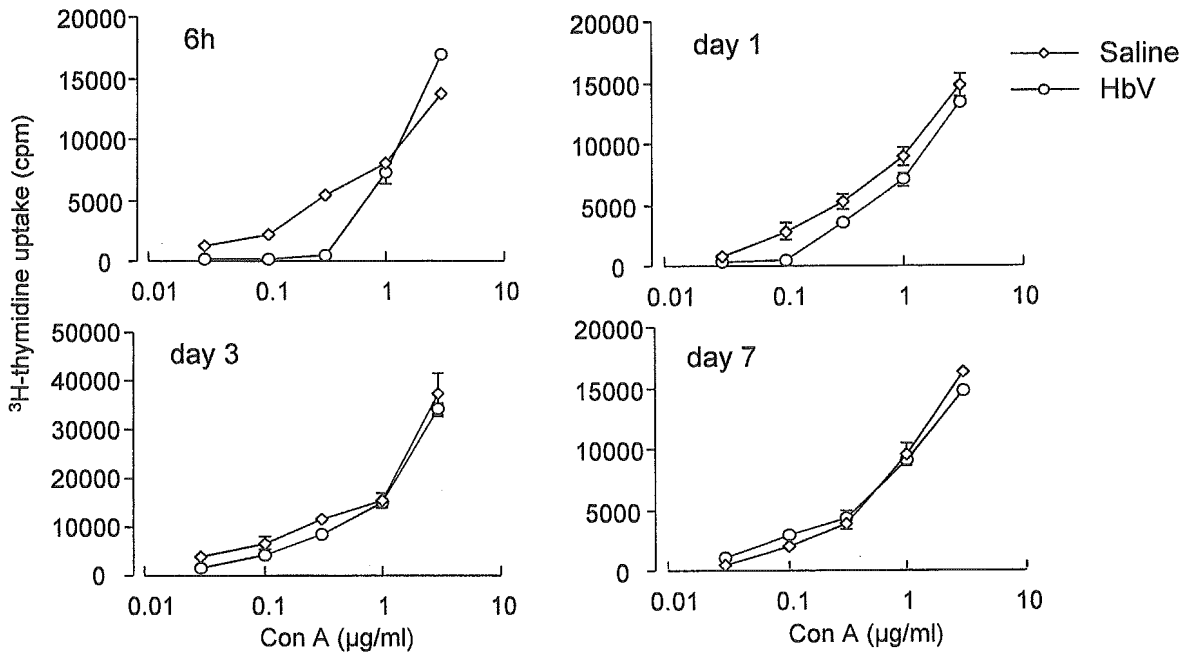


図5. HbV投与後のラット脾臓中Tリンパ球のConA刺激による増殖反応。
N=3, mean ± SEM. (○: Day7, N=2)

一方、生食投与においては、脾臓重量の増加がみられないにもかかわらず、Hb 小胞体投与と同様の T リンパ球、MHC class II 陽性細胞の割合変化が観察された。加えて、両群において B リンパ球の割合はほとんど変化していない。これらのことから、今回の検討においては、脾臓重量の増加は Hb 小胞体によるものと考えられるが、脾細胞中の単核球分布の変化は、Hb 小胞体あるいは生食輸注による急激な循環血液量の増加が影響を及ぼしたものと考えられる。

T リンパ球は ConA 刺激により増殖することが知られており、³H-チミジンの取り込み量をみることで増殖能を観察することが出来る。低濃度 ConA 刺激に対する脾細胞の反応性は、Hb 小胞体群においてのみ一過性に低下した。脾細胞中 T リンパ球の割合は Hb 小胞体群、生食群共に同程度であり、このことは、Hb 小胞体投与により脾細胞が質的に変化したことを示す。これが、T リンパ球自体が変化したのか、共存するマクロファージや B リンパ球への影響が T リンパ球の反応性に反映されたのか、ConA 濃度依存性の反応性の消失等について、今後解明する必要がある。

E. 結論

Hb 小胞体投与により、脾臓重量の増加、低濃度 ConA 刺激に対する T リンパ球機能低下が生じたが一過性であり、生体の免疫系に及ぼす影響は少ないものと思われるが、臨床的意義については今後の検討課題である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

阿部英樹、藤原満博、東寛、池田久寛. “リポソームと補体系との相互作用” *人工血液* **11**, 151-160 (2003).

2. 学会発表

阿部英樹、他/ヘモグロビン小胞体投与によるラット末梢血液細胞および補体への影響/第 51 回日本輸血学会総会/5.29-31/北九州市

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担研究報告書

人工赤血球の安全性向上に関する研究

分担課題：人工赤血球・ヘモグロビン小胞体の体内動態特性の解析

分担研究者 小田切 優樹 熊本大学大学院医学薬学研究部 教授

研究協力者 安楽 誠 日本公定書協会リサーチレジデント

研究要旨

本研究は、輸血に代わりうる人工赤血球としてヘモグロビン小胞体 (Hb 小胞体) に着目し、有効かつ安全性に優れた人工赤血球製剤の開発ならびに適切な投与設計の確立を最終目的に、 ^{125}I 標識 Hb および Hb 小胞体のマウス及びラットにおける体内動態実験を行い、その半減期及び臓器クリアランス等から動態特性を評価した。その結果、Hb 小胞体は Hb と比べて半減期の延長とともに各臓器への有意な取り込みの抑制が観察され、Hb 小胞体の人工赤血球としての有効性が確認された。

A. 研究目的

輸血に代わりうる人工酸素運搬体としてヘモグロビン (Hb) が着目され、これまでに Hb を利用した種々の Hb 製剤が考案されてきた。しかしながらこれら Hb 製剤は、粒子径が小さいため血管外漏出が著しく、また、NO との反応性が高いため、血圧上昇、血小板活性化等の副作用が報告されている。このような問題点を克服するため、高純度・高濃度 Hb をリン脂質二重膜で被覆した、細胞型粒子 Hb 小胞体が考案され、粘度・膠質浸透圧・酸素親和性・体内滞留時間の調節、また、動物投与試験による十分な酸素輸送能を発揮することが証明されてきた。

一般にタンパク性医薬品を市場化する上で、体内動態特性評価は、医薬品の有効性、安全性の確保の観点から必要不可欠であり、Hb 小胞体についても体内動態特性の詳細検討が推進されている。本研究では有効性かつ安全性に優れた人工赤血球製剤の開発を最終目的として、特に、代謝および排泄に関する知見を得るため、 ^{125}I 標識 Hb および Hb 小胞体のマウス及びラットにおける体内動態

実験を行い、その半減期及び臓器クリアランス等から動態特性を評価した。

B. 研究方法

動物：実験動物は ddY 系雄性マウス (7 週齢、28～30g) 及び SD 系雄性ラット (6 週齢、180～220g) に水と固形飼料を自由に摂取させ、1 週間予備飼育の後、実験に使用した。1 群 3 匹とした。

 ^{125}I -Hb 及び ^{125}I -Hb 小胞体投与液の調製

iodo-GEN(1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenyl glycouril) でコーティングしたチューブに Hb (2.5mg/mL) 160 μL を加え、さらに 0.5M Na-PB を 40 μL 、 Na^{125}I を 2.5 μL (0.25mCi) 添加し、攪拌した。Hb 小胞体においては、Hb として 400 μg を IODO-GEN コーティングチューブに入れ、Na-PB を最終濃度 0.1M となるように加えた後、 Na^{125}I を 5 μL (0.5mCi) 添加、攪拌した。室温にて 30 分間放置した後、PBS により平衡化した PD-10 カラムにのせ、ゲル濾過によってヨウ素標識 Hb 及び Hb 小胞体と未反応の Na^{125}I とを分離した。各標

識体をそれぞれ非標識体で希釈して投与液を調製した。この方法によるラベル化率は90%以上であった。

投与方法及び投与量

雄性マウス及びラットに非絶食、エーテル麻酔下において、 $^{125}\text{I}\text{-Hb}$ 及び $^{125}\text{I}\text{-Hb}$ 小胞体をそれぞれ、約 $3\times 10^5\text{cpm/匹}$ 、約 $10\times 10^5\text{cpm/匹}$ の用量でマウス及びラット尾静脈より投与した。なお、タンパク量は非標識 Hb 及び Hb 小胞体の添加により、マウスでは、1mg/kg、200mg/kg、ラットでは、1400mg/kg で投与を行った。いずれの場合もヨードブロックを行うために投与の1週間前より試験終了まで、5mM ヨウ化ナトリウム(NaI)水溶液を自由飲水させた。

採血方法、放射活性の測定・分析

マウスにおいて投与後、経時的に開腹し、ヘパリン処理したシリンジで下大静脈より約 200 μL 採血した。血液 50 μL に 1mL の 1%BSA を加えて希釈し、1mL の 40%トリクロロ酢酸(TCA)を加え、血液中に含まれるタンパク質を沈殿させた。攪拌後、4 $^{\circ}\text{C}$ 、3000rpm で遠心分離を行い、沈殿中の放射活性をオートウェルガンマーカウンター(アロカ製、ARC-2000)にて測定した。採血、採尿終了後、下大静脈を切断し放血致死させ、組織を摘出した後、重量を秤量し、各組織の放射活性をオートウェルガンマーカウンターを用いて測定し、MULTI により半減期及び各臓器クリアランスを算出した。ラットにおいて投与後、経時的にヘパリン処理したシリンジで一定時間毎に、投与していない側の尾静脈から 100 μL 採血し、マウスと同様の操作により測定した。最終サンプリング終了後、断頭し放血致死させ組織を摘出した後、重量を秤量し、各組織の放射活性をオートウェルガンマーカウンターにてマウスと同様に測定した。

C. 研究結果

1. マウスにおける体内動態特性

$^{125}\text{I}\text{-Hb}$ 及び $^{125}\text{I}\text{-Hb}$ 小胞体の血中濃度推移

Hb 1mg/kg、200mg/kg 及び Hb 小胞体 200mg/kg の投与量において体内動態特性を評価した (Fig.1)。投与後2時間までの血中体内動態について検討した結果、Hb 小胞体は消失半減期70分と、Hbの半減期(8.97分)の約8倍まで延長し、血中に長時間存在することが示唆された。一方、Hb 200mg/kg 投与時では、1mg/kg 投与時と比較して、半減期の延長が認められた。この結果より、Hbの血中からの消失過程が飽和している可能性が示唆された。

$^{125}\text{I}\text{-Hb}$ 及び $^{125}\text{I}\text{-Hb}$ 小胞体の臓器分布

200mg/kg 投与後、2時間までの Hb 及び Hb 小胞体の肝臓、腎臓及び脾臓への $^{125}\text{I}\text{-Hb}$ 小胞体、 $^{125}\text{I}\text{-Hb}$ 分布時間推移を Fig. 2 に示す。Hb 小胞体投与時では、Hbと比較して肝臓への緩やかな取込みが観察された。さらに脾臓への取り込みは著しい上昇を示した。また、Hbの1mg/kg投与と200mg/kg投与における用量依存性を検討したところ、Hbと比較した場合、200mg/kg投与時において、肝臓、腎臓への取り込みの遅延が認められた。このことより、Hbが過剰投与されたことにより臓器取り込み飽和が起り、結果的に取り込み阻害が生じた可能性が示唆される。

動態学的パラメータと各臓器取込みクリアランス

これまでの結果から動態学的パラメータ及び各臓器取込みクリアランスを算出した (Table 1)。200mg/kg投与における Hb 及び Hb 小胞体では、分布容積 (V_{ss})、全身クリアランス (CL) の低下に伴う半減期の延長、及び AUC の増大が認められ、血中滞留性が改善されていることを示唆する結果が得られた。また、この時の各臓器初期取込みクリアランスは、脾臓において顕著な増大が認められた (Table 2)。次に、Hb 200mg/kg 及び Hb 1mg/kg 投与時の用量依存性を比較検討したとこ

ろ、 V_{ss} 、CL の減少とともに半減期の延長、及び AUC の増大が認められた。また、この時の肝臓、

腎臓、脾臓、心臓における初期取り込みクリアランスは低下していた (Table 1,2)。

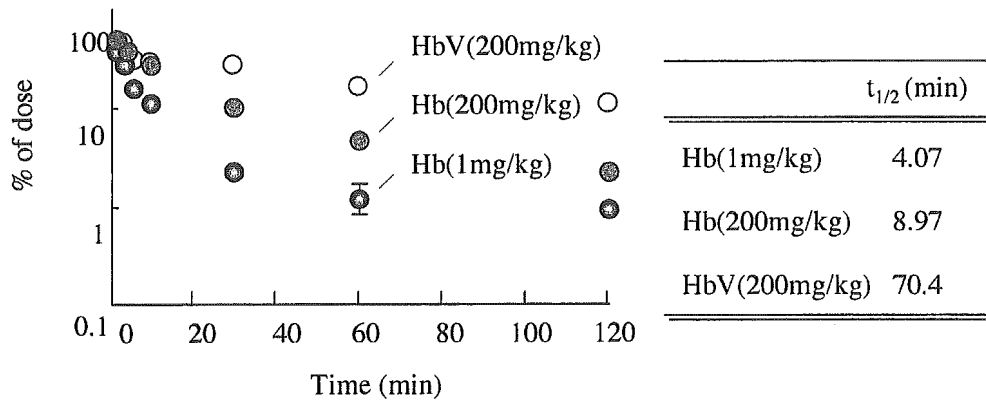


Fig.1 Time course and half-life of ^{125}I -HbV and ^{125}I -Hb after i.v. administration in mice (1mg/kg or 200mg/kg)

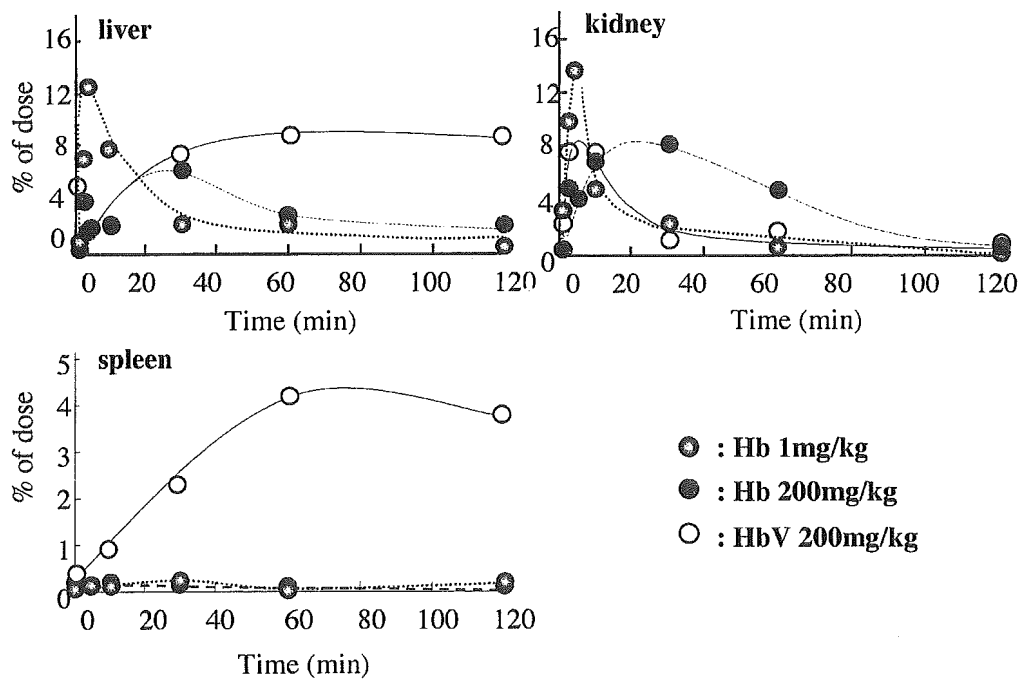


Fig.2 Time course of distribution of ^{125}I -HbV and ^{125}I -Hb after i.v. administration in mice (1mg/kg or 200mg/kg)

Table 1 Pharmacokinetic parameter of HbV and Hb in mice

		V_{ss} (mL)	$t_{1/2}$ (min)	AUC (% of dose*min*ml ⁻¹)	CL (mL*h ⁻¹)
^{125}I -Hb	1mg/kg	13.8	4.07	471.3	127.3
	200mg/kg	5.08	8.97	1137.7	52.7
^{125}I -HbV	200mg/kg	3.09	70.4	3211.6	18.7

Table 2 Uptake clearance of ^{125}I -HbV and ^{125}I -Hb in mice

		CL (mL*h ⁻¹)				
		liver	kidney	spleen	heart	lung
^{125}I -Hb	1mg/kg	5.85	5.87	0.018	0.036	0.084
	200mg/kg	0.588	0.762	0.0036	0.012	1.80
^{125}I -HbV	200mg/kg	1.33	1.85	0.42	0.012	0.054

2. ラットにおける体内動態特性

^{125}I -Hb 及び ^{125}I -Hb 小胞体の血中濃度推移

次にラットを用いてHbとHb小胞体の体内動態特性を評価した (Fig.3)。1400mg/kg 投与後 72 時間までの血中体内動態について検討した結果、Hb小胞体は消失半減期 79 時間と、マウスと同様、Hbの半減期 (1 時間) と比較して血中に長時間存在することが示唆された。

^{125}I -Hb 及び ^{125}I -Hb 小胞体の臓器分布

1400mg/kg 投与後、72 時間までの Hb 及び Hb 小胞体の肝臓、腎臓及び脾臓への ^{125}I -Hb、 ^{125}I -Hb 小胞体分布時間推移を Fig. 4 に示す。Hb 小胞体投与時において、Hb では 24 時間以内にほぼ尿中に排泄され、肝臓において若干の分布が認められるものの、他の臓器における分布はほぼ認められなかった。一方、Hb 小胞体では肝臓および脾臓への取込みが大きく、24 時間を最大として、その後、消失していく過程が確認された。

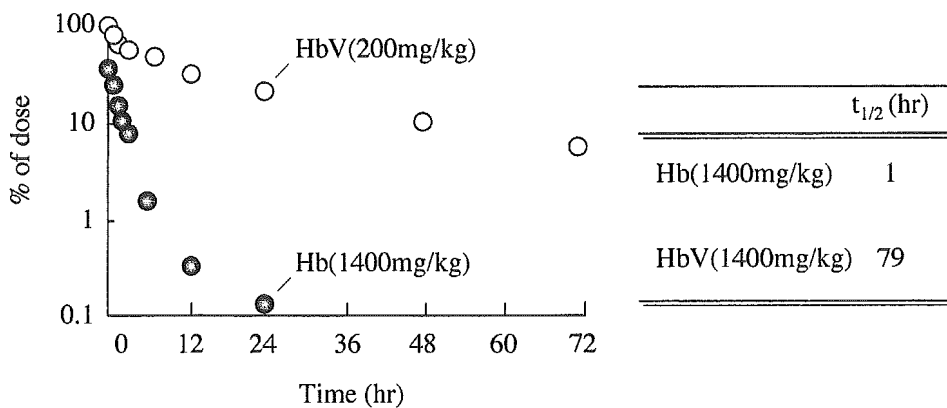


Fig. 3 Time course and half-life of ^{125}I -HbV and ^{125}I -Hb after i.v. administration in rat (1400mg/kg)

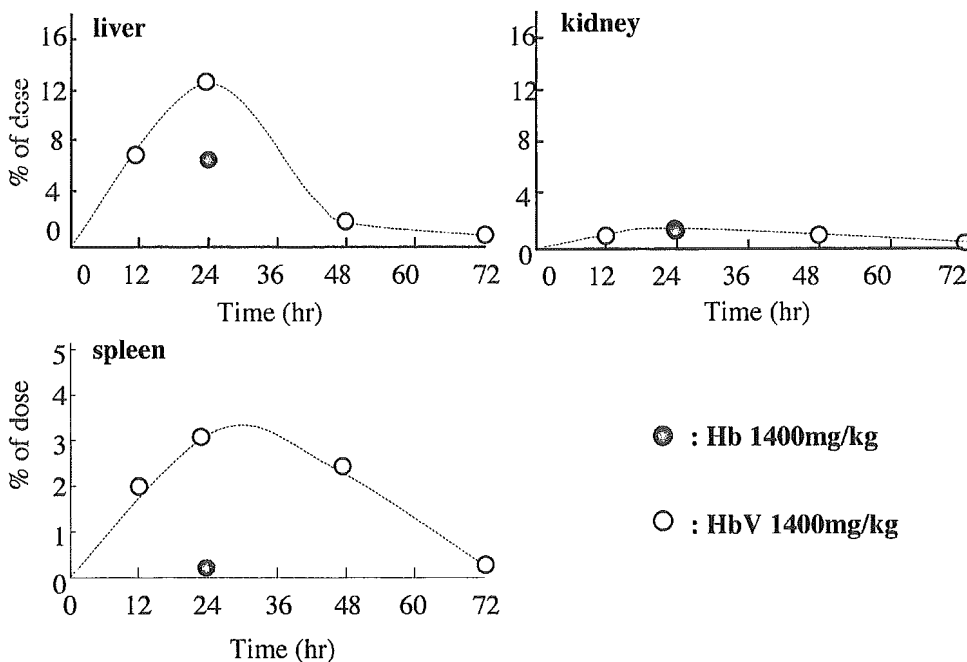


Fig. 4 Time course of distribution of ^{125}I -HbV and ^{125}I -Hb after i.v. administration in rat (1400mg/kg)

D. 考察

本研究は、有効かつ安全性に優れた人工赤血球製剤の開発を最終目的として、¹²⁵I 標識 Hb および Hb 小胞体のマウス及びラットにおける体内動態実験を行い、その半減期及び臓器分布、クリアランス等から動態特性を評価した。マウスにおいて Hb 小胞体は消失半減期 70 分と、Hb の約 8 倍まで延長し、血中に長時間存在することが示唆された。また、この時の時間経時的な臓器分布を比較したところ、Hb 小胞体投与時では、Hb と比較して肝臓および脾臓への取込みが著しく増大した。これは Hb 小胞体において Hb を脂質膜内に封入することで血中滞留性が改善したためと考えられる。また、肝臓及び脾臓への高い分布は、Hb 小胞体粒子径が 250nm と拡大したために、肝臓、脾臓等の細網内皮系組織に認識され、取り込まれたことによるものと推察される。したがって、この主臓器への分布、代謝、排泄の時間経時的な解明が脾臓肥大のような副作用軽減へのアプローチにつながるものと考えられる。一方、Hb 200mg/kg 投与時では、投与後、5 分で肝臓、腎臓への分布が最大となり素早い消失が観察された。これは、肝臓によるスカベンジャー受容体のような消失系に認識されたものや腎臓での糸球体による漏出の影響によるものかもしれない。事実、Hb 200mg/kg 投与時では、Hb 1mg/kg 投与時と比較した場合、Hb の血中からの消失過程が飽和していることが示唆されたことから、肝臓、腎臓への取り込みになんらかの輸送担体が関与していることが強く示唆された。

次に、ラットにおける体内動態についてマウスと同様に実験を行った。その結果、マウスの体内動態特性と同様、Hb に比べて消失の著しい遅延が観察された。また、各臓器への時間依存的な分布を評価したところ、マウスの体内分布と同様、脾臓に高い移行性が観察された。この脾臓への Hb 小胞体の高い蓄積は脾臓肥大の主要因と考えられており、検討課題の一つとなっている。しかし、今回、ラットの体内動態の結果から、24 時間の脾

臓への蓄積をピークにその蓄積は減少し、72 時間後では殆ど脾臓には認められなかった。これまで、ある一定時間の Hb 小胞体の臓器分布のみの評価であったが、今後、臓器への時間移行性を詳細に検討することにより、動態特性を考慮した有効かつ安全な投与設計の確立が可能になるものと考えている。

E. 結論

本研究は、有効かつ安全性に優れた人工赤血球製剤の開発を最終目的として、¹²⁵I 標識 Hb および Hb 小胞体のマウス及びラットにおける体内動態特性を評価した。その結果、Hb 小胞体は Hb と比べて半減期の延長とともに各臓器への取り込みの抑制が観察された。また、その高い脾臓への移行が観察されたものの、24 時間の脾臓への蓄積を最大に 72 時間後では多くの臓器での蓄積は殆ど認められなかった。今後、インジウム(In)を利用したラベル体を作製し、他の臓器への分布も含め、より詳細な体内動態解析を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 発表論文

1. Sakurai Y, Ma SF, Watanabe H, Yamaotsu N, Hirorno S, Kurono Y, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Esterase-like activity of serum albumin: Characterization of its structural chemistry using p-nitrophenyl esters as substrates. *Pharm Res.* **21**, 285-292 (2004).
2. Deguchi T, Kusuhara H, Takadate A, Endou H, Otagiri M, Sugiyama Y. Characterization of uremic toxin transport by organic anion transporters in the kidney. *Kidney Int.* **65**, 162-174 (2004).
3. Deguchi T, Nakamura M, Tsutsumi Y, Suenaga A, Otagiri M. Pharmacokinetics and tissue distribution of uraemic indoxyl sulphate in rats. *Biopharm Drug Dispos.* **24**, 345-55 (2003).
4. Nakajou K, Watanabe H, Kragh-Hansen U,