

- Maruyama T, Otagiri M. The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants. *Biochim Biophys Acta*. **1623**, 88-97 (2003).
5. Imai T, Yoshigae Y, Hosokawa M, Chiba K, Otagiri M. Evidence for the involvement of a pulmonary first-pass effect via carboxylesterase in the disposition of a propranolol ester derivative after intravenous administration. *J Pharmacol Exp Ther*. **307**, 1234-42 (2003).
 6. Tokutomi Y, Okamoto S, Matsumoto K, Otagiri M, Nishi K, Tokutomi N. Effects of alpha(1)-acid glycoprotein on isometric tension of mouse aorta. *Eur J Pharmacol*. **477**, 137-41 (2003).
 7. Imamura Y, Koga T, Shimada H, Otagiri M. Inactivation of rabbit liver carbonyl reductase by phenylglyoxal and 2,3,4-trinitrobenzenesulfonate sodium. *J Enzyme Inhib Med Chem*. **18**, 35-39 (2003).
 8. Anraku M, Kragh-Hansen U, Kawai K, Maruyama T, Yamasaki Y, Takakura Y, Otagiri M. Validation of the chloramine-T induced oxidation of human serum albumin as a model for oxidative damage in vivo. *Pharm Res*. **20**, 684-692 (2003).
 9. Imai T, Nomura T, Otagiri M. Probenecid-induced changes in the clearance of pranoprofen enantiomers. *Chirality* **15**, 318-23 (2003).
 10. Imai T, Nomura T, Aso M, Otagiri M. Enantiospecific disposition of pranoprofen in beagle dogs and rats. *Chirality* **15**, 312-317 (2003).
 11. Usami N, Ishikura S, Abe H, Nagano M, Uebuchi M, Kuniyasu A, Otagiri M, Nakayama H, Imamura Y, Hara A. Cloning, expression and tissue distribution of a tetrameric form of pig carbonyl reductase. *Chem Biol Interact*. **143-144**, 353-361 (2003).
 12. Matsumoto K, Nishi K, Tokutomi Y, Irie T, Suenaga A, Otagiri M. Effects of alpha 1-acid glycoprotein on erythrocyte deformability and membrane stabilization. *Biol Pharm Bull*. **26**, 123-126(2003).
 13. Matsumoto K, Okamoto S, Tokutomi Y, Irie T, Maruyama T, Nishi K, Suenaga A, Otagiri M. Effects of alpha 1-acid glycoprotein on blood circulation. *Artificial Blood*. **11**, 144-150 (2003).
2. 学会発表
 1. 中城圭介、渡辺大介、丸山徹、堺正和、堀内正公、小田切優樹／メイラード反応後期生成物 (AGE) の体内動態解析／日本薬学会第 123 年会／2003.3.／長崎
 2. 安楽誠、新塘里奈、岩尾康範、Kragh-Hansen U、小田切優樹／部位特異的変異を施したアルブミンによる HSA 分子上の酸化部位の検索／日本薬学会第 123 年会／2003.3.／長崎
 3. 香月正明、C.T.G.Chung、小田切優樹／ α_1 -酸性糖蛋白質と UCN-01 との相互作用／日本薬学会第 123 年会／2003.3.／長崎
 4. 脇田 直樹、北村 健一郎、安達 政隆、細山田 真、遠藤 仁、富田 公夫、小田切 優樹／家族性腎性低尿酸血症における尿酸トランスポーター (URAT1) 遺伝子異常の解析／日本薬学会第 123 年会／2003.3.／長崎
 5. 出口 恒夫、楠原 洋之、長谷川真絹、遠藤 仁、小田切 優樹、杉山 雄一／インドキシル硫酸の腎取り込み過程における有機アニオントランスポーターの寄与／日本薬学会第 123 年会 2003.3.／長崎
 6. 松元一明、菊池真理、徳富芳子、西勝英、末永 綾香、小田切 優樹／ラット足蹠浮腫及び好中球活性に対する α_1 -酸性糖蛋白質の影響／日本薬学会第 123 年会／2003.3.／長崎
 7. 西 弘二、松下貞治、中城圭介、岩尾健範、芥照夫、棚瀬純男、小田切優樹／メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を用いた α_1 -酸性糖蛋白質の発現と精製／日本薬学会第 123 年会／2003.3.／長崎
 8. 脇岡基樹、C.T.G.Chung、末永 綾香、小田切 優樹／光アフィニティラベル法による AGP 分子上のフルニトラゼパム結合部位の同定／日本薬学会第 123 年会／2003.3.／長崎
 9. 伊藤隆志、増田宏之、高橋雅行、小田切優樹、杉山雄一／ラット体内動態の系統差に及ぼすトランスポーター、血清アルブミンの関与-アニオン性薬物を例に-／第 18 回日本薬物動態学会年会；シンポジウム／2003.10.／北海道
 10. 安楽 誠、篠原有祐美、新塘里奈、北村健一郎、

- 丸山 徹、富田公夫、小田切優樹／腎疾患時における酸化型アルブミンの変動とその構造・機能変化／第 18 回日本薬物動態学会年会；シンポジウム／2003.10.／北海道
11. 堺 政和、坂本裕一郎、中城圭介、小田切優樹、堀内正公／メイラード反応後期生成物 (AGE) と糖尿病合併症／第 18 回日本薬物動態学会年会；シンポジウム／2003.10.／北海道
12. 河野 陽介、出口 恒夫、末永 綾香、高館 明、小田切 優樹／ラット腎上皮細胞における尿毒症物質の取り込み輸送機構の解析：In vivo による検討／第 18 回日本薬物動態学会年会／2003.10.／北海道
13. 出口 恒夫、楠原 洋之、遠藤 仁、小田切 優樹、杉山 雄一／尿毒症物質の腎取り込み輸送におけるヒト有機アニオントランスポーターの関与／第 18 回日本薬物動態学会年会／2003.10.／北海道
14. 脇田 直樹、北村 健一郎、安達 政隆、實吉 拓、細山田 真、遠藤 仁、富田 公夫、小田切 優樹／家族性腎性低尿酸血症における URAT1 の検討／第 18 回日本薬物動態学会年会／2003.10.／北海道
15. 福田 光、安楽 誠、末永 綾香、小田切 優樹／光アフィニティラベル法による各種動物アルブミン分子上の薬物結合部位のトポロジー解析／第 18 回日本薬物動態学会年会／2003.10.／北海道
16. 中城 圭介、丸山 徹、堺 政和、堀内 正公、小田切 優樹／メイラード反応後期生成物 (AGE) の体内動態解析と糖尿病合併症との関連／第 18 回日本薬物動態学会年会／2003.10.／北海道
17. 竹元 瑞絵、出口 恒夫、末永 綾香、小田切 優樹／尿毒症物質 Hippuric acid の動態特性について／第 18 回日本薬物動態学会年会／2003.10.／北海道
18. Masaki Otagiri / "Enantioselectivity in Drug - Plasma Protein Interactions: Drug Binding in Diabetes" / 15th International Symposium on Chirality (ISCD-15) / 2003.10. / 静岡
19. 出口恒夫、寺崎哲也、楠原洋之、杉山雄一、小田切優樹／薬物動態変動因子としての尿毒症物質の動態特性の評価／第 25 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム／2003.11.／金沢
20. 異島 優、赤池孝章、金場俊二、松下貞治、芥照夫、宮本洋一、小田切優樹／ヒトアルブミン変異体を用いた新規 S-ニトロソ蛋白の作製と生物活性の解析／第 25 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム／2003.11.／金沢
21. 西 弘二、福永直子、芥 照夫、棚瀬純男、半田哲朗、小田切優樹／膜—水相界面における α_1 -酸性糖蛋白質の構造及び機能特性の評価／第 25 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム／2003.11.／金沢
22. 新塘里奈、安楽 誠、北村健一郎、富田公夫、小田切優樹／慢性腎不全患者から単離精製した血清アルブミンの構造・機能特性／日本薬学会第 124 年会／2004.3.／大阪
23. 磯崎孝也、出口恒夫、寺崎哲也、小田切優樹／血液脳関門を介した尿毒症物質の脳排出輸送機構に関する検討／日本薬学会第 124 年会／2004.3.／大阪
24. 出口恒夫、竹元 瑞絵、末永綾香、小田切優樹／腎障害時における尿毒症物質 Hippuric acid の動態解析／日本薬学会第 124 年会／2004.3.／大阪
25. 菊池真理、松元一明、中城圭介、安楽誠、末永 綾香、小田切 優樹／ α_1 -酸性糖蛋白質及びその脱糖化修飾体の体内動態／日本薬学会第 124 年会／2004.3.／大阪
26. 中城圭介、堺 政和、堀内正公、末永 綾香、小田切 優樹／メイラード反応後期生成物 (AGE) の肝取り込み機構／日本薬学会第 124 年会／2004.3.／大阪
27. 安楽誠、齋藤志織、西 弘二、Kragh-Hansen U、小田切優樹／異常アルブミン (variant) の構造特性について／日本薬学会第 124 年会／2004.3.／大阪
28. 松下貞治、異島優、棚瀬純男、小田切優樹／遺伝子組換えによるヒト血清アルブミンドメインの設計と機能評価／日本薬学会第 124 年会／2004.3.／大阪
- H. 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： Hb 小胞体が血球や血液凝固線溶系に与える影響

分担研究者 村田 満 慶應義塾大学医学部 内科 講師

研究要旨

ヘモグロビン小胞体 (Hb 小胞体) が血球や血液凝固線溶系に与える影響を、ヒト全血を用い *in vitro* で検討した。健常人末梢血を採取し、これに Hb 小胞体を添加し血小板機能、血液凝固線溶系の変化を観察した。(1) クエン酸採血の全血に Hb 小胞体を添加したあと血漿を採取し、特に DIC の診断の際に行われる検査項目について測定系への干渉がないか調べた。PT、APTT、フィブリノゲン、D-dimer、TAT、PIC、FM テスト、AT、PC、PS、t-PA-PAI 複合体、prothrombinF1+2、plasminogen、 α 2-antiplasmin、凝固 X 因子、凝固 XII 因子について測定した。その結果、Hb 小胞体は通常の凝固検査への影響は少ないが、一部の発色基質を用いた検査 (PLNG, α 2PI) に影響することが判明した。比濁法を用いた方法(ATIII)では異常高値となる可能性が示唆された。(2) Goerog's Thrombosis Test (GTT)を用いた総括的止血能/線溶の評価においては、Hb 小胞体は *in vitro* 止血能や血栓溶解能に大きな影響を与えないと思われた。(3) 全血血小板機能測定装置 PFA-100 を用いた *in vitro* 血小板機能の検討では Hb 小胞体は血小板機能に影響を与えなかった。

A. 研究目的

通常生体内で血液は凝固することなく流動性を保っているが、これは幾つかの生体機能が絶妙に働いて血液凝固/抗凝固のバランスが保たれている結果である。一般に血球や血管内皮細胞には、互いに結合しあう為の幾つかの接着分子や受容体があり、これらを介して細胞同士の接着がおこる。血液凝固因子は通常これらの細胞によって活性化されることはないが、一方では病的状態の細胞や異物表面は血液凝固因子の活性化を引き起こすことが知られている。人工赤血球を生体に投与する上で血液凝固因子や血球の活性化による血栓形成の可能性は重大な問題である。この点を明らかにするため、今年度は特に Hb 小胞体が血球や血液凝固線溶系に与える影響を検討した。すなわち健常人末梢血を採取し、これに Hb 小胞体を添加した際

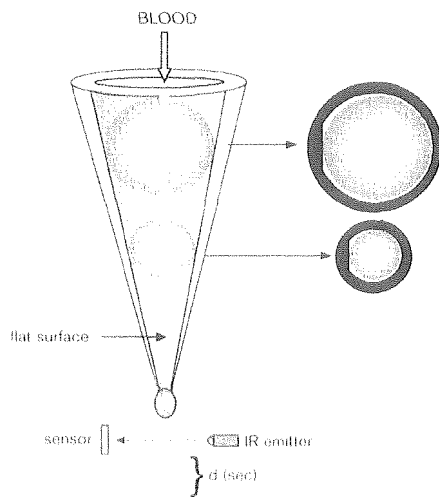
にみられる血液凝固線溶系と血小板機能の変化を観察した。具体的には (1) 凝固線溶系検査値への影響 (特に測定系に対して)、(2) 止血能、血栓溶解能への影響、(3) 血小板機能への影響、の 3 点について検討した。

B. 研究方法

- (1) Hb 小胞体の凝固線溶系への影響：測定系への影響を検討する為、クエン酸採血の全血に Hb 小胞体を添加したあと血漿を採取し、特に DIC の診断の際に行われる検査項目について検査値を調べた。PT、APTT、フィブリノゲン、D-dimer、TAT、PIC、FM テスト、AT、PC、PS、t-PA-PAI 複合体、prothrombinF1+2、plasminogen、 α 2-antiplasmin、凝固 X 因子、凝固 XII 因子について測定した。
- (2) 止血能、血栓溶解能の総括的評価： Goerog

Thrombosis Test (GTT, 図1) を用いて総括的に止血能/線溶能を評価した。この装置では抗凝固剤添加なしの全血が2つの小さなballの隙間を通過する際に血小板や凝固因子の活性化がおり、一定時間後に血栓が形成されるため、血流が閉塞する。閉塞までの時間 (occlusion time) を測定する。一方、放置すると線溶能によって一定時間後に血流が再開する (lysis time)。前者は血小板機能や凝固能、ヘマトクリットなどが決定要素であり、後者は総合的な線溶能を反映する事が予備検討で明らかにされている。Hb小胞体またはコントロールを添加したあと両者を測定した。

(3) 血小板機能への影響: 全血血小板機能検査装置である PFA-100 で評価した。この装置ではコラーゲン+エピネフリン、またはコラーゲン+ADP が固相化されたカセットにクエン酸全血を通過させる際に形成される血小板血栓により、血流が閉塞するまでの時間を測定する。血小板機能にほぼ依存しており、凝固系の影響は受けない。抗血小板薬服用時や血小板機能異常では延長し、血小板が活性化されていると短縮する。Hb小胞体またはコントロールを添加したあと閉塞時間を測定した。



Practical embodiment of the principle shown in Figure 2.

図1 Goerog Thrombosis Test (GTT)

C. 研究結果

(1) Hb小胞体の凝固線溶系への影響: Hb小胞体を全血に対して20%、50%の比率で混合した場合の測定値を、生理食塩水やcontrol vesicleを同率に混合した場合と比較した。その結果、Hb小胞体の混合はPT、APTT、フィブリノゲン、D-dimer、TAT、PIC、FMテスト、PC、PS、t-PA-PAI複合体、prothrombinF1+2には全く影響しないことが明らかとなった。しかしAT、plasminogenと $\alpha 2$ -antiplasminはHb小胞体の混合により、その値が上昇した。さらに凝固X因子、凝固XII因子ではHb小胞体の混合(20%、50%いずれも)により、測定が不能となった。これらより、Hb小胞体は通常の凝固検査への影響は少ないが、plasminogen、 $\alpha 2$ -antiplasmin、凝固X因子、凝固XII因子など、一部の発色基質を用いた検査に影響することが判明した。また比濁法を用いた方法(ATIII)では異常高値となる可能性が示唆された。

(2) GTTを用いたこの検討では、Hb小胞体を全血に対して20%、50%の比率で混合した場合、データにばらつきはみられるものの、occlusion timeにもlysis timeにも大きな影響は認められなかった(表1)。

表1 Hb小胞体が止血と血栓溶解能に与える影響
(抗凝固剤なし)
- Hemostatmeter

	O T (sec)	L T (sec)
無添加	300.1	2555
生食20%	356.8	2446
cont vesicle20%	319.8	1896
HbV20%	147.5	2607
生食50%	352.0	3170
cont vesicle50%	279.4	1595
HbV50%	300.8	2206

(3) 血小板機能への影響：PFA-100を用いたin vitro 血小板機能の検討では全血の希釈により occlusion timeは延長したが、Hb小胞体そのものの occlusion timeへの影響は明らかではなかった。20%、50%いずれの場合も通常血球計測装置 (CBC counter)でのヘモグロビン値を著増させた(表2)。

表2 Hb小胞体が血小板依存性血栓形成能に与える影響 (クエン酸全血)

- Platelet Function Analyzer (PFA-100) -

	collagen / ADP occlusion time (sec)	WBC (/ml)	Hgb (g/dl)
無添加	94	3700	12.6
生食0%	129	2700	10.4
cont vesicle20%	119	3100	10.8
HbV20%	137	—	16.6
生食50%	269	1800	6.4
cont vesicle50%	>300	2200	7.5
HbV50%	>300	—	22.7

D. 考察

(1) Hb小胞体は通常の凝固検査への影響は少ないが、plasminogen、 α 2-antiplasmin、凝固X因子、凝固XII因子など、一部の発色基質を用いた検査に影響することが判明した。また比濁法を用いた方法(ATIII)では異常高値となる可能性が示唆された。これらはHb小胞体を使用される状況(ショックやDIC)ではしばしば用いられる検査であり、検査値の解釈に重要な知見を与えると同時にサンプリング法や測定法の改良の必要性を示唆する。従来報告によれば血清の生化学検査でもHb小胞体の混在時に認められる測定障害は、測定前にHb小胞体を超遠心分離すれば殆ど回避できるので(*Clin.*

Chem. Lab. Med. 41, 222-231, 2003)、本研究で認められた各種障害作用も同様の処置をすれば回避できる可能性がある。(2) Hb小胞体は総括的にみて凝固や線溶能に大きな影響を与えないようである。ただし、今回の結果はin vitroでの系、すなわちHb小胞体が直接これらに与える影響のみを観察しており、生体内に投与された際に起こる他の生体反応による凝固系への影響を無視している。この点は今後の課題である。(3) Hb小胞体は血小板機能に大きな影響を与えなかった。ただし、同様に今回の結果はin vitroでの系、すなわちHb小胞体が直接血小板に与える影響のみを観察している。今後、凝固血小板系への影響をさらに詳細に検討するとともに in vivoでの血球系/凝固線溶系への影響、さらに血栓形成能について検討していきたい。

E. 結論

Hb小胞体は通常の凝固線溶検査への影響は少ないが、一部の発色基質を用いた検査(PLNG、 α 2PI)に影響する可能性が示された。また比濁法を用いた方法(ATIII)では異常高値となる可能性がある。Hb小胞体はin vitro止血能や血栓溶解能や血小板機能に大きな影響を与えないと思われた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

該当なし

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 (Hb 小胞体) の微小循環における挙動と酸素運搬の全身への影響の検討
－Hb 小胞体分散溶媒の最適化の検討－

分担研究者 合田 亘人 慶應義塾大学医学部 医化学教室 講師

研究協力者 菅沼 和弘 慶應義塾大学医学部 医化学教室 助手

研究要旨

本研究班で作成された人工赤血球 (Hb 小胞体) ならびにその分散溶媒の生体適合性を検証する目的で、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 小胞体溶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。40%脱血ショックにより低下した全身血圧は、生理的食塩水に分散した Hb 小胞体(Hb 小胞体/PS)投与により全身血圧は急速に回復しその効果は少なくとも 1 時間は維持することができた。Hb 小胞体をアルブミン溶液に分散した場合(Hb 小胞体/Alb)にはこの昇圧効果の増強が認められた。また、胆汁排泄流量に関しても Hb 小胞体/PS 投与により著明な改善が認められた。一方、肝微小循環に対しては Hb 小胞体/PS 投与ではクッパー細胞の活性化によると考えられる類洞閉塞による有効類洞数減少傾向が認められたが、Hb 小胞体/Alb を投与した場合にはこのような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 小胞体による全身性ショック改善効果はアルブミンに分散することで、その適合性・有用性が更に上昇するものと考えられた。

A. 研究目的

平成 15 年度の研究は、平成 14 年度までに行った人工赤血球の構成成分である脂質二重膜の最適化に続き、主に Hb 小胞体の分散溶媒の最適化に対する検討を行った。本研究では実際の臨床現場での使用状況に近いと考えられる 40%程度の脱血性ショックに対してどの分散溶媒を使用すれば適切な Hb 小胞体の投与効果が認められるかを、全身循環動態変化のみならず Hb 小胞体投与により最も影響を受ける肝臓における肝内微小循環動態および胆汁排泄機能変化を経時的に観察することで検討し、その生体適合性を明らかにしていくことを目的とした。

B. 研究方法

Wistar 系雄性ラット (290g±30g) を使用し、ペントバルビタールを筋肉内投与し麻酔後、Wigger's hemorrhagic shock model に従い循環血液量の 40%相当の脱血を 10 分間かけて頸動脈より行うことで全身血圧を 40mmHg 以下のショック状態に 15 分間維持し、その後 10g/dL の Hb 小胞体溶液を 1.2・1.4mL/min で 5 分間かけ頸動脈より返血した。Hb 小胞体投与前後の全身平均血圧変化を頸動脈に挿入したカテーテルを介して経時的にモニタリングした。また、Hb 小胞体投与により最も影響を受ける臓器の一つである肝臓における胆汁排泄機能変化(胆汁排泄流量)を総胆管に PE10 を留置することで、また肝類洞微小循環動態変化を共焦点顕微鏡による *in vivo imaging*法により経時的に観察した(図 1)。

更に、本研究では Hb 小胞体の分散溶媒の適合性を検討するために、① 生理的食塩水(PS)、② 酸素を運搬せず、浸透圧が Hb 小胞体とほぼ同程度と考えられるリポソーム溶液(生理的食塩水分散)、③ Hb 小胞体/PS(Hb 小胞体を生理的食塩水に分散)、④ アルブミン溶液(Alb)、⑤ Hb 小胞体/Alb(Hb 小胞体をアルブミン溶液に分散)をそれぞれ使用しその効果を比較検討した。

倫理的配慮：実験動物に関しては、十分な麻酔下にて実験を試行し必要以上の苦痛を与えないように十分な配慮を行った。

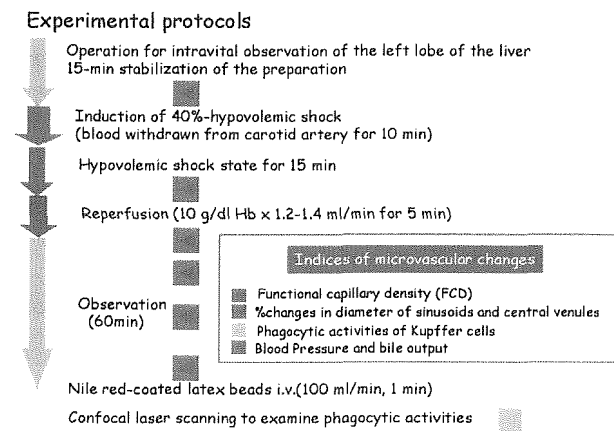


図 1 Experimental Protocol

C. 研究結果・考察

40%ショックモデルにおいて Hb 小胞体/PS 投与群では返血後速やかに全身平均血圧の回復が認められ、その持続効果が少なくとも 1 時間以上認められた(図 2)。これに対して、PS 投与群およびリポソーム投与群では、平均血圧は投与後一過性に約 80%程度の回復が認められるものの持続せず、その後約 60-70%の低値を示すことが明らかになった。一方、酸素運搬能のない Alb 溶液単独投与でも Hb 小胞体/PS 投与群と同等の血圧回復効果が認められた。Hb 小胞体/Alb 投与群では、Hb 小胞体/PS 群あるいは Alb 単独投与群と比較し相加的な血圧の上昇・維持が認められた(図 2)。

以上の結果より、酸素運搬と浸透圧がそれぞれ別の機序であるが相加的にショック後の血圧の回

復・維持に役立っていることが明らかになった。

次に、Hb 小胞体投与による肝臓機能回復効果を解析するために、酸素運搬の指標と考えられる胆汁排泄流量を経時的に測定した。その結果、Hb 小胞体/PS 投与により胆汁排泄流量はほぼショック前の排泄流量まで回復が見られた(図 3)。この効果は、PS あるいはリポソーム投与群では減弱し、回復率はショック前の約 75%に留まった。一方、Alb 単独および Hb 小胞体/Alb 投与群では胆汁排泄流量はショック前と同等あるいはそれを越えたレベルまで回復が認められた。また、これらの回復効果は、Hb 小胞体/PS 投与のそれよりも増強が認められた(図 3)。

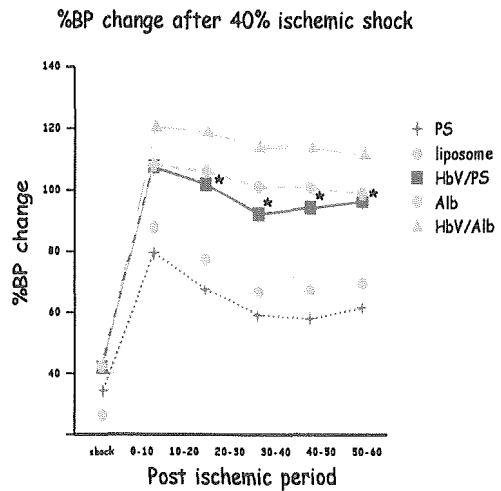


図 2. ラット 40%脱血ショック後の全身平均血圧の変化。

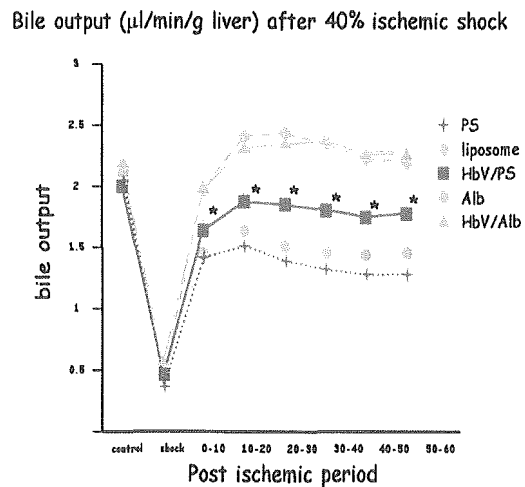


図 3. ラット 40%脱血ショック後の胆汁排泄量の変化。

以上の結果により、肝臓における胆汁排泄機能は、全身血圧調節機構同様に酸素運搬能と浸透圧効果がそれぞれ別のレベルで作用しているが、浸透圧効果の方が酸素運搬能と比較して大きく相加的でないことが明らかになった。

最後に、ショック後の Hb 小胞体投与による肝類洞微小循環動態に対する効果を、共焦点顕微鏡を用いた *in situ in vivo imaging* 法により検討した。その結果、Hb 小胞体/PS 投与群では肝内類洞微小循環において観察視野内の約 60-70%に部分的な血流障害が認められた(図 4)。一方、Alb 単独あるいは Hb 小胞体/Alb 投与群では、Hb 小胞体/PS において見られた類洞血管における不均一な循環動態が認められず、ほとんど全ての類洞において血流循環が維持されていた(図 4)。

FCD in post-ischemic hepatic microvascular damages

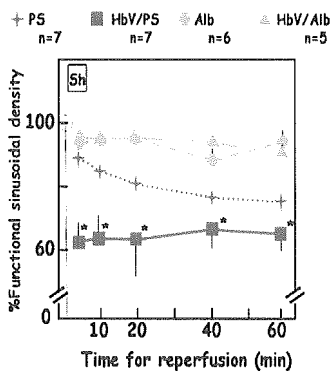


図 4. Hb 小胞体投与による肝微小循環における有効類洞血管床 (FCD: Functional Capillary Density) の変化。

Sinusoidal diameters in post-ischemic hepatic microvascular damages

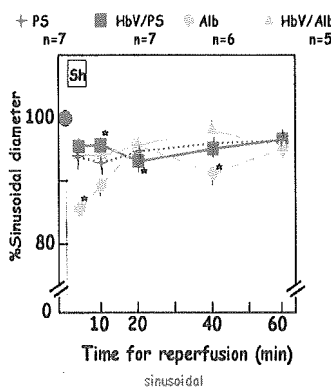


図 5. Hb 小胞体投与による循環類洞血管径の変化。

一方、類洞血流が維持されている血管床における血管径の変化を画面上にて測定したところ、生食投与群を含め溶液の性質に関係なく類洞血管径の有意な変化は認められなかった(図 5)。

以上の結果より考えて、Hb 小胞体/Alb あるいは Alb 単独投与群と比較して Hb 小胞体/PS 投与群の方がショック後の胆汁排泄流量維持に対してより有効に作用しなかった原因は、投与液は膠質浸透圧を示さないので循環血液量が回復せず、肝臓の灌流圧も低下して受動的に類洞が閉塞した可能性が考えられる。或いは、Hb 小胞体投与により肝内レジデントマクロファージである Kupffer 細胞の活性化に起因した Kupffer 細胞の膨大化により類洞が閉塞しやすくなり結果的に肝内有効類洞血管床が減少したためであると考えられた。

D. 結論

ショック後の全身血圧、胆汁流量、Functional Sinusoidal Density の結果から、40%脱血ショックモデルにおいても、人工赤血球の分散媒としてはアルブミン溶液を使用するのが最適であると考えられた。また、アルブミン溶液を使用することで血中滞留時間の延長や全身状態の一層の改善が期待されると考えられた。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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：血液代替物の安全性指針、臨床試験手順作成に関する研究

分担研究者 高折 益彦 東宝塚さとう病院 名誉院長

研究要旨

1. 作成された人工赤血球 (Hb 小胞体) 各ロット毎に塗沫検鏡、好氣的・嫌氣的培養を行ないその無菌性について検討し、いずれの製品についても完全無菌であることを確認した。
2. 人工赤血球開発に関係する内外主要施設にアンケートを送り、また国内の一部施設については現地におもむき安全性に必要な項目を検討し、研究分担者に検討を依頼することにつとめた。

A. 研究目的

1. 早稲田大学理工学部を中心に作成されている人工血液の安全性の一部としてその無菌性を確認、Hb 小胞体を動物に投与する研究で得られる成績への細菌汚染の影響の排除を目的とした。
2. 過去の研究において Hb 小胞体の安全性と有効性とについて検討されてきた諸点以外に必要な検討点を洗いだし、研究班内の研究者で、あるいはさらに研究者を追加して確認すべきか検討することの調査を目的とした。

B. 研究方法

1. 0℃ 下に保存され、送付された Hb 小胞体、ならびにヒト赤血球から遊離し、滅菌され Hb 小胞体に包埋される直前のヘモグロビン溶液、それぞれにつき、液体培地に注入、寒天培地に塗布した。そしてそれぞれの培地で 37℃ の好氣的、嫌氣的状態下での 7 日間培養をそれぞれ 2 回重複して施行した。一部はガラス板上に塗布して検鏡した。
2. 代用血液に関係した過去の発表論文の研究者、あるいは今後この方面での研究を行なう可能性を有する国内外の研究者を選出し、文書にて現在の研究の状況、ならびに今後の研究の計画について調査した。そして我々の研究班における研究実施

状況に対しての批判、助言を求めた。これらの調査の結果を参考に現在推進している研究項目への追加、修正を加えた。

C. 研究結果

1. 検査対象となった Hb 小胞体、ヘモグロビン溶液ともにそれぞれ 2 ロットであったが、そのいずれにおいても、好氣性菌、嫌氣性菌、真菌の培養試験において、また塗沫検鏡試験においても陰性であった。
2. 多くの研究者、研究施設からの回答をもとに検討した結果、すでに本研究班において Hb 小胞体の安全性について研究、検討されてきた項目以外に消化管の蠕動運動、Hb 小胞体の臓器蓄積状態の詳細な解析、またその蓄積にもとづく肝機能への影響、さらに脳内への蓄積による生体行動変調の有無、運動機能への影響を検討することの重要性が明かになった。また Hb 小胞体反復投与にともない生体内に抗体産生が生じるか検討することの必要性も明かとなった。さらに *in vitro* での検討のみならず、またラットのごとき小動物のみならず犬のごとき中動物での血液凝固系、造血臓器機能への影響も検討することの必要性も認められた。

D. 考察

製品の無菌性に関しては今後も抜取検査を続けて確認して行くことが必要である。Hb 小胞体製造過程も次第に一貫した工業生産性をおびてきた。そのため無菌性は一段と確実なものとなると思われた。しかしさらなる完全性を考慮して今後は高気圧、放射線照射滅菌法も加えることも視野に入れるべきものと思われる。生体への投与にともなう前臨床試験においては、すでに中動物での研究を行なっているが、これら Hb 小胞体投与動物の長期生存下での観察を試みるべきである。とりわけ生体内 Hb 小胞体の酸素運搬能の有効性を含めて、その生体内分布を明確にすることの重要性が求められる。また代謝系への影響についてはヒトの代謝系に最も近いといわれるミニ豚を対象としての研究が必要と思われる。

E. 結論

現在用いている原料ヘモグロビン溶液の滅菌方法、濾過法により Hb 小胞体に対する無菌性は確保されていることが確認された。今回の諸施設、諸研

究者を対象とした調査によって得られた結果をもとに、今後は中動物を対象として Hb 小胞体の安全性についてより高度の、そしてより実際的な臨床使用を考慮した検討を行なう重要性が示された。

F. 研究発表

論文発表

1. Takaori, M. : Approach to clinical trial considering medical ethics and efficacy for HbV, liposome encapsulated hemoglobin vesicle. *Proc. IX Int. Symp. Blood Substitute*, Springer-Verlag (2004) (in press).
2. Takaori, M.: Studies on red cell substitute in Japan and perspective in the future. *Proc. XIII Keio Univ. Int. Symp. Life Sci. & Med.*, Springer-Verlag (2004) (in press).
3. 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**,4317-4325 (2004) (in press).

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： 1. ヘモグロビン小胞体の無菌的製造と試料供給
 2. ヘモグロビン小胞体投与後のサイトカイン放出過程の解析
 3. ヘモグロビン小胞体による 40%交換輸血後の脾臓の組織病理

分担研究者 土田 英俊 早稲田大学 名誉教授 / 理総研 顧問研究員
 研究協力者 武岡 真司 早稲田大学 理工学部 助教授
 酒井 宏水 早稲田大学 理総研 助教授
 宗 慶太郎 早稲田大学 理総研 講師

研究要旨

(1) ヘモグロビン(Hb)小胞体の人工赤血球としての安全度評価が本研究班の目的である。これを実施するための Hb 小胞体を無菌的雰囲気にて効率高く調製した。平成 15 年度は計 5.4 L (4 バッチ)の Hb 小胞体を調製した。何れのバッチも無菌試験に合格、エンドトキシン値は 0.2 EU/mL 以下が確認された。その他、粒子径、メト化率、HbCO 含量、酸素親和度など諸物性値も再現性よく規格に合致した。(2) Hb 小胞体を Wistar rat に単回投与した後の血中サイトカイン(9 種類)の産生挙動をビーズ固相サンドイッチ ELIZA 法フローサイトメトリーにより測定した。Hb 小胞体の投与には殆どサイトカインの産生は殆ど無かった。LPS 単独投与では炎症反応により各種サイトカインの顕著な増大が見られたが、LPS と Hb 小胞体を同時に投与するとサイトカイン産生量が顕著に低下した。(3) 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、組織病理学的検討では Hb 小胞体がマクロファージに捕捉されるだけでなく、造血作用の亢進により赤芽球が増大していることも理由として考えられた。また、ヘマトクリット値が 7 日後に正常値に復すことから、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。

A. 研究目的

1. ヘモグロビン小胞体の無菌的製造と試料供給

A. 研究目的

Hb 小胞体の製造技術は既に確立している。製造管理には物性値の再現度に加え、無菌状態、エンドトキシン(リポポリサッカライド, LPS)含量が基準値以下であることなど製剤としての要件を満たすことが重要となる。平成 15 年度は製造実績を重ね無菌的製造確認を目的とした。平成 14 年度に確立した LPS 定量法により、各製造工程での LPS 混入のないことを確認、また得られた試料について

無菌試験を実施し、規格に合致した試料を本研究班員に配布し、安全性試験に供することを目的とした。

B. 研究方法

Hb 小胞体の調製はクリーンルーム(クラス 10000)内で実施。得られた試料について界面活性剤可溶化法による LPS 定量(リムルス試験)、無菌試験(BML 社提出)を実施した。

C. 結果および考察

平成 15 年度に実施した計 4 バッチの収量、LPS 含量、および無菌試験結果を表 1 にまとめた。LPS 含量は何れも 0.2 EU/mL 以下であり、全てのバッチについて無菌が確認された。

バッチ	収量 (L)	LPS 含量 (EU/mL)	無菌試験
1	2.2	0.2	合格
2	1.9	0.1	合格
3	0.5	<0.1	合格
4	0.8	<0.1	合格

日本薬局方による LPS 規格値は、下式により設定される。

$$\text{LPS 規格値} = K/M \quad (1)$$

K: 体重 1kg 当りの LPS 量 (EU/kg)

静脈内投与の場合 K = 5.0 (EU/kg)

M: 体重 1kg 当り 1 時間以内に投与する注射剤最大量 (mL/kg)

これより投与量により規格値は表 2 のように設定される。

単位	投与量 (mL)	M* (mL/kg)	規格値 (EU/mL)
1	200	3.3	1.4
2	400	6.7	0.7
5	1000	16.7	0.3

*体重 60 kg で換算

従って、本法で調製された試料は高容量投与においても LPS の影響なく評価できると判断される。

D. 結論

平成 15 年度は計 5.4L の Hb 小胞体を調製した。何れのバッチでも無菌試験に合格、LPS 混在量は 0.2 EU/mL 以下が確認された。その他、粒子径、メト化率、HbCO 含量、酸素親和度など諸物性値

も再現性よく規格に合致することを確認した。得られた試料は安全度評価のために当研究班員に配布することができた。

2. ヘモグロビン小胞体投与後のサイトカイン放出過程の解析

A. 研究目的

サイトカインは免疫細胞から産出される糖蛋白質群(分子量 5~100 kDa)の総称であり、細胞間の情報伝達物質として多様な生理活性を有していることから、免疫反応を理解する情報源となる。本研究では、Hb 小胞体および比較としてリポポリサッカライド(LPS)をラットに投与した場合の血中サイトカイン濃度を測定し、Hb 小胞体(HbV)の安全性評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

投与試料

- (1) Hb 小胞体 (HbV, [Hb] = 10 g/dL, in saline), 20 mL/kg
- (2) LPS (0.3 mg/mL、*E. coli* 由来 S-type 0111:B4 sigma 製), 20 mL/kg
- (3) HbV/LPS (上記 HbV 10 mL と LPS 溶液 0.5 mL (6mg/mL)を混合), 21 mL/kg

投与、採血法

雄性 Wister 系ラット(体重 250±30 g)、計 15 匹に対しエーテル麻酔下、ラット尾静脈より留置針(24G)を使用して試料を投与した。投与前、投与後、1、3、6、12、24 時間後に尾静脈に留置針を刺入し、Hct 測定用ガラスキャピラリー3 本分を採血、直ちに遠心分離(12000 rpm、5 min)し、Hct を測定後上清を回収、サイトカイン測定用に凍結保存(-80 °C)した。また 24 時間後の採血終了後門脈より採血、直ちに遠心分離(6000 rpm、15 min)し上清を得た。HbV 投与群はさらに超遠心分離(33000 rpm、30 min)

し、Hb 小胞体を完全に沈降させ、透明な血清を得た。これは血液生化学検査の検体とした。

サイトカイン定量

ビーズ固相サンドイッチ ELISA 法フローサイトメトリーにより、計 9 種類のサイトカイン(IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、GM-CSF、INF- γ 、TNF- α)の同時定量を行った(Bio-Plex Protein Array System、Bio-Rad 社製)。蛍光標識された 1 次抗体結合ビーズ(計 9 種類の混合)に血漿検体を添加しサイトカインを結合、次に 2 次抗体を反応させ更に蛍光分子アビジンを結合させた。フローサイトメトリーによりビーズの種類とアビジンの定量によりサイトカインの種類と血中濃度(pg/mL)を測定した(図 1)。

C. 結果および考察

図 2 に血球数の推移を示した。白血球数は投与から 3 時間で最も減少し、HbV 投与群では投与前

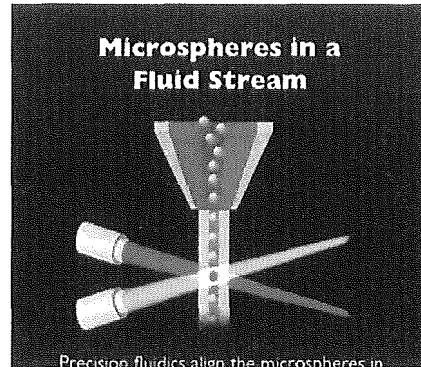
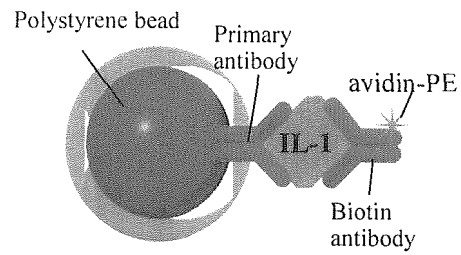


Fig. 1. Each cytokine is sandwiched with a primary antibody conjugated on a fluorescent-labeled polystyrene microsphere (5.5 μm) and a secondary antibody. After the reaction with adipin-PE, the mixture of microspheres is analyzed by flow-cytometry equipped with two laser beams excitation and fluorescence measurement to distinguish and measure the sandwiched cytokines.

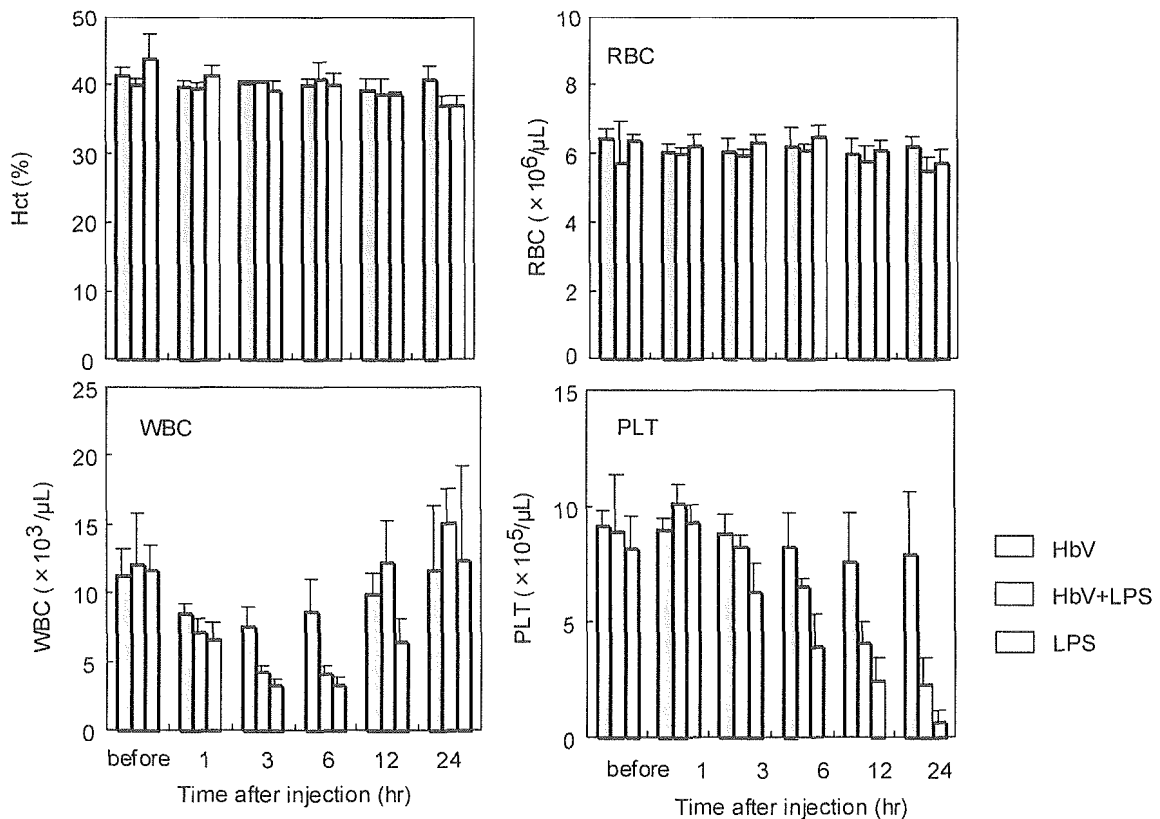


Fig. 2 Changes in hematocrit and blood cell counts after infusion of HbV, LPS, and HbV/LPS (20 mL/kg, [Hb] = 10 g/dL, [LPS] = 6 mg/mL)

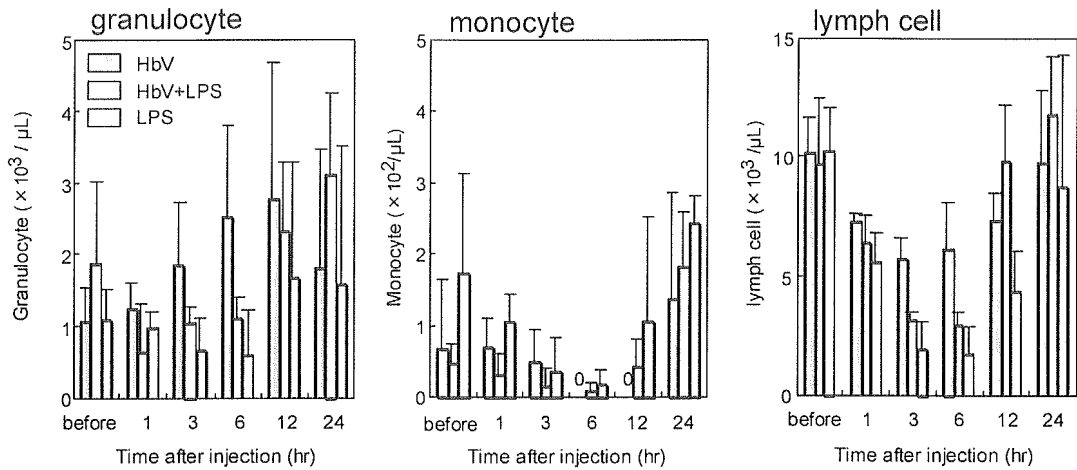


Fig. 3. Changes in the number of granulocytes, monocytes, and lymph cells after infusion of HbV, LPS, and HbV/LPS (20 mL/kg, [Hb] = 10 g/dL, [LPS] = 6 mg/mL).

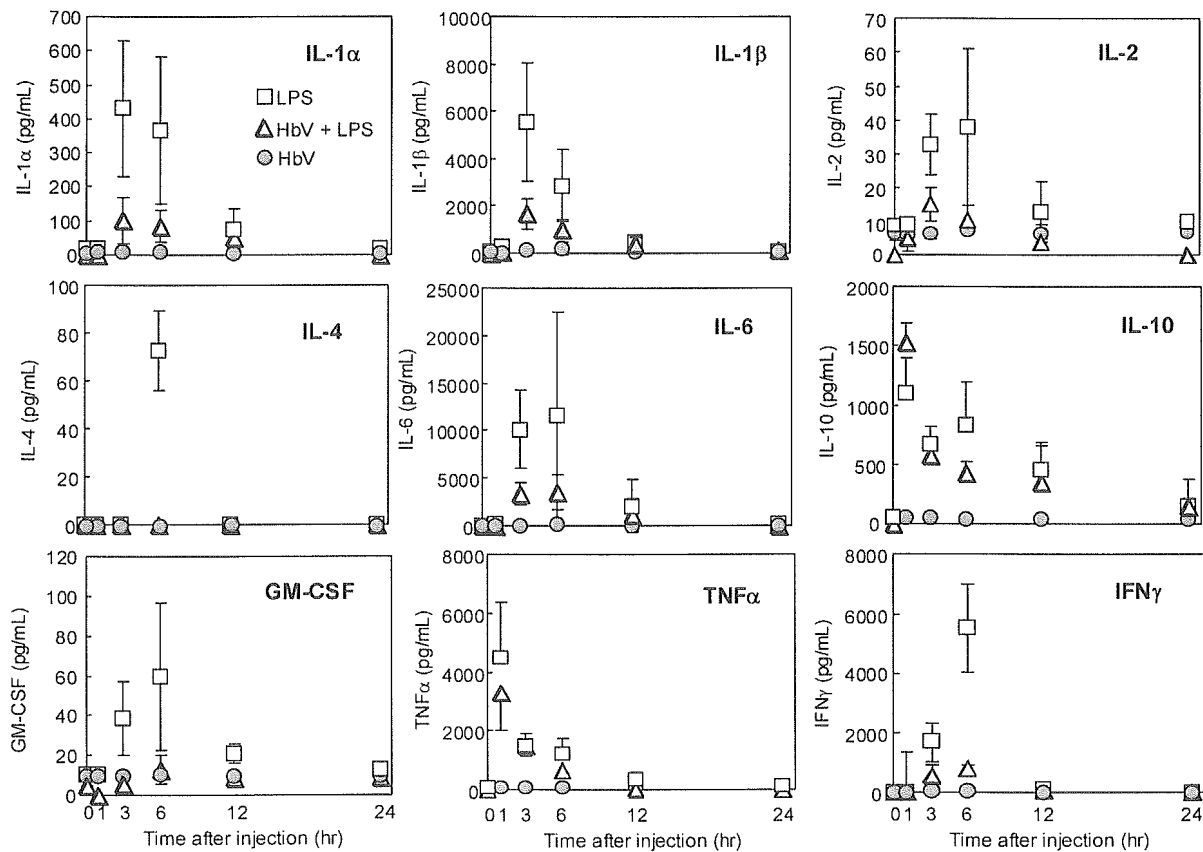


Fig. 4 Time courses of cytokine production after infusion of HbV, LPS, and HbV/LPS (20 mL/kg, [Hb] = 10 g/dL, [LPS] = 6 mg/mL).

の70%までの低下に留まったが、LPS群、HbV/LPS群は25%程度にまで減少した。しかし両群とも24時間後には投与前の血球数に近づいた。血小板数はHbV群では大きな変化は見られなかったが、LPS

群、HbV/LPS群では低下し続けた。白血球分画の推移では、単核球とリンパ球濃度は、投与から3~6時間後に低下する傾向が見られた。リンパ球の減少はLPS群、HbV/LPS群で顕著であった(図3)。

LPS 群、LPS/HbV 群では、ALT、AST、LDH 等の値が増加していることからラット肝臓の障害が明らかであった。さらに投与 24 時間後のラット肝表面に、白斑が多数見られ、LPS 投与により播種性血管内血液凝固(DIC)を生起し血流停止により壊死した領域と考えられた。これは HbV 群のラットには見られなかった。

LPS 群では投与開始時から 6 時間後まで各サイトカイン血中濃度が大きくなった(図 4)。これは LPS により敗血症を起こした結果である。LPS がマクロファージに捕食され IL-1、TNF- α の産生が増加し、逆にこのサイトカイン合成抑制因子である IL-10 も産生されたと考えられる。その後免疫系の活性化に伴い、IFN- γ と GM-CSF が増加しマクロファージ機能を増強していると考えられる。その結果マクロファージ抑制因子を持つ IL-4 も産生される。9 種類のサイトカインが産生されはじめる時間は図 5 のようであった。

他方、HbV 群ではサイトカインの増大は LPS 群に比較すると極めて低い値となった。これは Hb 小胞体の品質管理が保たれ、LPS が殆ど入っていないこと(0.1 EU/mL 以下、1 EU/mL = 100 pg/mL)、また LPS ほど免疫系を活性化しないためと考えられる。過去に Naval Research Laboratory (USA)で展開された liposome-encapsulated Hb (LEH)をマウスに投与すると、IL-6 の顕著な上昇が見られたことが報告されているが (Rollwagen et al., Exp. Hematol. 1996;24:429-436)、HbV の投与では全く上昇は認められなかった。

HbV/LPS 群では、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、GM-CSF、および IFN- γ で産生量が LPS 群よりも低下した。しかし IL-10、TNF- α は同等の産生量であった。産生量が低下したのは、HbV/LPS 混合溶液を調製した際に、LPS が Hb 小胞体の脂質二分子膜に挿入され、LPS の活性が低下したことも要因の一つと考えたが、今回の LPS 投与量では殆どが遊離している状態であることが LPS の定量から明らかになったので、Hb 小胞体が敗血症時の炎症反応を抑制する作用があると考えられるべきと思われる。

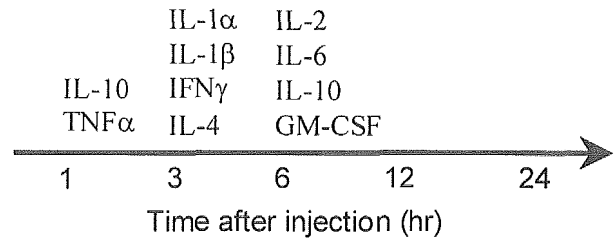


Fig. 5 Time course of cytokine production after infusion of LPS (6 mg/mL).

D. 結論

ビーズ固相サンドイッチ ELISA 法フローサイトメトリーにより、Hb 小胞体投与後の合計 9 種類のサイトカインの産生挙動を観測することができた。Hb 小胞体の投与には殆どサイトカインの産生は殆ど無かった。LPS 単独投与では炎症反応により各種サイトカインの顕著な増大が見られたが、LPS

3. ヘモグロビン小胞体による 40%交換輸血後の脾臓の組織病理

A. 研究目的

これまでの Hb 小胞体の投与試験で、Hb 小胞体が最終的に細網内皮系に捕捉され順次代謝分解、消失する過程が確認されている。このとき、脾臓重量の一過性増大や鉄の沈着が確認されているがその影響については未だ不明な点が多い。ラットの脾臓は造血の盛んな臓器であることが知られているので今回は、脾臓をギムザ染色し造血機能について組織病理学的な検討を行った。

B. 研究方法

Wistar 系ラット(180-200g, ♂)に対し、ネンブタール腹腔内投与麻醉下、右頸動脈に挿管。1mL の脱血と 1mL の試料溶液の投与を繰返し、40%の血液を交換した。縫合して覚醒させ最長 2 週間まで生存させた。試料溶液として Hb 小胞体をリコンビナントアルブミン(rHSA)に分散させた溶液

(HbV/rHSA, [Hb] = 8.6 g/dL)および rHSA の投与試験を行った。血液交換後 1, 3, 7, 14 日後に犠牲死させ、脾臓重量の測定、組織病理学的検討を行った。また、血清中のエリスロポエチンの定量(RIA2 抗体法、BML 社)と脾臓組織切片のギムザ染色を行い、造血の状態について検討した。

C. 結果および考察

平成 14 年度までの検討の結果、HbV/rHSA 投与群だけでなく rHSA 投与群にも脾臓重量が増大した。しかし、rHSA の体内動態(ラット)に関する文献によれば、rHSA は脾臓には殆ど移行しないので(岡野ほか, 薬理と治療 1997;25(suppl):207-218)、rHSA の捕捉が原因では無いと考えられた。エリスロポエチンの濃度推移を測定したところ、両群ともに有意な増大がみられた(図 6)。HbV/rHSA 群では、前値 18 ± 4 IU/L から血液交換後 6 時間で 143 ± 42 IU/L への増大に留まったが、rHSA 群では 378 ± 219 IU/L にまで増大した。7 日後には両群ともに正常値に復した。エリスロポエチン濃度は貧血状態の指標になりうるので、rHSA に比較して HbV/rHSA で血液交換した場合の方がより酸素供

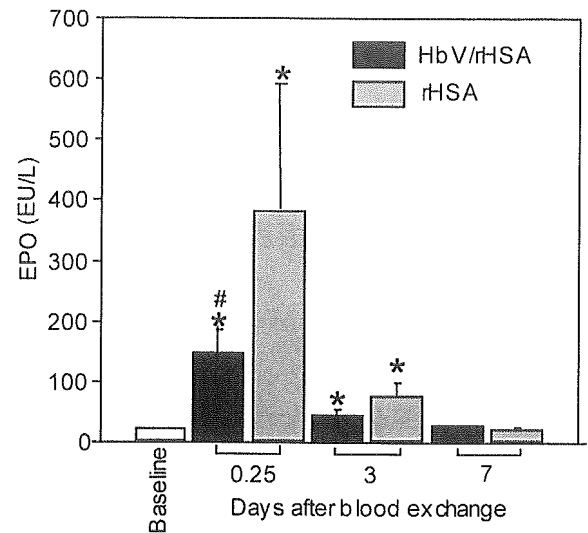


Fig.6 Serum erythropoietin (EPO) activity after 40% exchange transfusion with HbV/rHSA or rHSA. The values are mean \pm SD. *Significantly different from the saline group ($p < 0.01$); #significantly different from the rHSA group ($p < 0.01$).

給量が維持されていることが解る。しかし、両群ともにエリスロポエチンは有意に増大しており、造血作用を刺激していることが示唆された。事実、両群ともに 7 日後にヘマトクリットが血液交換前と同等の値に回復していることを確認した(平成 14 年度成果)。

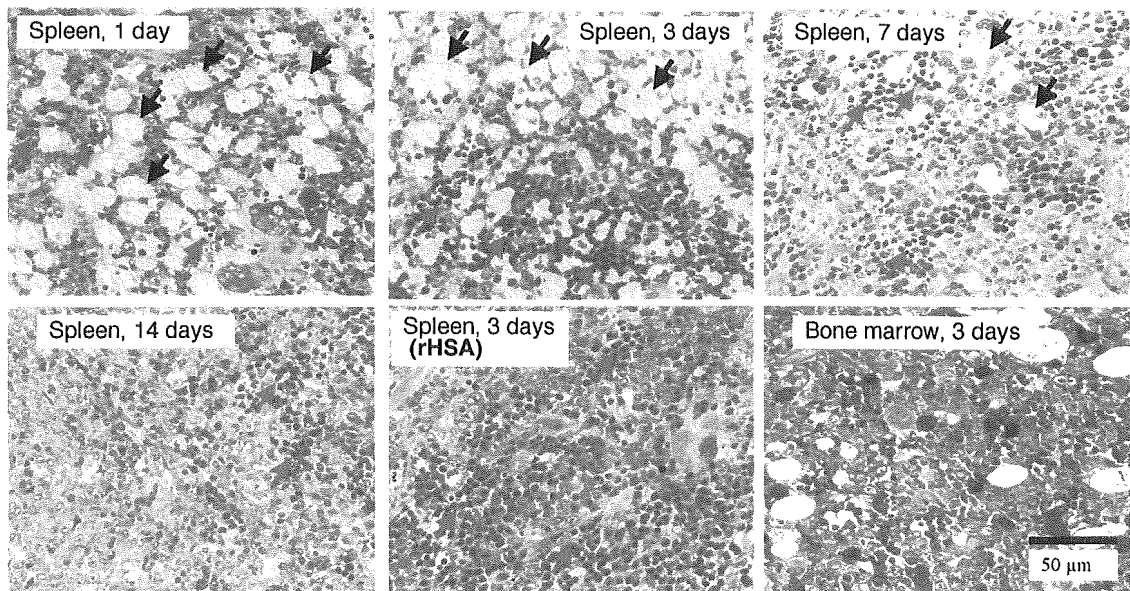


Fig. 7 Histology of rat spleen and bone marrow after exchange transfusion with HbV/rHSA or rHSA alone (Giemsa staining). The presence of the accumulated HbV particles are seen as light-blue domains indicated by black arrows. The nests of erythroblasts were seen as indicated by red arrows.

ラット脾臓は造血が盛んな臓器であることが知られているので、脾臓組織切片をギムザ染色して観察したところ、両群ともに赤芽球が多量に存在していることが明らかになった(図 7)。従って、HbV/rHSA を投与した場合の顕著な脾臓増大は、捕捉された Hb 小胞体の重量だけでなく、造血作用の亢進によることも考えられる。

D. 結論

ラットの循環血液量の 40% を HbV/rHSA で交換すると脾臓重量の増大が認められるが、これは Hb 小胞体がマクロファージに捕捉されることだけでなく、造血作用の亢進により赤芽球が増大していることも理由として考えられた。また、ヘマトクリットが 7 日後に正常値に復することからも、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できた。

研究業績

1. 論文発表

1. C. Contaldo, S. Schramm, R. Wettstein, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Leunig, A. Banic, D. Erni. Improved oxygenation in ischemic hamster flap tissue is correlated with increasing hemodilution with Hb vesicles and their O₂ affinity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H1140-H1147 (2003).
2. H. Sakai, Y. Suzuki, M. Kinoshita, S. Takeoka, N. Maeda, E. Tsuchida. O₂-Release from Hb-Vesicles Evaluated Using an Artificial Narrow O₂-Permeable Tube: Comparison with RBC and Acellular Hb. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H2543-H2551 (2003).
3. Y. Teramura, H. Kanazawa, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida. The prolonged oxygen-carrying ability of Hb vesicles by coencapsulation of catalase *in vivo*. *Bioconjugate Chem.* **14**, 1171-1176 (2003)
4. K. Sou, Y. Naito, T. Endo, S. Takeoka, E. Tsuchida. Effective encapsulation of proteins into size-controlled phospholipid vesicles using freeze-thawing and extrusion. *Biotechnol Prog.* **19**(5), 1547-52 (2003).

5. 久本秀治、酒井宏水、福富一平、宗慶太郎、武岡真司、土田英俊. 酸素輸液へモグロビン小胞体に混在するリポポリサッカライドの定量法. *人工血液* **11**, 173-178 (2003).
6. H. Sakai, S. Hisamoto, I. Fukutomi, K. Sou, S. Takeoka, and E. Tsuchida. Detection of Lipopolysaccharide in hemoglobin-vesicles by *Limulus* amoebocyte lysate test with kinetic-turbidimetric gell clotting analysis and pretreatment with a surfactant. *J. Pharm. Sci.* **93**, 310-321 (2004).
7. H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, M. Yamamoto, E. 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).
8. 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).
9. 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.* (submitted, Nov. 2003).

(総説、著書など)

10. 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)
11. 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)
12. 土田英俊. 臨床応用可能な酸素輸液(人工赤血球)の創製に関する研究. *人工臓器* **32**, 29-36 (2003).
13. 酒井宏水、土田英俊. 海外文献紹介"赤血球代替物を用いる蘇生法による外傷後過剰炎症反応の変化. *人工血液* **11**, 211-214 (2003).

14. 土田英俊. 酸素輸液の安全性と人工赤血球としての効果. *TMDC MATE* **233**, 4-5 (2004)
 15. 土田英俊、武岡真司、小松晃之、酒井宏水、”人工赤血球”「新訂版・表面科学の基礎と応用」第12節、エヌ・ティー・エス社 (2004)
 16. 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*, Springer-Verlag (2004) in press.
 17. H. Sakai, K. Sou, S. Takeoka, K. Kobayashi, E. Tsuchida. “Hemoglobin-vesicles (HbV) as Artificial Oxygen Carriers”. In: *Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine Vol.12*, Springer-Verlag (2004) in press.
2. 学会発表
1. 土田英俊 / (招待講演) 酸素輸液(人工赤血球) 開発の現状と近未来の展開 / 日本麻酔科学会 / 2003.6.31 / パシフィコ横浜
 2. E. Tsuchida / Hemoglobin-vesicles and albumin-hemes based on Nano-molecula Sciences / ASAIO-ISAIO Joint Conference (Workshop: Blood substitutes, Present and Future) / 2003.6.18
 3. E. Tsuchida / (Plenary Lecture) Oxygen infusions (Hemoglobin-vesicles and albumin-hemes) based on nano-molecular science. / 7th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies / 2003.9.21-24 / Fort Lauderdale, Florida
 4. 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
 5. K. Sou, S. Takeoka, E. Tsuchida / Synthesis and molecular assembly of aminolipids to form stable hemoglobin-vesicles (HbV). / 7th International Symposium on Polymers for Advanced Technologies / 2003.9.21-24 / Fort Lauderdale, Florida
 6. 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、小林紘一 / (教育講演)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
 7. 久本修治、酒井宏水、武岡真司、土田英俊 / 界面活性剤を用いたヘモグロビン小胞体のリポポリサッカライド定量法 / 第41回日本人工臓器学会大会 / 2003.10.30-11.1 / 仙台市民会館
 8. 酒井宏水、武岡真司、堀之内宏久、小林紘一、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
 9. 土田英俊 / (招待講演) ヘモグロビン小胞体とアルブミンヘムの安全性と酸素輸送力の評価 / 秋田大学 / 日本素材物性学会研究会 -生態機能性分子に関する最新の研究- / 2003.12.12. / 秋田大学 VBL 大会議室
 10. 土田英俊 / 人工赤血球とは / 厚労科学研究・医薬安全総合研究推進事業 研究成果発表会「人工血液をつくる(4)」 / 2004.2.11 / 慶應義塾大学医学部 北里講堂
 11. 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)

別添 6

表 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者名
<i>Crit. Care Med.</i> 32 , 539-545 (2004). “Hemoglobin-vesicles suspended in recombinant human serum albumin for resuscitation from hemorrhagic shock in anesthetized rats.”	2004年2月	Lippincott Williams & Wilkins	H. Sakai, Y. Masada H. Horinouchi M. Yamamoto E. Ikeda S. Takeoka K. Kobayashi E. Tsuchida
人工血液 11 , 151-160 (2003). “リポソームと補体系との相互作用”	2003年7月	日本血液代替物学会	阿部英樹 藤原満博 東 寛 池田久寛
<i>Pharm Res.</i> 21 , 285-292 (2004). Esterase-like activity of serum albumin: Characterization of its structural chemistry using p-nitrophenyl esters as substrates.	2004年2月	Plenum Publishing corporation	Y. Sakurai S.F. Ma H. Watanabe N. Yamaotsu S. Hirono Y. Kurono U. Kragh-Hansen M. Otagiri
<i>Kidney Int.</i> 65 , 162-174 (2004). Characterization of uremic toxin transport by organic anion transporters in the kidney.	2004年2月	International Society of Nephrology	T. Deguchi H. Kusuvara A. Takadate H. Endou M. Otagiri Y. Sugiyama
<i>Biopharm Drug Dispos.</i> 24 , 345-55 (2003). “Pharmacokinetics and tissue distribution of uraemic indoxyl sulphate in rats.”	2003年9月	John Wiley & Sons, Ltd.	T. Deguchi M. Nakamura Y. Tsutsumi A. Suenaga M. Otagiri
<i>Biochim Biophys Acta.</i> 1623 , 88-97 (2003). “The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants.”	2003年8月	Elsevier B.V.	K. Nakajou H. Watanabe U. Kragh-Hansen T. Maruyama M. Otagiri
<i>J Pharmacol Exp Ther.</i> 307 , 1234-42 (2003). “Evidence for the involvement of a pulmonary first-pass effect via carboxylesterase in the disposition of a propranolol ester derivative after intravenous administration.”	2003年8月	The American Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics	T. Imai Y. Yoshigae M. Hosokawa K. Chiba M. Otagiri
<i>Eur J Pharmacol.</i> 477 , 137-41 (2003). “Effects of alpha(1)-acid glycoprotein on isometric tension of mouse aorta.”	2003年7月	Elsevier B.V.	Y. Tokutomi S. Okamoto K. Matsumoto M. Otagiri K. Nishi N. Tokutomi

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者名
<i>J Enzyme Inhib Med Chem.</i> 18 , 35-39 (2003). Inactivation of rabbit liver carbonyl reductase by phenylglyoxal and 2,3,4-trinitrobenzene-sulfonate sodium.	2003年7月	Taylor & Francis Ltd.	Y. Imamura T. Koga H. Shimada M. Otagiri
<i>Pharm Res.</i> 20 , 684-692 (2003). Validation of the chloramine-T induced oxidation of human serum albumin as a model for oxidative damage in vivo.	2003年4月	Plenum Publishing corporation	M. Anraku U. Kragh-Hansen K. Kawai T. Maruyama Y. Yamasaki Y. Takakura M. Otagiri
<i>Chirality</i> 15 , 318-23 (2003). Probenecid-induced changes in the clearance of pranoprofen enantiomers.	2003年3月	Wiley-Liss, Inc.	T. Imai T. Nomura M. Otagiri
<i>Chirality</i> 15 , 312-317 (2003). Enantiospecific disposition of pranoprofen in beagle dogs and rats.	2003年3月	Wiley-Liss, Inc	T. Imai T. Nomura M. Aso M. Otagiri
<i>Chem Biol Interact.</i> 143-144 , 353-361 (2003). Cloning, expression and tissue distribution of a tetrameric form of pig carbonyl reductase.	2003年2月	Elsevier Science Ireland Ltd.	N. Usami S. Ishikura H. Abe M. Nagano M. Uebuchi A. Kuniyasu M. Otagiri H. Nakayama Y. Imamura A. Hara
<i>Biol Pharm Bull.</i> 26 , 123-126(2003). Effects of alpha 1-acid glycoprotein on erythrocyte deformability and membrane stabilization.	2003年1月	Pharmaceutical Society of Japan	K. Matsumoto K. Nishi Y. Tokutomi T. Irie A. Suenaga M. Otagiri
<i>Artificial Blood.</i> 11 , 144-150 (2003). Effects of alpha 1-acid glycoprotein on blood circulation.	2003年1月	日本血液代替物学会	K. Matsumoto S. Okamoto Y. Tokutomi T. Irie T. Maruyama K. Nishi A. Suenaga M. Otagiri
<i>Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.</i> 285 , H1140-H1147 (2003). Improved oxygenation in ischemic hamster flap tissue is correlated with increasing hemodilution with Hb vesicles and their O ₂ affinity.	2003年5月	the American Physiological Society	C. Contaldo S. Schramm R. Wettstein H. Sakai S. Takeoka E. Tsuchida M. Leunig A. Banic D. Erni