

蓄積した EB を抽出した。EB の絶対量を算出するために、620 nm における吸光度とリファレンスとして 750 nm における吸光度を測定し、その差 OD₆₂₀₋₇₂₀ を EB の相対吸光度とした。濃度既知の EB を用いて検量曲線を作成して、各臓器に蓄積した EB を算出した。

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。

C. 結果および考察

生理的な状態では、fenestration 構造を持つ血管内皮細胞で覆われた微小循環系を有する肝臓や腎臓は Evans Blue 投与後 4 時間で 20-30 ngEB/mg tissue の蓄積を認めた。一方、blood-brain barrier を有する脳組織では、肝臓や腎臓で認められた 1/30 以下に相当する EB (0.73±0.09 ngEB/mg tissue) しか蓄積しないことが明らかになった (Fig. 2)。

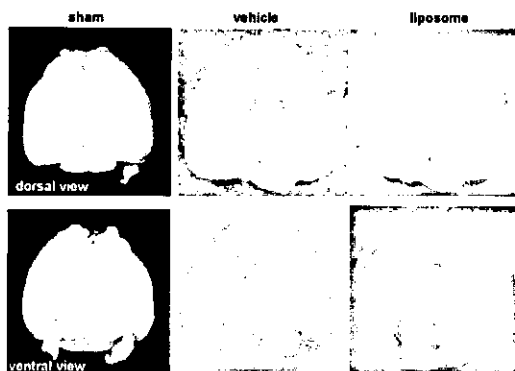


Fig. 1 マウス脳虚血・再灌流障害モデルにおける Evans Blue 漏出のマクロ所見

血液中の EB の大部分がアルブミンなどの分子と結合して存在することを考えれば、これらの所見は本研究で用いた改変 Miles assay 法が脳などの fenestration 構造を有しない血管内皮細胞を持つ臓器における血管透過性機能の評価系として用いることが出来る有効な方法であると考えられた。

そこで、この方法を用いてマウス両側総頸動脈

を結紮し一過性脳虚血モデルを作成し、再灌流後の脳血管機能の変化を解析した。その結果、この脳虚血・再灌流傷害により、肉眼的にびまん性であるが片半球により強い著明な EB の漏出が認められた (Fig. 1, 2)。定量的結果、非結紮群と比較して約 10 倍量に相当する 7.5±0.5 ngEB/mg tissue の脳組織への蓄積が明らかになった。一方、肝臓、腎臓および肺における血管透過性はこの処置により特に変化は認められなかった (Fig. 2)。これらの結果より、一過性脳虚血・再灌流傷害はマウス脳血管障害を惹起することで脳循環における血管透過性を著しく亢進させることが明らかになった。

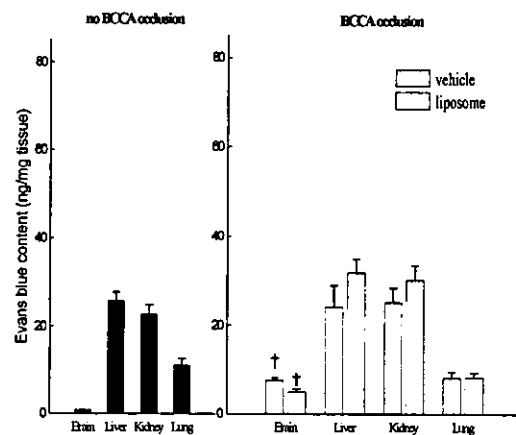


Fig. 2 マウス脳虚血・再灌流障害モデルにおける血管透過性に対する小胞体(liposome)の効果

次に、局所血管透過性に与える小胞体の影響の有無を解析するために、脳虚血前に大腿静脈より空小胞体 (5 ml/kg) を投与し同様に検討した。その結果、空小胞体投与により脳組織における EB の蓄積は著明に減少し肉眼的には片半球のみに限局することが明らかになった。また、定量的な解析では、非投与群と比較して有意に減少し 4.8±0.7 ngEB/mg tissue の EB の蓄積が存在することが示された。一方、空小胞体の投与によるこの血管透過性変化は解析した他臓器では認められなかった (Fig. 1, 2)。以上の結果は、小胞体自身が血管透過性亢進を惹起しうる局所血管障害を抑制する付加

的な機能を有していることを示していると考えられた。今後 Hb 小胞体を用いて更に検討を行い、局所への酸素運搬能を亢進させた場合、脳循環系における血管内皮細胞機能への如何なる変化が惹起されるかを明らかにしていく予定である。

D. 結論

局所への酸素運搬能を亢進させることに主眼がおかれ開発された Hb 小胞体は、病態下の血管内皮細胞機能、特に血管透過性を抑制する付加的な機能を有していることが明らかになり、今後単なる輸血の代替え物としてのみならず未知の利用価値が更に賦課された生理機能物質として幅広い臨床応用が期待される。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 論文発表

1. A. Kudo, S. Kashiwagi, M. Kajimura, Y. Yoshimura,

K. Uchida, S. Arii, M. Suematsu. Kupffer cells alter organic anion transport through multidrug resistance protein 2 in the post-cold ischemic rat liver. *Hepatology*. **39**, 1099-1109, (2004)

2. 学会発表

1. M. Kajimura, M. Ichikawa, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Suematsu./ Real-time imaging of anionic liposomes during thrombus formation and acute inflammation in rats./ Japan-United Kingdom Platelet Conference / 2004.9

2. M. Kajimura, H. Sakai, T. Atoji, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Ichikawa, M. Suematsu./ Anionic liposome protects murine brain against plasma leaking after ischemia reperfusion / The 6th Asian Congress for Microcirculation (ACM'05)/ 2005.2.24-26

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： 1. Hb 小胞体試料供給
2. Hb 小胞体単回投与 1 年後の血液生化学、組織病理学的検討
3. Hb 小胞体による 40%交換輸血後の回復過程
4. Hb 小胞体による 50%出血ショック蘇生後の回復過程
5. 放射化標識を利用した Hb 小胞体の体内動態評価
6. Hb 小胞体分散液の Hb 定量法の検討

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 理工学術院 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) 厚生労働科学研究に供する Hb 小胞体分散液(委託製造品)の物性値解析を実施した。脂質濃度が従来よりも 10%程度高値となったが、粒径、酸素親和度、Hb 濃度、LPS はいずれも従来値と同等であり、酸素輸送能は従来と同等と判断された。(2) Hb 小胞体をラットに単回投与(20mL/kg)した後、1 年間の観察を行った。ラットは全例が生存し体重が増加した。血液生化学検査と組織病理学的検討の結果、肥満と老化が原因と考えられる所見が認められたが、Hb 小胞体投与と直接関係のある副作用では無いと考えられた。(3) Hb 小胞体を 5%のリコンビナントアルブミンに分散させた溶液を用い、ラットの循環血液量の 40%を交換したところ、一過性の脾臓肥大と若干のヘモジデリン沈着が認められる。ラット保存赤血球を同様に投与したところ、脾臓肥大とヘモジデリン沈着が認められたので、Hb 小胞体は老化赤血球と同様の経路によって捕捉分解されることが明らかになった。(4) ラットの循環血液量の 50%を脱血し Hb 小胞体をリコンビナントアルブミンに分散させた溶液の投与により蘇生させ、最長 14 日間の回復過程を観察した。血行動態および血液ガス組成は安定した値を推移した。また、Hct 値は 7 日後にほぼ脱血前の値にまで増大した。(5) Hb 小胞体分散液の Hb 濃度を、臨床用血液ガス測定装置および血球数測定装置により測定した。4 機種のうち 2 機種は Hb 小胞体の干渉作用が顕著であったが、他の機種は 10%以内の誤差に留まった。今後更に機種の選定や、Hb 小胞体を可溶化するための前処理法の検討が必要と考えられた。(6) ^{99m}Tc ラベル Hb 小胞体の体内動態を解析した。半減期はラットで 34.8 h、ラビットで 62.2 h、最終的に細網内皮系(主に肝臓と脾臓)に移行する過程が観測された。

1. Hb 小胞体試料供給

A. 研究目的

Hb 小胞体の製造技術を(株)オキシジェニクス(開発実施企業)に移転する作業を進めている。厚生労働科学研究に供する Hb 小胞体分散液の委託製造、さらには GLP 製造への移行と GMP への対応を進めることが目的である。平成 16 年度に 7 ロットの調製を実施し、計 13L の Hb 小胞体を得た。試料の物性値は早稲田大学で確認し、本研究班での動物投与試験に使用できることを確認して供給されている。

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。物性値の重要項目として、Hb および脂質濃度、酸素親和度(P_{50})、メト化率について早稲田大学にて確認試験を行った。

C. 結果および考察

計 7 ロット製造され、それぞれについて物性値を測定した結果、酸素輸送に関する Hb 濃度、メト Hb 含量、HbCO 含量は従来値に合致、酸素輸送量は従来と同様と判断された。 P_{50} 値が低値となっているが、測定装置の相違による誤差もあり、ほぼ従来値と同等と判断される。粒径、エンドトキシン含量は従来値に合致していることが確認された。バッチ容量を増やした Lot. 5-7 では、量産に向け製造工程を一部変更したことで、脂質収率が向上したため、[Hb]/[lipid]値(Hb と脂質の重量比)が 0.1 ないし 0.2 低値となった。

D. 結論

安定的に動物投与試料を供給できる体制が整った。量産に対応させた工程では、脂質収率の向上に伴い 10%程度脂質濃度が上昇、酸素輸送に関するパラメータ(Hb 濃度、 P_{50} 、MetHb、HbCO 含量)は従来と同等、また、大量投与される静注製剤に重要となるエンドトキシン含量も検出されな

かったため、安全性・有効性試験に供することができた。

2. Hb 小胞体単回投与 1 年後の血液生化学、組織病理学的検討

A. 研究目的

これまでに Hb 小胞体の単回投与(20 mL/kg)、および反復投与試験(10 mL/kg/day x 14 days)の結果から、Hb 小胞体は最終的に細網内皮系に捕捉され、速やかに分解消失することが明らかにされた(Am. J. Pathol. 2001;159:1079-1088, J. Pharmacol. Exp. Ther. 2004;311:874-884)。特に非可逆的な副作用を認めず、安全性に関する知見が得られている。しかし、H15 年 10 月に開催された第 40 回人工臓器学会(仙台)において、Nose 博士からの指摘として、パーフルオロカーボン乳剤(PFC)を投与した場合には、肺の障害が出るため、1 年を待たずに動物が死亡する例があるので、長期的な観察を出来るだけ早く実施すべきとの助言を戴いた。そこで同年 11 月に Hb 小胞体を単回投与し、1 年間の体重の推移と、H16 年 11 月、1 年経過後に犠牲死させ、血液生化学的検査と組織病理学的観察を実施した。

B. 研究方法

Wistar rat (♂, 体重 263 ± 8 g) 5 匹をエーテル麻酔下に、尾静脈より Hb 小胞体(HbV)を 20 mL/kg 留置針を経由して投与した。覚醒後、ラットを個別にケージに入れ、1 年間飼育した。この間、体重の推移を観察した。1 年経過後、Sevoflurene 麻酔下に開腹して、下大静脈より採血し、遠心分離をして血漿を得て、血液生化学検査を行った(BML 社)。また放血犠牲死させ臓器を摘出、ホルマリン固定し、切片を H/E 染色、Berlin-blue 染色し、組織病理学的観察を行った。動物実験は全て学内倫理規定に従って実施した。

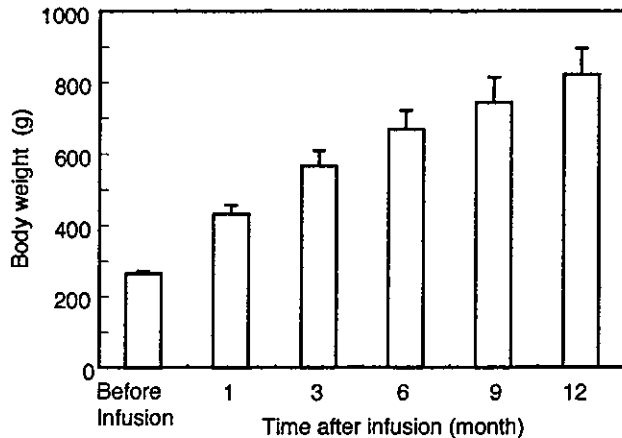


Fig. 1. One-year observation of body weight after bolus infusion of HbV into Wistar rats (i.v. 20 mL/kg), n = 5.

C. 結果および考察

ラットは全例が 1 年間生存し、体重は順調に増加し続け、最終的に 821 ± 75 g まで増加した(Fig. 1)。血漿には乳糜があり、血液生化学検査の結果、脂質成分の著増が認められ明らかな高脂血症であった(Fig. 2)。これらは、比較的小さいケージの中で、接種量を制限することなく 1 年間飼育したために肥満になった為と考えられる。肝機能を反映するパラメータ、AST, ALT, LDH は正常範囲であった。既報の Hb 小胞体単回投与(20mL/kg)の後の血液生化学検査では、投与 1, 2 日後一過性の血漿中脂質濃度増大が認められた (Biomaterials 2004;25:4317-4325)。これは Hb 小胞体がマクロファージに捕捉されたあと、脂質成分が遊離したものであるが、7 日目には正常値に戻った。今回の実験結果から、高脂血症の状態にあるラットに比較すれば 1~3 日後の脂質濃度の増大は無視出来る程度あることが明らかになった。

組織病理学的検討では、著変は認められなかったが、ヘモジデリン沈着が脾臓、副腎、腎臓に認められた。また、1 例に下垂体腺腫が認められたが、これは老化による現象と考えられた。また、肺には全例において全く異常を認めなかった。

D. 結論

Hb 小胞体を単回投与したあと、ラットは全例が

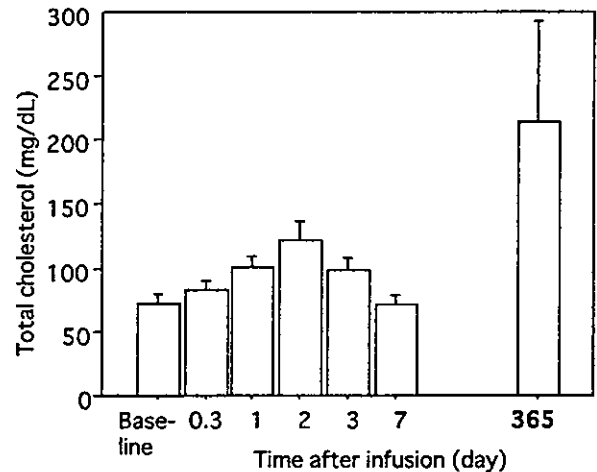


Fig. 2. Changes in the plasma level of total cholesterol after bolus infusion of HbV into Wistar rats (i.v. 20 mL/kg), n = 5. The data until 7 days are cited from: Sakai et al. *Biomaterials* 2004;25:4317-4325.

生存した。また、血液生化学検査、組織病理学的検査では、肥満および老化による影響が見られたが、Hb 小胞体投与に起因する異常は認められなかった。

3. Hb 小胞体による 40%交換輸血後の回復過程

A. 研究目的

平成 15 年度には、Hb 小胞体(HbV)による 40% 交換輸血後の回復過程について、特に脾臓に Hb 小胞体が捕捉されて消失していく過程と、脾臓での活発な造血作用により、ヘマトクリットが 7 日目ではほぼ正常値に戻る過程を報告した。Berlin-blue 染色の結果、ヘモジデリンの沈着が認められたが、果たしてこれが問題となる所見なのか疑問が残った。そこで、ラットで輸血をした場合と比較検討することを目的とした。

B. 方法

ラット輸血モデル実験を実施するにあたり、まず、保存赤血球の調製を D'Almeida らの方法に従って実施した(Transfusion Med. 2000;10:291-303)。Sevoflurene 麻酔下、Wistar 系ラット(400-500g)の右頸動脈にカテーテルを挿管した。血液保存液(川

澄化学社製、CPDA-1)2mLを10 mLシリンジに入れ、カテーテルに繋ぎ、急速脱血した。約10 mL採血したところで密封して4 °Cにて1週間冷蔵保存した。D'Almeidaらの報告によれば、この条件で1週間保存したラット赤血球の脆弱性は、ヒト赤血球を同条件で4週間保存したものと同等である。保存血液は遠心分離(3,000g, 10 min)して血清と白血球を除去し、再度生理食塩水を等量加えて遠心分離する操作を二回繰り返した。次いで5 g/dLのrHSAを添加して再分散させ、再度遠心分離して上澄みを除去し、rHSAを添加してHb濃度を8.6 g/dLに調節した(sRBC/rHSA)。

交換輸血の方法は、既報の通りである。Wistar系ラット(180 - 200 g, ♂)に対し、ネンプタール腹腔内投与(1 mL/kg)により全身麻酔とし、右頸動脈に挿管。1mLの脱血と1 mLの試料投与を繰返し、40%の血液を交換した。縫合して覚醒させ、最長14日間生存させた。血液交換後1, 3, 7, 14日後に犠牲死させ(各測定時 n = 5)、血液学的、血液生化学的検査、脾臓の重量の測定、組織病理学的検討(H/E染色, Berlin-blue染色)を実施した。またこれらの結果を、既報のHbV/rHSA群、rHSA群と比較した。

に対する脾臓の重量比は、血液交換前に0.33±0.04%であったが、1日後に0.42±0.04%, 3日後に0.48±0.04%, 7日後には0.46±0.06%になり、約1.5倍の増大が認められた(Fig. 3)。しかし14日後には0.37±0.07%にまで回復した。また、血液交換前のHctは43%程度であったが、交換後に36%に低下し、14日後には44%にまで回復した。血中エリスロポエチン濃度は、血液交換1日後に全群で有意に増大したが、sRBC/rHSA群が最も低かった(63±7 IU/mL)。特にrHSA群で顕著で(311±123 IU/mL)、HbV/rHSA群(153 ±22 IU/mL)の二倍の値を示し、酸素運搬の効果に依存した結果と考えられる。即ち、HbV/rHSA群は、rHSA群より明らかに高い酸素運搬機能を有していることを反映している。sRBC/rHSA群で見られた一過性の脾臓肥大は、老化赤血球が脾臓に捕捉されたこと、造血の作用の両方が考えられた。SRBC/rHSA群でもBerlin-blue染色では脾臓にのみヘモジデリン沈着が認められた。既報のHbV/rHSA群では、脾臓の一過性肥大とヘモジデリンが脾臓と肝臓に僅かに観測されたが、今回の保存赤血球投与の結果から、老化赤血球の場合と同様の経路により、Hb小胞体が脾臓で捕捉代謝される過程が予測された。

C. 結果および考察

保存赤血球で交換した場合(sRBC/rHSA群)、体重

D. 結論

Hb小胞体をリコンビナントアルブミンに分散

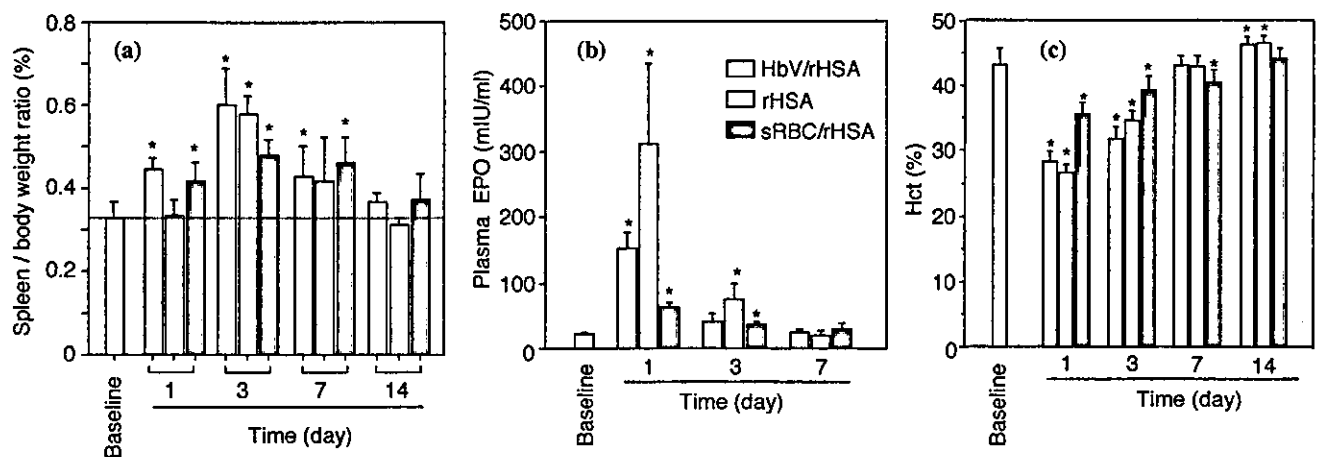


Fig. 3. Profiles after 40% exchange transfusion either with HbV/rHSA, sRBC/rHSA, or rHSA in Wistar rats (n = 5, at each time point). (a) Spleen weight ratios, (b) Plasma EPO levels, and (c) Hct changes. *: p < 0.05 vs. baseline.

値にまで増大した。Hb 小胞体の出血ショック蘇生液としての安全性に関する基礎知見を得ることが出来た。

5. 放射化標識を利用した Hb 小胞体の体内動態評価

A. 研究目的

投与 Hb 小胞体の血中半減期と体内分布は、酸素輸液としての安全度と有効性についての基本的評価項目として不可欠である。本研究ではこの評価法の確立と臨床適応への正確な見積りを目的とし、同位元素で標識した Hb 小胞体の体内動態を非侵襲下で観測、安全と代謝に関して定量的評価を行った。

本研究は Prof. Phillips (U. Texas Health Science Center at San Antonio)と早稲田大学との共同で実施された。

B. 方法

1) Hb 小胞体の放射化標識

放射性同位元素 sodium [technetium-^{99m}perchnetate (^{99m}TcO₄; 半減期 6 hr) の生理食塩水溶液を hexamethylpropyleneamine oxime (HMPAO)の凍結乾燥体の市販キットに添加した後、この溶液を Hb 小胞体 (HbV) あるいは Hb を内包しない小胞体 (Empty vesicles: EV) 分散液と混合した。1 時間放置後、遊離 ^{99m}TcO₄ をゲル濾過除去して標識を完了。本法で標識した Hb 小胞体を動物投与に供した。

2) Hb 小胞体の体内動態の計測

動物実験は National Institutes of Health Animal

Use and Care guidelines の下、University of Texas Health Science Center at San Antonio Institutional Animal Care Committee によって承認されたプロトコールに従い実施した。

雄性 Sprague-Dawley ラット(体重 200-274 g)に対し、3% isoflurane 自発呼吸麻酔下、尾静脈に挿入した留置針を介して試料を投与した (投与量: 14 mL/kg、投与速度: 1mL/min)。また、雄性 New Zealand White rabbits (体重 2.2-2.9 kg) に対し、ketamine/xylazine 混合液 (50 and 10 mg/kg)大腿部筋注麻酔下、後耳介静脈に挿入した留置針を介して試料を投与した (投与量: 14.25 mL/kg、投与速度: 1mL/min)。両者とも経時的に血液を採取し、48 時間後の血液サンプル採取後にシンチレーションカウンターで各サンプル中の放射線量を計測した。Hb 小胞体の血中残存率は投与直後を 100%として各時間での放射線量から算出した。体内分布の計測は Hb 小胞体を投与したラットあるいはラビットをγカメラ (PICKER DYNA CAMERA) で撮影した。ソフトウェア (Nuclear Imaging System ver. 2.34 R4) に取込み画像解析。肝臓、脾臓への分布経時変化を明らかにした。投与 48 時間後に全身の臓器を採取し各臓器中の放射線強度をγカウンター (MINAXI-X Auto-GammaR 5000 Series Gamma Counter; Packard) で計測し、各臓器への Hb 小胞体の分布率を定量した。

Table 2 Characteristics of ^{99m}Tc-HbV and ^{99m}Tc-EV suspensions.

Parameters	^{99m} Tc-HbV	^{99m} Tc-EV
[Hb] ^{a)} (g/dL)	9.5	0
[lipids] (g/dL)	4.75	4.75
particle diameter (nm)	247±44	259±32
endotoxin level (EU/mL)	<0.2	<0.2

a) MetHb: <1%, carbonylHb <2%

Table 3 Kinetic parameters of HbV and EV clearance from blood in rats and rabbits (25% top-loading).

Animal	sample	distribution (α) phase		elimination (β) phase		t _{1/2} (h)
		k _α (h ⁻¹)	t _{1/2α} (h)	k _β (h ⁻¹)	t _{1/2β} (h)	
Rat	HbV	0.0894	7.8	0.0177	39.1	34.8
	EV	0.1004	6.9	0.0230	30.1	29.3
Rabbit	HbV	0.0226	30.7	0.0088	79.2	62.6
	EV	0.0159	43.6	0.0115	60.2	57.3

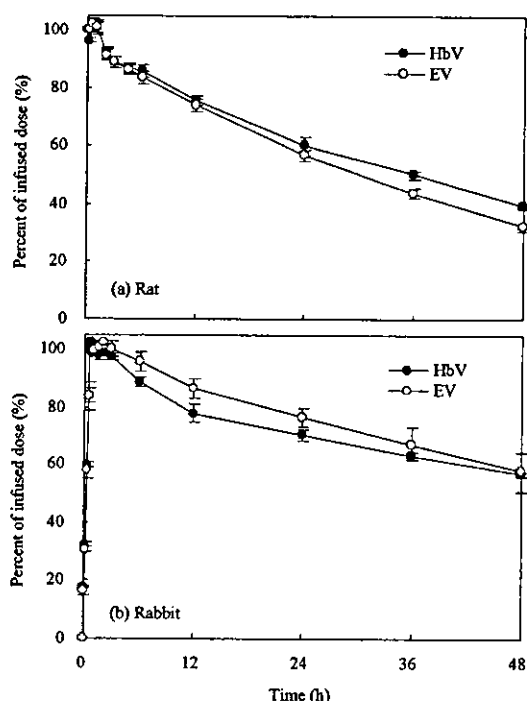


Fig. 6. Circulation kinetics of HbV and EV after top-loading intravenous infusion (14 mL/kg) in rats and rabbits. The radioactivity was determined by scintillation counting of blood samples with time. The percentage of radioactivity is calculated as a percentage of baseline radioactivity in a blood sample withdrawn just after HbV or EV infusion.

C. 結果および考察

1. 血中半減期

血中投与された Hb 小胞体は初期の比較的速い過程 (α 相) と続く緩やかな過程 (β 相) により血中から消失した (Fig. 6)。Hb 小胞体の半減期はラットで 34.8 h、ラビットで 62.6 h と見積もられた (Table 3)。Hb を内包していない小胞体との比較では、Hb の内包により半減期の延長を認めるが、これは Hb の負荷分による網内系への取り込み遅延によると考えられる。

2. 体内分布

投与 48 時間後の体内分布を Table 4 に示す。Hb 小胞体は主に肝臓、脾臓および骨髄に分布し、Hb 内包の有無による分布パターンの変化は認めない。これらの臓器には細網内皮系に關与する食細胞が分布しており、Hb 小胞体は赤血球と同様の経路にて代謝経路に移行するものと考えられる。ラビットではラットに比較して脾臓への取り込みが著しく低い、これは体重に対する脾臓重量が著し

Table 4 Biodistribution of HbV and EV as a percent of the infused dose (%ID) at 48 h after 25% top-loading in rats or rabbits (%ID/organ \pm s.e.m.).

Organ	Rat		Rabbit	
	HbV	EV	HbV	EV
Blood	33.27 \pm 1.11*	24.13 \pm 0.65	50.95 \pm 2.02†	52.76 \pm 4.80‡
Liver	10.04 \pm 0.86*	14.13 \pm 0.40	07.55 \pm 0.46†	08.64 \pm 0.34‡
Femur	10.06 \pm 0.21*	13.05 \pm 0.38	05.37 \pm 0.33**	07.36 \pm 0.28‡
Spleen	06.50 \pm 0.30*	09.18 \pm 0.37	0.72 \pm 0.10**	01.84 \pm 0.28‡
Bowels	07.30 \pm 1.59	04.16 \pm 0.35	09.61 \pm 2.31	08.62 \pm 4.42
Skin	02.37 \pm 0.33	02.29 \pm 0.12	00.88 \pm 0.05†	01.09 \pm 0.21‡
Kidney	02.40 \pm 0.10*	03.35 \pm 0.08	01.47 \pm 0.13†	01.69 \pm 0.21‡
Muscle	01.94 \pm 0.28	01.98 \pm 0.27	02.51 \pm 0.31	02.62 \pm 0.76
Lung	00.62 \pm 0.03	00.54 \pm 0.03	00.55 \pm 0.02	00.43 \pm 0.06
Heart	00.17 \pm 0.01	00.16 \pm 0.01	00.12 \pm 0.01†	00.13 \pm 0.02
Brain	00.16 \pm 0.01*	00.09 \pm 0.01	00.08 \pm 0.01**	00.05 \pm 0.00‡
Testis	00.12 \pm 0.01*	00.09 \pm 0.01	00.06 \pm 0.02†	00.07 \pm 0.01
Feces	09.50 \pm 1.17	06.95 \pm 0.29	05.06 \pm 2.56	02.02 \pm 0.55‡
Urine	13.61 \pm 0.31	12.87 \pm 0.41	11.30 \pm 1.22	07.81 \pm 1.44‡

* Difference is statistically significant from EV in same species at $p < 0.01$

† Difference is statistically significant from HbV in rat at $p < 0.05$

く小さいことに起因している。このため、臓器重量当りの取り込み量による解析では兩種で相違を認めない。同様に肝臓、骨髄においても兩者で相違を認めないことから、臓器重量当りの取り込み量を指標としてヒトへの外挿の妥当性が示された。ヒトの標準臓器重量(参考:International Commission on Radiation Protection, 1984, Report on the task group on reference man. ICRP No. 23, Pergamon Press, New York)を用いて、本実験と同投与量(血液量の25%)を投与した場合の β 相半減期($t_{1/2\beta}$)は66時間と概算された。この数値はラビットに近く、 α 相を含めた血中半減期は2~3日程度と見積もられた。

D. 結論

Hb 小胞体は半減期(2~3日)程度で血中から消失し、これは緊急時の措置としては十分な循環時間であると判断できる。血中からの消失は主に肝臓および脾臓での網内系捕捉により、これら代謝臓器で捕捉される経路は赤血球と同様であり、Hb 小胞体の代謝経路に適していると考えられる。

6. Hb 小胞体分散液の Hb 定量法の検討

A. 研究目的

Hb 小胞体の脂質二分子膜は、赤血球膜に比較して界面活性剤や力学的刺激に対する耐性が高いため、臨床現場で使用されている各種測定装置が正確なHb値を表示しない可能性が指摘されている。そこで平成16年度は先ず、代表的な臨床検査装置4機種についてHb小胞体のHb濃度の測定を実施し、干渉作用の有無とその原因について考察した。

B. 方法

以下の4機種の臨床検査装置を検討した。

- 1) KX-21, 自動血球数測定装置(シスメックス社製), Hb測定原理: SLS-Hb法
- 2) ABL700, 自動血液ガス測定装置(ラジオメータ

社製): Hb測定原理: 可視光領域吸収スペクトル

3) FL-250, 自動血球数測定装置(フクダ電子製), Hb測定原理: シアノメトヘモグロビン法

4) ADVIA120 総合血液学検査装置(バイエルメディカル社製), Hb測定原理: シアノメトヘモグロビン法の変法(特殊な界面活性剤を使用)。

Hb 小胞体分散液([Hb] = 10 g/dL)を生理食塩水で10倍、5倍、2倍に希釈し、測定試料とした。正確なHb濃度の測定には、アズワン社製Hb測定試薬キット(シアノメトヘモグロビン法)を使用した。操作法はマニュアル記載の方法とほぼ同じであるが、発色試薬を添加する際に、60°Cにて5分間加温することにより小胞体の溶解を促進し、HbをmetHbCNに変換する反応が完了することを可視吸収スペクトル(500 - 700 nm)から確認し、Hb濃度を算出した。

C. 結果および考察

Fig. 6にHb小胞体分散液のHb濃度測定結果を示す。横軸は正確なHb濃度、縦軸は各測定装置が表示した値である。明らかなように、KX-21およびFL-250において顕著な干渉作用が認められた

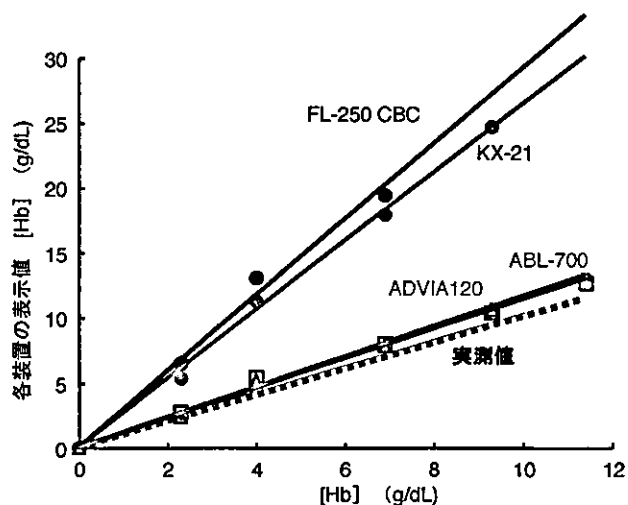


Fig. 6. 各種臨床検査装置によるHb小胞体分散液のHb濃度測定結果。実測値とは、Hb小胞体の溶解を促進させて干渉因子を排除した方法によって得られた正確な値。ADVIA120およびABL-700では阻害作用が僅かであった。

が、ABL700 および ADVIA120 ではより正確な値を示した。

KX-21 では、界面活性剤としてラウリル硫酸ナトリウム(SLS)を用い、これで赤血球を溶血させ、更にラウリル硫酸イオンが酸化したヘムに結合しヘミクロームの状態として測定する方法である。しかし Hb 小胞体は SLS では完全に破壊されず濁度が残るため、実際の値よりも高値となる。SLS 共存下、Hb 小胞体の溶解を促進させたため、加熱する実験を別途実施したが、吸光度が顕著に減少した。一般にヘミクロームは不安定で変性し易いので、Hb 小胞体の定量は困難と考えられた。

FL-250 は国際基準法であるシアノメトヘモグロビン法に基づく方法を採用しているが、使用している界面活性剤では、Hb 小胞体を完全に破壊することが出来なかった。装置内に加温して溶解を促進する仕組みを設ける必要があると考えられた。

ABL700 は、装置内で試料 1 μ L に周波数約 30 KHz の超音波振動をかけて溶血させ、478-672nm の可視吸光スペクトルを測定し、HbO₂, deoxyHb, metHb, HbCO のスペクトルの可成性から各成分および総 Hb 濃度を算出している。Hb 小胞体で若干の高値傾向があるのは、恐らく超音波照射では完全に濁度を消去することが出来ないことが影響していると考えられる。Hb を変性させない程度の少量の界面活性剤を予め添加するなどの工夫が必要と考えられる。

ADVIA120 でも Hb 小胞体の干渉作用は僅かであった。本装置では、特殊な界面活性剤を使用しており(企業秘密)、Hb 小胞体の二分子膜を溶解させる能力が高いことが起因している。僅かな干渉作用は、今後、界面活性剤の濃度の変更や溶解に要する時間を延長させる等の工夫により克服できると考えられた。

D. 結論

臨床検査装置により Hb 小胞体分散液の Hb 濃度を測定したところ、Hb 小胞体の干渉作用のみられ

る機種があった。また干渉作用の少ない機種も、今後より正確な値を得る為に装置の工夫あるいは検体の前処理の必要性が明らかになった。Hb 小胞体の臨床応用にあたり、Hb 濃度は臨床現場で治療行為を決定する上で重要なパラメータの一つであるので、正確な値を得るための取り組みが急務である。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 論文発表

1. 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).

2. A. Yoshizu, Y. Izumi, S. Park, H. Sakai, S. Takeoka, H. Horinouchi, E. Ikeda, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier Hemoglobin Vesicle (HbV) maintains intestinal perfusion and suppresses the increase in plasma tumor necrosis factor alpha (TNF α). *ASAIO J.* **50**, 458-463 (2004).

3. H. Sakai, Y. Masada, H. Onuma, S. Takeoka, E. Tsuchida. Reduction of Methemoglobin via Electron Transfer from Photoreduced Flavin: Restoration of O₂-Binding of Concentrated Hemoglobin Solution Coencapsulated in Phospholipid Vesicles. *Bioconjugate Chem.* **15**, 1037-1045 (2004).

4. H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, E. Ikeda, K. Sou, S. Takeoka, M. Suematsu, M. Takaori, K. Kobayashi, E. Tsuchida "Physiologic capacity of reticuloendothelial system for degradation of hemoglobin-vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311**, 874-884 (2004)

5. K. Sou, R. Klipper, B. Goins, E. Tsuchida, WT Phillips. Circulation kinetics and organ distribution of hb-vesicles developed as a red blood cell substitute. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 702-709 (2005).

6. P. Cabrales, H. Sakai, A.G. Tsai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Intaglietta. Oxygen transport by low and normal P₅₀ Hb-vesicles in extreme hemodilution. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2005) in press.
7. C. Contaldo, J. Plock, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, M. Leuing, A. Banic, and D. Erni. Hemodilution with polymerized and encapsulated hemoglobins improves oxidative energy metabolism in collateralized hamster flap tissue. *Crit. Care Med.* (2005) in press.
8. H. Sakai, P. Cabrales, A.G. Tsai, M. Intaglietta, E. Tsuchida. Oxygen release from low and normal P₅₀ Hb-vesicles in transiently occluded arteriole of the hamster window model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* (2005) in press.
9. Y. Hunag, T. Komatsu, H. Yamamoto, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Exchange transfusion with entirely synthetic red-cell substitute albumin-heme into rats: Physiological responses and blood biochemical rests. *J. Biomed. Mater. Res.* 71A, 63–69 (2004).
10. A. Nakagawa, N. Ohmichi, T. Komatsu, E. Tsuchida. Synthesis of protoheme derivatives with a covalently linked proximal-base and their human serum albumin hybrids as artificial hemoprotein. *Org. Biomol. Chem.* 2, 3108–3112 (2004).
11. T. Komatsu, N. Ohmichi, P. A. Zunszain, S. Curry, E. Tsuchida. Dioxygenation of human serum albumin having a prosthetic heme group in a tailor-made heme pocket. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 14304–14305 (2004)
12. T. Komatsu, Y. Oguro, Y. Teramura, S. Takeoka, J. Okai, M. Anraku, M. Otagiri, E. Tsuchida. Physicochemical characterization of cross-linked human serum albumin dimer and its synthetic heme hybrid as an oxygen carrier. *Biochim. Biophys. Acta* 1675, 21–31 (2004)
13. T. Komatsu, H. Yamamoto, Y. Huang, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, Exchange transfusion with synthetic oxygen-carrying plasma protein “Albumin-Heme” into an acute anemic rat model after seventy-percent hemodilution.. *J. Biomed. Mater. Res.* 71A, 644–651 (2004).
14. Y. Hunag, T. Komatsu, H. Yamamoto, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Safety evaluation of artificial O₂-Carrier as red cell substitute “Albumin-Heme” by blood biochemical Tests and histopathology observations. *ASAIO J.* 50, 525–529 (2004).
15. R.-M. Wang, T. Komatsu, A. Nakagawa, E. Tsuchida. Human serum albumin bearing covalently attached iron (II) porphyrins as O₂-binding sites. *Bioconjugate Chem.* 16, 23–26 (2005).
- (総説、著書など)
1. 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5章第12節 pp. 1333-1336、編者: 日本表面科学会、エヌ・ティー・エス社 (2004).
 2. 小松晃之, 土田英俊. 酸素輸送合成ヘム蛋白質 “アルブミン-ヘム” の創製と酸素輸液の展開”, *体液・代謝管理* 20, 3–6 (2004).
 3. 武岡真司. 人工血液(人工赤血球)の開発動向. *日本医師会雑誌* 131, 907-910 (2004)
 4. 武岡真司. “酸素輸液の展望”「周術期輸液の最前線」pp.162-168、編者: 宮尾秀樹、真興交易(株) 医書出版部 (2004)
 5. 武岡真司. 人工赤血球・人工血小板の開発の現状. *臨床麻酔* 29, (2005) (印刷中)
 6. S. Takeoka. “Design and Modification of Nanoparticles for Blood Substitutes”. In: *Organ Micocirculation: A Gateway to Diagnostic and Therapeutic Investigation.* pp. 35-41, Eds. by H. Ishii, M. Suematsu, K. Tanishita, H. Suzuki. Springer-Verlag Tokyo (2005)
 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: *Artificial Oxygen Carrier: Its Front Line,* Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine Vol.12, pp. 1-21, Eds. by K. Kobayashi,

E. Tsuchida, and H. Horinouchi. Springer-Verlag Tokyo (2005).

8. H. Sakai, K. Sou, S. Takeoka, K. Kobayashi, E. Tsuchida. "Hemoglobin-vesicles (HbV) as artificial oxygen carriers". In: *Artificial Oxygen Carrier: Its Front Line*, Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine Vol.12, pp. 135-168, Eds. by K. Kobayashi, E. Tsuchida, and H. Horinouchi. Springer-Verlag Tokyo (2005).

9. T. Komatsu, E. Tsuchida. "Oxygen-carrying plasma hemoprotein including synthetic heme" In: *Artificial Oxygen Carrier: Its Front Line*, Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine Vol.12, pp. 193-204, Eds. by K. Kobayashi, E. Tsuchida, and H. Horinouchi. Springer-Verlag Tokyo (2005).

10. E. Tsuchida, H. Sakai, T. Komatsu, S. Takeoka, Y. Huang, K. Sou, A. Nakagawa, Y. Teramura, and K. Kobayashi. Oxygen infusions (Hemoglobin-vesicles and Albumin-hemes) based on nano-molecular sciences. *Polymers Adv. Technol.* 16, 73-83 (2005).

11. S. Takeoka. Developmental trend of artificial blood (artificial red blood cells). *JMAJ* 48, (2005) in press.

12. H. Sakai, K. Sou, S. Takeoka, K. Kobayashi, and Eishun Tsuchida, "Hemoglobin-vesicles as a molecular assembly: Characteristics of preparation process and performances as artificial oxygen carriers." In "*Blood Substitutes*" (Ed. By Robert M. Winslow, Elsevier), (2005) in press.

13. T. Komatsu, Y. Huang, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. "Albumin-Heme: A Synthetic Heme-Based Oxygen Carrier" In "*Blood Substitutes*" (Ed. By Robert M. Winslow, Elsevier), (2005) in press.

2. 学会発表

1. 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 9th Liposome Research Days Conference / May 11-15, 2004 / Hsinchu, Taiwan

2. E. Tsuchida, H. Sakai, S. Hisamoto, I. Fukutomi, K.

Sou, S. Takeoka / Detection of lipopolysaccharide in hemoglobin-vesicles by Limulus Amebocyte lysate test with kinetic-turbidimetric gel clotting analysis and pretreatment of surfactant. / The 9th Liposome Research Days Conference / May 11-15, 2004 / Hsinchu, Taiwan

3. 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 RBCs and acellular Hb)/ The 9th Liposome Research Days Conference / May 11-15, 2004 / Hsinchu, Taiwan

4. E. Tsuchida, H. Sakai, H. Horinouchi, S. Takeoka, K. Kobayashi. / Hemoglobin-vesicles as oxygen carriers: influence on phagocytic activity and histopathological changes in reticuloendothelial system. / The 9th Liposome Research Days Conference / May 11-15, 2004 / Hsinchu, Taiwan

5. K. Sou, R. Klipper, B. Goins, H. Sakai, S. Takeoka, W.T. Phillips, E. Tsuchida. / Circulation Kinetics and biodistribution of Hemoglobin-vesicles. / The 9th Liposome Research Days Conference / May 11-15, 2004 / Hsinchu, Taiwan.

6. E. Tsuchida, T. Komatsu, Y. Huang, A. Nakagawa / Albumin, Instead of Liposome, as a Carrier of Oxygenated Heme (Albumin-heme)", / The 9th Liposome Research Days Conference / May 11-15, 2004 / Hsinchu, Taiwan.

7. E. Tsuchida / Safety and Efficacy of Hb-vesicles as the O₂ infusion system / The 23rd Symposium of the Korean Society of Transfusion (Invited Lecture) / 2004.5.21-22 / Muju, Korea

8. 小幡洋輔、武岡真司、西出宏之、酒井宏水、土田英俊 / ヘモグロビン小胞体(人工赤血球)投与後のサイトカイン放出挙動 / 第 53 回高分子年次大会 / 2004.5.25-27 / 神戸国際会議場

9. 大道直美、中川晶人、小松晃之、西出宏之、Stephen Curry、土田英俊 / アルブミン-ヘム錯体の構造と物理化学的特徴 / 第 53 回高分子学会年次大会 / 2004.5.25-27 / 神戸国際会議場

量で約 20 分間窒素バブルし、Hb 小胞体溶液中の酸素を除去した。ヘッドスペースを採取し、酸素濃度を酸素分圧として測定した。測定法はガスクロマトグラフィー法を原理とする測定機器 (GC-323:GL サイエンス社製, カラム:WG-100...無機ガス分析用) に測定気体を 150 μ L 注入し、得られたピーク面積から算出した。

C. 結果及び考察

オキシジェニクス社より提供された 7 種類の Hb 小胞体試料のヘッドスペースの酸素分圧の測定結果を Table 1 に示した。

Table 1 試料のヘッドスペース酸素分圧

製造番号	酸素分圧(Torr)	
Lot 4-5	3.32	
Lot 4-50	0.53	
Lot 5-21	0.00	
Lot 5-55	2.81	平均
Lot 6-6	0.00	1.06 \pm 1.41
Lot 6-59	0.00	
Lot 7-8	0.76	

バブル処理により酸素分圧が 1.06 \pm 1.41 Torr を示し、良好に置換されている事が確認された。

D. 結論

窒素バブルした Hb 小胞体試料を、窒素雰囲気下でガラス製バイアルに分注し、ゴム栓で密栓すれば、酸素の混入はほぼ完全に防げるものと判断された。

3. 粒径分布の評価

A. 研究目的

本研究では、得られた最終製剤の平均粒子径及び

その均一性、更に凝集物の有無について評価し、製造方法の確認を行うことを目的とした。

B. 研究方法

提供された試料 (Lot.4~7) を超純水により適正濃度に希釈調製し、動的光散乱法及びレーザー回折式粒度分布装置で粒子径測定を行った。測定方法としては中心粒子径の算出には動的光散乱 (NICOMP-ZLS, 380, article sizing systems) を使い、凝集物の検出にはレーザー回折式粒度分布測定 (SALD-1100, SHIMADZU) を使用した。

C. 結果及び考察

動的光散乱法により測定した結果を Table 2 に示した。Lot. 4~5 における Hb 小胞体の中心粒子径はいずれも、260~290 nm 付近に観測され、ほぼ粒子径の均一な製剤が得られているものと判断された。

Table 2 動的光散乱法による粒子径測定結果

製造番号	中心粒子径 (nm)	
	ガウス型分布	バイモダル分布
Lot.4-38	279.5	270.7
Lot.5-21	279.9	269.8
Lot.5-55	283.6	265.7

次に、レーザー回折式粒度分布測定を実施した結果を Fig. 4 に示した。Lot. 4~7 における Hb 小胞体の粒度分布は 0.17~0.45 μ m 付近のいずれも単一ピークが得られ、ほぼ粒子径の均一な製剤が得られているものと判断された。また、凝集物と考えられる粒子の存在は確認されなかった。

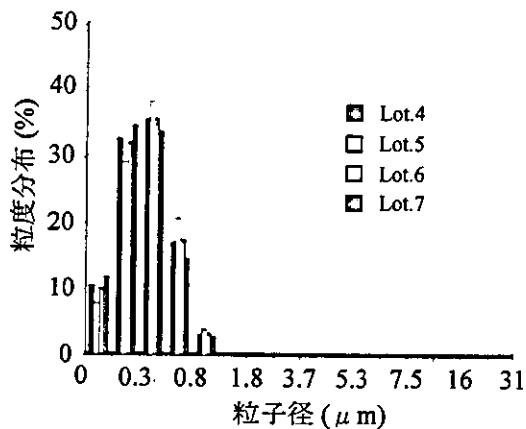


Fig. 4 レーザー回折式粒度分布測定による粒子径測定結果分布図

D. 結論

いずれの試料も均一な粒径の製剤を調製できていることが判明した。また、凝集物の存在も認められなかった。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 論文発表 (総説)

1. 甲斐俊哉、木田善規、福富一平、帆足洋平、片山直久、山本尚志、大川裕紀、広津一郎、佐藤誠. 完全合成型人工酸素運搬体の開発. *人工血液*. (2005) (in press)

1. 学会発表

1. 甲斐俊哉、木田善規、福富一平、帆足洋平、片山直久、山本尚志、大川裕紀、弘津一郎、佐藤誠 / 完全合成型人工酸素輸液の開発 / 日本血液代替物学会 / 2004.7.13 / 北方圏センター道庁別館

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： (1) Hb 小胞体の製造方法の確立および規格値設定
(2) カニクイザルへの Hb 小胞体単回負荷投与試験

分担研究者 須賀 裕子 株式会社オキシジェニクス 京都研究所 主席研究員
研究協力者 太田 勝次 株式会社オキシジェニクス 東京研究所 所長

研究要旨

(1) 早稲田大学より Hb 小胞体の製造法の技術移転を完了した。製造量、品質ともに安定した Hb 小胞体が製造できるようになった。また計 3 ロット分の製造試料の分析実測値をもとに規格値の検討を行い、今後製造の基準となる暫定規格値を設定した。

(2) カニクイザルに Hb 小胞体の単回負荷投与 (5, 10, 20 mL/kg 体重) 試験を実施した。2 週間の経過観察において変化のみられた主な項目は、血清コレステロール濃度 (中・高用量で高値)、血清フェリチン濃度 (高用量で高値) であった。また、血小板数と血小板機能に殆ど影響を及ぼさないことが確認された。

1. Hb 小胞体の製造方法の確立および規格値設定

A. 研究目的

Hb 小胞体の安定製造を目的として、早稲田大学からの技術移転を完了させ、オキシジェニクス社での製造を確立することを目的とする。また製造量、品質ともに安定した Hb 小胞体を供給するためには、基準となる規格値が必要であるので、安定製造が得られたロットの分析実測値より暫定規格値を設定する。

B. 研究方法

製造方法の確立

オキシジェニクス社京都研究所内に Hb 小胞体製造施設を設置した。既に稼動していた慶應義塾大学リサーチパークおよびオキシジェニクス社京都研究所にて、早稲田大学が確立した Hb 小胞体製造法の技術移転を行った。

規格値の設定

早稲田大学より技術移転をうけて、で安定製造 (3L スケール) できた 3 ロットについて、Hb 小胞体粒径、Hb 濃度、脂質濃度等の分析を実施し、その分析実測値より暫定規格を設定した。

C. 結果及び考察

製造方法の確立

早稲田大学からの Hb 小胞体製造技術移転は 2004 年 2 月より開始し、2005 年 1 月に終了した。その間、2 ロットを慶應リサーチパークにて、5 ロットをオキシジェニクス社京都研究所にて製造した。これらの内、3L スケールで安定製造できた 3 ロット (Lot. 5, 6, 7) について製造量、製造日を表 1 に示した。

規格値の設定

3Lスケールで製造したHb小胞体3ロット(Lot. 5, 6, 7)について、粒径、Hb濃度、脂質濃度等の測定を行い、その分析実測値より安定した製造が確認された。そこでこの3ロットの分析実測値より暫定規格値を設定した(Data not shown)。

Table 1 : Hb小胞体製造量

項目	Lot.5	Lot.6	Lot.7
製造量(L)	3.15	3.20	3.20
製造日	H16.11.12	H16.12.17	H17.1.20

3. カニクイザルへのHb小胞体単回負荷投与試験

A. 研究目的

カニクイザルにHb小胞体を単回静脈内投与し、安全性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

被験物質、対照物質の投与用量と投与経路

Hb小胞体の生理食塩水分散液(Hb濃度: 10 g/dL; 5, 10, 20 mL/kg体重の3用量)、あるいは対照として生理食塩水(20 mL/kg体重)を、正常雄性カニクイザルの前腕橈側皮静脈内にインフュージョンポンプを用いて5 mL/minの速度で投与した。

観察、検査項目

一般状態、摂餌量、体重、血圧、尿検査、血液学的検査(血小板、凝固、線溶系検査含)、血液生化学的検査、について投与2週間後まで経時的に評価し、最終剖検時には器官重量、骨髓検査、病理組織学的検査を実施した。また、Toxicokinetics

として血漿中Hb濃度(Hb小胞体由来)の測定を行った。

C. 結果及び考察

カニクイザルにHb小胞体を単回静脈内投与後の血漿中Hb濃度(Hb小胞体由来)を測定し、最終消失相の半減期を算出した結果、10 mL/kgで2.8日、20 mL/kgでは2.9日であった。このうち非メト化Hb画分の消失半減期については10 mL/kgで約15時間と見積もられ、救命救急臨床における有用性が示唆された。

Hb小胞体10 mL/kgおよび20 mL/kg投与群の血清コレステロールが、投与7日後および13日後に高値を示した(Fig.1)。Hb小胞体の脂質成分の代謝分解に起因した変化と推察される。一方、小胞体大量投与であるにもかかわらず、血小板数と血小板機能(出血時間測定にてスクリーニング)に殆ど影響を及ぼさないことが明らかとなった(Fig.2)。

Hb小胞体20 mL/kg投与群の3、7、13日後に、血清フェリチンが対照群に比し有意な高値を示した(Fig.3)。Hb代謝に基づく誘導性変化と考えられる。

D. 結論

カニクイザルにHb小胞体の単回負荷投与(5, 10, 20 mL/kg体重)し、2週間の経過観察において変化のみられた主な項目は、血清コレステロール濃度(中・高用量で高値)、血清フェリチン濃度(高用量で高値)であった。これら観察された変化に関しては今後更なる精査を予定している。

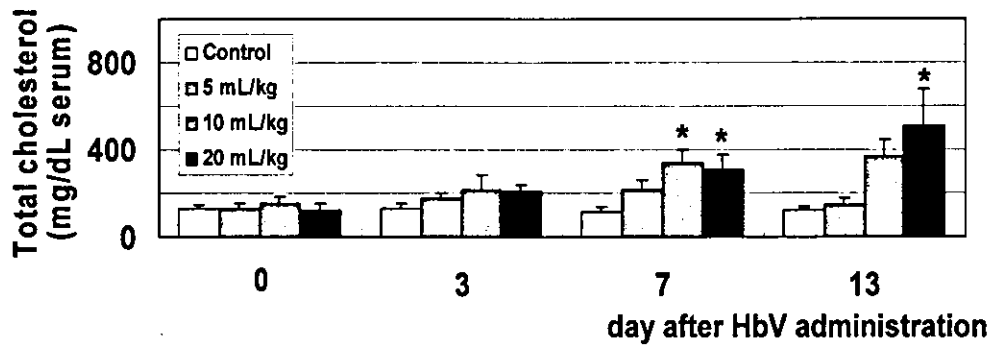


Fig.1 Serum cholesterol levels after single intravenous administration of HbV to male cynomolgus monkeys. *: significantly different from control value ($p < 0.05$)

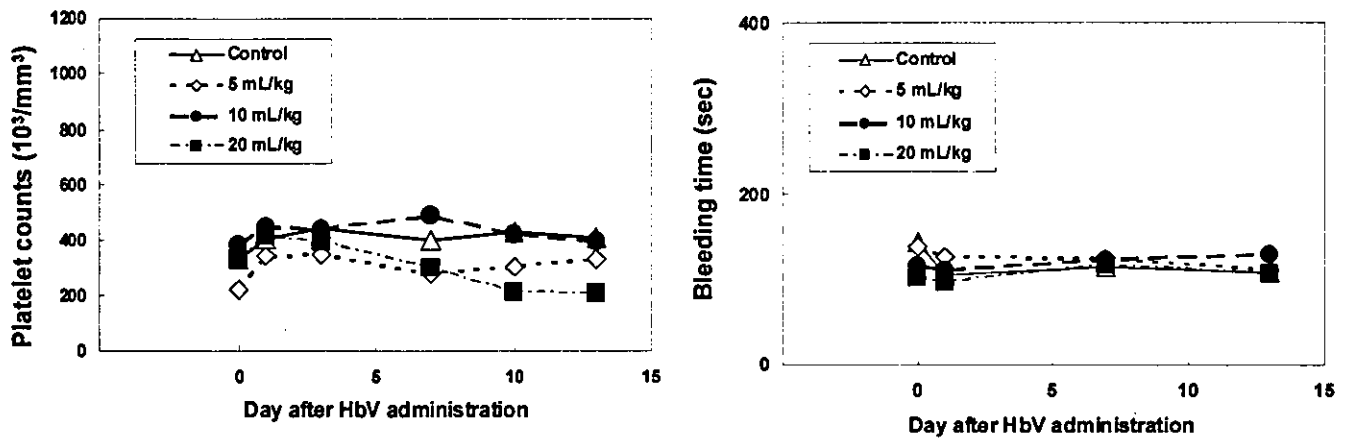


Fig.2 Platelet counts and bleeding time after single intravenous administration of HbV to male cynomolgus monkeys.

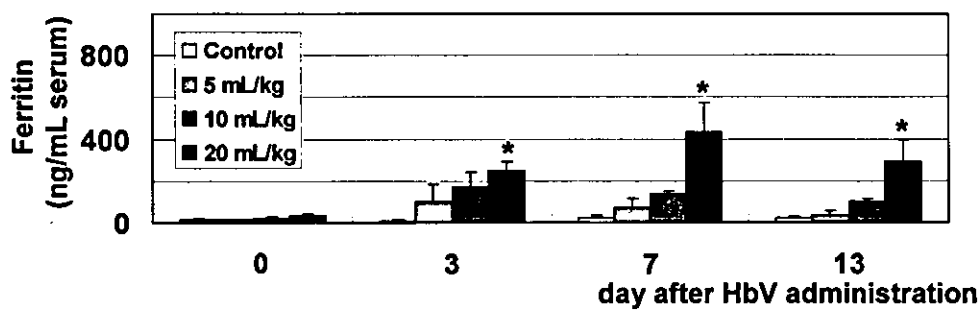


Fig.3 Serum ferritin levels after single intravenous administration of HbV to male cynomolgus monkeys. *: significantly different from control value ($p < 0.05$)

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 論文発表

1. 高木智史、大村光代、太田勝次、須賀裕子、松浦昭宏. ヒト赤血球由来ヘモグロビンによるヘモグロビン小胞体の開発と酸素輸液としての医療応用. *人工血液*. 2005 (in press)

2. 学会発表

1. 高木 智史 / ヒト赤血球由来ヘモグロビンによるヘモグロビン小胞体の開発と酸素輸液としての医療利用 / 第11回日本血液代替物学会年次大会 / 2004 / 札幌

G. 知的財産権の出願・登録情報 (予定を含む)

該当なし

別添 5

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>ASAIO J.</i> 50, 525-529 (2004) “ Safety evaluation of an artificial O ₂ carrier as a red blood cell substitute by blood biochemical tests and histopathology observations. ”	2004年11月	Lippincott Williams & Wilkins	Y. Huang T. Komatsu H. Yamamoto H. Horinouchi K. Kobayashi E. Tsuchida
<i>ASAIO J.</i> 50, 458-463 (2004) “Hemorrhagic shock resuscitation with an artificial oxygen carrier, hemoglobin vesicle, maintains intestinal perfusion and suppresses the increase in plasma tumor necrosis factor-alpha. ”	2004年11月	Lippincott Williams & Wilkins	A. Yoshizu Y. Izumi S. Park H. Sakai S. Takeoka H. Horinouchi E. Ikeda E. Tsuchida K. Kobayashi.
<i>Am J Respir Crit Care Med.</i> 170, 1239-1246 (2004) “ Importance of tumor necrosis factor-alpha cleavage process in post-transplantation lung injury in rats. ”	2004年12月	American Thoracic Society	T. Goto A. Ishizaka F. Kobayashi M. Kohno M. Sawafuji S. Tasaka E. Ikeda Y. Okada I. Maruyama K. Kobayashi
<i>Nippon Geka Gakkai Zasshi.</i> 106, 31-37 (2005) “Artificial blood. ”	2005年1月	日本外科学会	K. Kobayashi
<i>Stem Cells Dev.</i> 13, 315-322 (2004) “Cytotoxic difference of T cells expanded with anti-CD3 monoclonal antibody in the presence and absence of anti-CD28 monoclonal antibody. ”	2004年7月	Mary Ann Liebert, Inc.	Y. Yamada-Ohnishi H. Azuma N. Urushibara M. Yamaguchi M. Fujihara T. Kobata H. Ikeda

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
<p>日本輸血学会雑誌 50, 588-595 (2004) “Edstein-Barr virus 特異的 CD4 陽性 bulk cytotoxic T lymphocytes の ex vivo 増幅と解析”</p>	2004 年 8 月	日本輸血学会	漆原範子 山田淑子 宮崎孔 山口美樹 村橋秀明 関本達也 佐藤進一郎 加藤俊明 藤原満博 東寛 池田久實
<p>日本輸血学会雑誌 50, 620-625 (2004) “臍帯血凍結保存状態に関する保管検体による評価の有用性の検討”</p>	2004 年 8 月	日本輸血学会	伊藤のぞみ 佐藤典宏 茂木祐子 荒関みき 山本定光 東寛 池田久實 宮崎保
<p>人工血液. 12, 104-113 (2004) “ウイルス不活化の現状と課題”</p>	2004 年 7 月	日本血液代替物学会	阿部英樹 東寛 平山順一 池田久實
<p><i>Vox Sang.</i> 88, 41-51 (2005) “Heterogeneity of platelet responsiveness to anti-CD36 in plasma associated with adverse transfusion reactions. ”</p>	2005 年 1 月	Backwell Publishing	S. Wakamoto M. Fujihara N. Urushibara K. Morishita S. Kaneko H. Yasuda H. Takayama S. Yamamoto H. Azuma H. Ikeda