

Fig. 7. The effect of HbV and liposome 2 on the proliferation of Con A stimulated splenic T cells. The injection of both HbV and liposome 2 affect the proliferation of splenic T cells, but not the injection of Intralipid.

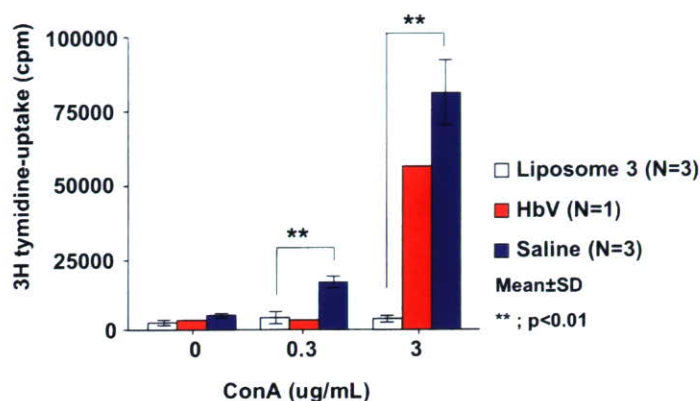


Fig. 8. The effect of HbV and liposome 3 on the proliferation of Con A stimulated splenic T cells. The injection of both HbV and liposome 3 affect the proliferation of splenic T cells

Table 1. The effect of DPPC on Con A stimulated T cell proliferation

	Hb	PEG	CHO	DPPC	DHSG	Accumulation	Inhibition
HbV	+	+	+	+	+	+	+
Liposome 1	-	+	+	+	+	+	+
Liposome 2	-	-	+	+	-	+	+
Liposome 3	-	-	-	+	-	+	+
Intralipid	-	-	-	-	-	-	-

Except for Intralipid, HbV, liposome 1, 2 and 3 showed inhibitory effect

### 3. 2. Flow cytometryによる解析結果

それぞれのサブセットについてCD3およびCD4の発現の有無を検討した。ClassII陽性、classII陰性のいずれのサブセットにおいても、CD3-CD4lowの細胞集団が認められ、それらの側方散乱光の強度は、HbVを予め投与した場合に明らかな増強を示

した。従って、このCD3-CD4lowのマーカーを持つ細胞集団がHbVを貪食していることが強く示唆された(Fig. 10)。細胞染色の結果と合わせて考えると、classII+CD3-CD4lowのフェノタイプを持つマクロファージ様の細胞と、classII-CD3-CD4lowのフェノタイプを持つ骨髄球様の細胞がHbVを捕捉した細

胞と推定される。

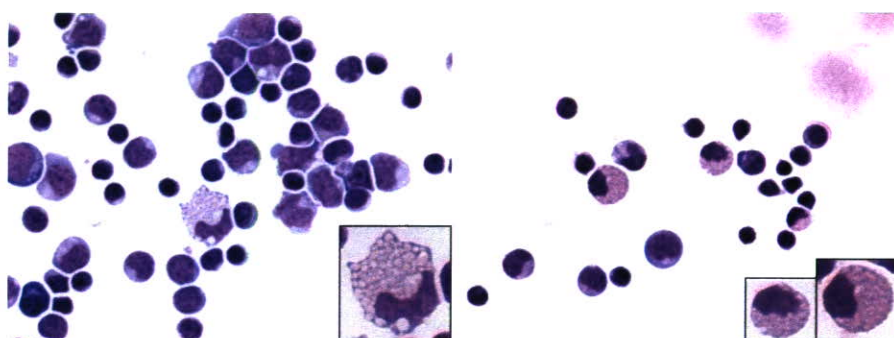
### 3.3 .T細胞の増殖抑制活性の検討

生理食塩水投与後の脾細胞の増殖反応に対する抑制効果を調べた結果、ClassII陽性サブセットとclassII陰性サブセットとも抑制活性をもっていることが判明した (Fig. 11)。しかし、その強さは同等ではなく、class II陰性サブセットでは1:0.2 の比率においても抑制効果が認められるのに対して、class II陽性サブセットでは1:0.2の比率では抑制効果は認められなかった。また、class II陰性サブセットは、HbV投与に関係なく、1:1の比率で抑制効果

が認められた。

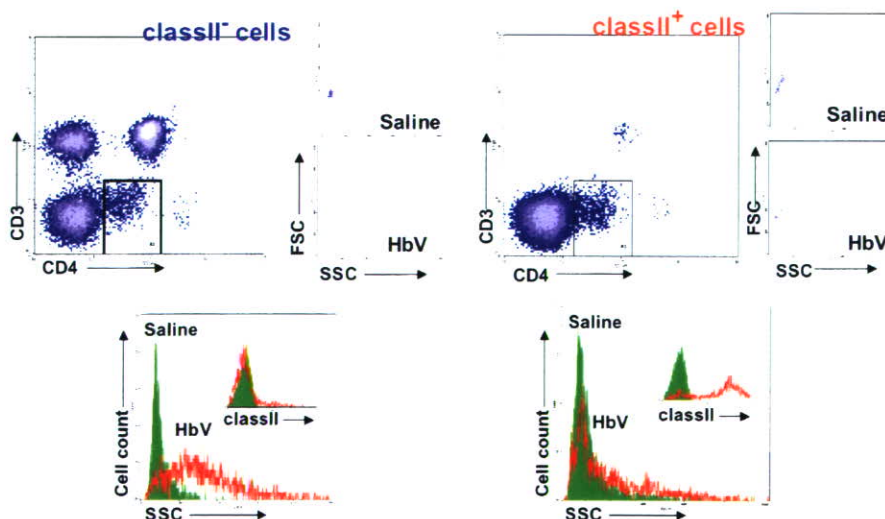
### D. 考察

これまでに、ラットにHbVを投与すると一過性に脾T細胞の増殖反応が抑制されるが、抑制は一週間で解除されること、Hb分子を内包していない空のリポソーム(liposome 1)でも同様の現象がみられることが明らかになっている。今回はHb分子を内包している脂質膜の組成を簡素化してゆき、抑制効果の発現を検討した。その結果、最も単純なリポソームであるDPPC liposome (liposome 3)でも増殖反応の抑制が誘導されることが解った。従って、



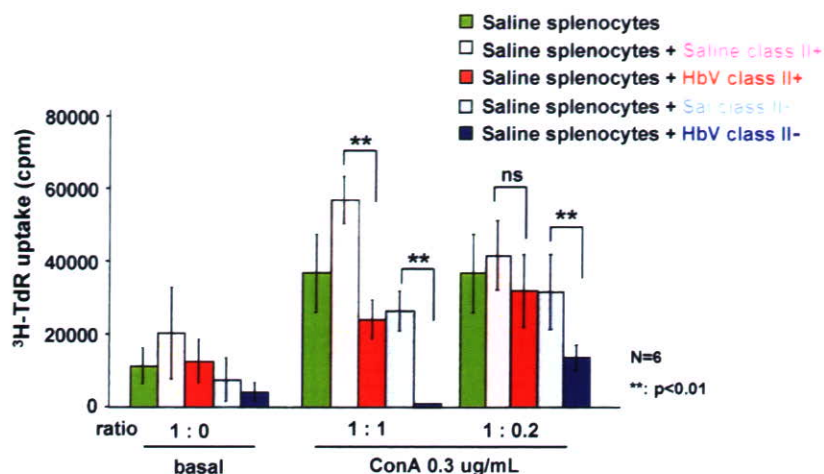
**Fig. 9. Morphologic feature of class II+ or class II- fraction**

HbV loaded rat spleen cells were divided into 2 subset by magnetic beads and each subset was stained with May-Grunwald-Giemsa. Both macrophage like cell and lymphocyte like cell are present in class II+ subset, in contrast myelocyte like cells with abundant cytoplasm and small lymphocyte cells are present in class II- cells.



**Fig. 10. Flow cytometric analysis of class II+ or class II- subset**

In both subset, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>low</sup> populations were shown to phagocyte HbV, because they increased side scatter intensity when HbV were loaded into rat in advance.



**Fig. 11. The effect of class II+ and class II - subset on splenocyte proliferation.**

Both subsets inhibit splenocyte proliferation. The inhibitory activity appears to be more intense in class II - subset than in class II + subset. Class II - subset appears to inhibit splenocyte proliferation without HbV loading.

HbV投与後の抑制効果はその基本骨格であるDPPC liposomeにより引き起こされると結論される。抑制の程度もHbVそのものよりはDPPC liposomeのほうが強い傾向があった。

HbV投与により脾細胞の中にT細胞の増殖を抑制する活性が生ずることが示唆されていた。今回の一連の実験から、抑制活性を持つ細胞として、フェノタイプ classII+CD3-CD4low と classII-CD3-CD4lowの二つの細胞集団に分類できる可能性がある。言い換えると、フローサイトメーターによる表面マーカーの解析およびHbV投与による側方散乱光強度の変化から、class II分子の発現の有無に関わらず、CD3-CD4lowのフェノタイプをもつ細胞群がHbVを取り込み、抑制効果を発揮している可能性がある。さらにMay-Grünwald-Giemsa染色の結果から、HbVを取り込んでいると思われる細胞群はclassIIの発現の有無でその形態が異なると思われる。即ちclassII-CD3-CD4low細胞は、形態学的に骨髓球様の細胞であるが、classII+CD3-CD4low細胞はマクロファージ様の細胞として認められる。更に抑制効果は前者が後者と比べて明らかに強い。今後はこれらの抑制活性を発揮していると考えられる細胞のより詳細な機能の解析、抑制効果のメカニズムの解析を行う予定である。

## E. 結論

HbV投与後に一過性に脾細胞のConA刺激に対する増殖反応が抑制される原因の一つは、HbVの脂質膜を構成しているDPPCである。また、HbV投与後の脾細胞中には、T細胞の増殖を抑制する活性を持つと推定される2種類の細胞集団(フェノタイプはclassII+CD3-CD4lowおよびclassII-CD3-CD4low)が認められる。今後はこれらの機能のより詳細な検討をするべきであろう。

## F. 健康危険情報

該当なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. H. Abe, H. Azuma, M. Yamaguchi, M. Fujihara, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, H. Ikeda. Effects of hemoglobin vesicles, a liposomal artificial oxygen carrier, on hematological responses, complement and anaphylactic reactions in rats. *Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.* 35, 157-172 (2007).
2. T. Komatsu, Y. Huang, S. Wakamoto, H. Abe, M. Fujihara, H. Azuma, H. Ikeda, H. Yamamoto, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Influence of O<sub>2</sub>-carrying plasma hemoprotein "albumin-heme" on

complement system and platelet activation in vitro and physiological responses to exchange transfusion. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 81(4), 821-826 (2007).

3. M. Yamaguchi, M. Fujihara, S. Wakamoto, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, H. Hamada, H. Azuma, H. Ikeda. Effects of hemoglobin vesicles, a cellular-type artificial oxygen carrier, on human hematopoietic stem/progenitor cells in vitro. *J. Biomed. Materials Res. A.* (in press).

## 2. 学会発表

1. 藤原満博、高橋大輔、東寛、酒井宏水、宗慶太郎、武岡真司、土田英俊、池田久實／In vitroにおけるヘモグロビン小胞体のヒトTリンパ球増殖反応に対する影響／第14回日本血液代替物学会 年次大会／2007.6.14-15／慶應義塾大学 三田キャンパス
2. 高橋大輔、藤原満博、東寛、宗慶太郎、酒井宏水、武岡真司、土田英俊、池田久實／リポソームがラット免疫系に及ぼす影響／第14回日本血液代替物学会 年次大会／2007.6.14-15／慶應義塾大学 三田キャンパス
3. 東寛、藤原満博、池田久實／HbVの血液適合性の検討(シンポジウム: 人工赤血球の諸問題)／第14回日本血液代替物学会 年次大会／2007.6.14-15／慶應義塾大学 三田キャンパス

## 分担研究報告書

## 人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究

## 分担課題：Hb 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	丸山 徹	熊本大学薬学部	教授
研究協力者	岩尾 康範	熊本大学薬学部	リサーチ・レジデント

## 研究要旨

本研究では、Hb小胞体(HbV)の出血性ショックモデルラットにおける体内動態特性を評価し、得られた結果からヒトの出血性ショック時におけるアニマルスケールアップを試みた。その結果、出血性ショックモデルラットにおけるHbVの消失半減期は健常時ラットの約30時間から18時間へと短縮し、末梢コンパートメントの分布容積や臓器移行性の有意な増大が確認された。したがって、HbVは出血性ショック時において投与初期から臓器へ効率よく分布し、酸素を供給することが示唆された。そこで、ヒトでの出血性ショック時におけるHbVの半減期を見積もったところ、約30時間程度と予測され、自己血回復までの十分な血中滞留性を保持することが示唆された。今回得られた知見はHbVの体内動態における安全性を確認するとともに臨床試験への有用な基礎資料になるものと考えられる。

## A. 研究目的

HbVはヒト赤血球由来のHbをリン脂質二分子膜中に内包させた、直径約250 nmの人工酸素運搬体である。HbVは優れた物理化学的特性、長期安定性に加え、動物試験においても十分な酸素運搬能を示すことが明らかとなり、輸血に変わり得る酸素輸液としての実用化が期待されている。しかしながら、その安全性に関する検討は、血液生化学的パラメータの測定及び血流特性、免疫等の機能維持に関する検討にとどまり、HbV自身がどのような動態を経て、体内より消失するかについての検討はほとんど行われていなかった。最近、我々はHbVの体内動態に関して、HbV内部のHbを<sup>125</sup>I標識した<sup>125</sup>I-HbVならびに脂質膜を構成するコレステロールを<sup>3</sup>H標識した<sup>3</sup>H-HbVを用いて、マウスおよびラットにおけるHbVの分布、代謝及び排泄経路を明ら

かにしてきた。

赤血球代替物であるHbVをヒトに適用する場合、大量出血時での投与が想定されるが、これまでの検討はいずれも健常動物を用いたものであり、病態時における体内動態挙動の詳細は未だ明らかでない。そこで、本研究では大量出血時に併発される出血性ショックモデルラットにおけるHbVの体内動態実験を行い、その動態特性を健常時と比較した。さらに、アニマルスケールアップの観点からヒトの出血時におけるHbVの消失半減期を予測し、HbVの有用性について評価した。

## B. 研究方法

## 1. 動物

Sprague-Dawley(SD)系雄性ラット(6週齢)を九動より購入し、1週間の予備飼育後、7週齢(200-220g)

で実験に使用した。

## 2. 倫理面への配慮

動物実験は、科学研究の一般原則に従い、動物の生命を尊重するという基本的観点に基づく動物福祉を護持するための配慮を念頭に置き、熊本大学実験動物倫理委員会のもとに、実験を施行した。

## 3. 出血性ショックモデルラットの作製及び心循環動態パラメータの測定

SDラットに非絶食、ペントバルビタール麻酔下で、左大腿動脈に挿入したポリエチレンチューブ(PE-50)より規定時間に規定量の脱血を行い、全血液量の40%の血液を脱血し、最終脱血終了15分経過後を出血性ショックモデルラット作製終了とし、各投与液を投与した。またその際、平均動脈圧、収縮期・拡張期血圧、脈拍数は右大腿動脈に挿入したPE-50を観血式血圧計に接続しモニタリングを行った。

## 4. 血清パラメータの測定

出血性ショックモデルラットを作製した際、0分及び蘇生直前に脱血した血液(約2 mL)をそれぞれbaseline、脱血直後のサンプルとし、直ちにpHメーター(HORIBA)でpHの測定を行った。その後、HbV(1400mg/kg)及び生理食塩水(22.4 mL/kg)を投与した。投与後7日目に下大静脈から約3 mL採血した。血清パラメータの測定は株式会社SRLに委託し、A液より乳酸値を、B液よりアルブミン、リン脂質、総コレステロール、遊離型コレステロール、尿素窒素、クレアチニン、AST、ALT、 $\gamma$ -GTP、HDL-コレステロール、鉄、リパーゼ、アミラーゼの測定を行った。

## 5. $^{125}\text{I}$ -HbV投与液の調製

HbVの $^{125}\text{I}$ ラベル化は IODO-GEN Iodination Reagent (Pierce)を用いて行った。動物実験における投与液は標識体を非標識体で希釈して調製した。

なお、ヒト血清アルブミン(HSA、5g/dL)を添加することで浸透圧の調節を行った。

## 6. $^{125}\text{I}$ -HbVの投与及び採血、放射活性の測定・分析

SDラットに非絶食、ペントバルビタール麻酔下、PE-50を右大腿動脈に挿入後、 $^{125}\text{I}$ -HbVを右大腿動脈より投与した。規定時間ごとに、ヘパリン処理した注射筒を用いて下大静脈から約1mL採血を行い、6000 rpmで5分間遠心分離し、血漿100 $\mu$ Lを採取した。血漿100 $\mu$ Lに1%ウシ血清アルブミン(BSA) 500 $\mu$ L、40%トリクロロ酢酸(TCA) 500 $\mu$ Lを加え攪拌した後、遠心分離(2500 rpm, 10 min)を行った。沈殿物中の放射活性をオートウェルガンマカウンター (ARC-5000, Aloka) にて測定し、MULTIにより体内動態パラメータを算出した。また、同時に各臓器の放射活性も測定した。尿・糞中への排泄は、代謝ゲージに入れたラットより経時的に採尿・採糞を行い、その全量の放射活性を測定することで評価した。

## C. 結果および考察

### 1. 出血性ショックモデルラットの作製と、血清パラメータ

現在、臨床において、赤血球濃厚液(MAP製剤)を必要とするのは循環血液量の40%以上の出血が起きた時とされている。そこでまず、ラットの全血液量の40% (22.4 mL/kg)を脱血することで出血性ショックモデルラットの作製を行った。**Fig. 1**にはその時の心循環動態パラメータを示す。出血性ショック時には平均動脈圧や心拍出量が持続的に低下しているが、本モデルでも平均動脈圧は、脱血開始直後に $79.9 \pm 4.3$  mmHgから $30.1 \pm 1.8$  mmHgまで低下し、蘇生までその血圧は40 mmHg以下に保たれていた。また蘇生後は、 $81.4 \pm 3.6$  mmHgまで回復した(**Fig. 1A**)。他方、心拍出量を反映する脈圧も脱血直後に $26.4 \pm 3.2$  mmHgから $15.3 \pm 3.1$  mmHgまで低下していたが、HbVで蘇生後には脱血前の値まで回復した(**Fig. 1B**)。平均心拍数は脱血開始後、

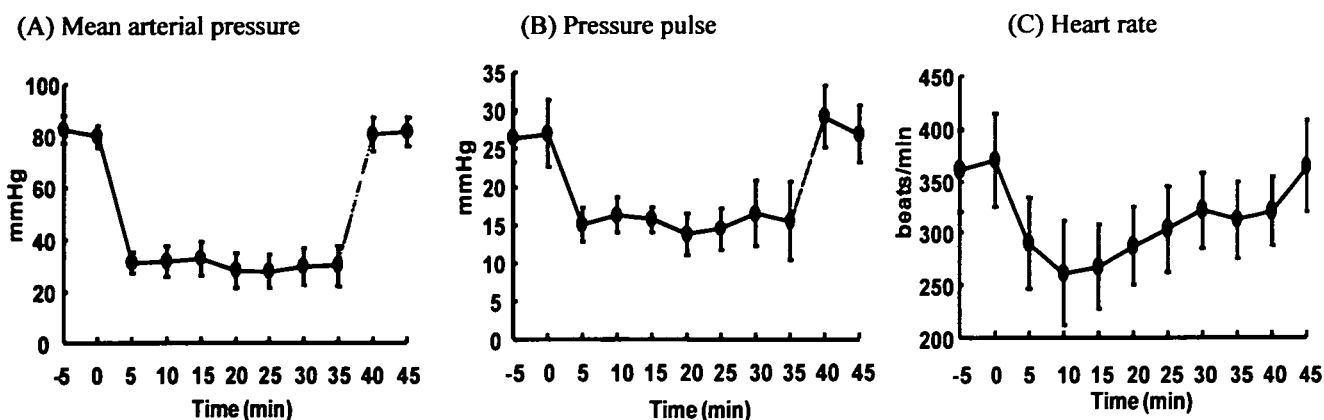


Fig. 1. Change in (A) mean arterial pressure, (B) pressure pulse, (C) heart rate from -5 min (5 min before bleeding) to 45 min (10 min after resuscitation). Hemorrhagic shock was induced in rats by withdrawing 40% of their blood volume and blood pressure was maintained within 40 mmHg for 30 min. After 30 min from start of bleeding, rats were resuscitated by injecting same volume of HbV. Points are means  $\pm$  SD ( $n = 10$ ).

369 $\pm$ 44 beats/minから290 $\pm$ 43beats/minに低下したが、脱血開始10分後から徐々に増加した。これは生体が全身血流量を維持するために脈拍数が上昇したと考えられる。また、脱血後、pHの7.55 $\pm$ 0.06から7.51 $\pm$ 0.05への低下、乳酸値の21.4 $\pm$ 4.0 mg/dLから62.8 $\pm$ 17.5 mg/dLへの有意な上昇など代謝性アシドーシスの傾向を示した。このように出血性ショック時にみられる平均動脈圧の低下、脈圧の低下、心拍数の減少やアシドーシスの傾向が認められたこと、さらには皮膚の蒼白・呼吸数の上昇も同時に確認されたことから総合的に判断すると、今回作製したモデルが出血性ショックモデルとして妥当性のあることが強く示された。

次に、出血性ショック時にHbVを投与することにより、血清パラメータにどのような影響を及ぼすか検討した。Table 1には脱血前後及び出血性ショック誘起後にHbV (1400mgHb/kg)または生理食塩水(22.4 mL/kg)を投与し7日後の各血清パラメータを示す。その結果、脱血後に腎機能マーカーであるクレアチニン値の有意な上昇が確認されたが、もう1つの腎機能マーカーである尿素窒素(BUN)及びその他のパラメータに有意な差は確認されなかった。投与後7日目においては、AST値のみ脱血前(74.0 $\pm$ 9.3 IU/L)に比べ、HbV投与群 (119.3 $\pm$ 28.8

IU/L)及び生理食塩水投与群(101.8 $\pm$ 11.4 IU/L)とも有意な上昇が確認された。脱血後に上昇したクレアチニン値は7日後には脱血前までの値に回復していた。また、HbV投与群と生理食塩水投与群を比較したところ、いずれのパラメータ間にも有意な違いは認められなかった。このことにより、出血性ショック誘起による一過性のパラメータの変動はあるものの、HbV投与群と細胞外補充液である生理食塩水投与群の間で血清パラメータに差がないことから、出血性ショック時にHbVを投与しても生体に大きな影響を与えないことが確認された。

## 2. 血漿中の濃度推移

出血性ショックモデルラット及び健常ラットに<sup>125</sup>I-HbVを1400 mgHb/kgで投与後の血漿中濃度の変化を検討した。Fig. 2には投与後72時間までの血漿中濃度推移の結果を示す。図から明らかのように、健常時に比べ出血性ショック時において投与初期から急激な血漿中濃度の低下が確認された。

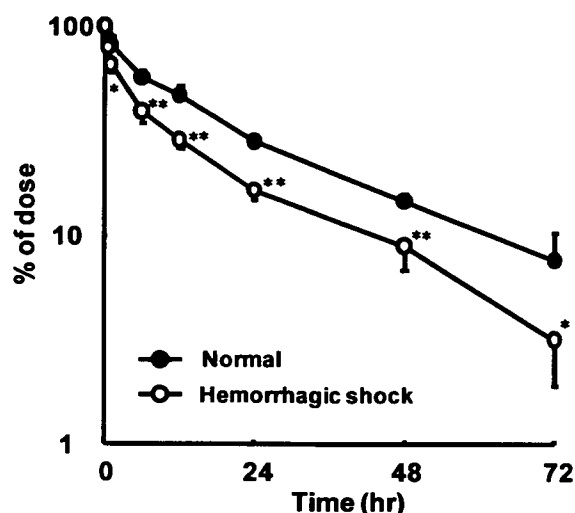
Table 2には血漿中濃度曲線より得られた各速度論パラメータを示す。健常群と比較すると出血性ショック群では分布相半減期 ( $t_{1/2\alpha}$ ) が約1/10倍に、消失相半減期 ( $t_{1/2\beta}$ ) が約2/3倍に減少し、それに伴

**Table 1.** Plasma clinical chemistry tests after withdrawing 40% of total blood volume and 7 days after administration of HbV or saline

	Baseline	Hemorrhage	7 days after hemorrhage	
			HbV	Saline
Albumin, g/dL	3.38 ± 0.13	2.96 ± 0.15	3.34 ± 0.28	3.32 ± 0.26
Phospholipids, mg/dL	124.4 ± 15.4	103.6 ± 12.0	139.2 ± 12.9	129.4 ± 14.2
Total-cholesterol, mg/dL	75.0 ± 11.3	59.4 ± 8.8	80.8 ± 10.3	75.2 ± 9.5
Free-cholesterol, mg/dL	20.2 ± 2.0	16.2 ± 1.9	20.2 ± 2.8	18.8 ± 2.3
BUN, mg/dL	13.1 ± 1.9	13.7 ± 0.6	16.0 ± 1.0	15.6 ± 2.0
Creatinine, mg/dL	0.17 ± 0.01	0.29 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.01
AST, IU/L	74.0 ± 9.3	65.6 ± 8.7	119.3 ± 28.8 <sup>a</sup>	101.8 ± 11.4 <sup>b</sup>
ALT, IU/L	42.4 ± 4.7	37.2 ± 2.4	57.0 ± 9.9	56.0 ± 9.7
γ-GTP, IU/L	<2.8	<2.8	<2.8	<2.8
HDL-cholesterol, mg/dL	23.0 ± 3.2	19.2 ± 2.6	28.2 ± 1.5	25.4 ± 2.9
Fe, μg/dL	153.5 ± 36.5	171.4 ± 54.7	148.7 ± 22.5	123.7 ± 66.3
Lipase, U/L	6.8 ± 0.4	6.8 ± 0.8	5.4 ± 0.5	5.8 ± 0.4
Amylase, U/L	669.8 ± 28.5	638.8 ± 34.0	604.0 ± 67.7	624.4 ± 66.0

Values are means ± SD (n = 3-5). a and b indicate significant differences from baseline (p < 0.01 and p < 0.05, respectively).

って、AUCの低下 (126.5 h\*% of dose/mL)、CL の増加 (0.8 mL/hr) 及び消失速度定数 (ke) の増加 ( $1.4 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ) が確認された。他方、投与直後の血漿中濃度を示す $C_0$ 及び中枢コンパートメントの分布容積を示す $V_1$ は両群間で同じ値を示した。しかしながら、末梢コンパートメントの分布容積を示す $V_2$ の値は出血性ショック群で約2倍に増加した。さらに興味深いことに、中枢と末梢のコンパートメント間の移行性を示す $k_{12}/k_{21}$ の値は健常群では1以下であるのに対して、出血性ショック時では1より大きくなっていった。これら $V_2$ や $k_{12}/k_{21}$ 値の増大より、出血性ショック時には組織への移行性が亢進していることが強く示唆された。



**Fig. 2.** Plasma concentration of HbV after  $^{125}\text{I}$ -HbV administration to normal (●) and hemorrhagic shock rats (○) Points indicate means ± SD (n = 5). \* p<0.05 and \*\* p<0.01, compared with normal rats group.



**Table 2.** Pharmacokinetic parameters of HbV after  $^{125}\text{I}$ -HbV administration to normal and hemorrhagic shock rats

	Normal	Hemorrhagic shock
$t_{1/2\alpha}$ , h	5.3 ± 3.9	0.58 ± 0.05 *
$t_{1/2\beta}$ , h	30.6 ± 4.0	18.1 ± 3.7 **
$C_0$ , % of dose/mL	9.1 ± 0.2	9.9 ± 0.5
$V_1$ , mL	10.9 ± 0.2	10.1 ± 0.5
$V_2$ , mL	5.5 ± 1.2	11.9 ± 1.6 **
$V_{ss}$ , mL	16.7 ± 1.1	21.6 ± 2.3 **
$k_e$ , $\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	0.70 ± 0.06	1.4 ± 0.1 **
AUC, h* % of dose/mL	210.3 ± 22.9	126.5 ± 12.8 **
CL, mL/hr	0.47 ± 0.04	0.80 ± 0.08 **
$k_{12}/k_{21}$	0.60 ± 0.14	1.2 ± 0.1 **

な差異が生じないことが明らかとなった。

Each value represents the mean ± SD (n=3).

\* p<0.05 and \*\* p<0.01, compared with normal rats group.

### 3. 臓器分布

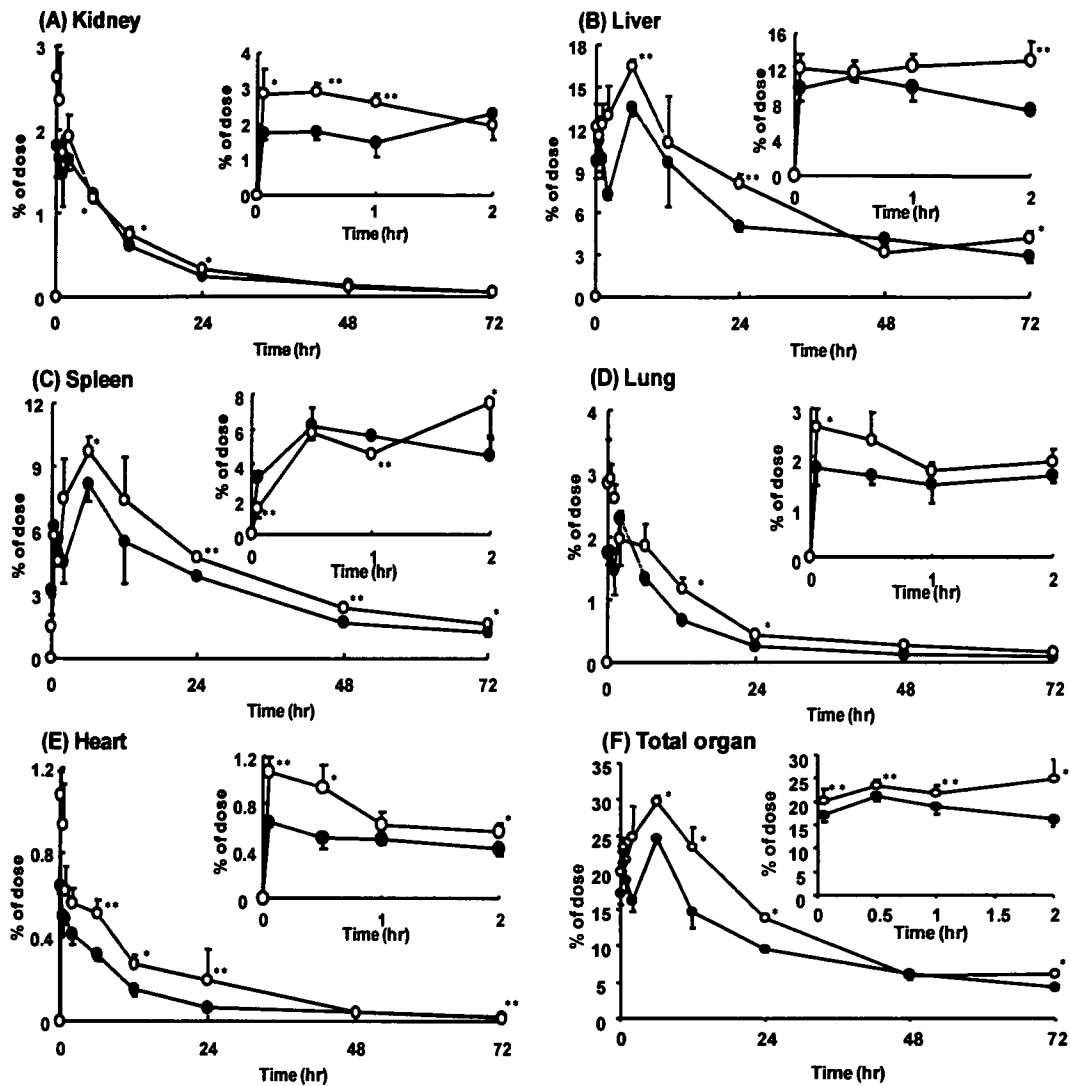
次にHbVの各臓器への経時的な分布推移について検討した (Fig. 3)。その結果、HbVは出血性ショック群の方が投与初期から臓器に高い割合で分布していることが判明した。Fig. 3F には腎臓・肝臓・脾臓・肺・心臓への分布の合計量の経時的推移を示すが、投与初期から臓器移行性が有意に亢進していた。これらの結果より、出血性ショック時においてHbVは低酸素状態の臓器に多く移行する可能性が示された。

### 4. 排泄経路

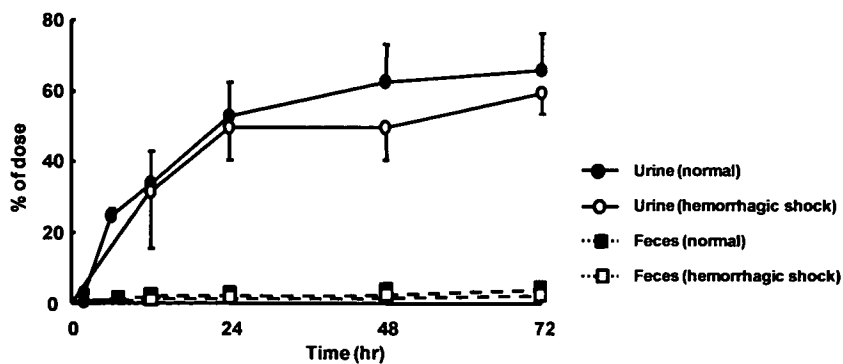
Fig. 4には健常群及び出血性ショック群におけるHbVの糞中及び尿中排泄量の経時的な推移を示す。 $^{125}\text{I}$ -HbVの場合、投与後3日までに健常群及び出血性ショック群でそれぞれ投与量の約65 %及び約60 %が尿中に排泄され、糞中への排泄は両投与群ともほとんど確認されなかった (Fig. 4, Table 4)。また、いずれの測定時間においても両群間で有意な違いが認められなかったことから、出血性ショック時においても、HbVの排泄経路や排泄量に大き

### 5. ヒトへの外挿

これまでに、Souらは $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAOを内封したHbVをウサギに投与した検討結果から、ウサギにおけるHbVの半減期が79.2時間であることを見出し、また、HbVの健常人での半減期は約66時間と見積もっている。そこで、これらの文献値に今回の結果を加味してヒトでの体内動態の予測、いわゆるアニマルスケールアップを試みた。今回の結果から、HbVの半減期には臓器への移行性が大きく関与しているため、本研究で得られたHbVの健常及び出血性ショックモデルラットの半減期と当研究室で以前報告したマウスの半減期、さらには、上述したウサギとヒトの予測半減期を用い、消失半減期の逆数 ( $\beta = 0.693/t_{1/2\beta}$ ) と各臓器 (腎臓・肝臓・脾臓・肺・心臓) の重量の合計を血液量で割った値との関係を調べたところ、Fig. 5のように両者間に高い相関性が認められた。そこで、この結果に基づきヒトにおける出血性ショック時の単回投与におけるHbVの半減期を見積もったところ、約30時間程度と予測された。



**Fig. 3.** Distribution of HbV in kidney (A), liver (B), spleen (C), lung (D), heart (E) and total organ (F), respectively, after  $^{125}\text{I}$ -HbV administration to normal (●) and hemorrhagic shock rats (○) Each point represents the mean  $\pm$  SD (n = 3). \* p < 0.05 and \*\* p < 0.01, compared with normal rats group.

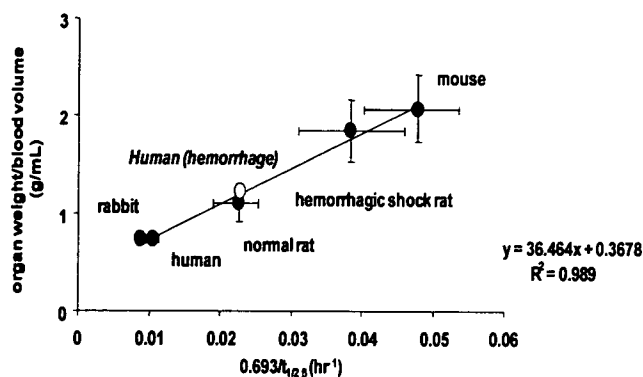


**Fig. 4.** Time dependence of urinary and fecal excretion of HbV after  $^{125}\text{I}$ -HbV administration to normal (●, ■) and hemorrhagic shock rats (○, □). Unbroken and dotted lines, urinary and fecal excretion, respectively. Points represent means  $\pm$  SD (n = 3).

**Table 4.** Urinary and fecal excretion ratio after administration of  $^{125}\text{I}$ -HbV to normal and hemorrhagic shock rats

	% of dose	
	Normal	Hemorrhagic shock
Urine	65.5 ± 10.5	58.9 ± 5.6
Feces	2.0 ± 0.5	3.2 ± 1.3

Each value represents the mean ± SD (n=3).



**Fig. 5.** Correlation between the reciprocal of elimination phase half-life and the total organ weight/total blood volume

#### D. 結論

現在、世界各国で人工酸素運搬体の開発が活発に行われており、効果や毒性といった薬理学的検討や製剤の物性に関する検討が多く行われているが、臨床試験に際して薬物動態に関する網羅的情報の構築が切望されている。本研究では、人工酸素運搬体では初めて出血性ショック時における体内動態を明らかにするとともに、その結果に基づきヒトにおける動態特性を予測した。したがって、今回得られた知見は、今後のHbVの臨床開発、特に至適投与設計において有用な基礎資料になるものと思われる。

#### E. 健康危険情報

該当なし

#### F. 研究業績

##### 1. 論文発表

1. Chuang, V. T., and Otagiri, M. Recombinant human serum albumin. *Drugs Today (Barc)*, 43, 547-561, (2007)
2. Ishima, Y., Sawa, T., Kragh-Hansen, U., Miyamoto, Y., Matsushita, S., Akaike, T., and Otagiri, M. S-Nitrosylation of human variant albumin Liprizzi (R410C) confers potent antibacterial and cytoprotective properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 320, 969-977, (2007)
3. Ishima, Y., Akaike, T., Kragh-Hansen, U., Hiroshima, S., Sawa, T., Maruyama, T., Kai, T., and Otagiri, M. Effects of endogenous ligands on the biological role of human serum albumin in S-nitrosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 364, 790-795, (2007)
4. Iwao, Y., Hiraie, M., Kragh-Hansen, U., Mera, K., Noguchi, T., Anraku, M., Kawai, K., Maruyama, T., and Otagiri, M. Changes of net charge and alpha-helical content affect the pharmacokinetic properties of human serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1774, 1582-1590, (2007)
5. Kadowaki, D., Anraku, M., Tasaki, Y., Kitamura, K., Wakamatsu, S., Tomita, K., Gebicki, J. M., Maruyama, T., and Otagiri, M. Effect of olmesartan on oxidative

- stress in hemodialysis patients. *Hypertens. Res.*, **30**, 395-402, (2007)
6. Kitamura, R., Yamamoto, Y., Nagayama, S., and Otagiri, M. Decrease in plasma concentrations of antiangiogenic agent TSU-68 ((Z)-5-[(1,2-dihydro-2-oxo-3H-indol-3-ylidene)methyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-propanoic acid) during oral administration twice a day to rats. *Drug. Metab. Dispos.*, **35**, 1611-1616, (2007)
  7. Kosa, T., Nishi, K., Maruyama, T., Sakai, N., Yonemura, N., Watanabe, H., Suenaga, A., and Otagiri, M. Structural and ligand-binding properties of serum albumin species interacting with a biomembrane interface. *J. Pharm. Sci.*, **96**, 3117-3124, (2007)
  8. Matsumoto, K., Nishi, K., Kikuchi, M., Kadowaki, D., Tokutomi, Y., Tokutomi, N., Suenaga, A., and Otagiri, M. Alpha1-acid glycoprotein suppresses rat acute inflammatory paw edema through the inhibition of neutrophils activation and prostaglandin E2 generation. *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1226-1230, (2007)
  9. Mera, K., Fujiwara, Y., Otagiri, M., Sakata, N., and Nagai, R. Immunological Detection of N{omega}-carboxymethylarginine by Specific Antibody. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, (2007)
  10. Mera, K., Nagai, R., Haraguchi, N., Fujiwara, Y., Araki, T., Sakata, N., and Otagiri, M. Hypochlorous acid generates N epsilon-(carboxymethyl)lysine from Amadori products. *Free. Radic. Res.*, **41**, 713-718, (2007)
  11. Nagai, R., Fujiwara, Y., Mera, K., Motomura, K., Iwao, Y., Tsurushima, K., Nagai, M., Takeo, K., Yoshitomi, M., Otagiri, M., and Ikeda, T. The Usefulness of Antibodies for Evaluating the Biological Significance of AGEs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, (2007)
  12. Nagai, R., Fujiwara, Y., Mera, K., and Otagiri, M. Investigation of pathways of advanced glycation end-products accumulation in macrophages. *Mol. Nutr. Food. Res.*, **51**, 462-467, (2007)
  13. Nagai, R., Mera, K., Fujiwara, Y., Nagai, M., and Otagiri, M. Comparison of Pharmacokinetics Between Highly- and Mildly-modified AGE- proteins in Mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, (2007)
  14. Nagai, R., Mera, K., Nakajou, K., Fujiwara, Y., Iwao, Y., Imai, H., Murata, T., and Otagiri, M. The ligand activity of AGE-proteins to scavenger receptors is dependent on their rate of modification by AGEs. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1772**, 1192-1198, (2007)
  15. Nakai, Y., Inoue, K., Abe, N., Hatakeyama, M., Ohta, K. Y., Otagiri, M., Hayashi, Y., and Yuasa, H. Functional characterization of human proton- coupled folate transporter/heme carrier protein 1 heterologously expressed in mammalian cells as a folate transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **322**, 469-476, (2007)
  16. Shimoishi, K., Anraku, M., Kitamura, K., Tasaki, Y., Taguchi, K., Hashimoto, M., Fukunaga, E., Maruyama, T., and Otagiri, M. An oral adsorbent, AST-120 protects against the progression of oxidative stress by reducing the accumulation of indoxyl sulfate in the systemic circulation in renal failure. *Pharm. Res.*, **24**, 1283-1289, (2007)
  17. Kaneko, K., Fukuda, H., Chuang, V.T.G., Yamasaki, K., Kawahara, K., Nakayama, H., Suenaga, A.,

Maruyama, T., Otagiri, M. Subdomain IIIA of dog albumin contains a binding site similar to site II of human albumin. *Drug Metab. Disposition* **36**, 81-86 (2008).

## 2. 学会発表

1. Iwao, Y., Hiraike, M., Kragh-Hansen, U., Kawai, K., Maruyama, T., Otagiri, M. / The elimination of serum albumin is dependent on its conformational Stability / Pharmaceutical Sciences World Congress. / 2007. April (Amsterdam)
2. Ishima, Y., Hiroshima, S., Sawa, T., Kragh-Hansen, U., Akaike, T., Otagiri, M. / S-Nitrosylation of human variant albumin Lipizzi (R410C) confers potent antibacterial and cytoprotective properties. / Pharmaceutical Sciences World Congress / 2007. April (Amsterdam)
3. Suenaga, A., Takeuchi, K., Anraku, M., Kitamura, K., Maruyama, T., Otagiri, M. / The role of 34cys of human serum albumin for oxidative stress on iron administrated hemodialysis patients. / Pharmaceutical Sciences World Congress. / 2007. April (Amsterdam)
4. 田先由佳、下石和樹、岩尾康範、安楽誠、末永綾香、丸山徹、小田切優樹。 / 尿毒症物質インドキシル硫酸による血中酸化ストレス誘導機序 / 日本薬剤学会第22年会 / 5月 (埼玉)
5. 異島優、赤池孝章、廣山秀一、澤智裕、丸山徹、小田切優樹 / 内因性リガンド結合によるヒト血清アルブミンのS-ニトロ化制御機構の解明 / 日本薬剤学会第22年会 / 5月 (埼玉)
6. 金子健一、福田光、Chuang Tuan Giam、Victor、山崎啓之、川原浩一、中山仁、丸山徹、小田切優樹 / イヌアルブミン分子上の薬物結合部位のトポロジー解析 / 日本薬剤学会第22年会 / 5月 (埼玉)
7. 米良克美 / 異型アルブミンを利用した低抗原性 DDS 担体の開発 / 日本薬剤学会第22年会 / 5月 (埼玉)
8. 田口和明、浦田由紀乃、安楽誠、甲斐俊哉、岩尾康範、土田英俊、小林紘一、小田切優樹 / 出血性ショック時におけるヘモグロビン小胞体の体内動態特性 / 第14回血液代替物学会年次大会 / 7月 (東京)
9. 永井竜児、米良克美、藤原章雄、本村啓太、小田切優樹、北村健一郎 / 腎疾患における AGE 生成経路の検討とその臨床マーカーとしての応用 / 第19回腎とフリーラジカル研究会 / 9月 (浜松)
10. Mera, K., Fujiwara Y., Otagiri, M., Sakata, N., Nagai, R. / Investigation of formation pathway and its immunohistochemical localization of N-carboxy methylarginine by specific antibody / 9th International Symposium on the Maillard Reaction. / September (Germany)
11. Saito, S., Ando, Y., Ueda, M., Nakamura, M., Kim, J., Ishima, Y., Akaike, T. and Otagiri, M. / Effect of nitric oxide in transthyretin-related amyloidosis. 8th ISSX meeting. / October (Sendai)
12. Taguchi, K., Urata, Y., Anraku, M., Kai, T., Iwao, Y., Kobayashi, K., Tsuchida, E., Otagiri, M. / Possible utility of hemoglobin-vesicle for blood cell substitution pharmacokinetic properties in hemorrhagic shock rat model. / 8th ISSX meeting. / October (Sendai)
13. 田先由佳、岩尾康範、佐藤圭創、丸山徹、小田切優樹 / インドキシル硫酸のスーパーオキシドアニオンラジカルに対するスカベンジ作用 / 第29回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム / 11月 (東京)
14. 廣山秀一、異島優、甲斐俊哉、小田切優樹 / NO トラフィックタンパク質としてのアルブミンの有用性 / 第29回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム / 11月 (東京)
15. 生田祥一郎、異島優、中城圭介、岩尾康範、丸山徹、小田切優樹 / 血中滞留性の向上を目的としたチオレドキシシ・アルブミン融合タンパクの設計と評価 / 第29回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム / 11月 (東京)
16. 米良克美、藤原章雄、坂田則行、山縣和也、小田切優樹、永井竜児 / 蛋白質の CMA 化とその生成経路の検討 / 第17回日本メーラード学会大会. 12月 (神戸)

17. 田口和明、岩尾康範、丸山徹、甲斐俊哉、土田英俊、小林紘一、小田切優樹 / 人工酸素運搬体ヘモグロビン小胞体の出血時における体内動態特性評価 / 第 24 回日本薬学会九州支部大会 / 12 月 (福岡)
  18. 米良克美、永井竜児、藤原章雄、坂田則行、小田切優樹 / 特異抗体を用いた N<sup>ω</sup>-carboxymethylarginine 生成経路および生体内局在の検討 / 第 24 回日本薬学会九州支部大会 / 12 月 (福岡)
  19. 田先由佳、岩尾康範、佐藤圭創、丸山徹、小田切優樹 / 尿毒症物質インドキシル硫酸の抗酸化能について / 第 24 回日本薬学会九州支部大会 / 12 月 (福岡)
  20. 平田憲史郎、中城圭介、異島 優、丸山徹、末永綾香、小田切優樹 / 糖鎖含有アルブミンの肝ターゲティング素材としての機能評価 / 第 24 回日本薬学会九州支部大会.12 月 (福岡)
  21. 生田祥太郎、異島優、中城圭介、岩尾康範、丸山徹、小田切優樹 / チオレドキシニン-アルブミン融合タンパク質の設計と機能評価 / 第 24 回日本薬学会九州支部大会.12 月 (福岡)
  22. 廣山秀一、異島優、甲斐俊哉、末永綾香、丸山徹、小田切優樹 / NO トラフィックタンパク質としてのアルブミンの有用性評価 / 第 24 回日本薬学会九州支部大会.12 月 (福岡)
- 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

## 人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究

## 分担課題：Hb小胞体投与における血液検体検査の最適化

分担研究者 村田 満 慶應義塾大学医学部 臨床検査医学 教授

## 研究要旨

本研究は、Hb小胞体が血球検査、血液凝固線溶系検査、生化学的検査等の検体検査に及ぼす影響を調査すること、そしてその影響を臨床現場で効率よく除去する簡便な方法を開発することを目的としている。主にHb小胞体(HbV)を*in vitro*で全血に添加し、検査の結果がどのような影響を受けるかを観察した。これまでの研究の結果、HbVの*in vivo*および*in vitro*添加ともに血球、凝固線溶系への大きな影響は認められなかったが、一部の比色法や比濁法を原理とする検査では異常値が認められることが明らかとなった。我々はヒト血清、血漿中のHbVを高分子凝集剤(デキストラン)を使用し除去する方法を採用し、生化学・免疫検査、凝固線溶検査、血糖検査にてその有用性を検討している。血清、血漿中へのデキストラン添加はそれ自体が一部の生化学、凝固検査値の上昇、低下傾向もたらした。しかし、多くの検査項目でデキストラン処理により、通常の検査室で行う遠心でヒト血清や血漿中のHbVが殆ど除去されることが明らかとなった。HbVは一部の検査に対し影響を及ぼすため、実際の臨床の場においてはHbV与後の検査時に注意が必要であり、具体的な除去方法の標準化が必要である。

## A. 研究目的

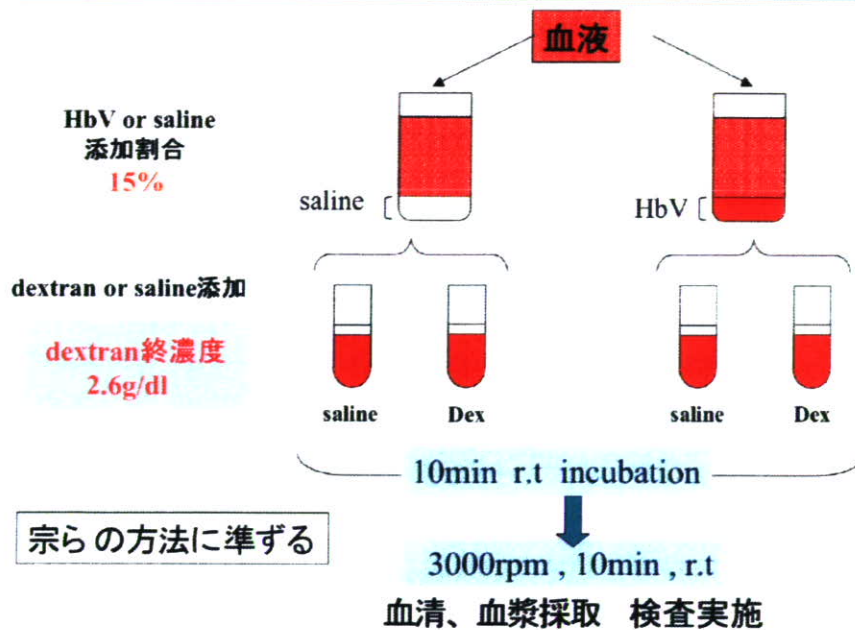
本研究は、血液代替物の安全性評価を目的とし、Hb小胞体(HbV)投与時におこりうる、さまざまな生体反応を臨床検査値の変化として捉える方法を探索している。動物実験を行う過程でHb小胞体そのものが検査測定値に影響することが判明した。HbVの粒子径は250nmと非常に小さいため、ヒト血液中にHbVが存在している場合、通常臨床検査で行われている遠心分離条件により得られる血清または血漿中にはHbVが浮遊している。さらに血清または血漿中のHbVは検査測定系への干渉作用があることがこれまでの検討により明らかとなっている。これは治験を実施する際の一つの問題点となりうる。従って具体的な臨床検査法の標準化との実施プロトコルの作成が急務と思われる。これまでの研究で、HbVを血漿や血清から完全に除去することは

困難であるが、(1) 超遠心法では大部分が除去可能であるが一部除去が不完全となること、一方で超遠心は煩雑で一般の検査ラボに不向きなこと、血清や血漿中のある成分を沈殿させてしまうなどの問題点も明らかになった。また(2) フィルター処理の問題点としては中性脂肪、凝固因子等がトラップされてしまうことが指摘された。そこでHbV混合血液の検査の最適化を行うため、HbVを高分子凝集剤(デキストラン)を用いて簡便に除去する方法を採用し、臨床への有用性を検討した。

## B. 研究方法

高分子量のデキストラン(400~500kDa)をHbV分散液に添加することによりHbVは凝集し遠心分離により沈降が可能となる。この原理を応用しデキストランによるHbV除去の効果を調べた。

## 研究方法



### C. 結果および考察

凝固学的検査の結果をTable 1に、また生化学的検査の結果をTable 2にまとめた。

Table 1. 凝固学的検査

項目	HbV の影響	DEX の HbV 除去 効果	DEX の影響	原理
活性トロンボプラスチン (APTT)	測定不能	あり	なし	Langdell 法(散乱光度法)
プロトロンビン (PT)	測定不能	あり	なし	Quick 一段法(散乱光度法)
フィブリノゲン	測定不能	あり	なし	発色性合成基質法
アンチトロンビン III (AT III)	上昇傾向	あり	なし	LPIA
vWF 抗原	測定不能	あり	なし	トロンビン凝固時間法
vWF 活性	測定不能	なし	低下傾向	ラテックス凝集反応
トータルPAI-1	低下傾向	—	上昇傾向	固定血小板凝集法
FDP	なし	—	なし	ラテックス免疫比濁法
D-ダイマー	?			ラテックス免疫比濁法



Table 2. 生化学的検査

項目	HbV の影響	DEX の HbV 除去 効果	DEX の影響	測定原理
総タンパク	上昇傾向 平均	あり	なし	Biuret 法
アルブミン	上昇傾向	あり	なし	BCG 法
総ビリルビン	測定不能	あり	なし	バナジン酸酸化法
AST	測定不能	あり	なし	JSCC 標準化対応法
ALT	測定不能	あり	なし	JSCC 標準化対応法
γGTP	測定不能	あり	なし	JSCC 標準化対応法
LDH	上昇傾向	あり	なし	JSCC 標準化対応法
LAP	なし	—	なし	酵素法(L-Leu-DBHA 基質)
CK	上昇傾向	あり	なし	JSCC 標準化対応法
ChE	低下傾向			Rate assay(P-ヒドロキシベンゾイルコリン基質)
尿素窒素	低下傾向	あり	なし	ウレアーゼ UV 法
クレアチニン	上昇傾向	あり	なし	酵素法
尿酸	?			ウリカーゼ POD 法
総コレステロール	上昇傾向	あり	なし	酵素法
エステル型コレステロール	上昇傾向	あり	なし	酵素法
遊離型コレステロール	上昇傾向	あり	なし	酵素法
トリグリセライド	なし	—	なし	LA(ラテックス凝集比濁法)
リン脂質	上昇傾向	あり	なし	酵素法(遊離グリセロール消去法)
遊離脂肪酸	なし	—	なし	酵素法
HDL-C 定量	なし	—	なし	酵素法
リポ蛋白質	なし	—	低下傾向	選択阻害法(直接法)
カリウム	なし	—	なし	電極法
カルシウム	なし	—	なし	OCPC 法
無機リン	なし	—	なし	モリブデン酸直接法
フェリチン	なし	—	なし	CLEIA
ハプトグロビン	上昇傾向	あり	なし	ネフェロメトリー
IgG	?			TIA
IgM	低下傾向	あり	なし	TIA
HBs抗原	なし	—	なし	CLIA
HBs抗体	なし	—	なし	CLIA
HCV抗体	なし	—	なし	RIA 固相法(IRMA)

HbVの分離操作をしない場合の検体では、凝固線溶検査ではATⅢで上昇傾向、トータルPAI-1で低下傾向を示し、その他FDP、D-ダイマーを除くすべての検査で測定不能と判断された。生化学検査においては総タンパク、アルブミン、LDH、CK、クレアチニン、CRP、ハプトグロビンの上昇が見られた。また、総コレステロール、エステル型コレステロール、遊離型コレステロール、リン脂質ではHbVの脂質膜が影響し上昇した。低下傾向を示した項目はChE、尿素窒素、IgMであった。総ビリルビン、AST、ALT、 $\gamma$ GTにおいては検査不能と判断された。免疫学検査項目であるHBs抗原・抗体、HCV抗体いずれもHbVによる影響は認められなかった。

一方、HbV浮遊血液にデキストランを添加し遠心分離で除去した血清、血漿はHbVの干渉作用は見られず生食添加条件とほぼ同様な検査値となった。この結果はデキストランがHbVを除去していることを示す。しかし、デキストランの影響により生化学検査ではリポプロテイン(a)の低下、凝固検査ではvWF活性の低下、トータルPAI-1の上昇が見られた。リポプロテイン(a)の低下はデキストランの凝集作用によるものと考えられる。vWF活性の低下、トータルPAI-1の上昇の原因については今後、調査の必要があると思われる。

#### D. 結論

血液中のHbVをデキストランにより除去することによってその血清、血漿は一部の検査を除きHbV

の影響を受けることなく測定可能であった。今後、病的サンプル(血液)を用いて同様な検討を行うとともに実臨床でのデキストラン使用に関するプロトコールを作成する必要がある。

#### E. 健康危険情報

該当なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Takahashi S, Ushida M, Komine R, Shimodaira A, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, Watanabe G, Ikeda Y, Murata M. Platelet responsiveness to in vitro aspirin is independent of COX-1 and COX-2 protein levels and polymorphisms. *Thromb Res.* 121, 509-17 (2008).

##### 2. 学会発表

村田 満／ヘモグロビン(Hb)小胞体投与における血液検体検査の最適化／第14回日本血液代替物学会年次大会／2007.6.14-15／慶應義塾大学 三田キャンパス

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

## 分担研究報告書

## 人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究

## 分担課題：Hb小胞体の開発指針の検討、および血液型判定に及ぼす影響の検討

分担研究者 高折 益彦 東宝塚さとう病院 名誉院長・川崎医大 名誉教授

## 研究要旨

国内、国外で人工酸素運搬体を研究、開発に当たっている研究者と連絡をとり、本研究班で実施すべき研究の進路を検討した。その上で各分担研究者の研究企画に参画し、それぞれの研究方法、結果解析を各分担研究者とともに検討した。また、開発中にある人工酸素運搬体(Hb小胞体, HbV)を患者に使用することを想定し、血液型判定検査に対して、投与したHbVがいかなる影響を及ぼすか検討した。

## A. 研究目的

1) 国内、国外の人工酸素運搬体を研究、開発に当たっている研究者、ならびに血液レオロジーの研究者に、今までに得られたHbVの血管内動態に関するデータを提示し、追加検討すべき諸点への意見を求める。

2) 本研究班の研究者と、研究方法ならびに得られた成績の解釈、更なる研究課題、方法の検討を行う。

3) 人工酸素運搬体(HbV)を患者に使用することを想定し、血液型判定においてHbVの混入の影響を検討する。

## B. 方法

1) 上記国内外の研究者に対し、それぞれの専門分野に対応した項目について、本研究班での成績(既発表論文、ならびに未発表成果)を郵送し、方法論、結果の妥当性、成績の解釈についての意見を求めた。

2) 研究班会議、血液代替物学会などの機会以外

にも、共同研究者の所属する施設を訪問、実験などから得られたそのままのデータを詳細に分析、検討した。

3) 医療機関の倫理委員会の承認が得られた研究協力者から得たA、B、O、AB型それぞれの血液とHbVを0%から1, 2, 5, 10, 20, 30, 40%の割合に混合、それぞれについて試験管法、および自動血液型判定を、おもて試験、及びうら試験で行い、両方法の適合性を検討した。

## C. 研究結果

1) 各研究者からの意見としては、i) HbVの血液中滞留時間と、内包するヘモグロビン(Hb)のメトヘモグロビン化を如何に長くするかの指摘、ii) 細網内皮系への貪食を防止する対策(例えばHbVへの接着分子抗体の配合)、iii) HbVが血液内で軸流を呈するようにそのサイズを大きくする試み、iv) 臨床使用には予期せざる出血への対応のみならず、希釈体外循環での人工心肺回路への充填を第一選択とすること、等がその主なものであった。

2) 研究班内の研究者との討議、研究計画への参

加に関しては、i) 臨床使用を目的としてのHbVの安全性、有効性を検討するために希釈式自己血輸血での利用をモデルとした実験計画を作製した。ii) 各種人工膠質との併用に伴うレオロジー変化の観察計画を作製した。これらの討論、検討から、前臨床試験で実施すべき諸点を補充することができた。

3) おもて試験においては、40%までのHbV混入では試験管法、自動血液型判定器いずれを用いても判定は可能であった。また特定の血液型での判定においても影響は認められなかった。うら試験において自動血液型判定器を用いた場合、5%までのHbV混入で判定可能であった。試験管法においても20%以上の混入では判定に困難を感じた。

#### D. 考察

1) 国内外の研究者の意見として、HbVのような細胞型人工酸素運搬体に対する評価は高いことが示された。従って、今後は上記“研究結果”に述べた諸点について更なる基礎的研究を重ねる必要性を感じた。現段階での製品でもその有用性、安全性は臨床使用を満足させられると思われる故に、製造面での充実が必要と思われた。

2) 研究班内の各研究者と個々に討論することによって、より具体的な研究計画の立案を行う事ができ、その意義が大きいことが認められた。

3) HbVを既に投与された患者を想定したABO型判定では、上記のいずれの方法も使用できることが示された。しかし、輸血用血液の適合性を確認する場合、自動血液型判定器を用いた場合には、5%以下のHbV混入例においてのみ可能で、それ以上の混入の場合には不可能であることが明らかになった。また、試験管法でも判定に困難を伴うことが認められた。

#### E. 結論

現在開発中の人工酸素運搬体HbVは、十分臨床使用に対応できるものであるため、速やかに次段階、すなわち臨床治験第一相に前進すべきものと結論付けられた。また、HbV使用患者での輸血用適合液の選択には、細心の注意が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 高折益彦、堀之内宏久、小林絢一. 救急医療の現場での輸血医療の実態と人工酸素運搬体への期待. 救急医学 31, 981-986 (2007)
2. 酒井宏水、堀之内宏久、山本学、池田栄二、武岡真司、高折益彦、土田英俊、小林絢一. ヘモグロビン小胞体(HbV)-リコンビナントアルブミン分散溶液による40%交換輸血:ラット脾臓内HbV代謝と造血に関する2週間の観察 (論文記事: secondary publication). 日本輸血細胞治療学会誌 53, 47-55 (2007).

##### (著書)

1. 高折 益彦 著: 周術期輸血. 克誠堂 東京 2007

##### 2. 学会発表

1. 高折益彦/人工酸素運搬体 (大会長シンポジウム)/第14回日本血液代替物学会年次大会/2007.6.14/東京 慶應義塾大学
2. A. Sato, H. Sakai, M. Takaori, S. Takeoka, E. Tsuchida. / Rheological properties of Hb-vesicles suspended in a series of plasma substitute solutions. / The 11th International Symposium on Blood Substitutes / 2007. Oct. 18-21 / Beijing, China.

#### G. 知的財産権の出願・登録情報

該当なし