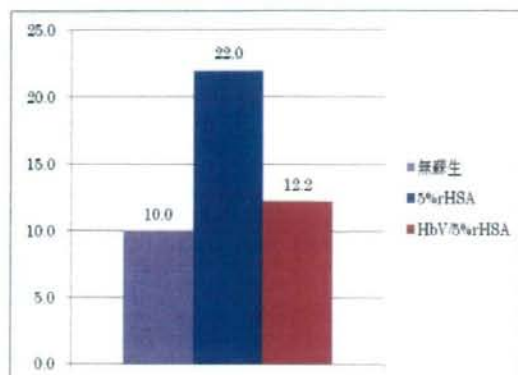
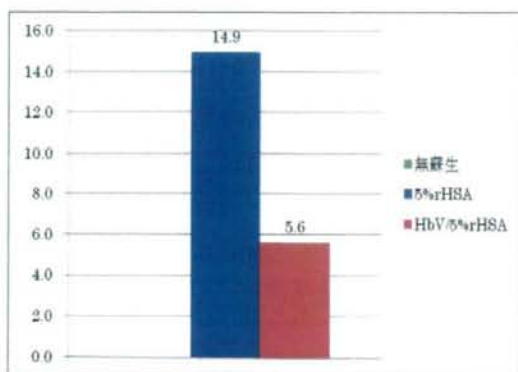


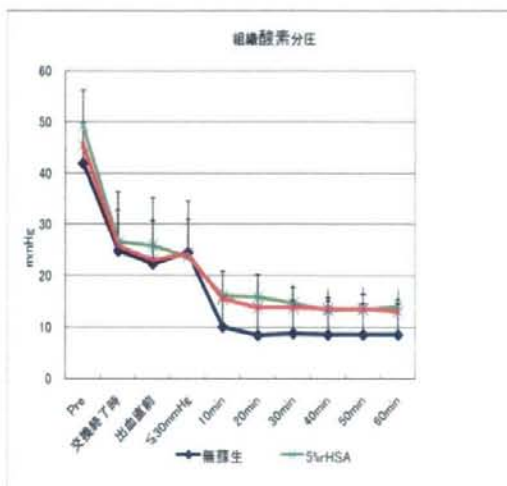
出血量について、60分後に生存している動物は回復し、腹腔内の出血量を測定し、犠牲死させた。出血量は無蘇生群で 10 ± 2.3 ml、5%アルブミン生食群で 22.0 ± 3.5 ml、HbV群で $12.2 \text{ml} \pm 7.5$ mlで無蘇生群とアルブミン生食群、無蘇生群とHbV群との間に有意差を認めた。



腎破裂作成後に血圧が30mmHgに低下した時点で輸液組成を開始したが、血圧を35mmHgから45mmHgの間に維持するために必要であった輸液量は5%アルブミン生食群では 14.9 ± 2.9 ml、HbV群では 5.6 ± 6.4 mlであり、両者の間に有意差を認めた。



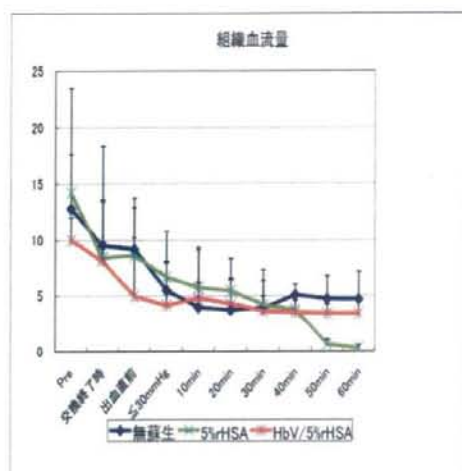
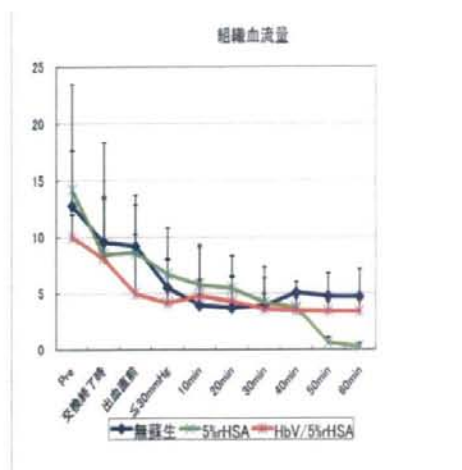
平均動脈圧は5%アルブミン生食群で輸液組成を続けているにもかかわらず低下した。無蘇生群およびHbV群では血圧を維持することができていた。



皮下組織酸素分圧は一樣に低下したが輸液組成を行っている群 (5%アルブミン生食群、HbV群) で良好である傾向があった。

腹直筋での血流量は正常時の50%以下にまで落ち込んだ。そして5%アルブミン生食群では血圧を維持するために輸液の投与が大量となったが、組織血流量は減少した。

血中乳酸値は上昇を続けたが、蘇生群では症状が抑制され、特にHbV群では生食群に比し、有意に低値であった。



D. 考察

鈍的外傷では腹腔内あるいは胸腔内の出血による出血性ショックが病態を重篤にさせる因子の一つである。救急医療施設では、出血の制御と輸液による蘇生を同時に行うことで治療目的を達することができるが、受傷現場あるいは搬送中は止血操作が十分に行えないため、救急施設へ到着するまでの効果的な治療についてはまだ検討の余地がある。特に、欧米で確立されている受傷現場より救急施設までの間を晶質液による輸液で血圧を維持する様式で治療を行なった場合、出血量が多くなり、予後が不良となる可能性が大きいことが発

表されるようになってより、初期輸液蘇生に関する多くの検討がなされるようになってきた。今回われわれは、鈍的腎破裂による制御不能の腹腔内出血を起こすラットモデルを開発し、輸液蘇生による生存、組織酸素代謝について検討した。当初ナイーブな動物を用いた腎破裂モデルでの検討を行なったところ、腹腔内で容易に止血されていた。このため、ヘパリン化して検討を行なったところ、制御不能の出血を惹起することが可能となった。しかし、ヘパリン化ではヘパリンによる凝固抑制状態が組織酸素代謝に影響する可能性があったため、臨床的な病態とかけ離れるのではないかと考えた。そこで、Hydroxyethyl starch (HES) を用いて血液希釈を行い、その後と同様の腎破裂を作成した。HESの量を予測循環血液量と同量とすると、全身ヘパリン化したときとほぼ同様の制御不能出血を惹起することができ、また、凝固能力には大きな影響が出ないことが考えられたのでこの方法を用いて検討することとした。

対照群としては無蘇生群、5%アルブミン生食群、Hb小胞体を5%アルブミン生食に分散し、ヘモグロビン濃度を8.6g/dlとしたHbV群を用いた。

血圧を上昇させるために輸液のスピードを上げると、晶質液による蘇生でも、膠質液による蘇生でも出血量が増加することが明らかにされているため、蘇生時には血圧の上限を45mmHgとして蘇生を継続、組織血流と組織酸素分圧、血中乳酸値を指標として酸素代謝について検討した。

結果としてはHbV群で観察期間の死亡例は無く、他の群では蘇生によっても死亡する例を認めた。出血量の算定でも5%アルブミン群では有意に出血量が多かった。また、組成に必要な輸液量も5%HSA群ではHbV群の3倍強であり、HbV群で出血量が抑制され、また、5%アルブミン生食群では蘇生を続けているにもかかわらず血圧が徐々に低下しており、血圧の制御にHbVが影響を与えている可能性が示唆された。

皮下の酸素分圧の変化に関しては無蘇生群では

著しく低くなった。これは組織の細動脈の収縮による血流定価とFunctional capillary densityが減少したため酸素供給が著しく減少したためと考えられた。これに比し、5%アルブミン生食群とHbV群では組織酸素分圧は低下するものの、一定のレベルで安定し、末梢循環が安定していたためと考えられた。

腹直筋の組織血流をレーザードップラー法で測定したところ、無蘇生群でも一定の血流を保って推移した。5%アルブミン生食群では蘇生開始より徐々に血流が減少し、120分後にはほとんど血流が途絶する状態になった。これは血圧の低下が主な原因と考えられ、制御不能出血の蘇生に膠質液を大量に投与することの危険性を示すものと考えられた。

HbV群では組織血流が保たれ、組織酸素分圧も一定に推移していたので、ショック状態にあるものの、酸素代謝が抑制された状態で安定し、回復可能な状況にあると考えられた。

血中乳酸値は無蘇生群で最も上昇し、HbV群で上昇は認めるものの無処置群に比して上昇が抑制されていた。これは、組織での血流が少ない状況ながら酸素運搬体が機能して組織に酸素供給を行ったため、嫌気代謝が抑制されたと考えてよいものと思われた。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawada I, Soejima K, Watanabe H, Nakachi I, Yasuda H, Naoki K, Kawamura M, Eguchi K, Kobayashi K, Ishizaka A. An alternative method for screening EGFR mutation using RFLP in non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol*. 2008 Oct;3(10):1096-103.
2. Shiono S, Kawamura M, Sato T, Nakagawa K, Nakajima J, Yoshino I, Ikeda N, Horio H, Akiyama H, Kobayashi K; Metastatic Lung Tumor Study Group of Japan. Disease-free interval length correlates to prognosis of patients who underwent metastasectomy for esophageal lung metastases. *J Thorac Oncol*. 2008 Sep;3(9):1046-9.
3. Kamiya K, Hayashi Y, Douguchi J, Hashiguchi A, Yamada T, Izumi Y, Watanabe M, Kawamura M, Horinouchi H, Shimada N, Kobayashi K, Sakamoto M. Histopathological features and prognostic significance of the micropapillary pattern in lung adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2008 Aug;21(8):992-1001.
4. Kawamura M, Nakajima J, Matsuguma H, Horio H, Miyoshi S, Nakagawa K, Fujisawa T, Kobayashi K; Metastatic Lung Tumor Study Group of Japan. Surgical outcomes for pulmonary metastases from hepatocellular carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008 Jul;34(1):196-9.
5. Yamamoto M, Izumi Y, Horinouchi H, Teramura Y, Sakai H, Kohno M, Watanabe M, Kawamura M, Adachi T, Ikeda E, Takeoka S, Tsuchida E, Kobayashi K. Systemic administration of hemoglobin vesicle elevates tumor tissue oxygen tension and modifies tumor response to irradiation. *J Surg Res*. 2009 Jan;151(1):48-54.
6. Kuroda H, Kawamura M, Hato T, Kamiya K, Kawakubo M, Izumi Y, Watanabe M, Horinouchi H, Kobayashi K, Nakayama M. Syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone after chemotherapy with vinorelbine. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008 Jul;62(2):331-3.

7. 須崎裕典、酒井宏水、小林直樹、池田達彦、堀之内宏久、小林 絃一、武田 朴、戸川 達男、土田英俊. 多波長パルス分光法を用いたHb小胞体用パルスオキシメータに関する研究. 人工血液 16, 198-204 (2008).
8. H. Sakai, Y. Seishi, Y. Obata, S. Takeoka, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Fluid resuscitation with artificial oxygen carriers in hemorrhaged Rats: Profiles of Hb-vesicles degradation and hematopoiesis for 14 days. Shock 31, 192-200 (2009).
9. H. Sakai, M. Okamoto, E. Ikeda, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Histopathological changes of rat brain after direct injection of hemoglobin-vesicles (oxygen carriers) and neurological impact in an intracerebral hemorrhage model. J. Biomed. Materials Res. Part A (in press).
10. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicles and red blood cells as carriers of carbon monoxide prior to oxygen for resuscitation after hemorrhagic shock in a rat model. Shock (in press).
11. K. Taguchi, T. Maruyama, Y. Iwao, H. Sakai, K. Kobayashi, H. Horinouchi, E. Tsuchida, T. Kai, M. Otagiri. Pharmacokinetic analysis of hemoglobin vesicles for red blood cell substitution in a rat model of hemorrhagic shock. J. Control. Release (in press).
- Tsuchida. Review of hemoglobin-vesicles as artificial oxygen carriers (Review paper). Artif. Organs 33, 139-145 (2009)
3. E. Tsuchida, K. Sou, A. Nakagawa, H. Sakai, T. Komatsu, K. Kobayashi. Artificial oxygen carriers, hemoglobin vesicles and albumin-hemes, based on Bioconjugate Chemistry. Bioconjugate Chem. (in press)
4. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicle, a cellular artificial oxygen carrier, that fulfills the physiological roles of the red blood cells structure. Adv. Exp. Med. Biol. (in press).

2. 学会発表

1. 堀之内宏久、酒井宏水、土田英俊、池田達彦、小林絃一 / (教育講演) 人工酸素運搬体の臨床応用へ向けた取組みと開発状況 / 第56回日本輸血・細胞治療学会総会 / 福岡国際会議場 / 4.25-28, 2008
2. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hb-Vesicle: A Cellular Hb-Based Oxygen Carrier that Fulfills the Physiological Roles of the RBC Structure / ISOTT 2008 (International Society on Oxygen Transport to Tissue) / Sapporo Prince Hotel / August 3-7, 2008
3. T. Ikeda, H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hb-Vesicle: A Cellular Hb-Based Oxygen Carrier that Fulfills the Physiological Roles of the RBC Structure / ISOTT 2008 (International Society on Oxygen Transport to Tissue) / Sapporo Prince Hotel / August 3-7, 2008
4. 酒井宏水、堀之内宏久、小林絃一、土田英俊 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)のNO, COとの反応制御と新しい医療応用 / 第57回高分子討論

(総説、著書など)

1. 酒井宏水、堀之内宏久、小林絃一. FDA Workshop on Hemoglobin Based Oxygen Carriersに参加して. 人工血液 16, 23-29 (2008).
2. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E.

5. 池田達彦、堀之内宏久、井澤菜緒子、河野光智、泉陽太郎、渡辺真純、川村雅文、宗慶太郎、酒井宏水、土田英俊、小林絃一 / Beagle犬を用いた40%脱血ショックにおけるHb小胞体の蘇生効果および中長期生存後の安全性の検討 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
6. 勢司泰久、堀之内宏久、相川直樹、酒井宏水、土田英俊、小林絃一 / 腎障害による制御不能出血モデルに対するヘモグロビン小胞体の蘇生効果 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
7. 堀之内宏久、勢司泰久、河野光智、泉陽太郎、酒井宏水、小林絃一、土田英俊 / 血管損傷による制御不要出血性ショックの蘇生 -人工酸素運搬体の効果について- / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
8. 河野光智、竹田貴、堤恭介、池田達彦、泉陽太郎、渡辺真純、堀之内宏久、小林絃一、酒井宏水、土田英俊 / マウス肺切除 + 周術期出血モデルでのヘモグロビン小胞体投与の有効性の検討 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
9. 田口和明、丸山徹、甲斐俊哉、酒井宏水、土田英俊、小林絃一、小田切優樹 / 出血性ショックモデルラットにおけ頻回投与時のヘモグロビン小胞体の体内動態特性 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
10. 高橋大輔、藤原満博、東寛、宗慶太郎、酒井宏水、堀之内宏久、小林絃一、土田英俊、池田久實 / ヘモグロビン小胞体(HbV)が免疫系に及ぼす影響 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
11. K. Taguchi, Y. Urata, M. Anraku, T. Maruyama, T. Kai, D. Kadowaki, H. Sakai, K. Kobayashi, E. Tsuchida, M. Otagiri / Effect of initially injected hemoglobin vesicles (HbV) on the pharmacokinetics of second injection of HbV in mice. / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
12. H. Azuma, H. Abe, D. Takahashi, M. Fujihara, H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, H. Ikeda / Transient induction of immune-suppressor cells in rat spleen by massive injection of hemoglobin-vesicle (HbV) / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
13. Y. Izumi, M. Yamamoto, K. Takeuchi, M. Watanabe, H. Horinouchi, Y. Teramura, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Potential tumor oxygenation by systemic administration of hemoglobin vesicles in a mouse Lewis lung carcinoma model / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
14. Y. Tomita, H. Toriumi, J. Tatarishvili, M. Tomita, M. Unekawa, H. Sakai, E. Tsuchida, H. Horinouchi, K. Kobayashi, N. Suzuki. / Effect of artificial RBCs

- on murine hemorrhagic model / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
15. H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hemoglobin-vesicles as O₂- and CO carriers / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
16. H. Sakai, K. Sou, Y. Izumi, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Hb-vesicle, a cellular Hb-based oxygen carrier, fulfills the physiological roles of the RBC structure. / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
17. Y. Izumi, H. Nagata, T. Yamada, H. Morisaki, H. Sakai, H. Horinouchi, J. Takeda, E. Tsuchida, K. Kobayashi / The effect of hemoglobin vesicle administration on ventilator induced lung injury / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
18. R. Aeba, Y. Seishi, H. Horinouchi, M. Yamazaki, E. Tsuchida, H. Sakai, K. Kobayashi / Effect of artificial oxygen carrier Hb vesicle on cerebral blood flow during and after hemodiluted cardiopulmonary bypass in rat / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
19. P. Bercik, J. Lu, E.F. Verdu, H. Sakai, E. Tsuchida, S.M. Collins / Assessment of inflammation-altered intestinal permeability using arterially perfused murine jejunal loop. / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
20. H. Sakai, A. Sato, K. Masuda, S. Takeoka, E. Tsuchida / Hemoglobin encapsulation in vesicles retards the reaction with NO by intracellular diffusion barrier / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
21. Y. Seishi, H. Horinouchi, N. Aikawa, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Effect of HbV as a resuscitation fluid in uncontrolled hemorrhage shock model: blunt kidney injury model / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
22. H. Horinouchi, Y. Seishi, M. Kohno, Y. Izumi, H. Sakai, K. Kobayashi, E. Tsuchida / Resuscitation of hemorrhagic shock due to uncontrolled hemorrhage – effect of hemoglobin-vesicle in vascular injury model / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
23. 酒井宏水、堀之内宏久、土田英俊、小林紘一 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)とCOの反応性と細胞保護効果 / 第46回日本人工臓器学会大会 / 東京 六本木アカデミーヒルズ40階 / 2008.11.27-29
24. 小林紘一 / 人工血液開発の将来展望 / 平成20年度研究成果発表会「人工血液をつくる(9)」 / 慶應義塾大学医学部 北里講堂 / 2

分担課題：ヘモグロビン小胞体(HbV)が免疫系に与える影響

研究分担者	池田 久實	北海道赤十字血液センター	所長
研究協力者	東 寛	北海道赤十字血液センター	研究部長
	藤原 満博	北海道赤十字血液センター	研究部
	高橋 大輔	北海道赤十字血液センター	研究部

研究要旨

ポリエチレングリコール修飾ヘモグロビン小胞体(HbV)をラットに投与後、脾臓に誘導される免疫抑制細胞の同定とその作用機序について検討し以下の結果を得た。FITCで標識した空の vesicleを用いることにより、vesicle 貪食細胞のフェノタイプを解析した結果、CD11b陽性(マクロファージ/モノサイト系のマーカー)かつCD172(未熟な骨髄球の持つマーカー)が陽性であり、その多くは既にラットで報告されているmyeloid derived suppressor cell (MDSC)と類似のフェノタイプを持つ事がわかった。また、脾細胞全体の数%がvesicleを貪食していることもわかった。さらに、T細胞の増殖が抑制されるためには、細胞間の直接的な接触が必要であることも明らかとなった。

A. 研究目的

我々は、HbVのラット免疫応答への影響を検討した一連の実験を通し、HbVの投与により脾臓に一過性にT細胞の増殖を抑制する少なくとも二つの抑制性細胞が誘導されることを明らかにしてきた。本研究は、二つのサブセットに関して、その細胞表面マーカーのより詳細な検討、およびT細胞増殖抑制の機序を明らかにする事を目的としている。

B. 研究方法

1. Con A刺激に対するラット脾T細胞の増殖反応の検討

実験にはWKAHラット(♂, 9-12週齢, 体重約280-330 g)を用いた。ラットに循環血液量の20%

(v/v)に相当するHbV溶液(あるいはHb分子を内包していない空リボソーム)(約3.3-4.6 mL)(脂質含量として約6g/dl)をエーテル麻酔下、尾静脈より輸注した。コントロール群には同量のsalineを輸注した。

HbVあるいはHb分子を内包しない空のリボソームをラットに輸注後およそ16時間後にエーテル麻酔で犠牲死し、無菌的に脾臓を摘出した。培養液(RPMI 1640/10%FCS/50 μ l 2-mercaptoethanol (2-ME)) 5 mLに浸した脾臓をディッシュ中ですりつぶし、その懸濁液を遠心チューブに移して静置することにより、大きな組織塊を沈降させた。上清を2,000 rpm \times 5 min遠心し、沈殿した細胞をRPMI1640で洗浄した後、塩化アンモニウム-トリス緩衝液(IBL免疫生物研究所) 5 mLにて3-5分間溶

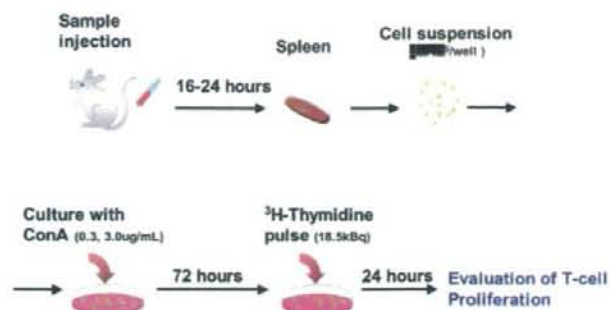


Fig. 1. Experimental protocol for evaluation of the effect of liposome on Con A stimulated T cell proliferation

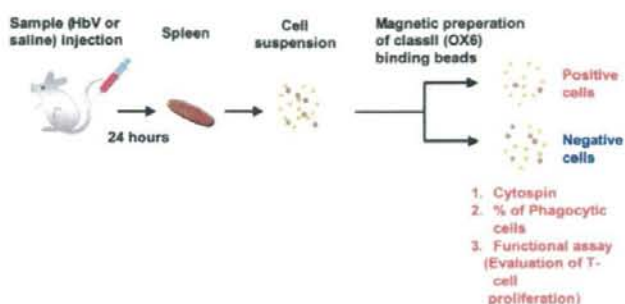


Figure 2. Experimental protocol the separation of class II+ and class II- subsets

血処理をした。溶血処理細胞液に5 mlの培地 RPMI/FCS/2-MEを加えた後、遠心・洗浄を行い、最後に培養液に懸濁して脾細胞とした。この脾細胞を丸底96穴プレートにtriplicateで分注 (2×10⁵個/200 μL/ウェル) し、Con A (終濃度0.3, 3 μg/ml) を加え37 °C, 5% CO₂にて培養を開始した。培養72時間後に各ウェルに18.5 kBqの³H-デオキシチミジン (アマシャム) 10 μLを添加し、その24時間後にセルハーベスターにて細胞を回収した。細胞DNAに取り込まれた³H-デオキシチミジン量を液体シンチレーションカウンタにて測定した(Fig. 1)。

2. 抗体と試薬

FITC/APC標識-抗CD3(G4.18)、FITC/APC標識-抗CD4(OX35)、PE標識-抗CD8a(OX8)、-抗CD25(OX39)、

- 抗 CD11a(WT-1) 、 - 抗 CD11b/c(WT-5) 、 - 抗 CD172(OX41) 、 - 抗 PR1(anti-granulocytes) 、 - 抗 CD103(OX62, anti-DCs) 、 - 抗CD161(NKR-P1A) 、 - 抗class I(OX18) 、 - 抗class II(OX6)はBecton Dickenson社より購入した。PE標識-抗CD43(W3/13)はSerotec社より購入した。

3. Class II 陽性分画と陰性分画の vesicle 貪食細胞の割合と T細胞増殖反応抑制効果に関する検討

HbVをラットに投与した後、anti-class II(OX6)抗体をコートした磁気 beads, anti-MHC classII(OX-6)microbeads, MACS (Meltiny Biotech, Bergishi, Gladbach, Germany) を用いて脾細胞を class II陽性分画とclassII陰性分画に分け、おのおの

をサイトスピンにかけてMay-Grunwald Giemsa染色し、その形態を光学顕微鏡下で観察しvesicleを貪食していると思われる細胞の割合を目視にて検討した。同時に、class II陽性分画と陰性分画のT細胞増殖反応抑制効果についても検討した。

4. FITCを標識したvesicle(FITC-vesicle)を用いた貪食細胞の表面マーカーの検討

HbV小胞体と同じ組成であるが、FITC-lipid(N-(fluorescein-5-thiocarbonyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt)(Molecular Probes, Cat#F-362)を含有した蛍光標識空小胞体(FITC-vesicles)を調製した。FITC-vesiclesを投与後、脾臓を摘出し、細胞浮遊液としたのち、はじめにanti-class II(OX6)をコートした磁気beadsを用いてclass II陽性とclass II陰性の分画に分けた。

次にフローサイトメータで、FITC陽性を示す細胞集団をgateし、その細胞集団の細胞表面マーカーの解析を行った。また、一部はサイトスピンをかけたのち、スライドグラスにマウントされた細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。

5. Transwellを用いた実験

細胞のCSFE染色

脾細胞浮遊液(1×10^7 /ml)1mlを1mlのチューブにとり、1%FCS/PBSで2回洗浄後1%FCS/PBSで再浮遊

する。続いてCFSE(Invitrogen)を最終濃度 $5 \mu\text{M}$ となるように添加し 37°C 5minインキュベーションする。その後1%FCS/PBSで洗浄し次にメディアウム(10%FCS/RPMI1640)で洗浄し、同じメディアウムに再浮遊した。実験開始前にFCMで染色されていることを確認した。

Transwellは(Flacon 3095 $0.1 \mu\text{m}$)、culture plateはFalcon plate (Falcon 3504)を用いた。HbV投与16時間後に取り出したラット脾細胞 4×10^5 個とCSFEで染色したコントロールの脾細胞(生食投与) 4×10^5 をそれぞれ上室と下室に入れCon A $0.3 \mu\text{g/ml}$ 存在下で3日間培養した。同時に、両者の混合培養も行った。培養後72時間後にFCMで細胞のCSFE蛍光強度の変化を解析した。

C. 実験結果

1. Class II陽性分画と陰性分画中のHbV貪食細胞の割合とその機能

HbV投与後に脾細胞をClassII陽性と陰性の分画に分け、各分画をスライドグラスにマウントしMay-Grunwald-Giemsa染色後に顕微鏡下で観察した。泡沫状に見える細胞質を有しHbVを貪食していると考えられる細胞の割合を算出すると、Class II陽性分画と陰性分画中の貪食細胞の割合は後者(おおよそ15%)が前者の3倍強であった(Fig 3)。

コントロール脾細胞のCon A刺激を各々の分画の存在下で行うと、どちらの分画でも増殖抑制効果

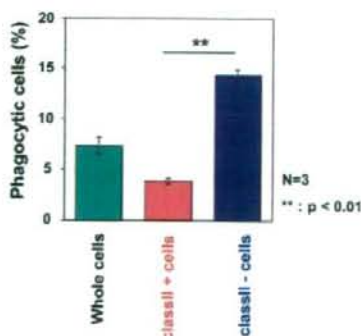


Figure 3. Percentage of HbV phagocytised cells.

The percentage of HbV phagocytised cells was 3-4 times higher in classII negative subset than in classII positive subset.

が認められた。Class II陰性分画ではclassII陽性分画の1/5の細胞数でも抑制効果が認められた (Fig 4)。

2. FITC-vesicle陽性細胞の形態とその表面マーカーの検討結果

FITC-vesicle投与後に摘出した脾細胞中には、フローサイトでFITC 陽性を示めす細胞群が認めら

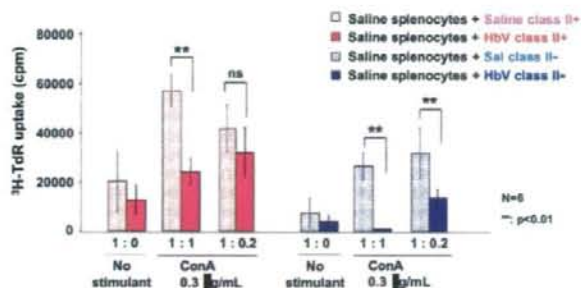


Figure 4. The effect of class II positive and class II negative subset on splenocytes proliferation.

Both subsets were shown to have suppressive effect on the proliferation of saline loaded-splenocytes. The effect of class II negative subset was stronger than that of class II positive subset.



Fig.5 Recognition of cells that phagocytised FITC -labelled vesicle by fluorescence microscopy. Light microscopy revealed the presence of cell with foamy or granulated cytoplasm. The same cell were shown to be positive for fluorescence intensity. Left: class II positive subset, right: class II negative subset

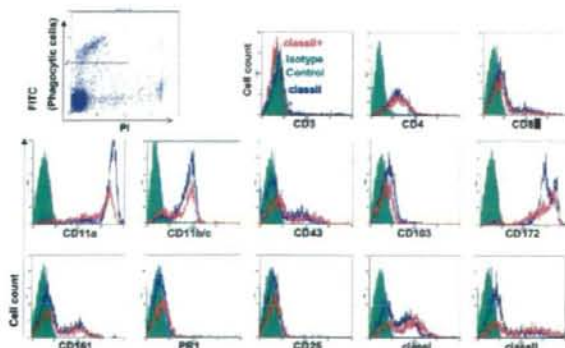


Fig. 6 Flow cytometric analysis of cell surface markers of cells positive for FITC intensity.

FITC positive cells expressed both CD11b/c and CD172.

Table 1 Summary of cell surface maker analyses

	classII+	classII-	Rat MDSCs
CD3	-	-	(non-T)
CD4	+	+	+
CD8	+/-	+/-	-
CD11a	+	+	+
CD11b/c	+	+	+
CD43	+/-	+/-	N.D
CD103 (anti-DCs)	-	-	-
CD172	+	+	+
CD161	+/-	+/-	N.D
PR1 (anti-granulocyte)	-	-	N.D
CD25	-	-	-
MHC classI	+	+	+
MHC classII	+	-	-

Class II positive subset and negative subset were identical in terms of cell surface antigen. In addition, their phenotype were shown to be similar to those of rat MDSC.

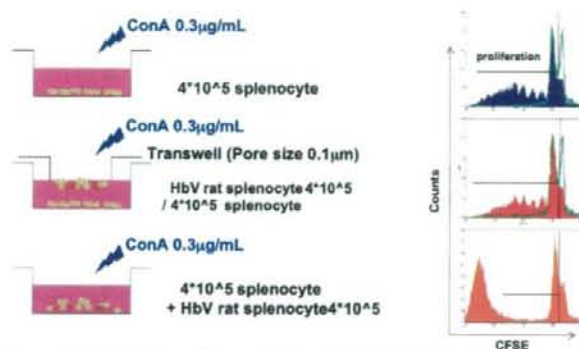


Fig. 7 Necessity of cell-to-cell contact for the inhibition of T cell proliferation.

T proliferation of control splenocytes was clearly inhibited when they were stimulated with Con A in the presence of HbV-loaded splenocyte(lower). However, when control splenocytes were separated from HbV-loaded splenocytes by transwell, no inhibition was observed at all(middle).

れ、それらの細胞がFITC-vesicleを貪食しているものと考えられた。光学顕微鏡にて脾細胞を観察した結果、細胞質内に多数の顆粒を内包した細胞が観察された。蛍光による観察に切り替えると、同一の細胞の細胞質が顆粒の蓄積している部分に一致して蛍光を発していることが確認された (Fig. 5)。

前述のごとく、class II陽性細胞分離用の磁気ビーズを用い、脾細胞をあらかじめ、class II陽性分画と陰性分画に分け、その後、フローサイトメーターにてFITC陽性細胞のみをゲートし、その細胞集団の表面マーカーの解析を行った (Fig. 6)。

これらの結果をTable 1にまとめた。すなわち、

class II陰性、陽性にかかわらず、どちらの分画の細胞もCD3-, CD8 +/-, CD4 low, CD11a+, CD11b/c+, CD172+, PR1-, CD103-のフェノタイプを持っていた。

3. T細胞の増殖抑制における細胞接触の必要性

コントロールの脾細胞はCon A刺激により細胞分裂をするが、それらがHbV投与後に採取された脾細胞と混合されると細胞分裂が起きない事がわかる。すなわち、増殖が抑制されている。しかしながら、Transwellを用いて、両者の接触を阻害すると、細胞分裂が認められた (Fig. 7)。従ってHbV投

与後の脾細胞中に存在していると考えられる抑制性細胞が作用するためには、抑制性細胞とT細胞との直接的な接触が不可欠であることが示された。

D. 考察

昨年は、class IIの発現の有無により、脾細胞を分類して、その抑制活性を検討した。ClassII陽性、陰性のどちらの分画にも、光学顕微鏡でHbVを貪食していると推定される細胞を認めた。その割合は後者(約15%)が前者(3-4%)よりも高く、抑制活性も後者が高かった(Fig. 3,4)。HbV貪食細胞が抑制活性に関与しているとするれば、貪食細胞の割合と活性には相関があることになる。しかしながら、光学顕微鏡で貪食細胞と判断されるものが、リポソームを貪食した細胞であるとの確証はなかった。そこで、FITCで標識した空リポソームFITC-vesicleを用いてリポソームを貪食した細胞をフローサイトメーターで特定することを考えた。リポソームを貪食した細胞はフローサイトメーターで容易にFITC陽性の細胞として検出できることが判明したので、リポソーム貪食細胞に焦点をあてたマーカーの解析を行う事ができた。得られた結果は、class IIの発現の有無に関わらずモノサイト系のマーカーであるCD11b/cおよび骨髄球系のマーカーであるCD172が陽性であった。しかし末梢血顆粒球のマーカーであるPR1は陰性であった。またT細胞マーカーであるCD3、CD25は陰性であったがCD4に関しては、intensityは低い陽性であった。さらに樹状細胞のマーカーであるCD103はわずかに発現しているのみであった。このフェノタイプは一部のclass II陽性細胞群を除くとラットにおけるMDSCのマーカーを詳細に検討した既報の文献の結果と一致した。従って、少なくともclass II陰性分画中に存在するリポソーム貪食細胞はMDSC類似の細胞群である可能性が高い。また、マウスの系ではMDSCには形態学的に2種類あることも示されていることからclass II陽性でリポソーム貪食細胞も少なくとも機能的にはMDSCに属すると

考えてよいのかも知れない。Transwellを使った実験(Fig. 7)が示すように、抑制性細胞の作用が発揮される為にはおそらくT細胞との直接的な接触が不可欠であり、この結果は、一酸化窒素が抑制作用の発現に関与しているという過去の結果とともにMDSCの機能発現の機序に矛盾しない。

以上のことから以下の機序が考えられる。HbVを含めたリポソームが輸注され、それらが血流を通過して脾臓を通過する際に、脾臓内の貪食細胞に取り込まれる。リポソームを貪食する細胞の大部分はMDSC類似の細胞である。これらの細胞は通常は免疫応答に対する強い抑制活性を有しないが、リポソームを貪食することによりその活性が増強されると考えられる。これらの細胞はcell-to-cell contactを介して、直接あるいはNOの産生などを介してT細胞の増殖を抑制する。

しかしながら、最終的にはリポソームを貪食した細胞を除去することにより、抑制活性が低下することを確かめなければならない。また、NO以外の何らかの液性因子(例えばTGF- β のような抑制性サイトカイン)の関与があるか否かなど今後のさらなる検討が必要である。

E. 結論

ラットにHbVを大量に投与すると一過性に脾細胞の免疫応答が抑制される。このとき脾臓にはHbVすなわちリポソームを貪食した細胞が出現する。細胞表面マーカーの解析からそれらの一部はMDSCと類似の細胞群である可能性が高い。免疫応答の抑制には、cell-to-cell contactが必要でありかつNO産生も関与しているというこれまでの実験結果は、このことを支持する。従って、一過性の免疫応答の抑制は、HbV投与に反応したMDSC類似細胞により誘導された生理的反応とも言える。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamaguchi M, Fujihara M, Wakamoto S, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Azuma H, Ikeda H. Influence of hemoglobin vesicles, cellular-type artificial oxygen carriers, on human umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 88, 34-42, (2009).
2. Yamaguchi M, Fujihara M, Wakamoto S, Sakai H, Takeoka S, Tsuchida E, Azuma H, Ikeda H. Biocompatibility study of hemoglobin vesicles, cellular-type artificial oxygen carriers, with human umbilical cord hematopoietic stem/progenitor cells using an in vitro expansion system. *ASAIO J* (in press)

(総説、著書など)

1. 藤原満博, 東 寛, 池田久實, ヘモグロビン小胞体のin vitroにおけるヒト血液細胞および血漿タンパクへの適合性. *人工血液* 16, 212-220 (2008).

2. 学会発表

1. 藤原満博, 東寛, 山口美樹, 高橋大輔, 酒井宏水, 土田英俊, 池田久實 / 人工酸素運搬体, ヘモグロビン小胞体 (HbV)のin vitroにおけるヒト造

血幹/前駆細胞への影響 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23

2. 高橋大輔, 藤原満博, 東寛, 宗慶太郎, 酒井宏水, 堀之内宏久, 小林紘一, 土田英俊, 池田久實 / ヘモグロビン小胞体(HbV)が免疫系に及ぼす影響 / 第15回日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学信濃町キャンパス 北里講堂 / 2008.10.23
3. H. Azuma, H. Abe, D. Takahashi, M. Fujihara, H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, H. Ikeda / Transient induction of immune-suppressor cells in rat spleen by massive injection of hemoglobin-vesicle (HbV) / The 6th Current Issues on Blood Substitute Research / Keio University Shinanomachi Campus / Oct 24-25, 2008.
4. 東 寛 / 人工血液使用時の免疫の変調について / 平成20年度研究成果発表会「人工血液をつくる(9)」 / 慶應義塾大学医学部 北里講堂 / 2009.2.11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

分担課題：ヘモグロビン小胞体(HbV)の体内動態特性に関する検討

研究分担者	小田切 優樹	熊本大学薬学研究部	薬物動態制御学	教授
研究協力者	丸山 徹	熊本大学薬学部	医療薬剤学	教授

研究要旨

本研究では、ヘモグロビン小胞体(HbV)頻回投与時のAccelerated Blood Clearance phenomenon (ABC現象)誘導について健常マウスを用いて評価した。その結果、0.1 mg/kgで頻回投与を行った場合では、初回投与に比べ2回目投与時において血中からの急速な消失と肝臓への有意な分布の増大が確認され、ABC現象が誘導された。一方、HbVの臨床使用推奨量である1400 mg/kgで頻回投与を行った場合では、初回投与・2回目投与時において血中濃度推移及び肝臓への分布量の変化は確認されず、ABC現象は誘導されなかった。加えて、ABC現象の誘導に強く関与する抗HbV IgMの産生量の検討を行ったところ、0.1及び1400 mg/kg両投与時において抗HbV IgMの産生が確認されたが、その発現時期は異なり、それぞれ初回投与3日後及び7日後より確認された。また、抗HbV IgMのHbV認識部位の検討により、抗HbV IgMはHbV脂質膜中の1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-PEG (DSPE-PEG)を認識していることが明らかとなった。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

これまでの研究により我々は、ヘモグロビン小胞体(HbV)の健常マウス・ラットにおけるHbV構成成分の体内動態の詳細、さらには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、得られた結果からアニマルスケールアップを試み、ヒトにおけるHbVの半減期の予測を行い、HbVの様々な体内動態特性を明らかにしてきた。しかしながら、近年、リボソーム製剤を、ある一定期間内に頻回投与した場合、2回目投与時の半減期が著しく低下するAccelerated Blood Clearance phenomenon (ABC現象)が報告されている。HbVを現行の輸血システムで臨床使用を考えた場合、HbVの頻回投与は十分に考えられる。HbV頻回投与時に

HbVの体内動態が変動するとHbVの薬理作用の変動や副作用の原因になりうる。そのため、HbV頻回投与時における体内動態の把握はHbVの臨床使用に向け、有用な情報になると考えられる。そこで本研究では、HbV頻回投与時の体内動態について健常マウスを用いて検討を行った。加えて、ABC現象の誘導に強く関与する抗HbV IgMの産生の検討を行い、さらに抗HbV IgMの認識部位の検討も行った。

B. 研究方法

1. 動物

ddY系雄性マウス(6週齢、28~30g)は日本SLCより購入し、1週間の予備飼育後、7週齢で実験に

使用した。また、甲状腺へのヨウ素の蓄積を防ぐために、体内動態実験開始1週間前よりヨードブロックを行い、実験に用いた。

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. ^{125}I -HbV 投与液の調製

HbV の ^{125}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。

4. 投与方法及び投与量

ddY 雄性マウスに非絶食、エーテル麻酔下において、非標識 HbV を 0.1 及び 1400 mg/kg で尾静脈より投与し、投与 7 日後に ^{125}I -HbV を約 10×10^5 cpm/匹の用量 (0.1 及び 1400 mg/kg)で投与した。

5.採血方法、放射活性の測定・分析

^{125}I -HbV 投与マウスにおいて投与後、経時的にヘパリン処理したシリンジで下腹静脈から 1mL 採血後、3000rpm で遠心分離を行い、血漿を得た。血漿に 1%BSA 及び 40%トリクロロ酢酸を加え、攪拌後、4°C、3000rpm で遠心分離を行い、沈殿中の放射活性をオートウェルガンマーカウンター (アロカ製、ARC-2000) にて測定した。各組織は、放血致死させ組織を摘出した後、重量を秤量し、各組織の放射活性をオートウェルガンマーカウンターにより測定し、MULTI により半減期及び各臓器クリアランスを算出した。

6. 抗 HbV IgG 及び IgM の検出

ddY 雄性マウスに非絶食、エーテル麻酔下において、非標識 HbV を 0.1 及び 1400 mg/kg で尾静脈より投与し、投与後 3、7、10 日後にヘパリン処理したシリンジで下腹静脈から 1mL 採血後、3000rpm で遠心分離を行い、血漿を得た。残存 HbV を除去するために超遠心処理(50000 g, 30 min)を行い、上清を血漿サンプルとした。

96well プレートに空小胞体、1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC), cholesterol, 1,5-bis-*O*-hexadecyl-*N*-succinyl-L-glutamate (DHSGL)及び 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine-*N*-PEG (DSPE-PEG)を固定化し、アルブミン溶液で blocking 後、希釈した血漿サンプルを添加し、37°C, 1 時間インキュベートした。wash 後、Horseradish peroxidase-conjugated Goat Anti-Mouse IgG または peroxidase-labeled affinity purified antibody to mouse IgM (μ)を添加し 37°C, 1 時間インキュベートした。*o*-phenylene diamine で発光後、490nm の吸光度で評価した。

C. 結果および考察

1. 血漿中濃度推移 (Fig.1)

0.1 mg/kg投与時では初回投与に比べ2回目投与時において血中からの急速な消失が確認され、ABC現象が誘導された(Fig. 1A)。また、各速度論パラメータを算出したところ、半減期は2回目投与時では0.5倍に短縮し(2.7 ± 0.2 and 1.3 ± 0.3 hr, $p < 0.05$, for first and second injection, respectively)、それに伴い血中濃度曲線化面積は減少し(27.1 ± 18 and 4.5 ± 3.8 hr*% of dose/mL, $p < 0.001$, for first and second injection, respectively)、クリアランスは増大した(3.69 ± 0.4 and 22.3 ± 8.1 mL/hr, $p < 0.001$, for first and second injection, respectively)。一方、1400 mg/kg投与時では初回投与・2回目投与間において血中濃度推移の変化は確認されず、ABC現象は誘導されなかった(Fig. 1B)。0.1 mg/kg投与時と同様に各速度論パラメータを算出したところ、初回投与・2回目投

与時において半減期、クリアランスは変化しなかったものの(半減期; 18.8 ± 1.3 and 17.4 ± 3.9 hr, クリアランス; 0.12 ± 0.04 and 0.14 ± 0.05 mL/hr, for first and second injection, respectively)、血中濃度曲線化面積は2回目投与時において有意に減少した (829 ± 38 and 695 ± 38 hr*% of dose/mL, $p < 0.05$, for first and second injection, respectively)。

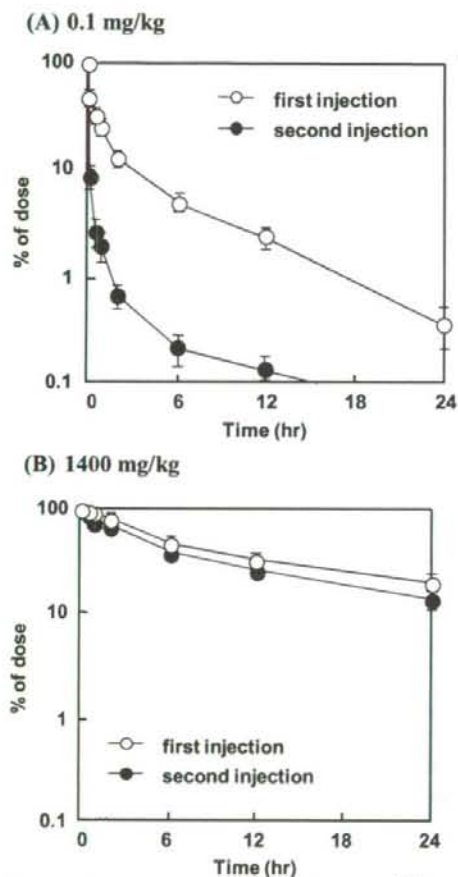


Fig. 1, Time courses of plasma level of ^{125}I -HbV at a dose of (A) 0.1 or (B) 1400 mg/kg. (first; open symbol, second; filled symbol)

2. 臓器分布 (Fig.2, 3)

HbVの主要分布である肝臓における経時的分布推移の確認を行った。その結果、0.1 mg/kg投与時においては初回投与に比べ、2回目投与時において、投与直後に分布量の増大が確認された(Fig.2A)。一

方、1400 mg/kg投与時においては初回投与・2回目投与間において分布推移の変化は確認されなかった(Fig.2B)。また、取り込みクリアランスを算出したところ、0.1 mg/kg投与時においては初回投与に比べ、2回目投与時には約9倍に増大していたが (3.5 ± 0.4 and 29.6 ± 18 mL/hr, $p < 0.01$, for first and second injection, respectively)、1400 mg/kg投与時においては初回投与・2回目投与時においては約1.5倍の増大であった (256 ± 37 and 372 ± 33 mL/hr, $p < 0.05$, for first and second injection, respectively)。

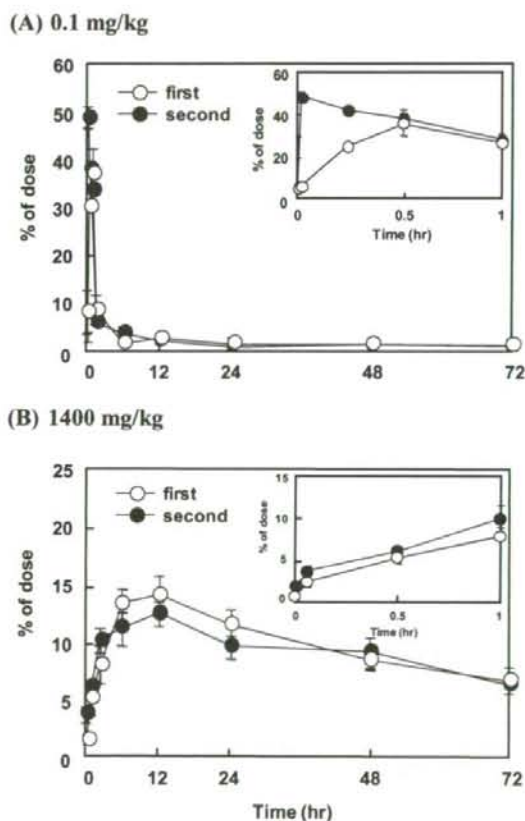
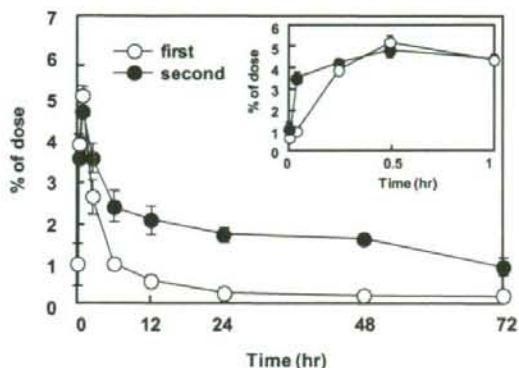


Fig. 2, Time courses of radioactivity in liver after administration to mice at a dose of (A) 0.1 or (B) 1400 mg/kg. (first; open symbol, second; filled symbol).

次に、ABC現象の誘導に強く関与する脾臓における経時的分布推移の確認を行った。その結果、0.1、1400 mg/kg両投与時において、初回投与に比

べ、2回目投与時において、分布量の増大が確認された(Fig.3A, B)。また、取り込みクリアランスを算出したところ、0.1 mg/kg投与時においては初回投与に比べ、2回目投与時には約4.5倍に増大していたが(1.6±0.1 and 7.2±3.2 mL/hr, p<0.01, for first and second injection, respectively)、1400 mg/kg投与時においては初回投与・2回目投与時においては約1.5倍の増大であった(51±6 and 71±19 mL/hr, no significantly, for first and second injection respectively)。

(A) 0.1 mg/kg



(B) 1400 mg/kg

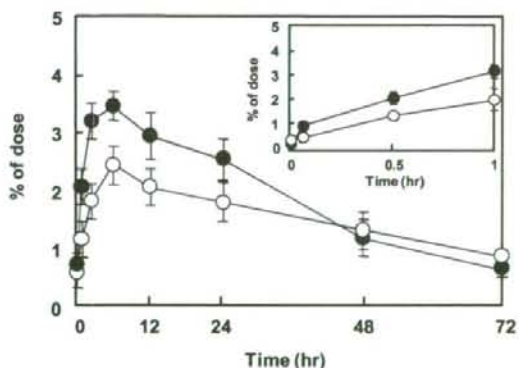


Fig. 3. Time courses of radioactivity in spleen after administration to mice at a dose of (A) 0.1 or (B) 1400 mg/kg. (first; open symbol, second; filled symbol).

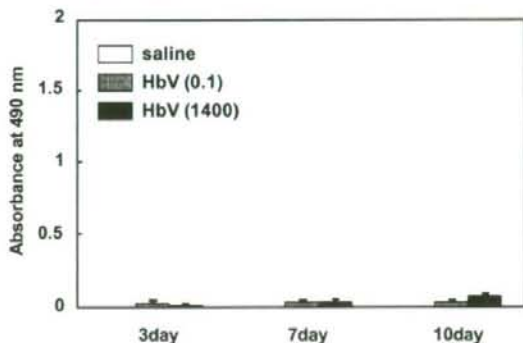
加えて、腎臓・心臓・肺においても同様の検討を行った結果、両投与時において、初回投与、2回目投与間に変化は確認されなかった。

Fig.1-3の結果より総合的に考えると、1400 mg/kg投与時のABC現象誘導の抑制は、HbV代謝経路である細網内皮系細胞(Kupffer cell, red pulp zone)の飽和によるものと考えられる。

3. 抗HbV IgG及びIgMの産生 (Fig.4)

ABC現象の誘導に強く関与する抗HbV IgMの産生は0.1及び1400 mg/kg両投与時において確認されたものの、その発現時期は異なり、それぞれ初回投与3日後及び7日後より有意に産生が確認された(Fig.4)。一方、抗HbV IgGの産生はいずれの投与群においても確認されなかった。

(A) anti-HbV IgG



(B) anti-HbV IgM

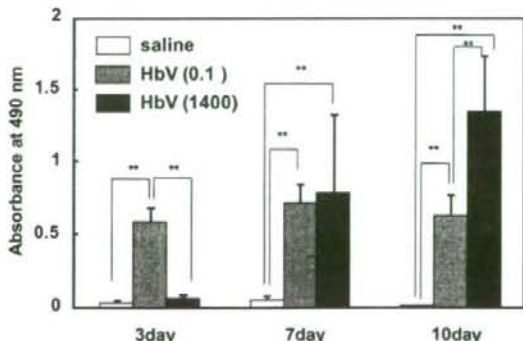


Fig.4. The quantitative of (A) IgG and (B) IgM against HbV 3, 7 and 10 days after HbV injection at a dose of 0.1 or 1400 mg/kg.

3. 抗HbV IgMの認識部位 (Fig. 5)

最後に、抗HbV IgMの認識部位の検討を行った。その結果、抗HbV IgM はDSPE-PEGに高い反応性

を示した(Fig.5)。また、DSPE-PEGの挙動はFig.4に示した抗HbV IgMと同様の挙動を示したことから、抗HbV IgMはHbV脂質膜構成成分であるDSPE-PEGを特異的に認識していることが確認された。

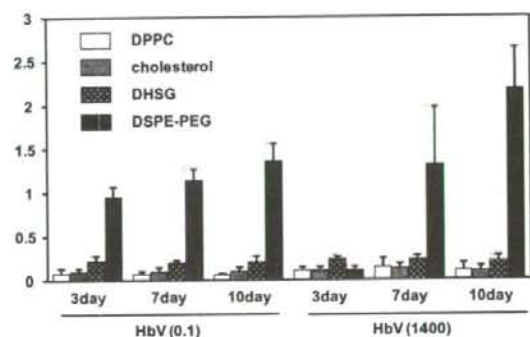


Fig. 5. The recognition site of IgM against HbV 3, 7 and 10 days after HbV injection at a dose of 0.1 or 1400 mg/kg.

D. 結論

HbVを現行の輸血システムで臨床使用を考えた場合、HbVの頻回投与は十分に考えられるため、HbV頻回投与時にHbVの体内動態の把握はHbVの臨床使用に向け非常に重要であるが、これまで検討されていない。

そこで、今年度は健常マウスを用い、HbV頻回投与時におけるABC現象の影響の検討を行った。その結果、HbV 0.1 mg/kg投与時ではABC現象が誘導されたが、HbVの臨床使用推奨量である1400 mg/kg投与時では初回投与・2回目投与時の体内動態の変動は確認されなかった。これはHbV代謝経路である細網内皮系細胞の飽和によるものであると考えられる。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。今後は出血性ショック時におけるABC現象の影響の検討も行い、評価していく予定である。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 主な論文発表

1. Taguchi K, Maruyama T, Iwao Y, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Tsuchida E, Kai T, Otagiri M. Pharmacokinetics of single and repeated injection of hemoglobin-vesicles in hemorrhagic shock rat model. *J Control Release* (2009) in press.
2. Nishi K, Ueno M, Murakami Y, Fukunaga N, Akuta T, Kadowaki D, Watanabe H, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. A site-directed mutagenesis study of drug-binding selectivity in genetic variants of human alpha(1)-acid glycoprotein. *J Pharm Sci.* (2009) in press.
3. Iwao Y, Hiraie M, Kragh-Hansen U, Kawai K, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. Altered chain-length and glycosylation modify the pharmacokinetics of human serum albumin. *Biochim Biophys Acta.* (2008) in press.
4. Iwao Y, Nakajou K, Nagai R, Kitamura K, Anraku M, Maruyama T, Otagiri M. CD36 is one of important receptors promoting renal tubular injury by advanced oxidation protein products. *Am J Physiol Renal Physiol.* (2008) 295(6):F1871-80.
5. Ishima Y, Akaike T, Kragh-Hansen U, Hiroshima S, Sawa T, Suenaga A, Maruyama T, Kai T, Otagiri M. S-nitrosylated human serum albumin-mediated cytoprotective activity is enhanced by fatty acid binding. *J Biol Chem.* (2008) 283(50):34966-75.
6. Anraku M, Kitamura K, Shintomo R, Takeuchi K, Ikeda H, Nagano J, Ko T, Mera K, Tomita K, Otagiri M. Effect of intravenous iron administration frequency on AOPP and inflammatory biomarkers in chronic hemodialysis patients: a pilot study. *Clin Biochem.* (2008) (14-15):1168-74.
7. Kitamura R, Asanoma H, Nagayama S, Otagiri M. Identification of human liver cytochrome P450 isoforms involved in autoinduced metabolism of the

- antiangiogenic agent (Z)-5-[(1,2-dihydro-2-oxo-3H-indol-3-ylidene)methyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-propanoic acid (TSU-68). *Drug Metab Dispos.* (2008) ;36(6):1003-9.
8. Katayama N, Nakajou K, Komori H, Uchida K, Yokoe J, Yasui N, Yamamoto H, Kai T, Sato M, Nakagawa T, Takeya M, Maruyama T, Otagiri M. Design and evaluation of S-nitrosylated human serum albumin as a novel anticancer drug. *J Pharmacol Exp Ther.* (2008) 325(1):69-76.
 9. Nagai R, Mera K, Fujiwara Y, Nagai M, Otagiri M. Comparison of pharmacokinetics between highly and mildly modified AGE proteins in mice. *Ann N Y Acad Sci.* (2008) ;1126:325-7.
 10. Kitamura R, Matsuoka K, Nagayama S, Otagiri M. Time-dependent induction of rat hepatic CYP1A1 and CYP1A2 expression after single-dose administration of the anti-angiogenic agent TSU-68. *Drug Metab Pharmacokinet.* (2008) ;23(6):421-7.
- ## 2. 主な学会発表
1. Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Maruyama T, Kai T, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Tsuchida E, Otagiri M. Effect of the Initially Injected Hemoglobin Vesicles (HbV) on the Pharmacokinetics of Second Injection of HbV in Mice. The 6th Current Issues on Blood Substitute Research (Tokyo, Japan; 2008, 10/24-25)
 2. Maruyama T, Katayama N, Nakajou K, Ishima Y, Komori H, Uchida K, Yokoe J, Yasui N, Yamamoto H, Kai T, Sato M, Otagiri M. Design and Evaluation of S-nitrosylated Human Serum Albumin as a Novel Anticancer Drug. The 6th Current Issues on Blood Substitute Research (Tokyo, Japan; 2008, 10/24-25)
 3. Mera K, Iwao Y, Tasaki Y, Sato K, Maruyama T, Otagiri M. Scavenging activity of indoxyl sulfate against superoxide anion radicals. A Joint Conference of the 13th In Vivo EPR Spectroscopy & Imaging and the 10th International EPR Spin Trapping/Spin Labeling: Biomedical Redox Navigation (Fukuoka, Japan, 2008, 9/28-30)
 4. Otagiri M, Ishima Y, Maruyama T. Design and evaluation of novel S-nitrosylated albumin. The 7th Korean Conference on Innovative Science and Technology. (Jeju, Korea; 2008, 8/24-26)
 5. Taguchi K, Maruyama T, Kai T, Iwao Y, Kobayashi K, Tsuchida E and Otagiri M. Further study on pharmacokinetics of hemoglobin-vesicles in a rat model of hemorrhagic shock. 2nd Asian Pacific Regional Meeting (Shanghai, China; 2008, 5/11-13)
 6. Ishima Y, Akaike T, Kragh-Hansen U, Hiroshima S, Sawa T, Suenaga A, Maruyama T, Kai T, Otagiri M. S-nitrosylated human serum albumin-mediated cytoprotective activity is enhanced by fatty acids binding. 2nd Asian Pacific Regional Meeting (Shanghai, China; 2008, 5/11-13)
 7. 小田切優樹／平成 20 年度 日本薬学会賞受賞講演／血清タンパク質の分子薬理的解明と医薬への応用／横浜／2008, 3/26-28
 8. 田口和明, 丸山徹, 岩尾康範, 酒井宏水, 土田英俊, 小林紘一, 甲斐俊哉, 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解析／第 128 年会 日本薬学会／横浜／2008, 3/26-28
 9. 廣山秀一, 異島優, 甲斐俊哉, 丸山徹, 小田切優樹／簡便な S-ニトロソ化アルブミン製剤の調製について／第 128 年会 日本薬学会／横浜／2008, 3/26-28
 10. 異島 優, 片山直久, 中城圭介, 小森久和, 甲斐俊哉, 佐藤 誠, 小田切優樹／新規抗癌物質としての S-ニトロソ化アルブミンの設計と評価／第 24 回日本 DDS 学会／東京／2008, 6/29-30
 11. 異島優, 廣山秀一, Ulrich Kragh-Hansen, 赤池孝章, 澤智裕, 末永綾香, 甲斐俊哉, 小田切優

樹/脂肪酸結合により SNO-HSA の細胞保護効果は増強する/第 30 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム/札幌/2008, 8/7-8

12. 田口和明, 丸山徹, 甲斐俊哉, 酒井宏水, 土田英俊, 小林紘一, 小田切優樹/出血性ショックモデルラットにおける頻回投与時のヘモグロビン小胞体の体内動態特性評価/第 15 回日本血液代替物学会年次大会/東京/2008, 10/23

13. 田口和明, 浦田由紀乃, 安楽誠, 丸山徹, 門脇大介, 甲斐俊哉, 小林紘一, 土田英俊, 小田切優樹/連続投与時におけるヘモグロビン小胞体の体内動態評価/第 23 回日本薬物動態学会年会/熊本/2008, 10/30-11/1

14. 異島優, 赤池孝章, 澤智裕, 末永綾香, 丸山徹, 甲斐俊哉, 小田切優樹/脂肪酸は S-ニトロソ化ヒト血清アルブミンによる S-ニトロソ転位反応の

新規制御因子になり得る/第 23 回日本薬物動態学会年会/熊本/2008, 10/30-11/1

15. 小田切優樹/人工赤血球の体内動態について/「人工血液をつくる(8)」/東京/2009, 2/11

G. 知的財産権の出願。登録状況 (予定を含む)

1. 異島 優, 赤池 孝章, 小田切 優樹/脂肪酸を含有する S-ニトロソタンパク質とその製法/特開2008-050294

2. 糖鎖含有アルブミン、その製造方法およびその用途/中城 圭介, 片山 直久, 甲斐 俊哉, 小田切 優樹/特開2008-043285

3. ピキア酵母を用いた組換えヒトヘモグロビンの製造/中城 圭介, 帆足 洋平, 甲斐 俊哉, 宇野公之, 小田切 優樹/特開2008-017774