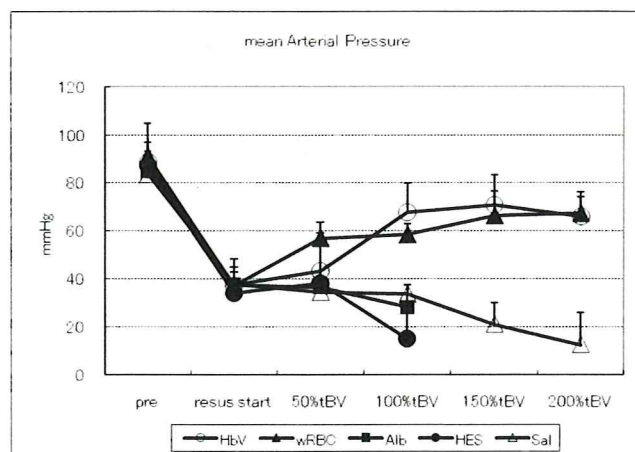
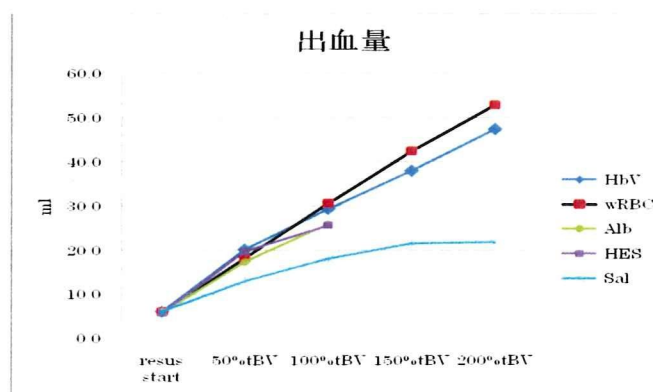


生食群は死亡する動物が増加し、循環血液量の150%の出血が認められる状況ではアルブミン生食群、HES 群に生存する動物はなく、生食群の一部と wRBC 群、HbV 群の全動物が検討の対象となった。HbV 群、wRBC 群では血圧は保たれ、生食群との間に有意差を認めた。



3. 出血量

使用した動物の推定循環血液量は20ml 前後であり、循環血液量の30%は6.2~7.7ml にあたる。循環血液量の30%を喪失した時点で蘇生を開始し、循環血液量の200%の蘇生液を量を56ml/kg/min のスピードで輸注した。それぞれの動物で循環血液量の50%を輸注した時点と50%BV、100%を輸注した時点と100%BV、150%を輸注した時点と150%BV、200%を輸注した時点と200%BVとして採血、呼吸循環諸標を計測した。

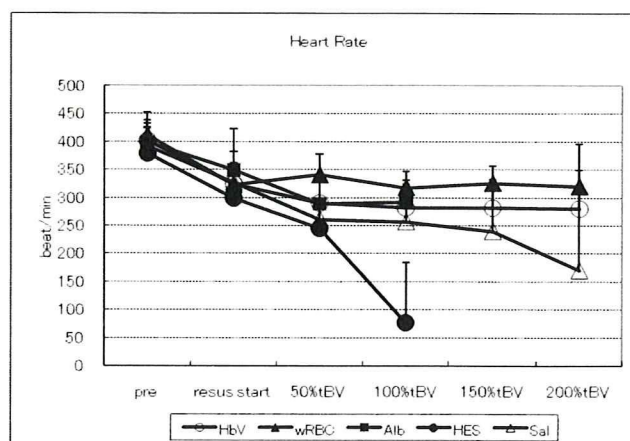


出血は平均動脈圧に応じて増減し、アルブミン

生食群、HES 群、wRBC 群、HbV 群で蘇生後も蘇生と同様の速度で出血が持続した。生食群では平均血圧の低下に伴い、出血量が減少し、wRBC 群、HbV 群との間に有意差が認められた。

4. 心拍数

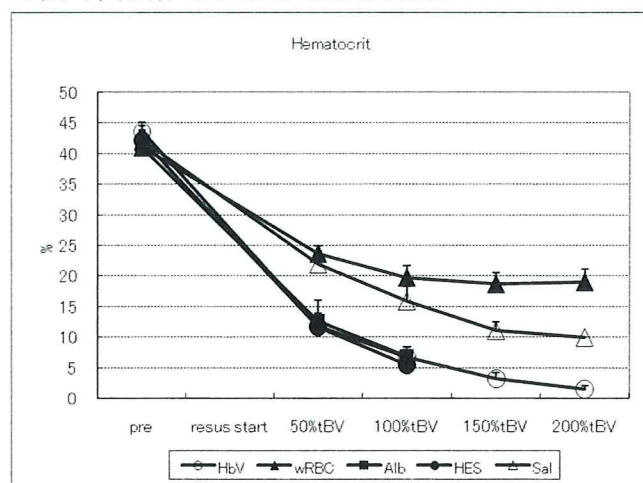
実験開始時と比し、蘇生開始時にはいずれの群でも心拍数は減少していた。蘇生開始後 wRBC 群は蘇生開始時の心拍数を維持していた。HbV 群では50%BV の蘇生液を注入した時点より心拍数は変化を認めなくなった。アルブミン生食群、HES 群は蘇生開始後心拍数の低下を認め、100%BV 量の蘇生液を輸注終了前後ですべての動物が死亡した。輸注量は出血量に及ばず、Hypovolemia と Hypoxia による臓器不全が心停止の原因と考えられた。生食群では蘇生後血圧が低い値で保たれ、出血量が抑えられたこともあり、血圧の低い状態で維持されたが、100%BV 量の生食を輸注した後より、心拍数の減少が認められ、200%BV 輸注時にはwRBC 群、HbV 群との間に有意差を認めた。



5. ヘマトクリット

蘇生液開始とともにヘマトクリットも低下を示した。wRBC 群でも100%BV 量の輸注が終了するまでは徐々に低下し、その後は20%を維持した。これは投与したwRBC 浮遊液のヘマトクリットとほぼ同じ値であり、輸血と出血がバランスした状況であったと考えられた。

一方、生食群では血圧が低下し、出血量が減少したためか、ヘマトクリットの低下は緩やかであった。生食群に比して膠質浸透圧を有するアルブミン生食群や HES 群では出血のスピードはそれほど低下せず、血圧、心拍数が減少した。出血のスピードが衰えなかったため、ヘマトクリットは急速に減少した。膠質浸透圧を保った溶液では、循環血漿量が確保されたためか、出血が減少せず、急速に状態が悪化した。生食群では輸液した量の一部が血管外に漏出したため血圧の上昇が得られず、出血量も血圧低下のために減少したため、かえって長時間生存できたと考えられた。

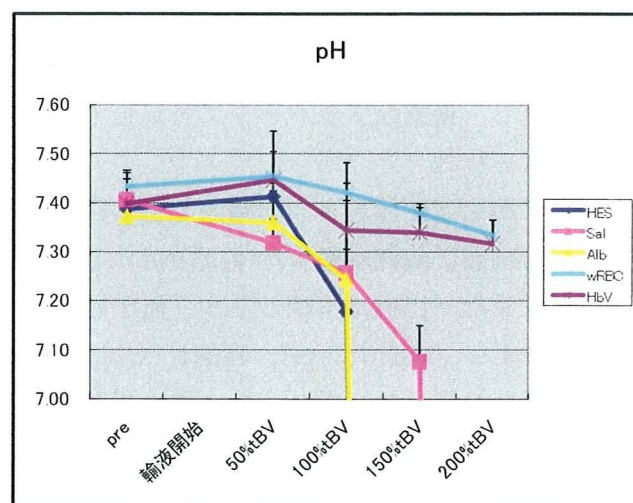
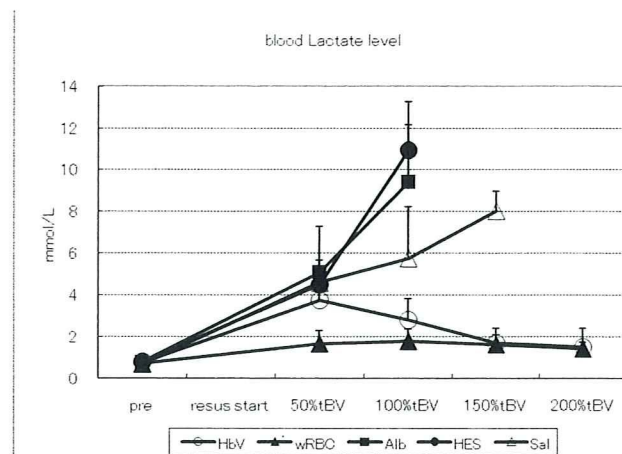


一方、HbV 群では出血量が wRBC 群に比して減少していたが、ヘマトクリットは HES 群、アルブミン生食群と同様な現象を見せ、200%BV 量の輸注が終了した後はヘマトクリットは 1.5% であった。しかし、血圧は wRBC 群とほぼ同等の値を呈し、心拍数も保たれ、血液ガス所見も悪化を認めなかった。酸素運搬体が含まれていることが生存に重要であることがこのモデルから明らかとなった。

6. 乳酸値および pH

乳酸値は wRBC 群では経時的に維持されていた。アルブミン生食群、HES 群では出血の増加及び輸注量の増加とともに増加し、100%BV 量の輸液を行った時点で 9mmol/L を超え、全例死亡するにいたった。生食群でも徐々に乳酸レベルは上昇し、

150%BV 量の輸液が終了した時点で 8mmol/L を超えた。HbV 群では 50%BV 量の輸液まではアルブミン生食、HES 群と同様に上昇を認めたが、その後低下し、200%BV 量の輸液が終了した時点では wRBC 群と同様に正常範囲内であった。



pH は乳酸の増加と反比例するような変化を示し、アルブミン生食群、HES 群では 100%BV 量の輸液が終了する時点で 7.3 以下となった。生食群でも低下は顕著で、150%BV 量の輸液が終了した時点では 7.08 と著しい acidosis を示した。一方、wRBC 群、HbV 群でも、pH は緩やかに低下し、200%BV 量の輸液が終了した時点での血漿 pH はそれぞれ 7.33 ± 0.03 、 7.32 ± 0.05 であった。このアシドーシスは出血性ショックによる臓器・組織の嫌気解糖によるものと考えられ、酸素運搬体を有する蘇生

液の投与により出血が持続していても組織の酸素代謝が保たれることを示したと考えられた。

D. 結論

持続出血モデルは実際の外傷においてよく遭遇する病態で、医療施設までの管理の違いによって救命率が異なると報告されており、生食の大量輸液のみでは救命率が改善しないあるいは低下するとされている。

今回我々は膠質浸透圧を有する輸液、生食、酸素運搬体として赤血球と HbV を含む蘇生液を使用して持続出血による出血性ショックモデルの治療経過を観察した。膠質浸透圧を有する輸液では血管内での容量に変化がないため、出血量が多くなり、早期に嫌気解糖が進み、重度のアシドーシスに陥り死亡すると考えられた。一方、生食による蘇生では輸液量の一部が血管外に漏出するためか、出血量が減少し、血圧は低いものの、循環だけが保たれたものと考えられた。臓器・組織の嫌気代謝は亢進し、極端なアシドーシスを呈して死亡したと考えられた。

一方、酸素運搬体を有する輸液では膠質浸透圧を有する輸液に酸素運搬体(赤血球あるいは HbV)を分散させた。出血は持続したが、血圧は低いレベルで安定し、輸液中の pH、乳酸レベルは正常範囲内で保たれていた。また、この酸素運搬体を含む輸液群のみが 120 分まで全例生存した。

以上より、持続出血症例に対し、HbV を含む輸液は赤血球浮遊液と同様、組織・臓器の酸素代謝を維持し、生存率を改善することが明らかとなり、臨床において外傷受傷直後よりの初期輸液として適している可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 31, 507-514 (2009).
2. K. Taguchi, T. Maruyama, Y. Iwao, H. Sakai, K. Kobayashi, H. Horinouchi, E. Tsuchida, T. Kai, M. Otagiri. Pharmacokinetics of single and repeated injection of hemoglobin-vesicles in hemorrhagic shock rat model. *J. Control. Release* 136, 232-239 (2009)
3. 宗 慶太郎、小峰 梨沙、酒井 宏水、小林 紘一、土田 英俊、村田 満. ヘモグロビン小胞体を含む血液検体の臨床検査. *人工血液* 17, 6-15 (2009)
4. K. Taguchi, Y. Urata, M. Anraku, T. Maruyama, H. Watanabe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, T. Kai, M. Otagiri. Pharmacokinetic study of enclosed hemoglobin and outer lipid component after the administration of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier. *Drug Metab. Dispos.* 37, 1456-1463 (2009)
5. 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. Mater. Res.* 90A, 1107-1119 (2009).
6. K. Taguchi, Y. Urata, M. Anraku, H. Watanabe, D. Kadowaki, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, T. Maruyama, M. Otagiri. Hemoglobin vesicles, polyethylene glycol (PEG)ylated

- liposomes developed as a red blood cell substitute, do not induce the accelerated blood clearance phenomenon in mice. *Drug Metab. Dispos.* 37, 2197-2203 (2009).
7. 堀之内宏久、小林紘一、酒井宏水、土田英俊. 人工酸素運搬体. 「からだと酸素の事典」酸素ダイナミクス研究会 編. 第5章:酸素の利用. pp.478-484, 2009, 朝倉書店, 東京.
 8. 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.* 20, 1419-1440 (2009).
 9. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. Hemoglobin-vesicle, a cellular artificial oxygen carrier, that fulfils the physiological roles of the red blood cells structure. *Adv. Exp. Med. Biol.* 662 (Oxygen Transport to Tissue XXXI) 433-438 (2010).
 10. Kuroda H, Mochizuki S, Shimoda M, Chijiwa M, Kamiya K, Izumi Y, Watanabe M, Horinouchi H, Kawamura M, Kobayashi K, Okada Y. ADAM28 is a serological and histochemical marker for non-small-cell lung cancers. *Int. J. Cancer.* (2010) in press.
 11. 池田達彦, 堀之内宏久, 森岡秀夫, 矢部啓夫, 林雄一郎, 小林紘一. 胸骨の一部を含む胸壁全層切除を行いtitanium reconstruction plateによる再建を行った2例. *日本呼吸器外科学会雑誌* 23(6) 861-865 (2009)
- ## 2. 学会発表
1. 小林紘一、堀之内宏久、土田英俊、酒井宏水 / 人工酸素運搬体 / 日本医工学治療学会第25回學術大会 / 大阪国際会議場 / 2009.4.10
 2. H. Sakai, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Hb-vesicles as O₂- and CO-carriers for cytoprotection at resuscitation from hemorrhagic shock / 55th- ASAIO-IFAO conference / Dallas / 2009. 5.28-30
 3. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida. / Physicochemical characteristics of Hb-Vesicles as RBC substitutes / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
 4. H. Horinouchi, Y. Seishi, K. Kobayashi, Y. Izumi, M. Kohno, H. Sakai, E. Tsuchida. / Resuscitation with hemoglobin-vesicle can improve survival in uncontrolled hemorrhage model in rats: hemorrhage from large vessel model / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
 5. K. Taguchi, T. Maruyama, H. Watanabe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, M. Otagiri / Pharmacokinetic profiles of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
 6. Y. Seishi, H. Horinouchi, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Kobayashi / Effect of large volume resuscitation with the cellular type artificial oxygen carrier (Hb-vesicle) in rat model of uncontrolled hemorrhagic shock via a caudal artery. / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009

7. Y. Seishi, H. Horinouchi, H. Sakai, E. Tsuchida, K. Kobayashi. / Effect of large volume resuscitation with the cellular type artificial oxygen carrier (Hb-vesicle) in rat uncontrolled hemorrhagic shock model caused by blunt kidney injury. / XII International Symposium on Blood Substitutes / Parma / Aug 25-28th, 2009
 8. 酒井宏水、岡本紀子、池田栄二、堀之内宏久、小林紘一、土田英俊/ 脳内出血モデルによるHb小胞体の脳神経組織への影響に関する検討 / 第16回 日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学北里講堂 / 2009. 10. 16-17.
 9. 田口和明、渡邊博志、門脇大介、酒井宏水、堀之内宏久、土田英俊、小林紘一、丸山徹、小田切優樹 / 出血性ショックモデルラットにおけるヘモグロビン小胞体頻回投与時の体内動態解析 / 第16回 日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学北里講堂 / 2009. 10. 16-17.
 10. 勢司泰久、堀之内宏久、酒井宏水、土田英俊、小林紘一 / 制御不能尾動脈出血モデルを用いたヘモグロビン小胞体輸液蘇生の検討 / 第16回 日本血液代替物学会年次大会/ 慶應義塾大学北里講堂 / 2009. 10. 16-17.
 11. 堀之内宏久、泉陽太郎、酒井宏水、小松晃之、土田英俊、小林紘一 / 実験腫瘍における腫瘍酸素分圧のマッピングと人工酸素運搬体投与による腫瘍の酸素加 / 第16回 日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学北里講堂 / 2009. 10. 16-17.
 12. 高橋大輔、東寛、脇田大功、藤原満博、宗慶太郎、酒井宏水、堀之内宏久、西村孝司、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16回 日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学北里講堂 / 2009. 10. 16-17.
 13. 宮里麻友美、田口和明、渡邊博志、酒井宏水、堀之内宏久、土田英俊、小林紘一、丸山徹、小田切優樹 / 四塩化炭素誘発肝障害モデルラットにおけるヘモグロビン小胞体の体内動態の検討 / 第16回 日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学北里講堂 / 2009. 10. 16-17.
 14. 藤原満博、東寛、若本志乃舞、泉陽太郎、酒井宏水、堀之内宏久、土田英俊、小林紘一、武田純三、池田久實 / 第16回 日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学北里講堂 / 2009. 10. 16-17.
 15. H. Horinouchi, H. Sakai, E. Tsuchida, k. Kobayashi. / Research and development of hemoglobin vesicle, a cellular type artificial oxygen carrier / 20th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion, Asia / 名古屋国際会議場 / 2009. 11. 14-18.
- 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

人工赤血球の臨床応用を目指した至適投与法の策定とGMP製造技術の確立

分担課題：ヘモグロビン小胞体（HbV）が免疫系に与える影響とその機序の解明

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)投与後にラット脾細胞に認められる一過性の免疫抑制を引き起こす細胞を同定する目的で、HbVを貪食した細胞をflow cytometerでソートし、それらが免疫抑制を引き起こすか否かを検討した。それらは、濃度依存性にラット脾細胞の増殖を抑制した。また、それらを除去した脾細胞では抑制が解除されることを確認できた。また、HbVを貪食する細胞はCD11b/c+, class II-のimmature monocyteであること、T細胞の増殖抑制にはiNOSだけでなくarginaseも関与していることも確かめた。従って、これらの細胞は機能的にはいわゆるmyeloid derived suppressor cellと言えるものである。

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こと、HbVを貪食した細胞が抑制に関与している可能性を検討してきた。本研究は、HbVを貪食した細胞を選択的にソートすることにより、それらの細胞がT細胞の増殖抑制に関与していることをより詳細に確認することを目的としている。

B. 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ポソーム）（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ポ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/50μl 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×5 min遠心し、沈殿した細胞をRPMI1640で洗浄した後、塩化アンモニウム-トリス緩衝液（IBL 免疫生物研究所）5 mLにて3-5分間溶血処理をした。溶血処理細胞液に5 mLの培地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（ 2×10^5 個/200 μL/ウェル）し、

Con A (終濃度0.3, 3 $\mu\text{g/ml}$) を加え37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 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)。

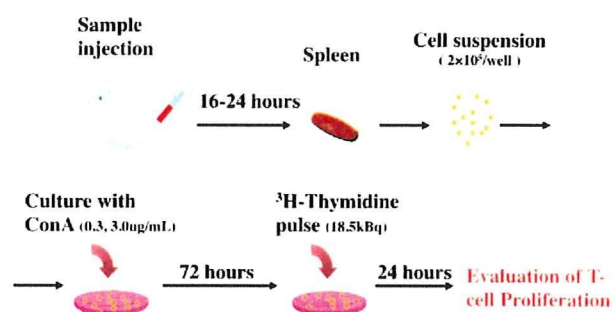


Fig. 1. Experimental protocol for evaluation of the effect of liposome on Con A stimulated T cell proliferation

2. FITCを標識した空vesicle(FITC-vesicle)のソーティングとその抑制活性の検討

HbV 小胞体と同じ組成であるが FITC-lipid(N-(fluorescein-5-thiocarbamoyl)-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、ラットに循環血液量の20%相当量を投与し、FITC陽性を示す細胞分画をフローサイトメーター(Aria; BD Bioscience)を用いてソートした。同時に FITC 陰性の細胞分画もソートした。ソートした細胞をコントロール脾細胞 (生理食塩水を投与したラットの脾細胞) に種々の割合(1:1 から1:1/32)で加え、コントロール脾細胞の増殖に与える影響を検討した。

3. 抗体と試薬

FITC-EVを貪食した細胞の表面マーカーの検出はLSR flow cytometer(BD Bioscience)を用いた。抗体は以下に示したものを使用した。

PE-conjugated anti-CD8a(OX8), CD25(OX39), CD11a(WT-1), CDb/c(OX42), CD172(OX41), HIS48(anti-grnulocyte), CD103(OX62), CD161(NKR-P1A), HLA class I(OX18), HLA class II(OX6), CD80, CD86. APC-conjugated CD11b/c. 以上は BD Bioscience より購入した。また、APC-conjugated anti-rat CD3 はImmunotechより購入した。各々、少なくとも10,000個の細胞を測定し、結果をCELLQUEST software(BD)にて解析した。

4. L-NMMA(iNOS inhibitor)とnor-NOHA(arginase inhibitor) のT細胞抑制への影響

Inducible nitric oxide synthase(iNOS) inhibitor, NG-monomethyl-L-arginine (2mM;L-NMMA; Alexis Corp., San Diego, CA) と arginase inhibitor, Nw-Hydroxy-nor-L-arginine, Diacetate Salt (0.5mM; nor-NOHA; Calbiochem, San Diego, CA)、それぞれ、あるいは両者をHbVを投与した脾細胞の培養系に加えて、T細胞の増殖抑制が解除されるか否かを検討した。

C. 実験結果

1. HbV貪食細胞のT細胞増殖抑制効果

FITC陽性細胞 (vesicleを貪食した細胞) は全脾細胞の5%程度であった。その部分をgateした細胞 (純度は95%以上) を標記の割合でコントロール脾細胞に加え、T細胞の増殖を評価した(Fig. 2, 3)。FITC陽性細胞は、その量に依存してコントロール脾細胞の増殖を抑制することが確認された。一方、FITC陰性の細胞をソートして、その増殖を検討した結果、抑制が解除されていることおよび、Con A濃度が1 $\mu\text{g/ml}$ では、コントロールより良く増殖することが示された(Table 1)。これらの結果から、FITC陽性細胞、すなわちHbVを貪食した細胞が、T細胞の増殖を抑制している細胞であることが確認できた。

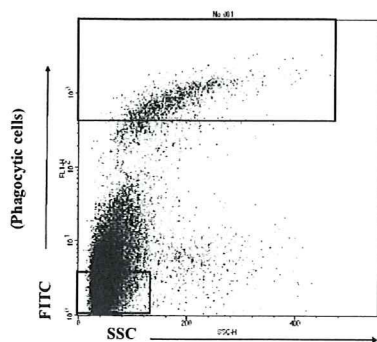


Fig. 2. Sorting of FITC-positive cells by flow cytometry
FITC labeled empty liposome (FITC-EV) was injected into rats and spleens were excised the next day. Subsequently, single spleen cells were analyzed using FCM. Cells that phagocytized FITC-EV (upper square) were recognized clearly as FITC-positive cells. The cells (upper square) were sorted by FCM. The purity of them was >95%.

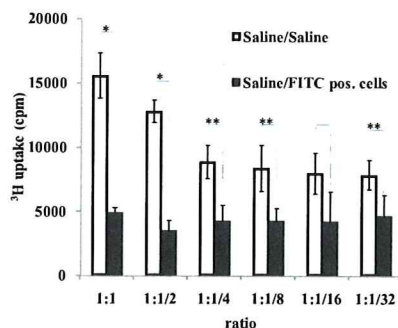


Fig. 3. Suppressive effect of FITC-positive cell on the proliferation of control splenocytes
Saline-loaded bulk splenocytes (2×10^5 /well) were simulated with Con A ($0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence of the sorted cells at indicated ratios. Saline-loaded bulk splenocytes was used as control cells. The splenic T cell proliferation was inhibited by FITC-positive cells (liposome phagocytized cell) in a dose-dependent manner. Data are representative of two independent experiments and are expressed as mean \pm SD ($n=3$). *: $p<0.01$ compared to control. **: $p<0.05$ compared to control.

Table 1. Proliferation of FITC-negative cells and bulk splenocytes

Con A($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	0.3	1.0
Saline	1410 \pm 319	6332 \pm 32	18092 \pm 654
FITC-EV(bulk)	1872 \pm 2045	3575 \pm 1200	7586 \pm 200
FITC-negative	1818 \pm 515	8061 \pm 3292	81848 \pm 5277

T cell proliferation of FITC-negative cells (2×10^5 /well) and FITC-EV loaded bulk splenocytes was compared with that of saline-loaded splenocytes. No inhibition was observed in FITC-negative cells. Data are representative of two independent experiments and ^3H -thymidine uptakes are expressed as mean \pm SD ($n=3$). *: $p<0.01$ compared to control. **: $p<0.05$ compared to control.

2. HbV食食細胞のフェノタイプの検討

FITC陽性細胞(HbV食食細胞)の表面マーカーに関して、HIS48抗体(ラット顆粒球に反応する抗体)を新たに購入し検討した。FITC陽性細胞でHIS48陽性のものはその16%のみで、脾細胞全体のわずか

0.7%であった(Fig. 4 upper)。

一方、CD11b/c+, HIS48-細胞の80%以上がFITC陽性であるのに対して、CD11b/c+, HIS48+細胞でFITC陽性のものは30%弱しかなかった(Fig. 4. middle and lower)。また、CD11b/c陽性細胞はおおむねclass II-, CD80-, CD86-であった。さらに、これらの細胞の多くがHbVを食食していることが確認された。加えて、HbV投与後の脾細胞をGiemsa染色では、細胞質にリボソームを内包しているように見える特異な細胞が観察され、これらがFITC陽性であることを確認できた。形態的にはmonocyte/macrophage系の細胞である(Fig. 5)。

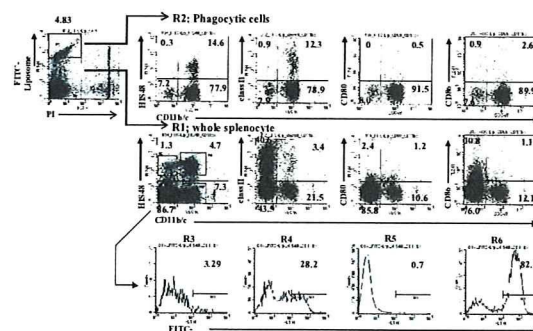
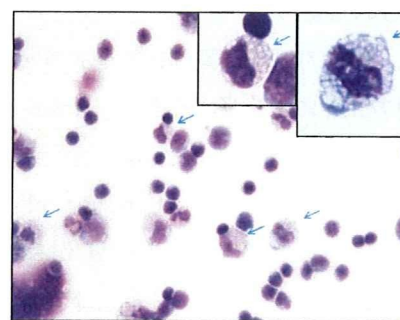


Fig 4. Flow cytometric analysis of whole splenocyte and FITC-positive cells
Splenocytes derived from FITC labelled-empty vesicles (FITC-EV) loaded rat spleen were analysed. Upper: FITC-positive cells were gated in R2. Middle: whole splenocytes were gated in R1. Subsequently, the gated cells were analyzed for the indicated cell surface markers. Lower: whole splenocytes that were divided into 4 subsets in terms of HIS48 and CD11b/c positivity (Middle left) was further analyzed for FITC intensity. Most of FITC-positive cells were positive for CD11b/c but negative for class II, CD80, CD86 and HIS48. In addition, most of CD11b/c+ cells were positive for FITC intensity.



May-Grunwald Giemsa($\times 600$, $\times 1000$)

Fig. 5. Microscopic examination of cells appeared after injection of HbV
HbV-loaded splenocytes were spun on slide glass and stained with May-Grunwald-Giemsa dye. Images were visualized using BX50 light microscope equipped with 40x/0.75 or 100x/1.3 oil objective lens to give original magnification at the time of photomicroscopy as $\times 400$ and $\times 1000$, respectively. Arrows indicate unique cells that appeared after injection of empty vesicles. They appeared to belong to monocyte cells.

3. iNOS inhibitor と arginase inhibitor による T細胞 増殖抑制の解除

HbV投与後に認められるT細胞増殖抑制は、iNOS

inhibitorあるいはarginase inhibitorの存在下である程度の解除が認められた。両者が同時に存在するとより解除が明らかとなった(Fig. 6)。このことは、T細胞の増殖抑制には iNOS と arginase活性の上昇が関与していることを示している。

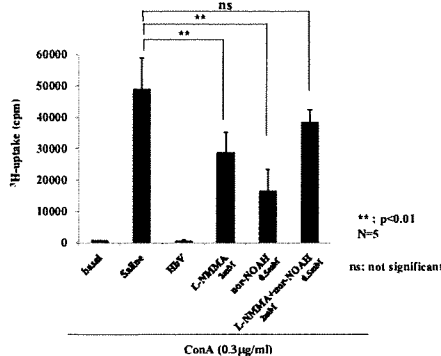


Fig. 6. Effect of L-NMMA and nor-NOHA on the suppression of T cell proliferation. Each rat was injected with HbV or saline and splenocytes were stimulated with Con A(0.3µg/ml) in the presence or absence of iNOS inhibitor (L-NMMA, 2mM) or arginase inhibitor (nor-NOHA, 0.5mM) or both. T cell proliferation was evaluated as described in materials and methods. Data were expressed as mean±SD (N=5). T cell proliferation was restored in the presence of each inhibitor to a certain degree. Significant inhibition was disappeared in the presence of the both inhibitors, suggesting both iNOS and arginase were involved in the suppression.

D. 考察

HbVの投与後にラット脾細胞に認められる一過性のT細胞増殖抑制効果は、脾の mononuclear phagocytic system (MPS) として存在している CD11b/c+, class II-, CD80-, CD86-のphenotypeをもつ細胞が HbVを貪食することにより、強力な免疫抑制細胞として作用するようになることに起因すると考えられる。

近年、強力な免疫抑制作用を有する骨髄系の細胞が注目を集めている。それらはmyeloid suppressor cell あるいはimmature myeloid cellと呼ばれていたが、現在myeloid derived suppressor cell(MDSC)と呼ばれることが提唱されている。MDSCは腫瘍、感染症、炎症、ストレスなど種々の病態下で現れ、かつ形態や性質も多様であるとされている。しかしながら、もっとも重要な点は強い免疫抑制作用を有しているということである。

最近、マウスのMDSCはCD11b+, Gr-1(granulocyte marker) weakly +, class II-のフェノタイプを持つものとされた。ラットのMDSCの代表的なフェノタイプはまだ定まっていないが、マウスGr-1のcounter partとしてHIS48が報告されている。すなわち、ラ

ットMDSCの一部はCD11b+, HIS48+である可能性が指摘されている。我々の検討ではHbV貪食細胞の中にCD11b/c+,HIS48+細胞が含まれていることが確認されたが、その細胞は全脾細胞の中の1%にも満たないことから、抑制効果をもたらす細胞が、この細胞群に限定されているとは考え難い。むしろ、HIS48の発現の有無には関係なく、CD11b/c+, class II-のフェノタイプを有する細胞が免疫抑制効果を発揮していると考えerほうが妥当である。これらの細胞は、CD11b/cを発現しているが、ほとんどの細胞はclass IIやCD80, CD86は発現していない。このことと、形態学的な観察結果から、問題の細胞は未熟な単球であると言える。このことは、MDSCが当初はimmature myeloid cellと言われたことと矛盾しない。一方これらの細胞のclass II, CD80, CD86分子はHbVの貪食に伴い発現量が低下した可能性もある。しかしながら、コントロールの脾細胞のCD11b/c陽性細胞もその多くがclass II-, CD80-, CD86-であった(データは示していない)ことから、その可能性は否定的である。

免疫抑制効果の機序については、既に、cell-to-cell contactが必要であること、iNOSが関与していることなどを明らかにしてきた。今回はこれらに加えてarginaseの関与も示唆することができた。両者のinhibitorの存在下では、より顕著に抑制を解除できたことから、二つの酵素の活性化が抑制効果の発現に重要であることが確認できた。また、増殖抑制を受けたT細胞は、活性化しIL2を産生するが増殖には至らないことを既に示しているが、それらが最終的にapoptosisに至るというデータも得ている(データは示していない)。これらの機序は今までに報告されているMDSCの抑制機序と矛盾しない。以上のことより、HbVを貪食したCD11b/c+, class II-immature monocytesは機能的には、いわゆるMDSCと同等であると言える。

腫瘍あるいは炎症の場合より産生される種々の物

質(GM-CSF, IL-1, VEGF, C5a etc)がMDSCの集積や活性化に必要であると報告されている。しかしながら、実験に用いているHbVは、極めて良好な生体適合性を有していることから、HbVが、問題のimmature monocyte以外の血液成分と接触して何らかの生物学的反応を引き起こすことは考えづらいところである。すなわち、これらの細胞は、liposomeを貪食することにより、一過性に強力な免疫抑制能を獲得した可能性がある。もちろん、貪食により分泌されるサイトカインがautocrineやparacrineにこれらの細胞に作用する可能性は否定できない。HbVのようなリポソームをこれらの細胞が貪食するとどのような遺伝子の発現が誘導されるかは今後の検討が必要である。

E. 結論

ラットにHbVを投与すると脾細胞の免疫応答が一過性に抑制される。その原因として、脾のMPSを構成しているCD11b/c+, class II- immature monocytesがHbVを貪食し、その結果一過性に強力な免疫抑制能を獲得することが考えられる。免疫抑制の機序は、iNOSとarginase活性の上昇を介した、NOの産生とarginineの欠乏によるもので、いわゆるMDSCにおける抑制機序と類似のものと考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Yamaguchi, M. Fujihara, S. Wakamoto, H. Sakai, S. Takeoka, E. Tsuchida, H. Hamada, H. Azuma, H. Ikeda. Effect of hemoglobin vesicles, cellular-type artificial oxygen carriers, on the ex vivo expansion of human hematopoietic stem/progenitor cells using a coculture system with human stromal cells. *ASAIO J.* 55, 200-205 (2009)

2. 学会発表

1. 高橋大輔、東寛、脇田大功、藤原満博、宗慶太郎、酒井宏水、堀之内宏久、西村孝司、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16回 日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学北里講堂 / 2009. 10. 16-17.
2. 藤原満博、東寛、若本志乃舞、泉陽太郎、酒井宏水、堀之内宏久、土田英俊、小林紘一、武田純三、池田久實 / ヘモグロビン小胞体への薬剤の吸着の検討 / 第16回 日本血液代替物学会年次大会 / 慶應義塾大学北里講堂 / 2009. 10. 16-17.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

分担研究報告書

人工赤血球の臨床応用を目指した至適投与法の策定とGMP製造技術の確立

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

主任研究者	小田切 優樹	熊本大学薬学研究部	薬物動態制御学	客員教授
		崇城大学薬学部	薬物動態学	教授
研究協力者	丸山 徹	熊本大学薬学研究部	医療薬剤学	教授

研究要旨

人工酸素運搬体であるヘモグロビン小胞体 (HbV) は大量出血時及び外科手術中における使用が想定されている。肝障害患者では静脈瘤破裂による大量出血やその処置として緊急外科手術を受ける可能性が高いため、その際に HbV を使用することは十分に予想される。これまでに、我々は肝臓が HbV の主要代謝・排泄臓器であることを見出し、このような肝代謝・排泄型薬物の体内動態は肝障害時に変動する。そのため、肝機能低下時において HbV の体内動態も影響を受けることが予想される。そこで今回、四塩化炭素 (CCl₄) 誘発慢性肝障害ラットモデルを作成し、HbV の脂質成分をトリチウム (³H) 標識した ³H-HbV を用い、肝障害時における HbV の体内動態の検討を行った。CCl₄ 誘発慢性肝障害ラットモデルは、CCl₄ を 400 mg/kg の投与量で週 3 回、8 週間腹腔内投与することで作成し、モデルの評価は血漿中肝機能マーカー及び組織染色により評価した。加えて、ヒトの肝硬変重症度の指標として臨床で汎用されている Child-Pugh 分類による評価した。体内動態の検討は、HbV を Cholesterol,[1,2-³H(N)]-で標識した ³H-HbV を用い検討した。CCl₄ 誘発慢性肝障害ラットモデルに、³H-HbV (1400 mg/kg) を投与し、体内動態特性の評価を行った。得られた結果より、血中クリアランスを算出したところ、顕著な個体差が認められた。そこで、この個体差は肝障害の程度に依存するのではないかと考え、肝機能マーカーの 1 つであるアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) 値と血中クリアランスの相関関係を検討したところ、良好な負の相関関係が認められた。また、AST 値は HbV の肝臓への分布量、さらには、クッパー細胞などの細網内皮系細胞の代謝能とも負の相関関係を示した。加えて、AST 値は脂質膜成分の排泄量とも負の相関関係を示した。つまり、慢性肝障害時に HbV を投与すると、肝障害の程度により肝臓への分布量・クッパー細胞を中心とした細網内皮系細胞の貪食能が低下することで、血中クリアランスが低下したと考えられた。また、実質細胞が障害を受けることで、排泄量の低下も起こることが明らかとなった。さらに、肝障害時の体内動態を予測する指標として、AST 値が有効である可能性が示唆された。しかしながら、投与 14 日後には血中・臓器内ともに放射活性が認められなかったため、慢性肝障害時においても HbV は十分な代謝・排泄能を有していると考えられた。

1. ヘモグロビン小胞体(HbV)の体内動態特性に関する検討

A. 研究目的

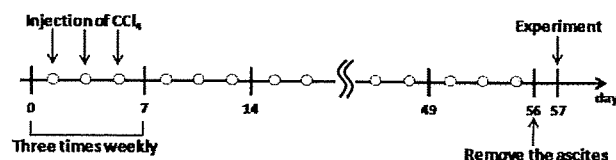
我々はこれまでに、人工酸素運搬体として開発されたヘモグロビン小胞体 (HbV) が健常及び出血性ショック時において十分な代謝・排泄性を有し、体内動態の観点からも安全な製剤であることを確認している。加えて、HbV は主に肝臓中のクッパー細胞で代謝され、HbV 脂質膜構成成分は肝臓から胆汁を経て、糞中に排泄されることも明らかにしている。ところで、通常、肝臓において代謝・排泄を受ける薬物は肝疾患時において、その体内動態特性が健常時と比較して変動することが知られている。そのため、肝代謝・排泄型薬物の一つである HbV においても肝疾患時に、体内動態特性、特に HbV の代謝・排泄が変化し、生体内長期蓄積性を示し、副作用を誘発することが懸念される。実際に、これまでに開発されてきた人工酸素運搬体であるパーフルオロカーボン (PFC) では1年以上にわたる臓器蓄積を示した結果、副作用を誘発した。そのため、肝疾患時における HbV の体内動態特性の検討は HbV の安全性を検討するだけでなく、肝障害患者への HbV 投与の適用可否の決定や最適投与計画を行う上で重要であると考えられる。そこで本研究では、HbV の肝疾患時における体内動態特性を明らかにすることを目的とし、四塩化炭素 (CCl₄) 誘発慢性肝障害ラットモデルを作成し、HbV の脂質成分をトリチウム (³H) 標識した ³H-HbV を用い、肝障害時における HbV の体内動態の検討を行った。

B. 研究方法

1. CCl₄ 誘発慢性肝障害モデルラットの作成

Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット (3 週齢, 約 50 g) にミネラルオイルに溶解した CCl₄ (CCl₄ : mineral oil = 1 : 4) を 400 mg/kg body weight の投与量で週 3 回、8 週間腹腔内投与し、CCl₄ 誘発慢性肝

障害モデルを作成した (下図参照)。また、実験期間中は水及び固形飼料を自由に摂水及び摂食させた。



2. 生化学パラメータの測定

CCl₄ 誘発慢性肝障害モデルラット作成終了後、ヘパリン処理した注射筒を用いて、尾静脈より血液を採取した。採取後直ちに、Ammonia-Test-Wako kit を用い、血中アンモニアの測定を行った。また、残りの血液は遠心分離 (3000 rpm、10 分間) により血漿を回収し、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、γ-グルタミルトランスフェラーゼ (γ-GTP)、総ビリルビンを測定した。血漿サンプルは測定まで -80℃ で保存し、株式会社 SRL に委託した。

3. 病理組織学的検査

CCl₄ 誘発慢性肝障害モデルラット作成終了後、肝臓を摘出し、4 % パラホルムアルデヒドに浸し (4℃, overnight)、固定した。その後、厚さ 5 μm の切片となるようスライスし、パラフィン包埋切片を作製した。

3-1. H.E.染色 (Hematoxylin-Eosin stain)

脱パラフィン後、流水水洗し、ヘマトキシリン液で 4 分間染色した。再び流水水洗した後、エオシン液で 60 秒間染色し、流水水洗、脱水、透徹、封入を行い、組織像を観察した。

3-2. EVG 染色 (Elastica van Gieson stain)

脱パラフィン後、ワイゲルト・レゾルシンフクシン液で 6 時間染色し、100 % エタノールで分別を行った。流水水洗後、ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液で 5 分間染色し、再び流水水洗し、ワング

ーソン液 (1.25 w/v % picric acid, 1 % acid fuchsin solution) で 10 分間染色した。その後、分別、脱水、透徹、封入を行い、組織像を観察した。また、線維化組織面積率の測定は、100 倍顕微鏡下でランダムに 30 枚の画像を撮影し、Lumina Vision version 2.2 により画像 1 枚毎の線維化面積率を算出し、その平均値を線維平均含有率とした。

4. Child-Pugh 評価法

腹水は肝障害モデル作成後の腹水除去前後の体重変化から算出した。また、血清ビリルビン、血清アルブミン、プロトロンビン時間 (PT) の測定は株式会社 SRL に委託した。Class 分類は各評価項目のスコアの合計値より求めた (下図参照)

Parameter	Point score according to abnormality		
	1	2	3
Encephalopathy	None	Minimal	Advanced (coma)
Ascites	Absent	Controlled	Refractory
Bilirubin (mg/dL)	<2.0	2.0 - 3.0	>3.0
Albumin (g/dL)	>3.5	2.8 - 3.5	<2.8
PT (s)	<4	4 - 6	>6
(%)	>80	50 - 80	<50

Total points rise with severity of liver disease.

Class A : Score 5 - 6 (well compensated)

Class B : Score 7 - 9 (significant functional compromise)

Class C : Score 10 - 15 (decompensated)

5. 体内動態実験

5-1. タンパク質の放射 ^3H ラベル化法

HbV 800 μL と cholesterol, [1,2- $^3\text{H}(\text{N})$]- 20 μL を混合し、24 時間室温で放置することにより標識を行い、 ^3H -HbV を作製した。

5-2. 投与方法

CCl_4 誘発慢性肝障害ラットモデルにエーテル麻酔下、ポリエチレンチューブを左大腿静脈に挿入後、 ^3H -HbV を 1400 mgHb/kg の用量で投与した。投与液中のタンパク量は非標識体を添加することにより調整し、浸透圧は rHSA (5 g/dL) を添加することで調節を行った。

5-4. 採血方法、放射活性の測定・分析

へパリン処理した注射筒を用いて、規定時間ごとに尾静脈から採血を行い、遠心分離により血漿を採取した。得られた血漿を 19000 rpm で 20 分間超遠心分離し、血漿中に含まれる HbV を沈殿させた。得られた血液、血漿、超遠心後上清のそれぞれ 50 μL を、soluene-350/イソプロピルアルコール (1:1) 混合液 500 μL で可溶化後 (50 $^{\circ}\text{C}$, 24 時間)、過酸化水素で脱色し、液体シンチレーションカクテル (Hionic-Fluor) 8 mL を加え、放射活性を測定した (LSC-5121)。摘出した臓器は、秤量した後、その一部を soluene-350 1 mL で可溶化後 (50 $^{\circ}\text{C}$, 24 時間)、血液と同様の処理により放射活性を測定した。尿・糞については、代謝ゲージにより経時的に採尿・採糞を行い、その一部を臓器と同様の処理により放射活性を測定することで評価した。また、体内動態パラメータは MULTI により算出した。

6. カーボンクリアランス

CCl_4 誘発慢性肝障害ラットモデルにエーテル麻酔下、ポリエチレンチューブを左大腿静脈に挿入後、カーボン溶液を投与した。規定時間に左大腿静脈より採血し、50 μL を 0.1 % 重炭酸ナトリウム溶液 5mL に溶解させ、吸光度 (675 nm) を測定した。

7. 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。

C. 結果

1. CCl_4 誘発慢性肝障害ラットモデルの作成

1.1 血漿中肝機能マーカー

血漿中肝機能マーカーである AST、ALT、 γ -GTP、総ビリルビン及びアンモニアを測定した。その結果、健常時に比べ、 CCl_4 誘発慢性肝障害ラットモデル群では AST、ALT、 γ -GTP、総ビリルビン及びアンモニアの有意な上昇が確認された (Fig. 1)。

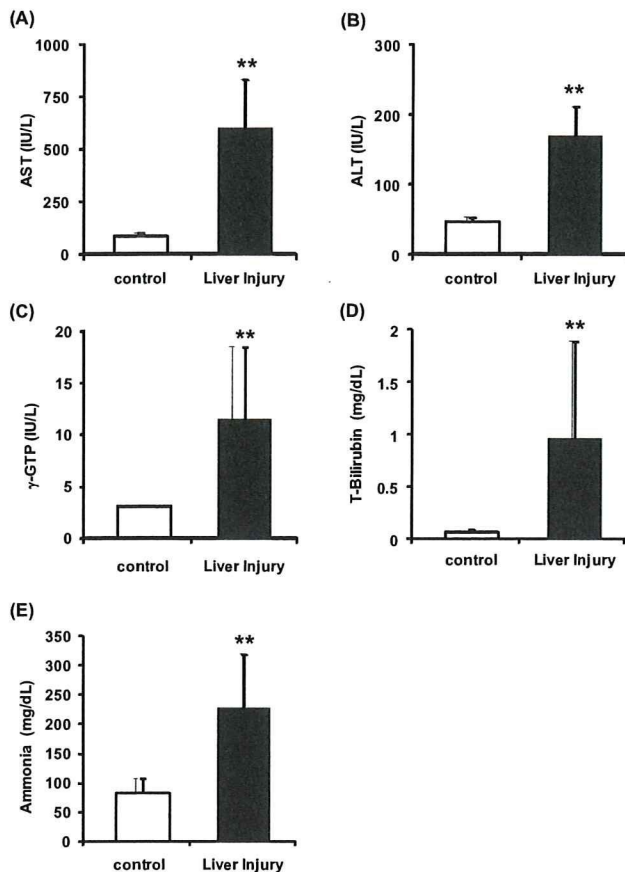


Figure 1
Plasma clinical chemistry tests at 8 weeks after exposure to CCl₄ in liver injury rats
Each column represents the mean ± SD (normal; n = 5, liver injury; n = 6-9). ** *p* < 0.01 compared with normal rats group.

1.2 病理組織学的検査

Figure 2A・B には H.E.染色の結果を示す。その結果、CCl₄ 誘発慢性肝障害ラットモデル群では明らかな形態変化が観察された。また、慢性肝障害時には肝臓の線維化が起こることが知られているため、線維化部分を特異的に染色する EVG 染色を行ったところ、CCl₄ 誘発慢性肝障害ラットモデル群では明らかな線維化が確認された(Fig. 2C・D)。そこで、この線維化組織面積率を算出したところ、CCl₄ 誘発慢性肝障害ラットモデル群では肝組織全体の約 11 % が線維化していた (Fig. 2E)。

1.3 Child-Pugh 分類評価

さらに、ヒトの肝硬変重症度の指標として臨床で汎用されている Child-Pugh 分類による評価を行っ

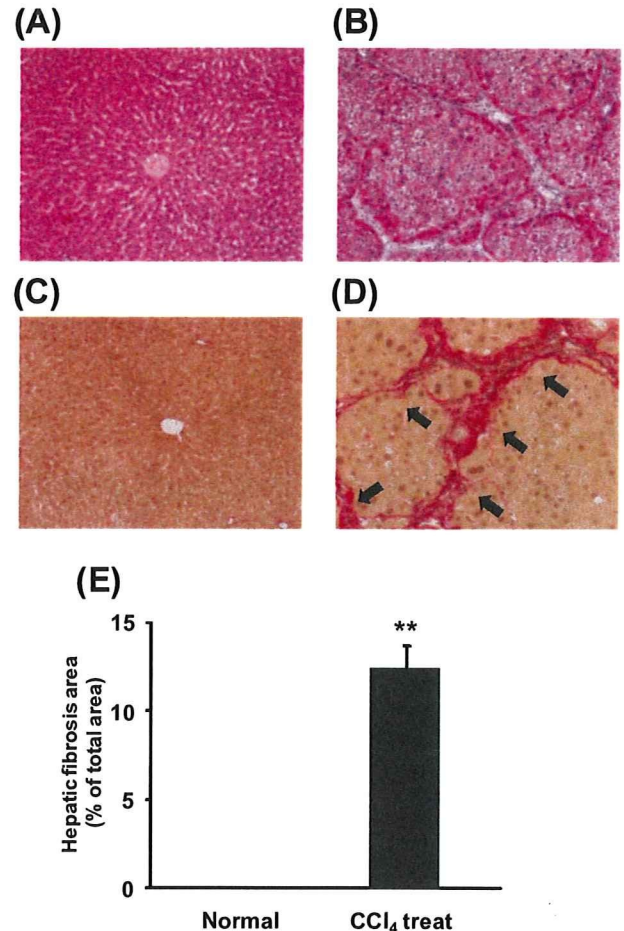


Figure 2
Light micrographs of livers stained with H&E and EVG stains: Normal group (A) and CCl₄ treated (B) group (x100) stained with H&E. Normal group (C) and CCl₄ treated (D) group (x100) stained with EVG. The arrows indicate fibrosis areas. (E) Hepatic fibrosis area in the normal (n=6) and CCl₄ treated (n=6) groups. The fibrotic area was calculated as the mean of thirty, randomly selected fields of vision in each liver section, based on EVG staining. Data are expressed as the mean ± SD. ***P* < 0.01

た。その結果、ビリルビン及びプロトロンビン活性値はそれぞれ 0.96 ± 0.93 mg/dL, 51.7 ± 6.63 % を示し (Score 1 - 2)、アルブミン値は 3.10 ± 0.25 g/dL を示した (Score 2)。また、脳症は確認されず (Score 1)、腹水は 24.1 ± 17.1 mL 存在した (Score 2 - 3)。これら結果から、作成した CCl₄ 誘発慢性肝障害ラットモデルは、Score が 7 - 10 となり、Class B- C に相当する肝機能障害を示すことが判明した。これはヒトにおいて、中等度から重度の肝障害に相当するものと推定された (Table 1)。

Table 1 Child-Pugh assessment

Parameter		Score
Encephalopathy	None	1
Ascites (ml)	24.1 ± 17.1	2-3
Bilirubin (mg/dl)	0.96 ± 0.93	1-2
Albumin (g/dl)	3.10 ± 0.25	2
Prothrombin activity (%)	51.7 ± 6.6	1-2
total		7-10

2. 体内動態評価

2.1 血漿中濃度

上記のように作成したCCl₄誘発慢性肝障害ラットモデルを用い、体内動態評価を行った。³H-HbV投与後、規定時間ごとに尾静脈から採血を行い、得られた血漿中濃度推移より血中クリアランスを算出したところ、非常に個体差の大きい結果となった (0.51 ± 0.11 mL/hr)。そこで、この個体差は肝障害の程度に依存するのではないかと仮定し、肝機能マーカーの1つであるASTと血中クリアランスの相関をとったところ、良好な負の相関関係を示した (Fig. 3)。

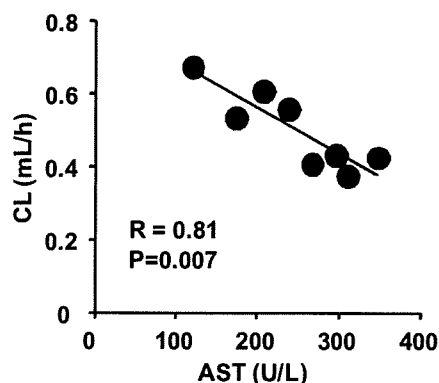


Figure 3
Relationship between plasma AST levels and total clearance (CL) for HbV. The linear regression of the logarithmic values was calculated using the least-squares method ($y = -0.0012x + 0.814$, $r = 0.81$, $p = 0.007$).

2.2 臓器分布

肝臓はHbVの主要分布臓器であるため、Fig. 3で示した肝障害の程度によるクリアランスの変化に肝臓への分布量が影響しているのではないかと考えられる。そこで、肝臓へのHbV分布率とAST値との

相関関係の確認を行ったところ、HbV投与後24時間および72時間におけるHbV分布率とAST値には、高い相関関係が確認された (Fig. 3A)。一方、もう1つのHbVの主要分布臓器である脾臓においては、このような相関関係は認められなかった (Fig. 3B)。

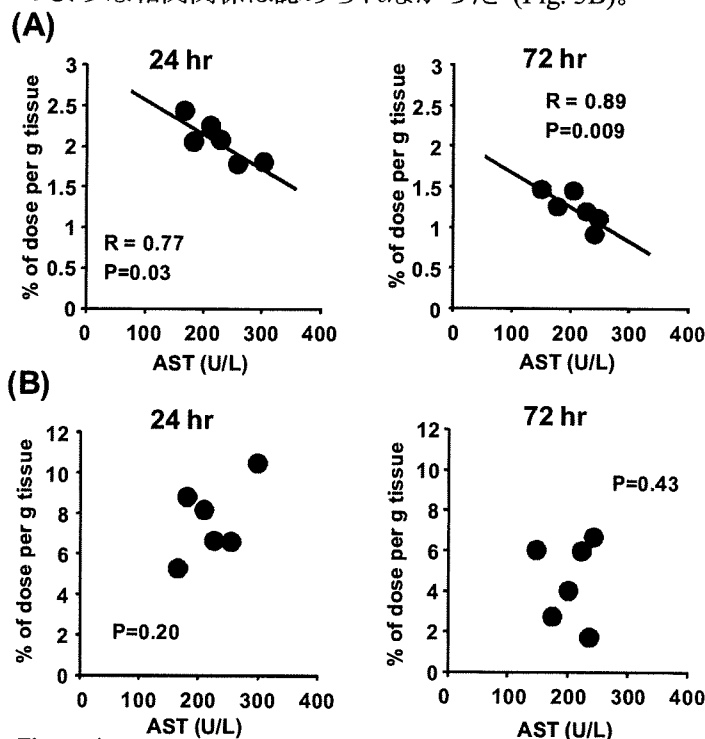


Figure 4
Relationship between plasma AST levels and (A) hepatic or (B) splenic distribution of HbV at 24 hr or 72 hr after the administration of ³H-HbV. The linear regression of the logarithmic values was calculated using the least-squares method (A; 24 hr, $y = -0.0042x + 2.99$, $r = 0.77$, $p = 0.03$, 72 hr, $y = -0.0042x + 2.09$, $r = 0.89$, $p = 0.009$).

2.3 代謝能

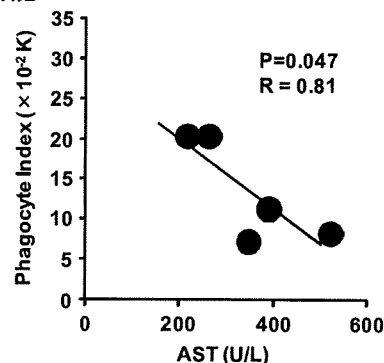


Figure 5
Relationship between plasma AST levels and phagocyte index (K). The linear regression of the logarithmic values was calculated using the least-squares method ($y = -0.00004x + 0.0289$, $r = 0.81$, $p = 0.047$).

HbVの代謝には細網内皮系細胞が関与しているため、次に、肝障害の程度により、代謝能の変化についてカーボンクリアランス法により評価した。その結果、AST値の上昇に従い食食活性が低下することが確認され (Fig. 5)、肝障害の程度によるHbVの体内動態変動は代謝能の変化も影響していることが強く示唆された。

2.4 排泄性

また、肝臓はHbV脂質膜構成成分の排泄臓器でもあり、肝障害がHbV脂質膜構成成分の排泄にも影響を与えることが考えられる。そこで、脂質成分の排泄量について検討を行った。その結果、尿中排泄量は変動しないものの、糞中排泄は肝障害の悪化に従い排泄率が低下することが確認された (Fig. 6)。これは肝実質細胞障害による影響であると考えられる。

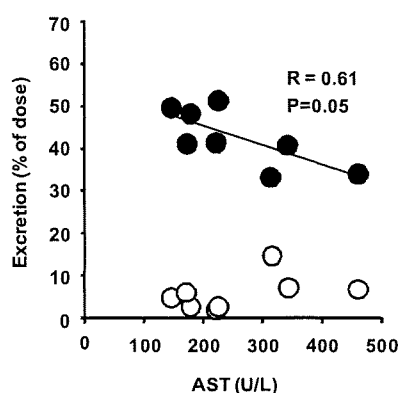


Figure 6
Relationship between plasma AST levels and excretion via the feces (closed circle) or urine (open circle). The linear regression of the logarithmic values was calculated using the least-squares method (Feces; $y = -0.0464x + 54.364$, $r = 0.61$, $p = 0.05$).

D. 考察

HbV の慢性肝障害時における使用の有効性と安全性に関して、 CCl_4 誘発慢性肝障害ラットモデル作成し、体内動態の観点より評価した。その結果、慢性肝障害時に HbV を投与すると肝障害の程度により血中クリアランスが低下し、これは、HbV の肝臓への分布量の低下、さらには、クッパー細胞を中心とした細網内皮系細胞の食食能の低下が要

因であることが示唆された。加えて、実質細胞が障害を受けることで、脂質膜構成成分の排泄量の低下も起こることも確認された。しかしながら、長期観察においては投与 14 日後には血中・臓器内ともに放射活性が認められなかったため、慢性肝障害時においても HbV は十分な代謝・排泄能を有していると考えられた。また、今回、これらの体内動態特性が血漿中肝機能マーカーの一つである AST 値と良好な相関関係を示したことから、肝障害時の体内動態を予測する指標として AST 値が有効である可能性が示唆された。つまり、肝障害患者に HbV を投与する際には AST 値をあらかじめ測定することで、おおよその体内動態を予測できると考えられる。これらの結果から、HbV は、慢性肝障害患者に対しても安全に使用できる可能性が示唆された。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishi K, Fukunaga N, Ono T, Akuta T, Yumita N, Watanabe H, Kadowaki D, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. Construction of an Expression System for Human $\alpha 1$ -Acid Glycoprotein in *E. coli*: the Role of Oligosaccharide Moieties on Structural and Functional Properties. *Drug Metab Pharmacokinet.* (2010) *in press*

2. Matsumoto K, Nishi K, Kikuchi M, Watanabe H, Nakajou K, Komori H, Kadowaki D, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. Receptor-mediated uptake of human $\alpha 1$ -acid glycoprotein into liver parenchymal cells in mice. *Drug Metab Pharmacokinet.* (2010) *in press*

3. Anraku M, Arahira M, Mady M. Fatma, Khaled A. Khaled, Yamasaki K, Seo H, Imai T, Otagiri M. Enhancement of Dissolution and Bioavailability of Flurbiprofen by Low Molecular Weight Chitosans. *PHARMAZIE* (2010) *in press*

4. Katayama N, Nakajou K, Ishima Y, Ikuta S, Yokoe JI, Yoshida F, Suenaga A, Maruyama T, Kai T, Otagiri M. Nitrosylated human serum albumin (SNO-HSA) induces apoptosis in tumor cells. *Nitric Oxide.* (2010)

5. Mera K, Takeo K, Izumi M, Maruyama T, Nagai R, Otagiri M. Effect of reactive-aldehydes on the modification and dysfunction of human serum albumin. *J Pharm Sci.* (2010) 99(3):1614-25.
 6. Imoto M, Yamamoto I, Azuma H, Otagiri M, Imai T. Permeability of 5-fluorouracil and its prodrugs in Caco-2 cell monolayers: Evidence for shift from paracellular transport by prodrug formation. *J Drug Del Sci Tech.* (2009) 19(1): 37-41.
 7. Kadowaki D, Anraku M, Tasaki Y, Taguchi K, Shimoishi K, Seo H, Hirata S, Maruyama T, Otagiri M. Evaluation for antioxidant and renoprotective activity of olmesartan using nephrectomy rats. *Biol Pharm Bull.* (2009) 32(12):2041-5.
 8. Otagiri M, Kragh-Hansen U, Imai T. Albumins with new functions and clinical applications. *Drug Metab Pharmacokinet.* (2009) 24(4):285-6.
 9. Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, Maruyama T, Otagiri M. Hemoglobin vesicles, polyethylene glycol (PEG)ylated liposomes developed as a red blood cell substitute, do not induce the accelerated blood clearance phenomenon in mice. *Drug Metab Dispos.* (2009) 37(11):2197-203.
 10. Tomida H, Fujii T, Furutani N, Michihara A, Yasufuku T, Akasaki K, Maruyama T, Otagiri M, Gebicki JM, Anraku M. Antioxidant properties of some different molecular weight chitosans. *Carbohydr Res.* (2009) 344(13):1690-6.
 11. Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Maruyama T, Watanabe H, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, Kai T, Otagiri M. Pharmacokinetic study of enclosed hemoglobin and outer lipid component after the administration of hemoglobin vesicles as an artificial oxygen carrier. *Drug Metab Dispos.* (2009) 37(7):1456-63.
 12. 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) 136(3):232-9.
 13. 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) 98(11): 4316-26.
 14. Iwao Y, Hiraike 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.* (2009) 1794(4):634-41.
 15. Anraku M, Fujii T, Furutani N, Kadowaki D, Maruyama T, Otagiri M, Gebicki JM, Tomida H. Antioxidant effects of a dietary supplement: reduction of indices of oxidative stress in normal subjects by water-soluble chitosan. *Food Chem Toxicol.* (2009) 47(1):104-9.
- (総説、著書など)
1. Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M. Updates on contemporary protein binding techniques. *Drug Metab Pharmacokinet.* (2009) 24(4):358-64. *Review*
 2. Ishima Y, Kragh-Hansen U, Maruyama T, Otagiri M. Albumin as a nitric oxide-traffic protein: characterization, biochemistry and possible future therapeutic applications. *Drug Metab Pharmacokinet.* (2009) 24(4):308-17. *Review*
 3. Otagiri M. Study on binding of drug to serum protein *Yakugaku Zasshi.* (2009) 129(4):413-25. *Review*
 4. Otagiri M, Chuang VT. Pharmaceutically important pre- and posttranslational modifications on human serum albumin. *Biol Pharm Bull.* (2009) 32(4):527-34. *Review*
 5. 田口和明、丸山徹、小田切優樹. ヘモグロビン小胞体 (HbV) の体内動態特性. *人工血液.* 17, 169-178 (2009).
2. 学会発表
1. 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 人工酸素運搬体ヘモグロビン小胞体 (HbV) の頻回投与時における体内動態特性 日本薬学会第129年会 2009年3月26日-28日
 2. 末永 綾香, 山田 純嗣, 岩尾 康範, 野口 大

之, 米良 克美, 異島 優, 丸山 徹, 小田切 優樹 抗酸化能に富むアルブミンの設計: 抗酸化活性に関与するアミノ酸残基の探索 日本薬学会第129年会2009年3月26日-28日

3. 異島 優, 赤池孝章, 廣山 秀一, 澤 智裕, 末永 綾香, 丸山 徹, 甲斐 俊哉, 小田切優樹 S-ニトロソヒト血清アルブミンの臓器保護作用は, 脂肪酸結合により増強される 第9回日本NO学会学術集会 2009年5月8日-9日

4. 平田 憲史郎, 異島 優, 末永綾香, 丸山 徹 小田切 優樹 組換え型糖鎖付加アルブミンの肝ターゲティング担体としての有用性評価 第9回日本NO学会学術集会 2009年5月8日-9日

5. 小田切 優樹, 金子 健一, 福田 光, チュアン・トゥアン ギャム, 山崎 啓之, 川原 浩一, 中山 仁, 末永 綾香, 丸山 徹 イヌアルブミン分子上のケトプロフェン結合部位のトポロジー解析 第9回日本蛋白質科学会年会 2009年5月20日-22日

6. 異島 優, 赤池孝章, 廣山 秀一, 澤 智裕, 末永 綾香, 丸山 徹, 甲斐 俊哉, 小田切優樹 S-ニトロソヒト血清アルブミンの臓器保護作用は, 脂肪酸結合により増強される 第9回日本蛋白質科学会年会 2009年5月20日-22日

7. 小森 久和, 上原 奈緒, 菊池 真理, 西 弘二, 丸山 徹, 小田切 優樹 $\alpha 1$ -酸性糖たんぱく質のヘモグロビン β 鎖を介した肝細胞取り込み機構の解析 日本薬剤学会第24年会 2009年5月21日-23日

8. 異島 優, 陳 迪, 末永 綾香, 丸山 徹, 小田切 優樹 DDS 担体としての組換え型アルブミン二量体の有用性評価 第25回日本DDS学会 2009年7月3日-4日

9. 田口 和明, 浦田 由紀乃, 安楽 誠, 土田 英俊, 小林 紘一, 丸山 徹, 小田切優樹 ヘモグロビン小胞体の体内動態の検討 第25回日本DDS学会 2009年7月3日-4日

10. 異島 優, 赤池孝章, 廣山秀一, 澤 智裕, 末永 綾香, 丸山 徹, 甲斐俊哉, 小田切優樹 強力な臓器保護剤としての新規 S-ニトロソヒト血清アルブミンの開発 第16回血液代替物学会年次大会 2009年10月15日-16日

11. 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ヘモグロビン小胞体頻回投与時の体内動態解析 第16回血液代替物学会年次大会 2009年10月15日-16日

12. 宮里麻友美, 田口和明, 渡邊博志, 酒井宏水, 堀之内宏久, 土田英俊, 小林紘一, 丸山徹, 小田切優樹 四塩化炭素誘発肝障害モデルラットにおけるヘモグロビン小胞体の体内動態の評価 第16回血液代替物学会年次大会 2009年10月15日-16日

13. 小森久和, 上原奈緒, 西 弘二, 児玉 彬, 渡邊博志, 丸山 徹, 小田切優樹 $\alpha 1$ -酸性糖タンパク質のヘモグロビン β 鎖を介した肝細胞取り込み機構 第3回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2009年11月14日-15日

14. Takeo K, Mera K, Izumi M, Maruyama T, Nagai R, Otagiri M REACTIVE ALDEHYDES INDUCE STRUCTURAL CHANGE AND DISFUNCTION OF HUMAN SERUM ALBUMIN 第24回日本薬物動態学会年会 2009年11月26日-29日

15. Kugimiya T, Ando Y, Saito S, Watanabe H, Kadowaki D, Jono H, Ueda M, Otagiri M, Maruyama T EFFECT OF ALBUMIN BINDING AND ANTIOXIDATIVE ACTIVITY ON

TRANSTHYRETIN AMYLOID FORMATION 第24

回日本薬物動態学会年会 2009年11月26日-29日

16. Furukawa M, Ishima Y, Ikuta S, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T IMPROVED THERAPEUTIC EFFECT OF THIOREDOXIN BY FUSION TO HUMAN SERUM ALBUMIN AGAINST OVALBUMIN-INDUCED LUNG INJURY 第24回日本薬物動態学会年会 2009年11月26日-29日

17. Tokunaga K, Maruyama T, Mera K, Watanabe H, Tanaka M, Fukagawa M, Otagiri M IMPACT OF CINACALCET ON SERUM OXIDATIVE STRESS IN SECONDARY HYPERPARATHYROIDISM 第24回日本薬物動態学会年会 2009年11月26日-29日

18. Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Watanabe H, Kobayashi K, Tsuchida E, Maruyama T, Otagiri M PHARMACOKINETIC STUDY OF ENCLOSED HEMOGLOBIN AND OUTER LIPID COMPONENT AFTER THE ADMINISTRATION OF HEMOGLOBIN VESICLES AS AN ARTIFICIAL OXYGEN CARRIER 第24回日本薬物動態学会年会 2009年11月26日-29日

19. Hoshino H, Ishima Y, Akaike T, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T THE DETECTION OF ENDOGENOUS S-GUANYLATED HUMAN SERUM ALBUMIN. 第24回日本薬物動態学会年会 2009年11月26日-29日

20. Komori H, Uehara N, Nishi K, Kodama A, Watanabe H, Maruyama T, Otagiri M Involvement of hemoglobin β -chain mediated endocytic pathway in hepatic uptake of α 1-acid glycoprotein. 第31回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2009年11月29日-12月1日

21. Yoshida F, Ishima Y, Kai T, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M NO Transferring from Poly-S-Nitrosylated Human Serum Albumin is Involved in Cell-Surface Protein Disulfide Isomerase. 第31回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2009年11月29日-12月1日

22. Miyamoto Y, Iwao Y, Watanabe H, Sato K, Otagiri M, Maruyama T 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan propionate, an uremic toxin, increase oxidative stress through over-generation of super-oxide anion radical. 第31回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2009年11月29日-12月1日

23. Minomo A, Ishima Y, Suwa Y, Uchida M, Maruyama T, Morioka H Otagiri M Identification of bilirubin binding site in human serum albumin via construction and bilirubin binding screening of a phage library 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月9日-12日

24. 宮里麻友美、田口和明、渡邊博志、酒井宏水、堀之内宏久、土田英俊、小林紘一、丸山徹、小田切優樹 肝障害モデルラットにおけるヘモグロビン小胞体の体内動態特性 第26回日本薬学会九州支部大会 2009年12月12日-13日

25. 古川 真斗, 異島 優, 渡邊 博志, 小田切 優樹, 丸山 徹 マウス肺障害モデルに対するアルブミン-チオレドキシン融合タンパク質の有用性評価 第26回日本薬学会九州支部大会 2009年12月12日-13日

国際学会

1. Otagiri M, Ishima Y, Maruyama T. Evaluation of possible utility of recombinant albumin DDS carrier. 7th Retrometabolism Based Drug Design and Targeting

2009/5/10-13

2. Taguchi K, Maruyama T, Watanabe H, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, Otagiri M. Pharmacokinetic profiles of hemoglobin-vesicles as an artificial oxygen carrier. XII Symposium on Blood Substitute, Parma, 2009 8/25-29

3. Hirata K, Ishima, Y, Watanabe H, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M Mannosylated-Recombinant albumin as a NO traffic protein for the treatment of hepatic ischemia /reperfusion injury XII Symposium on Blood Substitute, Parma, 2009 8/25-29

4. Chuang VTG, Ikuta S, Maruyama T, Otagiri M HUMAN ALBUMIN BASED DRUG DELIVERY: ALBUMIN FUSION OF THIOREDOXIN Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

5. Fatma M. Mady, Ahmed E. Abou-taleb, Khaled A. Khaled, Yamasaki K, Iohara D, Ishiguro T, Hirayama F, Uekama K, Otagiri M EFFECT OF SULFOBUTYL ETHER β -CYCLODEXTRIN ON THE AQUEOUS SOLUBILITY AND MASKING OF BITTER TASTE OF FAMOTIDINE IN THE ABSENCE AND PRESENCE OF PVP K30 Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

6. Mera K, Takeo K, Izumi M, Maruyama T, Nagai R, Otagiri M MODIFICATION WITH REACTIVE ALDEHYDES ALTERS THE STRUCTURE AND FUNCTION OF HUMAN SERUM ALBUMIN Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

7. Taguchi K, Watanabe H, Urata Y, Anraku M, Kadowaki D, Sakai H, Tsuchida E, Maruyama T,

Otagiri M. PROPOSED DOSE OF HEMOGLOBIN VESICLES, PEGYLATED LIPOSOMES DEVELOPED AS A RED BLOOD SUBSTITUTE, DOES NOT INDUCE THE ACCELERATED BLOOD CLEARANCE PHENOMENON IN MICE Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

8. Kadowaki D, Anraku M, Tasaki Y, Taguchi K, Shimoishi K, Suenaga A, Watanabe H, Hirata S, Maruyama T, Otagiri M EVALUATION FOR ANTIOXIDANT AND RENOPROTECTIVE ACTIVITY OF OLMESARTAN USING NEPHRECTOMY RATS Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

9. Anraku M, Fujii T, Kondo Y, Yasufuku T, Maruyama T, Otagiri M, Tomida H ANTIOXIDANT PROPERTY OF SEVERAL MOLECULAR WEIGHT CHITOSANS IN IN VITRO AND IN VIVO STUDIES Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

10. Ishima Y, Maruyama T, Akaike T, Sawa T, Suenaga A, Kai T, Otagiri M FATTY ACIDS COULD BE A NOVEL TYPE OF MEDIATOR OF S-DENITROSATION FROM S-NITROSYLATED HUMAN SERUM ALBUMIN Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18

11. Hirata K, Maeda H, Watanabe H, Nakajou K, Ishima Y, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M GENETICALLY ENGINEERED MANNOSYLATED-HUMAN SERUM ALBUMIN AS A VERSATILE CARRIER FOR LIVER-SELECTIVE THERPEUTICS Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009 2009/10/15-18