

DHSG のピークの溶出位置は、混合脂質より得た標準溶液の DPPC, Chol, PEG-DSPE 及び DHSG の溶出位置と等しく、ブランク試料のクロマトグラムにおいて、分析対象物の各溶出位置にレスポンスを認めないことを確認した。更に、標準溶液のクロマトグラムにおいて、分析対象物と近接するピークとの分離度が 1.5 以上であった。

### 「直線性」及び「範囲」

DPPC, Chol, PEG-DSPE 及び DHSG の希釈系列を調製し、10 μL につき測定を行った。

DPPC, Chol, PEG-DSPE 及び DHSG 濃度に対して面積値をプロットしたところ、いずれも視覚的に直線であることが確認できたので、最小 2 乗法による直線回帰を行った。その結果各成分における相関係数は順に、0.9999, 0.9998, 0.9953 及び 0.9999 であり、回帰式はそれぞれ  $y = 133726.2x - 62037.6$ ,  $y = 187272.4x - 8876.5$ ,  $y = 93365.4x - 27585.4$  及び  $y = 144782x - 9573.6$  であった。得られた回帰直線（検量線）を図 3-1~3-2 に示す。

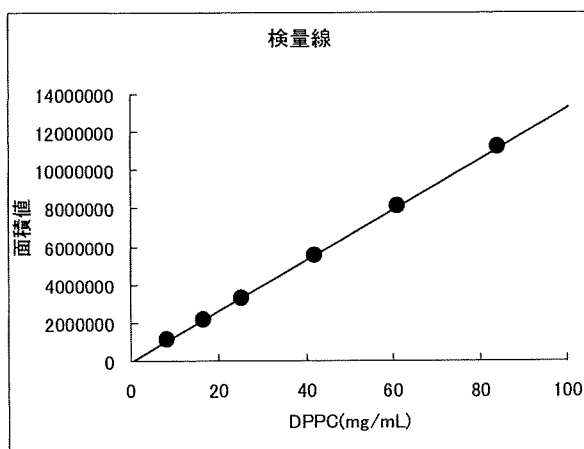


図 3-1 DPPC の検量線

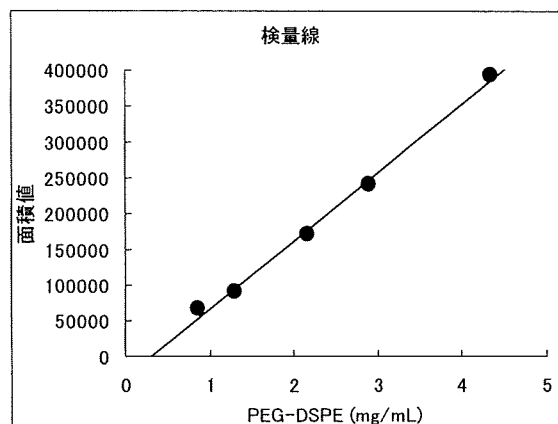


図 3-1 PEG-DSPE の検量線

DPPC 濃度 8.41~84.14 mg/mL, Chol 濃度 3.85~38.53 mg/mL, PEG-DSPE 濃度 0.867~4.33 5mg/mL 及び DHSG 濃度 1.56~15.59mg g/mL の範囲において、検量線は良好な直線性を示し、残差グラフから残差に一定の傾向のないことが確認された。さらに、y 切片の 95%信頼区間内に原点が存在することから、DPPC, Chol, PEG-DSPE 及び DHSG のいずれも一点補正法による定量が可能であることが明らかとなった。

### 「検出限界」及び「定量限界」

以上の実験において得られたデータをそれぞれ用いて、検出限界及び定量限界の推定を行った。推定式は、ICH ガイドライン (Q2B) に記載されている通り、それぞれ検出限界 (DL) =  $3.3 \sigma / \text{slope}$ , 定量限界 (QL) =  $10 \sigma / \text{slope}$  を用いた。

表 1 各脂質の検出限界 (DL) 及び定量限界 (QL) の推定値

	DL (mg/mL)	QL (mg/mL)
DPPC	0.076	0.230
Chol	0.012	0.037
PEG-DSPE	0.171	0.518
DHSG	0.014	0.043

以上の方法により、DPPC, Chol, PEG-DSPE 及び DHSG のいずれも分離可能であり、一定の範囲内

で定量可能であることが明らかとなった。更に各脂質の検出限界及び定量限界値を推定することが可能となった。本法は混合脂質終濃度が 100 mg/mL と高濃度にて測定することから、低含量である PEG-DSPE の測定が可能であった。この混合脂質の分散液からの溶媒抽出を試みたが、水/有機相の分離が完全でなく、PEG-DSPE の回収率が安定しなかった。また有機溶媒乾固の際も突沸を生じやすく定量的な脂質回収が困難で、これは PEG-DSPE の物性によるところが大きいと考えられた。さらに極性の高いと思われる類縁物質（分解物）には溶媒抽出は向いていないと考え、サンプルから直接水を除去する前処理とした。その結果示差屈折計の能力を生かすことのできる高濃度にて測定も可能となった。しかし、凍結乾燥機による水の除去に多大の時間がかかることも問題である。また、示差屈折計自体もベースラインが安定しにくい、グラジエント溶出ができないなどの点で分析効率の向上には難点もある。今後 PEG-DSPE においても十分な感度を以て測定を考える場合、例えば UV 吸収の低い成分の検出に最近汎用されている蒸発光散乱検出器（ELSD : Evaporative Light Scattering Detector）を使用することにより、高感度化とグラジエント溶出が可能となる。その結果分析の効率化が期待でき、類縁物質（分解物）の評価も可能となることが気体できる。

## 2. サンプル処理法の検討

1) 前述の方法に従い、種々濃度の TG を添加したのち DPPC と Chol を測定したときの発色の度合いを図 4 に示す。濃度計算にはサンプルの 600 nm の吸光度からブランクの 700 nm の吸光度を差し引くので、その値でプロットした。残存した凝集物のなど要因を除くためここでは遠心処理も加えて方法と比較した。

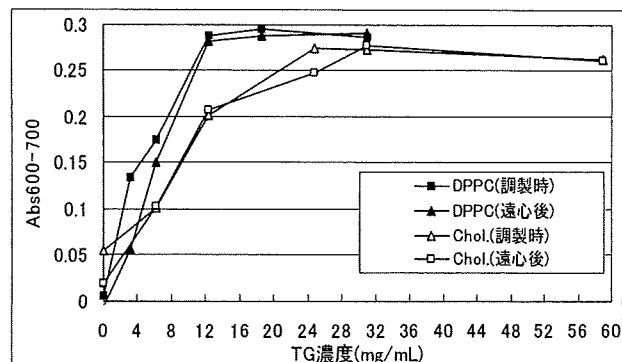


図 4 Hb-V の可溶化に必要な TG 濃度

Cholの方が可溶化は難しいものの TG 最終濃度 31 mg/mL で十分な発色が得られていることがわかった。そこで以降この条件で基本的に可溶化を行うこととした。

実際の工程サンプルである凍結乾燥前の脂質分散液およびヘモグロビン脂質混合液（水和攪拌後）について、この方法で DPPC を見積もった結果を、表 2 に示す。これから、可溶化による全脂質推定値に仕込みの実績値と良い一致がみられ、この定量法が妥当なものであることがわかる。Chol を指標にした場合も同様の結果が得られた

表 2 DPPC 濃度の測定と全脂質の推定

試料溶液	濃度	単位 ; (mg/mL)	
		全脂質濃度推定値	仕込み計算値
脂質分散液 1	11.85	19.43	19.33
脂質分散液 2	12.55	20.57	19.82
脂質分散液 3	12.50	20.49	20.01
ヘモグロビン脂質混合液 1	42.20	69.18	69.25
ヘモグロビン脂質混合液 2	42.55	69.76	71.77

全脂質中 DPPC 含量を 61%として全脂質濃度推定値を算出し、仕込み実績と比較した。

2) さらにこの手法を応用し、ヘモグロビンを含むサンプルを TG にて予め可溶化し均一化し

た後、アルコール類を添加することにより除蛋白とサンプルの均一化を図った。予備検討の結果、検出可能な脂質濃度を維持するにはプロパノールがメタノール、エタノールに比べ有効で、また蛋白変性には2-プロパノールが1-プロパノールより勝ることがわかった。この方法により、脂質分散液と同様のHPLCチャートが得られることも確認できた。

そこで、Hb-V中の脂質濃度を脂質測定キット（酵素法）とHPLC法で比較した。HPLC法のサンプル前処理法は前記方法の欄に記載の通りである。結果を表3に示す

表3 Hb-V中の脂質濃度の比較

分析法	単位 ; (mg/mL)			
	DPPC	Chol	PEG-DSPE	DHSG
酵素法	54.2	21.0	—	—
HPLC法	52.13 (61.0)	21.99 (25.7)	2.818 (3.28)	8.87 (10.3)

括弧内は実測値より脂質構成比(%)を算出したもの

以上の結果、酵素法とHPLC法は良い一致を示し、HPLC法により最終Hb-Vにおいても脂質の構成比が原料の混合脂質とほとんど変わらないことが実証できた。また工程中の脂質の収支評価においては、酵素法であっても一度脂質構成についてデータを得ておれば、十分妥当な結果が得られることもわかった。

#### D.研究業績

##### 1. 論文発表

1. Nitrosylated human serum albumin (SNO-HSA) induces apoptosis in tumor cells.  
Katayama N, Nakajou K, Ishima Y, Ikuta S, Yokoe J, Yoshida F, Suenaga A, Maruyama T, Kai T, Otagiri M. Nitric Oxide. 2010, 22,

259-265.

2. Pharmacokinetic study of enclosed hemoglobin and outer lipid component after the administration of hemoglobin-vesicle as an artificial oxygen carrier.

Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Maruyama T, Watanabe H, Sakai H, Horinouchi H, Kobayashi K, Tsuchida E, Kai T, Otagiri M. Drug Metab. Dispos., 2009 Apr 13.

3. Pharmacokinetics of single and repeated injection of hemoglobin-vesicles in hemoglobin-vesicles in hemorrhagic shock rat model.

Tagushi K, Maruyama T, Iwao Y, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Tsuchida E, Kai T, Otagiri M. J. Control Release, Feb. 24 (2009)

##### 2. 学会発表

1. 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

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

日本薬学会第129年会 (2009.3.26).

2. 強力な臓器保護材としての新規S-ニトロソヒト血清アルブミンの開発

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.

日本血液代替物学会第16年次会(2009.10.16).

3. Fatty acid could be a novel type of mediator of S-denitrosation from S-nitrosylated human serum albumin.

Ishima Y, Maruyama T, Akaike T, Sawa T, Suenaga A, Kai T, Otagiri M.

AFPS 2009 (Fukuoka, 15-18 Oct., 2009).

4. S-ニトロソアルブミンによる細胞内 NO 輸送  
における NO 修飾率の影響

渡邊博志, 吉田芙美香, 異島優, 甲斐俊哉,  
末永綾香, 丸山徹, 小田切優樹.  
日本薬学会第 130 年会 (2010.3.28).

別添 4-9 平成 21 年度 厚生労働省科学研究費補助金（政策創薬総合研究）

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 試料の滅菌法の開発に関する検討：2. BPL による滅菌の可能性の検討

分担研究者	高野久輝	ニプロ株式会社	総合研究所	人工臓器開発センター	センター長
研究協力者	白数昭雄	ニプロ株式会社	総合研究所	人工臓器開発センター	部長
	山根恒彦	ニプロ株式会社	医薬研究所	製剤研究部製剤研究部	主席
	田中 均	ニプロ株式会社	総合研究所	試験課	課長
	加藤 洋	ニプロ株式会社	総合研究所	試験課	課員
	岸田晶夫	東京医科歯科大学	生体材料工学研究所	分子制御分野	教授

研究要旨

生体投与を行う人工酸素運搬体である HbV(Hb 小胞体:資料)の臨床応用を考える場合に無菌性が必須である。従来より医療に用いられている加熱、ガス滅菌及び放射線照射は、資料に変性を生じさせるので、滅菌処理法の検討を継続した。[検討-1]は、前回に引き続き、超高压処理での滅菌の可能性の検討を継続して行った。[検討-2]は、新しく、 $\beta$ -propiolactone (BPL) による滅菌効果を検討した。その結果、超高压処理により、常在菌の栄養型細菌及び virus は、60℃で 3,000 気圧を 10 分以上加えることにより滅菌が可能であることが判明した。更に芽胞を形成する bacillus は、30℃および 37℃で、10,000 気圧を 60~100 分保持することにより、滅菌が可能であることが判明した。しかしこれらの条件では、滅菌は可能であるが、Hb が変性することも判明した。従って、資料の滅菌には、超高压法は資料の滅菌には不相当であることが判明した。そこで今回は特に血液製剤等の微生物不活化剤として利用される BPL ( $\beta$ -propiolactone) による滅菌法に的を絞って検討を加えた。人工酸素運搬体 HbV の無菌化手法の確立のため、 $\beta$ プロピオラクトン (BPL) のヘモグロビンへの影響とその微生物殺滅効果を調べた。ヘモグロビン溶液への最終濃度 0.01~1%での添加では、濃度および処理温度依存的に pH の低下とともに影響が見られ、1%添加で明らかに凝集沈殿など蛋白変性を生じていた。これ以下での濃度では変性までは認められなかったが、酸素親和性の変化が見られた。これらの影響が BPL の結合による直接的効果か pH 低下による間接的効果かは判別できていない。さらに HbV 存在下で BPL の微生物殺滅効果をブドウ球菌および緑膿菌について室温、最終濃度 0.05、0.1%で調べた。いずれも濃度および処理時間依存的に菌数の低下を認めた。0.1%では両菌種とも 5 時間以内にコロニーを検出しなくなった。ブドウ球菌の方が抵抗性は強く、0.05%では 5 時間後も残存菌が認められた。指標菌未添加、室温、BPL 0.05、0.1%での HbV を調べたところ、pH の低下は認めたが、酸素親和性には大きな変化は見られなかった。最後に今後の検討課題も考察した。

## A. 研究目的

ヘモグロビン小胞体(HbV)が人工酸素運搬体として安全に利用するにはが無菌性の確保が必須であるが、従来の滅菌方法を適用することは困難であることから実用的な製造プロセスの無菌保証を達成することは容易ではない。

## B. 研究方法

### 1. ヘモグロビンへの影響

化学修飾剤である BPL のヘモグロビンへの直接的な影響の有無を調べるため、ヘモグロビン溶液に BPL を最終濃度 0.01~1% となるよう添加し、その後の外観や pH および酸素親和性 (P50、Hill 係数) を経時的に調べた。

ヘモグロビン溶液は予め通常の製造手順に沿って酸素親和性、pH、濃度を調整したものをさらに生理食塩水でヘモグロビン濃度 100g/L としたものをを用いた。BPL は冷凍保存しておいたものを使用直前に開封し、ヘモグロビン溶液に所定量添加した。

添加直後に外観を調べサンプリングした後、4℃、室温、および37℃に保存し、経時的にサンプリングした。外観上の変化のあったもので凝集物が明らかでないものは遠心処理により沈殿の有無を確認し、変化の認められないものは念のため吸収スペクトルも調べた。pHは常法に従い、酸素親和性はヘモックスアナライザーを使用し計測した。

### 2. 微生物の殺滅効果

HbV 懸濁液 (ヘモグロビン濃度約 100g/L、CO 化されたもの) に指標菌液を 1/100 量接種したところに BPL を添加して、

一方、一部の血液製剤やワクチンなどでウイルス、細菌・真菌などの微生物の不活化剤として古くより利用され他実績のある BPL の HbV への適用可能性はこれまで調べられたことがない。そこで今回 HbV 存在下で BPL の細菌・真菌類の殺滅効果の検討をした。

室温に静置し所定時間ごとに 0.5mL 採取し、生菌数は第十五改正日本薬局方生菌数測定カンテン平板混釈法に準じて、SCD 培地を用い 3 日間培養後のコロニー数を測定した。

指標菌には、

- ・ *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) IFO12732
- ・ *Pseudomonas aeruginosa* (緑膿菌) IFO13275

を用いた。

また、指標菌未添加の HbV を同処理条件においたサンプルの外観、メト化率、pH、酸素親和性も調べた。

## C. 結果

### 1. ヘモグロビンへの影響

結果の一覧を表 1. に示した。

BPL は濃度および温度依存的にタンパク質であるヘモグロビン自体の物性に影響が見られることがわかった。特に 1% の pH 低下は著しく、凝集沈殿まで生じた。これ未満の濃度では pH 低下と酸素親和性のパラメーター変化を伴うものの明らかな凝集は認めなかった。

表1.  $\beta$ -プロピオラクトン(BPL)によるヘモグロビンへの影響

BPL終濃度	処理条件 適用温度 適用時間	外観	吸収スペクトル	遠心後の沈殿物 (40,000 × g, 30分)	pH	p50	Hill係数
1%	- 0hr	変化なし	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	36°C 2hr	凝集塊多数認め	変化あり	N.E.	4.60	12.05	1.85
	36°C 4hr	凝集塊多数認め	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	室温 24hr	凝集塊多数認め	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	4°C 24hr	濃化・やや粘稠	変化なし	あり	4.77	7.90	1.94
0.1%	- 0hr	変化なし	変化なし	N.E.	7.52	25.56	2.39
	36°C 2hr	変化なし	変化なし	なし	6.83	18.16	2.04
	36°C 4hr	変化なし	変化なし	なし	6.81	18.46	2.00
	室温 24hr	変化なし	変化なし	なし	6.78	17.56	1.99
	4°C 24hr	変化なし	変化なし	なし	6.90	15.21	2.11
0.05%	- 0hr	変化なし	変化なし	N.E.	7.64	24.52	2.32
	36°C 2hr	変化なし	変化なし	なし	7.29	20.73	2.18
	36°C 4hr	変化なし	変化なし	なし	7.26	22.23	2.16
	室温 24hr	変化なし	変化なし	なし	7.20	21.77	2.21
	4°C 24hr	変化なし	変化なし	なし	7.29	22.03	2.18
0.01%	- 0hr	変化なし	変化なし	N.E.	7.55	24.27	2.40
	36°C 2hr	変化なし	変化なし	なし	7.40	23.66	2.22
	36°C 4hr	変化なし	変化なし	なし	7.40	23.55	2.29
	室温 24hr	変化なし	変化なし	なし	7.58	24.60	2.29
	4°C 24hr	変化なし	変化なし	なし	7.61	24.47	2.36
0%	- 0hr	-	-	なし	7.58	24.34	2.38

N.E.: Not Examined

## 2.微生物の殺滅効果

処理条件が室温、BPL濃度0.05ないし0.1%での指標菌への効果を調べた(表2)。

いずれも濃度および処理時間依存的に菌数の低下を認め、0.1%では両菌種とも5時間以内にコロニーを検出しなくなった。ただし、抵抗性はブドウ球菌が強く、0.05%

では5時間後も残存菌が認められた。

一方、指標菌未添加のHbVに室温、BPL濃度0.05および0.1%を添加し24時間以上おいたものについて、外観などを調べたところ、pH低下は前述の実験同様濃度依存的に見られたが、その他の項目には大きな変化は見られなかった(表3)。

表2. HbV存在化でのBPLの効果

### A) *Staphylococcus aureus*

添加菌数： $4.8 \times 10^7$ cfu/mL(実測値)

Solution kind	濃度	Bacterium kind	0 hour	1 hour	2 hour	5 hour
Hb-V 懸濁液 + BPL	0.05%	<i>Staphylococcus aureus</i>	$1.3 \times 10^6$	$3.9 \times 10^5$	$1.8 \times 10^4$	$7.1 \times 10^2$
	0.1%	<i>Staphylococcus aureus</i>	$1.2 \times 10^6$	$2.9 \times 10^2$	$3.2 \times 10^2$	0
Hb-V 懸濁液	—	<i>Staphylococcus aureus</i>	$1.4 \times 10^6$	$1.4 \times 10^6$	$1.4 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$

### B) *Pseudomonas aeruginosa*

添加菌数： $3.2 \times 10^8$ cfu/mL(実測値)

Solution kind	濃度	Bacterium kind	0 hour	1 hour	2 hour	5 hour
Hb-V 懸濁液 + BPL	0.05%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$5.2 \times 10^6$	$1.7 \times 10^2$	7	0
	0.1%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$5.0 \times 10^6$	0	0	0
Hb-V 懸濁液	—	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$6.6 \times 10^6$	$5.5 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$	$2.3 \times 10^7$

表3. Bプロピオラクトン(BPL)のHbVへの影響

BPL終濃度	外観	メト化率 (%)	pH	p50	Hill係数
0.1%	変化なし	1.9	6.25	25.6	1.99
0.05%	変化なし	2.3	6.82	26.9	2.11
0%	—	2.2	7.62	28.0	2.20

N.E.: Not Examined



#### D. 考察

BPLは、分子内にあるβプロピオン環が不安定であり水中では直ちに速やかに開環して、求核反応によりDNAなど生体高分子に結合し微生物を殺滅されることが知られており、そのため血液製剤ワクチンなどにおいて古くより利用されていた。殺滅効果は主にDNA損傷によるものだが、DNAだけでなく蛋白質にも反応することからそれぞれの対象物・使用目的に応じて処理条件などが検討されてきた。未反応のものはプロピオ酪酸を生じ、液性を酸性とする。微生物の不活化にはこの酸性化は寄与しないとされている。したがって酸性化には処方緩衝作用を加えることでこの両者の作用は分離できるものと考えられる。また分解が速やかなことから、BPLとしての最終製剤への残留は無い。

以上のことがBPL適用可能性を考慮するメリットといえる。そこでまずBPLがヘモグロビン自体の物性にどの程度影響するかを調べた(表1.)。

1%添加では明らかに蛋白変性を起こしており、この付近での濃度は実用化が難しいものと思われる。ただし、この変性効果がBPLの結合によるものかpH変化によるものかは現段階では判別は出来ていない。また、リポソーム外に添加した場合の影響はもう少し小さくなる可能性もある。これらの点はより詳細な検討が必要だが、微生物殺滅効果を発揮できる処理条件が見出された段階で行うこととした。

このことから、以下の微生物殺滅効果を調べる実験では、室温、BPL濃度0.05ないし0.1%での効果を調べることとした。

その結果(表2.)、黄色ブドウ球菌、緑濃菌ともに0.1%で5時間以内にコロニーを検出しなくなり、 $-6 \log$ の減弱効果があることが認められた。一方この条件ではヘモグロビンの機能には影響が少なかったものと思われる。これはCO体であるため安定であった可能性がある。

ただし、現行処方では生理食塩液懸濁のままでは緩衝作用がないので、BPLを使用する場合この点の改良が必要となる。

以上のことから、BPLのリポソーム懸濁液への添加は、実用可能性において有望と考えられるが、さらに今後検討の必要のある課題には、以下の項目が挙げられよう。

- ・ 他の指標菌による効果の確認と使用濃度条件の絞り込み
- ・ ヘモグロビン機能の影響の確認(作用直後および保存安定性)
- ・ 処方設計
- ・ 無菌試験ないし生菌数測定法の確立

第一、二項目が大前提ではあるが、有効となった場合、無菌性レベルが格段に高くなるので、製剤試験あるいは工程検査としての無菌試験ないし生菌数測定法は今回のような混釈法ではなく十分に検出力の高い方法の確立が必要である。加えてリポソーム内部の無菌性の議論も必須であることから、このような試験法も無菌保証の観点から重要となる。

#### E. 研究発表

#### F. 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の心筋虚血-再灌流傷害に対する保護効果  
作用メカニズムの解明-3：nitroso-redox balanceを経由する可能性について

分担研究者：大鈴文孝	防衛医科大学校	内科学教室	教授
研究協力者：足立 健	防衛医科大学校	内科学教室	准教授
柳田茂樹	防衛医科大学校	内科学教室	研究員
山岸 正	防衛医科大学校	内科学教室	研究員
中島 淳	防衛医科大学校	内科学教室	研究員
別所基明	防衛医科大学校	内科学教室	研究員
濱 御幸	防衛医科大学校	内科学教室	技官

## 研究要旨

ラット摘出心臓をランゲンドルフ灌流し、ヘモグロビン小胞体(HbV) 30倍希釈懸濁液(Hbとして0.33 g/dL)を虚血直前に灌流すると、25分虚血後の再灌流時に心機能の回復が見られる。この機能回復は、アデノシン受容体blocker、sarcolemmal K<sub>ATP</sub>-channel blocker、PG合成酵素抑制剤では抑制されなかった。HbVによるこの心機能回復効果はL-NAMEによる効果と類似しており、HbVはL-NAMEと同じように虚血-再灌流後の心筋組織中のGSSGを低下させ、蛋白質のthiol残基の酸化を抑制した。また、HbVは心筋組織中のNO<sub>2</sub> contentをcontrol灌流中も虚血-再灌流後も低下させた。これらの実験結果は、HbVが虚血-再灌流で生じるnitroso-redox balanceの破綻を改善することを通じて心筋虚血-再灌流傷害に対して保護効果を発揮することを示唆した。

## A. 研究目的

我々は、ラットの摘出心臓をランゲンドルフ灌流する方法を用いて、ヘモグロビン小胞体(HbV)が虚血-再灌流時の心機能を有意に回復させることを明らかにした(1)。そこで、この効果のメカニズムを解明するため、HbVで灌流した心筋組織中のglucose、glycogen濃度と解糖系の酵素活性を測定し、対照群あるいは空球小胞体で灌流した心筋組織での結果と比較した。いずれの項目においてもHbVで灌流した心筋組織と対照群あるいは空球小胞体で灌流した心筋組織の間に大きな差がないことを見出した(2)。続いて、この効果がmitochondria

K<sub>ATP</sub>-channelを介するかどうかを検討し、このチャンネルは関係しないことを報告した(3)。本研究では、HbVが虚血-再灌流時の心機能を回復する効果のメカニズム解明をさらに進めるため、この効果がsarcolemmal K<sub>ATP</sub>-channel、アデノシン受容体やプロスタノイドを経由するか否か、また心筋組織のnitroso-redox balanceを経由するか否かを検討した。sarcolemmal K<sub>ATP</sub>-channel blockerのglimpiride (glim)、アデノシン受容体blockerのtheophylline (theo)、prostaglandin (PG)合成酵素抑制剤のindomethacin (indo)、NO合成酵素抑制剤のN<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)を用いて以下の実験を行っ

た。nitroso-redox balanceに関係する指標としては、心筋組織中の還元型 (GSH)および酸化型(GSSG)の glutathione含有量、組織蛋白質のthiol残基の酸化度、nitrite (NO<sub>2</sub>)含有量、redoxに関係する酵素類の活性、などを測定した。

## B. 研究方法

### 1. 用いた試薬類：

実験に用いたHbVはSN20061024、lot 14、lot 15、lot 6-37-3,4およびlot 071128 (ニプロ株式会社)である。灌流液の作製には、和光純薬の特級試薬と比抵抗18.2 MΩ以下の超純水を用いた。Theophylline (theo)とindomethacin (indo)は和光純薬から、L-NAMEは同仁化学から、glimpiride (glim)とDMSOはSigma (St Louis, MO)から、それぞれ購入した。

### 2. 用いた動物、心臓灌流法および心機能の測定：

この項目での方法は前報(3)に述べた通りであるが、以下に概略を記載する。

生後9-12週齢のWistar系雄性ラット(Charles River Japan Inc.)を用いた。ヘパリン(ノボ・ヘパリン注1000、持田製薬) 1000 Uを腹腔内投与し、7分後に、ネブタール60 mg/kg (ネブタール注射液、大日本住友製薬、Na-pentobarbital 50 mg/mL溶液)を腹腔内投与して麻酔した。開腹・開胸して心臓を取り出し、直ちに氷冷したKrebs-Henseleit buffer (NaCl 116 mM, KCl 4.7 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, glucose 11.0 mM)(以下KH-bufferと省略する)に投入して心臓の拍動を停止させた。大動脈にカニューレを挿入し、KH-bufferを用いて静水圧100 cmH<sub>2</sub>O、37°Cでランゲンドルフ灌流した。KH-bufferをはじめとする灌流液は、実験開始前から終了するまで95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>の混合ガスを通気し、pHを7.4に調整した。

左心室に生理食塩水を満たしたラテックス・バルーンを挿入し、圧トランスデューサー(P-50, Gould Inc.)を介して多チャンネル記録計(WS-641G, Nihon Kohden)に接続し、左室発生圧(LVDP)、左室

拡張末期圧(LVEDP)、心拍数(HR)などを実験開始から終了まで連続的に記録した。バルーンの容積は、control灌流時の左室拡張末期圧(LVEDP)が0-5 mmHgになるようにした。control灌流開始時から実験終了まで、心臓を灌流して出てきた灌流液を5分毎に採取して冠灌流量(coronary flow, CF)を測定した。

### 3. HbVと各種化合物のKH-bufferへの懸濁あるいは溶解：

(1)HbV 30倍希釈懸濁液：Hb濃度0.33 g/dL のHbV懸濁液の作製法については最初の報告書(1)で詳しく述べた。概略は以下の通りであるが、実験の必要に応じて作製する総volumeは変更した。

純水約260 mLに、832 mgのD-glucoseを溶解させた。これにKH-bufferの構成イオン成分を個別に溶解させた溶液を加え、次にHbV原液14 mLを加え、最後に純水で420 mLにメスアップした。但し、NaCl溶液のvolumeは、HbV原液14 mLが含有するNaCl (0.9%)を差し引いたものとした。

こうして作製したHbV懸濁液のHb濃度は0.33 g/dL相当となる(30倍希釈懸濁液)。

以下の溶液についても必要に応じて作製するvolumeを変更した。溶解にDMSOを使用する場合、DMSOの最終含有率は0.05%とした。なお、glim、theo、indoおよびL-NAMEの濃度は、これまでの文献の中で、今回の実験と同様の実験条件で使用されたことが報告されたものを用いた。

(2) glim 10 μM/KH-buffer溶液：glim 2.18 mgを秤量し、0.22 mLのDMSOに溶解させた。このDMSO溶液100 μLを200 mLのKH-bufferに溶解させた。

(3) glim 10 μM/HbV 30倍希釈懸濁液：上の(2)で作製したglimのDMSO溶液100 μLを200 mLのHbV 30倍希釈懸濁液に溶解させた。

(4) theo 10 μM/KH-buffer溶液：theo 3.9 mgを秤量し、

1.08 mLの純水に溶解させた。この水溶液200  $\mu$ Lを400 mLのKH-bufferに溶解させた。

(5) theo 10  $\mu$ M/HbV 30倍希釈懸濁液：上の(4)で作製したtheo水溶液100  $\mu$ Lを200 mLのHbV 30倍希釈懸濁液に溶解させた。

(6) indo 10  $\mu$ M/KH-buffer溶液：indo 3.7 mgを秤量し、0.51 mLのDMSOに溶解させた。このDMSO溶液100  $\mu$ Lを200 mLのKH-bufferに加え、よく攪拌した。

(7) indo 10  $\mu$ M/HbV 30倍希釈懸濁液：上記の(6)で作製したindoのDMSO溶液100  $\mu$ Lを200 mLのHbV 30倍希釈懸濁液に溶解させた。

(8) L-NAME 100  $\mu$ M/KH-buffer溶液：L-NAME 5.4 mgを秤量し、200 mLのKH-bufferに溶解させた。

こうして作製したすべての溶液あるいは懸濁液は37°Cに加熱し、95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>の混合ガスを1時間以上通気した後実験に用いた。

#### 4. 実験のプロトコール：

実験は、(A)HbVの再灌流時心機能回復効果に対する各種阻害剤の効果を測定する実験と、(B) 心筋組織中のnitroso-redox balanceに関係する化合物あるいは酵素活性の測定、に分けて行った。

#### (A)HbVの再灌流時心機能回復効果に対する各種阻害剤の効果を測定する実験

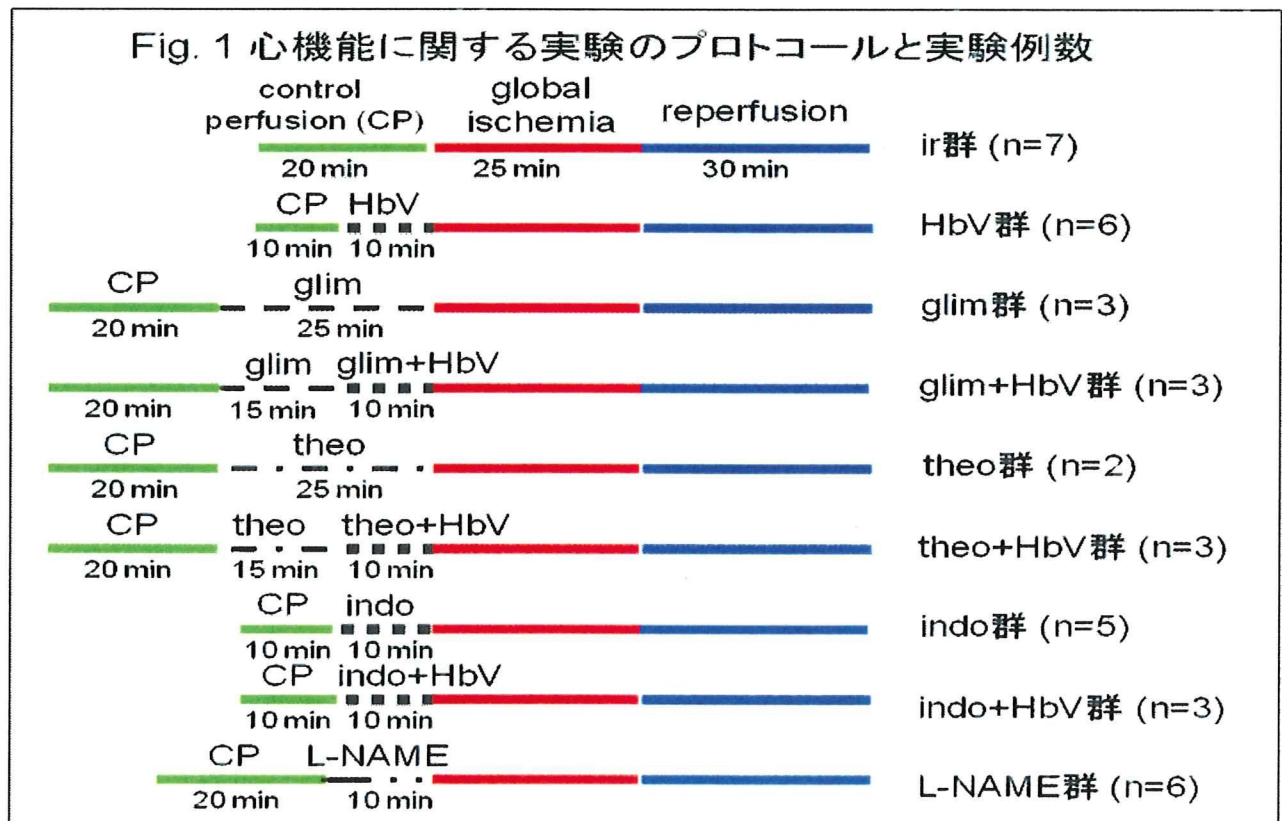
この実験のプロトコールをFig. 1に示した。各実験群の実験内容は以下の通りとした。

(1) ischemia-reperfusion群 (n=7)：以下ir群

control灌流を20分間行った後に、灌流を停止させて虚血(global ischemia)を惹起し、虚血を25分間継続した後再灌流を30分間行った。

(2)HbV 0.33 g/dL群 (n=6)：以下HbV群

10分間のcontrol灌流直後に灌流液をHbV希釈懸濁液に切り換え、同じ灌流圧で10分間灌流した。その後、ir群と同様に虚血25分-再灌流30分の処置を行った。



(3)glim 10  $\mu$ M群 (n = 3) : 以下glim群

20分間のcontrol灌流直後に灌流液をglim 10  $\mu$ M/KH-buffer溶液に切り換え、同じ灌流圧で25分間灌流した。その後、ir群と同様に虚血25分-再灌流30分の処置を行った。

(4) glim 10  $\mu$ M + HbV 0.33 g/dL群 (n = 3) : 以下glim+HbV群

20分間のcontrol灌流直後に灌流液をglim 10  $\mu$ M/KH-buffer溶液に切り換え、同じ灌流圧で15分間灌流した。その後、灌流液をglim 10  $\mu$ Mを含有するHbV 0.33 g/dL懸濁液に切り換えてさらに10分間灌流した後、ir群と同様に虚血25分-再灌流30分の処置を行った。

(5) theo 10  $\mu$ M群 (n = 2) : 以下theo群

20分間のcontrol灌流直後に灌流液をtheo 10  $\mu$ M/KH-buffer溶液に切り換え、同じ灌流圧で25分間灌流した。その後、ir群と同様に虚血25分-再灌流30分の処置を行った。

(6) theo 10  $\mu$ M + HbV 0.33 g/dL群(n = 3) : 以下theo+HbV群

20分間のcontrol灌流直後に灌流液をtheo 10  $\mu$ M/KH-buffer溶液に切り換え、同じ灌流圧で15分間灌流した。その後灌流液をtheo 10  $\mu$ Mを含有するHbV 0.33 g/dL懸濁液に切り換えてさらに10分間灌流した後、ir群と同様に虚血25分-再灌流30分の処置を行った。

(7) indo 10  $\mu$ M群 (n = 5) : 以下indo群

10分間のcontrol灌流直後に灌流液をindo 10  $\mu$ M/KH-buffer溶液に切り換え、同じ灌流圧で10分間灌流した。その後、ir群と同様に虚血25分-再灌流30分の処置を行った。

(8) indo 10  $\mu$ M + HbV 0.33 g/dL群(n = 3) : 以下indo+HbV群

10分間のcontrol灌流直後に灌流液をindo 10  $\mu$ M

を含有するHbV 0.33 g/dL懸濁液に切り換えて10分間灌流した後、ir群と同様に虚血25分-再灌流30分の処置を行った。

(9) L-NAME 100  $\mu$ M群 (n = 6) : 以下L-NAME群

20分間のcontrol灌流直後に灌流液をL-NAME 100  $\mu$ M/KH-buffer溶液に切り換え、同じ灌流圧で10分間灌流した。その後、ir群と同様に虚血25分-再灌流30分の処置を行った。

(10) 灌流実験終了後の心臓の処理

上述のプロトコールに従って灌流実験を行った心臓は、別の実験を行うまで $-80^{\circ}\text{C}$ に保管した。ir群、HbV群およびL-NAME群の各6例の心臓を用いて組織中のGSHとGSSGを測定した。また、ir群、HbV群、L-NAME群と以下で述べる実験(B)のcontrol群の各2例について組織蛋白質のthiol残基の酸化度の測定(biotinylated-iodoacet amide labeling)を行った。

(B) 心筋組織中のnitroso-redox balanceに関する化合物あるいは酵素活性の測定

この実験のプロトコールをFig. 2に示した。各実験群の実験内容は以下の通りとした。

(1)control群 (n = 5)

control灌流を30分間行った後に、心臓を液体窒素で冷却したアルミブロックで挟んで凍結させた。

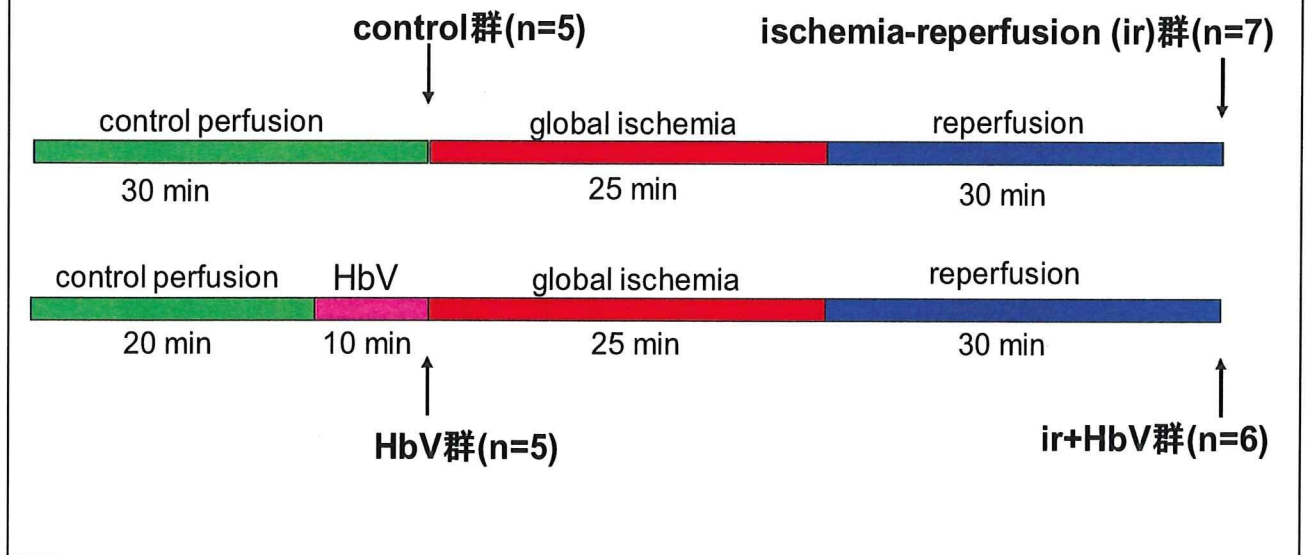
(2)HbV 0.33 g/dL群 (n=5) : 以下HbV群

20分間のcontrol灌流直後に灌流液をHbV希釈懸濁液に切り換え、同じ灌流圧で10分間灌流した。その後、control群と同様に心臓を液体窒素で冷却したアルミブロックで挟んで凍結させた。

(3)ischemia-reperfusion (ir)群 (n = 7)

control灌流を30分間行った後、灌流を停止させて虚血(global ischemia)を惹起した。虚血を25分間継続した後再灌流を30分間行い、その後control群と同様

Fig. 2 心筋組織中のnitrateおよびredox関連酵素活性測定のための実験のプロトコールと実験例数



に心臓を液体窒素で冷却したアルミブロックで挟んで凍結させた。

#### (4) ir + HbV群 (n = 6)

20分間のcontrol灌流直後に灌流液をHbV希釈懸濁液に切り換え、同じ灌流圧で10分間灌流した。その後、ir群と同様に虚血25分-再灌流30分の処置を行い、心臓を液体窒素で冷却したアルミブロックで挟んで凍結させた。

以上の実験で凍結させた心臓は、液体窒素中で細かく粉碎して-80℃に保管した。

### 5. 各種の測定

#### (1) 心筋組織中のGSHとGSSG contentの測定：

実験(A)のir群、HbV群、L-NAME群の各6例の心臓組織を、100 μMのdiethylenetriamine penta acetic acid (DTPA)を含む10% TCA溶液で抽出し、遠心分離した後その上清中のGSHとGSSG濃度をLakritz J et al (4)の方法に従ってHPLC法で測定した。遠心沈査中の蛋白質をBCA法 (Thermo Scientific, Rockford,

IL, USA)で測定し、各実験群の心筋組織中のGSHとGSSG contentをmg/g-proteinで表記した。

#### (2) 組織蛋白質のthiol残基の酸化度の測定：

Kim JR et al.(5)の方法に従って、実験(A)のir群、HbV群、L-NAME群と実験(B)のcontrol群の各2例の心臓組織を、100 μMのbiotinylated iodoacetamide (BIAM)を含むPIPES buffer (PIPES 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, diethylene triamine penta acetic acid 50 mM, PMSF 2 mM, Triton X-100 0.5%, pH 6.5)でhomogenizeしてBIAMとの反応を行わせた後、その上清中のBIAMでラベルされた蛋白質をSDS-PAGEで分離した。

#### (3) 心筋組織中のNO<sub>2</sub>の測定：

実験(B)の各実験群の心臓組織を、lysis buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, sodium pyrophosphate 2.5 mM, β-glycerophosphate 1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, Triton X-100 1%, leupeptin 1 μg/mL, PMSF 0.2 mM, pH 7.4)で抽出し、4℃、10,000gで10分間遠心分離した。

Misko TP et al. (6)の方法に従って、上清中のNO<sub>2</sub>を2,3-diaminonaphthaleneと37℃で30分間反応させ、その反応生成物を蛍光法で測定した。上清中の蛋白質をBCA法で測定し、組織中のNO<sub>2</sub> contentをnmol/mg-proteinで表記した。

(4) 心筋組織中のredoxに関する酵素活性の測定：実験(B)の各実験群の心臓組織を、Tris-HCl buffer

(Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, DTT 1 mM, leupeptin 1 μg/mL, PMSF 0.2 mM, pH 7.5)で抽出し、4℃、10,000gで10分間遠心分離した。上清中のglutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), Cu/Zn-soperoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD)およびcatalase活性をCayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)の測定キットで測定した。上清中の蛋白質をBCA法で測定し、組織中の各酵素活性をU/mg-proteinあるいは反応速度/mg-protein (Table 1)で表記した。

#### 6. データの計算と統計処理：

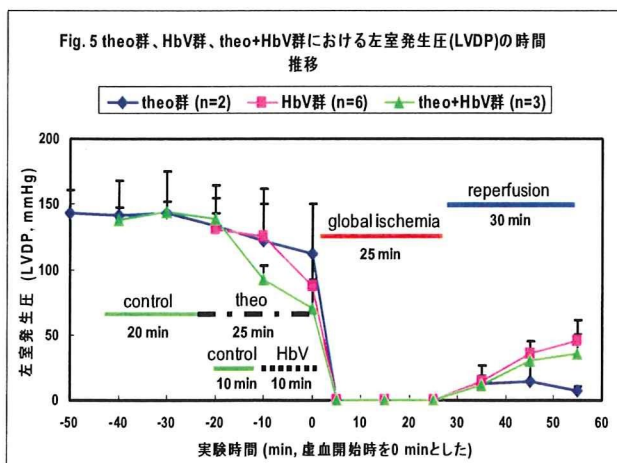
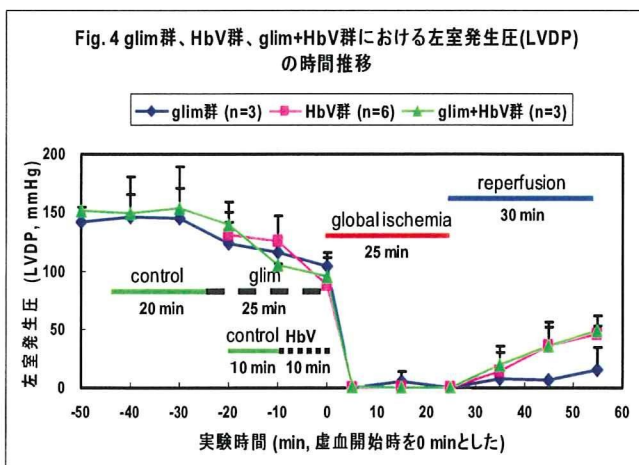
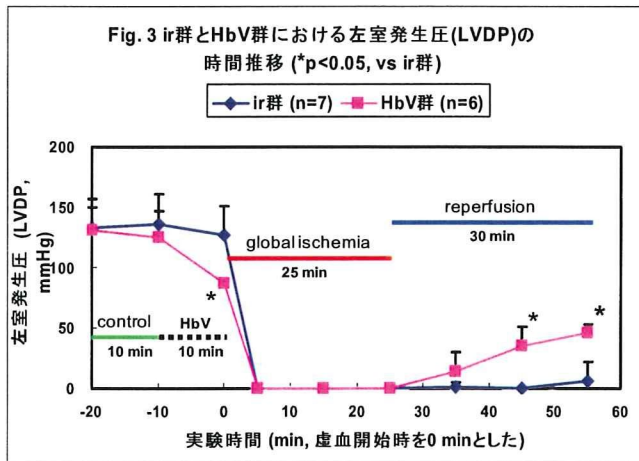
各実験群で測定した計数データはすべて平均値(mean)と標準偏差(SD)で表示した。実験(A)の心機能では、左室発生圧(LVDP)のみを図示した(Fig.3-7)。これらのデータは、時系列分散分析を行った後、Bonferroniの多重比較法で群間の有意差検定を行った。組織中のGSH, GSSG content (Fig. 8), NO<sub>2</sub> content (Fig. 10)および酵素活性のデータ (Table 1)は、両側ANOVAを行った後、各実験群の有意差検定をTukey多重比較法で検定した。

#### C. 研究結果

各実験群で冠灌流量と心機能(心拍数、左室発生圧、左室拡張末期圧、±dP/dTなど)を測定したが、ここでは左室発生圧(LVDP)のみの結果を示すこととした。

(1)ir群とHbV群でのLVDPの時間推移の比較 (Fig. 3)

これまでの報告(1,3)と同じように、ir群の左室発生圧(LVDP)は、control灌流時には平均約150 mmHgで安定的に推移し、虚血開始直後から心臓の拍動は停止し、それ以降再灌流終了まで全例で、LVDPは0 mmHgであった。HbV群でもcontrol灌流時のLVDPは安定していたが、HbVを灌流するとLVDPが僅かだが有意に低下した。再灌流時には、これまでの報告(1,3)と同様にLVDPは有意に回復した。



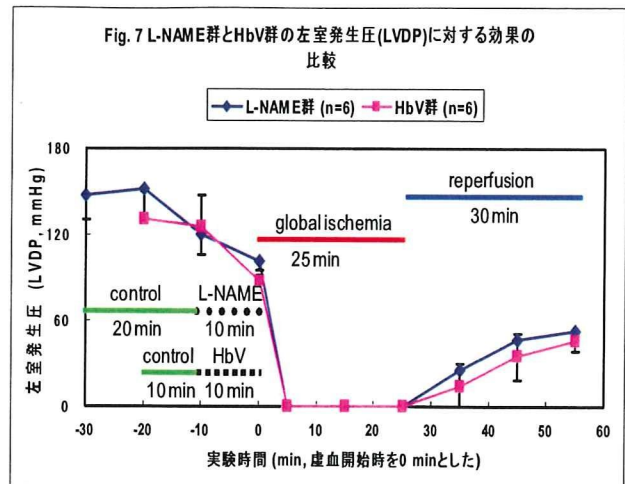
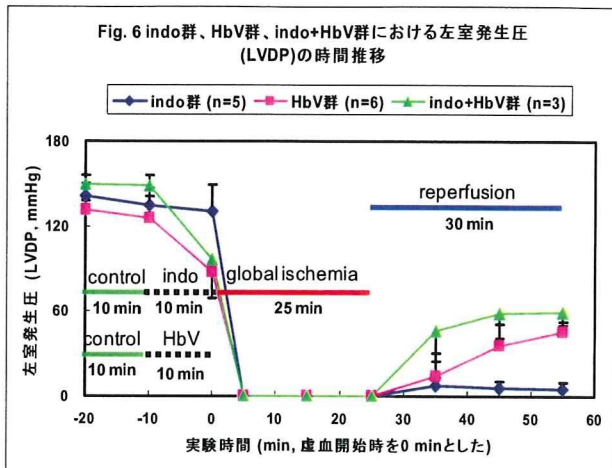
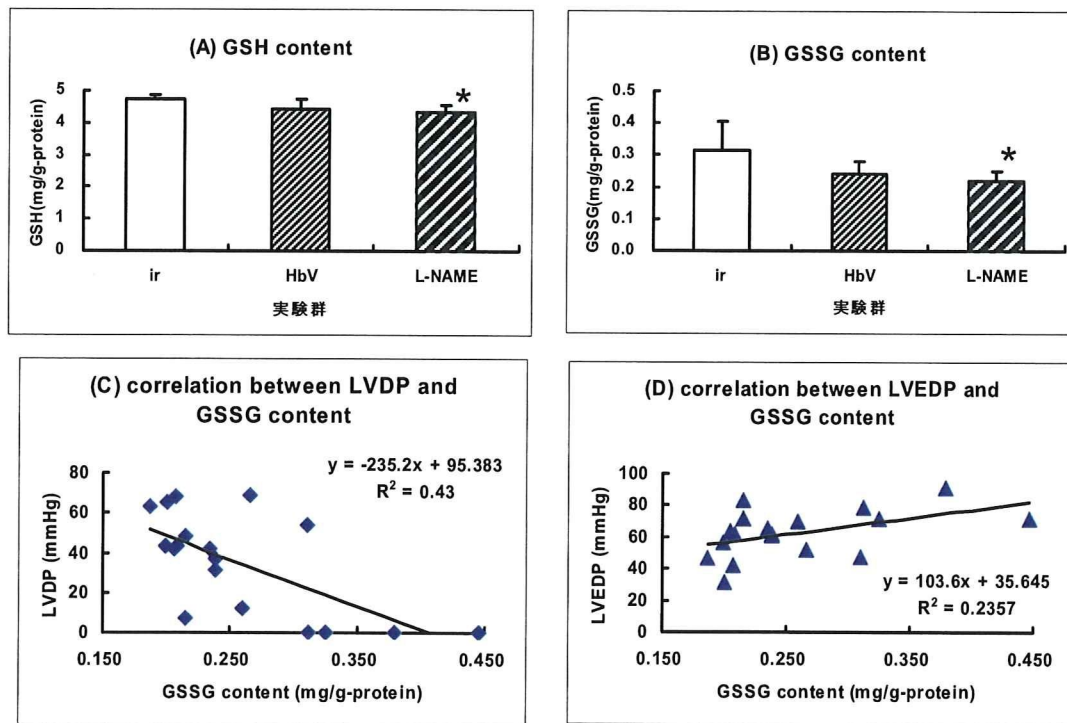


Fig. 8 心筋組織中のGSH (A), GSSG (B) contentおよびGSSGとLVDP (C)あるいはLVEDP (D)との相関  
\* $p < 0.05$  vs ir group



(2)HbV群の再灌流時心機能回復効果に対する各種阻害剤の効果 (Fig. 4-6)

HbV群では再灌流開始後には全例で左室発生圧の回復が見られた。この心機能回復効果に対して sarcolemmal  $K_{ATP}$ -channel blocker (glibenclamide, Fig. 4), アデノシン受容体 blocker (theophylline, Fig. 5)、PG合成酵素抑制剤(indomethacin, Fig. 6)のいずれも有意の影響を与えなかった。これらの結果は、HbV

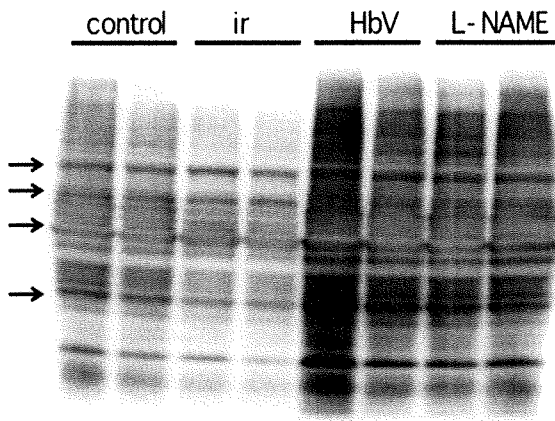
による再灌流時心機能回復効果が、sarcolemmal  $K_{ATP}$ -channelやアデノシン受容体あるいはPG合成系を経由しないことを示唆した。

(各図の中のblockerあるいは抑制剤単独群とHbV群あるいは併用群との間の有意差マークは省略した。)

(3)HbV群とL-NAME群の再灌流時心機能回復効果



Fig. 9 各実験群におけるBIAM staining (各群2例)



矢印(→)はnon-specific bandを示す

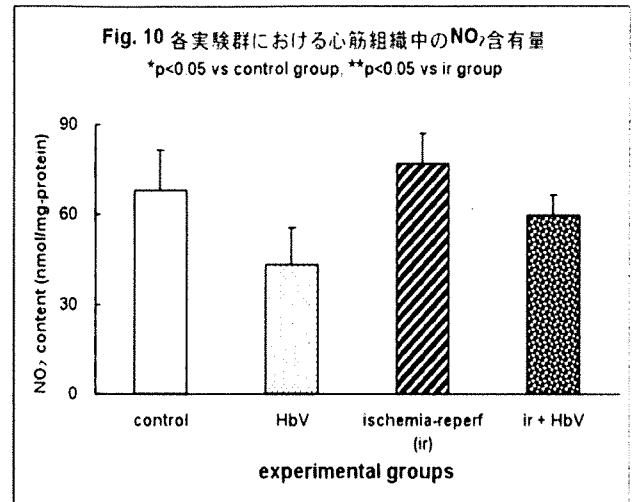


Table 1 Activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), Cu/Zn-superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD) and catalase in the cardiac tissues.

	control group n = 5	HbV group n = 5	ischemia-reperf. (ir) group n = 7	ir + HbV group n = 6
glutathione peroxidase (NADPH, nmol/min/mg-protein)*1	223 ± 23	230 ± 34	248 ± 43	224 ± 72
glutathione reductase (NADPH, nmol/min/mg-protein)*1	11.2 ± 1.8	12.3 ± 1.5	14.6 ± 2.8	13.9 ± 1.6
Cu/Zn-superoxide dismutase (U/mg-protein)	0.92 ± 0.15	0.86 ± 0.38	0.95 ± 0.31	0.91 ± 0.42
Mn-superoxide dismutase (U/mg-protein)	0.44 ± 0.14	0.59 ± 0.19	0.60 ± 0.32	0.59 ± 0.27
Catalase (FA, nmol/min/mg-protein)*2	5.57 ± 0.89	5.65 ± 1.39	6.12 ± 1.29	6.22 ± 1.17

All numerical data are shown as mean ± SD

\*1: Enzyme activity is expressed as the rate of oxidation of NADPH/min/mg-protein extracted.

\*2: Enzyme activity is expressed as the rate of generation of formaldehyde (FA)/min/mg-protein extracted.

の比較 (Fig. 7)

L-NAMEを灌流するとHbV群と同様にLVDPが低下し、再灌流時にはLVDPが回復した。このLVDPに対するHbV群とL-NAME群の効果の類似性は、HbVとL-NAMEがNOの捕捉(HbV)あるいはNOの合成抑制(L-NAME)によって組織中のNO濃度を低下させるという共通の経路を介することを示唆した。

(4)心筋組織中のGSH, GSSG contentとGSSGとLVDPあるいはLVEDPとの相関 (Fig. 8)

ir群の再灌流後のGSH contentは $4.72 \pm 0.16$  mg/g-proteinであった。HbV群とL-NAME群ではGSH contentが僅かに低下したが、L-NAME群の値

のみがir群と比較して有意に低かった。ir群の再灌流後のGSSG contentは $0.31 \pm 0.09$  mg/g-proteinであった。HbV群とL-NAME群ではGSH contentが低下したが、GSHの場合と同様にL-NAME群の値のみがir群と比較して有意に低かった。また、この3つの実験群の全データ(16例)を使ってGSSGとLVDPあるいはLVEDPとの相関をとったところ、それぞれ間に有意の相関を認めた( $p < 0.01$ , GSSG vs LVDP,  $p < 0.05$ , GSSG vs LVEDP)。

(5) 組織蛋白質のthiol残基の酸化度 (Fig. 9)

control群と比較してir群では、虚血-再灌流によって組織蛋白質のthiol残基の酸化度が進んでいた。こ

れに対してHbV群とL-NAME群ではこの酸化の進行が抑制されていた。この実験結果は、HbV群とL-NAME群でH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>など蛋白質のthiol残基を酸化する化合物の合成が抑制されていたことを示唆した。

#### (6)心筋組織中のNO<sub>2</sub>含有量 (Fig. 10)

control群のNO<sub>2</sub> contentは68.1 ± 13.2 nmol/mg-proteinであった。HbV群ではNO<sub>2</sub> contentが有意に低下した。虚血-再灌流後(ir群)には、わずかにNO<sub>2</sub> contentが増加したが、この増加に対してもHbVは有意の抑制効果(ir + HbV群)を示した。

#### (7) 心筋組織中のredoxに関係する酵素活性 (Table 1)

この実験で測定した酵素活性に対して、HbVは虚血前にも虚血-再灌流後にも大きな影響を与えなかった。また、虚血-再灌流後のこれらの酵素活性の変化も大きいものではなかった。

#### D. 考察

今回の実験で我々は、HbVの虚血-再灌流後の心機能回復効果がsarcolemmal K<sub>ATP</sub>-channel blocker、アデノシン受容体blocker、PG合成酵素抑制剤によって影響を受けないことを見出した。これらの結果は、HbVの心機能回復効果がsarcolemmal K<sub>ATP</sub>-channel活性、アデノシン受容体、PG合成酵素などを経由しないことを示唆した。

次に、① L-NAMEが今回の心臓灌流実験系でHbVとほとんど同じ心機能回復効果を引き起こすこと、② 虚血-再灌流後の心筋組織中のGSSG contentをL-NAMEとHbVが同程度に減少させること、③ 虚血-再灌流後の心筋組織中の蛋白質のthiol残基の酸化を両者が同程度に抑制すること、そして④ HbVが心筋組織中のNO<sub>2</sub> contentをcontrol灌流中でも、虚血-再灌流後でも低下させること、を見出した。HbVは、その内包するヘモグロビンによってNO分子を捕捉する。L-NAMEはNO合成酵素を阻害する。それ故、HbVとL-NAMEは、メカニズムは違うが、組

織中のNO濃度を減少させるという共通の効果を持つと推定される。今回の実験結果は、HbVが心筋組織中のNO濃度を低下させ、その結果、虚血-再灌流時に引き起こされるnitroso-redox balanceの破綻を改善することで虚血-再灌流時の心機能回復効果を発揮する可能性を示唆した。今後はHbVの心筋組織中のnitroso-redox balanceに関わる生化学的指標の測定をさらに進め、作用メカニズムを解明したいと考えている。

#### E. 結論

ラット摘出心臓をランゲンドルフ灌流し、ヘモグロビン小胞体(HbV) 30倍希釈懸濁液(Hbとして0.33 g/dL)を虚血直前に灌流すると、25分虚血後の再灌流時に心機能の回復が見られた。これらの機能回復は、アデノシン受容体 blocker、sarcolemmal K<sub>ATP</sub>-channel blocker、PG合成酵素抑制剤では抑制されなかった。

HbVによるこの心機能回復効果はL-NAMEによる効果と類似しており、HbVはL-NAMEと同じように虚血-再灌流後の心筋組織中のGSSGを低下させ、蛋白質のthiol残基の酸化を抑制した。また、HbVは心筋組織中のNO<sub>2</sub> contentをcontrol灌流中も虚血-再灌流後も低下させた。これらの実験結果は、HbVが虚血-再灌流で生じるnitroso-redox balanceの破綻を改善することを通じて心筋虚血-再灌流傷害に対して保護効果を発揮することを示唆した。

#### (参考文献)

1. 大鈴文孝、楠原正俊、柳田茂樹、山岸正、加藤隆一、別所基明、浜御幸. Hb小胞体の心筋虚血-再灌流傷害に対する保護効果. 「救急・災害医療に利用可能な人工赤血球の開発に関する研究」平成17年度 総括・分担研究報告書、pp.29-34 (2006).
2. 大鈴文孝、楠原正俊、柳田茂樹、山岸正、加藤隆一、別所基明、浜御幸. Hb小胞体の心筋虚血-再灌流傷害に対する保護効果. 作用機序の解明-1: 心筋組織中のglucose、glycogen濃度と解糖系酵

- 素活性への影響「救急・災害医療に利用可能な人工赤血球の開発に関する研究」平成18年度 総括・分担研究報告書、pp. 38-43 (2007).
3. 大鈴木文孝、楠原正俊、柳田茂樹、山岸正、中島淳、別所基明、浜御幸. Hb小胞体の心筋虚血-再灌流傷害に対する保護効果. 作用機序の解明-2 : mitochondria  $K_{ATP}$ -channel活性を經由する可能性について「血液製剤安定確保のための人工酸素運搬体を用いた救急医療への応用に関する研究」平成19年度 総括・分担研究報告書、pp. 49-54 (2008).
  4. Lakritz J, Plopper CG, Buckpitt AR. Validated high-performance liquid chromatography-electrochemical method for determination of glutathione and glutathione disulfide in small tissue samples. *Anal Biochem.* 1997 Apr 5; 247(1): 63-8.
  5. Kim JR, Yoon HW, Kwon KS, Lee SR, Rhee SG. Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH. *Anal Biochem.* 2000 Aug 1; 283(2):214-21.
  6. Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, Moore WM, Currie MG. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal Biochem.* 1993; 214: 11-16.
- plasma high-sensitivity C-reactive protein levels in Japanese patients with stable coronary artery disease: The Japan NCVV-Collaborative Inflammation Cohort (JNIC) Study. *Atherosclerosis* 207, 272-276 (2009).
2. T. Akima, K. Nakanishi, K. Suzuki, M. Katayama, F. Ohsuzu, T. Kawai. Soluble Elastin Decreases in the Progress of Atheroma Formation in Human Aorta. *Circulation Journal* 73, 2154-2162 (2009).
  3. T. Adachi, F. Ohsuzu. Cosmic Effect of Rosuvastatin in COSMOS. *Circulation Journal* 73, 2015-2016 (2009)
  4. A. Yonemura, Y. Momiyama, Z. A. Fayad, M. Ayaori, R. Ohmori, T. Kihara, N. Tanaka, K. Nakaya, M. Ogura, H. Taniguchi, M. Kusuhara, M. Nagata, H. Nakamura, S. Tamai, F. Ohsuzu. Effect of lipid-lowering Therapy with atorvastatin on atherosclerotic aortic plaques: a 2-year follow-up by noninvasive MRI. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation* 16, 222-228 (2009)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）  
なし

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究業績

### 1. 論文発表

1. Y. Momiyama, A. Kawaguchi, I. Kajiwara, R. Ohmori, K. Okada, I. Saito, M. Konishi, M. Nakamura, S. Sato, Y. Kokubo, T. Mannami, H. Adachi, K. Kario, H. Iso, F. Ohsuzu, M. Tsushima. Prognostic value of

## 別添 5

表 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者名
Hemoglobin-vesicles and red blood cells as carriers of carbon monoxide prior to oxygen for resuscitation after hemorrhagic shock in a rat model. <i>Shock</i> 31, 507-514 (2009).	2009年5月	Lippincott Williams & Wilkins	H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida.
Pharmacokinetics of single and repeated injection of hemoglobin-vesicles in hemorrhagic shock rat model. <i>J. Control. Release</i> 136, 232-239 (2009).	2009年6月	Elsevier	K. Taguchi, T. Maruyama, Y. Iwao, H. Sakai, K. Kobayashi, H. Horinouchi, 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. <i>Drug Metab. Dispos.</i> 37, 1456-1463 (2009).	2009年7月	American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics	K. Taguchi, Y. Urata, M. Anraku, T. Maruyama, H. Watanabe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, T. Kai, M. Otagiri.
Histopathological changes of rat brain after direct injection of hemoglobin-vesicles (oxygen carriers) and neurological impact in an intracerebral hemorrhage model. <i>J. Biomed. Mater. Res.</i> 90A, 1107-1119 (2009).	2009年8月	Wiley	H. Sakai, M. Okamoto, E. Ikeda, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida.
A transient inflammatory reaction in the lung after experimental hemorrhagic shock and resuscitation with a hemoglobin-vesicles solution compared with rat RBC transfusion. <i>ASAIO J.</i> 55, 478-483 (2009).	2009年9月	Lippincott Williams & Wilkins	Y. Yamanashi, M. Mori, K. Terajima, T. Tsueshita, H. Horinouchi, H. Sakai, A. Sakamoto.
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年9月	朝倉書店	堀之内宏久、小林紘一、酒井宏水、土田英俊
Hemoglobin vesicles, polyethylene glycol (PEG)ylated liposomes developed as a red blood cell substitute, do not induce the accelerated blood clearance phenomenon in mice. <i>Drug Metab. Dispos.</i> 37, 2197-2203 (2009)	2009年11月	American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics	K. Taguchi, Y. Urata, M. Anraku, H. Watanabe, D. Kadowaki, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida, T. Maruyama, M. Otagiri.
Hemoglobin-vesicle, a cellular artificial oxygen carrier, that fulfils the physiological roles of the red blood cells structure. <i>Adv. Exp. Med. Biol.</i> 662 (Oxygen Transport to Tissue XXXI) 433-438 (2010)	2010年3月	Springer Science	H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, K. Kobayashi, E. Tsuchida.
ヘモグロビン小胞体を含む血液検体の臨床検査. <i>人工血液</i> 17, 6-15 (2009).	2009年6月	日本血液代替物学会	宗慶太郎、小峰梨沙、酒井宏水、小林紘一、土田英俊、村田満
Artificial oxygen carriers, hemoglobin vesicles and albumin-hemes, based on bioconjugate chemistry. <i>Bioconjugate Chem.</i> 20, 1419-1440 (2009)	2009年8月	American Chemical Society	E. Tsuchida, K. Sou, A. Nakagawa, H. Sakai, T. Komatsu, K. Kobayashi