

D3の発現低下および細胞周期を負に制御するp27kip1の発現増強が重要とされる場合等が知られている。

そこで、今回はこれらのタンパクの挙動に着目し、空リポソーム投与の影響の検討を試みた。タンパク発現をみるためには、これまで用いてきた系よりも多くの細胞数を必要とするため、最初に系の確立を試みた。タンパク抽出をおこなう系と並行して、CFSEを用いた脾細胞の増殖ならびにNOレベルの測定をおこなったが、空リポソーム投与ラット由来の脾細胞ではConA応答性が有意に低下すること、またConAの応答性の低下にNOが関与するというこれまでの我々の結果を再確認した。この系において、STAT5のリン酸化を調べたが、空リポソーム投与ラット由来の脾細胞においてConA刺激に対するリン酸化の低下が認められたが、STAT5自体の発現も減少しているため、STAT5の量でノーマライズすると、有意差はみられなかった。このことから、NOを介したT細胞増殖抑制機序の一つとしてSTAT5のリン酸化抑制をあげる系が報告されているが、空リポソーム投与による脾細胞の増殖抑制においては、別の機序の果たす役割が大きいと推察された。

細胞周期の各段階は、異なるCyclin-CDK (cyclin-dependent kinase)複合体と、CDK阻害因子によって複雑に制御されている。G1期の通過とS期への移行はCyclin D-CDK4とCyclin E-CDK2複合体が鍵となっている。増殖刺激によってcyclin Dが合成され、CDK4と結合する。活性化された複合体はRbタンパク質をリン酸化する。Rbがリン酸化されると結合している転写因子E2Fが離れ、cyclin EなどのS期進行やDNA複製に必要な遺伝子群の発現が誘導される。P27kip1はCDK阻害因子の一つで、cyclin E-CDK2複合体に結合し、CDK活性を阻害する (Fig. 10)。

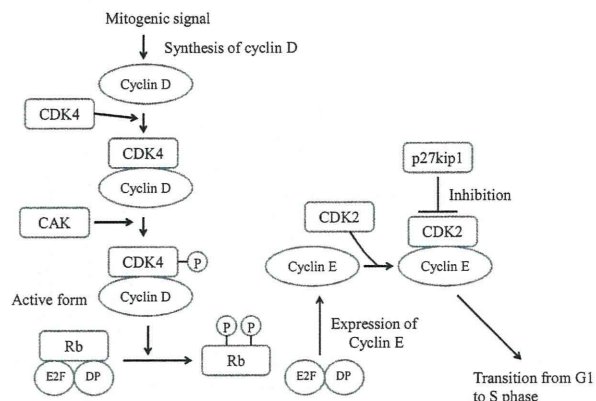


Fig. 10 Regulation of transition from G1 to S phase

このようなカスケードの中において、cyclin D2, D3およびp27kip1の発現について検討を試みた。増殖刺激ConA処理によって、生食投与ラット由来の脾細胞においては、cyclin D3およびcyclin D2の発現が増加するのに対し、空リポソーム投与ラット由来の脾細胞においては有意な発現低下が認められ、その低下はiNOS阻害薬の投与によって回復した。NOを介したT細胞の増殖抑制にcyclin D familyの発現抑制が報告されているが、空リポソーム投与において見られる脾臓T細胞の増殖抑制においても、NOを介したcyclin D familyの発現抑制が関与している可能性が示唆された。また、他の実験系においてはp27kip1の発現が亢進することがT細胞の増殖抑制の一因であるとの報告があるが、今回の検討ではp27kip1は未刺激状態よりもむしろ減少し、その程度は生食投与ラットと空リポソームラットの脾細胞において違いは見られなかった。よって空リポソームラットの脾細胞での増殖抑制においてp27kip1の関与は少ないと考えられた。

これまでの検討から、HbVまたは空リポソームを投与したラットの脾細胞をConA刺激した場合、IL-2の産生や脾臓T細胞のIL-2高親和性受容体の発現等、増殖刺激による初期のイベントは正常におこることを既に報告している。その状態から、産生されるNOがどのように、細胞周期に係るタンパク分子の発現抑制をもたらすかについては、現時点ではわからない。NOによる増殖のための鍵となるタンパク分子のニトロソ化等の関与等につい

て明らかにしていくことが今後の課題として残されている。

E. 結論

HbVや空リポソーム投与後に脾細胞の免疫応答能をex vivoの系でみると、NOを介して脾臓T細胞の増殖反応を抑制する。この抑制に細胞周期制御分子であるcyclin D3, cyclin D2の発現低下の関与が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. D. Takahashi, H. Azuma, H. Sakai, K. Sou, D. Wakita, H. Abe, M. Fujihara, H. Horinouchi, K. Kobayashi, T. Nishimura, H. Ikeda. Phagocytosis of liposome particles by rat splenic immature monocytes makes them transiently and highly immunosuppressive. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*

337, 42-49 (2011).

2. 学会発表

1. 池田久實. 震災時の血液供給について. 第18回日本血液代替物学会年次大会. 札幌, 2011年10月.
2. 東 寛. LEHの輸血医療への期待. 第18回日本血液代替物学会年次大会. 札幌, 2011年10月.
3. 藤原満博, 東 寛, 大橋乃理子, 酒井宏水, 堀之内宏久, 小林紘一, 池田久實. ヘモグロビン小胞体(HbV) のラット免疫能への影響—遺伝子発現プロファイルの解析—. 第18回日本血液代替物学会年次大会. 札幌 2011年10月.

H. 知的財産権の出願。登録状況（予定を含む）

該当なし

分担研究報告書

人工酸素運搬体の臨床応用に関する研究

分担課題：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 熊本大学大学院生命科学研究部 客員教授
崇城大学薬学部 教授

研究要旨

本研究では、HbVの霊長類における安全性及び体内動態特性評価を目的とし、カニクイザルにHbVを臨床推奨量である1400 mg Hb/kgで投与し、血圧・血液ガス・血清生化学パラメーター及び血中濃度推移について評価を行った。4匹のカニクイザル（オス、4～8才、5.57～5.93 kg）にHbVを投与したところ、HbV投与による摂餌量・体重変化に特記する異常は確認されず、HbV投与から観察終了まで、いずれのカニクイザルにおいても、異常行動・瀕死状態あるいは死亡した例はなかった。加えて、HbV投与前後で収縮期血圧・拡張期血圧・血液ガスパラメーターに変化は認められず、また、霊長類においてもHbVは十分な血中滞留性を維持していた。一方、12項目の生化学検査値の中でアスパラギン酸トランスアミナーゼ・アラニントランスアミナーゼの一過性の上昇及び脂質関係のパラメーターの経時的な上昇が確認された。今回得られた知見は、HbVのヒトにおける安全性の予測に有用になるだけでなく、臨床試験の際のプロトコール作成の重要な基盤情報になると考えられる。

A. 研究目的

これまでの研究により、健常マウス・ラット・ウサギにおけるヘモグロビン小胞体 (HbV) の体内動態試験や毒性試験などにおいて、その安全性が証明されている。加えて、臨床使用を想定した出血性ショックモデル動物などへHbVを投与した際の薬理効果試験よりHbV投与群は赤血球投与群と同等以上の有用性を示し、また、マウス・ラット・ウサギの体内動態試験結果よりアニマルスケールアップを試み、ヒトにおけるHbVの半減期は約3～4日と予測され、HbVがヒトにおいて十分な血中半減期を維持しつつ、有効性を有する可能性も提示してきた。しかしながら、これらの試験は薬物耐久性の高い齧歯類を中心とした小中動物を用いた試験結果であり、

ヒトの生体反応に近い霊長類での安全性評価は未だ行われていない。臨床試験を控えたHbVにとって、霊長類における安全性試験結果は、ヒトに投与後の安全性の予測に有用になるだけでなく、臨床試験を遂行する際のプロトコール（評価項目やモニタリング期間など）作成の重要な基盤情報になると考えられる。そこで本研究では、カニクイザルにHbVを臨床推奨量である1400 mg Hb/kgで投与し、血圧、血液ガス及び血液生化学パラメータをHbV投与後14日目までモニタリングを行い、霊長類におけるHbVの安全性評価を行った。加えて、HbVの血中濃度推移についても評価を行い、霊長類における体内動態特性についても評価を行った。

B. 研究方法

1. 動物

実験動物はカニクイザル（オス、4～8才、5.57～5.93 kg）を用いた。実験開始前10日間を馴化期間とし、飼育環境・投与及び採血条件に慣れさせた。12時間の明暗サイクルで飼育し、固形飼料を約108 g/day及びトリーツを2回/週で与え、水は自動給水装置を用い自由摂取させた。

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、株式会社新日本科学 安全研究所の動物実験委員会により承認を受け、実験を施行した。

3. HbV の投与

カニクイザルを保定器に拘束し、ディスプレイ注射筒、留置針、延長チューブ及びインフュージョンポンプを用い、無麻酔下で前腕橈側皮静脈に 1400 mg Hb/kg の投与量で HbV 溶液（遺伝子組み換え型ヒト血清アルブミンを 5%含有）を 1 mL/min で投与した。

4. 血圧測定

HbV 投与前、投与終了後 1, 6 時間、1, 3, 7, 14 日目に無麻酔下で全自動血圧測定装置を用い、上腕部から測定した。

5. 血液ガス

HbV 投与前、投与終了後 1, 3, 7, 14 日目に大腿動脈より採血し、i-STAT 300F を用い、酸素分圧 (pO₂)、炭酸ガス分圧 (pCO₂)、pH を測定した。

6. 血清生化学的検査

HbV 投与前、投与終了後 1, 3, 7, 14 日目に大腿静脈から採血し、遠心分離を行い血清を得た。さらに、得られた血清を超遠心分離処理し、HbV を沈殿・除去させ、上清を用い 12 項目の検査値の測定を行った。

7. 体内動態

HbV 投与前、投与直後、投与終了後 10, 30 分、1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 168, 336 時間に大腿静脈からヘパリンナトリウム加注射筒を用い採血した。直ちに遠心処理を行い、血漿を得た。

得られた血漿中のヘモグロビン濃度をヘモグロビンテストワコーにより測定し、血中濃度推移を評価した。

C. 結果および考察

1. 一般状態

HbV投与による摂餌量、体重、行動などに特記する異常は確認されなかった。また、HbV投与後から観察終了日（投与後14日目）まで、いずれのカニクイザルにおいてもHbV投与後にショック症状や瀕死状態あるいは死亡した例は確認されなかった。

Table 1 The changes of blood pressure in male cynomolgus monkeys.

	pre	after HbV administration					
		(hour)		(day)			
		1	6	1	3	7	14
Systolic blood pressure	118±8	124±4	123±15	109±11	110±14	104±10	109±10
Diastolic blood pressure	64±5	66±5	66±7	56±9	63±10	56±5	55±6

Table 2 The changes of blood gas parameters in male cynomolgus monkeys.

	Day after HbV administration				
	pre	1	3	7	14
pO ₂ (mmHg)	96.3±4.9	93.3±2.2	93.8±6.2	98.5±6.0	90.8±17.7
pCO ₂ (mmHg)	29.7±2.4	31.9±2.3	31.0±2.1	30.5±2.9	28.5±1.8
pH	7.363±0.094	7.439±0.070	7.467±0.023	7.438±0.016	7.382±0.083

2. 血圧

これまでに開発されてきた非細胞型 Hb-based oxygen carrier (HBOCs) を投与した際、一酸化窒素の捕捉により、血圧の上昇が引き起こされる。そこで、HbV を投与した際の血圧の変化を HbV 投与終了後 1, 6 時間、1, 3, 7, 14 日目に評価を行った。その結果、いずれの時間においても HbV 投与による収縮期及び拡張期血圧に変化は確認されなかった (Table 1)。

3. 血液ガス

HbV 投与による血液ガスへの影響を評価するために、HbV 投与前、HbV 投与終了後 1, 3, 7, 14 日目に酸素分圧 (pO₂)、炭酸ガス分圧 (pCO₂)、血液 pH の測定を行った。その結果、投与前と比較して各血液ガスパラメーターに有意な変化はなく、アシドーシスなどの異常は認められなかった (Table 2)。

4. 血清生化学検査

HbV 投与による血液生化学的検査値への影響を評価するために、HbV 投与前、HbV 投与終了後 1, 3, 7, 14 日目に Figure 1 に示す全 12 項目について評価を行った。その結果、投与前と比較して、投与後 1~3 日目にアスパラギン酸トランスアミナーゼ (AST)、アラニントランスアミナー

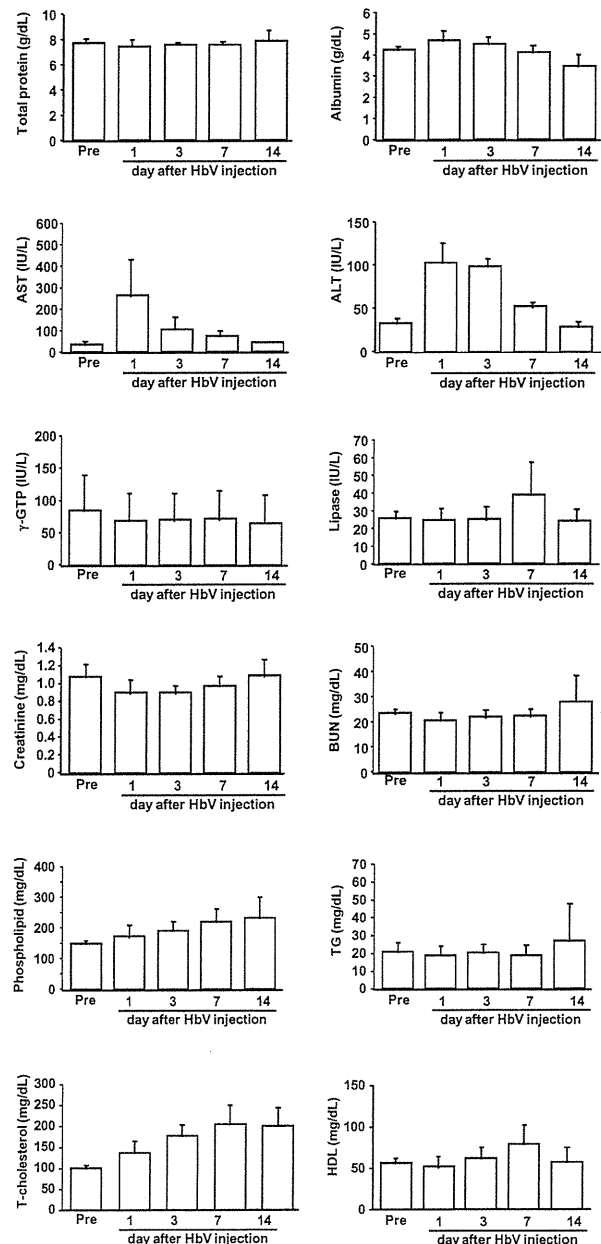


Figure 1 The changes of laboratory parameters in male cynomolgus monkeys.

ゼ (ALT) の一過性の上昇が確認された。また、脂質関連パラメーター (リン脂質・トリグリセリド・総コレステロール・HDL-コレステロール) においては、HbV 代謝による影響と考えられる経時的な上昇が確認された。

5. 体内動態

HbVを含む血液は遠心分離処理することによりHbVは血漿分画にHbVが残存するため、赤血球との分離が容易に行える。そこで次に、HbVの血中動態を検討するために血漿中ヘモグロビン濃度を測定することで、HbVの血中動態を評価した。その結果、HbV投与12時間後まで一定の血中濃度を示し、HbV投与終了後に一過性の消失の飽和現象が見られた。しかしながら、投与12時間以降ではHbV血中濃度は減少し、投与168時間後には血中からほとんどが検出されなかった (Figure 2)。これらの結果より、HbVは霊長類 (カニクイザル) においても十分な血中滞留性を有し、また、血中蓄積性もないことが確認された。

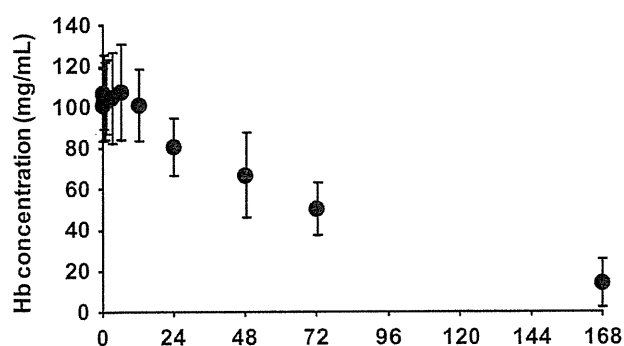


Figure 2 Relative plasma concentration of hemoglobin after administration of 1400 mg Hb/kg via injection of male cynomolgus monkeys. Each point represents the mean \pm SD (n=4).

D. 結論

カニクイザルに対し、HbVを臨床推奨量である1400 mg Hb/kgで投与しても、瀕死状態あるいは死亡する例はみられず、また、投与前後で血圧・

血液ガスの変化に特記する異常は確認されなかった。加えて、HbVの霊長類での血中動態特性は齧歯類では見られなかった消失の飽和現象が投与後12時間まで認められたが、投与後12時間以降より消失が始まり投与168時間後には血中よりその大部分が消失しており、血中蓄積性はなかった。さらに、霊長類においても十分な血中滞留性を維持していた。一方、血清生化学検査においてAST・ALTの一過性の上昇及び脂質関係のパラメーター (リン脂質・トリグリセリド・総コレステロール・HDL-コレステロール) の経時的な上昇が確認された。これまでの検討により、HbVは主に肝臓中のKupffer細胞により分解され、脂質成分は血中に放出されることが明らかとなっている。そのため、これら生化学検査の結果はHbVが代謝される際におこる上昇であると推測される。

以上の知見より、HbVを霊長類へ投与した今回のケースでは、本研究でモニタリングした評価項目においては重篤な副作用等は確認されなかった。しかしながら、今後、さらに詳細な評価が必要であると考えられる。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 主な論文発表

- Iwao Y, Ishima Y, Yamada J, Noguchi T, Kragh-Hansen U, Mera K, Honda D, Suenaga A, Maruyama T, **Otagiri M**. Quantitative evaluation of the role of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin using recombinant mutants. *IUBMB Life*. (2012) *in press*
- Komori H, Nishi K, Uehara N, Watanabe H, Shuto T, Suenaga A, Maruyama T, **Otagiri M**.

- Characterization of hepatic cellular uptake of α 1-acid glycoprotein (AGP), part 2: Involvement of hemoglobin β -chain on plasma membranes in the uptake of human AGP by liver parenchymal cells. *J Pharm Sci.* (2012) *in press*
3. Ishima Y, Chen D, Fang J, Maeda H, Minomo A, Kragh-Hansen U, Kai T, Maruyama T, **Otagiri M**. S-Nitrosated Human Serum Albumin Dimer is not only a Novel Anti-Tumor Drug but also a Potentiator for Anti-Tumor Drugs with Augmented EPR Effects. *Bioconjug Chem.* (2012) *in press*
 4. Nishi K, Komori H, Kikuchi M, Uehara N, Fukunaga N, Matsumoto K, Watanabe H, Nakajou K, Misumi S, Suenaga A, Maruyama T, **Otagiri M**. Characterization of the hepatic cellular uptake of α (1) -acid glycoprotein (AGP), part 1: A peptide moiety of human AGP is recognized by the hemoglobin β -chain on mouse liver parenchymal cells. *J Pharm Sci.* (2012) *in press*
 5. Minomo A, Ishima Y, Kragh-Hansen U, Chuang VT, Uchida M, Taguchi K, Watanabe H, Maruyama T, Morioka H, **Otagiri M**. Biological characteristics of two lysines on human serum albumin in the high-affinity binding of 4Z,15Z-bilirubin-IX α revealed by phage display. *FEBS J.* (2011) 278:4100-11.
 6. Guo J, Jono H, Kugimiya T, Saito S, Maruyama T, Misumi Y, Hoshii Y, Su Y, Shono M, Ueda M, Obayashi K, **Otagiri M**, Ando Y. Antioxidative effect of albumin on amyloid fibril formation in transthyretin-related amyloidosis. *Amyloid.* (2011) Suppl 1:12-3.
 7. Ishima Y, Yoshida F, Kragh-Hansen U, Watanabe K, Katayama N, Nakajou K, Akaike T, Kai T, Maruyama T, **Otagiri M**. Cellular uptake mechanisms and responses to NO transferred from mono- and poly-S-nitrosated human serum albumin. *Free Radic Res.* (2011) 45:196-206.
 8. Zhang JS, Kadowaki D, Nonoguchi H, Hirata S, Seo H, Imai T, Suenaga A, Giam Chuang VT, **Otagiri M**. Toxicodynamic evaluation of a cisplatin-chondroitin sulfate complex using a perfused kidney and human proximal tubular cells. *Ren Fail.* (2011) 33:609-14.
 9. Furukawa M, Tanaka R, Chuang VT, Ishima Y, Taguchi K, Watanabe H, Maruyama T, **Otagiri M**. Human serum albumin-thioredoxin fusion protein with long blood retention property is effective in suppressing lung injury. *J Control Release.* (2011) 154:189-95.
 10. Tanaka M, Tokunaga K, Maruyama T, **Otagiri M**, Tominaga Y, Itoh K, Matsushita K, Komaba H, Fukagawa M. Parathyroidectomy markedly reduces oxidative stress in a patient with primary hyperparathyroidism. *Ther Apher Dial.* (2011) Suppl 1:38-41.
 11. Watanabe H, Miyamoto Y, **Otagiri M**, Maruyama T. Update on the pharmacokinetics and redox properties of protein-bound uremic toxins. *J Pharm Sci.* (2011) 100:3682-95.
 12. Kugimiya T, Jono H, Saito S, Maruyama T, Kadowaki D, Misumi Y, Hoshii Y, Tasaki M, Su Y, Ueda M, Obayashi K, Shono M, **Otagiri M**, Ando Y. Loss of functional albumin triggers acceleration

- of transthyretin amyloid fibril formation in familial amyloidotic polyneuropathy. *Lab Invest.* (2011) 91:1219-28.
13. Kaneko K, Chuang VT, Minomo A, Yamasaki K, Bhagavan NV, Maruyama T, **Otagiri M**. Histidine146 of human serum albumin plays a prominent role at the interface of subdomains IA and IIA in allosteric ligand binding. *IUBMB Life.* (2011) 63:277-85.
 14. Anraku M, Takeuchi K, Watanabe H, Kadowaki D, Kitamura K, Tomita K, Kuniyasu A, Suenaga A, Maruyama T, **Otagiri M**. Quantitative analysis of cysteine-34 on the antioxidant properties of human serum albumin in hemodialysis patients. *J Pharm Sci.* (2011) 100:3968-76.
 15. Taguchi K, Maruyama T, **Otagiri M**. Pharmacokinetic properties of hemoglobin vesicles as a substitute for red blood cells. *Drug Metab Rev.* (2011) 43:362-73.
 16. Tanaka M, Tokunaga K, Komaba H, Itoh K, Matsushita K, Watanabe H, Kadowaki D, Maruyama T, **Otagiri M**, Fukagawa M. Vitamin D receptor activator reduces oxidative stress in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Ther Apher Dial.* (2011) 15:161-8.
 17. Miyamoto Y, Watanabe H, **Otagiri M**, Maruyama T. New insight into the redox properties of uremic solute indoxyl sulfate as a pro- and anti-oxidant. *Ther Apher Dial.* (2011) 15:129-31.
 18. Mera K, Nagai R, Takeo K, Izumi M, Maruyama T, **Otagiri M**. An autoantibody against N(ϵ)-(carboxyethyl)lysine (CEL): possible involvement in the removal of CEL-modified proteins by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* (2011) 407:420-5.
 19. Nishi K, Ono T, Nakamura T, Fukunaga N, Izumi M, Watanabe H, Suenaga A, Maruyama T, Yamagata Y, Curry S, **Otagiri M**. Structural insights into differences in drug-binding selectivity between two forms of human α 1-acid glycoprotein genetic variants, the A and F1*S forms. *J Biol Chem.* (2011) 286:14427-34.
 20. Zhang JS, Anraku M, Kadowaki D, Imai T, Suenaga A, Odani A, **Otagiri M**. Spectroscopic studies of interactions of chondroitin sulfates with cisplatin. *Carbohydr Res.* (2011) 346:631-7.
 21. Miyamoto Y, Watanabe H, Noguchi T, Kotani S, Nakajima M, Kadowaki D, **Otagiri M**, Maruyama T. Organic anion transporters play an important role in the uptake of p-cresyl sulfate, a uremic toxin, in the kidney. *Nephrol Dial Transplant.* (2011) 26:2498-502.
 22. Taguchi K, Ogaki S, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Maruyama T, **Otagiri M**. Fluid resuscitation with hemoglobin vesicles prevents Escherichia coli growth via complement activation in a hemorrhagic shock rat model. *J Pharmacol Exp Ther.* (2011) 337:201-8.
 23. Taguchi K, Iwao Y, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Maruyama T, **Otagiri M**. Repeated injection of high doses of hemoglobin-encapsulated liposomes (hemoglobin vesicles) induces accelerated blood clearance in a hemorrhagic shock rat model. *Drug Metab Dispos.*

(2011) 39:484-9.

24. Taguchi K, Miyasato M, Watanabe H, Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K, Maruyama T, **Otagiri M**. Alteration in the pharmacokinetics of hemoglobin-vesicles in a rat model of chronic liver cirrhosis is associated with Kupffer cell phagocyte activity. *J Pharm Sci.* (2011) 100:775-83.

2. 主な学会発表

(主な国際発表)

1. Ryota Tanaka, Masato Furukawa, Yu Ishima, Ayaka Suenaga, Hiroshi Watanabe, **Masaki Otagiri** and Toru Maruyama. Improved Therapeutic Effect of Thioredoxin by Fusion to Human Serum Albumin against Ovalbumin-induced Lung injury (4th Asia Pacific ISSX Meeting 2011 Tainan. Taiwan, 4/22-4/25)
2. Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Kadowaki D, **Otagiri M**, Maruyama T. Carbon Monoxide Binding Red Blood Cells Prevent Cytochrome P450 Degradation in Resuscitation after Hemorrhagic Shock in a Rat Model. (4th Asia Pacific ISSX Meeting 2011 Tainan. Taiwan, 4/22-4/25)
3. Yohei Miyamoto, Yasunori Iwao, Yuka Tasaki, Keizo Sato, Yu Ishima, Hiroshi Watanabe, Daisuke Kadowaki, Toru Maruyama and **Masaki Otagiri**. The uremic solute indoxyl sulfate acts as an antioxidant against superoxide anion radicals under normal-physiological conditions (4th Asia Pacific ISSX Meeting 2011 Tainan. Taiwan, 4/22-4/25)
4. Yohei Miyamoto, Yasunori Iwao, Katsumi Mera, Hiroshi Watanabe, Daisuke Kadowaki Keizo Sato, **Masaki Otagiri**, Toru Maruyama. Uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate (CMPF) causes renal cell damage via oxidative stress induction (7th International Congress on Uremia Research and Toxicity 2011 Nagoya, Japan, 5/12-5/14)
5. Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Kadowaki D, **Otagiri M**, Maruyama T. Carbon monoxide bound red blood cells prevent alteration of hepatic cytochrome P450 activity after hemorrhagic shock and resuscitation (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2011, 2011 12/9-12, Malaysia, Kuala Lumpur)
6. Suenaga T, Nishi K, Komori H, Kikuchi M, Uehara N, Fukunaga N, Matsumoto K, Watanabe H, Nakajou K, Maruyama T, **Otagiri M**. A peptide moiety of human $\alpha 1$ -acid glycoprotein is recognized by the hemoglobin β -chain on mouse liver parenchymal cells (Asian Federation For Pharmaceutical Sciences Conference 2011/12/9-12, Malaysia, Kuala Lumpur)
7. Watanabe H, Miyamoto Y, Noguchi T, Suenaga A, Kadowaki D, **Otagiri M**, Maruyama T. Interaction between p-cresol sulfate and indoxyl sulfate during body disposition can influence their serum free concentrations in chronic kidney disease (Asian Federation For Pharmaceutical Sciences Conference 2011/12/9-12, Malaysia, Kuala Lumpur)
8. Nagumo K, Sugimori T, Ymada N, Kubota K, Ishima Y, Watanabe H, Tanaka M, Sasaki Y, Maruyama T, **Otagiri M**. Quantitative assessment of cysteinylated human serum albumin using

- ESI-TOF/MS and its clinical significance in chronic liver disease (Asian Federation For Pharmaceutical Sciences Conference 2011/12/9-12, Malaysia, Kuala Lumpur)
9. Ishima Y, **Otagiri M**, Fukukawa M, Tanaka R, Chuang VT, Taguchi K, Watanabe H, Maruyama T. Human serum albumin-thioredoxin fusion protein with long blood retention property is effective in suppressing lung injury (Asian Federation For Pharmaceutical Sciences Conference 2011/12/9-12, Malaysia, Kuala Lumpur)
 10. Hara M, Ishima Y, Katayama N, Nakajou K, Ikuta S, Yokoe J, Yoshida F, Suenaga A, Kai T, Maruyama T, **Otagiri M**. Nitrosylated human serum albumin (SNO-HSA) induces apoptosis in tumor cells. (6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Kyoto, Japan; 2010, 6/14-18)
 11. Watanabe K, Hirata K, Maruyama T, Watanabe H, Nakajou K, Iwao Y, Ishima Y, **Otagiri M**. Genetically engineered Mannosylated-human serum albumin as a liver-selective carrier for delivering of nitric oxide. (6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Kyoto, Japan; 2010, 6/14-18)
 12. Minomo A, Ishima Y, Suwa Y, Uchida M, Maruyama T, Morioka H, **Otagiri M**. Characterization of bilirubin binding site in human serum albumin via construction and bilirubin binding screening of a phage library. (ISSX 9th International Meeting, Istanbul, Turkey; 2010, 9/4-8)
 13. Komori H, Uehara N, Nishi K, Watanabe H, Maruyama T, **Otagiri M**. Hepatic uptake of α 1-acid glycoprotein through hemoglobin b-chain-mediated endocytic pathway. (ISSX 9th International Meeting, Istanbul, Turkey; 2010, 9/4-8)
 14. Taguchi K, Maruyama T, Watanabe H, Sakai H, Tsuchida E, **Otagiri M**. Pre-clinical pharmacokinetic studies of hemoglobin-vesicle as an artificial oxygen carrier. (ISSX 9th International Meeting, Istanbul, Turkey; 2010, 9/4-8)
 15. Watanabe H, Miyamoto Y, Iwao Y, Tasaki Y, Sato K, Ishima Y, Kadowaki D, Maruyama T, **Otagiri M**. The Uremic Solute Indoxyl Sulfate Has Both Pro- and Anti-oxidant Properties Depending on Its Physiological Concentration. (ISSX 9th International Meeting, Istanbul, Turkey; 2010, 9/4-8)
 16. Suenaga A, Kikuchi M, Nishi K, Matsumoto K, Komori H, Watanabe H, Maruyama T, **Otagiri M**. A 16 kD plasma membrane protein of mice liver parenchymal cell recognizes the peptide moiety of human serum α 1-acid glycoprotein. (ISSX 9th International Meeting, Istanbul, Turkey; 2010, 9/4-8)
 17. Kadowaki D, Anraku M, Tasaki Y, Taguchi K, Shimoishi K, Suenaga A, Watanabe H, Seo H, Hirata S, Maruyama T, **Otagiri M**. Relationship between Antioxidant and Renoprotective Activity of Olmesartan. (70th FIP World Congress of Pharmacy/Pharmaceutical Sciences, Lisbon, Portugal, 2010, 8/28-9/2)

18. Ikuta S, Chuang VTG, Ishima Y, Nakajou K, Furukawa M, Watanabe H, Maruyama T, **Otagiri M**. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of thioredoxin by fused to human serum albumin. (70th FIP World Congress of Pharmacy/Pharmaceutical Sciences, Lisbon, Portugal, 2010, 8/28-9/2)
19. Komori H, Uehara N, Nishi K, Watanabe H, Maruyama T, **Otagiri M**. Involvement of hemoglobin b-chain on plasma membrane in uptake of human α 1-acid glycoprotein into liver. (The Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, New Orleans, LA, USA; 2010, 11/14-18)
20. Maruyama T, Hirata K, Watanabe H, Maeda H, Iwao Y, Ishima Y, Katsumi H, Hashida M, **Otagiri M**. Genetically engineered mannosylated-human serum albumin as a versatile carrier for liver-selective therapeutics. (The Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, New Orleans, LA, USA; 2010, 11/14-18)

(主な国内発表)

1. 永尾 紗理, 田口 和明, 田中 遼大, 渡邊 博志, 酒井 宏水, 堀之内 宏久, 小林 紘一, **小田切 優樹**, 丸山 徹. ブレオマイシン誘発肺線維症に対する一酸化炭素付加型ヘモグロビン小胞体の有用性評価 (日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 28 日-31 日)
2. 異島 優, 原茉莉絵, 末永綾香, 甲斐俊哉, 渡邊 博志, **小田切 優樹**, 丸山徹. Poly-SNO-アルブミンによる抗癌剤耐性克服効果と機序解明 (日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 28 日-31 日)
3. 渡邊博志, 本田大輔, 宮本洋平, 野口剛, 門脇

大介, 異島 優, 小谷俊介, 中島誠, 深川雅史, **小田切 優樹**, 丸山徹. 尿毒症物質 p-クレジル硫酸の酸化ストレス誘導を介した腎障害作用 (日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 28 日-31 日)

4. 小森久和, 渡邊博志, 首藤剛, 甲斐広文, **小田切 優樹**, 丸山徹. α 1-酸性糖タンパク質による TLR4 活性化を介した CD163 発現誘導 (日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 28 日-31 日)
5. 末永綾香, 西弘二, 小森久和, 菊池真理, 上原奈緒, 福永直子, 松元一明, 渡邊博志, 中城圭介, 丸山徹, **小田切 優樹**. α 1-酸性糖タンパク質のヘモグロビン β 鎖介在性肝取り込み機構 (日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 28 日-31 日)
6. **小田切 優樹**, 蓑毛藍, 異島 優, 成底徹, 諏訪喜昭, 渡邊博志, 森岡弘志, 丸山徹. ヒト血清アルブミンドメイン II によるビリルビン尿中排泄促進作用 (日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 28 日-31 日)
7. 丸山徹, 前田仁志, 渡邊博志, 異島 優, 末永綾香, **小田切 優樹**. 急性肝障害に対するマンノース付加アルブミンを担体としたクッパー細胞選択的チオール送達の有用性評価 (日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 28 日-31 日)
8. 福田 哲也, 蓑毛 藍, 異島 優, 末永 綾香, 渡邊 博志, 森岡 弘志, **小田切 優樹**, 丸山 徹. フェージディスプレイ法を用いたアミロイド β -ヒト血清アルブミン相互作用の解析 (第 28 回 日本薬学会九州支部大会平成 23 年 12 月 10 日-12 月 11 日 福岡大学薬学部)
9. 氏平 隼人, 田口 和明, 渡邊 博志, 勝野 峻介, 新井 愛美, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠, 異島 優, **小田切 優樹**, 丸山 徹. 血小板代替

- 物 (H12 (ADP) リポソーム) の体内動態評価 (第 28 回日本薬学会九州支部大会 2011 年 12 月 10 日-12 月 11 日 福岡大学薬学部)
10. 前田 仁志、渡邊 博志、異島 優、末永 綾香、小田切 優樹、丸山 徹. マンノース付加アルブミンによるクッパ-細胞選択的チオール送達-急性肝障害に対する有用性評価- (第 28 回日本薬学会九州支部大会 2011 年 12 月 10 日-12 月 11 日 福岡大学薬学部)
 11. 村田 道哉、児玉 彬、渡邊 博志、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹. 尿毒症物質はインドキシル硫酸の生合成を促進する (第 28 回日本薬学会九州支部大会 2011 年 12 月 10 日-12 月 11 日 福岡大学薬学部)
 12. 杉森 剛志、南雲 恒平、渡邊 博志、異島 優、山田 尚之、阿部 貴弥、小田切 優樹、丸山 徹. ESI-TOF/MS を用いた透析患者由来ヒト血清アルブミンの翻訳後修飾解析 (第 28 回 日本薬学会九州支部大会 2011 年 12 月 10 日-12 月-11 日 福岡大学薬学部)
 13. 福留 一平、宮本 洋平、本田 大輔、門脇 大介、末永 綾香、渡邊 博志、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹. オルメサルタン・アゼルニジピン配合剤の抗酸化作用が動脈硬化症の進展に及ぼす影響 (第 28 回日本薬学会九州支部大会 2011 年 12 月 10 日-12 月 11 日 福岡大学薬学部)
 14. Komori H, Watanabe H, Shuto T, Kai H, Otagiri M, Maruyama T. α 1-酸性糖タンパク質による hemoglobin scavenger receptor (CD163) 発現誘導機構解析 (第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2011 年 11 月 24 日-25 日 岡山大学創立五十周年記念館)
 15. Minomo A, Ishima Y, Narisoko T, Watanabe H, Morioka H, Maruyama T, Otagiri M. フェージディスプレイ法を用いたビリルビン高捕獲型アルブミン変異体の設計と評価 第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2011 年 11 月 24 日-11 月 25 日 岡山大学創立五十周年記念館)
 16. Nagumo K, Sugimori T, Yamada N, Kubota K, Watanabe H, Ishima Y, Tanaka M, Sasaki H, Otagiri M, Maruyama T. ESI-TOF/MS を用いたシステイン付加型ヒト血清アルブミンの検出と機能相関 -慢性肝疾患の影響- (33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2011 年 11 月 24 日-11 月 25 日 岡山大学創立五十周年記念館)
 17. Yohei Miyamoto, Yasunori Iwao, Katsumi Mera, Hiroshi Watanabe, Daisuke Kadowaki, Yu Ishima, Victor Tuan Giam Chuang, Keizo Sato, Masaki Otagiri, Toru Maruyama. A uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionate accumulates in proximal tubular cells and induces cell damage through increasing oxidative stress (日本薬物動態学会 第 26 回年会 広島, 2011, 11/16-11/18)
 18. Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Kadowaki D, Otagiri M, Maruyama T. Carbon monoxide bound red blood cells prevent pharmacokinetic alteration caused by the degradation of hepatic P450 after resuscitation from hemorrhagic shock. (日本薬物動態学会第 26 回年会 2011 年 11 月 16 日-18 日 広島国際会議場)
 19. Watanabe K, Ishima Y, Watanabe H, Suenaga A, Kai T, Otagiri M, Maruyama T. ACUTE-PHASE PROTEIN ALPHA1-ACID GLYCOPROTEIN ACQUIRES ANTIBACTERIAL ACTIVITY THROUGH S-NITROSYLATION BY A NITRIC

- OXIDE-DEPENDENT MECHANISM. (日本薬物動態学会第 26 回年会 2011 年 11 月 16 日-11 月 18 日 広島国際会議場)
20. Tetsuya Fukuda, Ai Minomo, Yu Ishima, Ayaka Suenaga, Hiroshi Watanabe, **Masaki Otagiri**, Hiroshi Morioka and Toru Maruyama. IDENTIFICATION OF AMYLOID BETA PEPTIDE BINDING SITE ON HUMAN SERUM ALBUMIN (第 26 回年会 日本薬物動態学会 2011 年 11 月 16 日-11 月 18 日 広島国際会議場)
21. Hitoshi Maeda, Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, Ayaka Suenaga, **Masaki Otagiri** and Toru Maruyama. GENETICALLY ENGINEERED MANNOSYLATED-ALBUMIN WITH THIOLS, KUPFFER CELL TARGETING ANTIOXIDANT, ATTENUATED CONCANAVALIN-A INDUCED HEPATITIS IN MICE. (第 26 回年会 日本薬物動態学会 2011 年 11 月 16 日-11 月 18 日 広島国際会議場)
22. Azusa Kodama, Ryota Tanaka, Hiroshi Watanabe, Yu Ishima, **Masaki Otagiri**, Toru Maruyama. HUMAN SERUM ALBUMIN-THIOREDOXIN FUSION PROTEIN, A LONG ACTING ANTIOXIDANT, IS EFFECTIVE IN PREVENTING CONTRAST-INDUCED NEPHROPATHY (第 26 回年会 日本薬物動態学会 2011 年 11 月 16 日-11 月 18 日 広島国際会議場)
23. 氏平 隼人, 田口 和明, 渡邊 博志, 勝野 峻介, 新井 愛美, 武岡 真司, 池田 康夫, 半田 誠, **小田切 優樹**, 丸山 徹. マウス及びラットにおける血小板代替物 (H12 (ADP) リポソーム) の体内動態評価 (第 18 回日本血液代替物学会年次大会 2011 年 10 月 27 日-10 月 28 日 北海道大学)
24. 品川 拓也, 異島 優, 米重 梓二, 末永 綾香, 渡邊 博志, 丸山 徹, **小田切 優樹**. 臓器移植保存液としての S-ニトロソ化アルブミンの有用性評価 (第 18 回日本血液代替物学会年次大会 2011 年 10 月 27 日-10 月 28 日 北海道大学)
25. 異島 優, 原 茉莉絵, 末永 綾香, 甲斐 俊哉, 丸山 徹, **小田切 優樹**. Poly-SNO-アルブミンによる抗癌剤耐性克服効果 (第 27 回日本 DDS 学会学術集会 2011 年 6 月 9 日-6 月 10 日 東京大学)
26. **小田切 優樹**, 渡辺 佳織, 異島 優, 末永 綾香, 渡邊 博志, 甲斐 俊哉, 丸山 徹. 新規抗菌剤としての S-ニトロソ化 α 1-酸性糖タンパク質の可能性 (第 27 回日本 DDS 学会学術集会 2011 年 6 月 9 日-6 月 10 日 東京大学)
27. Komori H., Watanabe H., Shuto T., Maruyama T., **Otagiri M.** AGP の CD163 誘導作用に基づく新規抗炎症機序解明 (日本薬剤学会 26 年会 2011 年 5 月 29 日-31 日タワーホール船堀 東京都江戸川区)
28. 大柿滋, 田口和明, 渡邊博志, **小田切優樹**, 丸山徹. 一酸化炭素付加型赤血球はクッパー細胞を介して輸血誘発肝 P450 機能障害を保護する. 日本薬剤学会 26 年会 (2011 年 5 月 29 日-31 日)タワーホール船堀 東京都江戸川区)
29. 野口剛, 宮本洋平, 渡辺博志, **小田切優樹**, 丸山徹. 尿毒症物質 p-クレジル硫酸とインドキシル硫酸との相互作用の動態学的機序解明 (日本薬剤学会 26 年会 2011 年 5 月 29 日-31 日 タワーホール船堀 東京都江戸川区)

30. 本田大輔, 宮本洋平, 渡邊博志, 門脇大介, 小田切優樹, 丸山徹. 尿毒症物質 p-クレジル硫酸が慢性腎臓病の酸化ストレスに及ぼす影響 (日本薬剤学会 26 年会 2011 年 5 月 29 日~31 日 タワーホール船堀 東京都江戸川区)

31. Ai Minomo, Yu Ishima, Hiroshi Morioka, Toru Maruyama, Masaki Otagiri. Lys199 is involved in stereoselective interaction between 4Z,15Z-bilirubin and serum albumin (Symposium on Molecular Chirality 2011 2011 年 5 月 20 日-5 月 21 日 東京工業大学)

32. 異島 優, 原 茉莉絵, 末永 綾香, 甲斐 俊哉,

丸山 徹, 小田切 優樹. Mono-SNO-HSA と Poly-SNO-HSA による細胞内 NO 輸送機構の解明 (第 11 回日本 NO 学会学術集会 2011 年 5 月 13 日-5 月 14 日 昭和薬科大学)

G. 知的財産権の出願。登録状況 (予定を含む)

1. S-ニトロソ化 $\alpha 1$ -酸性糖タンパク質を含有する抗菌剤 / 渡辺 佳織, 異島 優, 末永 綾香, 渡邊 博志, 甲斐 俊哉, 丸山 徹, 小田切 優樹. / 特願 P 1 1 1 N 2 1 0 2 3
2. 抗癌剤増感剤 / 小田切 優樹, 異島 優, 渡邊 博志, 丸山 徹 / 特願 P 1 1 1 N 2 1 0 6 3

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臨床応用を踏まえた第一相治験計画の策定

研究分担者 高折益彦 東宝塚さとう病院 名誉院長

研究要旨

人工酸素運搬体としてのHbV（ヘモグロビン内包リポソーム）製造方法の安定性、無菌性の確立に基づき、その臨床治験をふまえ、我が国研究機関の協力を得るため、多くの施設での具体的な計画を求め、その可能性について核施設と協議した。そしてそれに対応しうる治験第一相試験計画の作成を行った。その作成にあたり特に配慮した点は（1）被験者の安全性をいかに速やかに、かつ確実に把握するか、（2）いかに少数の被験者でHbVの適合性、有効性を立証するか、（3）次に行う第2相試験が安全にかつ有効に施行できるように計画した。

A. 研究目的

HbVの臨床応用を踏まえ、その第1相治験計画を作製することを研究目的とした。

B. 研究方法

1) 我が国でHbVの臨床応用に関心を持つ臨床教室の研究者を訪ねて将来にHbVの治験第二相を実行する場合、その対象症例（疾患、病態、あるいは社会的環境条件を含む）について訊ねた。

2) それらの対象症例で第二相治験施行の場合、その基盤となる第一相治験での生理、生化学的検査を厚生労働省の副作用報告指針を中心に検討、選択した。

3) このような条件の第一相治験計画を過去に行われた各種新薬開発の過程、とくに被験者人数、施行期間を参考に検討した。

C. 研究結果

1) 上記対象臨床教室での結果を総合し、（1）外傷性出血治療のために救急外来に搬送された患者、（2）予期せざる手術性大量出血を生じ、供給血液

に不足を来した患者、（3）希釈性自己血輸血を志向する患者、（4）宗教上の信条に基づき、一般的な輸血を受け入れられない患者、を対象として第二相治験が可能であるとの結果を得た。ただ、上記（1）、（2）においてはHbV使用についてのインフォームドコンセントをいかに得るか問題があるとの指摘を受けた。

2) 第一相治験において安全性の確証を必要とする点では（1）HbVを第二相治験で使用できる使用量上限の確立、（2）基本となる循環、呼吸機能の安全性の確立であった。そしてその基本として平成4年に厚生省が提示した新薬の副作用報告を参考とすることが適切であると認めた。

3) 安全性を確保するために投与量を10mから200mlまでの単独投与を有害事象の発生のないことを順次確認しつつ施行し、その治験数は計8例をした。

4) 次の400ml投与ではそれに伴う循環血液量負荷

を避け、対象者の血液と等量のHbVの交換を6症例にて行う計画とした。

5) 第二相治験をふまえて等量HbVにその半量のヒドロキシ澱粉液を添加し、被験者の600ml、800mlの血液との交換をそれぞれ8例にて施行する計画を立案した。

D. 考察

1) HbVの最小投与量を10mlとしたのは薬物アレルギー反応が発生する場合にはきわめて少量(たとえば0.1~0.5ml)でも発生することを考慮した。また、一般に悪物アレルギー反応は注入2~3分以内に発生するため、その注入時間も20分とした。これにより、HVの注入はこの間に1.0から1.5mlにとどまることとなった。したがってこの注入量・速度は最も慎重を期したものと思われた。

2) HbVの分散媒は生理食塩水で、その2/3は注入後速やかに血管外へ流出し、HbV単独の等量交換のみでは被験者の血液量減少を来す危険性があると想定したため、600ml以上のHbVと被験者の血液交換ではヒドロキシ澱粉液を添加した。

3) 検査項目ではHbVに対するアレルギー反応を感知する項目(肺機能、動脈血酸素飽和度)をHbV単独投与群でHbV投与量が600ml以上では全身酸素供給量の指標としての中心静脈酸素飽和度、血液乳酸値を採用した。一方、HbV投与にともなうサイトカインあるいはアラキドンサン代謝物発生に関する検査は採血量の増加を考慮して回避した。

はじめに施行した諸検査からそれらの遊離、発生が疑われた場合には新たな追加試験の設定をすることとした。

E. 結論

上記臨床第1相治験計画では第1にHbVの投与量、投与方法を持って被験者の安全性の確保をし、第2に最小限の検査項目を採用してHbVに対する生体反応を知ることにも努め、第3に被験者数を最小として研究施行上での倫理性を全うした。これにより第二相試験が十分行える基礎を作ることができたと判断した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

18. H. Sakai, N. Miyagawa, H. Horinouchi, S. Takeoka, M. Takaori, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Intravenous injection of Hb-vesicles (artificial oxygen carriers) after hemodilution with a series of plasma expanders (water-soluble biopolymers) in a rat repeated hemorrhage model. *Polymers Adv. Technol.* 22, 1216-1222 (2011)

19. 高折益彦. 細胞型人工酸素運搬体治験、第1相計画. *人工血液* 19, 3-11 (2011)

H. 知的財産権の出願。登録状況(予定を含む)

該当なし

分担課題：混錬法によるヘモグロビン小胞体の効率の高い製造法の検討

研究分担者 酒井 宏水 早稲田大学 重点領域研究機構・上級研究員（研究院教授）

研究要旨

従来のHb小胞体の製造法においては、仕込みのHb溶液の回収率が必ずしも高く無いことが量産に向けての一つの課題であった。そこで、混錬法を用いるHb溶液の内包プロセスについて継続して検討した。濃厚で粘稠なHb溶液に対し、大量の脂質粉末を混合することが可能となった。その結果、50-70%の回収率でHb小胞体を製造出来る条件を見出すことができた。スケールアップを目指すべく、大型の混錬装置にて検討を進めている。

A. 緒言

リン脂質小胞体の製造方法としては、超音波照射法、有機溶媒を用いる逆相法、界面活性剤を用いて分散させた後これを透析で除去する方法などが知られている。しかし、Hbのような機能蛋白質を扱い、且つ、血管内投与を前提とした製剤の製造においては、工程中の蛋白質の変性や、残存物質の懸念があり、これらの方法は向いていない。また、一般的なリポソーム製剤と比較して大量投与を前提とする人工赤血球製剤の製造法としては、効率が極めて低い。人工赤血球の粒子ひとつの性能を表すパラメータとして、単位脂質重量に対するHb重量の比が使われる。この値が高いほど、Hbに結合した酸素を効率よく運搬できることになる。そのためには、粒子の内水相のHb濃度を出来るだけ高くすることが必要であり、要するに高濃度（例えば35-45 g/dL）のHb溶液中に複合脂質を分散させて、小胞体が形成される時にHbを濃度が高い状態で内包させることが要件となる。高濃度Hb溶液は粘度が高く、そこに脂質粉末を分散させると更に粘度が高くなる。

これをいわゆる押し出し法(Extrusion Method)によって孔径の異なるフィルタを段階的に（例えば、Millipore社製MFフィルタ、孔径 3.0 μm , 0.8 μm , 0.6 μm , 0.45 μm , 0.3 μm , 0.22 μm の順で）透過させて粒子径を調節する場合は、フィルタの交換が煩雑である上に、フィルタの目詰まりが起り易い。それを回避するために、脂質を予め水溶液中で小胞体を形成させて凍結乾燥して得られた粉末を使用する方法が知られている（Sou K, Naito Y, Endo T, Takeoka S, Tsuchida E. *Biotechnol Prog.* 2003; 19(5): 1547-1552）。しかし、水を凍結乾燥で除去する操作は極めて長時間を要し、またコストもかかり、産業化を考えた場合には効率が悪いことが課題となった。また、粒子径の小さい乾燥小胞体が混在し、これはHb溶液に分散させた後、Hbを十分に内包せずに最後まで残ってしまう場合があった。粘稠な濃厚Hb溶液に添加できる乾燥脂質の重量も攪拌効率や押し出し法の効率の面で制約を受け、せいぜい6 g/dLが上限であった(6 gの脂質を1 dLの濃厚Hb溶液に分散させること)。攪拌後に大量に発生する泡を消去するのに時間が要すること、ま

た泡が蛋白質の変性を助長すること、脂質粉末が完全に分散せずに塊になって残存することも課題であった。

また、乾燥した複合脂質粉末を粘稠な濃厚Hb溶液に分散させる方法として、プロペラ式攪拌器を用いる方法は、脂質塊が形成されることがあり結果として長時間を要すること、また脂質粉末が水和するときに発生する気泡は粘稠溶液中ではなかなか消えず、これが押し出し法におけるフィルタの通過性を低下させることや、分散しきれなかった脂質塊がフィルタ上に残り損失となることも問題であった。Hbの回収率はせいぜい20%となり、内包されなかったHbは、再度回収して再濃縮して再利用するか、あるいは廃棄せざるを得ず、極めて効率の悪いものであった。

また、粘稠なHb溶液-複合脂質分散液を、マイクロフルイダイザー法によって、高圧高速で対面に噴出させて衝突させて剪断応力を発生させ、それにより粒子径を小さくする方法が知られている (Beissinger RL, Farmer MC, Gossage JL. ASAIO Trans. 1986; 32: 58-63)。しかしこの方法では、剪断応力の調節が難しいこと、また、Hb脂質分散液を回路に通すためにある程度の流動性が必要であり、従って脂質の濃度を6 g/dL程度にまで低下させることが必要であり、結果としてHbの回収率は20%程度と低いものであった。

また、脂質粉末を予め少量の水で乳化、水和膨潤させてペーストを形成し、これをHb溶液と高速に混合・乳化することでHbを内包させる方法も知られている (特許文献；特開2009-035517号公報)。しかし、乾燥脂質を少量の水で水和させた際に既に小胞体が形成され、それがHb混合後もHbを内包することなくそのまま残る可能性があり、結果としてHbを効率よく内包できず、Hbの内包効率が低下することが予想される。

そこで本研究では、「混錬法」による人工赤血

球(ヘモグロビン小胞体)製剤の新しい製造方法を検討した。ヘモグロビンの回収率を従来よりも格段と高め、工程を簡略化し、操作時間を短縮でき、また、生体適合性を高めることもできるリン脂質小胞体(リポソーム)製剤の製造方法を提供することを目的とした。粒子ひとつひとつの酸素運搬機能を上げるには、やはり乾燥した複合脂質粉末を濃厚ヘモグロビン溶液と直接的に混合することが重要である。効率よく「多量の嵩高い乾燥状態の複合脂質粉末」と「粘稠な濃厚ヘモグロビン溶液」を混合し、濃厚ヘモグロビン溶液を小胞体に内包し、且つ粒子径を調節し、且つヘモグロビンの回収率を高めることを目的とした。

B. 研究方法と結果

複合脂質として1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC)、cholesterol, 1,5-O-dihexadecyl- N-succinyl- glutamate (DHSG)、ならびに1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine-N-Poly(oxyethylene)5000 (DSPE-PEG5000, PEG鎖の分子量5000)を、モル比で5/4/0.9/0.03となるように、合計10gをt-ブタノール1dLに溶解させ、0.5L茄子型フラスコに入れた。そしてドライアイス/メタノール混合冷媒で凍結し、凍結乾燥装置(東京理化製FD-1000)を24時間かけて行い、複合脂質粉末を得た。この粉末について、10gをテフロン製のシンキー社製の円柱状容器(外径:76mm、高さ約93mm、内壁を凹凸を加え容器上から見た時にクローバー形になっているもの)に入れ、高純度ヒトHb溶液(一酸化炭素結合-HbCO体、45 g/dL、0.4dL、pH7.4)を添加した。このときのHb(18g):脂質(10g)の重量比は、1.8:1となる。そして、内蓋をして封入し、混錬装置(自転公転攪拌器、シンキー社製、ARE-310)にて公転1500回転、自転600回転にて3分間混錬処理し、冷却に3分待ったあと、容器内の気相を完全に一酸化炭素ガスで置換して封入した。そして、再度、公転1500回転、自転600回転にて3

分混練・3分冷却する操作を繰り返し、合計30回(合計90分)の混練処理を行なった。このとき、ペーストの温度は、混練の際の剪断応力と装置からの伝熱のため40℃程度にまで上昇しており、Hbの変性を抑制するためにCO化が重要と判断された。暗赤色の粘稠で均一なペーストが得られた。脂質の塊や泡は一切認められなかった。次いで、冷却した生理食塩水0.50dLを添加し、15秒間回転させ、ペーストの粘度を低下させ、分散液とした。溶液を更に生理食塩水で二倍に希釈したあと、遠心分離(3000rpm、30分、Hitachi社製CF12RX)したところ、分散しきれていない粒子径の大きい分画の沈殿と、一部変性したHbの沈殿が見られた。上澄みの相について、超遠心分離用の遠心チューブ(230mL容器)に入れ、更に生理食塩水を満たし、50,000gにて30分間超遠心分離した(Hitachi社製CP90WX)。回転させる前の分散液および分離後の上澄みのHb濃度と体積を計測し、Hbの内包効率を計算したところ、約65%が得られた。粒子径をHORIBA製Nanoparticle analyzerを用いて計測したところ、約270nmとなった。メト化率をSoret帯のスペクトルをもとに計算し、3%以下であることを確認した。超遠心分離して得られた沈殿は、再度生理食塩水に再分散させ、Hb濃度を2.5g/dLに調節し、2dLずつ2L茄子型フラスコに入れてロータリーエバポレータにて回転させ、内部に空気を通気しながら、外部からハロゲンランプを45分間照射し、COガスを光解離させ、酸素が結合したHbに変換した。得られた溶液を再度超遠心分離にかけ、沈殿を生理食塩水に分散させ、Hb濃度を10g/dLに調節した。

C. 考察

人工赤血球の調製法として、乾燥脂質粉末を濃度高く濃厚Hb溶液に均一に分散させ、且つ粒子径を小さくして調節し、且つHbの回収率を高め、且つ操作中のHbの変性を抑制することのできる、混練操作の原理を採用する方法を考案した(図1)。例えば攪拌脱泡装置は、混練材料(少量の液体と大

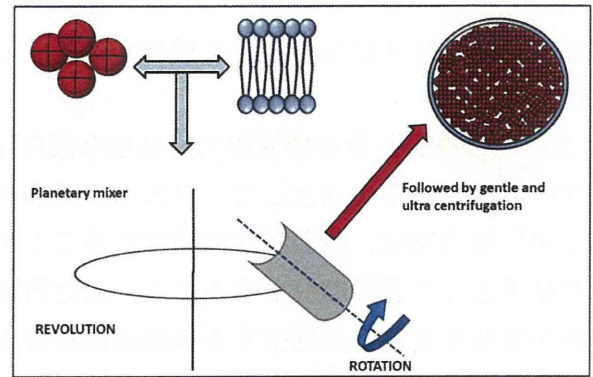


図1. 混練法によるHb小胞体の調製法の概要。容器が遊星運動(自転・公転)をすることにより、内容物の攪拌ができる。高濃度での混合が可能となる。

量の粉末を混ぜたペースト状の材料)を作製するものとして使われているが、本研究では、この攪拌脱泡装置は単に混ぜるという機能以外の機能を有することを見出し、また、この装置は操作を効率よく行なうことができる装置であるという点に着眼した。この装置は基本的に、混練させたい試料を封入した円柱型容器を自転方向と公転方向に同時に回転させて遊星運動させることによって、容器内を均一に攪拌させ、また公転による遠心力で脱泡を行なうことができるものであるが、完全な閉鎖容器内での混練により、無菌的雰囲気維持が可能になる。これによって、この装置を製造工程の一部に用いれば、Hb溶液に対して従来よりも大量の脂質粉末を添加・分散でき、Hb小胞体分散液の調製を効率よく行なうことができる。また、単に脂質を分散させるだけでなく、脂質分子が自発的に集合形成する小胞体の粒子径を調節することができる。また、強い剪断応力が発生するので、予めHbを鉄二価の状態に安定にさせるため、一酸化炭素を結合させておくことが重要である。従来、一酸化炭素を結合させることにより、Hb精製工程における加熱処理によるウイルス不活化を可能にする技術、一酸化炭素を結合したままHb小胞体を投与することにより、細胞保護効果を得ることのできる輸液製剤などは知られているが、混練操作中における変性の防止法として利用するのは本研

究が初めてである。

従来、この混錬装置（攪拌脱泡装置）の応用例としては、金／銀／カーボンペースト等の導電／抵抗材用途、ガラス／セラミックペースト等の封止／絶縁材用途、エポキシ樹脂等のシール材／接着剤用途、LED蛍光剤・シリコン樹脂等の成型材用途、インキ／塗料／顔料等、各種色材の混合用途、歯科材料／医薬品軟膏材料／化粧品基材等の製造用途、精密部品等の研磨用途等、食品分野ではマヨネーズなど本来混ざり合わない油と水の乳化などへの利用が知られていたが、本発明のような脂質分子を分散させて分子集合体を形成させることや、静注用リポソーム製剤の調製に使用する例は無かった。従来のいわゆるリポソーム製剤においては、そこまでの高濃度溶液の内

D. 結論

従来とは全く異なるHb溶液の内包プロセスを採用することにより、Hbの回収率が50-70%、平均粒子径は200 - 300 nmとなるHb小胞体分散液を短時間で得る方法を考案した。混合脂質粉末は、有機溶媒に溶解させてから減圧留去して得られる通常の脂質粉末で対応が可能であった。従来の、水中に空の小胞体を形成させて凍結乾燥によって得られる小胞体粉末を用いる必要性は無いと考えられた。スケールアップを目指すべく、現在、混錬装置はARE-310より一段階大型のARE-500にて検討を進めている。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. H. Sakai, N. Miyagawa, H. Horinouchi, S. Takeoka, M. Takaori, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Intravenous injection of Hb-vesicles (artificial oxygen carriers) after hemodilution with a series of plasma expanders (water-soluble biopolymers) in a rat repeated hemorrhage model. *Polymers Adv. Technol.* 22, 1216-1222 (2011)

2. K. Taguchi, S. Ogaki, H. Watanabe, D. Kadowaki, H. Sakai, K. Kobayashi, H. Horinouchi, T. Maruyama, M. Otagiri. Fluid resuscitation with hemoglobin vesicles prevents *E. coli* growth via complement activation in a hemorrhagic shock rat model. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 337, 201-208 (2011)

3. D. Takahashi, H. Azuma, H. Sakai, K. Sou, D. Wakita, H. Abe, M. Fujihara, H. Horinouchi, K. Kobayashi, T. Nishimura, H. Ikeda. Phagocytosis of liposome particles by rat splenic immature monocytes makes them transiently and highly immunosuppressive in ex vivo culture condition. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 337, 42-49 (2011).

4. H. Sakai, K. Sou, H. Horinouchi, E. Tsuchida, K. Kobayashi. Hemoglobin vesicle as an effective blood substitute and its removal from circulating blood. *Artif. Organs* 36, 202-209 (2012)

5. M. Yamamoto, H. Horinouchi, Y. Seishi, N. Sato, M. Itoh, K. Kobayashi, H. Sakai, Fluid resuscitation of hemorrhagic shock with Hemoglobin vesicles in Beagle dogs: pilot study. *Artif. Cells Blood Substitutes Biotechnol.* 40, 179-195 (2012)

6. A.G. Tsai, M. Intaglietta, H. Sakai, E. Delpy, C.D. la Rochelle, M. Rousselot, F. Zal. Microcirculation and NO-CO studies of a natural extracellular hemoglobin developed for an oxygen therapeutic carrier. *Current Drug Discovery Technol.* (in press)

7. Y. Seishi, H. Horinouchi, H. Sakai, K. Kobayashi. Effect of the cellular-type artificial oxygen carrier Hb-vesicle as a resuscitative fluid for pre-hospital treatment: Experiments in a rat uncontrolled