

対応指針等に関する調査研究、平成 24 年度・
防衛医学研究センター発表会・防衛医科大学校、
埼玉県所沢、平成 24 年 10 月 3 日

4)藤田真敬、山本頼綱、立花正一、金谷泰宏、
緒方克彦、航空機の除染と患者空輸に関する国
際指針、第 58 回日本宇宙航空環境医学会、愛
知県豊橋、2012 年 11 月 16 日

5)藤田真敬、立花正一、田村信介、緒方克彦、
患者搬送基準とその考え方、
第 6 回宇宙航空医学認定医セミナー、第 58 回
日本宇宙航空環境医学会、愛知県豊橋、2012
年 11 月 17 日

6)藤田真敬、齋藤大蔵、石原雅之、徳野慎一、
金谷泰宏、大災害、テロ対応に関する国際指針、
第 18 回日本集団災害医学会総会、兵庫県神戸、
平成 25 年 1 月 18 日

7)染田英利、徳野慎一、藤田真敬、西山靖将、
柳川練平、金谷泰宏、妻鳥元太郎、福島第一原
発事故下における震災犠牲者の遺体取り扱い
についての検証、第 18 回日本集団災害医学会
総会、兵庫県神戸、平成 25 年 1 月 18 日

8)藤田真敬、米国の CBRNE 災害における医療
対応指針等に関する調査研究、平成 24 年度・
防衛医学研究センター研究成果発表会、防衛省、
東京都市ヶ谷、平成 25 年 2 月 19 日（報告書提
出時予定）

4.その他

1)藤田真敬、防衛医大准教授 CBRNE 対処パン
フ作成、朝雲新聞 平成 24 年 4 月 5 日
[http://www.asagumo-news.com/news/201204/
120405/12040515.html](http://www.asagumo-news.com/news/201204/120405/12040515.html)

(平成 24 年 12 月 31 日 閲覧)

2)藤田真敬、重症患者空輸と搭載医療機器の許
容基準-我が国の制度改善への提言、防衛医科
大学校・第 3 回患者空輸研究会、防衛医科大学
校、埼玉県所沢、平成 25 年 2 月 22 日（報告書
提出時予定）

1.特許取得

該当事項無し。

2.実用新案登録

該当事項無し。

3.その他

添付資料：学会発表スライド、発表論文別刷り
一式、第 83 回米国航空宇宙医学会 東日本大
震災支援米軍発表資料一式

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

該当事項無し。

放射性物質及び化学剤災害に対する除染システムの研究・開発動向

研究分担者：石原雅之 防衛医科大学校 防衛医学研究センター 医療工学研究部門

研究協力者：井上忠雄 NPO 法人 NBCR 対策推進機構

研究要旨

有害物質の除染に関し、個人除染とその医療体制の整備以外に本格的技術検討は進められておらず、環境除染という大きな問題が残されている。本分担研究は、災害に対する除染技術と動向について調査・研究を行い、現場の汚染物である放射性物質或いは化学剤に対して、毒性や環境への負荷が少なく、短時間で効果を発揮し、経済的であり、選択的に解毒・分解・除去し、現場での危険な汚染を消失させる効果的な除染材料・機器を選択適用した有効な除染システムを開発することである。

1 放射性物質 (N) 剤除染

1-1 放射性物質除染の現状

放射線は5感で感じることができず、被曝した後症状がすぐに現われるものではなく、もし症状が出たとしてもその診断は困難である。さらに放射線に対する国民の不安は大きく、放射線物質がテロで使用されたり、放射能漏洩事故が発生した場合の社会的影響は計り知れない。放射性物質の除染の目的は、吸入と体内沈着の低減、2次汚染防止、被曝線量の減少、汚染環境の改善である。化学物質であれば加水分解や酸化反応による無毒化、微生物であれば殺菌、除菌または抗体やワクチンによる治療が可能であるが、放射性物質はそのような手段がない。

放射性物質の汚染直後は、容易に水による洗浄で除染できる場合が多い、時間の経過とともに除染が困難となってくる。まず湿式除染(乾燥させない状態での除染)を心がけ汚染物を空气中に舞い上がらせないようにしながら

ら、濾紙や布でふき取ってから適切な除染剤を使用する。線維や皮膚等の軽い汚染では粉末状中性洗剤を使用し、汚染度の高い時は、Na-EDTA やクエン酸等キレート形成剤を含んだ粉末状中性洗剤で洗浄する。これらの場合も、使用した除染剤や排水は、放射性廃棄物となるので、二次汚染を引き起こさないよう注意する必要がある。

環境中にある放射性物質による被ばく線量を軽減するためには、放射性物質に土を被せる等で遮蔽することやヒトから遠ざけることも有効であるが、生活環境の改善という意味では何ら解決をもたらさない。放射性物質で汚染された表土の削り取り、落ち葉等の除去、建物やコンクリート表面等の洗浄等により放射性物質を除去し、そこで発生した汚染水や汚泥から放射性物質を分離、濃縮する技術が必要不可欠となる。

放射性物質の除去については、米国における Microbial Genome Program の中で放射能耐

性菌 (Deinococcus radiodurans) を用いた核廃棄物の無害化の検討が進められていたが (Nature Biotechnology 18, 85-90, 2000)、その後その直接的有効性の学術的報告は皆無である。本稿では、微生物を用いた放射性物質の分離・濃縮技術である「膜分離活性汚泥式洗浄・排水処理システムの放射性物質除染への適用」について紹介を行っている。他方、ヒ素、クロム、水銀、鉛、ダイオキシン、農薬、環境ホルモン等の環境汚染物質の浄化については、微生物の大きな役割が期待でき、様々な研究が進んでいる。

1-2 最近の放射性物質除染剤の動向

実際に広く運用されている除染方法に加えて、民間や米軍などで開発された除染剤として、発生した汚染水や汚泥から放射性物質を分離、濃縮するための新しい商品や研究開発中の有益・有望技術について紹介する。

(1) デコンジェル (DECONGEL)

デコンジェルは中性で無臭の界面活性剤や溶性キレート剤を含んだポリマー・ハイドロジェルで、放射性汚染物質を密着・吸着・リフトアップし、その中に封入し除去することができる。ガラス、木材、コンクリート、金属表面等様々な素材表面に使用が可能であり、土壌等の複雑な形状にはスプレー剤としての使用もできる。現在米国、カナダ、イギリスをはじめとした諸外国で放射性物質の除染剤として利用されており、日本においても入手できる。

(2) 界面活性剤 (カネカ天然界面活性剤)

カネカ天然界面活性剤は、道路や建物の除染において、希釈水溶液として使用することで、汚染物質を飛散・拡散させることなく効率的に回収するのに有効である。本剤は狭

い隙間にも容易に入り込み汚染物を吸着・浮上させて分離し、その汚染水から容易に凝集・沈殿処理ができる。本界面活性剤は天然材料を使用しており、生分解性も高く環境にやさしいことが強調されている。

(3) セシウム除染水分離剤

放射性物質の除染について、湿式除染に使用した洗浄水 (除染水) の処理の問題があり、除染の現場で除染水を効率的に処理することが求められている。本剤は汚染水や除染水からセシウムなど金属放射性物質等を吸着・分離させる凝集沈殿剤であり、液体から半固体にすることができる。すなわち生じた廃棄汚染水の体積を減少させ、放射性物質を濃縮させることで、その後の濃縮された放射性物質の取り扱い・管理を容易にする。

(4) 微生物を用いた膜分離活性汚泥式洗浄・排水処理システムの放射性物質除染への適用

化学剤、農薬、放射性物質、ダイオキシン、砒素、有機金属、環境ホルモン等、汚染が広がっている。これらは単なる安全保障上の要請だけではなく、地球環境の問題であり、一刻も早い適切な対策が必要である。ここで紹介する膜分離活性汚泥式洗浄排水処理設備は、自然界における自浄作用を利用することにより、省ランニングコストを実現したもので、タンクとポンプを主体とする構成で加圧、昇温の必要もなく安全かつ簡便な設備となっている。二次廃棄物発生量も少なく、水質浄化、毒物及び放射性物質除去性能を有している。活性汚泥は、主としてバクテリア、真菌などから構成されている微生物群集であり、活性汚泥法とはこれら微生物群集の代謝機能を利用して排水を浄化する方法である。本システムでは浄化槽内に分離膜を設置し、従来の標

準活性汚泥法の浄化槽と沈降分離槽を一つの膜分離浄化槽に統合しており、装置のコンパクト化と膜を通してろ過するため、曝気槽内の汚泥濃度を高く維持することが可能となり、

処理能力も高い(図5)。さらに本システムの主な二次廃棄物発生源は有機物を分解することによる活性汚泥の増加分のみであり、二次廃棄物発生量の低減も実現している。

市販されている放射性物質除染剤の特性と機能

除染剤 商品名	特 徴	機 能				開発状況
		N 剤	B 剤	C 剤	環境 影響	
ディコンジェル (Deco n Gel)	界面活性剤や溶性キレート剤を含んだポリマー・ハイドロジェルである。	◎	△	△	○	民間開発市販品で、諸外国で広く使われ、日本で入手できる。
界面活性剤 (カネカ天然界面活性剤)	天然物質に界面活性剤を結合させたもので、放射性物質を吸着・濃縮回収する。	◎	△	△	◎	民間開発市販品で、原発事故の除染現場に本格供給が開始された。
セシウム除染水分離剤	除染水から、セシウムなどの放射性物質が吸着されている懸濁成分を分離・凝集剤である。	◎	×	△	○	民間開発市販品で、原発事故の除染現場に本格供給が開始された。
膜分離活性汚泥式洗浄・排水処理システム	自然界における自浄作用を利用した安全かつ簡便な設備であり、放射性物質を濃縮回収する。	◎	×	×	○	民間開発システムで、原発事故関連の除染でも適用が開始された。

2 化学 (C) 剤除染

2-1 化学剤除染の現状

化学剤除染とは、問題となる部位・場所に化学剤が存在する場合に、何らかの方法で化学剤が人体に影響を及ぼさない程度、できれ

ば存在しない状態にまで減少させることである。除染には物理的除染と化学的除染があり、地域除染、装備品等の除染、個人除染、さらに曝露した皮膚及び創傷の除染がある。

物理的除染に大量の水洗いによる除去や洗浄、濃縮等による処理を含み、共通する利点

は非特異的であることで、化学剤の構造に係らずみな同等に効果を示す。また化学剤の無毒化には、最も確実な焼却処理法と湿式化学反応を用いた中和処理法があるとされています。しかし焼却処理法は環境に及ぼす影響が大きく、状況に応じた併用が必要となる。他方化学的除染には「酸化」と「加水分解」の2種類の化学反応が利用されている。マスタード (HD) や V 剤 (VX) は分子内に硫黄を有し、酸化反応で無毒化される。また、VX、タブン (GA)、サリン (GB)、ソマン (GD) 等の神経剤は分子内にリンを有し、この部位で加水分解による無毒化が可能である。このような理由で化学剤の無毒化剤は、酸化及び加水分解の両者の効果を合わせ持つようにデザインする必要がある。

アルカリ性にした次亜塩素酸塩水溶液は、現時点で酸化と加水分解性を併せ持つ優れた化学剤の除染剤として世界中で採用されている。米軍においては、0.5%の次亜塩素酸ナトリウム又は次亜塩素酸カルシウムを皮膚の除染、5%のものは装備品等の除染に使用されている。次亜塩素酸塩水溶液は、皮膚又は外傷部のみに使用可能で、眼球や腹腔内や胸腔内等内用に使用することはできない。さらに次亜塩素酸塩は毒性が強く、また溶解や洗浄に大量の水を必要とするため、本剤を大量に用いることは環境に与える影響やそのコストパフォーマンスも考慮する必要がある。また洗い流した残存化学剤や大量の次亜塩素酸塩溶液の排水を既存の排水溝に垂れ流すことは許されず、洗浄排水処理の問題が発生する。

化学剤の除染については、除染の効果のための評価法を構築する必要がある。除染が確実に行なわれたかどうかの確認のためには化学剤検知・分析法にある。部隊隊員の臭覚や

小鳥(カナリア)等による有害化学物質の簡易検知や検知紙の適用から、現場検知器としては、初動対処部隊が所持し移動しながら検知する「小型携帯型」、現場で固定して検知する「可搬型」、設置場所に固定して連続モニタリングを目的とする「設置型」に区分される。化学剤検知のため現場で使用できる「小型携帯型」としての簡易現場検知資器材例を下記に示す。さらに設置型や携帯型を組み合わせ、化学剤・毒素の一斉現場検知システムの開発が望まれる。適切な手段で除染が実施されたなら、負傷者が汚染された状態で病院等へ搬入される可能性は極めて低くなる。また医療者や周囲の人間が危険に曝露する可能性も一層激減する。

2-2 最近の化学除染剤の動向

実際に広く運用されている除染方法に加えて、民間や米軍などで開発された除染剤、研究開発中で論文などに発表されている有益・有望技術について紹介する。

(1) ハイパー・イオン水 (ハルサ液: ワールド・エコロジー(株))、(総代理店、ファイン・クレスト(株))

すでに市販されているハイパーイオン水として、ハサル液 (High Acid Special Alkali Liquid) ハルサ液は、氷山底層水から生まれた濃縮強酸性 (pH 0.5 以下) と、濃縮強アルカリ性 (pH 13.5 以上) の2種類の電解質イオン水である。安全で安定性が高く殺菌、消臭、化学物質分解、腐敗防止、洗浄作用が見込まれており、両者とのほぼ同じレベルの抗菌・抗真菌活性が認められている。抗菌・抗カビ活性は強酸性イオン水のほうが強く、化学物質の加水分解力はアルカリ性イオン水がより強いことが見出されている。

(2) EasyDECON™DF200 (INTELAGARD Inc.)

EasyDECON™DF200 は、界面活性剤、アミン、酸化剤で構成される水溶性の除染剤で、生物化学剤及び毒性物質を迅速に無毒化できるといわれ、毒性や刺激性が少なく、自然分解されることから、大量に使用しても環境には大きな影響を与えないと言われている。あらゆる金属表面での使用が可能で泡沫剤、液体スプレー、及び噴霧剤として使用できる。本剤はサリン、VX、マスタード、ホスゲンを有効に無力化すると言われ、炭疽菌を始めとした生物剤についても増殖を完全に抑制することが出来るとされる。本剤はすでに商品化され、米国の対テロ分野を担う各機関に配備されている。

(3) FAST-ACT (NanoScale Materials, Inc.) (総代理店、ファースト・ブルーム(株))

FAST-ACT は、米国で開発された有害化学物質処理剤で、酸化チタン及び酸化マグネシウムを原料とし、無毒性、速効反応性のナノ材料配合製品であり、広い範囲の有害化学薬品を無害化するのに有効で、化学剤も無力化する能力があるとされている。本剤もすでに商品化され、米国の対テロ分野を担う各機関や毒物を扱う事業所に配備されている。

(4) 酸化チタンナノ粒子を用いた光触媒技術 (ギアタイト)

酸化チタンナノ粒子をアパタイトに包埋させた除染剤で、ギアタイトという商品名で国内でも販売がスタートした。わが国の得意とする基盤技術である光触媒技術を用いて、水や酸素と反応し、活性酸素を発生させて有毒物質を酸化無毒化するとされる。ギアタイトは、毒性は低く、比較的安価である酸化チタンナノ粒子を光触媒素材として使用し、化学剤除染システムへの適用が始まっている。こ

れらの技術は、現場の活用する資機材(防護服・防護マスク等)に適用して、自然除染作用を付加させ、より軽量・安全で高性能な装備品結びついていく。加えて、現場で紫外線を照射する条件下で生物化学剤を効率よく除去するシステムを設計し、救護所等で用いる空気清浄装置、自走式除染ロボットなどの試作が行われている。

発表文献 (平成 24 年度)

1. 石原雅之、岸本聡子、中村伸吾、森康貴、藤田真敬、服部秀美、田中良弘、金谷泰宏. 災害救急医療のためのバイオナノテクノロジーの展開. 防衛医大誌、印刷中 (平成 25 年 3 月号掲載予定).
2. Vinh Quang Nguyen, **Masayuki Ishihara**, Yasutaka Mori, Shingo Nakamura, Satoko Kishimoto, Hidemi Hattori, Masanori Fujita, **Yasuhiro Kanatani**, Takeshi Ono, Yasuhiro Miyahira, Takemi Matsui. Preparation of size-controlled silver nanoparticles and chitin-based composites and their anti-microbial activities. Journal of Nanomaterials, in press.
3. Yasutaka Mori, Takeshi Ono, Yasushi Miyahira, Vinh Quang Nguyen, Takemi Matsui. **Masayuki Ishihara**. Antiviral Activity of Silver Nanoparticle/Chitosan Composites against H1N1 Influenza A Virus. Nanoscale Research Letters, 8:93, DOI: 10.1186/1556-276X-8-93, 2013.
4. Satoko Kishimoto, **Masayuki Ishihara**, Shingo Nakamura, Megumi Takikawa, Masanori Fujita, Yuki Sumi, Tomoharu Kiyosawa, Toshinori Sato, **Yasuhiro Kanatani**. Fragmin/protamine microparticles to adsorb and protect HGF and to function as local HGF carrier in vivo. Acta Biomaterialia, 9, 4763-4770, 2013.

5. 藤田真敬、齋藤大蔵、石原雅之、石原美弥、 害における医療戦略. 防衛医大誌、37、
立花正一、金谷泰宏. 米国の化学、放射線災 172-183, 2012.

市販されている化学除染剤の特性と機能

除染剤 商品名	特 徴	機 能				開発状況
		N 剤	B 剤	C 剤	環境 影響	
次亜塩素酸・ 酢酸・水	加水分解と酸化分 解の機能を有し、化 学剤の無毒化が可 能である。	×	○	酸化 ◎ 加水分解 ◎	×	民間や家庭でも 広く簡便に製造 できる。
ハイパー イオン水 (ハルサ液)	強アルカリ水 (pH > 13.5)	×	○	酸化 × 加水分解 ○	◎	民間開発市販品 で、化学剤に対 して加水分解活 性を有する。
	強酸性水 (pH < 0.5)	×	○	酸化 × 加水分解 ○	◎	
EasyDECON® DF200	界面活性剤、アミ ン、酸化剤で構成さ れる水溶性の除染 剤である。	×	△	酸化 ○ 加水分解 ○	△	米国サンディア 研究所で開発さ れ、米軍でも採 用されている。
FAST-ACT	酸化チタン及び酸 化マグネシウムを 原料とし、有害化学 薬品を無害化する。	×	△	酸化 ○ 加水分解 ○	△	民間開発市販品 で、米国では広 く使われ、日本 で入手できる。
酸化チタンナノ 粒子/アパタイ ト複合体	酸化チタンナノ粒 子をアパタイトに 包含させた除染剤 である。	×	△	酸化 ○ 加水分解 ○	△	産総研からの開 発品ですでに商 品化され、入手 できる。

天然痘対処を参考にした CBRNE テロ対策

研究分担者：西山靖将 防衛医科大学校 防衛医学講座

研究要旨

文献等を参考にして世界保健機構の天然痘撲滅プログラムや、サリン事件を受けた国内の特殊テロ対策について調査を行い、国際軍事医学会議で発表し意見交換を実施した。自治体や各事業者の連携を今後も更に発展させなければならない。

A. 研究目的

本研究班で扱う範囲は、バイオテロを除いた CBRNE テロである。しかしながら、有史以来、人類を苦しめた天然痘の脅威に対して、種痘という予防手段で撲滅した成果を振り返ることは、今後のテロ対策上有用である。そこで、本研究では、優れた痘瘡ワクチンを用いた公衆衛生上の取り組みを明らかにして今後のテロ対策に役立てることを目的とした。

B. 研究方法

主任研究者らの既報やその他の関係文献を元に、海外と比較しながら国産ワクチンの有効性・安全性を調査した。また、取りまとめた内容を国際軍事医学会議のシンポジウムで発表して国外の関係者と意見交換を行った。

（倫理面への配慮）

調査研究のため該当事項なし。調査引用した資料などは全て公開済みである。

C. 研究結果

諸文献の調査から、わが国でも天然痘が1千年以上前から流行していたこと、そして英国のエドワード・ジェンナーによる牛痘ワクチン発明より早期に人痘ワクチンが試みられていたことが判明した。明治から昭和にかけての天然痘まん延の防止のために様々な公衆衛生上の取り組みがなされるとともに、

予防接種の基礎的な医学研究が蓄積され、高い安全性の国産ワクチン開発へ発展した。また、天然痘のような生体への影響の強い感染症はコミュニティあげての対策が必要である。わが国は地下鉄サリン事件以降、CBRNE テロを想定した様々な教育訓練が国一自治体の各レベルで行われている。

D. 考察

テロと災害や事故との鑑別は容易ではない。しかしながら CBRNE テロリズムのそれぞれの特性を掌握しつつ、共通する基本的な対処要領を、最新の知見を踏まえつつ改訂していく必要がある。特に天然痘対策は微生物学的知識もさることながら、運用面でも教訓にすべきことは多いと思われる。

E. 結論

諸外国の危機管理関係者からは、自治体や民間事業者との合同訓練を防衛省・自衛隊が支援する取り組みに関心が集まり、今後、特にわが国の取り組みはテロ勃発が懸念される諸国での対応モデルとして寄与できる可能性が示唆された。

[参考文献]

Yasuhiro Kanatani et al. Clinical and Immunological Response to Attenuated Tissue-Cultured Smallpox vaccine LC16m8. JAMA. 2009;301(10):1025-1033.

Yasuhiro Kanatani et al. Serological responses in humans to the smallpox vaccine LC16m8. Journal of General Virology. 2011;92:2405-2410.

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表 (2012/4/1~2013/3/31 発表)

1. 論文発表

Yasumasa Nishiyama. Countermeasures for CBRNE terrorism in Japan. International Review of the Armed Forces Medical Services. 2013 Mar accepted. In press.

2. 学会発表

Yasumasa Nishiyama, Yasuhiro Kanatani. Countermeasure by LC16m8 immunization against

smallpox bioterrorism.

2nd International Congress of Military Medicine. Bangkok, Thailand. 29, November, 2012.

(国際軍事医学会議、バンコク、2012年11月29日)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当事項なし

2. 実用新案登録

該当事項なし

3. その他

該当事項

福島第一原発事故下における震災犠牲者の遺体取扱いについての検証

研究分担者/研究協力者：染田 英利 防衛医科大学校

研究要旨

本研究では今後の CBRNE 災害対処計画の改善を目的とし、東日本大震災での福島県における遺体取扱いに関して検証し教訓の抽出をおこなった。検討の結果、今後の災害対処計画では、①大量遺体の発生と NBC 汚染遺体の発生という複合災害（事態）の想定、②汚染が認められる場合でも遺体のもつ特殊性に配慮した対処、③N 事案におけるゾーニング設定の手順の明確化等について考慮す

A. 研究目的

東日本大震災での福島県における震災犠牲者の収容と除染作業は、放射性物質による汚染下における多数遺体への対応という極めて稀な事例であった。

本研究の目的は、本事例を検証し教訓を抽出し、今後の CBRNE 災害対処計画の改善の資とすることである。

B. 研究方法

震災前後に作成された原子力災害や CBRNE テロ対策に関する各種対応計画・指針等の内容と、実際の福島における放射性物質汚染下での遺体関連業務の実施状況について比較検討を行った。

検証する対応計画等としては、災害基本法に基づく防災基本計画、厚労省、警察庁、消防庁、防衛省（以下、「関係省庁」と表記）の防災業務計画、福島県地域防災計画及び国民保護法に基づく関係省庁の国民保護計画、福島県の国民保護に関する計画、福島県NBC災害等対処現地関連機関連携指針を対象とした。

震災後に示されたものとしては、厚労省生活衛生課長通知(H23.3.31)「東京電力福島第一原子力発電所災害にかかわる避難指示区域内の御遺体の取り扱いについて」（以下「厚労省通知」と表記）を対象とした。

実際の遺体収容と除染活動状況に関しては、報道等の資料及び遺体関連のサーベイを担当した診療放射線技師、検死活動に協力した歯科医師等からの当時の状況に関する聞き取りにより検証を行った。

（倫理面への配慮）

本研究はヒトを対象としていない。

C. 研究結果

1 対処計画等の状況

各種災害対処計画における遺体の取扱いに関する事項について検証をおこなったところ、関係省庁、自治体がそれぞれの役割分担に従い、各計画が全体として、遺体取扱い全般を網羅するように整備されているものの、原発災害やテロ攻撃等における放射

性物質汚染遺体の取扱いを対象とした分野では、被災民や物体、施設の除染が規定されているのみで、遺体に関する規定はほとんどみられなかった。

また、NBC 災害の想定に関して、一般的に化学剤(C)、生物剤(B)に比して放射性物質(N)汚染対処についての想定が少ないことが認められた。

上記対処計画等の何れにおいても、放射性物質による汚染の認められる遺体への対処に関する具体的規定がないことから、本事例では、厚労省通知により、放射性物質の除染の基準(表面線量 10 万 cpm 以上あるいは 1 m 空間線量 10 μ Sv/h 以上)と方法(拭き取り)が示された。

2 ゾーニングと遺体安置所の設置

福島第一原発が所在する福島県警双葉署管内では NBC 災害対処の原則に従い、本事例では 20 km 圏内避難指示区域をホットゾーン、30 km 圏をウォームゾーンとして、その周辺部(浪江町津島中学校)に遺体安置所を設置した。しかしながら、空間線量測定の結果、空間線量屋外 16.8 μ Sv/h、除染テント内 8.8 μ Sv/h と、同遺体安置所は高線量地域に該当することが後日判明し、作業従事者への被ばくの恐れや除染効果の評価が困難であることから、同安置所は 3 日間で閉鎖され、後方の相馬署管内遺体安置所へ統合されることとなった。

3 除染方法とその効果

実際には、双葉署管内で収容された遺体の除染は、収容時に表面線量を計測し、水槽で一次除染を行った後、30 km 圏外へ搬出し遺体安置所収容時に再度表面線量を計測し、水洗浄行い基準値(10,000cpm 以下)になるまで二次除染を繰り返すという手順で行われた。

除染の効果としては、1 次除染で見発時線量の値(300~1600cpm)に関わらず 300 cpm 以下まで表面線量を下げることができており、さらに 2 次除染で更にその半分以上に下げられている。水槽および水流による全身洗浄は有効であったといえる。

D. 考察

震災前の対処計画等では、一般災害による大量遺

体の発生と、原発災害やNBC災害による汚染遺体の発生は別個のものとして想定していた。このため、2つの事象が同時に発生した本事例の対応では不備を生じる結果となったといえる。

遺体に汚染が認められる場合であっても、人道的立場からも、遺族感情への配慮の点からも、単なる汚染物体としての扱いではなく、尊厳ある特別な対応が求められることが認められた。

双葉署遺体安置所の事例では、設置当初線量が高いことはある程度把握されていたものの、この場所に設置された理由としては、警察署所轄地域内での対応を優先したこと、30km圏外への遺体の持ち出しによる汚染拡大を懸念する住民感情に配慮したこと等が理由として考えられる。この混乱の背景には、ゾーニングを行う段階で風向き等の汚染物質の拡散に影響を与える情報の入手や、事前の汚染状況に関する確認評価を十分に行えなかったことがあったと考えられる。

今後、対応計画では放射性物質汚染災害でのゾーニング設定に関してSPEEDI等の拡散予測情報とモニタリングの情報を加える等の手順を明確にしておくべきと考える。

除染方法とその効果について本事例では、厚労省通知により遺体の放射性物質汚染に関して拭き取りによる除染が推奨されたが、遺体が腐敗している場合には水洗による複数回除染が現実的且つ効果的であることが判明した。

今後のマニュアル等で示す除染方法のあり方についての参考とすべきであると考ええる。

E. 結論

今後の対応計画等の改定に際しては、複合災害（事態）における遺体関連業務（収容、除染、検死等）について想定すべきである。この際遺体の特殊性を考慮した対応が求められる。放射性物質汚染事案対応に関する事項（特にゾーニング）を充実すべきである。

F. 健康情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 東日本大震災犠牲者の身元確認作業について-福島県相馬市および南相馬市における事例検討-, 染田英利、板橋仁、菅野明彦, 日本集団災害医学会誌巻17号P200-206, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

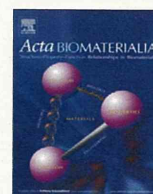
該当なし

バイオテロ以外のCBRNEテロ対策に対する効果的な対策の検証と国際連携ネットワークの活用に関する研究【総括・分担用】

研究成果（雑誌）の刊行に関する一覧

（平成24年度：2012年4月1日～2013年3月31日迄、予定を含む）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年 ※H24年度	GRANTへの 謝辞の有無
Satoko Kishimoto, Masayuki Ishihara, Shingo Nakamura, Megumi Takikawa, Masanori Fujita, Yuki Sumi, Tomoharu Kiyosawa, Toshinori Sato, Yasuhiro Kanatani.	Fragmin/protamine microparticles to adsorb and protect HGF and to function as local HGF carrier in vivo.	Acta Biomaterialia	9	P4763-4770	2013	有
Vinh Quang Nguyen, Masayuki Ishihara, Yasutaka Mori, Shingo Nakamura, Satoko Kishimoto, Hidemi Hattori, Masanori Fujita, Yasuhiro Kanatani, 6 Takeshi Ono, Yasushi Miyahira, and Takemi Matsui	Preparation of Size-Controlled Silver Nanoparticles and Chitin-Based Composites and Their Antimicrobial	Journal of Nanomaterials	Volume 2013	Article ID 693486	2013	有
藤田真敬、齋藤大蔵、石原雅之、石原美弥、立花正一、金谷泰宏	米国の化学、放射線災害における医療戦略	防衛医科大学校雑誌	37(3)	P172-183	2012	有
藤田真敬、櫛引俊宏、石原美弥	これからのEMC	月刊EMC	No. 297	P65	2013	無
染田英利、板橋仁、菅野明彦	東日本大震災犠牲者の身元確認作業について-福島県相馬市および南相馬市における事例検討-	日本集団災害医学会誌	巻17号	P200-206	2012	無



Fragmin/protamine microparticles to adsorb and protect HGF and to function as local HGF carriers in vivo

Satoko Kishimoto^{a,b,c}, Masayuki Ishihara^{a,*}, Shingo Nakamura^d, Masanori Fujita^a, Megumi Takikawa^e, Yuki Sumi^e, Tomoharu Kiyosawa^e, Toshinori Sato^c, Yasuhiro Kanatani^f

^aResearch Institute, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan

^bJapan Society for the Promotion of Science, Chiyoda-Ku, Tokyo 102-8472, Japan

^cDepartment of Biosciences and Informatics, School of Fundamental Science and Technology, Keio University, 3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-Ku, Yokohama-Shi, Kanagawa 223-8522, Japan

^dDepartment of Surgery, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan

^eDepartment of Plastic and Reconstructive Surgery, National Defense Medical College, 3-2 Namiki, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan

^fDepartment of Health Crisis Management, National Institute of Public Health, Wako, Saitama 351-0197, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2012

Received in revised form 20 July 2012

Accepted 6 August 2012

Available online 27 August 2012

Keywords:

Low molecular weight heparin (fragmin)/
protamine microparticles
Hepatocyte growth factor
Drug carrier
Angiogenesis

ABSTRACT

The clinical efficacy of hepatocyte growth factor (HGF) in tissue repair can be greatly enhanced by high affinity, biocompatible drug carriers that maintain the bioactivity and regulate release at the target site. We produced 0.5–3.0 μm fragmin (low molecular weight heparin)/protamine microparticles (F/P MPs) as carriers for the controlled release of HGF. F/P MPs immobilized more than 3 μg of HGF per mg of MPs and gradually released the absorbed HGF into the medium with a half-release time of approximately 5 days. Compared with HGF alone, HGF-containing F/P MPs substantially enhanced the mitogenic effect of HGF on cultured human microvascular endothelial cells, by prolonging the biological half-life, and its conjugation to F/P MPs protected HGF from heat and proteolytic inactivation. F/P MPs disappeared 8 days after subcutaneous injection in mice, suggesting that they are rapidly biodegraded. Furthermore, the number of large (diameter $\geq 200 \mu\text{m}$ or containing ≥ 100 erythrocytes) and medium (diameter 20–200 μm or containing 10–100 erythrocytes) lumen capillaries 8 days after injection of HGF-containing F/P MPs was significantly higher than that after injection of HGF or F/P MPs alone. Furthermore, the number of small (diameter $\leq 20 \mu\text{m}$ or containing 1–10 erythrocytes) lumen capillaries was significantly higher 4 days after injection of HGF-containing F/P MPs. This increased angiogenic activity of HGF in vivo is probably due to both sustained local release and protection against biodegradation by the F/P MPs. Thus, F/P MPs may be useful and safe HGF carriers that facilitate cell proliferation and vascularization at sites of tissue damage.

© 2012 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Preclinical studies have demonstrated that angiogenic growth factors can stimulate the development of collateral arteries in animal models of peripheral and myocardial ischemia [1,2]. Although growth factors such as hepatocyte growth factor (HGF) [3], fibroblast growth factor-2 (FGF-2) [4], and vascular endothelial growth factor [5] can induce neovascularization in ischemic models, this strategy has not always been successful [6] because of the high diffusibility and short biological half-life of these growth factors in vivo. Therefore, modifications that locally retain and prolong biological activity in vivo may enhance the efficacy of trophic and angiogenic factors for tissue regeneration and vascularization.

HGF was first identified as a potent mitogen for mature hepatocytes, and the gene was subsequently cloned [6]. Injection of HGF prevented endotoxin-induced hepatic failure in mice with fulminant hepatitis by inhibiting apoptosis [7], and HGF gene therapy improved the survival rate of rats with lethal liver cirrhosis [8]. HGF stimulated the growth of endothelial cells without stimulating the replication of vascular smooth muscle cells, indicating that it is a potential angiogenic growth factor [2,9,10]. Furthermore, HGF is neurotrophic to hippocampal, cortical, midbrain dopaminergic, cerebellar granular, sensory, motor, and sympathetic neurons and neuroblasts [11].

HGF binds with high affinity to heparinoids (heparin, heparan sulfate, and other heparin-like molecules), and this heparinoid binding could help maintain its biological stability and mitogenic activity [12,13]. HGF is synthesized as a biologically inactive precursor that is proteolytically cleaved to give a disulfide bonded heterodimer [14]. Two alternative transcripts have also been

* Corresponding author. Tel.: +81 42 995 1601; fax: +81 42 991 1611.

E-mail address: ishihara@ndmc.ac.jp (M. Ishihara).

identified that encode truncated variants of HGF, and these smaller isoforms, designated HGF/NK1 and HGF/NK2, behave as antagonists or partial agonists depending on the assay conditions [15]. All these HGF isoforms bind to the tyrosine kinase transmembrane HGF receptor MET and heparinoids [12].

HGF markedly accelerates regeneration of damaged organs in animals with hepatic and renal failure. However, since its half-life is only approximately 5 min because of rapid diffusion and clearance by the liver, its local biological activity may be limited in vivo [16,17]. This rapid clearance necessitates very large doses ($>100 \mu\text{g kg}^{-1}$) to exert hepatotrophic effects in vivo [18]. Thus, the development of a reliable, efficient and safe drug delivery system for HGF may facilitate potential clinical applications in tissue regeneration and vascularization.

We previously developed a photocrosslinked chitosan hydrogel [19] and a 6-O-desulfated heparin hydrogel [20] for the controlled release of growth factors such as FGF-2, and we demonstrated that these hydrogels served as efficient carriers for the local administration of a subcutaneous or muscular injection facilitating neovascularization and granulation tissue formation at wound sites in vivo [19,20]. 6-O-Desulfated heparin hydrogels [20] are not readily injectable, while photocrosslinkable chitosan hydrogels with modified heparin and FGF-2 are. However, thick needles (≥ 20 G) are required to inject these hydrogels, and these needles sometimes become clogged with the hydrogel [19]. Therefore, these hydrogels have not been evaluated as possible HGF carriers.

Heparin and low molecular weight heparin (fragmin) are known to interact with various proteins, including HGF, suggesting that a heparin-based carrier could be useful as a therapeutic agent to locally retain and prolong HGF bioactivity at the injury site. While high doses of heparin carry a high risk of bleeding [21], fragmin has several pharmacological and practical advantages. The lower protein binding affinity of fragmin produces a lower and more predictable anticoagulant response, thereby obviating the need for laboratory monitoring to adjust the dosage [21]. In addition, one or two subcutaneous injections per day are sufficient to maintain therapeutic concentrations because of the longer plasma half-life of fragmin [21]. Protamine, a purified mixture of proteins obtained from fish sperm, neutralizes heparin and fragmin by forming a stable complex that lacks anticoagulant activity [22]. It is used clinically to reverse the anticoagulant activity of heparin following cardiopulmonary bypass and in cases of heparin-induced bleeding [23].

We previously reported that fragmin/protamine microparticles (F/P MPs) are injectable carriers for the controlled release of FGF-2 [24]. A mixture of fragmin and protamine yields water insoluble microparticles (approximately 0.5–3 μm in diameter). FGF-2-containing F/P MPs induced substantial vascularization and fibrous tissue formation in vivo [24]. In the present study we examined the utility of F/P MPs as carriers for the controlled release of HGF. F/P MPs have a high affinity for HGF, enhance HGF mitogenic activity in vitro, and protect HGF from heat and proteolytic inactivation. Furthermore, HGF-containing F/P MPs are more effective in inducing angiogenesis in vivo than HGF and F/P MPs alone.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of HGF-containing F/P MPs

F/P MPs were prepared as described previously [24]. In brief, 0.3 ml of protamine solution (10 mg ml^{-1} , Mochida Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) was added dropwise to 0.7 ml of fragmin solution (6.4 mg ml^{-1} , Kissei Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) and vortexed vigorously for approximately 2 min. In this study, to maximize the production of MPs, protamine and fragmin were

mixed at a ratio of 3:7 by volume. To remove unreacted reagents the mixture was centrifuged at 8000 r.p.m. for 10 min at 4 °C (MX-300, Tomy, Tokyo, Japan), and the pelleted MPs (approximately 0.5–3 μm in diameter) were resuspended in 1 ml of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies Oriental, Tokyo, Japan). The diameter range of the F/P MPs was determined by comparison with the scale bars of an optical microscope. This mixture yielded approximately 5 mg of F/P MPs (dry weight). The F/P MPs did not aggregate at 5 mg ml^{-1} , hence 5 mg ml^{-1} was selected as the standard stock concentration. To prepare HGF-containing F/P MPs for in vivo muscular injection

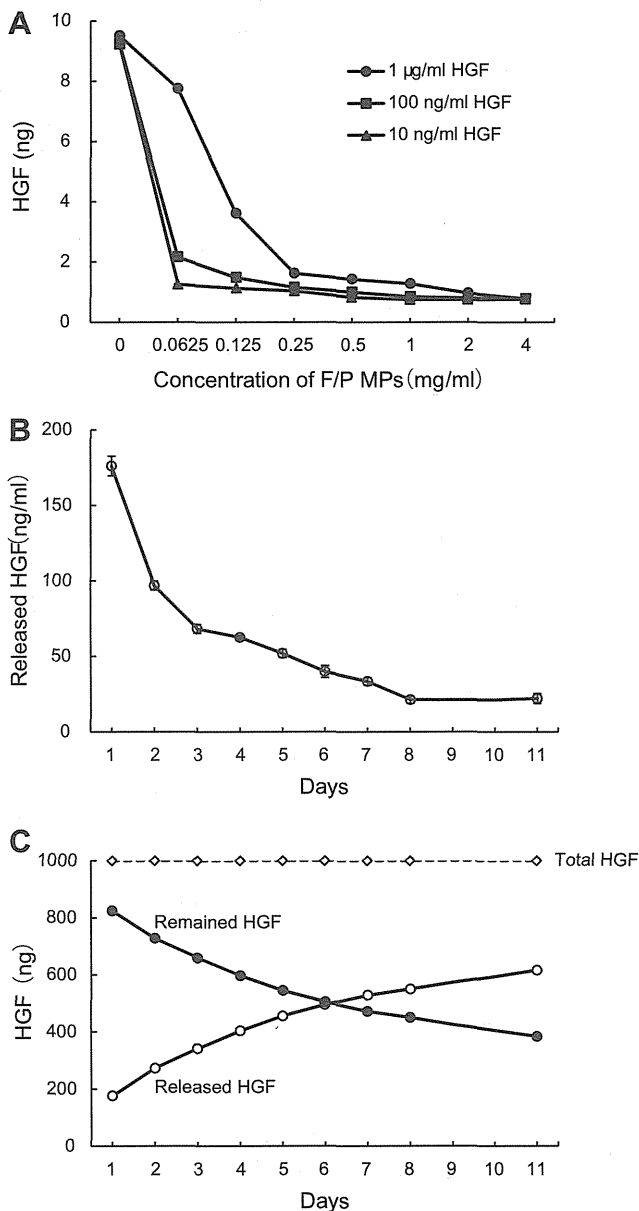


Fig. 1. (A) Absorption of HGF onto F/P MPs. The indicated amounts of F/P MPs were added to DMEM containing FBS and HGF. The solution was centrifuged to precipitate HGF-containing F/P MPs, and HGF remaining in the supernatant was measured by ELISA. (B) HGF release into DMEM. HGF release into DMEM on a given day from HGF-containing F/P MPs was quantified by ELISA of the supernatant. (C) Cumulative HGF release and retention. HGF initially added to the F/P MP solution was defined as 100%. The amount of HGF released into DMEM or retained on HGF-containing F/P MPs was calculated. Each data point represents the mean of three independent measurements.

recombinant human HGF (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) in DMEM without heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) was added to F/P MPs (5 mg ml^{-1}) on ice, mixed by vortexing, and incubated for 18 h at 4°C on a rotary shaker. Under these conditions almost all of the HGF is bound to and immobilized on F/P MPs.

2.2. Evaluation of HGF binding by ELISA

Solutions of F/P MPs at $0\text{--}4 \text{ mg ml}^{-1}$ were prepared in DMEM containing 100 U ml^{-1} penicillin G, $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ streptomycin, and 2% FBS. HGF ($10, 100$ or 1000 ng ml^{-1} in F/P MP solution) was added and the mixture was incubated for 18 h at 4°C on a rotary shaker. The mixture was then centrifuged at 8000 r.p.m. for 10 min to remove the precipitated HGF-containing F/P MPs.

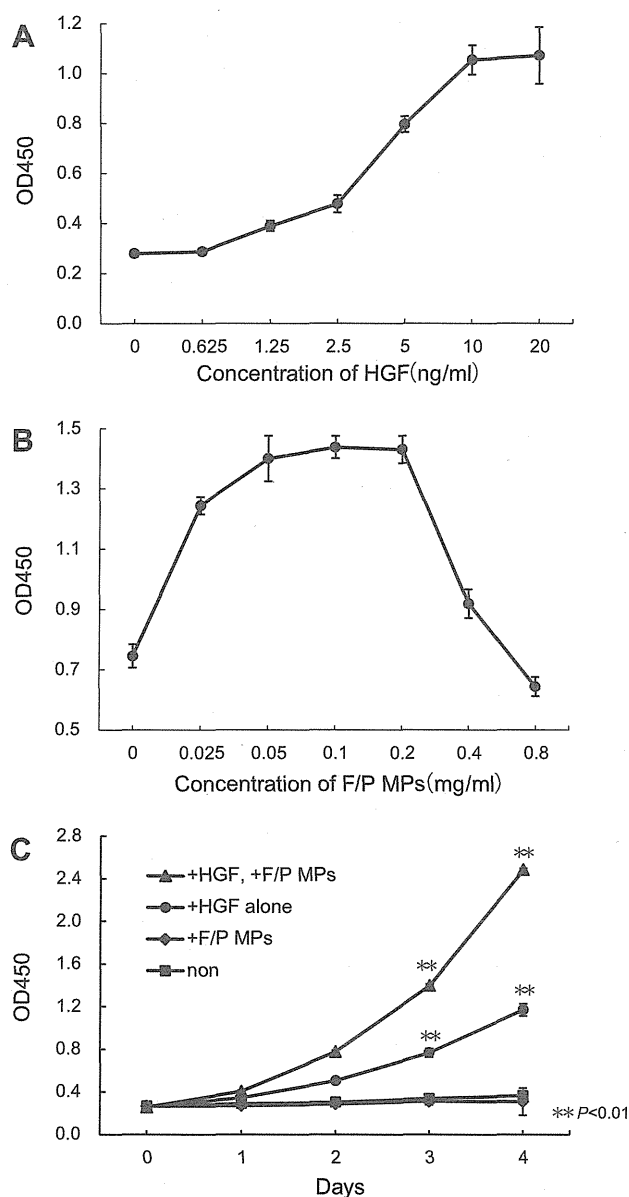


Fig. 2. (A) Influence of HGF concentration on MVEC growth in DMEM containing 5% FBS without F/P MPs. (B) Influence of F/P MP concentration on MVEC growth in DMEM containing FBS with HGF (5 ng ml^{-1}). (C) Influence of F/P MPs (0.1 mg ml^{-1}) and HGF on MVEC growth in DMEM containing FBS. Each data point represents the mean \pm SD values from four determinations. An unpaired *t*-test was used to compare the experimental and control groups. ***P* < 0.01.

The amount of HGF remaining in the supernatant was estimated by measuring the absorbance at 450 nm using a microplate reader and a Quantikine Human HGF Immunoassay Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) according to the manufacturer's instructions.

ELISA was also performed to evaluate HGF release from HGF-containing F/P MPs. In brief, HGF-containing F/P MPs were incubated in DMEM (2 ml) containing 2% FBS and antibiotics at 37°C for 10 days with gentle shaking. DMEM was removed daily for 10 days and centrifuged at 8000 r.p.m. for 10 min to obtain supernatants. The amount of HGF in the supernatant was measured by ELISA. The total amount of HGF released on a given day was the sum of all previous supernatant HGF concentrations.

2.3. Mitogenic activity of HGF alone and HGF-containing F/P MPs on human microvascular endothelial cells (MVECs)

MVECs (Takara Biochemical Corp., Otsu, Japan) were cultured in DMEM containing 5% FBS, 100 U ml^{-1} penicillin G, $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ streptomycin, and the indicated concentrations of HGF and/or F/P MPs. The cells used in these studies were all between cell cycle passages four and eight. MVECs were seeded at an initial density of 3000 cells per well in 96-well tissue culture plates and grown for 3 days in $200 \mu\text{l}$ of DMEM containing 5% FBS, 100 U ml^{-1} penicillin G, $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ streptomycin, and either HGF alone, HGF and F/P MPs, or F/P MPs alone at the indicated concentrations. After incubation the medium was removed and $100 \mu\text{l}$ of fresh medium containing $10 \mu\text{l}$ of WST-1 reagent (Cell Counting Kit, Dojindo Co. Ltd, Kumamoto, Japan) was added to each well. The cell number was estimated by measuring the absorbance at 450 nm using a microplate reader.

2.4. Protection of HGF from inactivation by F/P MPs

To determine whether binding to F/P MPs can sustain HGF activity, 100 ng of HGF was added to 1 ml of DMEM containing

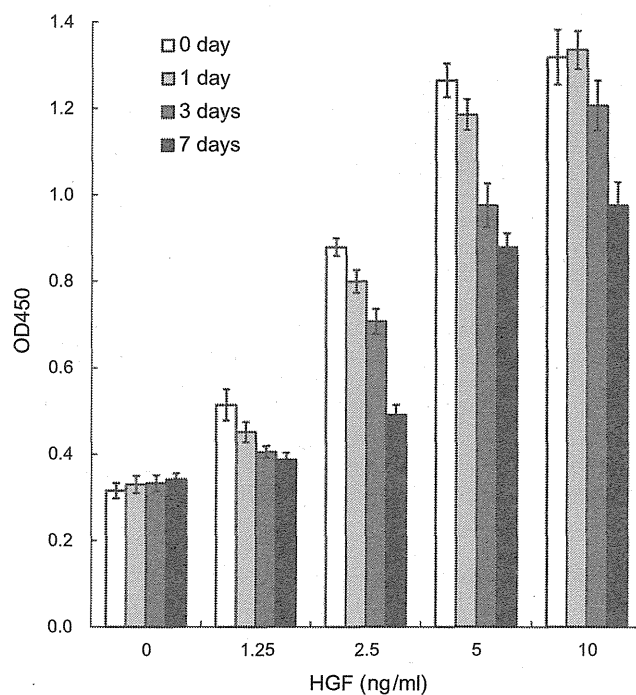


Fig. 3. The stability of pre-immobilized HGF as determined by MVEC proliferation assay. F/P MPs were incubated with HGF. After incubating the HGF-containing F/P MP stock solution for the indicated time periods MVECs were cultured in DMEM containing FBS and diluted pre-immobilized HGF-containing F/P MPs for 3 days. Data represent the means \pm SD of four determinations.

2% FBS or to DMEM containing 1.0 mg ml⁻¹ F/P MPs and 2% FBS. These stock solutions were incubated at 37 °C for 0, 2, 4 and 7 days and then 1 ml of the diluted HGF (nominally 20, 10, 5, 2.5 and 0 ng ml⁻¹) and F/P MPs (200, 100, 50, 25 and 0 µg ml⁻¹, respectively) in DMEM containing 5% FBS was used in MVEC cultures. Again, cell proliferation was assayed after 3 days using the WST-1 reagent.

To examine if F/P MPs protect HGF against heat inactivation, 200 µl stock solutions of either 100 ng HGF-containing F/P MPs (1 mg ml⁻¹) or HGF alone (100 ng ml⁻¹) in DMEM without FBS were heated at 37, 42, 47, 52, 57, 62, 67 and 72 °C for 20 min. To determine if F/P MPs protected against proteolytic cleavage by trypsin, 100 µl of trypsin-EDTA solution (0.5 mg ml⁻¹ trypsin, 0.2 mg ml⁻¹ EDTA/4Na⁺ in HBSS, Sigma, St Louis, MO) was added to 100 µl of each chilled stock solution (HGF alone or HGF-containing F/P MPs DMEM without FBS) and incubated at 37 °C for the indicated periods of time (10–120 min). After incubation, 100 µl of FBS was added to each trypsinized stock solution to stop the trypsinization reaction. These heat-treated or trypsinized stock solution were diluted 10-fold with DMEM containing 5% FBS.

MVEC were cultured in the prepared media for 3 days, and the cell number measured as described above.

2.5. Vascularization induced by HGF-containing F/P MPs

Animal experiments were performed according to the protocol approved by the Animal Experimentation Committee of the National Defense Medical College (Saitama, Japan). Male C57 BL/6 mice (6–7 weeks old) were purchased from Clea Japan Inc. (Tokyo, Japan). To prepare HGF-containing F/P MPs for in vivo injection 5 µg HGF and 5 mg F/P MPs were dissolved in 1 ml of DMEM and the solution vortexed. Next, 200 µl of HGF-containing (1 µg) F/P MPs (1 mg) or HGF alone (1 µg) was carefully injected into the right and left sides of the back subcutis of mice 2 cm above the tail root. To evaluate neovascularization mice were killed 4, 8, 11 or 15 days after injection. The excised skin tissue around the injection site was fixed in 10% formaldehyde solution (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), embedded in paraffin, and sectioned at 4 µm. The sections (~10 × 1.0 mm) were mounted on glass slides and stained with hematoxylin and eosin (H&E). The microscopic

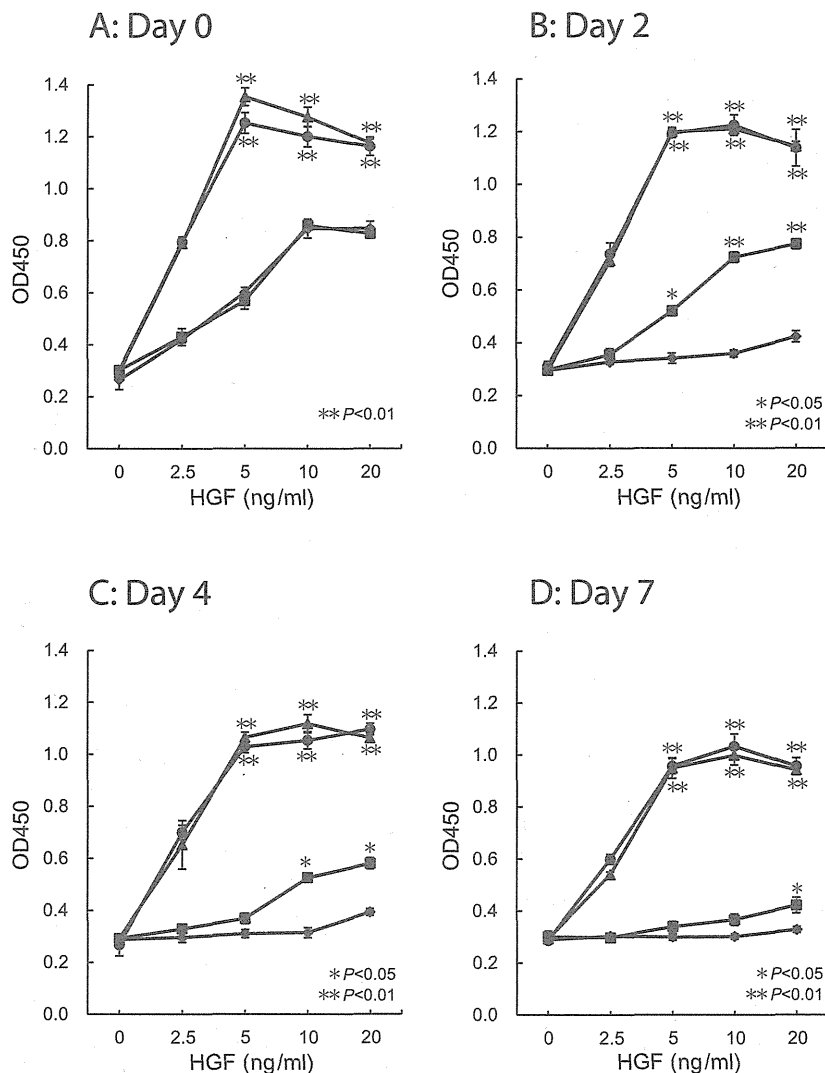


Fig. 4. The protective effect of F/P MPs on HGF. Stock solutions of HGF-containing F/P MPs with (●) or without (▲) FBS and HGF alone with (■) or without (◆) FBS were incubated for (A) 0, (B) 2, (C) 4, and (D) 7 days. Stock solutions were diluted to the indicated nominal concentrations of HGF-containing F/P MPs with DMEM. MVECs were cultured for 3 days using one of the prepared media. Data represent the means ± SD of four independent determinations. An unpaired *t*-test was used to compare the experimental and control groups. ***P* < 0.01, **P* < 0.05.

field (100 \times) showing the largest capillary density in each section was photographed, and the number of large (diameter $\geq 200 \mu\text{m}$ or containing ≥ 100 erythrocytes), medium (diameter = 20–200 μm or containing 10–100 erythrocytes) and small (diameter $\leq 20 \mu\text{m}$ or containing 1–10 erythrocytes) lumen capillaries were counted.

2.6. Statistical analyses

Group means were compared by an unpaired Student's *t*-test using Stat Mate III for Windows (ATMS Co., Tokyo, Japan). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Binding of HGF to F/P MPs

To assess the binding affinity of F/P MPs for HGF various concentrations of F/P MPs were added to 10, 100, or 1000 ng ml^{-1} HGF solution. The solutions were centrifuged to precipitate HGF-containing F/P MPs, and HGF remaining in the supernatant was measured by ELISA (Fig. 1A). The concentration of HGF was progressively reduced by increasing the F/P MP concentration. As little as 0.5 mg ml^{-1} F/P MPs reduced the remaining free HGF to near the limit of detection by ELISA, indicating that the majority of HGF molecules were bound to F/P MPs and subsequently precipitated by centrifugation. A F/P MPs concentration of 0.25 mg ml^{-1} adsorbed about 84% of 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ HGF in DMEM containing 2% FBS, indicating that 1 mg of F/P MPs can adsorb approximately 3.3 μg of HGF. Although various proteins in FBS, especially heparin-binding proteins, appear to interact with F/P MPs, fetal bovine albumin does not interact with F/P MPs. Therefore, it is speculated that HGF may specifically interact with F/P MPs even in the presence of FBS *in vitro*.

Approximately 19% of the HGF from HGF-containing F/P MPs (prepared by 18 h incubation at 4 $^{\circ}\text{C}$) was released into the medium within 1 day (Fig. 1B and C), while approximately 43% and 38% remained in the F/P MP fraction after 7 and 10 days, respectively (Fig. 1C). Thus, the immobilized HGF was gradually released into the medium with a half-release time of approximately 5 days. Dissolution of F/P MPs *in vitro* was not observed visually after 2 weeks.

3.2. Binding of HGF to F/P MPs enhanced and prolonged HGF mitogenic activity in MVEC cultures

Incubation with HGF at 1.25–20 ng ml^{-1} stimulated the proliferation of MVECs, with a half-maximal effect at approximately 5 ng ml^{-1} (Fig. 2A). Addition of F/P MPs (50–200 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and 5 ng ml^{-1} HGF to DMEM containing 5% FBS significantly enhanced the proliferation of MVECs (Fig. 2B). Indeed, the mitogenic effect of 5 ng ml^{-1} HGF was near maximal at an F/P MP concentration of 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Fig. 2B). The combination of 5 ng ml^{-1} HGF plus 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ F/P MPs approximately doubled the cell number on day 3 in culture compared with cells grown in the presence of HGF alone (Fig. 2C) and reduced the cell doubling time over days 1–3 to approximately 25 h from 47 h in HGF alone.

The growth of MVECs was stimulated in a concentration-dependent manner by the diluted pre-immobilized HGF-containing F/P MPs (Fig. 3), indicating that immobilized HGF retained significant bioactivity even after 7 days at 37 $^{\circ}\text{C}$. This result suggests that HGF mitogenic activity was stabilized when HGFs were pre-immobilized on F/P MPs.

3.3. F/P MPs prolonged the half-life of HGF bioactivity and protected against heat and proteolytic inactivation

When 100 ng ml^{-1} HGF was incubated for 2 days or more in DMEM with or without 2% FBS at 37 $^{\circ}\text{C}$ the mitogenic activity was substantially reduced (<90% by day 7, Fig. 4A–D). However, no decrease in mitogenic activity was observed if 100 ng ml^{-1} HGF was incubated in the presence of 1 mg ml^{-1} F/P MPs (either with or without 2% FBS) for 7 days (Fig. 4D). The biological half-life of 10 ng ml^{-1} HGF in DMEM containing 5% FBS was only about 3 days in the absence of F/P MPs (Fig. 4B), but more than 7 days in the presence of F/P MPs (Fig. 4D).

To determine whether F/P MPs could protect HGF bioactivity against heat inactivation HGF (100 ng ml^{-1}) was heated with or without F/P MPs (1 mg ml^{-1}). Heating HGF above 42 $^{\circ}\text{C}$ resulted in a reduction in mitogenic activity both in the presence and absence of F/P MPs (Fig. 5A), but the temperature at which half of the mitogenic activity was lost was substantially higher (56 $^{\circ}\text{C}$) in the presence of F/P MPs than in the absence of F/P MPs (45 $^{\circ}\text{C}$). Thus, F/P MPs can protect HGF from heat inactivation. Similarly, F/P MPs protected HGF against trypsin-mediated proteolysis

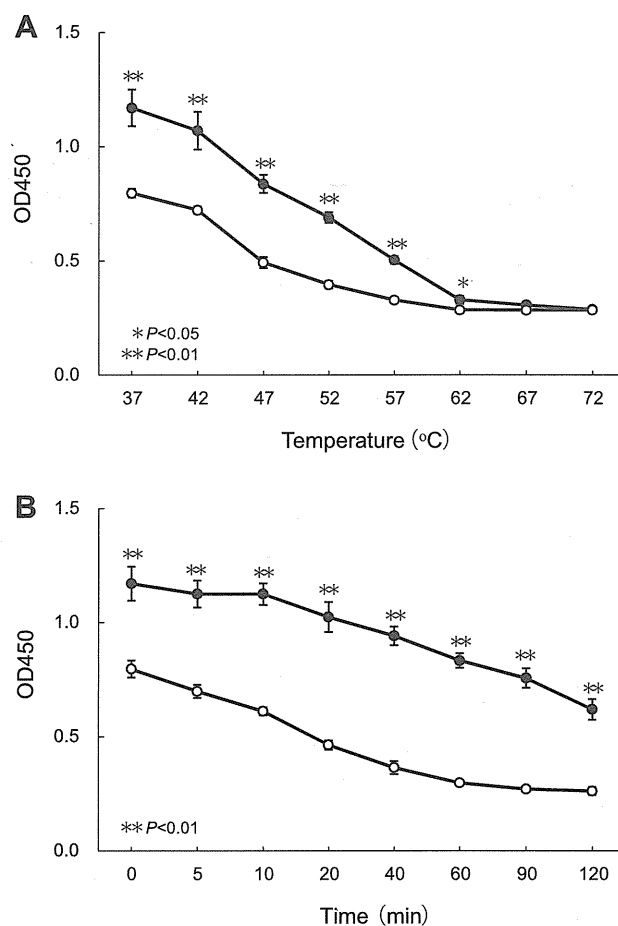


Fig. 5. The protective effect of F/P MPs on the bioactivity of (A) heat-treated and (B) trypsin-treated HGF. (A) The stock solutions (\bullet) and HGF alone (\circ) were incubated at the indicated temperatures. The heated HGF solutions were diluted with DMEM containing FBS. MVECs were cultured using one of the prepared media. (B) DMEM stock solutions (\bullet) and HGF alone (\circ) were treated with trypsin for the indicated times. After trypsinization proteolysis was stopped by adding FBS, the inactivated HGF in the stock solutions was diluted with DMEM containing FBS, and MVECs were cultured using one of the prepared media. Data points represent the means \pm SD of four independent determinations. An unpaired *t*-test was used to compare the experimental and control groups. $**P < 0.01$, $*P < 0.05$.

(Fig. 5B). In the presence of trypsin the biological half-life of HGF was only 20 min, while that of HGF-containing F/P MPs was 120 min.

3.4. Vascularization induced by HGF-containing F/P MPs in vivo

To confirm the bioactivity of HGF-containing F/P MPs in vivo we injected mice with HGF alone or HGF-containing F/P MPs and examined vascularization around the injection sites by H&E staining. Representative micrographs of tissue sections around each injection site on day 8 after injection are shown in Fig. 6. In this study the injected F/P MPs were not detected visually at the injection sites on day 8, suggesting that they are rapidly biodegraded, but small paste-like aggregates were observed on day 4 (data not shown). Several large (diameter $\geq 200 \mu\text{m}$ or containing ≥ 100 erythrocytes), medium (diameter 20–200 μm or containing 10–100 erythrocytes), and small (diameter $\leq 20 \mu\text{m}$ or containing 1–10 erythrocytes) lumen capillaries were observed in the subcutaneous tissue of mice injected with HGF-containing F/P MPs. Only

minor increases in the number of medium and small sized vessels were observed after injection of HGF or F/P MPs alone.

The number of large, medium, and small vessels around the injection sites (about a $10 \times 1.0 \text{ mm}$ area) was then quantified (Fig. 7). Representative micrographs of tissue around each injection site are shown 4, 8, 11, and 15 days after injection (Fig. 7). 8 days after injection the numbers of mature large (Fig. 7A), medium (Fig. 7B), and small vessels (Fig. 7C) were significantly higher ($P < 0.05$) in subcutaneous tissue injected with HGF-containing F/P MPs than in tissue injected with HGF or F/P MPs alone. A significantly larger number of small vessels was observed in tissue injected with HGF-containing F/P MPs as early as 4 days after injection (Fig. 7C).

4. Discussion

HGF can accelerate the regeneration of damaged tissue in animal models of hepatic and renal failure, but the local biological activity of exogenous HGF may be limited in vivo without an

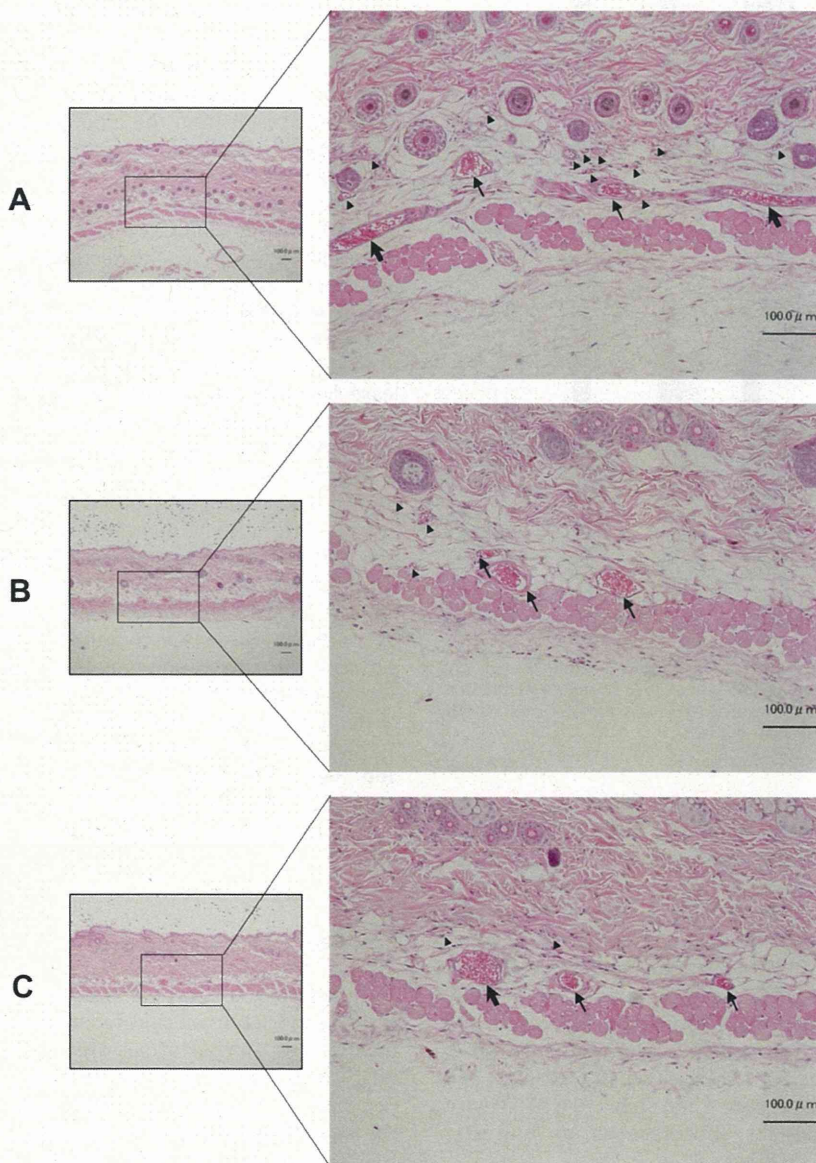


Fig. 6. Histological examination of subcutaneous sites 8 days after injection of (A) HGF-containing F/P MPs, (B) HGF alone, or (C) F/P MPs alone. Photographs are representative H&E stained tissue samples from 10 sites (1 per mouse) injected with either HGF-containing F/P MPs, HGF alone, or F/P MPs alone. The large arrows, small arrows, and triangles show large, medium, and small vessels containing erythrocytes, respectively.

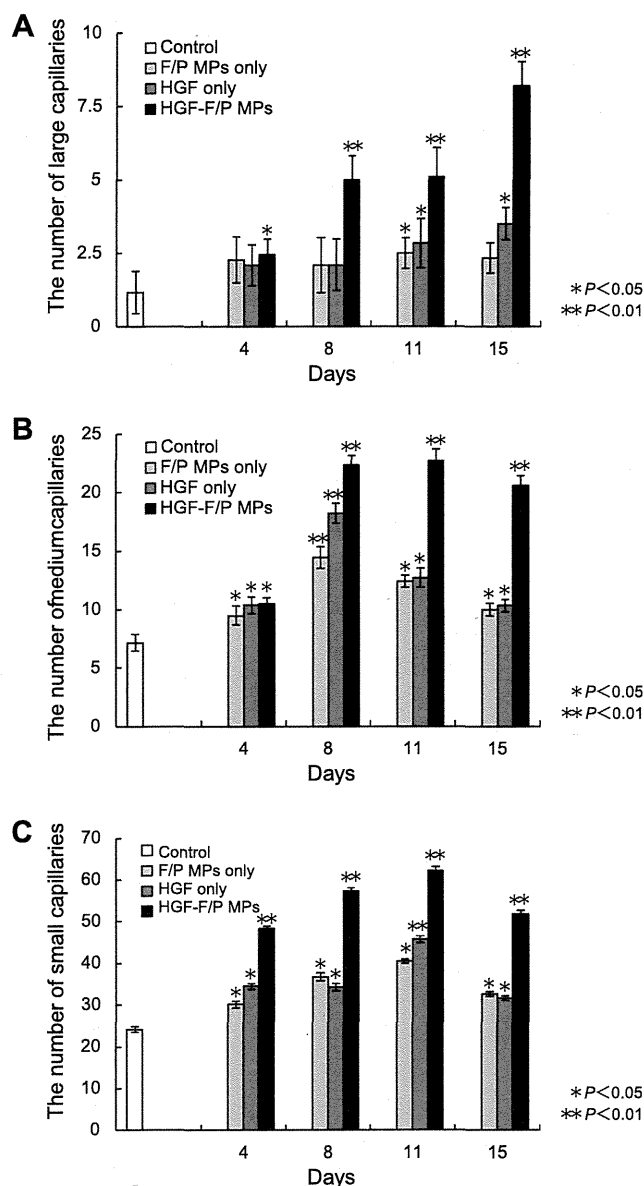


Fig. 7. Angiogenic effect of HGF-containing F/P MPs in vivo. The number of large, medium, and small capillaries in each sample (about 10×1.0 mm) was counted ($n = 10$). All values are means \pm SD. An unpaired *t*-test was used to compare the experimental and control groups. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

adequate protein delivery system that acts to maintain HGF at the target site and prevents rapid clearance by the liver [16,17]. Without such a system very large doses are usually required to exert a significant regenerative effect [18]. To enhance the repetitive efficacy of HGF we developed F/P MPs for high affinity absorption and controlled release of HGF. F/P MPs prolonged the biological activity of HGF and protected HGF against heat and proteolytic inactivation. Furthermore, these HGF-containing F/P MPs were injectable and biocompatible, and triggered significant angiogenesis at the site of injection. Thus, F/P MPs are a reliable, efficient and safe protein delivery system to enhance and stabilize HGF activity at local administration sites for subcutaneous or muscular injection.

Heparinoids and F/P MPs also prolong the biological half-life of FGF-2, and protect FGF-2 from heat and proteolytic inactivation [24–27]. Similarly, the present study has demonstrated that more

than 3 μ g of HGF bound to 1 mg of F/P MPs and was gradually released from HGF-containing F/P MPs in vitro. HGF-containing F/P MPs appeared to be bioactive, since they stimulated MVEC proliferation. In fact, HGF-containing F/P MPs were more mitogenic than HGF alone, reducing the cell doubling time from 47 to 25 h, possibly because bound HGF is more resistant to biodegradation and inactivation under physiological conditions. Indeed, proliferation of MVECs was substantially stimulated by preloaded F/P MPs even after 10 days at 37 °C, while HGF alone did not stimulate MVEC proliferation at all after 7 days preincubation at 37 °C. Furthermore, F/P MPs could effectively protect HGF against heat inactivation and trypsin degradation.

When HGF-containing F/P MPs were subcutaneously injected into the backs of mice large and medium vessels were induced near the injection site after 8 days. The number of small vessels induced by HGF-containing F/P MPs reached a maximum on days 8–11, after which a slight decrease in the rate of neovascularization occurred. No significant induction of large vessels was observed after injection of HGF or F/P MPs alone, although a slight induction of medium and small vessels was observed. We suggest that free HGF diffused away too rapidly to induce arteriogenesis and that inactivation of HGF remaining at the injection site within a few days also led to less efficient vascularization. The modest vascularization (mainly small and medium vessels) induced by F/P MPs alone may result from the binding of various endogenous angiogenic growth factors around the injection site, leading to local accumulation and controlled release.

It is known in polymer chemistry that positively and negatively charged polymers interact ionically [16,22]. Thus, basic protamine molecules complex with acidic fragmin molecules to form microparticles through ionic interactions. Our data indicate that bound polypeptides such as HGF are gradually released from F/P MPs with a half-release time of 5 days. Since F/P MPs are biodegradable in vivo, incorporating HGF on them will provide a controlled release system for the lifetime of the F/P MPs. Thus, F/P MPs provide an excellent biomaterial to immobilize, locally retain and gradually release HGF for optimal induction of neovascularization.

Fragmin enhanced HGF activity and HGF-induced tube formation by endothelial cells in vitro (data not shown). Protamine is also used clinically to neutralize heparin by forming a stable complex without anticoagulant activity [22]. The present study has demonstrated that F/P MPs strongly interact with HGF and that F/P MPs protect HGF from inactivation by heat and degradation by proteases. These HGF-containing F/P MPs bound to multiple cell surfaces [28], in addition to culture plates and biological matrices such as collagen [29]. Thus, HGF-containing F/P MPs would remain at the injection site and sustain a high local concentration of HGF.

Both chemical components of the F/P MPs are in clinical use and, hence, MPs may possess high clinical safety. It is thus proposed that HGF-containing F/P MPs may be a promising new controlled HGF release system to induce vascularization in ischemic limbs.

5. Conclusions

In the present study we evaluated the mitogenic effect of HGF-containing F/P MPs on cultured MVECs and the angiogenic effect in mice. Our main conclusions are (i) HGF is substantially adsorbed on F/P MPs, and in this state they are protected from inactivation, (ii) HGF is gradually released from HGF-containing F/P MPs through diffusion and/or biodegradation of the F/P MPs, and (iii) HGF-containing F/P MPs induce substantial vascularization in vivo. The results presented in this study indicate that F/P MPs may serve as an effective carrier for HGF, particularly for the local application of HGF at tissue injury sites.

Acknowledgements

We acknowledge the expertise and advice of Associate Prof. Koichi Fukuda and also thank the personnel of the Institute of Laboratory Animals, Graduate School of Medicine, National Defense Medical College for expert care of the animals. This study was partially supported by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan under Grant No. 1058500. S.K. was supported by a Restart Postdoctoral Fellowship of the Japan Society for the Promotion of Science.

Appendix A. Figures with essential colour discrimination

Certain figures in this article, particularly Fig. 6, is difficult to interpret in black and white. The full colour images can be found in the on-line version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.003>.

References

- [1] Stocum DL. *Frontiers in medicine: regeneration*. Science 1997;276:59–87.
- [2] Bussolino F, Drenzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naidini L, et al. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 1992;119:629–41.
- [3] Morishita R, Nakamura S, Hayashi S-I, Taniyama Y, Moriguchi A, Nagano T, et al. Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension* 1999;33:1379–84.
- [4] Baffour R, Berman J, Garb JL, Rhee SW, Kaufman J, Friedmann P. Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg* 1992;16:181–91.
- [5] Bauters C, Asahara T, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, et al. Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J Vasc Surg* 1995;21:314–24.
- [6] Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 1989;342:440–3.
- [7] Kosai K, Matsumoto K, Funakoshi H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents endotoxin-induced lethal hepatic failure in mice. *Hepatology* 1999;30:151–9.
- [8] Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, Nakanishi K, Sawa Y, Morishita R, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nat Med* 1999;5:226–30.
- [9] Nakamura Y, Morishita R, Nakamura S, Aoki SM, Moriguchi A, Matsumoto K, et al. A vascular modulator, hepatocyte growth factor, is associated with systolic pressure. *Hypertension* 1996;28:409–13.
- [10] Yashi S, Morishita R, Higaki J, Aoki M, Moriguchi A, Kida I, et al. Autocrine-paracrine effects of overexpression of hepatocyte growth factor gene on growth of endothelial cell. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;220:539–45.
- [11] Maina F, Klein R. Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nat Neurosci* 1999;2:213–7.
- [12] Lyon M, Deakin JA, Mizuno K, Nakamura T, Gallagher JT. Interaction of hepatocyte growth factor with heparin sulfate. *J Biol Chem* 1994;269:11216–23.
- [13] Ashikari S, Habuchi H, Kimata K. Characterization of heparin sulfate oligosaccharides that bind to hepatocyte growth factor. *J Biol Chem* 1995;270:29586–93.
- [14] Nakamura T. Structure and function of hepatocyte growth factor. *Prog Growth Factor Res* 1991;3:67–85.
- [15] Sakata H, Stahl SJ, Taylor WG, Rosenberg JM, Sakaguchi K, Wingfield PT, et al. Heparin binding and oligomerization of hepatocyte growth factor/scatter factor isoforms. *J Biol Chem* 1997;272:9457–63.
- [16] Ohno T, Hirano S, Kanemaru S, Yamashita M, Umeda H, Suehiro A, et al. Drug delivery system of hepatocyte growth factor for the treatment of vocal fold scarring in canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2007;116:762–9.
- [17] Xu CC, Chan RW, Weinberger DG, Efuno G, Pawlowski KS. Controlled release of hepatocyte growth factor from bovine acellular scaffold for vocal fold reconstruction. *J Biomed Mater Res* 2010;93A:1335–47.
- [18] Ishiki Y, Ohnishi H, Matsumoto K, Nakamura T. Direct evidence that hepatocyte growth factor is a hepatotrophic factor for liver regeneration and for potent anti-hepatitis action in vivo. *Hepatology* 1992;16:1227–35.
- [19] Fujita M, Ishihara M, Shimizu M, Obara K, Ishizuka T, Saito Y, et al. Vascularization in vivo caused by the controlled release of fibroblast growth factor-2 from an injectable chitosan/non-anticoagulant heparin hydrogel. *Biomaterials* 2004;25:699–706.
- [20] Nakamura S, Ishihara M, Obara K, Masuoka K, Ishizuka T, Kanatani Y, et al. Controlled release of fibroblast growth factor-2 from injectable 6-O-desulfated heparin hydrogel and subsequent effect on in vivo vascularization. *J Biomed Mater Res* 2006;78A:364–71.
- [21] Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, et al. Heparin and low-molecular weight heparin, mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 2001;119:645–94S.
- [22] Wolzt M, Wetermann A, Nieszpaun-Los M, Schneider B, Fassolt A, Lechner K, et al. Studies on the neutralizing of protamine on unfractionated and low molecular weight heparin (Fragmine®) at the site of activation of the coagulation system in man. *Thromb Haemost* 1995;73:439–43.
- [23] Pan M, Lezo JS, Medina A, Romero M, Hernandez E, Segura J, et al. In-laboratory removal of femoral sheath following protamine administration in patients having intracoronary stent implantation. *Am J Cardiol* 1997;80:1336–8.
- [24] Nakamura S, Kanatani Y, Kishimoto S, Nakamura S-I, Ohno C, Horio T, et al. Controlled release of FGF-2 using fragmin/protamine microparticles and effect on neovascularization. *J Biomed Mater Res* 2009;91A:814–23.
- [25] Ishihara M, Ono K. Structure and function of heparin and heparan sulfate: heparinoid library and modification of FGF-activities. *Trend Glycosci Glycotechnol* 1998;10:223–33.
- [26] Ishihara M. Biosynthesis, structure, and biological activity of basic FGF binding domains of heparan sulfate. *Trend Glycosci Glycotechnol* 1993;5:343–54.
- [27] Gospodarowicz D, Cheng J. Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J Cell Physiol* 1986;128:475–84.
- [28] Nakamura S, Kishimoto S, Nakamura S-I, Nambu M, Fujita M, Tanaka Y, et al. Fragmin/protamine microparticles as cell carriers to enhance viability of adipose-derived stromal cells and their subsequent effect on in vivo neovascularization. *J Biomed Mater Res* 2010;92A:1614–22.
- [29] Kishimoto S, Nakamura S, Nakamura S-I, Kanatani Y, Hattori H, Tanaka Y, et al. Fragmin/protamine microparticle-coated matrix immobilized cytokines to stimulate various cell proliferations with low serum media. *Artif Organ* 2009;33:431–8.