

培養した。

10. 用量設定試験

被験物質の菌株に対する作用（生育阻害又は殺菌性）並びにプレート上での溶解性を調べ、本試験の試験濃度を設定する目的で実施した。

10.1. 試験方法

プレインキュベーション法により、S9 mix添加及びS9 mix無添加で行った。

10.2. 試験濃度

被験物質原液を最高濃度（100%）として、以下30、10、3、1、0.3及び0.1%の計7濃度と陰性対照及び陽性対照について実施した。

10.3. 使用プレート数

菌株、S9 mix添加、S9 mix無添加及び濃度段階の組み合わせごとに2枚のプレートを用いた。

10.4. 観察項目

10.4.1. プレート上での析出物の有無

培養開始時及び終了時に肉眼的に観察した。

10.4.2. 菌の生育阻害の有無

100倍の実体顕微鏡下で観察した。

10.4.3. 復帰変異コロニー数の計測

培養終了後、プレート上での析出物の有無を肉眼で観察した後、復帰変異コロニー数を、コロニーアナライザー（CA-11D、システムサイエンス株式会社）により計測した。

11. 本試験

11.1. 試験方法

プレインキュベーション法により、S9 mix添加及びS9 mix無添加で行った。

11.2. 試験濃度

用量設定試験の結果、S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、すべての菌株において、菌の生育阻害及び復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、本試験の試験濃度は、用量設定試験と同様に100%を最高濃度として、以下公比2で5濃度を設定した。すなわち、S9 mix無添加及びS9 mix添加のいずれの菌株も6.25、12.5、25、50及び100%とした。また、対照として、全菌株に対し陰性対照及び陽性対照を設定した。

11.3. 使用プレート数

菌株、S9 mix添加、S9 mix無添加及び濃度段階の組み合わせごとに2枚のプレートを用いた。

11.4. 観察項目

10.4.に示した方法で実施した。

12. 試験の成立条件

無菌試験で被験物質の最高濃度液及びS9 mixに雑菌の混入がなく、また、復帰変異コロニー数が陰性対照では試験施設のバックグラウンドデータ（Attachment 2）の平均 ± 2 S.D.内にあり、陽性対照では陰性対照の2倍以上に増加し、また、用量設定試験と本試験との間に再現性が認められ、さらに試験系に影響した他の要因がない場合に試験成立とした。

13. 統計学的方法

復帰変異コロニー数は、濃度ごとに平均値を算出した。なお、下記の判定基準に従ったため、有意差検定は実施しなかった。

14. 判定基準

被験物質における復帰変異コロニー数が、陰性対照の2倍以上の値を示し、さらに、濃度依存性あるいは再現性が認められた場合に陽性と判断した。

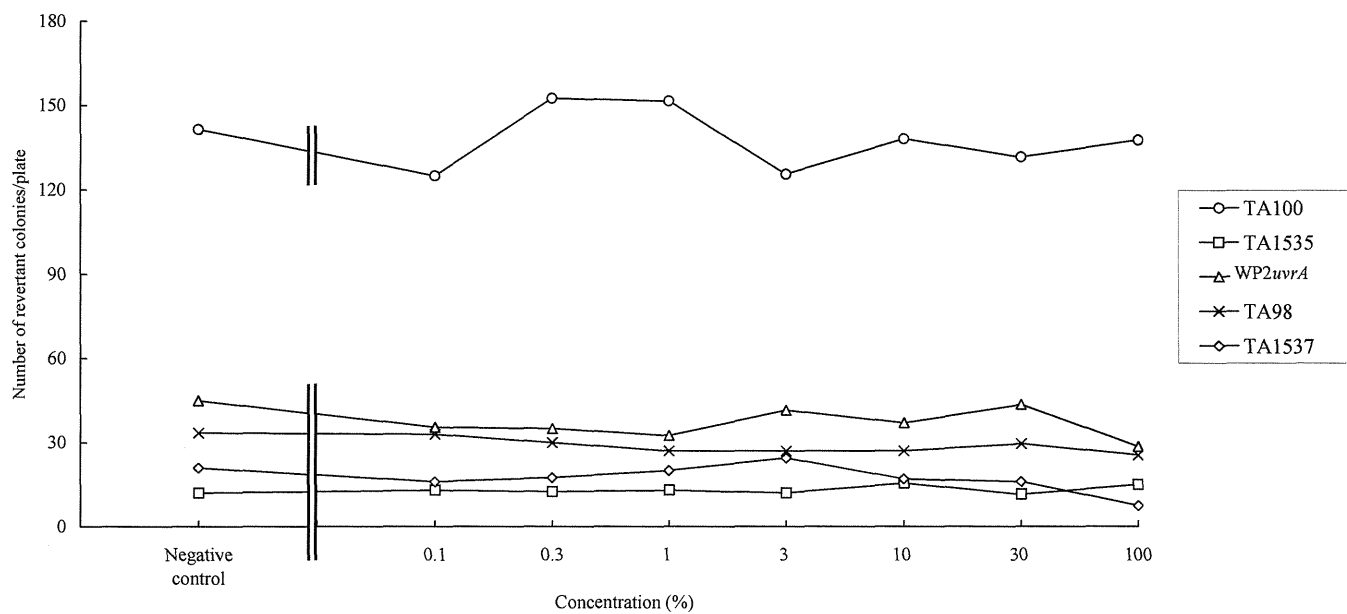


Figure 1-1. Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria.
(dose- finding test: without S9 mix)

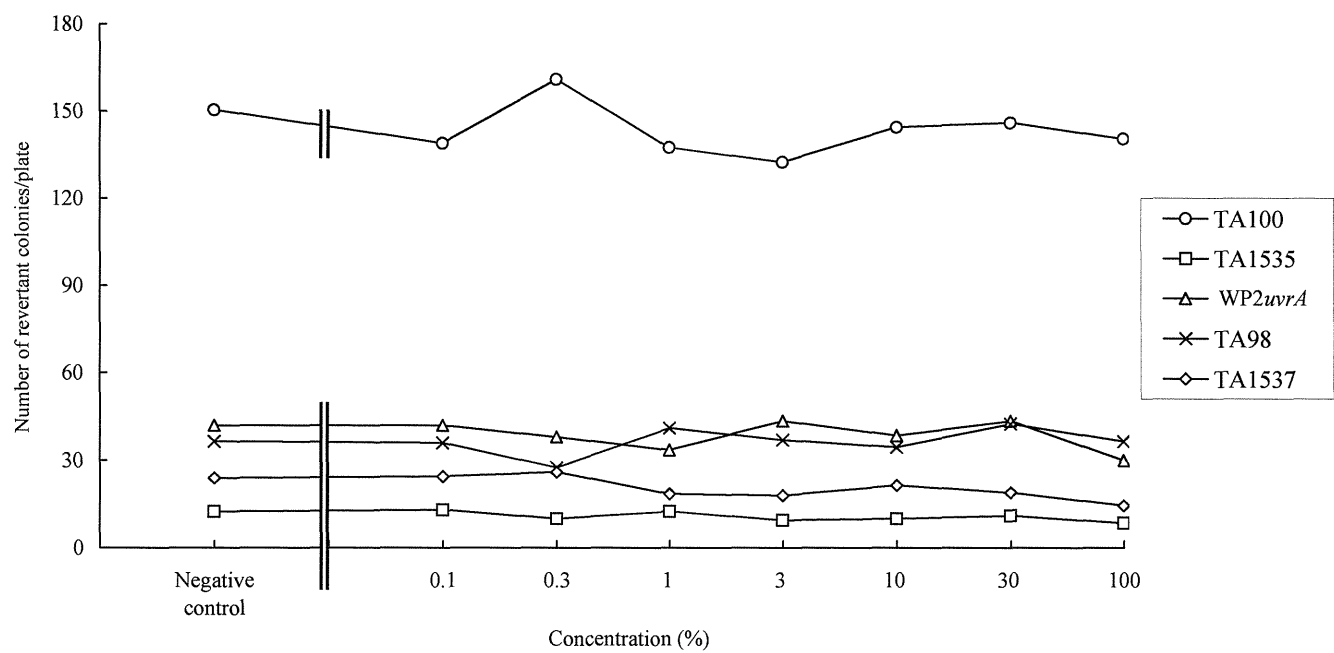


Figure 1-2. Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria.
(dose- finding test: with S9 mix)

Table 4-1

Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria (dose-finding test)

S9 mix		Concentration (%)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	0	140 143 (142)	11 13 (12)	40 50 (45)	32 35 (34)	18 24 (21)
	Artificial red cells	0.1	125 125 (125)	10 16 (13)	31 40 (36)	33 33 (33)	14 18 (16)
		0.3	144 161 (153)	10 15 (13)	33 37 (35)	29 31 (30)	16 19 (18)
		1	144 159 (152)	10 16 (13)	32 33 (33)	24 30 (27)	18 22 (20)
		3	120 131 (126)	7 17 (12)	41 42 (42)	27 27 (27)	23 26 (25)
		10	125 151 (138)	13 18 (16)	30 44 (37)	24 30 (27)	13 21 (17)
		30	128 135 (132)	11 12 (12)	42 45 (44)	27 32 (30)	16 16 (16)
		100	134 141 (138)	15 15 (15)	26 31 (29)	24 27 (26)	7 8 (8)
	Positive control	Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
		Concentration (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
		Number of revertant colonies/plate	445 525 (485)	591 638 (615)	106 121 (114)	375 378 (377)	306 371 (339)

Negative control : Saline.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃ : Sodium azide; 9AA : 9-Aminoacridine hydrochloride.

(): Mean

No precipitates were noted at any concentration on the surface of agar plate.

No growth inhibition of tester strains was observed.

Table 4-2

Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria (dose-finding test)

S9 mix		Concentration (%)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2 <i>uvrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	0	141 160 (151)	12 13 (13)	37 47 (42)	31 42 (37)	24 24 (24)
	Artificial red cells	0.1	139 139 (139)	12 14 (13)	41 43 (42)	34 38 (36)	22 27 (25)
		0.3	158 164 (161)	10 10 (10)	30 46 (38)	24 31 (28)	23 29 (26)
		1	127 148 (138)	11 14 (13)	32 35 (34)	40 42 (41)	13 24 (19)
		3	125 140 (133)	9 10 (10)	40 47 (44)	35 39 (37)	17 19 (18)
		10	139 150 (145)	9 11 (10)	36 41 (39)	34 35 (35)	18 25 (22)
		30	129 163 (146)	9 13 (11)	38 49 (44)	41 44 (43)	17 21 (19)
		100	128 153 (141)	8 9 (9)	28 32 (30)	34 39 (37)	11 18 (15)
	Positive control	Name	2AA				
		Concentration (µg/plate)	1	2	10	0.5	2
		Number of revertant colonies/plate	1135 1187 (1161)	360 401 (381)	1113 1208 (1161)	451 454 (453)	193 212 (203)

Negative control : Saline.

2AA : 2-Aminoanthracene.

(): Mean

No precipitates were noted at any concentration on the surface of agar plate.

No growth inhibition of tester strains was observed.

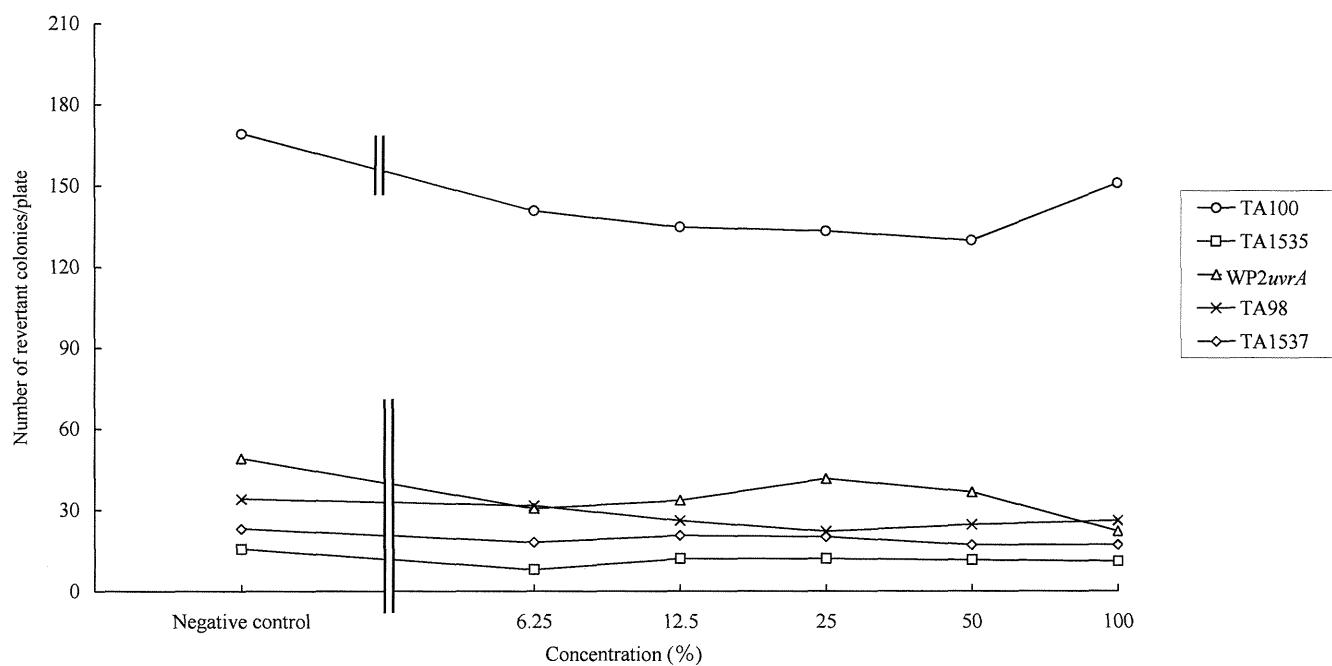


Figure 2-1. Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria.
(mutagenicity test: without S9 mix)

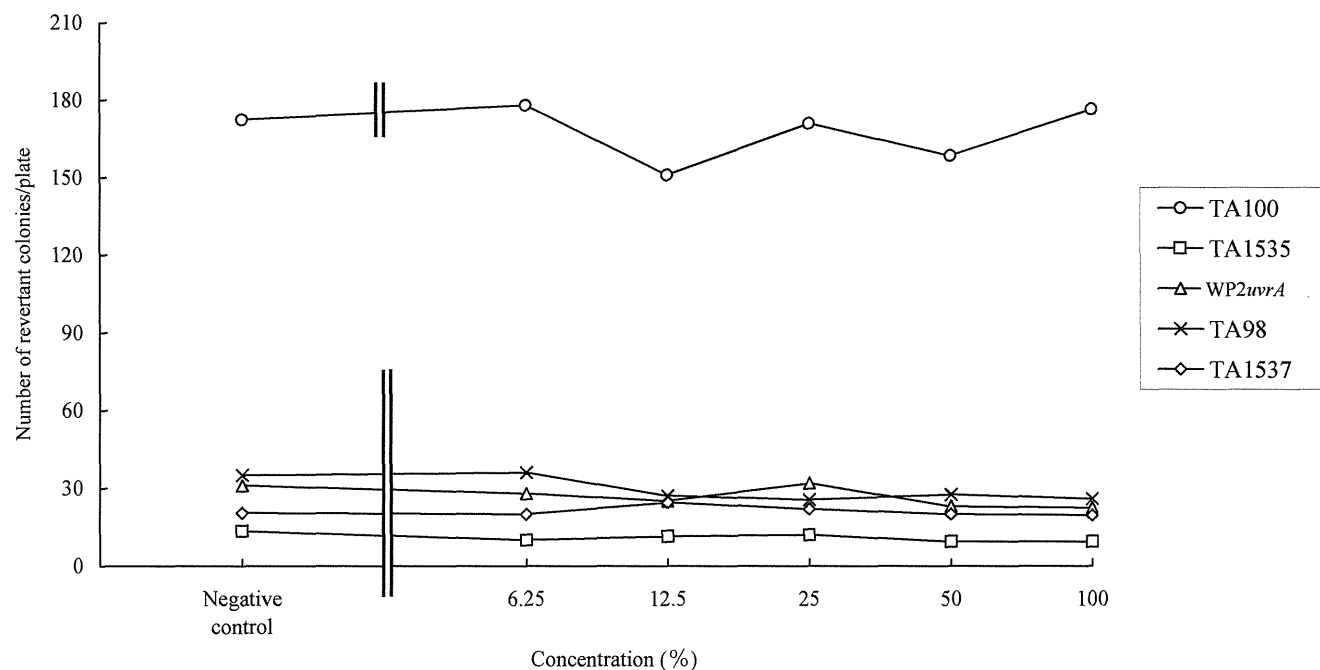


Figure 2-2. Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria.
(mutagenicity test: with S9 mix)

Table 5-1 Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria (mutagenicity test)

S9 mix		Concentration (%)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2 <i>invrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (-)	Negative control	0	164	12	46	34	22
			174 (169)	19 (16)	52 (49)	34 (34)	24 (23)
	Artificial red cells	6.25	120	8	27	30	16
			161 (141)	8 (8)	34 (31)	33 (32)	20 (18)
		12.5	134	11	31	22	17
			135 (135)	13 (12)	36 (34)	30 (26)	24 (21)
		25	130	11	39	20	20
			136 (133)	13 (12)	44 (42)	24 (22)	20 (20)
		50	113	8	34	21	14
			146 (130)	15 (12)	39 (37)	28 (25)	20 (17)
		100	134	11	22	24	16
			167 (151)	11 (11)	22 (22)	28 (26)	18 (17)
	Positive control	Name	AF-2	NaN ₃	AF-2	AF-2	9AA
		Concentration (µg/plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
		Number of revertant colonies/plate	594	580	110	353	386
			609 (602)	656 (618)	135 (123)	383 (368)	475 (431)

Negative control : Saline.

AF-2 : 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide; NaN₃ : Sodium azide; 9AA : 9-Aminoacridine hydrochloride.

() : Mean

No precipitates were noted at any concentration on the surface of agar plate.

No growth inhibition of tester strains was observed.

Table 5-2 Reverse mutation test of Artificial red cells with bacteria (mutagenicity test)

S9 mix		Concentration (%)	Number of revertant colonies/plate				
			Base-pair substitution type			Frameshift type	
			TA100	TA1535	WP2 <i>invrA</i>	TA98	TA1537
S9 mix (+)	Negative control	0	165	13	30	35	17
			180 (173)	14 (14)	32 (31)	35 (35)	24 (21)
	Artificial red cells	6.25	170	7	20	34	17
			186 (178)	13 (10)	36 (28)	38 (36)	23 (20)
		12.5	141	11	24	25	24
			161 (151)	12 (12)	26 (25)	29 (27)	25 (25)
		25	165	12	31	23	19
			177 (171)	12 (12)	33 (32)	28 (26)	25 (22)
		50	146	9	22	26	17
			171 (159)	10 (10)	24 (23)	29 (28)	23 (20)
		100	160	8	21	23	18
			193 (177)	11 (10)	24 (23)	29 (26)	21 (20)
	Positive control	Name	2AA				
		Concentration (µg/plate)	1	2	10	0.5	2
		Number of revertant colonies/plate	1089	386	1140	437	246
			1168 (1129)	406 (396)	1205 (1173)	449 (443)	255 (251)

Negative control : Saline.

2AA : 2-Aminoanthracene.

() : Mean

No precipitates were noted at any concentration on the surface of agar plate.

No growth inhibition of tester strains was observed.

C. 結果

1. 用量設定試験 (Table 4-1、4-2及びFigure 1-1、1-2)

1.1. プレート上の析出物

S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、培養開始時及び培養終了時にプレート上の析出物は認められなかった。なお、S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、3%以上の濃度において培養開始時には赤色、培養終了時には茶色の着色が認められた。

1.2. 菌の生育阻害

S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、いずれの菌株においても菌の生育阻害は認められなかった。

1.3. 復帰変異コロニー数

S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性対照の2倍未満であった。

1.4. 対照物質

陽性対照では、復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、陰性対照では、試験施設のバックグラウンドデータの平均 ± 2 S.D.の範囲内にあった。

1.5. 無菌試験

被験物質原液 (100%) 及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

2. 本試験 (Table 5-1、5-2及びFigure 2-1、2-2)

2.1. プレート上の析出物

S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、培養開始時及び培養終了時にプレート上の析出物は認められなかった。なお、S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、6.25%以上の濃度において培養開始時には赤色、培養終了時には茶色の着色が認められた。

2.2. 菌の生育阻害

S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、いずれの菌株においても菌の生育阻害は認められなかった。

2.3. 復帰変異コロニー数

S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、いずれの菌株においても復帰変異コロニー数は陰性対照の2倍未満であった。

2.4. 対照物質

陽性対照では、復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、陰性対照では、試験施設のバックグラウンドデータの平均 ± 2 S.D.の範囲内にあった。

2.5. 無菌試験

被験物質原液 (100%) 及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

D. 結論

人工赤血球の遺伝子突然変異誘発性の有無を、細菌を用いる復帰突然変異試験により検討した。人工赤血球は、S9 mix無添加及びS9 mix添加とも、いずれの菌株のすべての濃度において、復帰変異コロニー数は陰性対照の2倍以上に増加しなかった。

無菌試験では、被験物質の最高濃度液及びS9 mixに雑菌の混入は認められなかった。

陽性対照では、復帰変異コロニー数が陰性対照の2倍以上に増加し、陰性対照では、試験施設のバックグラウンドデータの平均 ± 2 S.D.の範囲内にあった。用量設定試験及び本試験には再現性が認められた。

以上の結果、当試験の条件下において、人工赤血球に遺伝子突然変異誘発性はないと判定する。

(参考文献)

労働省安全衛生部化学物質調査課 (編)：安衛法に

おける変異原性試験ーテストガイドラインとGLP
ー、中央労働災害防止協会、平成3年3月

3. ヘモグロビン小胞体のβプロピオラクトン
による殺菌効果に関する検討

A. 研究目的

Hb小胞体の製造工程において、最終段階で滅菌
操作を導入することが望まれている。しかし、そ
の粒子径が250nmであるため、滅菌フィルタを低圧
で透過させることが出来ない。そのため、他の滅
菌法の可能性を追求している。既に当研究班では、
β-プロピオラクトン(BPL)の有効性についてある
程度の確認をしている。BPLは血液製剤等の微生物
不活化剤として利用されているので、Hb小胞体の
製造工程にも導入出来るものと考えている。しか
し昨年度、BPL添加法について、耐性のある芽胞
(*Bacillus subtilis* spores)の添加系においては、十分
な殺菌効果が得られなかった。そこで、本年度は
継続して芽胞の殺菌について継続検討し、芽胞の
発芽を促進させてからBPLを添加する方法の可能
性を検討した。

B. 実験方法 (Test No. SN-2013-0560)

硝子バイアル瓶に封入したHb小胞体分散液(10mL,
計5本, 攪拌子入り)に対し、*Bacillus subtilis* spores
ATCC 6633を0.1 mL添加した(10^6 colony forming
unit (CFU)/0.1 mL)。バイアル瓶を37℃、または50℃
にてインキュベートし(Table 1)、芽胞の発芽を促
進させた。次いで、BPLをマイクロシリンジで5ま
たは10 μL注入しそれぞれ、0.05または0.10%になる
ように設定した。10分程度攪拌したのち、37℃に
て2時間インキュベートした(150±10 rpm)。その後、
1 mLを9 mLの生理食塩水で段階的に希釈した。各

希釈系列から1mLを採取し、滅菌済みのペトリ皿
に播種し(x 3)、20mLのSoybean-Casein Digest (SCD)
agarを添加した。30-35℃にて5日間培養し、CFU
(colony forming unit)を計測した。

Hb小胞体分散液への芽胞の接種とBPLの添加は、
早稲田バイオサイエンスシンガポール研究所にて
実施した。また、菌体の培養とCFU計測は Charles
River社 (33 Ubi Ave 3, #06-13/14, 27-29 Vertex,
Tower B, Singapore 408868)にて実施した(2013年に
社名がBRASSからCharles River に変更)。

(検体)

Hb小胞体分散液(Lot 30-May-2013)

(菌体)

Bacillus subtilis spores ATCC 6633

1.70×10^6 CFU/0.1 mL

Table 1. Test variables in each test run

Test Run	Variables		
	Germination condition		BPL concentration
	Germination Temperature (°C)	Germination Duration (hr)	
1	37	1	0.05%
2	37	3	0.10%
3	50	1	0.10%
4	50	3	0.05%

C. 結果および考察

芽胞(*Bacillus subtilis* spores ATCC 6633)に関する
結果をTable 2, 3に示す。Hb小胞体へのBPL添加量
が0.100%のところLog reductionは0.40-0.50に留
まった。従って、芽胞に対してはBPLの効果は限定
的であることが確認された。

β-プロピオラクトンの作用機序は、ラクトン環が
水溶液中で開環し、DNA鎖に結合することにより、
バクテリアやウィルスの不活化が行なわれるとい
うものであり、広く血液製剤に使用されている。
昨年度の実験では、*Staphylococcus aureus* および

Table 2. Log reduction of *Bacillus subtilis* from the positive control counts.

Test Run No.	Replicate	Estimated CFU/mL	Log ₁₀ Result	Average Log ₁₀ of Positive Control	Log Reduction
1	A	2.01 × 10 ⁵	5.30	5.38	0.07
	B	2.27 × 10 ⁵	5.36		0.02
2	A	9.10 × 10 ⁴	4.96	5.46	0.50
	B	9.40 × 10 ⁴	4.97		0.48
3	A	1.03 × 10 ⁵	5.01	5.42	0.41
	B	1.05 × 10 ⁵	5.02		0.40
4	A	2.32 × 10 ⁵	5.37	5.41	0.05
	B	2.01 × 10 ⁵	5.30		0.11

Table 3. Log reduction results shown in the context of the experimental design

Test Run	Test Variables Studied			Outcome (Log reduction against respective positive control)	
	Germination Temperature (°C)	Germination Duration (h)	BPL Concentration (% v/v)	A	B
1	37	1	0.05	0.07	0.02
2	37	3	0.10	0.50	0.48
3	50	1	0.10	0.41	0.40
4	50	3	0.05	0.05	0.11

*Pseudomonas aeruginosa*の添加系においては、BPLの十分な殺菌効果が見出されたが、芽胞(*Bacillus subtilis* spores)の添加系においては、十分な殺菌効果が得られなかった。文献(Wikipedia)によれば、芽胞を作る細菌は限られており、有芽胞菌あるいは芽胞形成菌として、細菌を分類する上での指標の一つにされている。有芽胞菌の中にはアンフィバシラス属、今回使用したバシラス属、クロストリジウム属、スポロサルシナ属などが存在する。このうち、バシラス属とクロストリジウム属が、病原性や微生物の有効利用などの面から、ヒトに対する関わりが深く、代表的な有芽胞菌として取り上げられている。芽胞を作る能力を持った細菌が、栄養や温度などの環境が悪い状態に置かれたり、その細菌に対して毒性を示す化合物と接触したりすると、細菌細胞内部に芽胞が形成される。このとき、細菌の遺伝子が複製されてその片方は芽胞の中に分配される。芽胞は極めて高い耐久性を持っており、さらに環境が悪化して通常の細菌が死滅する状況に陥っても生き残ることが可能である。

しかし、芽胞の状態では細菌は新たに分裂することはできず、その代謝も限られている。このため芽胞は耐久型、休眠型と呼ばれることがある。生き残った芽胞が、再びその細菌の増殖に適した環境に置かれると、芽胞は発芽して、通常の増殖・代謝能を有する菌体が作られる。芽胞に特化した滅菌方法として間欠滅菌と呼ばれる方法がある。間欠滅菌とは、材料を一旦煮沸したあと一晩室温で放置し、再び煮沸する作業を3回繰り返すもので、室温で放置している間に芽胞が発芽して栄養型になることを利用した方法である。

デオキシ型Hbの変性点は80℃なので、温度の上げ下げでどこまで芽胞の増殖を抑えることができるか、検討する必要があると考え、今回、37℃および50℃にてインキュベートして発芽させることを試みた。しかし、Log Reductionは限定的であった。これは今回の発芽の条件が不十分であったことを意味している。これまでの結果から、Hb小胞体の滅菌工程については、BPLを添加する方法は滅菌を促進はするものの、完全な滅菌を保証するも

のでは無いことが解った。従って、継続して他の無菌化法を今後も探索する必要がある。しかし、我々は無菌試験によって菌が無いことを実証したHb小胞体を何度も製造しているので、製造工程を完全な無菌管理下に置く事によりHb小胞体は製造出来るものと考えている。

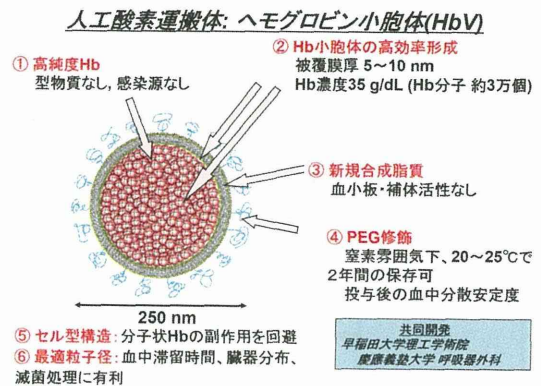


図 1 ヘモグロビン小胞体の特徴

4. 肺切除周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体の投与効果

A. 研究目的

人工酸素運搬体として開発されたヘモグロビン小胞体(HbV)はヘモグロビンを内包させたリポソームで、期限切れ輸血用ヒト赤血球よりヘモグロビンを抽出、精製、ウィルス不活化を行ったのち、リポソームに内包、膜表面をPEG修飾して粒径を250nm、 P_{50} は32Torrに調製した粒子である(図1)。血液中で酸素運搬体として機能することは、ラットやビーグルにおける交換輸血試験で確認され、90%の脱血交換試験でも生存が可能であった。出血性ショックの蘇生に用いた場合も良好な成績が得られている。手術中の出血に対する投与により、輸血の回避が可能となると期待されている。

本研究は、慶應義塾大学医学部にて実施された(実施者: 河野光智、重信敬夫、神山育男、渡辺真純、堀之内宏久、小林紘一)。

B. 方法

肺切除術中に大量出血する動物モデルとして、マウスに40%交換輸血を行い、同時に左肺全摘術を行うモデルを作成した。HbV投与の有効性と安全性を検討し、主要臓器の低酸素状態を組織学的及び低酸素誘導因子hypoxia-inducible factor 1alpha

(HIF-1alpha)の発現で評価した。

C57BL/6マウスを麻酔後、頸動脈にカテーテルを挿入し、試料溶液で循環血液量の40%を交換する。人工呼吸器下に左肺全摘術を施行する。輸血、輸液を替え以下の4群を作成する。

実験群

- (1) Lactate Ringer溶液 (LR)群
- (2) 5%アルブミン生食液(rHSA)群 : 25%ヒトアルブミンを生理的食塩水に5%濃度となるよう溶解した液体
- (3) マウス保存血液(sRBC群): マウス洗浄赤血球を生理的食塩水に再分させHb濃度を8.6 g/dlに調整した液体
- (4) ヘモグロビン小胞体分散液(HbV群): Hb小胞体を5%アルブミンに分散した液体

Hb濃度は8.6 g/dlに調整する。術後7日目まで観察を行い、血中のサイトカイン測定を行った。肝臓および腎臓でのHIF-1alphaの発現を免疫染色で評価した。

C. 結果

LR群は術後1日までに全例が死亡した。rHSA群は7日目の生存率が50%であったのに対し、sRBC群とHbV群では全例が生存した。rHSA群では術後3日目に体重が最低となったが、sRBC群やHbV群では減少率が低く、回復が早い傾向を認めた(図2)。

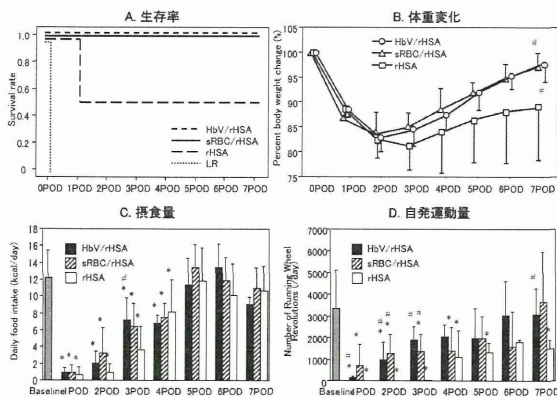


図2 マウス肺全摘術周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与の効果

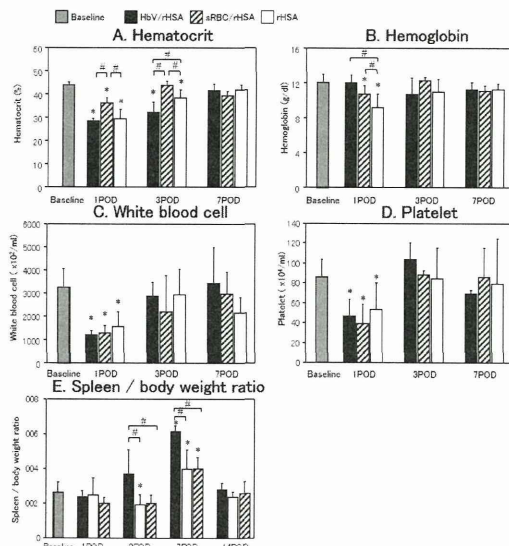


図3 マウス肺全摘術周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与の血算および脾臓重量の変化

HbV投与後、ヘマトクリット値や赤血球数の回復に影響はなく、白血球数や血小板数への影響も認められなかった。HbVは脾臓で捕捉されるため、一時的に脾腫を認めるが、14日までには改善した(図3)。組織学的にrHSA群では肝細胞の空胞変性が著明で遷延したのに対し、sRBC群やHbV群では肝細胞の変性は限局的で7日目までには回復していた(図4)。HbV群では肝臓および腎臓でのHIF-1 α の発現がsRBC群と同等に抑制されていた(図5)。

D. 考察

HbVによる40%交換輸液では、肺全摘術後にマウス全例が生存し、主要臓器の低酸素も回避されて

いた。肺全摘による呼吸機能低下状態でもHbVが有効に機能し、外科的侵襲からの回復過程に深刻な影響を与えなかった。

E. 結論

HbV投与は肺切除手術の出血に対しても有効であると考えられた。

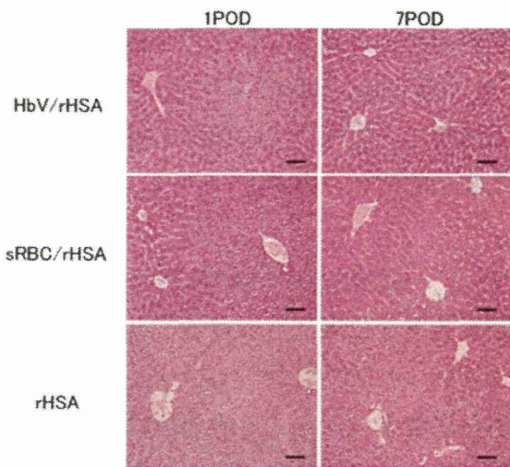


図4 マウス肺全摘術周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与後の肝臓の組織像

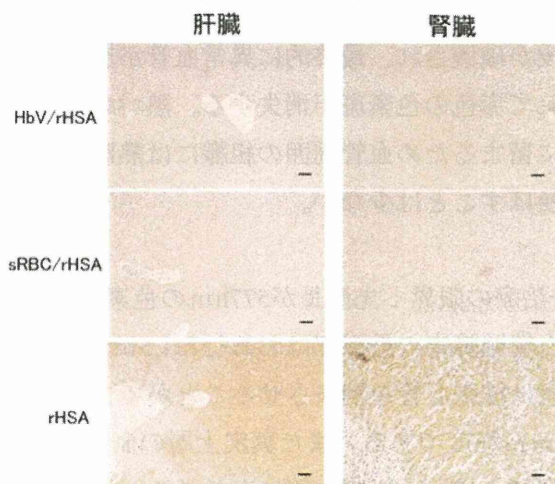


図5 マウス肺全摘術周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与後の肝臓及び腎臓でのHypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α)の発現

5. 人工赤血球を利用してport-wine stainのレーザー治療成績を向上させる研究

A. 研究目的

疾患について：単純性血管腫は皮膚毛細血管の拡張による平坦な赤色斑である。新生児0.3%にみられ、新生児の色素性皮膚病変としては頻度の高い疾患であり、一般には「赤あざ」は呼称される。単純計算では1年に30万人もの患者が国内で発症する。患部の血管壁は先天的に平滑筋層を欠いており、血管が病的に拡張しているため患部皮膚が赤色を帯び、port wine - stainとも呼ばれる。自然治癒することはない、成人例では患部の皮膚に凹凸が出現し色調は暗紫色となる。

治療について：拡張血管のみ消失させ傷跡なく、患部の色調を健常な皮膚に近づけることを目標としてレーザー治療が1970年代に導入された。レーザー光の条件を適切に設定すると、その熱エネルギーは標的とする組織に選択的に蓄積され、かつ周囲の組織には波及しない。単純性血管腫の治療では、レーザー光が血管内赤血球のヘモグロビンに吸収され、熱エネルギーに変換される。この熱エネルギーが血管壁に伝わり血管内皮が破壊され、最終的に異常血管が壊死し吸収されて赤色の色素斑が消失する。熱エネルギーは血管内に留まるため血管周囲の組織には熱影響の障害を及ぼすことは少ない。

レーザー治療の限界：光波長が577nmの色素レーザーによる血管壁障害の最深部はおおむね1.5mmであり、有意に拡張血管を消失させることができる深さは0.6mm程度である。また真皮上層の血管径が中程度（ $38 \pm 18 \mu\text{m}$ ）の血管に有効であったとする報告もある。このようにレーザー治療には光の物理学的な限界があるため、繰り返しレーザー照射をおこなってもわずかな色調の改善にとどまる病変も多く存在する。私の臨床経験では1回の照射で赤色斑のほとんどが消退した症例は708例中2例のみであ

る。以下にレーザー治療に反応しにくい単純性血管腫の特徴を挙げる。

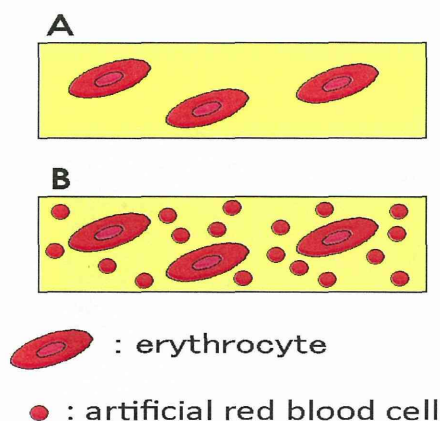
- 1) 病変が真皮層深部に存在する病変では、レーザー光が標的となる赤血球に届かないため治療効果が小さい。
- 2) 異常血管の血管径が非常に細い病変では、血管内の赤血球が少なく熱エネルギーが十分発生しないので。治療効果が小さい。
- 3) 異常血管内の血液の流速が速い病変では、熱エネルギーが血管壁に効率よく伝導しないため、治療効果が小さい。

708症例の治療成績をまとめたところ、治療回数が2回以下の症例は69%、3～5回は20%、6回以上レーザー治療を行った症例は11%であった。レーザー治療に反応しにくい治療抵抗性の単純性血管腫が10～20%ほど存在することが判明した。

打開策（他施設からの報告）：レーザー治療は赤色が強い病変ほど効果が高いため、タッピング・加温・駆血などによって色調を回復させてから照射を行う工夫が報告されているが、治療成績向上に大きなインパクトを与えるものではない。血管内にヘマトポフィリンやインドシアニグリーンを投与した後に、特殊なレーザー光を患部に照射して血管内で薬剤の酸化還元反応を起こし単純性血管腫の治療を行うphotodynamic therapyの報告もあり、中国では1000人以上の患者がこの治療をすでに受けている。従来の色素レーザー治療と組み合わせることで良い結果を得ているようである。しかし少量の薬剤投与と光線療法を組み合わせる血管壊死に至らせるこの治療方法は、その安全性の確保ため日光を含めた身体に浴びる光線量を術後数日間厳重に管理する必要があり、このような治療プロトコルは日本での小児例では使用できない。

本研究の意義（人工赤血球を利用するidea）：人工赤血球の直径は生体赤血球の40分の1と小さいため、人工赤血球を静脈投与すると、人工赤血球

は生体赤血球の間を埋めるように血管内に存在する。直径の大きな赤血球を患部に集中させるタッピング・加温・駆血・自己血輸血などの工夫に比べ、粒子径のより小さいヘモグロビン担体を血管内に投与する方法は、効果的に毛細血管内のヘモグロビン量を増やすことができると考えられる。血管内の標的が増えればレーザー光は効率よく熱エネルギーに変換されるようになり、今まで色素レーザー治療が不得手としていた直径の細い異常血管に対して特に優れた治療になると期待できる。臨床応用への必要性・実現性の高い研究である。人工赤血球を用いずに人赤血球を輸血する方法では、生体赤血球どうしが反発しあって距離をおくため、有効な毛細血管内のヘモグロビン濃度上昇には結びつかないと考えられる。(下図参照)



本研究は、千葉労災病院形成外科・部長 力久直昭によって実施された。

B. 研究方法

1. 試験系およびセッティング

鶏冠を利用したvivo studyを行った。ニトリの鶏冠を単純性血管腫のモデルとして実験を行った。鶏冠の表皮にはメラニンがほとんど存在しない、また真皮層には拡張した毛細血管が存在し、この拡張した血管が単純性血管腫の組織病理像と類似している。単純性血管腫研究に鶏冠が初めて使われたのは

1966年であり、以来頻繁に動物モデルとして使用されている。

実験1：安楽死させた鶏の頸動脈から直接人工赤血球を注入し、鶏冠の毛細血管を組織学的観察した。

実験2：循環血液量の10%量の人工赤血球をセボフルン吸入麻酔下に鶏へ静脈投与し、鶏冠毛細血管を血流マイクロスコープ（インテグラル社）で観察し動画で記録した。臨床応用を考慮し実現性の高い人工赤血球の投与量に設定した。

実験3：環血液量の10%量の人工赤血球を塩酸ケタジと塩酸キシラジン混合液の腹腔投与麻酔下にラットに静脈投与し、角膜毛細血管を顕微鏡で観察した。



図1 ラットの眼球を示す

実験4：鶏の循環血液量の10%量の人工赤血球をセボフルン吸入麻酔下に静脈投与し、鶏冠の赤みの変化を定量的記録した。測定にMexameter MX16（インテグラル社）を用いた。

実験5：鶏の循環血液量の10%量の人工赤血球に静脈投与したときの、血液のレーザー光吸光度の変化を測定した。

実験6：セボフルン吸入麻酔下に下記の条件で色素レーザーを照射し鶏冠毛細血管を組織学的に観察した。実験群を2群（人工赤血球非投与群：A群と投与群：

B群), 照射条件を4種類 ($6 \cdot 8 \cdot 10 \cdot 12 \text{ J/cm}^2$, 10ms)、組織採取および観察時期を4回(照射直後, 照射後4日目, 10日目, 15日目)とした。レーザー照射条件は、予備実験を繰り返し、照射によって直接血管が破裂してしまうことが少ない4設定とした。また組織標本にHE染色・AZAN染色・エラスカ・ワングーソン(EVG)染色・鉄染色を行い顕鏡した。

C. 結果

実験1 人工赤血球は生体赤血球に比べて毛細血管内を空隙なく充たすように流れることが可能で、血管内皮の近くを流れることが可能であることが示唆された。(参照：図2と図3)

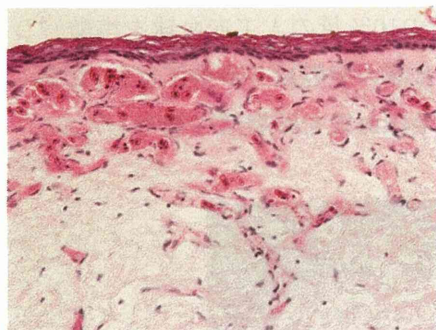


図2 人工赤血球投与群 400倍



図3 非投与群 400倍

実験2: 鶏の循環血液量の10%量の人工赤血球に静脈投与したとき、鶏冠毛細血管が拡張することが確認された。(参照：図4と図5)

実験3: ラットの循環血液量の10%量の人工赤血球に静脈投与したとき、角膜毛細血管が拡張することがわかった。(参照：図6と図7)



図4 人工赤血球投与前の鶏冠毛細血管

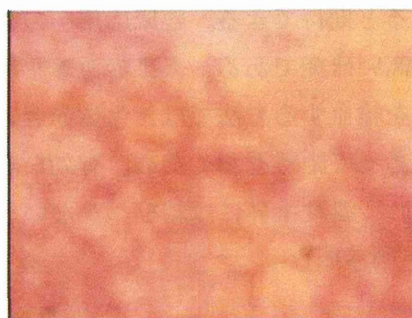


図5 人工赤血球投与後の鶏冠毛細血管



図6 人工赤血球投与前の角膜毛細血管



図7 人工赤血球投与後の角膜毛細血管

実験 4：鶏の循環血液量の 10%量の人工赤血球に静脈投与したとき、鶏冠の 568 nm の吸光度は投与前の 1.05 倍となった。

表 1 鶏冠の赤み測定結果

測定回数	投与前	投与後
1 回目	806	869
2 回目	809	855
3 回目	810	851
4 回目	825	853
5 回目	805	861
6 回目	807	862
7 回目	805	842
8 回目	820	861
9 回目	811	861
10 回目	798	858
11 回目	804	863
12 回目	821	853
13 回目	816	850
14 回目	814	845
15 回目	810	848
16 回目	799	858
17 回目	815	862
18 回目	821	869
19 回目	818	862
20 回目	806	867
中央値	810	859.5
平均値	811	857.5



図 8 上記鶏冠○内の赤みをMexameter MX16を用いて測定し、その変化を定量化した。

実験5：鶏の循環血液量の10%量の人工赤血球に静脈投与したとき、血液のレーザー光吸光度は投与前の

1.34倍～1.40倍となった。

表 2 測定結果

	585nm 吸光度	585nm 吸光度
Hb-V 投与前	0.296 (100 倍希釈)	0.532 (60 倍希釈)
Hb-V 投与後	0.392 (100 倍希釈)	0.746 (60 倍希釈)

実験6：レーザー照射後経時的に組織を観察すると以下に示す変化があった。

- ・照射直後：血管の拡張（充血期）
- ・4日目：血栓期
- ・10日目：血栓吸収期
- ・15日目：壊死血管の吸収期・血管再生期

また、人工赤血球投与の有無によって以下のような組織学的な差が観察された。

表 3 人工赤血球投与の効果

	Hb-V 非投与群	Hb-V 投与群
角質の損傷	あり(水疱形成)	なし
表皮の空胞・肥厚	あり	なし
残存毛細血管	少ない	少ない
組織球の浸潤	軽度	著明
Hb-V 塞栓	なし	あり

人工赤血球投与の投与群および非投与群ともに真皮内毛細血管が減少していることは確認できたが、毛細血管減少を定量的に解析するまでは至らなかった。(図 9、10)

D. 考察

生体赤血球の細胞膜は陰性荷電を有しており、同じく陰性荷電している赤血球や血管内皮細胞と反発し合って、それぞれが接着しないように血管の中を血漿という流体に乗って流れている。したがって毛細血管を顕微鏡で観察すると毛細血管内

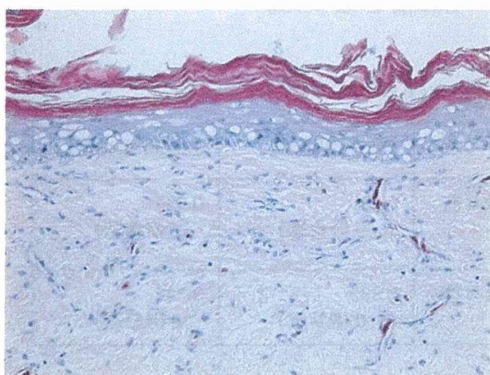


図9 人工赤血球非投与群レーザー照射後15日目の組織像（H E 染色 400倍）

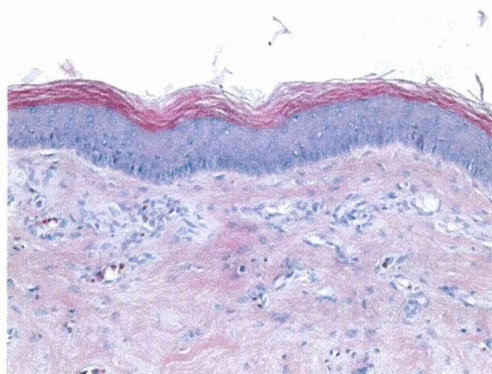


図10 人工赤血球投与群レーザー照射後15日目の組織像（H E 染色 400倍）

は赤血球がまばらに存在し一定の空隙が観察される（図3）。実験1で人工赤血球を動脈から注入したところ、動注された人工赤血球は生体赤血球と混じりながら毛細血管内に充満することが分かった（図2）。人工赤血球が血管内皮細胞に近接するこの状態は、レーザー照射後にヘモグロビンから産生される熱エネルギーを効率よく血管内皮に伝えることが可能な状態である。仮説で説いた人工赤血球投与によって毛細血管内のヘモグロビン濃度が上がることを示唆するものとも考える。

実験2・3から循環赤血球の10%量の人工赤血球の静脈投与によって毛細血管が拡張することが分かった。ニトリとラットと異なる生物で毛細血管の拡張だけにとどまらず、画面全体の赤みが増している。実験1のようなプレート切片的の薄い標本の観察ではなく、生体そのものを真上から実態顕微鏡で観察している。このため組織深部の血管拡張が画面

全体の赤みの増強に現れたものと考えられた。皮膚に届くレーザー光を受け止める血管の容積が増える可能性を示唆しており、今までヘモグロビンに当たることなく皮膚内で乱反射・減衰していった光エネルギーがより多くのターゲットを捉えるようになり、治療に寄与することが予想される。

実験4では、実験2で肉眼的に観察した毛細血管の拡張を定量化することを試みた。数値的には1.05倍の赤みの増加にとどまった。測定の精度を上げることが必要かもしれない。

実験5では、循環赤血球の10%量の人工赤血球の静脈投与によって、血液そのもののレーザー光の吸光度が1.4倍になることが分かった。より多くのレーザー光が血液に吸収されることでレーザー治療成績の向上につながるものと期待ができる。

実験6では、鶏冠にレーザーを照射してから経時的に鶏冠の組織学的観察を行った。人工赤血球投与によって、角質の損傷、水疱形成、表皮の空胞化などの熱傷を想起させる軟部組織の損傷が軽減することがわかった。人工赤血球非投与群は真皮からの反射光が下方から再び表皮のメラノゾームなどに吸収され空胞・水疱が形成されたのかもしれない。そして一方の投与群では血管の吸光度と体積が上がり、血管内で償却されるエネルギー量が大きくなったために真皮からの反射光が抑えられ表皮の空胞化が抑制されたと考えたと実験6の結果を説明することができる。

単純性血管腫の治療レーザー機器は現在第三世代を迎えている。1回目の世代交代ではレーザー波長が変更され、アルゴンレーザーから色素レーザーとなった。波長変更の目的はヘモグロビンを含む血管選択性の向上を狙ったもので、これにより治療後の熱傷発生が極端に減り、合併症の少ない治療が可能になった。2回目の世代交代は、パルス幅の変更であり、組織深部の血管を治療することが可能になった。

このようなレーザー光の血管選択性が向上することによって熱傷が減ったレーザー治療の歴史視点から、実験6の結果は人工赤血球の投与によってレ

レーザー光の血管選択性が向上したと考えることができる。

E. 結論

人工赤血球を生体に投与することで、レーザー光の血管選択性（血管に光が吸収され、他の皮膚構造物に吸収されないこと）が向上することが、*in vivo*, *in vitro*, 光学的観察、組織学的観察から示された。より多くの熱エネルギーが標的とする血管に選択的に蓄積されことから熱傷などのレーザー治療の合併症を軽減することが可能になり、レーザー治療の安全性向上に寄与することが示唆された。

今後は毛細血管の内皮を直接観察し、人工赤血球の投与によって標的血管が効率よく壊死に至るようになるか解析する予定である。

6. 酸素輸送をする臓器灌流液としての人工赤血球の可能性について

A. 研究目的

形成外科医が専門とするマイクロサージャリーの進歩により、切断肢再接着術や自家複合組織移植術など微小血管吻合を必要とする移植手術が多様化してきている。また、免疫抑制剤や骨髄移植との併用療法などの移植後療法についての研究開発も進歩は著しく、同種移植の対象が拡大してきている。心臓・肝臓・腎臓・肺・小腸など生命に直結する臓器移植はもとより、国際的には形成外科分野の顔面移植、四肢移植なども盛んに行われてきており、この傾向はますます強まっていくものと思われる。しかしここで大きな問題がある。一つ目の問題は、切断四肢再接着において、虚血時間が長くなってしまった場合、再接着に一旦は成功しても、活性酸素などによる虚血再還流障害

という重篤な合併症を起こし、再切断を要することや、場合によっては死に至ることである。（横紋筋は6時間で虚血障害が発生）。二つ目の問題点は、同種移植においては、慢性的ドナー不足である。

マイクロサージャリーを要する緊急再接着術を行える高次機能医療施設はある程度限られており、特に医療過疎地域では受け入れ可能な病院を探している間に虚血時間が長くなってしまう例や、患者の全身状態不良の場合にその治療が優先されるため切断組織はしばしばあきらめざるをえないといった例は少なくない。そこで酸素徐放性をもつ溶液と酸素運搬能の優れた物質の融合でこれまでにない保存液を作り、切断端や移植片の動脈に注入することで、血流再開までの虚血時間を延長することができれば、上記の問題点を解決できると考えた。ドナー不足に関しては、移植組織の中へ長距離輸送が可能となれば、ドナーの死後まもなく採取された組織・臓器が国境を越え、移植されることも可能となる。ドナーが増えるわけではないが、移植対象が大幅に増えることで恩恵に得る移植待ちレシピエントは格段に増えることが予想される。

従来の臓器保存の開発は、移植片の細胞・組織のダメージをいかに少なくするかという視点で考えられてきた。しかし、組織のダメージや再還流障害の本質は、細胞の長期間に及ぶ酸素欠乏にある。我々はこれまでの保存液に人工酸素運搬体を加えることで移植片に酸素供給ができるような、革新的な臓器保存液の開発を目指す。

基礎となる溶液としては京都大学で開発された「ET-Kyoto液」を用いる。これはストレス下で細胞保護作用をもたらす非還元性二糖類トレハロースと、低いカリウム濃度（細胞外液型電解質組成）を特長とするもので、肺、腎臓、筋肉、皮膚の保存効果が、University of Wisconsin液、Euro-Collins液やLow Potassium Dextran Glucose液など世界中で汎用されている他の保存液よりも優れていることが示されている。

そして人工酸素運搬体としては、早稲田大学で開発されたヘモグロビン小胞体を用いる。高純度・高濃度のヒトヘモグロビンをリン脂質の二分子層膜で被覆した細胞型の粒子をヘモグロビン小胞体といい、血液型不適合やヘモグロビン毒性の心配もない。これは期限切れのヒト赤血球濃厚液(MAP)から作ることができ、ウィルスなど感染源の混入は一切なく、ラットに投与しても酸素運搬体として優秀な働きをすることが示されている。

この日本発の2つのテクノロジーと、Super-microsurgeryの技術を用いた基礎研究により開発された革新的な組織保存液が、これまでの外傷医療・移植医療のブレイクスルーとなることを期待している。

B. 実験方法

実験動物としてWistar Ratを用いた。Salgado CJ.ら(2010)の報告により、ラットの後肢切断から再接着までの温虚血時間は4時間がヒトの切断肢の6時間に相当し、これが限界であることが知られている。今回の実験では温虚血時間は8時間に設定した。ラット後肢を一旦切断し、保存液を大腿動脈より灌流し、常温で8時間保存した。保存中、大腿静脈より灌流された保存液の、血液ガス分析を行った。灌流後、同所性に再接合術を行い、移植後の生着・機能を観察した。

C. 結果および考察

灌流前に約180mmHgあった保存液中の酸素分圧(pO_2)が、灌流後約20mmHgまで下がり、その後1時間おきの測定にて変化はみられなかった。これは、ET-Kyoto液単独では100 mmHgを推移していたことと対照的である。PCO₂も、HbV群では35-10 mmHgを推移したが、ET-Kyoto液ではほぼ0 mmHgであった。乳酸値は、HbV群で2.0 - 3.5 mMであり、ET-kyoto単独よりも高い値であった (Fig. 1)。常温8時間保存後再接合を行った例で、移植後約100日の生着を確認した。大腿静脈より灌流された保存液

の組成から、人工赤血球が灌流中に酸素運搬体として機能していることが明らかになった。ET-Kyoto単独での灌流は、初期の段階で組織が代謝を停止、壊死したものと考えられた。これまでに報告されている常温保存の限界である4時間を超える8時間の後肢保存後の再接合術が可能であった。平成26年度は、実験数を重ね、有効性を明らかにする。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. H. Sakai, K. Ng, B. Li, N. Sugimura. Swine hemoglobin as a potential source of artificial oxygen carriers, hemoglobin-vesicles. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* 41, 37-41 (2013).
2. M. Fujihara, D. Takahashi, H. Abe, H. Sakai, H. Horinouchi, K. Kobayashi, H. Ikeda, H. Azuma. Primary and secondary immune responses to keyhole limpet hemocyanin in rats after the infusion of hemoglobin vesicle, an artificial oxygen carrier. *Artif. Organs* 38, 234-238 (March, 2014)
3. S. Nagao, K. Taguchi, H. Sakai, R. Tanaka, H. Horinouchi, H. Watanabe, K. Kobayashi, M. Otagiri, T. Maruyama. Carbon monoxide-bound hemoglobin-vesicles as a potential therapeutic agent for the treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Biomaterials* (in press)

(Reviews)

1. 酒井宏水、人工赤血球の開発状況と将来展望. *Anesthesia Network* 18, 37-41 (2014, Jan)
2. H.W. Kim, J.S. Jahr, A. Mozzarelli, H. Sakai. International consortium for development of hemoglobin-based oxygen carriers, oxygen therapeutics and multifunctional resuscitation

- fluids—a white paper. In: Hemoglobin-based oxygen carriers –principles, approaches and current status (H.W. Kim & A.G. Greenburg eds.) Springer-Verlag (Berlin/Heidelberg, Germany). Chapter 39, pp. 737-746 (2013, Dec).
3. T. Ikeda, H. Horinouchi, H. Sakai. Cellular-type hemoglobin-based oxygen carriers as a resuscitative fluid for hemorrhagic shock: acute and long-term safety evaluation using beagle dogs. In: Hemoglobin-based oxygen carriers –principles, approaches and current status (H.W. Kim & A.G. Greenburg eds.) Springer-Verlag (Berlin/Heidelberg, Germany). Chapter 28, pp. 501-526 (2013, Dec).
 4. H. Azuma, M. Fujihara, H. Sakai. Biocompatibility of hemoglobin vesicles, a cellular-type artificial oxygen carrier, on blood cells and plasma proteins in vitro and in vivo. In: Hemoglobin-based oxygen carriers –principles, approaches and current status (H.W. Kim & A.G. Greenburg eds.) Springer-Verlag (Berlin/Heidelberg, Germany). Chapter 22, pp. 385-398 (2013, Dec).
 5. H. Sakai. Cellular-type hemoglobin-based oxygen carriers to mimic the red blood cells structure. In: Hemoglobin-based oxygen carriers –principles, approaches and current status (H.W. Kim & A.G. Greenburg eds.) Springer-Verlag (Berlin/Heidelberg, Germany). Chapter 12, pp. 235-248 (2013, Dec).
 6. 酒井宏水, 堀之内宏久, 東寛, 小田切優樹, 小林絃一. 輸血代替としての人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の安全性試験. 人工血液 21, 36-48 (2013)
 7. H. Sakai. Biocompatibility of a highly concentrated fluid of Hemoglobin-vesicles as a transfusion alternative. In: Selective Topics in Nanomedicine (T.M.S. Chang ed.), pp. 133-147, World Scientific, Singapore (2013)
 8. 酒井宏水. 人工赤血球による生体組織への酸素輸送. 「全人力・科学力・透析力に基づく透析医学」平方秀樹 監修、医薬ジャーナル社. 大阪 (印刷中)
- ## 2. 学会発表
1. 酒井宏水 / 人工赤血球による生体組織への酸素輸送 (シンポジウム) / 第58回 日本透析医学会 学術集会 / 福岡国際会議場 / 2013.6.23
 2. 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、小林絃一、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 (口頭発表) / 第38回西日本薬剤学研究会 / 九州地区国立大学九重共同研修所 / 2013/8/23-24
 3. K. Taguchi, H. Watanabe, H. Sakai, T. Maruyama, M. Otagiri / PRECLINICAL STUDIES OF HEMOGLOBIN-VESICLES AS AN ARTIFICIAL OXYGEN CARRIER IN NON-HUMAN PRIMATE (poster) / 日本薬物動態学会 第28回 年会 / 東京：タワーホール船堀/ 2013/10/9-11
 4. H. Sakai, H. Horinouchi, H. Azuma, M. Otagiri, K. Kobayashi / Artificial red cells (Hb-vesicles) for blood substitutes and oxygen therapeutics /14th International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Chengdu, China / Oct. 18-21, 2013

5. K. Taguchi, H. Watanabe, H. Sakai, T. Maruyama, M. Otagiri / PRECLINICAL STUDIES OF HEMOGLOBIN-VESICLES AS AN ARTIFICIAL OXYGEN CARRIER IN NON-HUMAN PRIMATE (poster) / 14th International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics / Chengdu, China / Oct. 18-21, 2013
6. 太田英伸、李コウ、田口和明、大柿滋、泉仁美、稲垣真澄、岡村州博、小田切優樹、酒井宏水、八重樫伸生 / 妊娠高血圧症候群に対する人工赤血球を用いた治療法の開発 (トピックス講演) / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013.12.6-7.
7. 河野光智、重信敬夫、神山育男、渡辺真純、堀之内宏久、酒井宏水、小林紘一 / 肺切除周術期出血モデルにおけるヘモグロビン小胞体投与とHIF-1 α の発現について / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013.12.6-7.
8. 東 寛、酒井宏水 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)を構成する脂質二重膜のもつ免疫調節効果について / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013.12.6-7.
9. 力久直昭、渡邊彰二、佐藤兼重、酒井宏水 / 人工赤血球を利用してport-wine stainのレーザー治療成績を向上させる研究 / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013.12.6-7.
10. 荒木淳、酒井宏水、加賀谷優、光嶋勲 / ラット後肢移植モデルを用いた人工赤血球の有用性に関する検討 / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013.12.6-7.
11. 東寛、高橋弘典、永井一樹、長森恒久、高橋大輔、藤原満博、酒井宏水 / リポソーム投与後の脾細胞からCon A刺激により産生されるサイトカイン・ケモカイン動態の網羅的解析 / 第20回日本血液代替物学会年次大会 / 奈良県新公会堂 / 2013.12.6-7.
12. 永尾紗理、田口和明、田中遼大、渡邊博志、酒井宏水、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 (口頭発表) *優秀発表賞受賞 / 長崎国際大学 / 第30回日本薬学会九州支部大会 / 2013/12/7-8
13. 酒井宏水 / 人工赤血球(Hb小胞体)の新しい利用法の深求と、シンガポールにおける融合研究拠点の形成 / 第6回生物学・化学・情報科学融合のための戦略的先進理工学研究基盤の形成支援事業シンポジウム / 早稲田大学西早稲田キャンパス / 2013.12.14.
14. 酒井宏水 / 輸血代替としての人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)微粒子分散液の特徴 / 一般社団法人 日本粉体工業技術協会 造粒分科会 平成25年度 技術討論会 / ライオン(株)伊豆高原研修センター / 2014. 3.7.
15. 酒井宏水、Li Bing、Lim WeiLee / 体内電子供与系の活用による人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)の機能復元 / 日本化学会第94春季年会 / 名古屋大学 東山キャンパス / 2014.3.27
16. 矢野和彦、石上盛敏、酒井宏水、狩野繁之 / 人工酸素運搬体による重症マラリア合併症の補助療法の開発 / 第83回日本寄生虫学会大会 / 愛媛大学城北キャンパス / 2014. 3.27-28.

3. 報道など

1. 関西テレビ「スーパーニュースアンカー」献血血液が将来的に不足することの解決策の一つとして、人工赤血球が紹介された
(平成25年5月20日(月)16:48～19:00)

F. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況願状況 (発明者, 酒井宏水ほか)

1. 安定保存可能な酸素輸液剤 3,466,516
2. ヘモグロビン小胞体の光還元法 4,181,290
3. メト化防止剤を含有する人工酸素運搬体 4,763,265
4. 配位子置換型輸液製剤 5,020,525

5. US Patent 6,916,303: Photoreduction method for hemoglobin-vesicle
6. US Patent 6,864,094: Method of preserving oxygen infusions.
7. Canadian Patent CA2383977: Method of preserving oxygen infusions.
8. US Patent 7,417,118: Pharmaceutical composition containing artificial oxygen carrier
9. European Patent 1,466,649: Pharmaceutical composition containing artificial oxygen carrier
10. PCT/JP2012/59233 (2012年4月4日出願): 小胞体の製造法. 各国移行済み。