

ではコメントできず)。考慮すべきガイドラインについて、i) 血漿分画製剤のウィルスに対する安全性確保に関するガイドライン、ii) 生物由来原料基準、iii) ヒト又は動物細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウィルス安全性評価について、iv) ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について、v) 献血血液の研究開発等での使用に関する指針、vi) バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価、vii) 医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床試験安全性試験の実施についてのガイダンス、などがあり資料を頂く。

3) 人工赤血球が臓器保存液としても有効であることが解って来た。市販の臓器保存液は医薬品には該当しないと聞かすが、人工赤血球も、この場合は医薬品には該当しないと考えて良いか。

本件については、厚生労働省 医薬食品局 監視指導・麻薬指導対策課に相談すべきである。

4) その他

反復投与毒性試験については、全ての薬剤について必須のものでは無い。臨床において単回投与を前提としているものであれば、反復投与毒性試験は必要が無い可能性、或は投与期間が短くなる可能性もある。従って、臨床における適用を想定した毒性試験プロトコルの決定が必要となる。不必要な動物試験は極力避けるべきとの意見を頂いた。

事前面談では質問に対して十分な回答は出来ないため、対面助言に進むべき。

(補足事項)

独立行政法人 医薬基盤研究所「創薬ナビ」の活用

「創薬ナビ」面談

2014年8月6日 11:00 – 12:00

出席者： 酒井 宏水(奈良県立医科大学 教授)

創薬ナビ担当者(敬称略): 中西理、宮坂忠与、安達栄樹、渡辺耕三

人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の研究開発の状況と、実施企業が見つからない現状について、酒井から説明するとともに、課題について議論を行なった。

1) 人工赤血球の原料である期限切れ赤血球の供給について、安定供給をどうするか。行政から何らかの支援が必要か。

(酒井)「期限切れ赤血球の有効利用」が、1980年代に人工赤血球の研究が始まった契機である。献血血液の供給体制の整備(集約化)が進み、期限切れ赤血球が減少している(2010年: 41,148単位)。しかし期限切れは潜在的に予想以上に多く存在すると言われている。また輸血治療が存在する限り、期限切れ赤血球が無くなることはあり得ず、これを有効利用する課題は存続する。現在は学術研究用として日赤から非使用赤血球(ALT検査落ち)を頂いて研究に使用している。ALT基準については変更されるとのことで、ALT検査落ち赤血球の量は低下すると考えられるが、非使用赤血球(期限切れ, 不規則抗体)が無くなることは無いと考えられるので、これを全国規模で医療機関から効率よく集めるシステムの構築が必要となる。本件については、臨床治験まで進んだ時点で、厚労省、日赤とも協議したいと考えている。

他方、動物血由来(ウシ、ブタ)のヘモグロビンから

人工赤血球を同様に調製出来る事を確認している。

2) 企業が共同しやすい環境を作る必要あり。ヒトに投与し、安全性が確認されるという実績を先ず作ること。大阪大学では、GMP製造設備を自前で設置し、学内で製造から医師主導臨床試験までを全て実施使用としている。これがモデルケースになるか。

(酒井) 医師主導の臨床試験をすることとし、「橋渡し研究支援」の公的資金を活用して進めたい。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. 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* 35, 6553-6562 (2014)
2. H. Sakai, B. Li, W. Lim, Y. Iga. Red blood cells donate electrons to methylene blue mediated chemical reduction of methemoglobin compartmentalized in liposome in blood. *Bioconjugate Chem.* 25, 1301-1310 (2014)
3. J. Araki, H. Sakai, D. Takeuchi, Y. Kagaya, M. Naito, M. Mihara, M. Narushima, T. Iida, I. Koshima. Normothermic preservation of the rat hind limb with artificial oxygen-carrying hemoglobin vesicles. *Transplantation* (in press)

(Reviews)

1. 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」第6章: 腎性貧血. pp.369-373 平方秀樹 監修、医薬ジャーナル社. 大阪 (2014)

2. 酒井宏水. 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)微粒子分散液の特徴. *粉体工学* 6, 909-914 (2014)
3. 酒井宏水. ヘモグロビンの再利用で、赤血球の寿命を延ばす. *Someone* 29, 9 (2014)
4. 酒井宏水、久禮智子. 人工赤血球(ヘモグロビンベシクル)の実現に向けて. *医学のあゆみ* (印刷中)

2. 学会発表

1. 木下学、萩沢康介、西川可穂子、柳川錬平、小野聡、斎藤大蔵、高瀬凡平、酒井宏水、半田誠、武岡真司、関修司 / 人工赤血球や人工血小板などの人工血液開発とその将来展望 / 第114回日本外科学会学術集会 / 国立京都国際会館・グラントプリンスホテル京都/ 2014. 4.3-5
2. Hiromi Sakai / Prolonged functional life span of artificial red cells (Hb-vesicles) by coexistence of an electron mediator in blood stream / *Experimental Biology 2014* / San Diego Convention Center / April 26-30, 2014
3. 酒井宏水 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)の実現に向けて (教育講演5) / 第62回日本輸血細胞治療学会総会 / 東大寺総合文化センター, 奈良 / 2014. 5. 15
4. 酒井宏水 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の開発状況 (シンポジウム12) / 第62回日本輸血細胞治療学会総会 / 奈良県新公会堂 / 2014. 5. 17

5. 東 寛、藤原満博士、酒井宏水 / 人工赤血球製剤の血液学的、免疫学的安全性 (シンポジウム12) / 第62回日本輸血細胞治療学会総会 / 奈良県新公会堂 / 2014. 5. 17
6. 小田切優樹、田口和明、丸山徹、酒井宏水、小林紘一 / 人工酸素運搬体ヘモグロビン小胞体の体内動態解析に基づく安全性評価 (シンポジウム12) / 第62回日本輸血細胞治療学会総会 / 奈良県新公会堂 / 2014. 5. 17
7. 木下学、高瀬凡平、田中良弘、西川可穂子、萩沢康介、柳川鍊平、斎藤大蔵、酒井宏水、関修司 / 人工赤血製剤による救命救急の可能性 (シンポジウム12) / 第62回日本輸血細胞治療学会総会 / 奈良県新公会堂 / 2014. 5. 17
8. 堀之内宏久、酒井宏水、泉陽太郎、饗庭了、勢司泰久、小林紘一 / 人工赤血球製剤の臨床応用を目指して: 動物モデルを用いた検討 (シンポジウム12) / 第62回日本輸血細胞治療学会総会 / 奈良県新公会堂 / 2014. 5. 17
9. 酒井宏水 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)濃厚分散液の物性と体内酸素運搬機能 / 平成26年度大学院特別講演会 / 崇城大学DDS研究所 / 2014. 6. 14
10. 酒井宏水 / 人工赤血球をつくる / 夢ナビ2014 / 大阪インテックス / 2014. 6. 21
11. H. Sakai / Hemoglobin-vesicles for transfusion alternative and oxygen therapeutics / International Society on Oxygen Transport to Tissue (ISOTT) 2014 / University College London, UK / 28 June – 3 July 2014.
12. K. Yano, M. Iwagami, H. Sakai, S. Kano / Development of an adjuvant therapy for severe malaria with the hemoglobin vesicle, an artificial oxygen carrier. / ICOPA: International Congress of Parasitology / August 10-15, 2014, Mexico.
13. 酒井宏水 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の新しい利用法 / イノベーションジャパン2014 / 東京ビックサイト / 2014.9.11-12
14. 酒井宏水 / 人工赤血球を用いる新しい治療法の開発 / BioJapan 2014 / 横浜メッセ / 2014. 10.15-17.
15. 酒井宏水 / 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の開発状況 (ワークショップ2) / 第52回日本人工臓器学会大会 / 京王プラザホテル札幌 / 2014. 10. 18 /
16. 東寛, 酒井宏水 / 人工赤血球の免疫応答への影響に関する検討 (ワークショップ2) / 第52回日本人工臓器学会大会 / 京王プラザホテル札幌 / 2014. 10. 18 /
17. 小田切優樹、田口和明、丸山徹、酒井宏水、小林紘一 / ヘモグロビン小胞体の体内動態解析に基づく安全性・有効性評価とDDSへの応用 (ワークショップ2) / 第52回日本人工臓器学会大会 / 京王プラザホテル札幌 / 2014. 10. 18 /
18. 河野光智、神山育男、松田信作、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の効果と安全性 (ワークショップ2) / 第52回日本人工臓器学会大会 / 京王プラザホテル札幌 / 2014. 10. 18 /
19. 荒木淳、酒井宏水、武内大、田代絢亮、光嶋勲 / 人工赤血球製剤を用いた組織保存研究: 移植

- 外科・形成外科領域への応用の可能性 (ワークショップ2) / 第52回日本人工臓器学会大会 / 京王プラザホテル札幌 / 2014. 10. 18 /
20. 太田英伸、李コウ、中川真智子、若松永憲、泉仁美、稲垣真澄、村岡州泊、小田切優樹、横田秀夫、柴田重信、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 (ワークショップ2) / 第52回日本人工臓器学会大会 / 京王プラザホテル札幌 / 2014. 10. 18 /
21. 酒井宏水 / (基調講演) 人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の特徴と実用化に向けた試み / 第21回 日本血液代替物学会 年次大会 / 中央大学理工学部 / 2014. 12.8-9.
22. 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2重膜のもつ免疫調節効果について (シンポジウム1) / 第21回 日本血液代替物学会 年次大会 / 中央大学理工学部 / 2014. 12.8-9.
23. 田口和明、丸山徹、酒井宏水、小田切優樹 / 病態モデル動物におけるヘモグロビン小胞体の体内動態と安全性評価 (シンポジウム1) / 第21回 日本血液代替物学会 年次大会 / 中央大学理工学部 / 2014. 12.8-9.
24. 河野光智、神山育男、松田信作、渡辺真純、堀之内宏久、酒井宏水、小林紘一 / 外科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と安全性 (シンポジウム1) / 第21回 日本血液代替物学会 年次大会 / 中央大学理工学部 / 2014. 12.8-9.
25. 荒木淳、酒井宏水、武内大、加賀谷優、内藤宗和、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 (シンポジウム1) / 第21回 日本血液代替物学会 年次大会 / 中央大学理工学部 / 2014. 12.8-9.
26. 松田信作、神山育男、河野光智、渡辺真純、堀之内宏久、酒井宏水、小林紘一 / ラット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後の循環動態 / 第21回 日本血液代替物学会 年次大会 / 中央大学理工学部 / 2014. 12.8-9.
27. 佐藤高彰、酒井宏水 / 小角・広角X線溶液散乱法によるヘモグロビンの立体構造再構築と濃厚ヘモグロビン溶液中の蛋白質間相互作用に関するpH効果の精密評価 / 第21回 日本血液代替物学会 年次大会 / 中央大学理工学部 / 2014. 12.8-9.
28. 酒井宏水、人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の新しい利用法 / メディカルジャパン2015 / 大阪インテックス / 2015.2.4-6.
29. 武内大、荒木淳、酒井宏水、田代絢亮、飯田拓也、光嶋勲 / 人工赤血球を用いた革新的な組織保存液の検討 / 第27回 代用臓器・再生医学研究会総会 / 北海道大学医学部学友会館「フラテ」 / 2015.2.28.
30. 酒井宏水、Karin Kettisen、伊賀弓佳 / 赤血球解糖系が産生する電子エネルギーの活用による人工赤血球(ヘモグロビンベシクル)の機能持続効果 / 日本化学会第95春季年会 / 日本大学船橋キャンパス (薬学部) / 2015.3.26-29

3. 報道など

1. 日本テレビ「世界一受けたい授業」にて、人工赤血球が紹介された(2014年7月5日, 19:00 – 20:58)

E. 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

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 名誉教授
崇城大学薬学部 教授

研究要旨

本研究は、生活習慣病保持者に対するヘモグロビン小胞体 (HbV) の安全性に関する基盤情報の構築を目的とした。HbV (2000 mg Hb/kg) を高脂血症モデルである ApoE 欠損マウス (B6.KOR/StmSlc-ApoE^{shl} マウス) に静脈内単回投与し、生理食塩水投与群と比較することで安全性を評価した。その結果、HbV 投与後 14 日目まで体重及び血算 (白血球数・赤血球数・血小板数) は生理食塩水投与群と違いは見られなかった。しかしながら、肝機能を反映するアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及びアラニンアミノトランスフェラーゼは HbV 投与 1 日後に一過性の上昇を示したものの、投与後 3 日目には生理食塩水投与群と同等の値を示した。また、その他の臓器機能を反映するパラメータ (尿素窒素・クレアチニンなど) に変化は無かった。さらに、脂質代謝異常時に代謝及び排泄の遅延が懸念される HbV 脂質膜構成成分由来代謝物の変化について検討したところ、HbV 投与 1・3 日後に生理食塩水投与群と比較して上昇したが、投与後 7 日目には生理食塩水投与群と同等の値を示したところから、HbV の脂質膜は十分に代謝・排泄されていると推測された。今回得られた知見は、現代の生活習慣病患者及びその予備群の増加を鑑み、生活習慣病の一種である高脂血症時における HbV の安全性を初めて明らかにしており、HbV の臨床使用及び臨床適応疾患の構築に向けた重要な基盤情報になると考えられる。

A. 研究目的

医薬品を開発する過程において、製剤化試験、薬理試験、薬物動態試験、さらには毒性試験など多くの前臨床試験結果より、新薬の有効性と安全性を総合的に判断し、臨床試験段階へ進める必要がある。これまでに、細胞型人工酸素運搬体であるヘモグロビン小胞体 (HbV) は健常動物のみならず、出血性ショックモデルや肝硬変モデルなどの様々な臨床疾患モデル動物において安全性が明らかとされている (*J Control Release*. 2009, *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010, *J Pharm Sci*. 2011)。しかしながら、現代の生活習慣病患者及びその予備群の増

加を鑑みると、生活習慣病疾患における安全性検討も必要であると考えられる。その理由として、HbVは赤血球代替物であるため多種多様な基礎疾患を持つ患者へ投与される可能性が高い。加えて、当然ながら莫大な投与量が予想され、これは心血管疾患等のリスクファクターと成り得る脂質成分 (特にコレステロール) を大量に体内へ投与することを意味する。そのため、脂質代謝異常に関係した基礎疾患を持つ患者に対してHbVを投与した場合、この外因性の脂質成分が安全に代謝・排泄されない可能性が考えられる。

そこで本研究では、脂質代謝に異常をきたして

いる疾患として生活習慣病の1種である高脂血症を選択し、本モデルとして汎用されているApoE欠損マウスを用いHbVの安全性評価を行った。

B. 研究方法

1. 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、崇城大学実験動物倫理委員会のもとに、実験を施行した。

2. 動物

ApoE欠損マウス (B6. KOR/StmSlc-Apoe^{shl}、オス、7週齢) は日本SLCより購入し、1週間の予備飼育後に8週齢で実験に使用した。

3. 投与方法及び投与量

ApoE欠損マウスに非絶食、エーテル麻酔下において、生理食塩水 (20 mL/kg) または HbV 2000 mg Hb/kg (20 mL/kg) を尾静脈より投与した。投与後1日目、3日目、7日目及び14日目に体重測定を行った後に、血液・臓器 (腎臓、肝臓、脾臓、心臓、肺) を回収した。

4. 血球パラメータの測定

血球計数装置 (Celltac α; MEK-6458, 日本光電) により血球パラメータを測定した。

5. 血漿パラメータの測定・分析

得られた血液を 3000 rpm で 10 分間遠心分離し、血漿を採取した。さらに、得られた血漿を 50,000 g で 20 分間超遠心分離することにより、血漿中に含まれる HbV を除去し、上清を回収し、測定まで -80 °C で保存した。血漿パラメータの測定は株式会社 SRL に委託した。

6. H.E.染色 (Hematoxylin-Eosin stain)

摘出した臓器を 4 % パラホルムアルデヒドに浸

し (4°C, overnight)、パラフィン固定した。その後、厚さ 5 μm の切片となるようスライスし、パラフィン包埋切片を作製した。切片の脱パラフィンを行った後、流水水洗し、ヘマトキシリン液で 4 分間染色した。再び流水水洗した後、エオシン液で 60 秒間染色し、その後、流水水洗し、脱水、透徹、封入を行い、組織像を蛍光顕微鏡 (BZ-X700、キーエンス) で観察した。

C. 結果および考察

1. 一般状態

HbV投与後に、すべてのApoE欠損マウスにおいて異常行動等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、HbV投与によるショック症状や瀕死状態あるいは死亡した例はなかった。

2. 体重及び臓器重量変化

まず、生理食塩水またはHbV (2000 mg Hb/kg) を ApoE欠損マウスに投与し、投与14日後までの体重変化をFig. 1に示す。その結果、両投与群の間で体重変化に差は見られなかった。

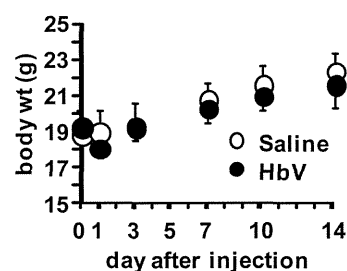


Figure 1

Change in body weight after saline (20 mL/kg) or HbV administration (20 mL/kg, 2000 mg Hb/kg) in B6. KOR/StmSlc-Apoe^{shl} mice. The values are mean ± SD. (n=5)

次に、HbV投与1・3・7・14日後のApoE欠損マウスの各臓器重量変化 (腎臓・肝臓・脾臓・肺・心臓) について検討した。その結果、HbVの主要分布臓器

の一つである脾臓において重量の増加が確認されたが (Fig. 2B)、もう一つの主要分布臓器である肝臓においては変化が無かった (Fig. 2A)。また、腎臓・肺・心臓においては臓器重量の変化は確認されなかった (data not shown)。

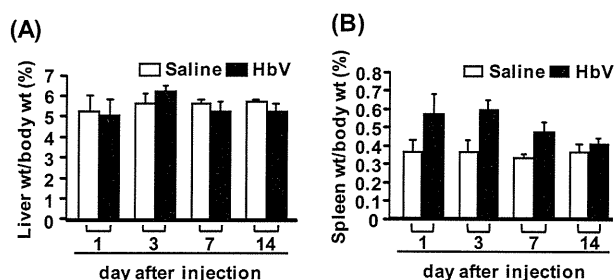


Figure 2

Change in (A) liver and (B) spleen weight at 1, 3, 7 and 14 days after saline (20 mL/kg) or HbV administration (20 mL/kg, 2000 mg Hb/kg) in B6.KOR/StmSlc-ApoE^{shl} mice.

The values are mean ± SD. (n=5)

3. 血球パラメータ

Fig. 3には、ApoE欠損マウスにHbV投与1・3・7・14日後の血球パラメータ (白血球・赤血球・血小板) を示す。その結果、生理食塩水投与群とHbV投与群の間で顕著な違いは確認されなかった。

4. 生化学パラメータ

ApoE欠損マウスにHbV投与後の血漿パラメータへの影響を検討した。Fig. 4には、ApoE欠損マウスにHbVまたは生理食塩水を投与し、1・3・7・14日後における、総タンパク質・アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)・アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)・アルブミン・尿素窒素 (BUN) 及びクレアチニン (CRE) の各値を示す。その結果、肝機能を反映するAST及びALTはHbV投与1日後に一過性の上昇を示したものの、投与後3日目には生理食塩水投与群と同等の値を示した。一方、他の肝機能マーカーである総タンパク質及びアルブミンには、HbV投与群と生理食塩水投与群の間で差は認められなかった。また、腎機能を反映

するパラメータ (BUN及びCRE) に変化は無かった。さらに、ApoE欠損マウスにHbV投与後、1・3・7・14日目における各臓器 (腎臓・肝臓・脾臓・肺・心臓) の組織への影響をH.E.染色により評価した。その結果、各臓器において、HbV投与による明らかな形態変化は確認されなかった (Fig. 5)。以上の生化学パラメータ及び組織学的評価の結果より、HbV投与による腎機能及び肝機能への影響はほとんど認められないか、あるいは一過性のものであり、他の臓器も含め、生体への悪影響は少ないものと思われた。

次に、HbV構成成分由来代謝物の血漿パラメータをFig. 6に示す。その結果、強度は異なるものの、評価した全ての脂質膜成分の代謝の指標となるパラメータ (トリグリセリド・リン脂質・遊離脂肪酸・総コレステロール・エステル型コレステロール及びフリーコレステロール) は、ApoE欠損マウスにおいて生理食塩水投与群に比べて、HbV投与後

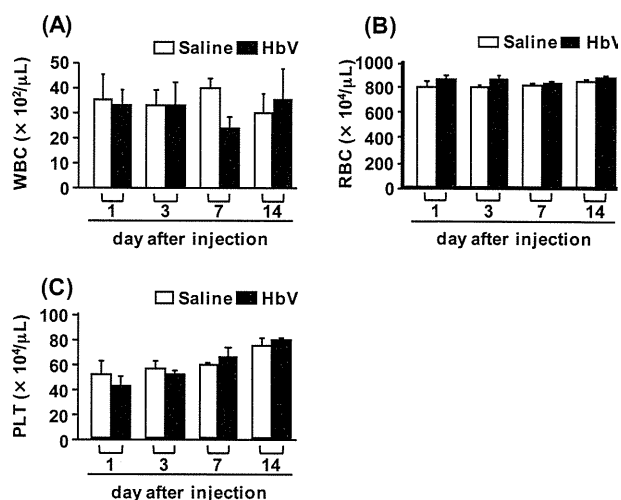


Figure 3

Changes in (A) white blood cells, (B) red blood cells and (C) platelets at 1, 3, 7 and 14 days after saline (20 mL/kg) or HbV administration (20 mL/kg, 2000 mg Hb/kg) in B6.KOR/StmSlc-ApoE^{shl} mice.

The values are mean ± SD. (n=5)

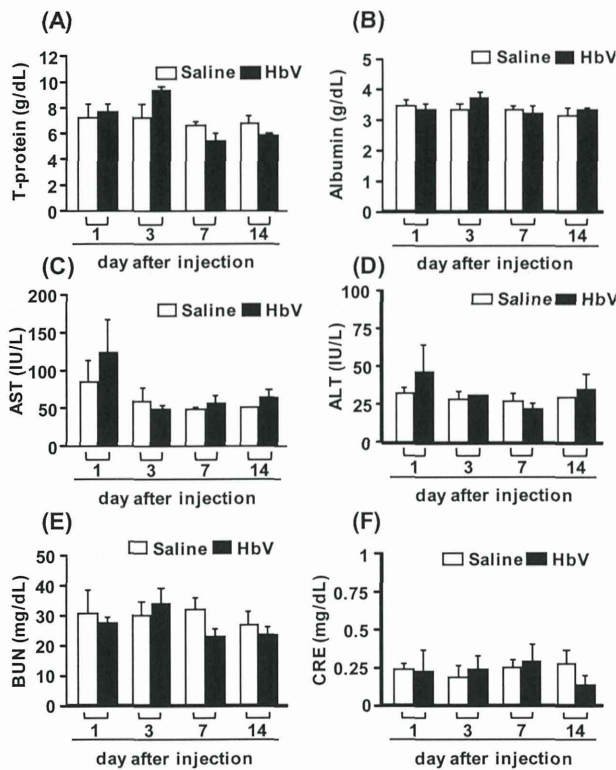


Figure 4

Serum laboratory tests representing liver and renal function at 1, 3, 7 and 14 days after saline (20 mL/kg) or HbV administration (20 mL/kg, 2000 mg Hb/kg) in B6. KOR/StmSlc-ApoE^{shl} mice.

The values are mean ± SD. (n=5)

1・3日目に上昇を示した。しかしながらこれらの値は、投与後7日目には生理食塩水投与群と同等の値まで回復した。これらの結果より、ApoE欠損マウスにおいて、HbVは細網内皮系細胞による代謝され、HbV代謝物が血中に放出されることにより上述した脂質関連パラメータが一時的に上昇するものの、7日目までに分解・排泄されると考えられた。

D. 結論

万人へHbVを安全に使用するためには、脂質代謝異常時におけるHbV使用の安全性評価を検討する必要がある。ここで、HbVは赤血球代替物であるため、通常の薬物とは異なり大量投与が想定される。そのため、一般的な薬物に比べ、脂質の代謝及び排泄能が低下した状態ではHbV及びその構成成分

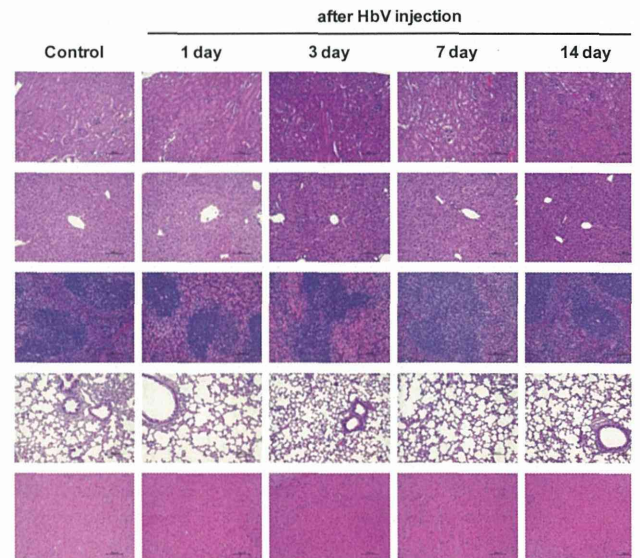


Figure 5

Light micrographs of kidney, liver, spleen, lung and heart in B6. KOR/StmSlc-ApoE^{shl} mice at 1, 3, 7 and 14 day after HbV injection (20 mL/kg, 2000 mg Hb/kg) stained with H&E.

が生体内に蓄積し、予期せぬ副作用を生じることが懸念される。本研究より、脂質代謝に異常をきたしている場合にHbVを単回大量投与 (2000 mg Hb/kg) しても臓器傷害性を示さず、また、HbV構成成分由来代謝物の血漿パラメータ値が投与後7日目までに回復しており、脂質代謝異常時においてもHbVは十分な代謝・排泄性を持っていることが示唆された。この結果は、昨年度に報告したApoE欠損マウスを用いた体内動態実験結果を良く反映した結果となった。本研究結果のみでHbVが高脂血症時に安全であると結論付けるのは早計であるが、生体蓄積性は殆ど無く、少なくとも動物実験レベルでは安全であると考えられる。今後、ApoE欠損マウスに出血性ショックを併発させた臨床に近いモデルでの安全性評価を行っていくことで、脂質代謝異常時 (高脂血症時) においてのさらなる安全性を明らかにしていけると考えられる。

本研究は、現代のライフスタイルの変化を鑑みた安全性評価であり、医薬品の開発においてこれまでに類を見ない先導的な評価と言える。また、

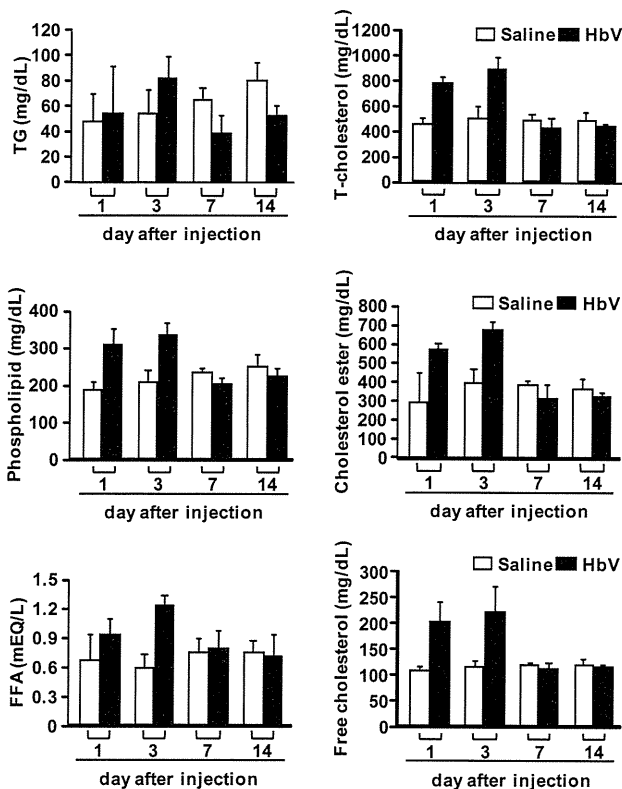


Figure 6

Serum laboratory tests representing the metabolism of lipid at 1, 3, 7 and 14 days after saline (20 mL/kg) or HbV administration (20 mL/kg, 2000 mg Hb/kg) in B6. KOR/StmSlc-Apoe^{shl} mice.

The values are mean \pm SD. (n=5) TG; triglyceride, FFA; free fatty acid, T-cholesterol; total cholesterol

本研究結果及びこれまで積み重ねられているHbVのデータを考え合わせると、HbVの赤血球代替物として様々な疾患に対しても安全に使用できるのではないかと考えられる。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究業績

1. 主な論文発表

1. Watanabe H, Miyamoto Y, Enoki Y, Ishima Y, Kadowaki D, Kotani S, Nakajima M, Tanaka M,

Matsushita K, Mori Y, Kakuta T, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. p-Cresyl sulfate, a uremic toxin, causes vascular endothelial and smooth muscle cell damages by inducing oxidative stress. *Pharmacol Res Perspect.* (2015) 3(1):e00092.

2. Taguchi K, Tokuno M, Yamasaki K, Kadowaki D, Seo H, **Otagiri M**. Establishment of a model of acetaminophen-induced hepatotoxicity in different weekly-aged ICR mice. *Lab Anim.* (2015) in press

3. Taguchi K, Chuang VT, Yamasaki K, Urata Y, Tanaka R, Anraku M, Seo H, Kawai K, Maruyama T, Komatsu T, **Otagiri M**. Cross-linked human serum albumin dimer has the potential for use as a plasma-retaining agent for the fatty acid-conjugated antidiabetic drugs. *J Pharm Pharmacol.* (2015) 67(2):255-63.

4. Tsukigawa K, Liao L, Nakamura H, Fang J, Greish K, **Otagiri M**, Maeda H. Synthesis and therapeutic effect of styrene-maleic acid copolymer-conjugated pirarubicin. *Cancer Sci.* (2015) in press

5. Tsukigawa K, Nakamura H, Fang J, **Otagiri M**, Maeda H. Effect of different chemical bonds in pegylation of zinc protoporphyrin that affects drug release, intracellular uptake, and therapeutic effect in the tumor. *Eur J Pharm Biopharm.* (2015) 89:252-70

6. Ishima Y, Inoue A, Fang J, Kinoshita R, Ikeda M, Watanabe H, Maeda H, **Otagiri M**, Maruyama T. Poly-S-nitrosated human albumin enhances the antitumor and antimetastasis effect of bevacizumab, partly by inhibiting autophagy through the generation of nitric oxide. *Cancer Sci.* (2015) 106(2):194-200.

7. Tanaka R, Ishima Y, Enoki Y, Kimachi K, Shirai T, Watanabe H, Chuang VT, Maruyama T, **Otagiri M**. Therapeutic impact of human serum albumin-thioredoxin fusion protein on influenza virus-induced lung injury mice. *Front Immunol*. (2014) 5:561.
8. Maeda H, Hirata K, Watanabe H, Ishima Y, Chuang VT, Taguchi K, Inatsu A, Kinoshita M, Tanaka M, Sasaki Y, **Otagiri M**, Maruyama T. Polythiol-containing, recombinant mannosylated-albumin is a superior CD68+/CD206+ Kupffer cell-targeted nanoantioxidant for treatment of two acute hepatitis models. *J Pharmacol Exp Ther*. (2015) 352(2):244-57.
9. Miyazaki Y, Taguchi K, Sou K, Watanabe H, Ishima Y, Miyakawa T, Mitsuya H, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. Therapeutic impact of erythropoietin-encapsulated liposomes targeted to bone marrow on renal anemia. *Mol Pharm*. (2014) 11(11):4238-48.
10. Anraku M, Tanaka M, Hiraga A, Nagumo K, Imafuku T, Maezaki Y, Iohara D, Uekama K, Watanabe H, Hirayama F, Maruyama T, **Otagiri M**. Effects of chitosan on oxidative stress and related factors in hemodialysis patients. *Carbohydr Polym*. (2014) 112:152-7.
11. Anraku M, Hiraga A, Iohara D, Uekama K, Tomida H, **Otagiri M**, Hirayama F. Preparation and antioxidant activity of PEGylated chitosans with different particle sizes. *Int J Biol Macromol*. (2014) 70:64-9.
12. Ogaki S, Taguchi K, Watanabe H, Ishima Y, **Otagiri M**, Maruyama T. Carbon monoxide- bound red blood cell resuscitation ameliorates hepatic injury induced by massive hemorrhage and red blood cell resuscitation via hepatic cytochrome P450 protection in hemorrhagic shock rats. *J Pharm Sci*. (2014) 103(7):2199-206.
13. Taguchi K, Yamasaki K, Maesaki H, Tokuno M, Okazaki S, Moriuchi H, Takeshita K, **Otagiri M**, Seo H. An evaluation of novel biological activity in a crude extract from Heme rocallis fulva L. var. sempervirens M. Hotta. *Nat Prod Res*. (2014) 28(23):2211-3.
14. Ishima Y, Fang J, Kragh-Hansen U, Yin H, Liao L, Katayama N, Watanabe H, Kai T, Suenaga A, Maeda H, **Otagiri M**, Maruyama T. Tuning of poly-S-nitrosated human serum albumin as superior antitumor nanomedicine. *J Pharm Sci*. (2014) 103(7):2184-8.
15. Nagao S, Taguchi K, Sakai H, Tanaka R, Horinouchi H, Watanabe H, Kobayashi K, **Otagiri M**, Maruyama T. Carbon monoxide- bound hemoglobin-vesicles for the treatment of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Biomaterials*. (2014) 35(24):6553-62.
16. Kouno Y, Anraku M, Yamasaki K, Okayama Y, Iohara D, Ishima Y, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Hirayama F, **Otagiri M**. N-acetyl-L-methionine is a superior protectant of human serum albumin against photo-oxidation and reactive oxygen species compared to N-acetyl-L-tryptophan. *Biochim Biophys Acta*. (2014) 1840(9):2806-12.
17. Tanaka R, Ishima Y, Maeda H, Kodama A, Nagao S, Watanabe H, Chuang VT, **Otagiri M**, Maruyama

- T. Albumin fusion prolongs the antioxidant and anti-inflammatory activities of thioredoxin in mice with acetaminophen-induced hepatitis. *Mol Pharm.* (2014) 11(4):1228-38.
18. Sato H, Chuang VT, Yamasaki K, Yamaotsu N, Watanabe H, Nagumo K, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Hirono S, **Otagiri M**, Maruyama T. Differential effects of methoxy group on the interaction of curcuminoids with two major ligand binding sites of human serum albumin. *PLoS One.* (2014) 9(2):e87919.
 19. Nagumo K, Tanaka M, Chuang VT, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, Kubota K, Tanaka M, Matsushita K, Yoshida A, Jinnouchi H, Anraku M, Kadowaki D, Ishima Y, Sasaki Y, **Otagiri M**, Maruyama T. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One.* (2014) 9(1):e85216.
 20. Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Kondo M, Chuang VT, Wu Q, Endo M, Ishima Y, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. Albumin fusion renders thioredoxin an effective anti-oxidative and anti-inflammatory agent for preventing cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* (2014) 1840(3):1152-62.
2. 主な学会発表
(国際学会)
1. Watanabe H, Tanaka R, Maeda H, Kodama A, Taguchi K, Ishima Y, **Otagiri M**, Maruyama T. Therapeutic impact of human serum albumin-thioredoxin fusion protein, long-acting anti-oxidative and anti-inflammatory modulator, against acetaminophen-induced acute hepatopathy. 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2014/4/13-16 (Melbourne, Australia)
 2. Taguchi K, Ujihira H, Ogaki S, Watanabe H, Takeoka S, Ikeda Y, Handa M, **Otagiri M**, Maruyama T. Pharmacokinetic study of enclosed adenosine diphosphate and outer lipid component after the administration of H12-(ADP)-liposome as a synthetic platelet substitute. 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2014/4/13-16 (Melbourne, Australia)
 3. Taguchi K, Nagao S, Jono H, Yamasaki K, Mizuguchi M, Maruyama T, Ando Y, **Otagiri M**. Effect of albumin on transthyretin disposition and tissue deposition in vivo. 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2014/4/13-16 (Melbourne, Australia)
 4. Kadowaki D, Sakaguchi S, Miyamoto Y, Muraya N, Narita Y, Sato K, Ishima Y, Chuang VTG, Maruyama T, **Otagiri M**, Hirata S. Radical scavenging activity of benzobromarone as a novel property in vitro. 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2014/4/13-16 (Melbourne, Australia)
 5. Maruyama T, Ogaki S, Taguchi K, Maeda H, Ishima Y, Watanabe H, **Otagiri M**. Carbon monoxide bound red blood cells protect the expression of hepatic cytochrome P450 after resuscitation from hemorrhagic shock via inactivation of Kupffer cells. 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2014/4/13-16 (Melbourne, Australia)
 6. Taguchi K, Sakai H, Maruyama T, **Otagiri M**. Safety and pharmacokinetic studies of

- hepatically-metabolized and –excreted artificial oxygen carrier, hemoglobin-vesicles, in chronic hepatic cirrhosis. 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2014/4/13-16 (Melbourne, Australia)
7. Yamasaki K, Okamoto Y, Enokida T, Maeda T, Taguchi K, Seo H, **Otagiri M**. Study on protein binding of sodium phenylbutyrate. 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2014/4/13-16 (Melbourne, Australia)
 8. **Otagiri M**, Maruyama T. Pharmacokinetics of serum albumin variants. Innovation workshop on Albumin: The next generation protein therapeutics 2014/7/12 (Chicago, USA)
 9. **Otagiri M**, Ishima Y, Maruyama T. Therapeutic Applications of Albumin- Thioredoxin Fusion Protein. 10th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences and 6th International Forum on Industrial Bioprocesses Lille, 2014/9/7-10 (France, LILLE GRAND PALAIS)
 10. Nagao S, Taguchi K, Tanaka R, Sakai H, Watanabe H, **Otagiri M**, Maruyama T. Development of a nanotechnology-based carbon monoxide donor and its therapeutic impact on idiopathic pulmonary fibrosis. 19th North American ISSX Meeting / 29th JSSX Meeting, 2014/10/19-23 (California, USA)
 11. Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Ishima Y, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. Albumin fusion renders thioredoxin an effective anti-oxidative and anti-inflammatory agent for preventing acute kidney injury. 19th North American ISSX Meeting / 29th JSSX Meeting, 2014/10/19-23 (California, USA)
 12. Maeda H, Ichimizu S, Watanabe H, Ishima Y, Suenaga A, **Otagiri M**, Maruyama T. Polythiolated- and recombinant mannosylated-albumin as a novel CD68+/CD206+ Kupffer cell-targeted mono-antioxidant for the treatment of acute and chronic hepatitis models. 19th North American ISSX Meeting / 29th JSSX Meeting, 2014/10/19-23 (California, USA)
 13. Watanabe H, Miyamoto Y, Enoki Y, Ishima Y, Fukagawa M, **Otagiri M**, Maruyama T. OAT-dependent cellular accumulation of p-cresyl sulfate, a uremic toxin, causes vascular endothelial and smooth muscle cell damages by inducing oxidative stress. 19th North American ISSX Meeting / 29th JSSX Meeting, 2014/10/19-23 (California, USA)
 14. Ogaki S, Maeda H, Taguchi K, Ishima Y, Watanabe H, **Otagiri M**, Maruyama T. Carbon monoxide bound red blood cells protect the function of hepatic Cytochrome P450 after resuscitation from hemorrhagic shock via suppression of Toll-like receptor-4 expression on the Kupffer cells. 19th North American ISSX Meeting / 29th JSSX Meeting, 2014/10/19-23 (California, USA)
 15. Taguchi K, Chuang VTG, Yamasaki K, Kawai K, Maruyama T, Komatsu T, **Otagiri M**. The potential of a cross-linked human serum albumin dimer in diabetic rats as an augmenting agent for antidiabetic drugs. 19th North American ISSX Meeting / 29th JSSX Meeting, 2014/10/19-23 (California, USA)

16. Maruyama T, Tanaka R, Watanabe H, Kodama A, Ishima Y, Otagiri M. Genetically engineered Albumin-Thioredoxin fusion protein, long-acting anti-oxidant, ameliorates acute lung injury associated with influenza virus infection. 19th North American ISSX Meeting / 29th JSSX Meeting, 2014/10/19-23 (California, USA)
17. Anraku M, Iohara D, Uekama K, Hirayama F, Otagiri M. Antioxidant and renoprotective activity of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in nephrectomized rats. 19th North American ISSX Meeting / 29th JSSX Meeting, 2014/10/19-23 (California, USA)

(国内学会)

1. 異島 優、方 軍、前田 浩、渡邊 博志、小田切 優樹、丸山 徹 NO 付加型ヒト血清アルブミンの臨床応用へのアプローチ 第14回日本 NO 学会学術集会 2014/5/16-17 (佐賀)
2. 木下 遼、異島 優、成底 徹、小谷俊介、中島 誠、渡邊博志、小田切 優樹、丸山 徹 ニトロインドキシル硫酸による酸化ストレス産生メカニズムの解析 第14回日本 NO 学会学術集会 2014/5/16-17 (佐賀)
3. 榎田 泰介、山崎 啓之、岡本 侑子、田口 和明、宮本 秀一、瀬尾 量、小田切 優樹 フェニル酪酸ナトリウムのタンパク結合特性に関する基礎的検討 日本薬剤学会第29年会 2014/5/20-22 (大宮)
4. 本田 尚子、異島 優、宮崎 裕理、渡邊 博志、末永 綾香、小田切 優樹、丸山 徹 S-ニトロソ化アルブミンは腎性貧血改善と腎保護作用を併せ持つ新規慢性腎臓病治療薬であ

る日本薬剤学会第29年会 2014/5/20-22 (大宮)

5. 木下 遼、異島 優、池田 真由美、方 軍、前田 浩、小田切 優樹、丸山 徹 新規 EPR 増強剤の一酸化窒素付加アルブミンダイマーは Doxil® の抗腫瘍効果を向上する日本薬剤学会第29年会 2014/5/20-22 (大宮)
6. 橋本 麻衣、田口 和明、大柿 滋、渡邊 博志、土井 麻美、武岡 真司、半田 誠、小田切 優樹、丸山 徹 血小板代替物 H12 (ADP) リポソームの頻回投与時における体内動態特性 日本薬剤学会第29年会 2014/5/20-22 (大宮)
7. 西田 健人、大柿 滋、田中 遼大、小玉 あずさ、渡邊 博志、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹 横紋筋融解症 AKI に対するアルブミン-チオレドキシシン融合体の有用性評価 日本薬剤学会第29年会 2014/5/20-22 (大宮)
8. 異島 優、井上 亜希、小田切 優樹、渡邊 博志、丸山 徹 低酸素誘導オートファジーに対する Poly-S-ニトロソ化ヒト血清アルブミンの抑制効果 日本薬剤学会第29年会 2014/5/20-22 (大宮)
9. 田中 遼大、異島 優、榎木 裕紀、小田切 優樹、渡邊 博志、丸山 徹 インフルエンザ肺炎に対するヒト血清アルブミン-チオレドキシシン融合タンパク質の有効性評価 日本薬剤学会第29年会 2014/5/20-22 (大宮)
10. 渡邊 博志、南雲 恒平、瀬戸山 博子、田中 基彦、佐々木 裕、山田 尚之、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹 新規肝硬変病態マーカーとしての Cys 付加アルブミンの有用性評価 日本薬剤学会第29年会 2014/5/20-22 (大宮)

- 宮)
11. 成田 勇樹、坂田 美紀、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹、門脇 大介、平田 純生 トロンボモデュリン α の抗酸化作用によるプレイオトロピック効果 第57回 日本腎臓学会学術総会 2014/7/4-6 (横浜)
 12. 戸田 翔太、渡邊 博志、弥永 直樹、濱崎 慶輔、國安 明彦、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹 Renal Drug Delivery Systemを可能とする腎標的化ペプチドの網羅的探索 第57回 日本腎臓学会学術総会 2014/7/4-6 (横浜)
 13. 今福 匡司、南雲 恒平、杉森 剛志、阿部 貴弥、申 曾洙、渡邊 博志、山田 尚之、田中 元子、松下 和孝、小田切 優樹、丸山 徹 透析患者における新規酸化ストレスマーカーとしてのシスティン付加 Cys34 アルブミンの有用性評価 第57回 日本腎臓学会学術総会 2014/7/4-6 (横浜)
 14. 小玉 あずさ、渡邊 博志、田中 遼大、近藤 真澄、WU Qiong、遠藤 正之、異島 優、深川 雅史、小田切 優樹、丸山 徹 アルブミン-チオレドキシシン融合体によるシスプラチン腎症予防効果 第57回 日本腎臓学会学術総会 2014/7/4-6 (横浜)
 15. 渡邊 博志、宮本 洋平、榎木 裕紀、異島 優、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血管障害作用 第57回 日本腎臓学会学術総会 2014/7/4-6 (横浜)
 16. 福永 雅樹、門脇 大介、成田 勇樹、竹澤 真吾、丸山 徹、小田切 優樹、平田 純生 In vivo 血液透析モデルラットによるバンコマイシン除去率評価の妥当性に関する検討 第57回 日本腎臓学会学術総会 2014/7/4-6 (横浜)
 17. 木下 遼、異島 優、池田 真由美、方 軍、前田 浩、小田切 優樹、丸山 徹 新規 EPR 増強剤の一酸化窒素付加アルブミンダイマーは Doxil の抗腫瘍効果を向上する。第30回日本 DDS 学会学術集会 2014/7/30-31 (東京)
 18. 西田 健人、大柿 滋、田中 遼大、小玉 あずさ、渡邊 博志、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹 横紋筋融解症 AKI に対するアルブミン-チオレドキシシン融合体の有用性評価第30回日本 DDS 学会学術集会 2014/7/30-31 (東京)
 19. 山崎 啓之、平山 茜、安楽 誠、田口 和明、小田切 優樹、瀬尾 量 粉末吸入用アルブミン製剤の設計に向けた基礎的検討第30回日本 DDS 学会学術集会 2014/7/30-31 (東京)
 20. 異島 優、方 軍、前田 浩、渡邊 博志、丸山 徹、小田切 優樹 PEG 化や 2 量体化により増強する S-ニトロソ化ヒト血清アルブミンの抗腫瘍活性 第30回日本 DDS 学会学術集会 2014/7/30-31 (東京)
 21. 小田切 優樹、田口和明、丸山徹、酒井宏水、小林紘一 ヘモグロビン小胞体の体内動態解析に基づく安全性・有用性評価と DDS への応用 第52回日本人工臓器学会大会 2014/10/17-19 (札幌)
 22. 太田英伸、李コウ、中川真智子、若松永憲、泉仁美、稲垣真澄、岡村州博、小田切 優樹、横田秀夫、柴田重信、酒井宏水、八重樫伸生 妊婦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 第52回日本人工臓器学会大

会 2014/10/17-19 (札幌)

23. 山崎 啓之、榎田 泰介、岡本 侑子、田口 和明、宮本 秀一、瀬尾 量、小田切 優樹 フェニル酪酸ナトリウムの血清アルブミン結合特性に関する基礎的検討 第42回構造活性相関シンポジウム 2014/11/13-14 (熊本)
24. 丸山 徹、渡辺佳織、異島 優、小川和加野、黒田照夫、小田切 優樹 S-ニトロソ化 α 1-酸性タンパク質による抗生物質の多剤耐性克服と機序解明 第36回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2014/11/20-21 (徳島)
25. 異島 優、井上亜希、方 軍、渡邊博志、前田 浩、小田切 優樹、丸山 徹 ベバシズマブの抗腫瘍活性に及ぼす Poly-S-ニトロソ化ヒト血清アルブミンの併用効果 第36回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2014/11/20-21 (徳島)
26. 春木理沙、神山育男、松田信作、河野光智、田口和明、永尾紗理、丸山 徹、小田切 優樹、小松晃之 HemoAct™の血液適合性および安全性評価 第21回日本血液代替物学会年次大会 2014/12/8-9 (東京)
27. 田口和明、丸山 徹、酒井宏水、小田切 優樹 病態モデル動物におけるヘモグロビン小胞体の体内動態と安全性評価 第21回日本血液代替物学会年次大会 2014/12/8-9 (東京)
28. 橋本麻衣、田口和明、大柿滋、異島優、渡邊博志、西川可穂子、木下学、武岡真司、池田康夫、半田誠、小田切 優樹、丸山徹 血小板減少状態における血小板代替物 H12 (ADP) リポソームの体内動態解析 第21回日本血液代替物学会年次大会 2014/12/8-9 (東京)
29. 山田佳奈、春木理沙、田口和明、永尾紗理、丸山 徹、小田切 優樹、小松晃之 (ヘモグロビン-アルブミン) クラスタ” HemoAct™”の分子構造調整 第21回日本血液代替物学会年次大会 2014/12/8-9 (東京)
30. 丸山 徹、前田仁志、田口和明、異島優、渡邊博志、木下学、小田切 優樹 CD68+CD206+クッパー細胞選択的ナノ抗酸化剤のポリチオール付加マンノースアルブミンは急性肝障害を抑制する 第21回日本血液代替物学会年次大会 2014/12/8-9 (東京)
31. 大柿滋、田口和明、西田健人、小玉あずさ、渡邊博志、異島優、深川雅史、小田切 優樹、丸山 徹 横紋筋融解症誘発急性腎障害に対するアルブミン-チオレドキシシン融合体の治療効果と機序解明 第21回日本血液代替物学会年次大会 2014/12/8-9 (東京)
32. 榎田 泰介、山崎 啓之、岡本 侑子、田口 和明、宮本 秀一、丸山 徹、瀬尾 量、小田切 優樹 フェニル酪酸ナトリウムの血清アルブミン結合に関する構造化学的考察 日本薬学会第135年会 2015/3/25-28 (神戸)
33. 渡邊 博志、西田 健人、大柿 滋、田中 遼大、小玉 あずさ、異島 優、小田切 優樹、丸山 徹 横紋筋融解症 AKI に対するナノ抗酸化炎症モジュレーター腎保護効果 日本薬学会第135年会 2015/3/25-28 (神戸)
34. 丸山 徹、異島 優、成底 徹、小谷 俊介、中島 誠、渡邊 博志、小田切 優樹 尿毒症物質インドキシル硫酸の酸化修飾体に関する構造特性と生物活性 日本薬学会第135年会 2015/3/25-28 (神戸)

35. 河野 陽介、安楽 誠、山崎 啓之、丸山 徹、岡山 善郎、平山 文俊、小田切 優樹 アルブミン製剤処方の基礎的検討：抗酸化剤としての N-アセチルメチオニンの有用性について 日本薬学会第 135 年会 2015/3/25-28 (神戸)
36. 田口 和明、山崎 啓之、安楽 誠、瀬尾 量、川井 恵一、丸山 徹、小松 晃之、小田切 優樹 腎疾患時におけるアルブミンダイマーの体内動態 評価 日本薬学会第 135 年会 2015/3/25-28 (神戸)
37. 山崎 啓之、平山 茜、安楽 誠、田口 和明、小田切 優樹、瀬尾 量 粉末吸入用アルブミン粒子の吸入特性におよぼす脂 肪酸添加の影響 日本薬学会第 135 年会 2015/3/25-28(神戸)
38. 安楽 誠、平賀 歩、庵原 大輔、伊福 伸介、James D. PIPKIN、小田切 優樹、平山 文俊 スルホブチル- β -シクロデキストリンによるキトサンナノファイバーゲルの調製 日本薬学会第 135 年会 2015/3/25-28 (神戸)
- G. 知的財産権の出願。登録状況 (予定を含む) 該当無し。

分担研究報告書

人工赤血球(ヘモグロビン小胞体)製剤の実用化を目指す研究

分担課題：

1. ヘモグロビン小胞体がサイトカイン・ケモカインの産生動態に与える影響について
2. ヘモグロビン小胞体を少量投与する事による脾T細胞の増殖抑制効果の検討

分担研究者	東 寛	旭川医科大学小児科	教授
研究協力者	藤原 満博	北海道赤十字血液センター	製剤開発課長
研究代表者	酒井 宏水	奈良県立医科大学 化学	教授

研究要旨

(1) 循環血液量の 20% v/v に相当するポリエチレングリコール修飾ヘモグロビン小胞体(HbV)あるいは Hb 分子を内包しない空リポソーム (DPPC-liposome)をラットに投与後に摘出した脾細胞では、一過性の T 細胞増殖抑制効果が観察され、この抑制効果発現には NO の産生が関与していることを見いだしている。T 細胞の増殖抑制に伴って、サイトカイン・ケモカインの産生動態がどのように変化しているかについて、前年度に引き続き検討を行った。今年度は TGF- β 1 の産生動態と自然免疫応答への影響を検討する目的で LPS 刺激に対する IL-1 β 産生能への影響について検討した。その結果、リポソーム投与による TGF- β 1 の産生増加は観察されなかった。また、LPS 刺激による IL-1 β 産生動態も特段の変化のない事が示された。

(2) さらに、T 細胞増殖抑制効果が誘導されるリポソームの最小投与量をさらに検討し、循環血液量の 5%v/v 相当の投与量では、抑制効果が再現性を持って認められるが、2%v/v では若干の抑制の傾向が認められるも再現性がなく、1%v/v ではほぼ完全に抑制効果が認められない事が明らかとなった。

A. 研究目的

我々はこれまでラットの免疫系へのHbVの影響を検討するため、HbV投与後に脾臓を摘出し、脾細胞のex vivoでの培養系において非特異的マイトジェンConAや特異抗原Keyhole limpet hemocyaninに対する反応性の変化を検討してきた。その結果、HbVおよびHbVを内包しない空リポソームの投与で、一過性にこれらの増殖刺激に対するT細胞の反応性が低下すること、そしてこの低下にNOの産生が関与することを既に見出している。反応系における諸々のサイトカインやケモカインの産生動態

がどのような影響をうけるかについての検討は、その一部がいまだ明らかにされていないところであった。本研究は、この点を明らかにすることを目的とした。また、少量のリポソームの反復投与により、T細胞の増殖抑制効果が誘導されうるかについても検討を進めた。

B. 研究方法

1. 空リポソーム投与ラットからの脾細胞の調製

実験には WKAH ラット、♂、8-11 週齢、体重約 200-300 g を用いた。ラットに循環血液量の

20%(v/v)に相当する Hb 分子を内包していない空リポソーム (DPPC-liposome) (脂質含量として約 6-7g/dl)をエーテル麻酔下, 尾静脈より輸注した. コントロール群には同量の saline を輸注した.

Hb 分子を内包しない空のリポソームをラットに輸注後およそ 16 時間後にエーテル麻酔にて犠牲死し, 無菌的に脾臓を摘出した. 培養液 (RPMI-1640/10%FCS/50 μ l 2-mercaptoethanol (2-ME))5 mL に浸した脾臓をディッシュ中ですりつぶし,その懸濁液を遠心チューブに移して静置することにより, 大きな組織塊を沈降させた. 上清を 2,000 rpm \times 5 min 遠心し, 沈殿した細胞を RPMI1640 で洗浄した後, 塩化アンモニウム-トリス緩衝液 (IBL 免疫生物研究所) 5 mL にて 5-7 分間溶血処理をした. 溶血処理細胞液に培養液を加え, 遠心・洗浄後, 培養液に再懸濁して 1x10⁶/ml の細胞浮遊液とした.

2. 培養上清中の TGF- β 1 の測定

調製した細胞浮遊液を 24well の培養用プレートに各 well 1ml を加え,Con A (最終濃度 0.3 μ g/ml) 存在下で培養を開始後, 1 日目, 2 日目, 3 日目に上清の一部を回収し,アッセイまで-20 $^{\circ}$ C に凍結保存した. 培養上清中の TGF- β 1 の測定は rat TGF- β 1 assay kit (R&D)を用いた. 測定は duplicate で行なった.

3. 培養上清中の IL-1 β の測定

調製した細胞浮遊液を 24well の培養プレートに各 well 1ml 播種し, 種々の濃度の LPS 存在下で 24 時間培養後, 上清を回収し,アッセイまで-20 $^{\circ}$ C に凍結保存した. 培養上清中の IL-1 β 濃度は rat IL-1 β assay kit (R & D)を用いて triplicate にて測定した.

4. リポソームの投与量

少量のリポソーム投与の脾 T 細胞増殖に与える影響を調べるため, 種々の量のリポソームを投与し, その影響を検討した. 即ち, 循環血液量の 20%v/v, 2%v/v, 1%v/v のリポソーム溶液をそれぞれ 1 回投

与, および, 1%v/v を 1 回投与後 12 時間後に再度投与した場合の影響を検討した. いずれの場合も最終投与後, 12 時間後に脾臓を摘出した.

5. 脾 T 細胞増殖能の検討

1x10⁶/ml に調製した脾細胞浮遊液を, 24well plate に 1 ml ずつ播種し, Con A (0, 0.3, 3 μ g/ml)にて 3 日間培養後, 細胞増殖の状態を顕微鏡下で観察した.

C. 結果

1. Con A 刺激による脾細胞からの TGF- β 1 産生

生食投与後に摘出した脾細胞の場合に, Con A 刺激後, 培養上清中の TGF- β 1 濃度は培養 2 日後に上昇傾向を示したが, 3 日目にはむしろ低下している傾向が認められた. この傾向はリポソーム投与後の摘出した脾細胞でも同様であった. この事より, リポソームの投与によっても TGF- β 1 産生に変化はないと判断された(Fig 1).

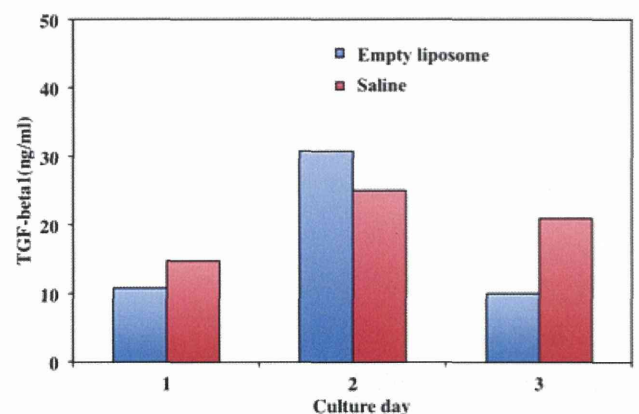


Fig. 1 Production of TGF- β 1
Saline or empty liposome loaded spleen cells were cultured for 3 consecutive days in the presence of Con A (0.3 μ g/ml). TGF- β 1 in the supernatants was assayed in duplicate and the mean values were expressed. The same experiments were done three times and the representative data was shown.

2. LPS 刺激による脾細胞からの IL-1 β の産生

コントロール脾細胞からの IL-1 β 産生は, LPS の濃度依存性に増加した. 同様にリポソーム投与後に摘出した脾細胞からの IL-1 β の産生動態は, コントロールとの相違を認めなかった(Fig. 2).

3. リポソーム少量投与による脾T細胞増殖抑制効果

いままでの検討では、リポソーム20%v/vの投与では、コントロールと比較して明らかにT細胞の増殖が抑制されているが、2%v/vの投与では、明らかな抑制効果は認めなかった。しかし1%v/vを2回投与後に摘出した脾細胞では、明らかな増殖抑制効果を認めた(Fig. 3)。NOの産生を、20%v/v、1%v/v x2、1%v/vの投与量で比較すると、同じ1%v/vを2回投与した場合のNO産生量は、20%v/v1回より低く1%v/v 1回投与より多かった(Fig. 4)。特に1%v/v投与のNO産生量は、生食投与と同等であった。この結果は、1%v/v投与では、T細胞の増殖抑制がかからない事と矛盾しないとともに、低容量のリポソーム投与におけるT細胞増殖の抑制効果も、NOが関与している事を示唆していると考えられる。

D. 考察

(1) リポソーム投与による脾細胞からのTGF-β1に与える影響について

今までの検討では、リポソーム投与によりT細胞の増殖が一過性に抑制される。細胞増殖を抑制する作用をもっているサイトカンの一つにTGF-β1がある。今回の検討では、TGF-β1の産生が、リポソームの投与により増強するという結果は得られなかった。従って、T細胞の増殖抑制にTGF-β1が関与している可能性は低いと考えられる。

いままで、リポソームの投与の自然免疫系の反応性への影響を検討してこなかった。LPSは自然免疫系の反応を荷なっているマクロファージ等の細胞表面に発現しているTLR4を介して、これらの細胞からのIL-1βの産生と分泌を促すことが知られている。リポソームは脾マクロファージが捕捉することから、それにより、マクロファージのIL-1β産生・分泌量が影響を受ける可能性がある。そこで、リポソーム投与後の脾細胞をLPSで刺激し、IL-1βの産生・分泌動態を検討した。IL-1βの分泌は、リポソーム投与の有無に関わらず、LPSの濃度依存性に

増加し、3 μg/mlの濃度でpeakに達した。

この事から、リポソームを捕捉したマクロファージが、細菌感染等に伴って過剰なIL-1βを産生する可能性は少ないと考えられる。即ち、リポソームは自然免疫系を刺激するポテンシャルはないものと判断される。

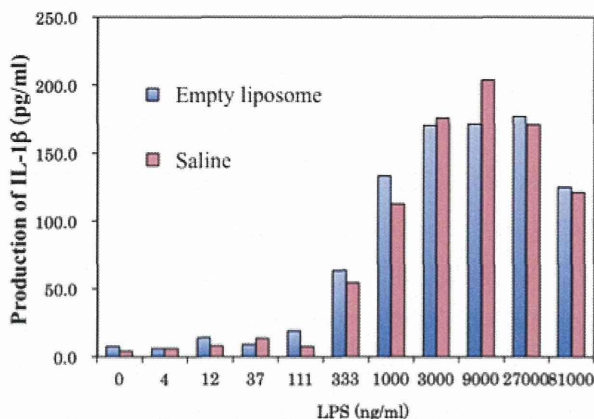


Fig. 2 Saline or liposome loaded spleen cells were cultured for 24 hours in the presence or absence of LPS at the indicated concentration. Then, IL-1β in the supernatant was assayed in duplicate and mean values were expressed. The same experiment were done three times and representative data was shown.

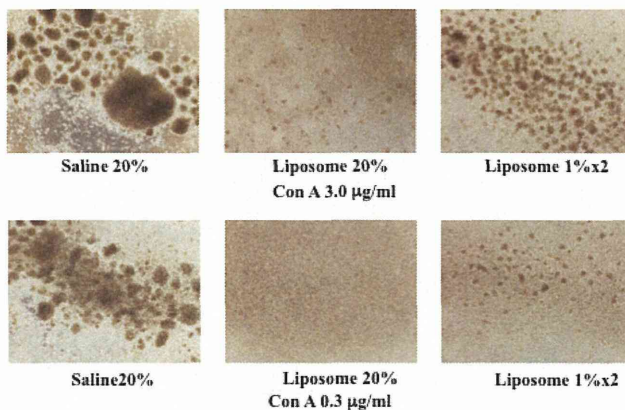


Fig. 3. Effect of small amount of empty liposome on Con A induced splenic T cell proliferation. As previously reported, injection of 20%v/v of liposome clearly suppressed T cell proliferation and no inhibition was observed in case of 2%v/v injection. However, injection of 1%v/v twice at 12 hours interval was shown to suppress T cell Proliferation.

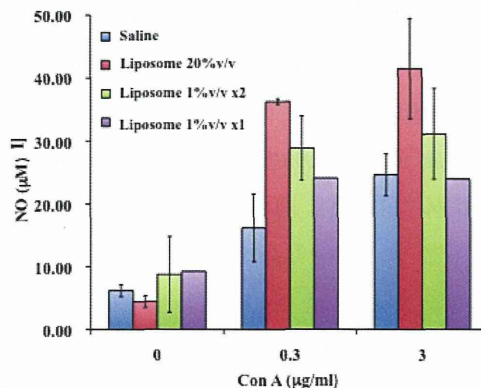


Fig. 4 Production of Nitric oxide during culture. Spleen cells derived from indicated dose of liposome solution were culture in the presence or absence of Con A for 72 hours. Then, NO in the supernatant was assayed. Experiments were performed 3 times and each data were collected and expressed as mean±S.D. Each bar represents S.D.